

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	野村研一郎
学位論文題目			
Bilateral motion restored to the paralyzed canine larynx with implantable stimulator (埋め込み型電気刺激装置を用いたイヌ両側喉頭麻痺の再運動化に関する研究)			
共著者名			
國部 勇、片田彰博、Charles T. Wright、Shan Huang、Yash Choksi、Rajshri Mainthia、 Cheryl Billante、原淵保明、David L. Zealear			
掲載雑誌名			
(The Laryngoscope; December 2010, Volume 120, Issue 12, 2399-2409 掲載)			
研究目的			
<p>喉頭は呼吸、発声、嚥下、気道防御と多彩な機能に関与する重要な臓器である。喉頭運動を制御する内喉頭筋は、迷走神経から分枝する反回神経の支配を受けている。反回神経が悪性腫瘍や外科手術等によって損傷されると声門の開大や閉鎖が起こらない喉頭麻痺の状態となり、喉頭の機能は著しく障害される。反回神経は末梢神経であり神経吻合により比較的容易に再生するが、再生の段階では本来の選択的な筋支配が失われた過誤支配が起こり、呼吸や発声に同期した合目的な喉頭運動は回復しない。特に両側喉頭麻痺では開大しない声帯が気道を非常に狭くするので、呼吸困難を軽減するために気管切開や、発声機能を犠牲にした声帯切除術等が必要となり、患者のQOLは著しく低下する。</p> <p>近年、障害された生体機能の回復に電気刺激を用いる機能的電気刺激が様々な領域で行われている。我々はこの機能的電気刺激に注目し、麻痺した喉頭の再運動化を目的とした喉頭ペーシングの基礎研究をすすめてきた。脳深部刺激用の電極を用いたイヌの急性実験では、電極の埋め込み位置や、刺激パラメータについての検討を行い、適正な電気刺激によって正常と同様の声門開大運動を誘発できることを確認した。しかし、電極と刺激装置を完全に体内に埋め込み、長期間使用した際の有効性や安全性については十分な評価がなされていない。よって本研究では、過誤支配による両側喉頭麻痺を有したイヌモデルを製作し、埋め込み型電気刺激装置を用いた喉頭麻痺の再運動化に関して長期間の有効性、安全性についての検討を行った。</p>			

## 材料・方法

### 1. 実験動物モデルの作製

実験には4頭のイヌ（体重21-26kg）を用いた。両側喉頭麻痺モデルの作成は全身麻酔下でおこなった。イヌの頸部を切開し、声門開大筋である後輪状披裂筋（両側）に脳深部刺激用の電極を14.5mm挿入して固定した。電極は埋め込み型電気刺激装置(Genesis XP, SJM-Neuro Division, Inc.)に接続し、刺激装置は頸部に埋め込んだ。その後、両側の反回神経を喉頭の入口部より5cm尾側で切断し、即時吻合を行った。電気刺激のパラメーターは体外式のプログラマーで調節することが可能であり、周波数40Hz、刺激強度2.5-3.0mA、パルス幅1msで、4秒間オン-4秒間オフのサイクルで刺激を行った。

### 2. 最大吸気時の声門面積の経時的な評価

最大吸気時の声門面積の計測は静脈麻酔下で行った。CCDカメラを接続した内視鏡を経口的に挿入し、声帯の運動を動画に記録した。安静呼吸時と、60秒間の二酸化炭素（CO<sub>2</sub>）ガス負荷による呼吸促迫時、の異なる呼吸状態において、それぞれ電気刺激なし、電気刺激ありの2つの条件で記録をおこなった。記録は2週間おきに行い、観察期間は8-20ヶ月とした。記録された動画から最大吸気時の静止面を作成し、画像解析ソフトを用いて声門面積を計測した。異なる動物間の声門面積を比較するために、計測した声門面積の、安静呼吸時の声門の前後径を一辺とする正方形の面積に対する割合を“標準化声門面積”として用いた。

### 3. トレッドミル検査による運動負荷実験

運動負荷実験は、酸素飽和度測定センサーを実験動物に装着し、トレッドミル上を走行させて行った。トレッドミルは3分毎に4段階に速度を上げていき、12分間で完走とした。途中で酸素飽和度が90%以下となった場合は検査を終了し、その時間を運動許容時間とした。検査は2週間おきに、電気刺激なしと電気刺激ありの両方の条件で行い、観察期間は8-20ヶ月とした。

### 4. 嚥下機能の評価

今回用いた電気刺激は、呼吸運動や嚥下運動とは同期していないので、刺激がオンの声門開大中に嚥下運動がおこれば、誤嚥が誘発される危険性が懸念される。よって今回用いた電気刺激装置の安全性について検討するために、電気刺激中の嚥下時に誤嚥が起こるのか検討した。静脈麻酔下で咽頭刺激により嚥下動作を誘発し、声門運動を気管側から内視鏡下に観察した。また誤嚥の有無を確認するために、定期的なバリウムによる嚥下造影検査、胸部レントゲン撮影を行った。

