

Title	増量法による鼻咽腔閉鎖機能向上に関する実験的研究
Author(s)	松川, 誠
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72227
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

学位論文

增量法による鼻咽腔閉鎖機能向上に

関する実験的研究

大阪大学大学院歯学研究科

口腔科学専攻

顎口腔疾患制御学講座

口腔外科学第一教室

(指導教官：教授 古郷 幹彦)

松川 誠

緒言

鼻咽腔閉鎖機能とは、軟口蓋挙上や鼻咽腔閉鎖により blowing、発音、咀嚼嚥下時における鼻漏出を防止する重要な機能である¹。口蓋裂患者では、軟口蓋の組織欠損や、口蓋帆挙筋の再構成不良、手術瘢痕に伴う軟口蓋の運動性の低下により口蓋形成術後においても、10～25%程度の割合で鼻咽腔閉鎖不全が残存することが報告されている²⁻⁴。山岡⁵は、blowing、発音、嚥下による鼻咽腔閉鎖様式の違いを内視鏡を用いて観察し、発音時に最も鼻咽腔閉鎖不全が生じやすいことを報告した。本邦では発音時における鼻咽腔閉鎖不全に対して、現在スピーチエイドや咽頭弁移植術などを用いて治療を行うことが一般的となっている⁴。

海外ではスピーチエイドや咽頭弁移植術に代わる方法として鼻咽腔周囲組織増量法と呼ばれる治療法が以前より報告されている⁴⁻¹⁰。これは鼻咽腔周囲組織にテフロンやシリコン、コラーゲン等の医療材料や自家脂肪組織を注入することで鼻咽腔を物理的に狭小化し、鼻咽腔閉鎖機能を向上させる方法である。この方法では、鼻咽腔形態を根本的に変えることなく、鼻咽腔閉鎖機能を賦活化することができ、低侵襲かつ再処置が可能であることから、小児期の成長に合わせた治療を提供することも可能である。しかしながら、術後の鼻咽腔閉鎖機能の改善程度に関して統一見解はなく、適切な注入材料について比較検討された報告もなされていないため、現時点では咽頭弁移植術に代わる方法として確立されているとはいえない。

これまで、当教室ではビーグル犬を用いて鼻咽腔周囲組織増量法における最適な注入部

位について検討を行ってきた。その結果、軟口蓋鼻腔側への注入が最も効率よく鼻咽腔閉鎖機能を向上することが可能であり、さらに鼻腔吸気に影響を与えにくいことを示した。しかしながら、術後の中長期的な安定性や適切な使用材料については検討していない。今回私は、ビーグル犬を用いてヒアルロン酸ナトリウム、コラーゲンおよび自家脂肪組織を用いて軟口蓋鼻腔側増量法を施行し、経時的に鼻咽腔閉鎖機能の評価を行い、術後の安定性ならびに適切な材料について検討を行った。

研究方法

本研究における実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の規定（動物実験委員会承認番号：動歯-29-004-0）と動物の受護および管理に関する法律を遵守して行った。

実験動物

実験には、生後 10 ヶ月齢、体重 10 kg 程度のビーグル犬（TOYO ビーグル：オリエンタル酵母、東京、日本）を用いた。実験動物はゲージで固形飼料を用いて飼育し、自由摂食・摂飲とした。実験動物は処置前日より絶食とした

術式

実験動物を全身麻酔下にて仰臥位に固定し、内視鏡下（i-Vets イメージシステム動物用内視鏡 Vet. スコープ 8.0[®]：SCET）で注入治療用ニードル（InterjectTM[®]23G, Boston Scientific, Natick, USA）を用いて、医療材料および自家脂肪組織を軟口蓋鼻腔側の鼻咽腔閉鎖面（軟口蓋前方より 3/4 の位置）に 2ml の注入を行った（図 1）。軟口蓋の最前方正中には 8mm 程度の切開を加え、内視鏡挿入孔を作製した。

注入材料にはヒアルロン酸ナトリウム（ヒアルロン酸 Na 関節注 25 mg[®]：サワイ、大阪、日本：ヒアルロン注入群 (N=3)）、アテロコラーゲン（コーケンアテロコラーゲンインプラ

ント®:高研、東京、日本:コラーゲン注入群 (N=3))、遊離自家脂肪組織 (脂肪注入群 (N=4))
を用いた。自家脂肪組織は、腹腔内側の大網より採取したものを Coleman の方法¹¹を参考
にして精製した。すなわち、採取した脂肪組織から目視的に血管組織を取り除き、遠心処理
(3000rpm、3 分間)にて、3 層に分離させ (上層:破碎脂肪細胞からの油分、中層:脂肪細胞、
下層:血液、水分、リドカイン)、中層のみを使用した。

全身麻酔は、塩酸メデトミジン (0.02 mg/kg、ドミツール®:日本全薬工業株式会社、福
島、日本)、ミダゾラム (0.3 mg/kg、ドルミカム®:アステラス製薬株式会社、東京、日本)、
酒石酸ブトルファノール (0.2 mg/kg、ベトルファール®、Meiji Seika ファルマ株式会社、
東京、日本)を筋肉内注射した。麻酔深度はⅢ期 I 相程度とし、すべての実験は自発呼吸下
に行った。局所麻酔には 1%リドカイン塩酸塩 (キシロカイン注射液「1%」®:アストラゼ
ネカ株式会社、大阪、日本)による浸潤麻酔法を用いた。実験中は動物体温保温器 (アイリ
スオーヤマ、宮城、日本)を用いて直腸温度を 36.0~38.0°Cに保った。

気道は、カフ付き気管チューブを気管内に挿入することで確保した。

評価方法

ヒアルロン酸注入群、コラーゲン注入群、脂肪注入群の 3 群に対し、軟口蓋挙上運動時の
口蓋帆挙筋筋活動・鼻咽腔閉鎖圧 (実験 1) および鼻腔気流量 (実験 2)、鼻咽腔の開存度
(実験 3)にて鼻咽腔閉鎖機能の評価を行った。いずれの実験においても軟口蓋挙上運動は、

栗本の方法¹²に準じて誘導した。すなわち、気管内挿管されたカフ付き気管チューブを麻酔用バッグに接続し、自発呼吸下にて呼気を再吸入させる負荷呼吸条件を作成した。負荷呼吸条件下では、体内の動脈血酸素分圧の低下および動脈血二酸化炭素分圧の上昇が起こり、迷走神経活動を介し、補助呼吸筋である口蓋帆挙筋の活動が促進され、軟口蓋挙上運動を誘導することが可能となる。全実験を通じて負荷呼吸条件下にて SpO₂ が 80% となった時点で計測を開始した。

実験 1 口蓋帆挙筋筋活動・鼻咽腔閉鎖圧

軟口蓋挙上運動時の口蓋帆挙筋筋活動を三村ら¹³の方法に準じて術前および術後 1・2・3・4・5・6 ヶ月時点で記録した (図 2)。記録電極には直径 0.2mm の銀線 (ユニークメディカル社、東京、日本) を用いて作製した双極有鉤針金電極を使用した。刺入部位は口蓋帆挙筋の軟口蓋の付着部位である挙筋陥没とし、電極間距離は 2mm とした。得られた筋電図は、Bio Amplifier (DAM50[®]、World Precision Instruments、東京、日本) にて増幅し、AD コンバーター (PowerLab[®] : AD instruments Japan、愛知、日本) を通し、パーソナルコンピュータ (U24a-px3210r Windows7:ASUS JAPAN、東京、日本) と専用ソフトウェア (Labchart4[®]:AD Instruments Japan、愛知、日本) を用いて記録した。

鼻咽腔閉鎖圧は術前および術直後、術後 1・2・3・4・5・6 ヶ月時点で後藤の方法¹⁹に準じて軟口蓋挙上運動時の値を記録した。すなわち、鼻咽腔閉鎖面に設置した食道圧測定用バ

ルーンカテーテル（12Fr：CREATE MEDIC 株式会社、神奈川、日本）を圧トランスデューサー（UB-104：ユニークメディカル社）に接続し、AD コンバーターを通してパーソナルコンピューターと専用ソフトウェア（Labchart4[®]）を用いて記録を行った。

口蓋帆挙筋筋活動は、得られた筋電図の生波形をウィンドウ幅 100msec で二乗平均平方根（Root mean Square：RMS）処理を行った後、1 回活動開始から終了までの時間での平均化により定量化した。鼻咽腔閉鎖圧は得られた値の最大値から最小値の差分として算出した。さらに、口蓋帆挙筋筋活動開始より鼻咽腔閉鎖圧が最大値を示すまでの時間を Time Latency とし算出した（図 3）。

実験 2 鼻腔気流量

安静時鼻腔吸気流量ならびに軟口蓋挙上運動時での鼻腔呼気流量（＝呼気鼻漏出量）を栗本の方法¹⁷に準じて術前および術直後、術後 1・2・3・4・5・6 ヶ月時点で測定した（図 4）。すなわち、両側の鼻腔に外径 3.5 mm のプラスチックチューブ（ポリプロピレン製：江戸川物産株式会社、愛知、日本）を挿入し、ゴムチューブ（シリコン製：八興販売、東京、日本）を介して呼吸流量トランスデューサー（TSD117：BioPac 社、東京、日本）に接続した。得られた呼吸流速は汎用アンプ（DA100C[®]：BioPac 社、東京、日本）にて増幅されたのち、Analog output module（HLT100-C[®]：BioPac 社、東京、日本）を通し、パーソナルコンピューターと専用ソフトウェア（Labchart4[®]）を用いて記録した。鼻孔に挿入されたプラスチックチュ

ーブ周囲および軟口蓋最前方正中に作製した内視鏡挿入孔を多目的常温重合レジン（ユニファストⅡ®：GC、東京、日本）を用いて封鎖し、同部より鼻腔気流が漏出しないように留意した。また口呼吸による影響を除外するために、歯科用アルギン酸塩印象材（Hygedent® AD、歯愛メディカル、石川、日本）を用いて上下歯列間および口腔前庭を封鎖し、口腔からの気流漏出を防止した。なお、舌位・下顎位はともに安静位とした

得られた波形の 1 回分の呼吸開始から終了までの範囲で積分値を計測し、呼吸流量を算出した。安静時鼻腔吸気流量および軟口蓋挙上運動時鼻腔呼気流量（＝鼻腔漏出量）を対象に解析を行った（図 5）。

