

頭蓋底手術における硬膜修復素材としての ヒト乾燥羊膜の有用性

**New Dried Human Amniotic Membrane Is Useful
as a Substitute for Dural Repair after Skull Base Surgery**



目次

1. Abstract 3
2. Introduction 4
3. Material and Method 20
4. Results 25
5. Discussion 40
6. References 45

この報告は以下の学会および論文で発表した。

2008年 10月 第67回日本脳神経外科学会学術総会（盛岡）

2010年 3月 第9回日本再生医療学会総会（広島）

2010年 10月 第69回日本脳神経外科学会学術総会（福岡）

2012年 10月 Journal of Neurological Surgery – Part B, Skull Base. ; 73: 302–307

略語集

- AM : ヒト羊膜 (human amniotic membrane)
- HD AM : ヒト乾燥羊膜 (hyperdry human amniotic membrane)
- ePTFE : expanded polytetrafluoroethylene
- CJD : クロイツフェルト・ヤコブ病 (Creutzfeldt-Jakob Disease)
- AIDS : 後天性免疫不全症候群 (Acquired immunodeficiency syndrome)
- HIV : ヒト免疫不全ウイルス (Human Immunodeficiency Virus)
- HTLV-1 : ヒトT型リンパ好性ウイルス1型 (Human T-lymphotropic Virus)
- NK : ナチュラルキラー (Natural Killer)
- MHC : 主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex)
- CT : コンピュータ断層撮影 (Computed Tomography)
- MRI : 核磁気共鳴画像法 (Magnetic Resonance Imaging)
- IL : インターロイキン (Interleukin)

1

Abstract

Objective

Cerebrospinal fluid (CSF) leakage is an undesirable complication of skull base surgery. We used dried human amniotic membrane (AM) as a patch graft for dural repair to determine its efficacy in preventing CSF leakage.

Design

Frontoparietal craniotomy and removal of dura were performed in 20 Wistar rats. A dried AM was placed to cover the dural defect without suturing in 16 animals. In four animals, an expanded polytetrafluoroethylene was implanted. At 2 weeks and 1, 3, and 6 months, histological examination was performed. Dried AM was also used as a substitute in 10 patients who underwent skull base surgery, after approval by the Ethics Committee of the University of Toyama.

Results

At 2 weeks after implantation, thick connective tissue completely enclosed the

dried AM. At 1 month after implantation, the connective tissue became thin and the implanted AM shortened. At 3 and 6 months after implantation, histological examination revealed disappearance of the dried AM and formation of membranous tissue. In the clinical study, neither CSF leakage nor clinical adverse reaction directly related to the dried AM were observed.

Conclusion

Dried human AM appears to be an ideal substitute for dura, since it is replaced by natural tissue.

Keywords

Amniotic membrane

Cerebrospinal fluid (CSF) leakage

Dural repair

Dural substitute

Skull base surgery

2

Introduction

脳神経外科手術後の髄液漏は、皮下水腫の形成や髄液鼻漏や耳漏を引き起こす。美容上の問題や感染の温床となり不都合な合併症である。これを防ぐにはwater-tightな縫合が理想的であるが、硬膜損傷や欠損により困難となる場合が生じる。この時、硬膜修復には何らかの修復素材が必要となる。自己組織、同種、異種、合成素材によるgraftが使用されてきたが、それぞれに問題がある。

その修復の為、同種、異種、あるいは合成素材を選ぶ必要がある。帽状腱膜、骨膜、側頭筋膜などのautologous tissueは移植による感染の危険は低く有利である。しかし、皮膚切開の拡大や追加が必要となり侵襲が増える¹。かつて、世界で広く使用されていたヒト乾燥硬膜はクロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）の発症で使用されなくなった^{2,3}。他の素材では、長期間の炎症に伴う脳への刺激や瘢痕形成、遅発性の出

血、あるいは髄膜炎などの不具合がある^{4,5,6}。

今回、我々は、再生医療で注目されているヒト乾燥羊膜（HD AM）の硬膜修復への応用を検討した。新しく開発された乾燥方法は、低気圧かつ60°C以下の環境で、遠赤外線とマイクロ波の連続照射で行われるもので、hyperdry method と呼ばれる。その乾燥後にγ線照射滅菌を行われ精製されたものである^{7,8}。

ラットモデルで、硬膜修復における HD AM の組織学的変化と周囲の修復過程を評価し、さらに臨床応用として、頭蓋底手術での硬膜修復にこれを用いた。その結果、すぐれた髄液漏の予防効果を証明した。これは、ヒト乾燥羊膜が臨床で頭蓋内硬膜の修復に有用であることを証明した初の報告である。

硬膜修復

脳神経外科手術後の髄液漏は、皮下水腫の形成、髄液鼻漏、耳漏を引き起こすので、美容上の問題や感染の温床となる不都合な合併症である。これを防ぐにはwater-tightな縫合が理想的であるが（図1）、しばしばこれが厳しい状態となる。術中操作による損傷や乾燥での縮小で欠損を生じる場合（図2）や、硬膜から病巣が発生する髄膜腫などで、その摘出による硬膜欠損である（図3）。このような場合、欠損部の修復には何らかのgraftを用いる必要がある。自己組織、同種、異種、合成素材によるgraftが使用されてきたが、それぞれに問題がある^{9, 10}。

理想的な硬膜補填素材は免疫学的に不活性であり、毒性は無く、感染的要素が低いものであるべきである^{11, 12, 13}。硬膜との結合は強いが、大脳皮質との癒着は起こしてはならない。そして、次第に吸収され生来の結合組織に置き換わるものが好ましいと考えられる¹⁴。