### 5. 組織学的な評価

長期間の電気刺激や電極の留置が筋線維にどのような影響を及ぼすのか検討するために、実験期間終了時に喉頭を摘出し後輪状披裂筋の切片を作成し、HE染色にて筋線維の形態学的な変化について評価を行った。

## 結 果

### 1. 最大吸気時の声門面積の経時的な変化

電気刺激がない条件で、安静呼吸状態から60秒間CO<sub>2</sub>ガス投与を行い、吸気時声門面積の安静呼吸時から呼吸促迫時への変化率について経時的に検討した。神経切断前には、声門は大きく開大し、約1.6倍の増加を認めた。手術後およそ3ヶ月以内の期間では、声帯に動きは認めず、声門面積に変化は認めなかった。手術後およそ3ヶ月以降より、吸気時に正常とは逆に声門が閉鎖する動きを認めるようになり、術後約6ヶ月以降に声門面積の減少率は最低に達し、約0.3倍の声門の減少を認めた。この吸気時の声門閉鎖運動は、神経再支配に伴う過誤支配による現象と考えられた。よって神経再支配は手術後3ヶ月程度より確立してくるものと考えられた。

上記の結果をふまえて、観察期間を手術後90日以内の脱神経期、手術後90日以降の神経再支配期に分けた。60秒間のCO<sub>2</sub>ガス投与による吸気時の標準化声門面積の変化について、電気刺激なし、電気刺激ありの条件下で検討を行った。脱神経期では、電気刺激なしだと声門面積は変化せず、CO<sub>2</sub>ガス投与後の標準化声門面積の平均値は12.6であった。電気刺激ありでは、両側声門のわずかな開大が認められ標準化声門面積の平均値は22.2へと増加した。神経再支配期では、電気刺激なしだと、過誤支配による著しい声門閉鎖を認め、CO<sub>2</sub>ガス投与後の標準化声門面積の平均値は4.55にまで低下した。一方で、電気刺激ありでは、両側声門の非常に大きな開大を認め、標準化声門面積の平均値は30.6へと劇的な増加を認めた。この値は、神経切断前のCO<sub>2</sub>ガス投与により声門が最も開大した時の平均値である33.0と有意差を認めなかった。

### 2. 運動負荷実験に対する運動許容時間の経時的な検討

運動負荷実験の結果、脱神経期の刺激なしの条件では、半数のイヌは12分間の完走が可能であり、残り2頭も完走はできないものの、6分程度はトレッドミル走行が可能であった。これはイヌの両側麻痺喉頭は、ヒトとの声門の形態的な違いより、比較的大きな安静時声門面積を有し、脱神経期にはその面積が維持されているためと考えられた。しかし再支配期になると許容時間の著しい低下を認めるようになり、最終的に全てイヌは運動により即座に呼吸困難をきたし、許容時間は1分以内となった。これは過誤支配による吸気時の声門閉鎖運動により、気道狭窄がもたらされた結果と思われた。その一方で、電気刺激をオンにすると、脱神経期、再支配期の両方の期間とも全てのイヌは12分間の完走が可能となった。電気刺激によってもたらされる声門の開大が運動負荷時の呼吸を改善し、運動許容時間の回復を認めた。

### 3. 嚥下機能に関する安全性の検討

電気刺激による声門の開大中でも、誘発した嚥下時に声門が完全に閉鎖することが全てのイヌで内視鏡下の観察により確認された。また嚥下造影検査でも気管内への流入は認められず、胸部レントゲン写真で誤嚥性肺炎を示唆する所見を認めなかった。

### 4. 組織学的な検討

摘出した後輪状披裂筋の組織標本では、電極を挿入していた部位の周囲にわずかな肉芽の形成を認めたが、筋組織の形態は保たれており、線維化などの異常所見は認められなかった。

## 考 案

喉頭麻痺には、1) 完全な脱神経によって内喉頭筋がまったく収縮しない状態と、2) 内喉頭筋は再支配を受けているがそれが過誤支配となっていて声帯の合目的な動きが認められない、二つの状態が存在する。本研究のイヌモデルにおける呼吸困難症状は、再支配後の過誤支配による吸気時の異常な声門閉鎖によりもたらされていた。その一方で、電気刺激による声門の開大は、脱神経期には効果は小さく、再支配後に大きく回復する傾向が認められた。これは、再支配が確立すると、再生した神経終末を介した生理的な筋収縮が引き起こされるようになるためであると推察された。本研究の結果から喉頭ペーシングを臨床応用する場合には、内喉頭筋が脱神経の状態ではなく、過誤支配であっても神経の再支配を受けていることが重要であると考えられた。

今回用いた一定のサイクルの電気刺激は、呼吸運動に同期していない。しかし、その状態であっても、電気刺激による声門開大は運動負荷時の運動許容時間を大きく回復させた。このことは、呼吸に同期していなくても、電気刺激による声門開大運動が両側喉頭麻痺における呼吸障害の改善に非常に有効であり、気管切開や声帯切除に変わるあらたな治療手段となる可能性を示唆している。