実験 3 鼻咽腔の開存度

術前および術直後、術後 1・2・3・4・5・6 ヶ月時点で安静時ならびに軟口蓋挙上運動時の鼻咽腔形態について内視鏡を用いて観察し、鼻咽腔の開存程度を評価した。内視鏡は軟口蓋最前方正中に作製した内視鏡挿入孔から挿入し、先端は常に軟口蓋前方 1/2 部に固定されるよう留意した。鼻咽腔形態の記録は内視鏡（i-Vets イメージングシステム動物用内視鏡 Vet スコープ 8.0®：SCETI、東京、日本）をイメージプロセッサ（SCETI）へ接続し、パーソナルコンピューターを用いて記録した。さらに内視鏡で観察した安静時および軟口蓋挙上運動時の鼻咽腔の開存度を<<完全閉鎖>>、<<一部に間隙あり>>、<<全体に空隙あり>>の 3 形態で分類した。さらに<<完全閉鎖>>を 1 点、<<一部に間隙あり>>を 2 点、<<全体に間

隙あり>>を3点と点数化し、鼻咽腔の開存度を定性的に評価した(図6)。

実験4 組織学的評価

術後6ヶ月時点で実験動物を塩化カリウムの心腔内投与にて安楽死させた。軟口蓋を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン溶液にて浸漬固定後、組織包埋用パラフィンで包埋した。この試料から4 μ m薄切切片を作製し、H-E染色を行った。画像解析ソフトImage J(NIH, USA)を用いて、軟口蓋厚、口蓋帆挙筋厚および鼻腔側粘膜厚を測定した(図7)。その後、軟口蓋厚および口蓋帆挙筋厚を最も注入操作による厚みの変化を受けにくい鼻腔側粘膜厚で除し、正規化を行った。

統計学的解析

データは中央値(四分位範囲)で示した。術前の全データおよびヒアルロン酸注入群、コラーゲン注入群、脂肪注入群における術後6ヶ月時点でのデータを用いて、Kruskal-Wallis test post-hoc Mann-Whitney's U testを用いて統計学的解析を行った。解析ソフトはR2.8.1(CRAN)を使用し、P値0.05未満を有意とした。また、参考として同条件のビーグル犬に咽頭弁移植術(:咽頭弁移植術群(N=2))を施行し、術後1年経過した時点で実験1、2を行った際の値とも比較検討を行った。

研究結果

実験 1 口蓋帆挙筋筋活動・鼻咽腔閉鎖圧

1-1 口蓋帆挙筋筋活動

口蓋帆挙筋筋活動（RMS 平均値）は、ヒアルロン酸注入群では術後 1 ヶ月時点で最大値（0.029V）を示し、その後減少傾向を認め、術後 6 ヶ月時点で術前と同程度の値（0.016V）を示した（表 1）。コラーゲン注入群では術後 3 ヶ月時点までは上昇傾向（0.036V）を認めるが、その後減少傾向を認め、術後 6 ヶ月時点では術前と同程度の値（0.021V）を示した。脂肪注入群では術後 3 ヶ月時点から上昇傾向を認め、術後 6 ヶ月でも最大値（0.042V）を維持したままであった。

RMS 平均値における術前の全データと術後 6 か月時点での各群の値および咽頭弁移植術群の値を比較すると、脂肪注入群のみ術前と比較して有意に上昇を認めた（図 8）。また、脂肪注入群は、咽頭弁移植術群と比較しても大きな値を示した。

以上によりヒアルロン酸注入群・コラーゲン注入群においては術後 6 ヶ月時点で軟口蓋増量に伴う口蓋帆挙筋筋活動は変化しないことが分かった。しかし、脂肪注入群では術後 6 ヶ月時点で口蓋帆挙筋筋活動が増強されることが明らかとなった。

1-2 鼻咽腔閉鎖圧

鼻咽腔閉鎖圧は、ヒアルロン酸注入群では術後 1 ヶ月時点で最大値（15.2mmHg）を示し、

その後経時的に減少傾向を認め、術後 6 ヶ月時点で術前と同程度の値 (3.65mmHg) を示した (表 2)。コラーゲン注入群では術後 1 ヶ月時点で最大値 (7.22mmHg) を示し、術後 2 ヶ月時点で減少 (4.20mmHg) を認めるもの、その後は比較的安定した値 (4.76-5.70 mm Hg) を示した。脂肪注入群では術後 1 ヶ月時点で最大値 (10.67mmHg) を示し、術後 2 ヶ月時点で術前と同程度の値 (3.91mmHg) を示し、その後は比較的安定した値 (6.12-7.04 mm Hg) を示した。

鼻咽腔閉鎖圧における術前の全データと術後 6 か月時点での各群の値および咽頭弁移植術群の値を比較すると、脂肪注入群のみ術前と比較し有意に上昇を認めた (図 9)。また、脂肪注入群は咽頭弁移植術群と比較しても同程度の結果であった。

以上によりヒアルロン酸注入群・コラーゲン注入群においては術後 6 ヶ月時点で軟口蓋増量に伴う鼻咽腔閉鎖強度は変化しないことが示された。脂肪注入群においては術後 6 ヶ月時点で鼻咽腔閉鎖強度を向上させることが明らかとなった。

1-3 Time Latency

Time Latency は、ヒアルロン酸注入群・コラーゲン注入群・脂肪注入群のいずれにおいても術前から変化を認めなかった (表 5)。

Time Latency における術前の全データと術後 6 か月時点での各群の値および咽頭弁移植術群の値を比較すると、いずれの群間においても有意差は認めなかった (図 10)。また、い

ずれの群においても術後 6 ヶ月時点の値は、咽頭弁移植術群と同程度の値であった。

以上により注入材料によらず軟口蓋増量法では軟口蓋挙上速度を変化させないことが明らかとなった。

実験 2 鼻腔気流量

2-1 安静時鼻腔吸気流量

安静時鼻腔吸気流量は、ヒアルロン酸注入群・コラーゲン注入群・脂肪注入群のいずれにおいても術前と比較し、減少傾向を認めるものの、0L となることはなかった (表 4)。

安静時鼻腔吸気量における術前の全データと術後 6 か月時点での各群の値および咽頭弁移植術群の値を比較すると、いずれの群間においても有意差は認めず、咽頭弁移植術群と同程度の値を示した (図 10)。

以上により注入材料によらず、軟口蓋増量法は安静時の鼻腔吸気流量を消失させないことが示された。

2-2 軟口蓋挙上運動時鼻腔呼気流量 (=鼻腔漏出量)

軟口蓋挙上運動時の鼻腔呼気流量は、ヒアルロン酸注入群・コラーゲン注入群・脂肪注入群のいずれにおいても術前と比較し減少を認めた (表 5)。

軟口蓋挙上運動時の鼻腔呼気流量における術前の全データと術後 6 か月時点での各群の

値および咽頭弁移植術群の値を比較すると、いずれの群においても術前と比較し、有意に減少を認め、咽頭弁移植術群と同程度の値を示した（図 12）。

以上により注入材料によらず、軟口蓋増量法は鼻腔漏出量を減少させることが明らかとなった。

実験 3 鼻咽腔開存度

安静時の鼻咽腔形態は、いずれの群においても術後 1 ヶ月から鼻咽腔全体に間隙を認めた（図 13A）。また、軟口蓋挙上運動時では、いずれの群においても術後 1 ヶ月より経時的に鼻咽腔の間隙の拡大を認めた。コラーゲン注入群・脂肪注入群においては、術後 6 ヶ月の時点でも<<一部間隙あり>>に留まったものの、ヒアルロン酸注入群では術後 5 ヶ月で全体に間隙が広がる傾向があることが明らかとなった（図 13B）。

以上により注入材料に関わらず、経時的に鼻咽腔間隙が拡大し、特にヒアルロン酸注入群で著しいことが示された。また、これは注入材料の経時的な吸収によるものであることが示された。

実験 4 組織学的評価

未処置（参考）と各群の術後 6 ヶ月時点での組織の計測結果より、軟口蓋厚/鼻腔側粘膜厚は脂肪注入群で最大値（193）が示された。口蓋帆挙筋厚/鼻腔側粘膜厚の中央値はいずれ

の群も大差ないものの、脂肪注入群での一部症例では非常に大きな値（107）を示した。

各群の軟口蓋組織像では、ヒアルロン酸注入群の一部症例で注入部位に脂肪組織を認め、コラーゲン注入群では全例に注入部位に線維組織を認めた。脂肪注入群では注入部位周囲に線維組織およびリンパ管もしくは血管と思われる管構造を認め、一部症例ではわずかに脂肪組織を認めた（図 15）。

考察

本研究は、スピーチエイドや咽頭弁移植術に代わる治療法となりうる軟口蓋増量法について、術後の安定性および材料による違いを生理学的小および組織学的に検討したものである。その結果、注入材料に関わらず、軟口蓋増量法は術後6ヶ月間において呼気鼻漏出量を明らかに減少させることが示された。また、Time Latencyについては術前後で変化しないことから、軟口蓋挙上運動を阻害しないことも明らかとなった。しかし、内視鏡による定性評価から注入材料の経時的な吸収が示唆され、長期的な予後については今後さらなる検討が必要である。

安田¹⁵は、家兎の耳介皮下にヒアルロン酸製剤およびコラーゲン製剤を注入し、組織反応および皮膚の膨隆効果について検討し、ヒアルロン酸群では皮膚の膨隆は注入後60日で肉眼的に消失することを示した。病理組織学的には炎症細胞の浸潤が注入早期に観察されるものの、注入後14日には消失し、ヒアルロン酸も術後180日ではほぼ吸収されることを示した。一方、コラーゲン群では皮膚の隆起は注入後60日間にわたり変化しないものの、90日頃から強い炎症反応に伴う肉芽形成が生じることで増大し、その状態で180日目まで維持されることを示した。病理組織学的には炎症細胞の浸潤が注入早期から継続して認められ、その後線維芽細胞の遊走・増殖、血管新生が生じ、注入コラーゲンは徐々に線維組織に置換されることを示した。本研究におけるヒアルロン酸注入群での内視鏡所見においても経時的な鼻咽腔間隙の拡大を認めており、組織学所見からも注入ヒアルロン酸の残存は認めな

