注入材料としての架橋型注入用コラーゲン

古川 太一・田村 悦代・小倉 雅實・北原 哲
井上 鐵三

Behavior of Cross-linked Collagen as a Bioimplant

Taichi Furukawa, Etsuyo Tamura, Masami Ogura,
Satoshi Kitahara and Tetsuzo Inouye

Silicone has been used for soft-tissue augmentation in Japan, however injectable collagen is taking over silicone because of latest reports on the carcinogenesis of silicone. This study examined histological changes over time (up to 180 days) of three types of injectable collagen (3% non cross-linked, 6.5% non cross-linked and 6.5% cross-linked), which were injected into hip muscles of mice. Each type of collagen was not absorbed and remained in a mass among muscle tissue at any time of the study. 3.5% non cross-linked type showed mild degeneration and foreign body reaction. 6.5% non cross-linked type showed severe degeneration with carcification and many foreign body giant cells in the implant. This might suggest possibility of further granuloma formation. 6.5% cross-linked type showed little degeneration and foreign body reaction and it seemed that wound healing process finished earlier than that for the other two types. Cross-linked collagen was shown in this experiment to persist as a stable bioimplant.

Key words: 注入用コラーゲン, 架橋型コラーゲン, 組織学的検討

緒 言

従来本邦では、一側声帯麻痺などに対する vocal rehabilitation としての声帯内注入術にシリコンが用いられてきたが、最近では欧米での発癌性などの報告^{1, 2)}もあり、シリコンに代る注入材料としてコラーゲンが注目されている^{3, 4)}。しかし、異種タンパクによる抗原抗体反応を減少させ、可溶化させるためにテロペプチドが除去された未架橋の状態であるために組織内での安定性が悪いなどの問題点があった。

今回我々は、本邦で新たに開発された架橋型アテロコラーゲンの組織内での安定性を従来より使用されてきた未架橋型アテロコラーゲンと比較し、その組織学的変化を経時的に検討し若干の知見を得たのでここに報告する。

実 験 方 法

生後6週のBALB/Cのマウス雄30匹(平均体重200g)の臀筋内に、1) 3%未架橋型アテロコラーゲン、2) 6.5%未架橋型アテロコラーゲン、3) 6.5%架橋型アテロコラーゲンをそれぞれ0.2ccずつ注入し、注入後24時間、7日、17日、30日、90日、180日の各時点における組織学的な変化を、10%ホルマリン固定後のパラフィン切片を作成し、比較検討した。

結 果

3%未架橋型アテロコラーゲン注入例では、注入後24時間で機械的な刺激のためかコラーゲン周囲に好中球やリンパ球の浸潤が軽度認められた。7日後にはコラーゲンを取り囲むように線維芽細胞が出現した。30日後にはコラーゲン周囲の被膜形成はより明らかに認められたが、コラーゲン自体の変性も17日には始まっており、さらに変性の進んだ状態であった。一部で血管新生を示したり、コラーゲンの変性に伴う異物巨細胞が出現する部分も見られた。90日後では被膜には包まれているが30日後よりさらにコラーゲンの変性が進んでおり、180日後では、変性に伴う異物反応も減少し、周囲に膠原線維の被膜を形成し被包化された異物として残存していた(図1, 2)。

6.5%未架橋型アテロコラーゲン注入例では、注入後30日以前では3%未架橋型アテロコラーゲン注入例とあまり変わらず、線維芽細胞がコラーゲン周囲を取り囲むような変化が見られた。しかし30日以降ではコラーゲンの変性や石灰化、それに伴う異物巨細胞の出現が随所に認められ、90日、180日後ではさらにそれらが進行している状態であった(図3)。

6.5%架橋型アテロコラーゲン注入例では、注入されたコラーゲンの線維が太く未架橋型の様に一様ではなかったが、注入後24時間では他のコラーゲン同様にリンパ球や好中

図1 3%未架橋型アテロコラーゲン注入例

24時間後 (×66)	7日後 (×66)
30日後 (×66)	90日後 (×66)
180日後 (×33)

図2 3%未架橋型アテロコラーゲン注入例

(上段) 血管新生が認められる。(矢印) (×66)
(下段) 異物巨細胞を認める。(矢印)

図3 6.5%未架橋型アテロコラーゲン注入例

24時間後 (×66)	7日後 (×66)
30日後 (×66)	90日後 (×33)
180日後 (×13.2)	

球の浸潤を認め、7日後にはコラーゲン内に線維芽細胞が浸潤しており、30日後にはさらに奥にまで浸潤する細胞も一部認められた。90日経った時点ではコラーゲン自体の変性も特に見られず、むしろコラーゲン内の細胞浸潤も鎮静化するよう思われた。180日後では内部への線維芽細胞の出現の程度もさらに減少し、注入直後の状態と較べてもコラーゲンの変性は特に認められなかった(図4)。