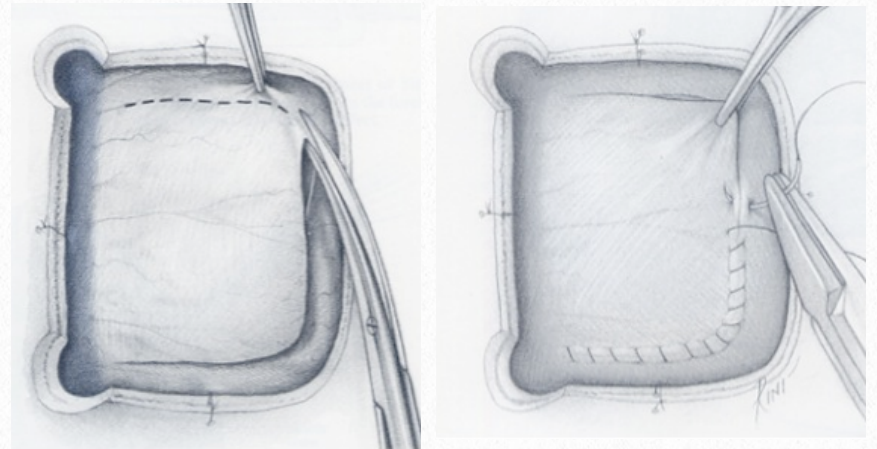


図1

硬膜の損傷や乾燥による縮小で欠損を生じることがある。

欠損部を補填、修復

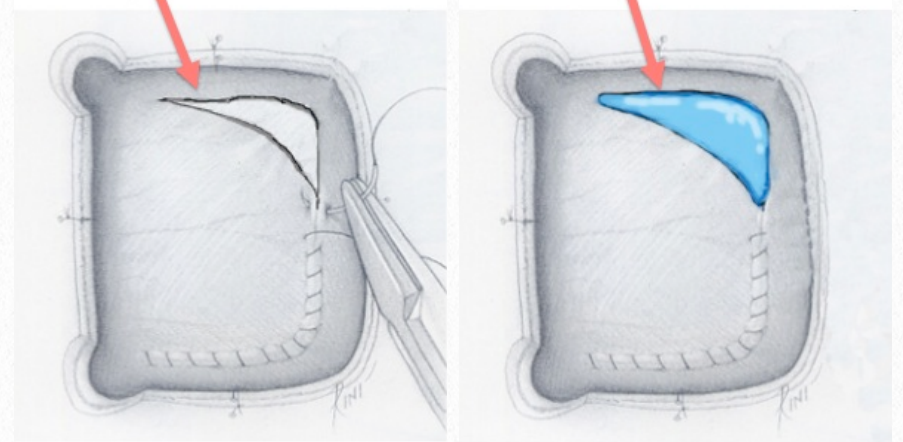
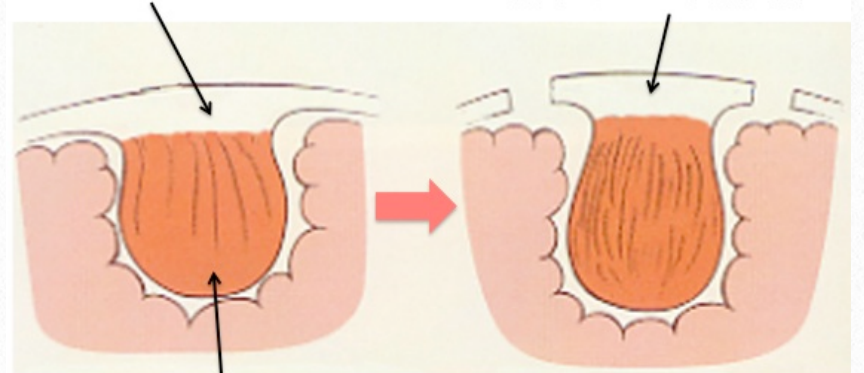


図2

病巣が硬膜より発生

摘出で起こる硬膜欠損



脳腫瘍（例：髄膜腫）
硬膜欠損

欠損部の補填、修復

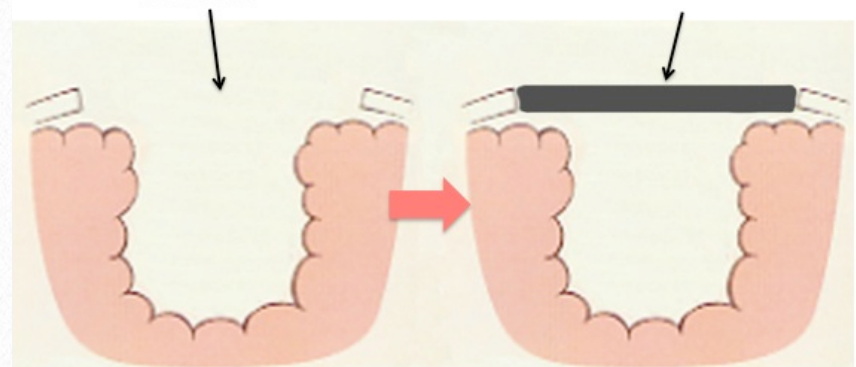


図3

硬膜

脳や脊髄は3層の結合組織で包まれているが、これらの結合組織を総称して髄膜と呼ぶ。その最も外層が硬膜である。この硬膜は、頭蓋骨の内側面を裏打ちする内骨膜 intracranial periosteum と、本来の硬膜、固有硬膜 *dura propria* が癒合した二次硬膜であり、髄膜は4層構造とする場合もある。