いことから、過去の報告と一致した。コラーゲン注入群においても過去の報告と同様に、内視鏡所見により術後 3 ヶ月時点での軟口蓋挙上運動時の鼻咽腔間隙の縮小を認め、組織学的には注入部位に線維組織の増生を認める結果となった。

また、Kitahara¹⁶らは、イヌの声帯を用いて注入直後のコラーゲンの体積変化について組織学的に検討を行い、コラーゲン製剤に含まれる水分の吸収やコラーゲン製剤の刺入孔からの漏出、組織への拡散が注入直後のコラーゲンの体積減少の原因であるとしている。さらに筋層内へ注入されたコラーゲン製剤は組織内へ拡散しやすいのに対し、粘膜内へ注入されたコラーゲン製剤は一塊として留まりやすいことも併せて報告している。このことより、コラーゲンをを用いた軟口蓋増量効果を維持するには、筋層内ではなく粘膜層にコラーゲンを注入するほうが効果的であると思われた。

脂肪注入においては数々の検討がなされている。Leong¹⁷らは、ヒトの皮下へ脂肪注入した際、周囲より十分な血流が得られなければ1年以内に注入脂肪の30-70%は吸収されると述べている。Coleman¹⁸は移植脂肪の組織学的挙動を検討したところ、注入後1週間では移植部位に炎症反応が生じ、注入後3ヶ月では注入脂肪が線維組織に置換されることを報告した。Jose¹⁹らは、ラットの大腿部を用い組織の層ごとの脂肪生着率について検討を行い、皮下への注入よりも筋層への注入が脂肪の生着には適していることを示している。これは移植床が筋層である方がより血流が豊富であるためとしている。本研究での組織像においても、注入部位に線維組織や血管新生は認めるものの、脂肪生着は一部症例の筋層付近に認

めるのみであり、過去の報告と同様であった。これらを考慮すると、脂肪を用いた軟口蓋増量法においては、コラーゲンをを用いた場合と異なり、粘膜層ではなく、筋層への注入が望ましいと思われる。しかし、血管内への脂肪誤注入のリスクもあるため、十分な検討が必要である。

また、本研究で軟口蓋増量法は注入材料によらず軟口蓋挙上運動時の鼻漏出量を減少させ、その効果は咽頭弁移植術と同等であることが明らかとなった。過去の報告では、臨床において軟口蓋よりも咽頭壁に脂肪注入する報告が多いが、Boneti⁹らは鼻咽腔閉鎖不全患者に対し、軟口蓋へ脂肪注入を行い、良好な音声言語機能回復が得られたと報告している。本研究とは条件が異なるが、ヒトにおいても軟口蓋増量法は一定の効果があると思われる。また、Boneti⁹らは軟口蓋への脂肪注入は咽頭壁への注入と比較し、少ない注入量で鼻咽腔閉鎖機能の向上が可能であり、鼻呼吸障害や睡眠障害を起こしにくいとも述べている。しかし、本研究の結果より安静時鼻腔吸気量は完全に消失はしないものの、減少しており、注入量については十分な検討が必要であると思われる。

一方で軟口蓋増量法は、単純に軟口蓋の質量を増加させるため、軟口蓋の挙上を担う口蓋帆挙筋の仕事量は増加することも考えられる。これは軟口蓋挙上装置とは逆の効果であり、22q11 欠失症候群などの口蓋帆挙筋が脆弱な症例では鼻咽腔閉鎖不全を悪化させる危険性をはらんでいる。

本研究は仰臥位で行っており、軟口蓋挙上運動と重力方向は一致し、鼻咽腔閉鎖に有利な

状況となっている。これは軟口蓋増量に伴ってより顕著となり、口蓋帆挙筋はより小さな仕事量で、鼻咽腔閉鎖を達成することが可能となると予想された。しかし、ヒアルロン酸注入群およびコラーゲン注入群において RMS 平均値に有意な変化はなく、脂肪注入群においてのみ有意な上昇を認める結果となった。これにより軟口蓋増量に伴い口蓋帆挙筋の仕事量が増加した結果、RMS 筋活動が向上したという仮説は否定され、脂肪組織そのものに筋活動を向上させる因子が含まれる可能性が示唆された。

脂肪組織には、脂肪細胞、軟骨芽細胞、骨芽細胞、筋芽細胞へ分化可能な間葉系幹細胞が豊富に含まれていることが Zuk²⁰ により報告され、近年注目を集めている。Nishio²¹ らは、イヌの声帯に対して脂肪由来未分化間葉系幹細胞を豊富に含んだ脂肪組織を声帯に注入した結果、注入部位周囲の甲状舌骨筋に肥大が認められたと報告している。また、Coleman²² らは顔面欠損に対して自家脂肪組織を移植すると、周囲皮膚の色調改善や毛包の再生などが認められることを報告した。本研究における結果から、脂肪注入群の一部では、未処置群と比較し口蓋帆挙筋厚/鼻腔側粘膜厚が非常に大きくなっており、これには脂肪組織に含まれた未分化間葉系幹細胞が影響しているのではないかと思われた。

本研究では軟口蓋鼻腔側増量法による鼻咽腔閉鎖機能への影響について検討することを目的としているため、実験動物には口呼吸と鼻呼吸を行うモデルが必要である。イヌは安静時には鼻呼吸であるが、激しい身体活動により著しく換気量が増大した状態では、ヒトと同様に鼻呼吸から口呼吸へ呼吸経路を変換することが知られている。しかし、口呼吸にシフト

しても口腔と鼻咽腔は分離できないため、鼻咽腔閉鎖不全の治療法を検討する本実験のモデルに適している。イヌの口蓋帆は構成する筋肉や神経がヒトと類似しており²³、口蓋帆挙筋には十分な厚みがあるため、筋電図を記録しやすい²⁴。また軟口蓋が長く手術操作を行いやすいことも特徴として挙げられる。加えて当教室では、過去よりイヌを用いて、呼吸運動における口蓋帆の役割¹²、口蓋帆挙筋の鼻咽腔閉鎖における役割およびその支配神経²⁵、口蓋帆挙筋筋活動時の鼻咽腔閉鎖状態の観察および定量化²⁶、鼻腔気流と口蓋帆挙筋筋活動の相互関係²⁷、口蓋帆挙筋及び上咽頭収縮筋筋活動と呼吸の相互関係²⁸など口蓋帆の生理機能を解析し数々の報告を行っており、イヌでの実験系が確立していることから本研究にもイヌを用いた。しかし、イヌには発音に伴う調節機構が存在せず、軟口蓋挙上運動を誘導させるために負荷呼吸条件を用いていることなどから、本実験での研究結果をヒトの発音時にそのまま適応するには十分に検討が必要である。

今後、脂肪幹細胞を含めさらなる検討を加え、ヒトへの臨床応用を行い、鼻咽腔閉鎖不全治療の低侵襲化および短縮化を図っていきたい。

結語

本研究により軟口蓋鼻腔側増量法は呼気鼻漏出を明らかに減少させることが可能であることが示された。また、脂肪注入によって口蓋帆挙筋筋活動および鼻咽腔閉鎖圧の向上が可能であることが示され、口蓋帆挙筋が脆弱な症例への適応についても有用である可能性が示された。今後、さらなる検討を加えて、鼻咽腔閉鎖不全に対する治療に応用していきたい。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えて頂き、終始御懇切なる御指導、御鞭撻を受け賜りました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔疾患制御学講座（口腔外科学第一教室）古郷幹彦教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の立案ならび進行にあたり、終始御教示、御指導いただきました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔疾患制御学講座（口腔外科学第一教室）磯村恵美子先生に深甚なる謝意を表します。最後に本研究の円滑な進展のため、特別な配慮、ご協力を頂きました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔疾患制御学講座（口腔外科学第一教室）の中川記世子先生、三ツ井諒先生ならびに教室員諸兄に深甚なる謝意を表します。

参考文献

1. Nohara K, Kotani Y, Ojima M, Sasao Y, Tachimura T, Sakai T. Power spectra analysis of levator veli palatini muscle electromyogram during velopharyngeal closure for swallowing, speech, and blowing. *Dysphagia*. 2007;22:135-139.
2. Roelof R. Cleft palate;Anatomic and surgical considerations. *Plast Reconstr Surgery*. 1964;33(2):132-147.
3. Brown AS, Cohen MA, Randall P. Levator muscle reconstruction: Does it make a difference? *Plast Reconstr Surg*. 1983;72(1):1-6.
4. Remacle M, Bertrand B, Eloy P, Marbarix E. The use of injectable collagen to correct velopharyngeal insufficiency. *Laryngoscope*. 1990;100(3):269-274.
5. Sipp JA, Ashland JE, Hartnick CJ. Injection pharyngoplasty with calcium hydroxyapatite for treatment of velopalatal insufficiency. *Arch Otolaryngol Neck Surg*. 2008;134(3):268-271.
6. Brigger MT, Ashland JE, Hartnick CJ. Injection pharyngoplasty with calcium hydroxylapatite for velopharyngeal insufficiency: patient selection and technique. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010;136(7):666-670.
7. Filip C, Matzen M, Aagenaes I, Aukner R, Kjoll L, Høgevoid HE, Tonseth K. Autologous fat transplantation to the velopharynx for treating persistent velopharyngeal insufficiency of mild degree secondary to overt or submucous cleft palate. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg*. 2013;66(3):337-344.
8. Lau D, Oppenheimer AJ, Buchman SR, Berger M, Kasten SJ. Posterior pharyngeal fat grafting for velopharyngeal insufficiency. *Cleft Palate-Craniofacial J*. 2013;50(1):51-58.
9. Boneti C, Ray PD, Macklem EB. Effectiveness and safety of autologous fat