また、電気刺激は嚥下運動にも同期していないため、電気刺激による声門開大時の誤嚥の可能性が懸念されたが、内視鏡下での観察により刺激中も嚥下時には声門が完全に閉鎖することが確認された。嚥下動作中には、咽頭収縮筋からの機械的な圧迫によって他動的に声門閉鎖がおこること、また声門閉鎖筋への神経再支配によって、喉頭に大きな筋活動を必要とする嚥下や上気道反射の際には、電気刺激による声門開大を打ち消すような強い声門閉鎖が起こる可能性が機序として考えられた。

異物である電極との長期的な接触や、持続的な電気刺激による筋線維への影響が懸念されたが、組織学的な検討では電極周囲の僅かな肉芽組織の形成のみであり、長期間の使用に対する有効性と同時に安全性が確認され、埋め込み型電気刺激装置を用いた喉頭麻痺の再運動化は、あらたな治療法としての可能性が示唆された。

## 結 論

1. イヌ両側喉頭麻痺モデルを用いた実験で、電気刺激により声門を開大させる喉頭ペーシングの長期的な有効性と安全性の評価を行った。
2. 内喉頭筋の神経再支配は術後3ヶ月以降から確立され、再支配後には電気刺激によって正常と同等の声門開大運動が誘発された。
3. 運動負荷に対する許容時間は電気刺激により大きく回復させることが確認され、この効果は実験期間終了時まで持続した。
4. 呼吸や嚥下に同期しない電気刺激であっても、電気刺激による声門開大中に嚥下時の声門閉鎖運動が障害されないことが確認された。
5. 組織学的検討で長期間の電気刺激による筋線維の形態学的な変化は認められなかった。
6. 本研究の結果から、埋め込み型電気刺激装置を用いた喉頭ペーシングによる喉頭の再運動化の長期間にわたる有効性と安全性が確認された。




## 引用文献

- 1) Katada A, Van Himbergen D, Kunibe I, et al. Evaluation of a deep brain stimulation electrode for laryngeal pacing. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2008;117:621-629.
- 2) Zealear DL, Dedo HH. Control of paralyzed axial muscles by electrical stimulation. *Acta Otolaryngol* 1977;83:514-527.
- 3) Zealear DL, Rainey CL, Herzon GD, Netterville JL, Ossoff RH. Electrical pacing of the paralyzed human larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1996;105:689-693.

## 参考文献

- 1) Zealear DL, Kunibe I, Nomura K, et al. Rehabilitation of bilaterally paralyzed canine larynx with implantable stimulator. *Laryngoscope* 2009;119:1737-1744.
- 2) 野村研一郎, 片田彰博, 國部勇ら. 機能的電気刺激による神経筋接合部の変化についての検討. *喉頭* 2009;21; 1-5

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	野村 研一郎
<p>審査委員長 <u>坂手尚志</u> </p> <p>審査委員 <u>高野木 薫</u> </p> <p>審査委員 <u>鎌田 泰輔</u> </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Bilateral motion restored to the paralyzed canine larynx with implantable stimulator.            (埋め込み型電気刺激装置を用いたイヌ両側喉頭麻痺の再運動化に関する研究)</p>			
<p>反回神経損傷に対する神経吻合治療では、神経再支配に伴って起こる過誤支配により、合目的な喉頭運動は回復しない。特に両側喉頭麻痺では、開大しない声帯による気道狭小化により、患者のQOLは著しく低下している。本研究は、両側への慢性埋め込み型電気刺激装置の長期間の有用性、安全性について、動物モデルを用いて解析し、両側喉頭麻痺患者への適応の可能性を探った研究である。</p> <p>実験には、イヌを用い、脳深部刺激用電極を両側声門開大筋に埋め込み、埋め込み型電気刺激装置を用いて刺激している。実験は再支配の起こるまでの脱神経期および過誤支配のある神経再支配期の二期に分けて行い、有用性は、CO2 負荷時の吸気時の声門面積、トレッドミルによる運動負荷実験により評価し、安全性は、誤嚥の有無を指標とした嚥下機能の評価、実験後の喉頭筋および周囲組織の組織学的検査により解析している。</p>			

得られた結果は明快で、脱神経期にはわずかな効果しか示さなかった電気刺激が、神経再支配期には、声門面積は正常と優位差なく開大し、運動負荷実験では、最大時間（12 分間）の負荷に耐えて運動可能となり、過誤支配であっても神経再支配がなされれば、極めて有用であることを明らかにしている。また、電気刺激による声門開大中でも誤嚥が生じないことが確認され、組織学的にも異常所見は認められず、安全性においても問題のないことを明らかとしている。

用いた装置は既に脳深部刺激のために既に臨床応用されており、本研究の成果が今後両側喉頭麻痺患者の QOL 向上のための臨床研究の進歩に資するところが大きいと思われる。本論文は既に 2010 年の Laryngoscope 誌に掲載済みであり、論文提出者に対する本論文の内容、関連領域に関する試問に対し、適切な回答が得られ、学力も十分と考えられた。

以上より、本論文は博士（医学）の学位論文に値すると判定された。