胎生初期に神経管を包む間質として形成される原始髄膜が、胎生2ヶ月に内髄膜と外髄膜に分かれる。内髄膜は神経管に密着し、その後、軟膜とクモ膜を形成する。外髄膜は骨膜内葉と骨膜外葉の2層に分かれ、骨膜内葉が固有硬膜、骨膜外葉が骨膜硬膜となる。骨膜硬膜とは骨膜そのものであり、頭蓋骨の外側面を覆う外骨膜 external periosteum が頭蓋縫合部や頭蓋裂孔を通り頭蓋内へ侵入し内骨膜 intracranial periosteumへと連続する。そして、その内骨膜と固有硬膜の2枚が密着して一枚の膜となり硬膜を形成する。この二次的癒着によって硬膜が形成されているため、二次的硬膜と呼ばれることもある。しかし、この癒着は静脈洞では行われぬ。ちなみに、この2層構造であるので、硬膜外葉 external layer と内葉 inner layer の二葉からなるといわれるのはこのためである。大脳鎌や小脳テントは固有硬膜が折り返すことで形成される。また、固有硬膜 *dura propria* は髄

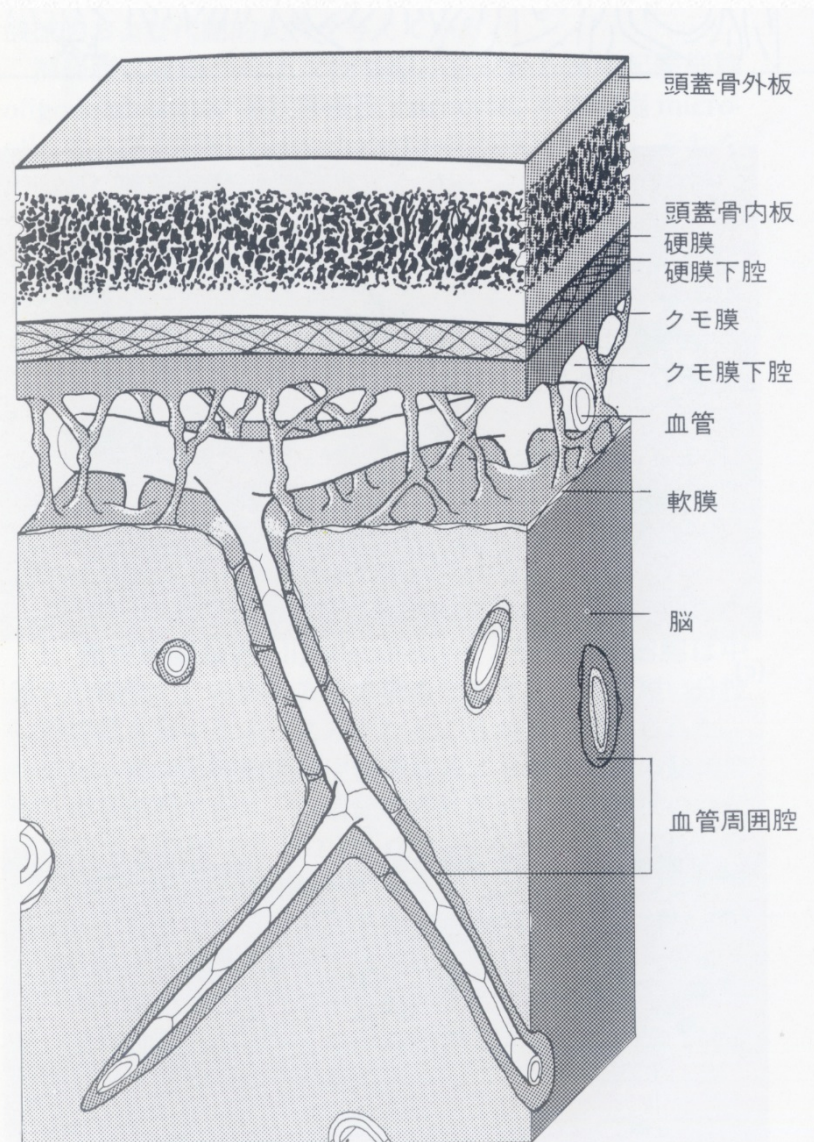
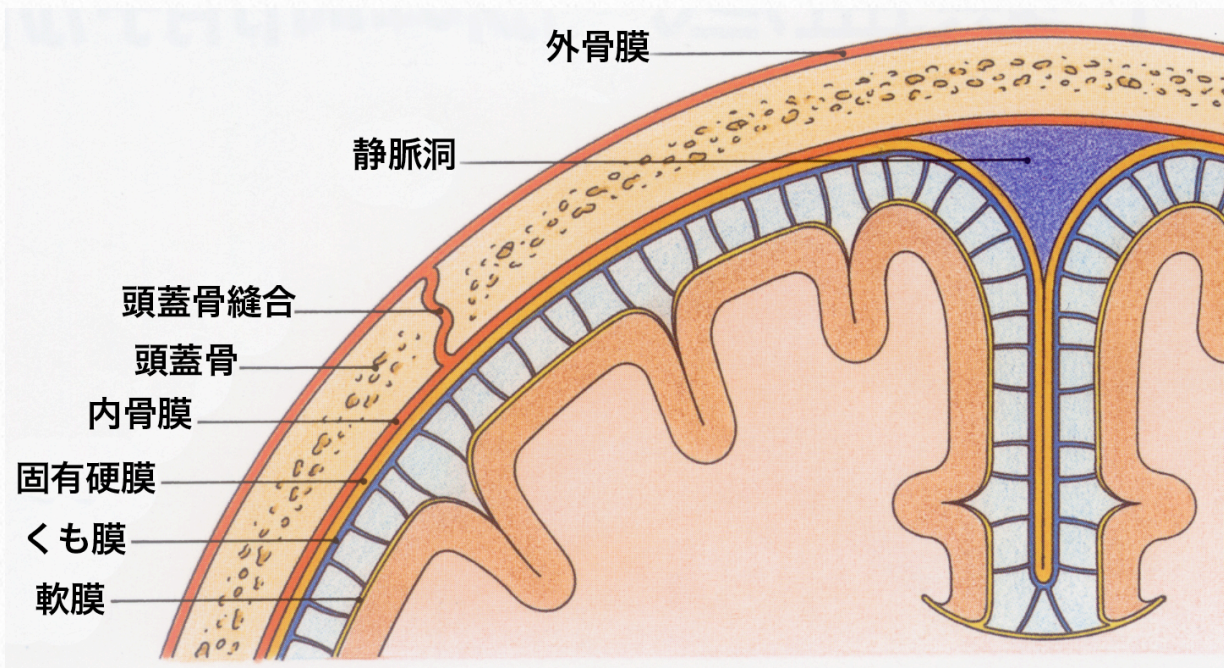