- grafting to the soft palate alone. *Ann Plast Surg.* 2015;74(4):190-192.
10. Peck BW, Baas BS, Cofer SA. Injection pharyngoplasty with a hyaluronic acid and dextranomer copolymer to treat velopharyngeal insufficiency in adults. *Mayo Clin Proc Innov Qual Outcomes.* 2017;1(2):176-184.
 11. Coleman SR. Hand rejuvenation with structural fat grafting. *Plast Reconstr Surg.* 2002;110(7):1731-1744
 12. 栗本拓哉. 呼吸運動による口蓋帆の役割. 大阪大学歯学誌. 1989;34(1):240-254.
 13. 三村保. 鼻咽腔閉鎖運動時の軟口蓋筋活動に関する筋電図学的研究. 大阪大学歯学誌. 1972;17(1):1-16.
 14. 後藤友信. 鼻咽腔閉鎖強度とその調節に関する研究. 大阪大学歯学誌. 1977;22(1):87-106.
 15. 安田廣生. ビアルロン酸およびコラーゲン注入後の皮膚組織反応の検討. 金沢医科大学雑誌. 2006;31:233-241.
 16. Kitahara S, Satoh M. A fundamental study of collagen injection in the vocal folds. 日本気管食道学会報. 1990;41(6):417-421.
 17. Leong DTW, Hutmacher DW, Chew FT, Lim TC Viability and adipogenic potential of human adipose tissue processed cell population obtained from pump-assisted and syringe-assisted liposuction. *J Dermatol Sci.* 2005;37(3):169-176.
 18. Coleman WP, Lawrence N, Sherman RN, Reed RJ. Autologous Collagen? *J Dermatol Surg Oncol.* 1993;19:1032-1040.
 19. Guerrerosantos J, Gonzalez A, Masmela Y, Gonzalez M, Deos M, Diaz P. Long-term survival of free fat grafts in muscle: An experimental study in rats. *Aesthetic Plast Surg.* 1996;20(5):403-408.
 20. Zuk P, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Brenhaim P, Lorenz HP,

- Hesrick MH. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7(2):211-228.
21. Nishio N, Fujimoto Y, Suga K, Iwata Y, Toriyama K, Takanari K, Kamei Y, Yamamoto T, Gotoh M. Autologous fat injection therapy including a high concentration of adipose-derived regenerative cells in a vocal fold paralysis model: Animal pilot study. *J Laryngol Otol.* 2016;130(10):914-922.
 22. Coleman SR. Structural Fat Grafting: More Than a Permanent Filler. *Plast Reconstr Surg.* 2006;118(3):108-120.
 23. Howard EE, Alexande DL. Miller's Anatomy of the Dog, Fourth Edition. Elsevier Saunders; 2012:284-303.
 24. Koizumi H. et al. Effect of lung inflation on levator veli palatini muscle activity. *J Dent Res.* 1995;74(5):1235-1239.
 25. 浜口裕弘. 口蓋帆挙筋の鼻咽腔閉鎖における役割と舌咽・迷走神経の関与. 大阪大学歯学誌. 1992;37(1):82-97.
 26. Adachi T, Kogo M, Matsuya T. Measurement of velopharyngeal movements induced by isolated stimulation of levator veli palatini and pharyngeal constrictor muscles. *J Dent Res.* 1997;76(11):1745-1750.
 27. Iida S, Kogo M, Matsuya T, Ishii S, Iida S, Matsuya T. Interaction between afferent input related to airflow through upper airway and activity of levator veli palatini muscle. *Brain Oral Funct.* 1995:587-592.
 28. Kogo M, Tanaka S, Ishii S, Iida S, Matsuya T. Activities of superior pharyngeal constrictor and levator veli palatini muscles related to respiration in dogs. *Cleft palate-Craniofacial J.* 1997;34(4):338-341.

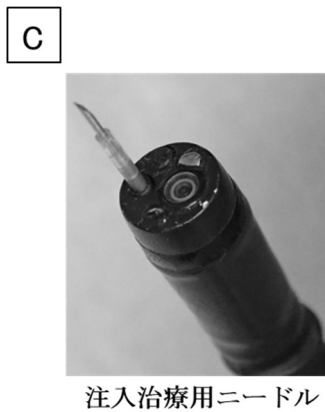
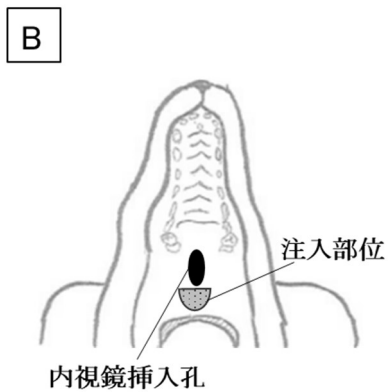
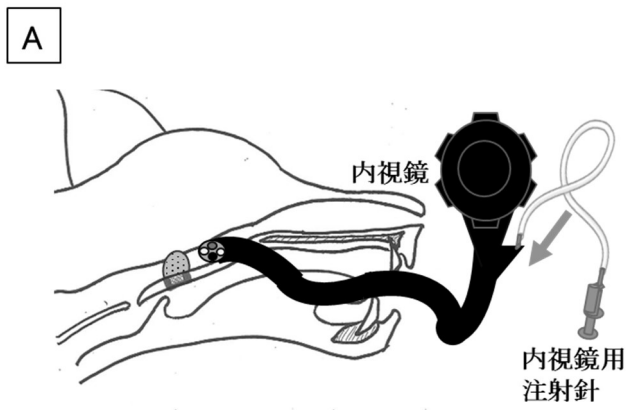


図 1 術式

(A: 矢状断における注入部位 B: 開口位における注入部位 C: 注入治療用ニードル)

軟口蓋最前方正中にモノポーラーにて 8 mm 程度の切開を加え、内視鏡挿入孔を作製し、同部位より挿入した内視鏡にて鼻咽腔閉鎖面（軟口蓋前方より 3/4 の位置）の観察を行いながら注入治療用ニードルを用いて、軟口蓋鼻腔側に注入を行った。

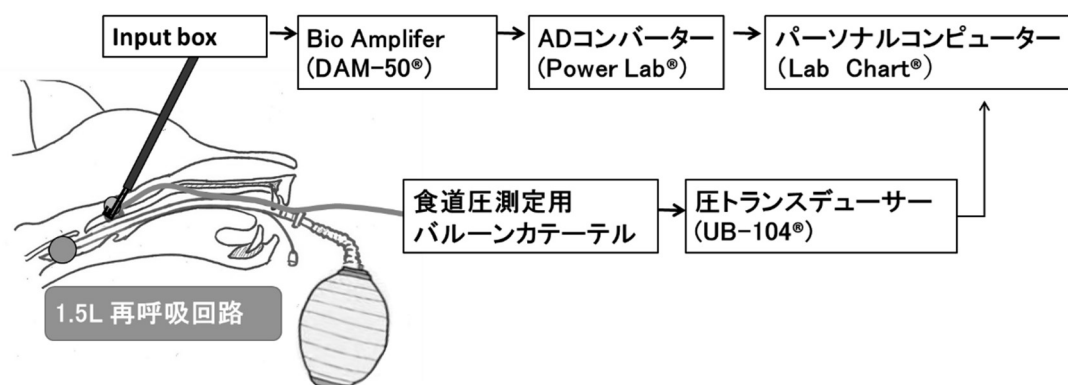


図 2 口蓋帆挙筋筋活動・鼻咽腔閉鎖圧測定

口蓋帆挙筋筋活動は、有鉤針金双極電極（銀製、直径 0.2mm、電極間距離 2mm）を口腔側より挙筋陥没に刺入し測定した。

鼻咽腔閉鎖圧は、12Fr 食道圧測定用バルーンカテーテルを鼻咽腔閉鎖面に設置し、圧トランスデューサーに接続し記録した。

いずれも気管内挿管したカフ付きスパイラルチューブを麻酔用バッグに接続した再呼吸回路を作製し、負荷呼吸条件と軟口蓋挙上運動を誘導した。

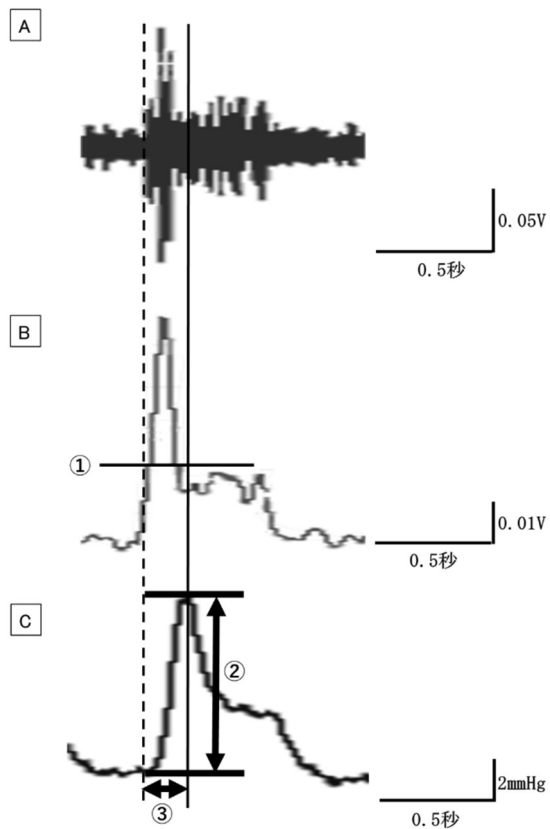


図 3 口蓋帆挙筋筋活動および鼻咽腔閉鎖圧の解析項目

A: 口蓋帆挙筋筋活動時の筋電図生波形

B: RMS 後の筋電図波形

筋電図の生波形をウィンドウ幅 100msec で二乗平均平方根 (Root mean Square:RMS) 処理を行った後、1 回活動開始から終了までの時間での平均化により定量化した (①)。

C: 鼻咽腔閉鎖圧

鼻咽腔閉鎖圧は得られた値の最大値から最小値の差分 (②) として算出した。口蓋帆挙筋筋活動開始より鼻咽腔閉鎖圧が最大値を示すまでの時間を Time Latency とし算出した (③)。