考 察

1962年 Arnorld は、注入材料としての条件を、①組織反応が少なく、腫瘍などを形成しない。②注入後も移動や拡散が無く、吸収されず長期に安定している。③注入し易い。以上の様に述べている⁵⁾。そして、これらの条件を完全に満たす物質は、現在でも未だに無いとされている。しかし、これらの3つの条件以上に、たとえば声帯の粘膜波動を障害しない等の条件を満足させる注入材料があれば、声帯内注入術が、単に一侧声帯麻痺のリハビリテーションに留まらず、声帯の術後瘢痕や声帯溝症などといった、粘膜の可撓性が障害された症例に対する治療法としても応用できうことになる。今回この実験ではその第一歩として、特に注入したコラーゲンの組織反応について検討した。

注入材料として本邦で発売されてるアテロコラーゲンは、主にタイプIコラーゲンで構成されており、コラーゲンの主要な抗原決定基であるテロペプチドを酵素処理によって除去して抗原性を低下させているものの、分子間架橋が消失しているために生体内での分解に対しては抵抗性が低く吸収も早い、そのために効果持続期間も短いという問題が残っていた。米国では既に架橋型のザイプラストが注入材料として使用されており、未架橋型に較べて長期に組織内に残存すると言われている⁶⁾。そして今回我々が使用した架橋型コラーゲンは本邦で開発されたもので、水溶性エポキシ化合物による分子間架橋がなされており(図5)、従

図4 6.5%架橋型アテロコラーゲン注入例

24時間後 (×33)	7日後 (×66)
30日後 (×33)	90日後 (×33)
180日後 (×33)

図5 架橋型アテロコラーゲンの架橋部分
(水溶性エポキシ化合物)

来の架橋剤であるグルタルアルデヒドを用いたものより細胞毒性において、より安全と思われる。

コラーゲン注入法もシリコン注入と同様に異物の注入であることに変わりはなく、異物の処理機転が起こってくる。異物の処理には、肉芽を伴わない吸収・貪食・融解と肉芽を伴った器質化・被包化があると言われている⁷⁾。今回の実験で観察し得た期間では、明らかな吸収・融解は認められなかった。3%未架橋型アテロコラーゲンでは変性が軽度であったため異物反応も少なく、周囲に膠原線維の被膜

を形成し、被包化された異物として組織内に残存していた。しかし注入物質の変性は、6.5%未架橋型アテロコラーゲンで著明であり、コラーゲンが石灰化したことによって異物巨細胞の出現を伴った異物反応が随所に認められた。従来コラーゲンは濃度が高ければ高いほど組織内に留り、注入材料として望ましいのではないかと考えられる傾向があったが、未架橋型の場合、高濃度になると石灰化を起こすために肉芽を形成する可能性があることが証明された。もちろん、これはマウスに対して注入した結果なので、そのま

まヒトに対する反応に当てはめることは危険であるが、コラーゲンの石灰化という現象は、注入用コラーゲンを使用する際の留意点として考慮し、特に粘膜面への未架橋型アテロコラーゲンの注入は慎重にすべきであると思われた。一方、6.5%架橋型アテロコラーゲンでは変性は認められず、コラーゲン内に浸潤していた線維芽細胞も時間を経るに従って少なくなり、異物反応は注入当初より次第に鎮静化する様に思われ、注入材料としての適合性があることが示唆された。

しかし異物注入に対する組織反応は長期に、そして慎重に観察されるべきものであり、今後も追跡調査して行く予定である。

ま と め

未架橋型アテロコラーゲン、および架橋型アテロコラーゲンをマウスの臀筋内に注入し、経時的にその組織反応を観察・検討し以下の結果を得た。

1. 3%未架橋型アテロコラーゲンは、注入後の変性が軽度であり、それに伴う異物反応も軽度であった。注入されたアテロコラーゲンは器質化・被包化されていた。

2. 6.5%未架橋型アテロコラーゲンは、注入後の変性が著しく、異物反応が強く認められた。

3. 6.5%架橋型アテロコラーゲンは、明らかな変性はなく異物巨細胞の出現を認めなかった。組織反応は他の二

者に較べて早期に終了することが示唆された。

参 考 文 献

- 1) Berkel H et al : Breast augmentation. A risk factor for breast cancer? N Engl J Med 326 : 1649~1653, 1992.
- 2) Goldblum RM et al : Antibodies to silicone elastomers and reactions to ventriculoperitoneal shunts. Lancet 340 : 510~513, 1992.
- 3) Knapp TR et al : Injectable collagen for soft tissue augmentation. Plast Reconstr Surg 60 : 398~405, 1977.
- 4) Ford CN et al : Injectable collagen in laryngeal rehabilitation. Laryngoscope 94 : 513~518, 1984.
- 5) Arnold GE : Vocal rehabilitation of paralytic dysphonia. Arch Otolaryngol 76 : 358~368, 1962.
- 6) Ford CN : Histologic studies on the fate of soluble collagen injected into canine vocal folds. Laryngoscope 96 : 1248~1257, 1986.
- 7) 小林忠義 : 異物の処理. 病理学総論 (第二版), 456~462, 医学書院, 東京, 1972.

別刷請求先 〒359 埼玉県所沢市並木3-2

防衛医科大学校耳鼻咽喉科学講座 古川太一