図4 髄膜の構造の模式図

図説 組織学

膜硬膜 meningeal dura と呼ばれることもある。軟膜は、線維芽細胞と膠原線維および下層の星状膠細胞からの突起からなる薄い膜で神経組織の表面を覆っている。クモ膜は、軟膜の外側にある比較的厚い線維性の層である。この層は、下層の軟膜との間に張る線維がクモの巣状を呈することから名付けられた。軟膜とクモ膜は構造上連続しているため、しばしば一つの単位と考え、軟膜クモ膜または広義の軟膜と呼ぶ。軟膜とクモ膜層の間の腔所はクモ膜下腔と呼ばれ、部位により大きな槽をなす。クモ膜下腔は3個の孔により脳室と連なってお



手術の為の脳局所解剖学

図5 髄膜の構造（頭蓋冠状断）

り、脳脊髄液は脳室からクモ膜下腔へ絶え

ず流れている。軟膜とクモ膜層の向かい合う面や両層を結ぶ線維は、扁平な中皮細胞により覆われている。クモ膜の外表面も中皮により覆われる。中枢神経系の動脈と静脈は軟膜に疎に付いているクモ膜下腔内を通る。大きい血管は薄い軟膜層を伴って神経組織内に侵入し、血管と軟膜の間にはクモ膜下腔と連なった血管周囲腔がある。

硬膜は、クモ膜の外側にある密な線維弾性の層である。硬膜はその内側表面が中皮により覆われている。硬膜はクモ膜に密接しているが、連続はしていない。この2層の間は少量の液を有する硬膜下腔で分けられている。頭蓋内では、硬膜は頭蓋骨の骨膜と癒合しているが、脊髄の周囲では硬膜は脊柱間の骨膜とはいわゆる歯状靭帯で

結ばれており、間の硬膜上腔は疎な線維性脂肪性結合組織と静脈叢で満たされている。硬膜はその内側表面が扁平中皮細胞により覆われている。これらの細胞は緻密な細胞質を有し、密な線維弾性性の層を形成している。その動脈支配は、*anterior meningeal artery*（眼動脈からの分枝）、*middle meningeal artery*（硬膜の最大の栄養血管・顎動脈からの分枝）、*posterior meningeal artery*（椎骨動脈からの分枝）よりなされている。神経支配は、テント上は三叉神経、テント下は迷走神経と高位頸髄の支配を受ける（図4）¹⁵。