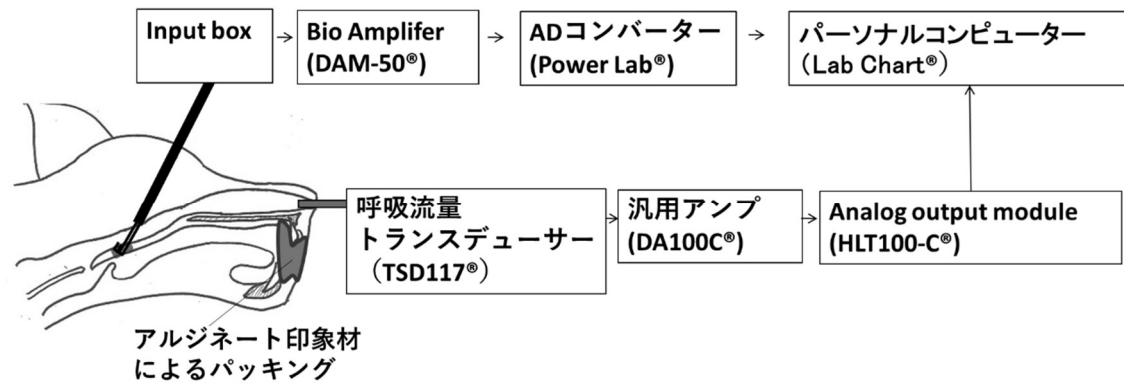


図 4 鼻腔気流量の測定

両側の外鼻孔に外径 3.5 mmのプラスチックチューブ挿入し、呼吸流量トランスデューサーに接続した。プラスチックチューブ周囲および内視鏡挿入孔を多目的常温重合レジン (ユニファストII®:GC、東京、日本)を用いて封鎖し、同部より鼻腔気流が漏出しないように留意した。また口呼吸による影響を除外するために、歯科用アルギン酸塩印象材を用いて上下歯列間および口腔前庭を用いて封鎖し、口腔からの気流漏出を防止した。

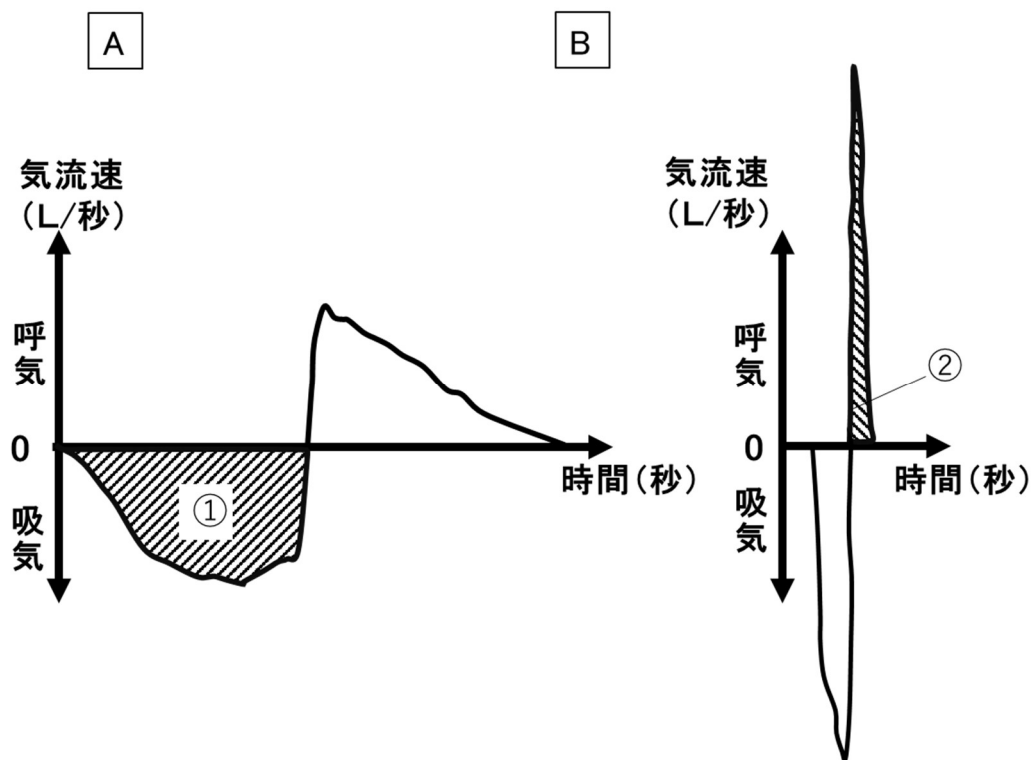


図 5 鼻腔気流量の解析項目 (A: 安静時 B: 軟口蓋挙上運動時)

得られた波形の 1 回分の呼吸開始から終了までの範囲で積分値を計測し、呼吸流量を算出した。安静時鼻腔吸気流量 (①) および軟口蓋挙上運動時鼻腔呼気流量 (= 鼻腔漏出量) (②) を対象に解析を行った。

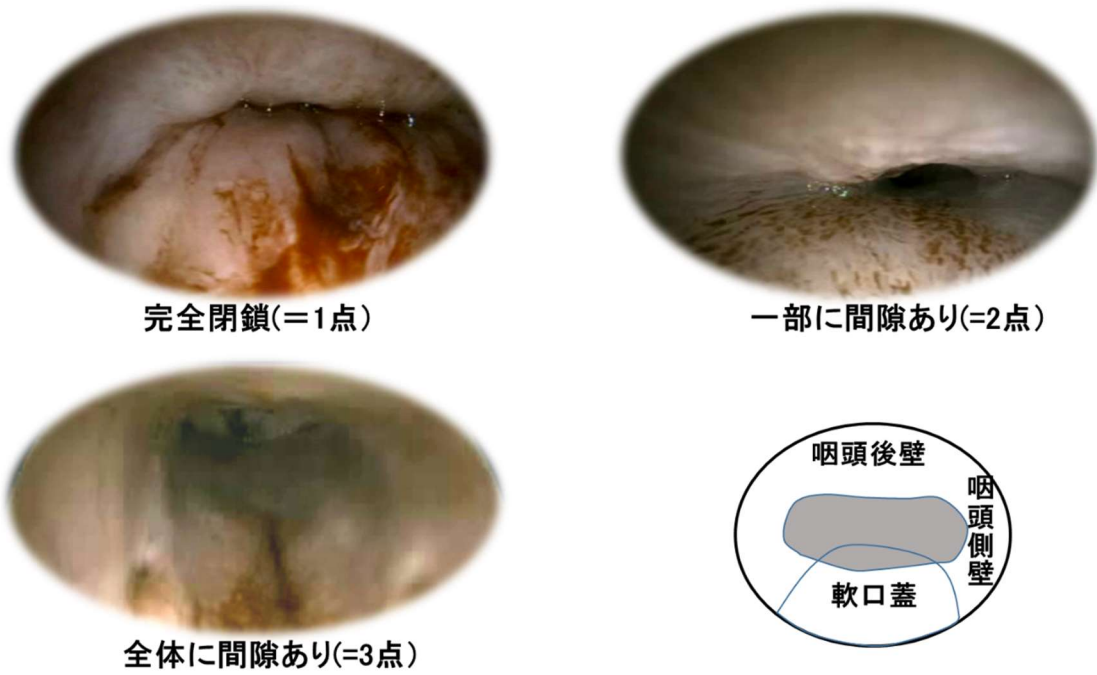


図 6 内視鏡による鼻咽腔開存度の評価

軟口蓋最前方正中に 8 mm 程度の切開を加え内視鏡挿入孔を作製し、同部位から内視鏡を挿入し、先端は常に軟口蓋前方 1/2 部となるよう固定し、安静時および軟口蓋挙上運動時の鼻咽腔形態の観察を行った。《完全閉鎖》、《一部間隙あり》、《全体に間隙あり》の 3 形態が観察され、《完全閉鎖》を 1 点、《一部に間隙あり》を 2 点、《全体に間隙あり》を 3 点と点数化し、鼻咽腔の開存程度を定性的に評価した。

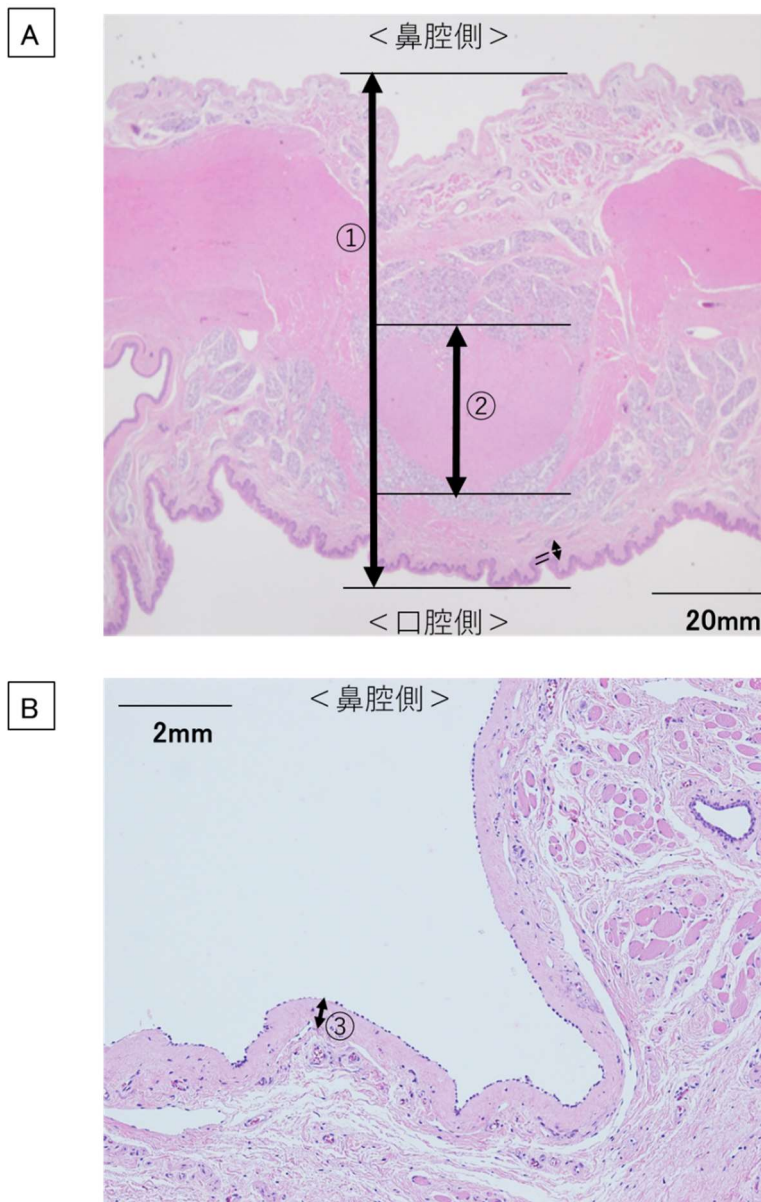


図 7 組織学的評価の計測項目(A:弱拡大像 対物 1 倍、B:拡大像 対物 10 倍)