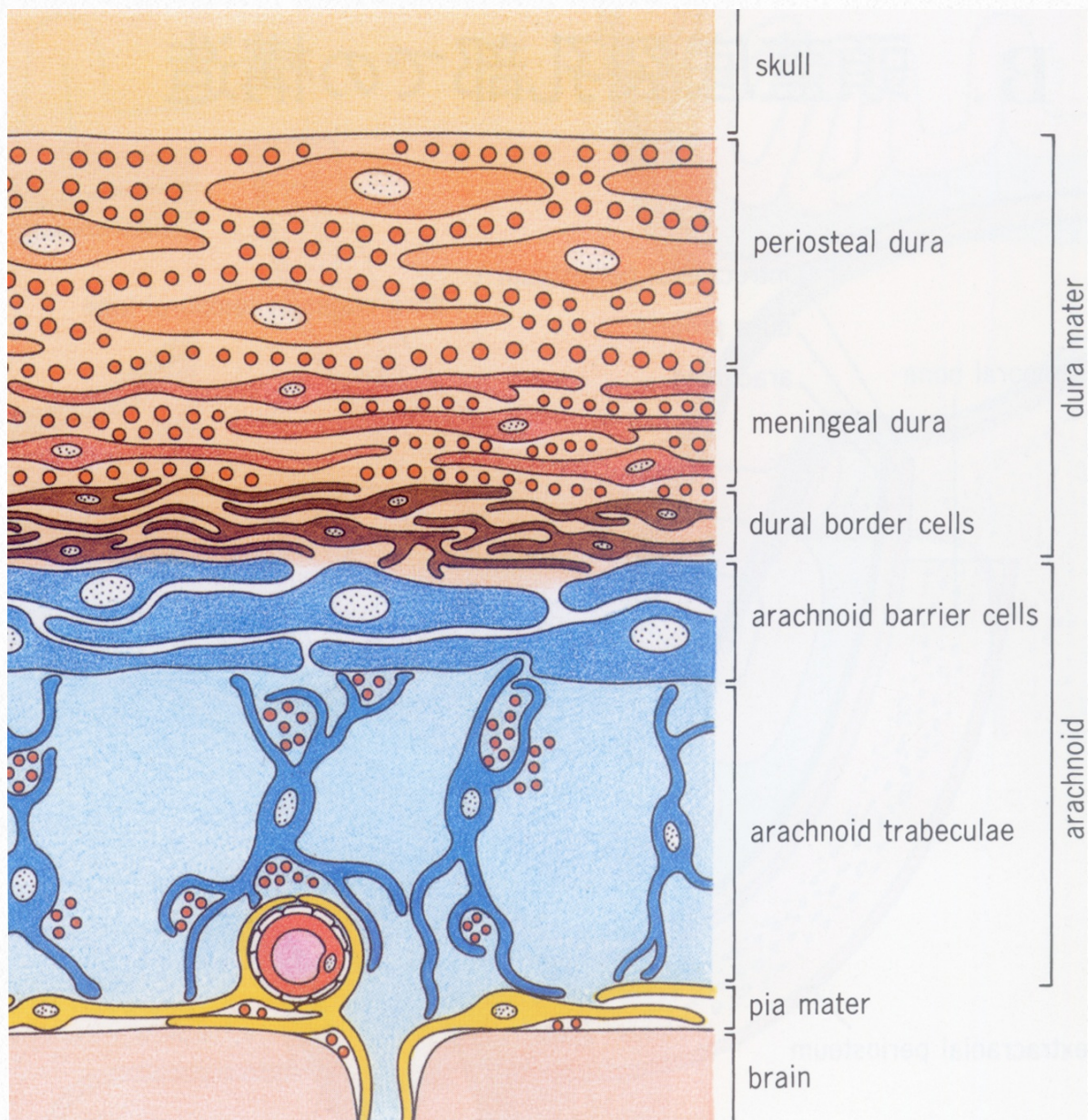


図6

手術の為の脳局所解剖学 髄膜の構造（電顕像の模式図）

外層側から骨膜硬膜層と髄膜硬膜層が区別され、その下層には硬膜辺縁細胞 dural border cells層が存在する。一般にいう硬膜下腔は潜在腔であり、生理的硬膜下腔は存在しない。すなわち、硬膜とクモ膜を分離した時に生じた間隙は、正確には機械的に剥離された硬膜辺縁細胞層の細胞間隙を見ていることになる。硬膜辺縁細胞層の直下には、クモ膜関門細胞 arachnoid barrier cellsと arachnoid trabeculae よりなり、クモ膜が密着している。そして、軟膜

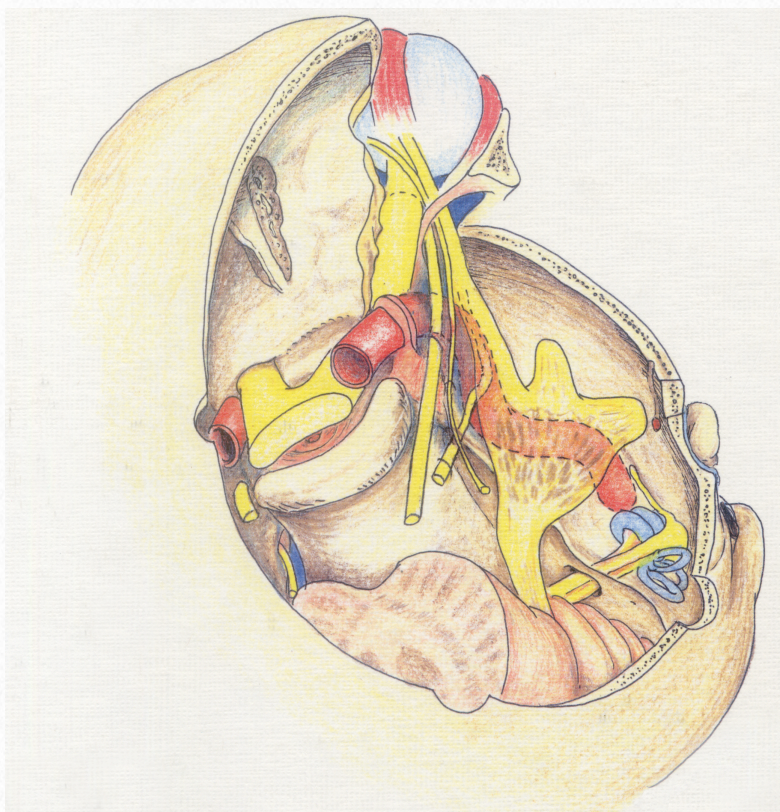
pia mater が最内層に位置している（図5、6）¹⁶。

脳脊髄液の多くは脳室系とクモ膜下腔に存在する。脳神経外科手術において、クモ膜の形成と修復には幾つかの方法がある^{17, 18}。しかし、クモ膜の脆弱な構造では、その完全な修復および、それによる髄液漏予防は現実的ではない。ゆえに髄液漏の予防には硬膜修復が重要となっている。

頭蓋底手術

硬膜の修復は、術野が浅く広い場合には、優れた修復素材があれば手技的に比較的容易である。しかし、深く狭い術野では修復は非常に困難となる。その代表的なものが頭蓋底手術である。

頭蓋底とは脳の底面であり、頭蓋骨の底面に接する前頭蓋底、中頭蓋底、および後頭蓋窩底面などを含む領域である。前頭蓋底では、眼窩および副鼻腔に接し、中央部は下垂体窩、副鼻腔に、中頭蓋底では、中耳、内耳などの聴覚器および頭蓋外側窩に接する。後頭蓋窩では、斜台部、大後頭孔部などが存在する、眼科および耳鼻咽喉科との境界領域である。これらの部位に存在する病変に対する手術を頭蓋底手術と呼ぶ。おもに、次のような疾患に対し施行される（図7）¹⁹。



- ・下垂体部腫瘍
- ・頭蓋咽頭腫
- ・髄膜腫
- ・神経鞘腫
- ・脊索腫
- ・骨腫
- ・軟骨腫
- ・脳動脈瘤

手技として代表的なものが以下である。

1. Orbitozygomatic Infratemporal Approach
2. Otico-condylar Approach
3. Extensive Middle Fossa Approach
4. Anterior Transpetrosal-transtentorial Approach
5. Presigmoid Transpetrosal Approach
6. Transcondylar Approach

例としてanterior transpetrosal-transtentorial approach の手技を提示する。

図では左椎体骨先端部にある病巣に対する手術を示している。

1. 体位は右下側臥位で、コの字型に皮膚切開を行い、皮弁、筋弁を翻転する。ここでは3個の穿頭を穿ち開頭を行う（左側頭開頭）（図8）。

2. 左側頭骨鱗部を中頭蓋底に至まで削除すると、弓状隆起、中硬膜動脈、大浅錐体神経が確認できる（図9）。

3. 硬膜と中頭蓋底との剥離をさらに内側前方へと進めると、棘孔とここから頭蓋内へ侵入した中硬膜動脈が露出され、これを結紮し切断する。さらに剥離を前方に進め、卵円孔とそこへ侵入する三叉神経第三枝（下顎神経）、さらにその前方に正円孔と、そこへ侵入する三叉神経第二枝（上顎神経）が露出される。ここでは、硬膜の二層のうち、上層である骨膜硬膜を剥離する事で術野の展開が得られる（図10）。

4. 椎体骨先端部を削除する。このときに、大浅錐体神経と弓状隆起を結ぶ線が、蝸牛、三半規管、内耳道の位置を確認するための重要なland markとなる。この線の内側にそって骨削除を進める。ダイヤモンドバーでのドリル操作が安全である（図11）。