術後 6 ヶ月時点でのヘマトキシリン-エオジン (H-E) 染色組織像にて画像解析ソフト Image J (NIH, USA) を用いて以下の計測を行った。その後、軟口蓋厚および口蓋帆挙筋厚を鼻腔側粘膜厚で除し、正規化を行った

① : 軟口蓋厚 ② : 口蓋帆挙筋厚 ③ : 鼻腔側粘膜厚。

表1 各群のRMS 平均値

(単位：V)

	ヒアルロン酸注入群	コラーゲン注入群	脂肪注入群
術前	0.017 (0.012-0.035)	0.018 (0.015-0.031)	0.021 (0.017-0.024)
術後1ヶ月	0.029 (0.017-0.038)	0.023 (0.021-0.038)	0.024 (0.016-0.025)
術後2ヶ月	0.026 (0.014-0.029)	0.029 (0.024-0.031)	0.015 (0.010-0.019)
術後3ヶ月	0.014 (0.0061-0.023)	0.036 (0.026-0.036)	0.019 (0.010-0.030)
術後4ヶ月	0.011 (0.0057-0.016)	0.031 (0.031-0.034)	0.028 (0.019-0.038)
術後5ヵ月	0.014 (0.013-0.016)	0.021 (0.020-0.037)	0.042 (0.014-0.061)
術後6ヶ月	0.016 (0.011-0.016)	0.021 (0.015-0.022)	0.042 (0.026-0.043)

 咽頭弁移植術群

術後1年	(0.028-0.033)
------	---------------

中央値 (四分位範囲)

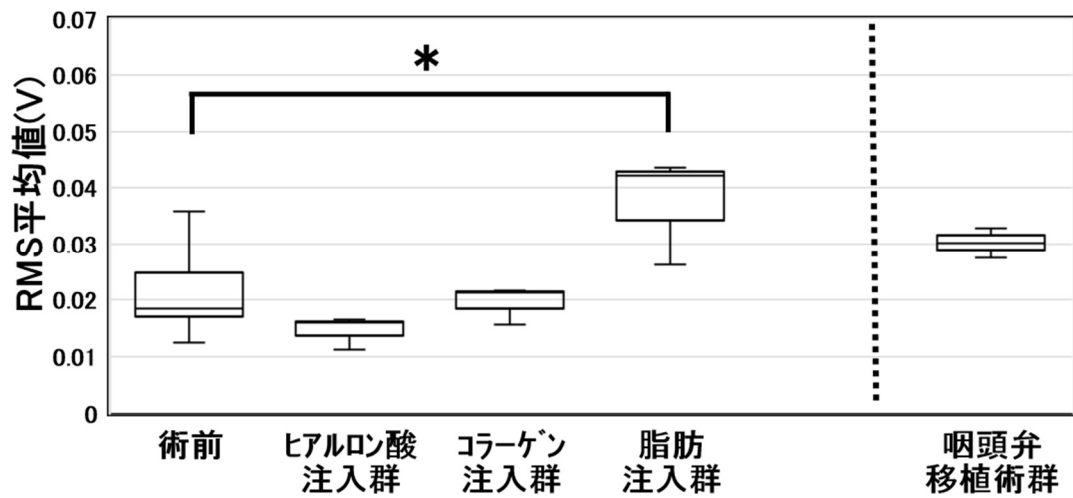


図 8 RMS 平均値の解析結果

RMS 平均値における術前の全データと術後 6 か月時点での各群の値および咽頭弁移植術群の比較を示す。脂肪注入群のみ術前と比較して有意に上昇を認めた。また、脂肪注入群は、咽頭弁移植術群と比較しても大きな値を示した

(Kruskal-Wallis test post-hoc Mann-Whitney' s U test *: $P < 0.05$)

表2 各群の鼻咽腔閉鎖圧

(単位：mmHg)

	ヒアルロン酸注入群	コラーゲン注入群	脂肪注入群
術前	3.16 (2.23-5.04)	2.57 (2.53-3.55)	3.77 (2.12-4.62)
術直後	15.0 (14.7-15.9)	3.35 (3.20-5.66)	8.13 (5.16-11.1)
術後1ヶ月	15.2 (11.1-15.8)	7.22 (3.28-7.48)	10.6 (7.00-13.9)
術後2ヶ月	7.79 (7.64-11.6)	4.20 (2.91-4.82)	3.91 (2.72-5.40)
術後3ヶ月	6.93 (4.47-11.3)	4.76 (3.28-5.93)	6.29 (5.44-7.38)
術後4ヶ月	5.62 (3.91-7.42)	4.79 (3.45-5.77)	7.04 (6.30-8.24)
術後5ヵ月	4.87 (4.09-5.60)	5.71 (3.30-6.37)	6.33 (5.26-7.20)
術後6ヶ月	3.65 (3.54-.18)	5.71 (3.21-5.76)	6.12 (5.42-6.81)

咽頭弁移植術群

術後1年	(4.25-6.84)
------	-------------

中央値 (四分位範囲)

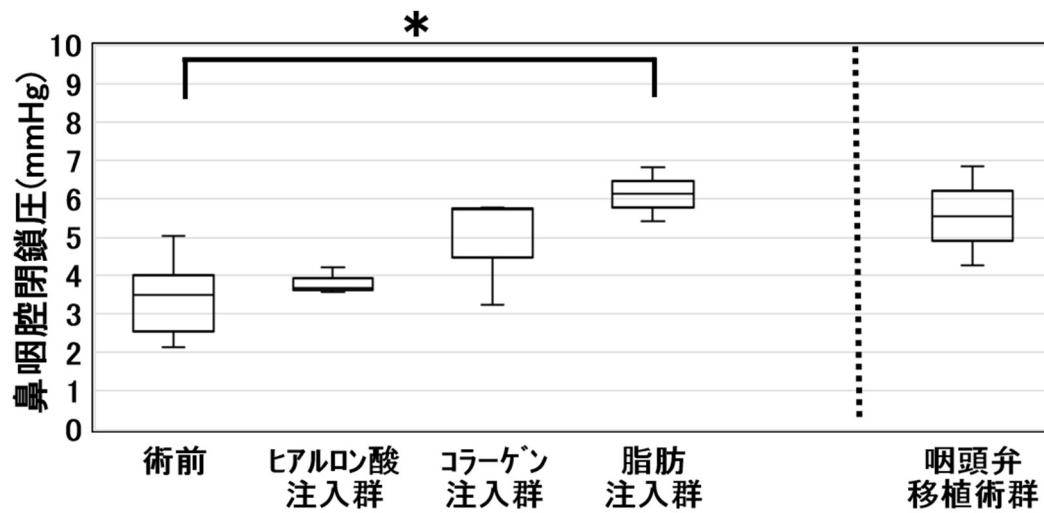


図 9 鼻咽腔閉鎖圧の解析結果

鼻咽腔閉鎖圧における術前の全データと術後 6 か月時点での各群の値および咽頭弁移植術群の比較を示す。脂肪注入群のみ術前と比較し、有意に上昇を認めた。また、脂肪注入群は咽頭弁移植術群と比較して同程度の値を示した。

(Kruskal-Wallis test post-hoc Mann-Whitney' s U test)

表3 各群の Time Latency

(単位：秒)

	ヒアルロン酸注入群	コラーゲン注入群	脂肪注入群
術前	0.14 (0.14-0.18)	0.10 (0.090-0.11)	0.12 (0.10-0.15)
術後1ヶ月	0.14 (0.12-0.16)	0.085 (0.085-0.15)	0.11 (0.09-0.14)
術後2ヶ月	0.12 (0.10-0.14)	0.12 (0.11-0.17)	0.11 (0.10-0.12)
術後3ヶ月	0.14 (0.10-0.17)	0.12 (0.11-0.17)	0.12 (0.11-0.14)
術後4ヶ月	0.14 (0.12-0.15)	0.12 (0.080-0.13)	0.12 (0.11-0.14)
術後5ヵ月	0.13 (0.12-0.14)	0.13 (0.085-0.14)	0.10 (0.095-0.14)
術後6ヶ月	0.13 (0.12-0.15)	0.11 (0.10-0.12)	0.10 (0.090-0.11)

 咽頭弁移植術群

術後1年	(0.11-0.13)
------	-------------

中央値 (四分位範囲)

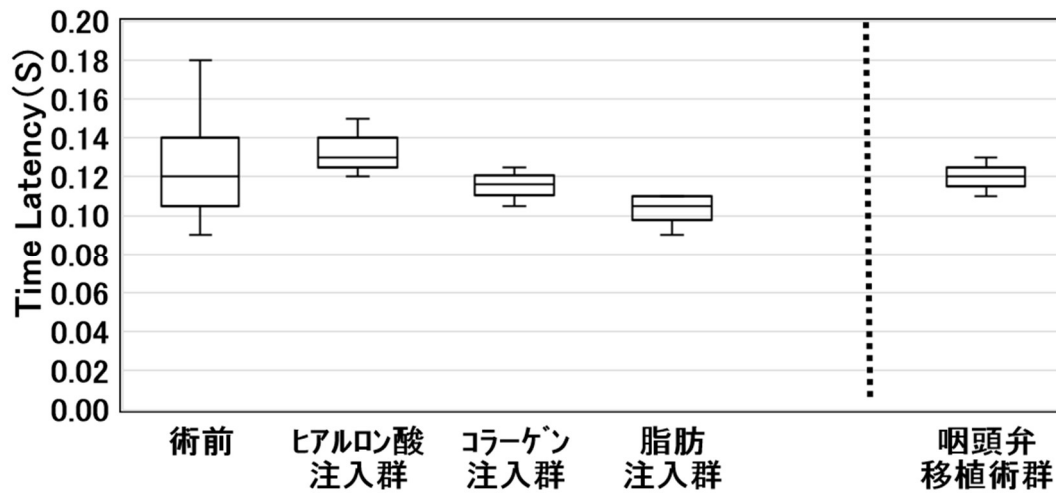


図 10 Time Latency の解析結果

Time Latency における術前の全データと術後 6 か月時点での各群の値および咽頭弁移植術群の比較を示す。いずれの群間においても有意差は認めなかった。またいずれの群も咽頭弁移植術群と比較して同程度の値を示した。

(Kruskal-Wallis test post-hoc Mann-Whitney' s U test)

表4 各群の安静時鼻腔吸気量

(単位:L)

	ヒアルロン酸注入群	コラーゲン注入群	脂肪注入群
術前	0.26 (0.26-0.55)	0.32 (0.12-0.56)	0.16 (0.095-0.36)
術直後	0.12 (0.02-0.13)	0.029 (0.0036-0.10)	0.034 (0.0014-0.12)
術後1ヶ月	0.17 (0.089-0.18)	0.063 (0.043-0.10)	0.081 (0.0075-0.33)
術後2ヶ月	0.20 (0.092-0.32)	0.079 (0.042-0.080)	0.19 (0.093-0.29)
術後3ヶ月	0.080 (0.03-0.46)	0.12 (0.10-0.25)	0.11 (0.081-0.20)
術後4ヶ月	0.065 (0.046-0.37)	0.073 (0.042-0.092)	0.18 (0.077-0.26)
術後5ヵ月	0.14 (0.10-0.17)	0.10 (0.049-0.12)	0.10 (0.054-0.19)
術後6ヶ月	0.092 (0.077-0.15)	0.096 (0.090-0.18)	0.16 (0.10-0.39)

 咽頭弁移植術群

術後1年	(0.058-0.27)
------	--------------

中央値 (四分位範囲)

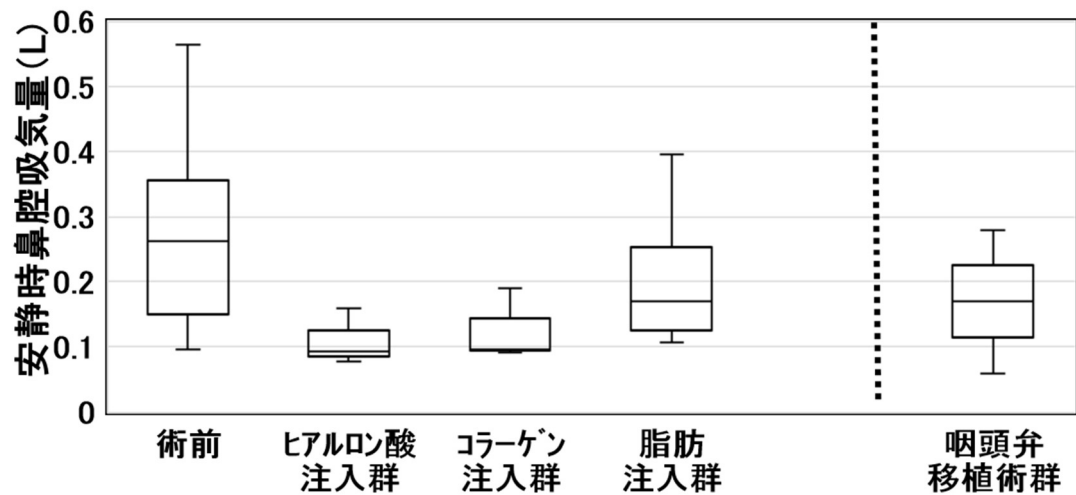


図 11 安静時鼻腔吸気量の解析結果

安静時鼻腔吸気量における術前の全データと術後 6 か月時点での各群の値および咽頭弁移植術群の比較を示す。いずれの群間においても有意差は認めなかった。

また、いずれの群も咽頭弁移植術群と同程度の値を示した。

(Kruskal-Wallis test post-hoc Mann-Whitney' s U test)

表5 各群の軟口蓋挙上時鼻腔呼気流量

(単位:L)

	ヒアルロン酸注入群	コラーゲン注入群	脂肪注入群
術前	0.11 (0.093-0.14)	0.20(0.18-0.39)	0.14(0.091-0.53)
術直後	0.0051 (0.0049-0.011)	0.0055(0.0027-0.0088)	0.0066(0.00089-0.011)
術後1ヶ月	0.036 (0.028-0.088)	0.019(0.0025-0.0225)	0.017(0.0016-0.024)
術後2ヶ月	0.084 (0.027-0.089)	0.057(0.028-0.11)	0.029(0.023-0.040)
術後3ヶ月	0.042 (0.032-0.052)	0.048(0.031-0.077)	0.023(0.0077-0.084)
術後4ヶ月	0.092 (0.013-0.11)	0.037(0.030-0.059)	0.041(0.018-0.081)
術後5ヵ月	0.092 (0.047-0.093)	0.044(0.041-0.091)	0.024(0.020-0.033)
術後6ヶ月	0.054 (0.034-0.099)	0.089(0.088-0.093)	0.049(0.019-0.064)

咽頭弁移植術群

術後1年	(0.019-0.052)
------	---------------

中央値 (四分位範囲)

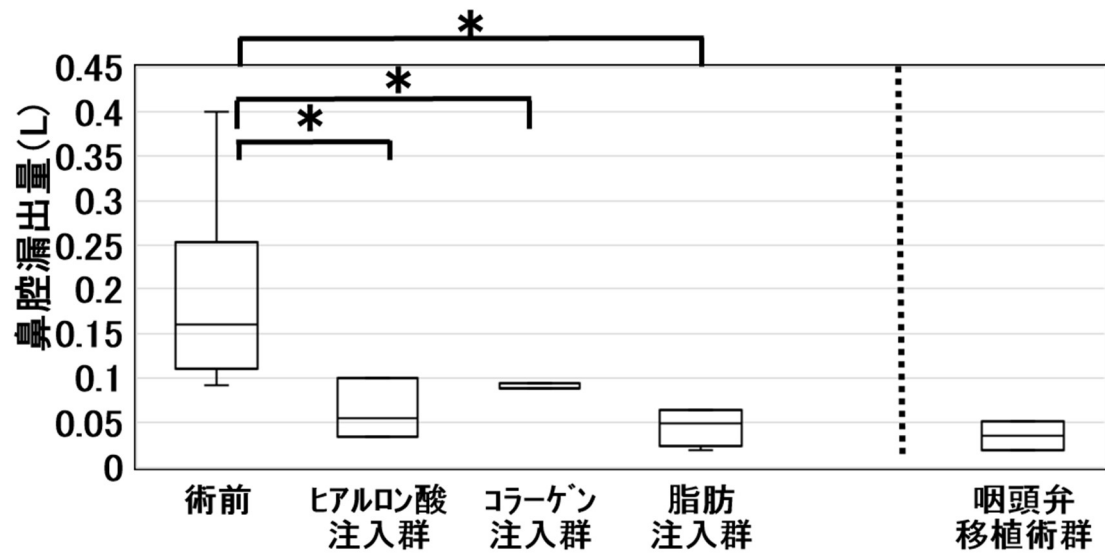
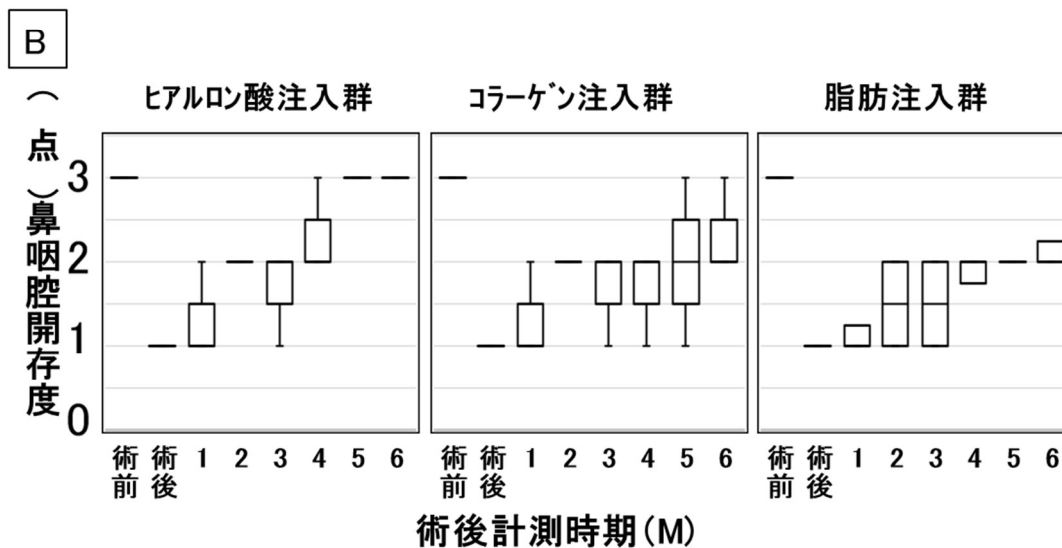
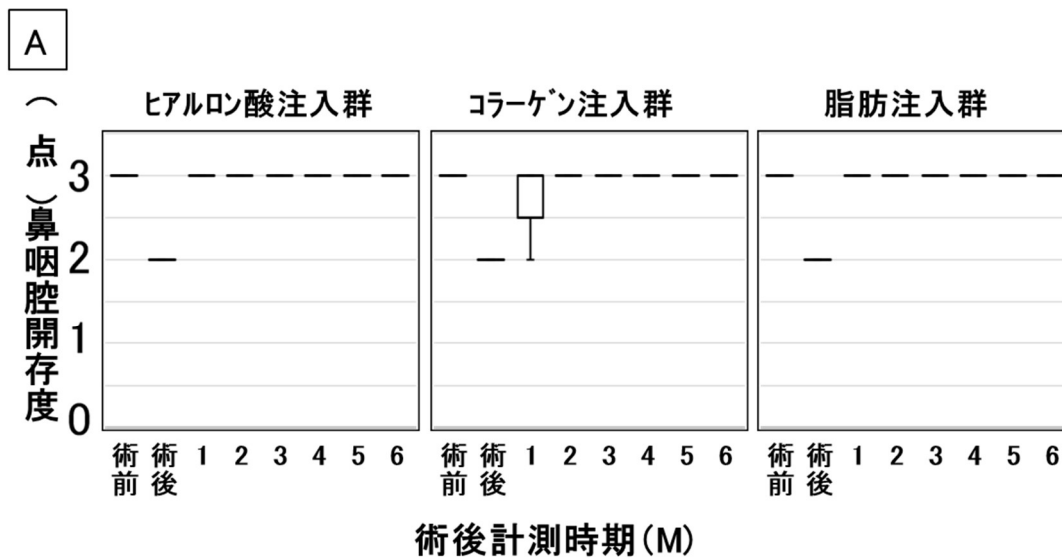