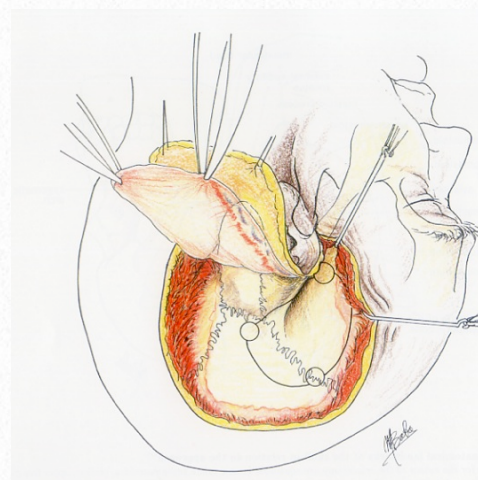


図8
皮膚切開-皮弁
および筋弁の
展開-3 burr
holesの位置

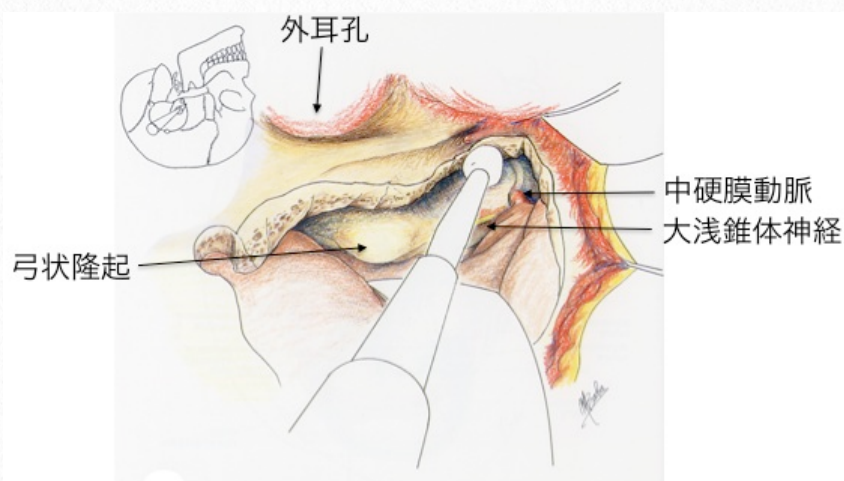


図9 左側頭骨鱗部を中頭蓋底に至るまでの削除する

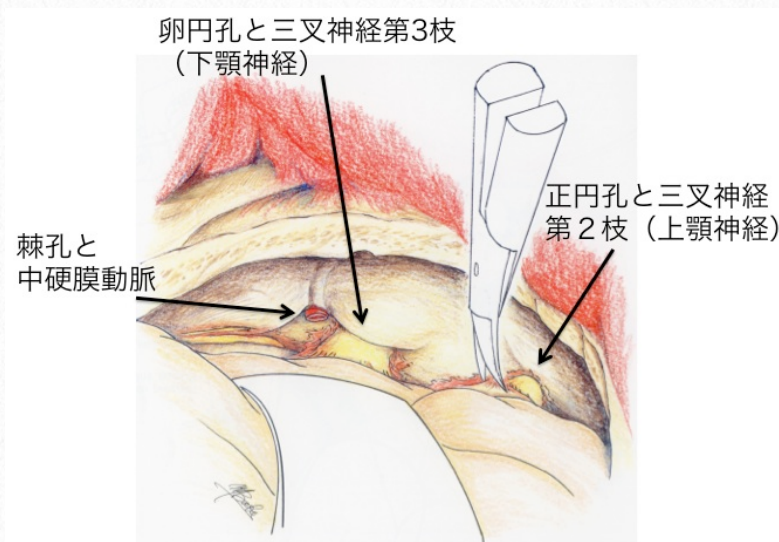


図10 棘孔、卵円孔、正円孔の露出

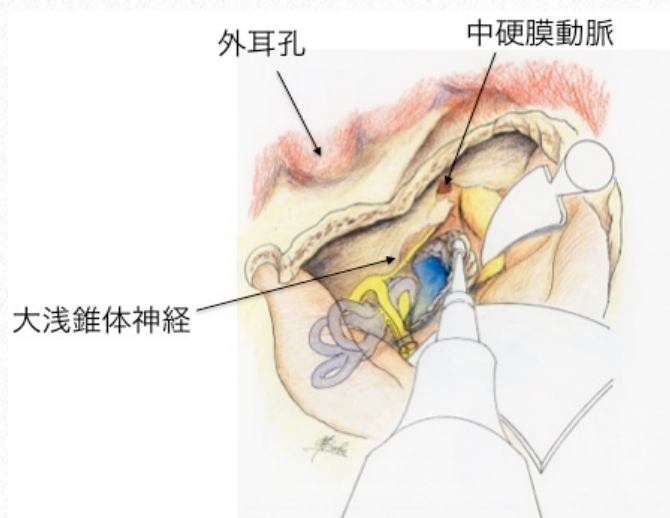


図11 椎体骨先端部の削除

5. この後、側頭葉の硬膜に切開を入れ、小脳テントへ切り進める。このとき、上錐体静脈洞の切断が必要となる（図12）。

6. これを結紮し切断し、硬膜切開をさらに小脳テントへと進める。これによって中頭蓋窩から脳幹周囲への術野の展開が可能となる（図13）。

このような手技では、術野は深く狭く、かつ硬膜切開は複雑となる。ゆえに、修復ではgraftの使用の有無に関わらず縫合は厳しくなる。術式によるが、髄液漏の確率は5-20%と報告されている^{20, 21, 22, 23, 24}。有茎での筋弁、あるいは骨膜弁を使用しての修復は非常に有効な手段であり^{25, 26, 27}、脂肪片、筋肉片、筋膜片、フィブリン糊での修復も効果的であるが、十分に髄液漏を予防できていないのが現状である。これに対し、縫合が不要な優れた接着性を有することで十分に髄液漏を防げる硬膜修復素材が必要となる。

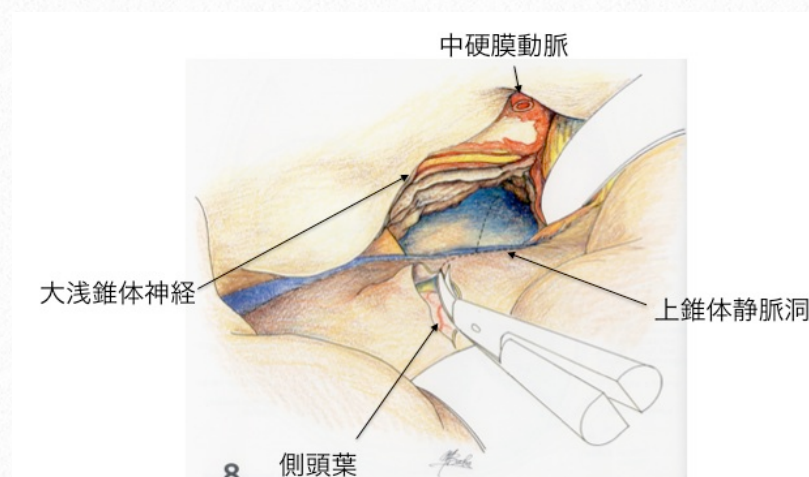


図12 小脳テントの切開（上錐体静脈上の切断）

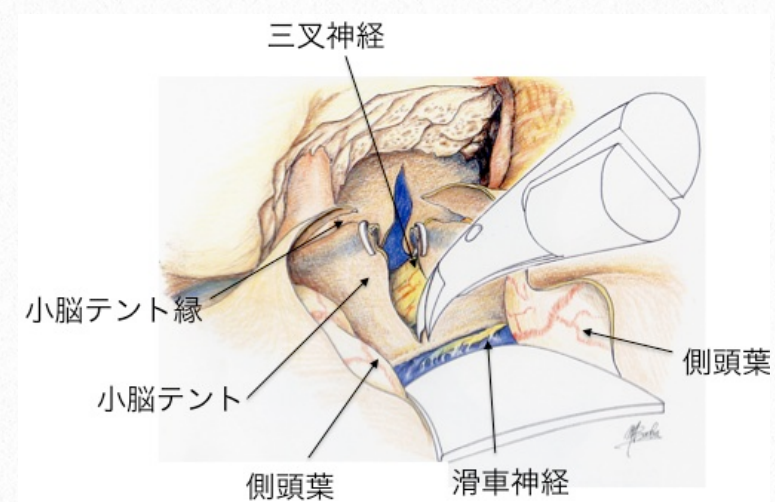


図13 脳幹周囲の術野の展開

硬膜修復素材

修復素材として、同種、異種、あるいは合成素材を選ぶ必要がある。帽状腱膜、骨膜、側頭筋膜などのautologous tissueは移植による感染の危険は低く有利である。しかし、皮膚切開の拡大や追加が必要となり侵襲が増える¹。かつて、世界で広く使用されていたヒト乾燥硬膜はクロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）の発生で使用されなくなった^{2,3}。他の素材では、長期間の炎症に伴う脳への刺激や瘢痕形成、遅発性の出血、あるいは髄膜炎などの不具合がある^{4,5,6}。