図 12 軟口蓋挙上運動時鼻腔漏出量の解析結果

鼻腔漏出量における術前の全データと術後 6 か月時点での各群の値および咽頭弁移植術群の比較を示す。いずれの群においても術前と比較し、有意に減少を認めた。

また、いずれの群も咽頭弁移植術群と同程度の値を示した。

(Kruskal-Wallis test post-hoc Mann-Whitney' s U test * : $P < 0.05$)



鼻咽腔開存度

1: 完全閉鎖 2: 一部間隙あり 3: 全体に間隙あり

図 13 鼻咽腔開存度の解析結果 (A: 安静時 B: 軟口蓋挙上運動時)

各群における鼻咽腔開存度の経時変化を示す。安静時では、いずれの群においても術後 1 ヶ月から、鼻咽腔全体に間隙を認めた (A)。軟口蓋挙上運動時では、いずれの群においても術後 1 ヶ月より経時的に鼻咽腔の間隙の拡大を認めたが、コラーゲン注入群・脂肪注入群においては、術後 6 ヶ月時点でも<<一部間隙あり>>に留まったものの、ヒアルロン酸注入群では術後 5 ヶ月で全体に間隙が広がる傾向があることが明らかとなった (B)。

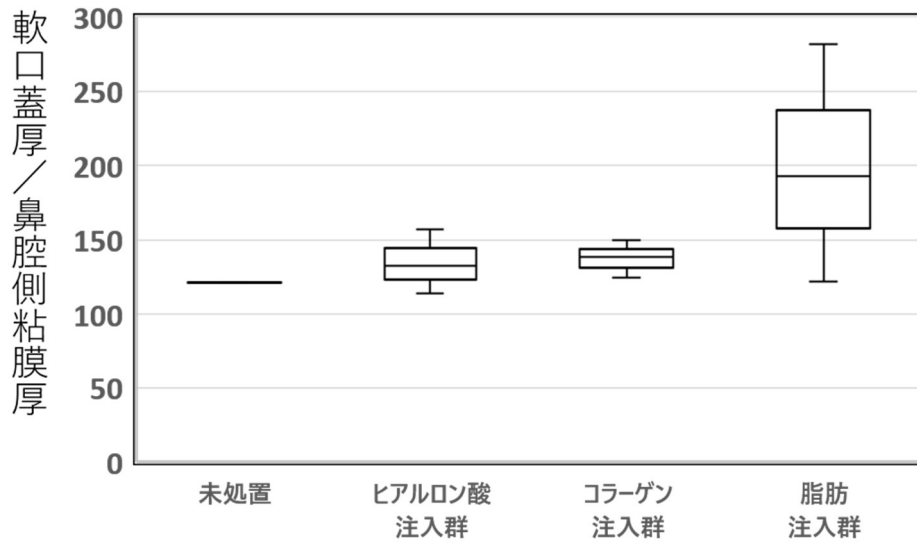
表 6 組織学的評価の計測結果

	ヒアルロン酸注入群	コラーゲン注入群	脂肪注入群
軟口蓋厚 (mm)	6.84 (6.55-6.85)	7.56 (7.45-8.19)	10.0 (8.58-11.1)
口蓋帆挙筋厚 (mm)	2.14 (1.99-2.52)	2.09 (1.96-2.11)	2.53 (1.58-3.81)
鼻腔側粘膜厚 (μm)	49.4 (43.6-59.8)	59.1 (50.4-59.9)	57.2 (35.64-70.35)
軟口蓋/鼻腔側粘膜	132(114-156)	138(124-149)	193(121-281)
口蓋帆挙筋/鼻腔側粘膜	49.2(33.2-51.0)	35.6(32.8-41.4)	44.1(22.4-107)

未処置

軟口蓋厚 (mm)	7.03
口蓋帆挙筋厚 (mm)	1.74
鼻腔側粘膜厚 (μm)	58.0
軟口蓋/鼻腔側粘膜比	121
口蓋帆挙筋/鼻腔側粘膜	30.0

A



B

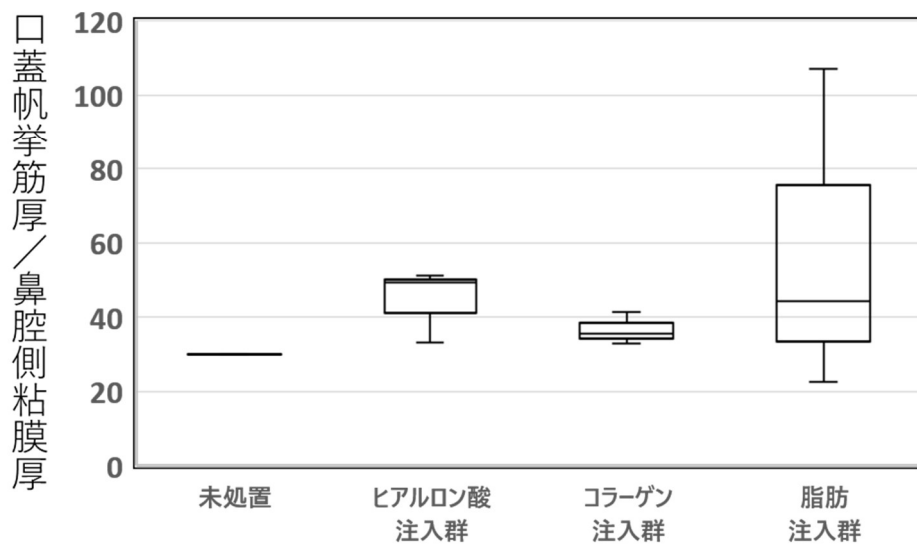


図 14 組織学的評価の計測結果 (A:軟口蓋厚/鼻腔側粘膜 B:口蓋帆挙筋/鼻腔側粘膜)

未処置および術後6か月時点での各群の組織像の計測結果を示す。脂肪注入群で、軟口蓋厚/鼻腔側粘膜厚において最大値を示した。口蓋帆挙筋厚/鼻腔側粘膜厚の中央値はいずれの群も大差ないものの、脂肪注入群での一部症例では非常に大きな値を示した。

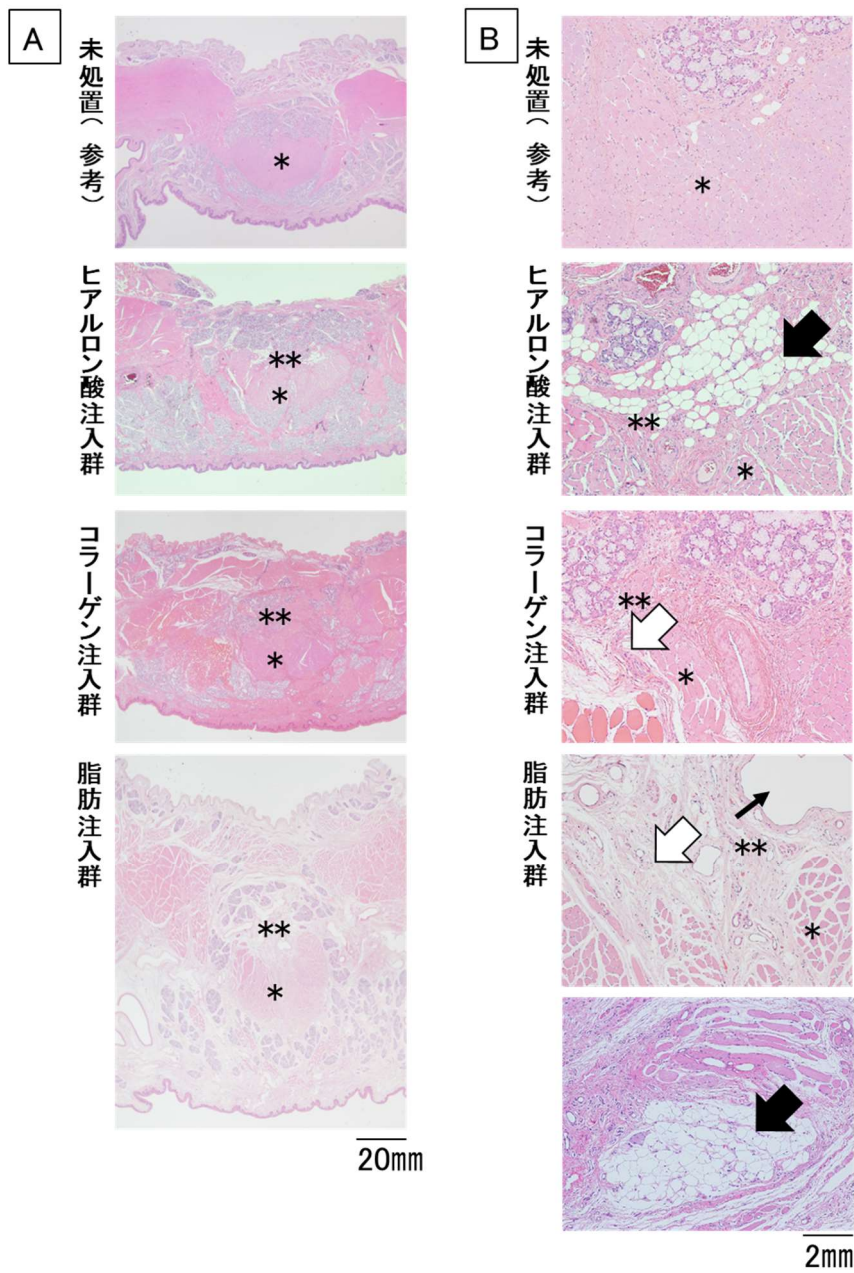


図 15 軟口蓋組織像 (A:弱拡大像×4 B:強拡大像×40、*:口蓋帆挙筋 **:注入部位)

未処置 (参考) および術後 6 ヶ月時点の軟口蓋の HE 染色像の代表例を示す。弱拡大像 (A) より脂肪注入群で最も軟口蓋自体の厚みがあることが示された。強拡大像 (B) よりヒアルロン酸注入群では注入部位周囲に脂肪組織 (➡) を、またコラーゲン注入群では注入部位に線維組織 (⇨) を認めた。一方、脂肪注入群では注入部位周囲に線維組織 (⇨) およびリンパ管もしくは血管と思われる管構造 (➡) を認め、一部症例では脂肪組織 (➡) を認めた。