ここで、これまでに開発および使用されてきた硬膜修復素材に関する歴史について触れる。

ヒト乾燥硬膜 (Lyodura®)は、1968年当時西ドイツのビー・ブラウン社より発売された（図14）。これは、屍体より採取した硬膜を乾燥加工した製品であった。取り扱いが簡便で、硬膜修復には有効な素材として広く世界で使用された。本邦では年間、約2万枚が使用され、約27年間の累計での使用数は約40～50万枚にのぼった。これが医原性クロイツフェルト・ヤコブ病

（CJD）によって大きく事情が変わった。1987年、米国より硬膜移植による医原性CJDの報告が初めて発表された²⁸。本邦で



図14
ヒト乾燥硬膜
(Lyodura®)

も1991年に初めて報告され²⁹、世界各国から発生の報告も相次いだ。これを受け1997年3月27日、WHOにおいて医薬品等に関する伝達性海綿状脳症専門家会合が開催され、加盟国に対しヒト乾燥硬膜の使用停止の勧告がなされた。本邦では同年3月に緊急で回収が命令され4月より禁止された（表1）³⁰。

硬膜移植による医原性CJD患者は孤発性CJDに比し、若年発症者が存在し、初発症状として小脳失調が多く³¹、脳波でperiodic synchronous discharge (PSD)を欠き、緩徐に経過する症例が存在すること、病理像で脳に florid plaqueが認められる、などのいくつかの点で孤発性CJDとは異なった特徴が指摘された^{32,33}。硬膜移植を受けた時期は1979年から1991年に及んでいた³⁴。1983年から1987年にかけて硬膜の移植を受けたものから多くのCJD患

1968年		ビー・ブラウン社がヒLyodura®の販売を開始。
1973年	7月	厚生省がLyodura®を「医療用具」として輸入・販売の承認。
1987年	2月	米国疾病センター（CDC）が週報MMWRにおいてLyodura®移植歴のあるCJD患者に関する世界初の症例報告を掲載。
	4月	米国食品医薬品局（FDA）が全米の医療機関に安全警告。
	5月	ビー・ブラウン社がLyodura®の滅菌方法をアルカリ処理に変更。
	8月	米国医師会雑誌（JAMA）日本語版にMMWRの第1症例報告が掲載。
	10月	日本臨床ウイルス学会誌「臨床とウイルス」にMMWR記事が掲載。
1989年	1月	MMWRがLyodura®移植歴のあるニュージーランドのCJD患者が世界2番目の症例として報告。
	4月	国立予防衛生研究所の月報「病原微生物検出情報」においてMMWRに掲載された第2症例の要約掲載。
1991年	6月	米国の神経医学専門誌「ニューロロジー」において世界で第4番目にあたる新潟大学の症例報告が掲載。
	8月	英国はLyodura®の認可を取り消す。
	10月	ノルウェーはLyodura®の登録を抹消。
1996年	5月	英国の狂牛病との関連により厚生省で「クロイツフェルト・ヤコブ病等に関する緊急全国調査研究班」を設置。
		ビー・ブラウン社がDonorの追跡困難な場合があることを理由に1995年以前に製造されたLyodura®を自主回収。
	6月	ビー・ブラウン社が原料の入手困難でLyodura®の製造を中止。
1997年	3月	WHOがヒト乾燥硬膜の使用を差し控えるよう勧告。
	4月	厚生省が薬事法に基づきヒト乾燥硬膜を回収する緊急命令を行う。

表1 Lyodura®の承認から使用停止までの経緯

者が発症しており、この傾向は外国例でも同一であった。罹病率：1983～85年に移植を受け発症した患者数から推定すると1,500名に1名の割合で発病したことになる。硬膜とCJD発症との間に何らかの因果関係が存在することを示した一つのデータであった³⁵。

日本ではビー・ブラウン社のLyodura®とバイオダイナミクス社のテウトプラスト®の2つの製品がドイツから輸入されていた。そのうち問題となったのはLyodura®で、1973年7月に厚生省で輸入承認されて以降、1997年3月に使用が停止されるまでの間に累計で推定約40～50万枚が使用され、

少なくとも30万人に移植された³⁶。ビー・ブラウン社では、Lyodura[®]の原料となる硬膜を不正な闇取引で集めていたため、Donorの特定やCJDなどの感染性疾患の排除をしていなかった。また、病原体に汚染された硬膜は、感染の認識も無いままに、他の硬膜と一緒に処理・保存され、滅菌も不十分であった。このように、Lyodura[®]は製造過程においても、CJDやAIDS、その他の病原体で汚染されている可能性の高い危険な製品であった。

Lyodura[®]の問題点を以下にまとめた。

1. Donorの選択

ビー・ブラウン社では、行き倒れなども解剖するヨーロッパの法医学教室などからも硬膜を買っていた。社員が病院の裏口で、解剖アシスタントに賄賂を渡し、病院に無断で密買めいた入手もされていた。よって、Donorの死因、既往歴などの把握が医師によって成されていなかった。当然として、病原体を持っている可能性のあるDonorの排除も為されないまま製造されていた。

2. 製品管理

硬膜移植によるCJDが問題になり、アメリカ当局の調査の結果、ビー・ブラウン社では1987年4月以前のDonorに関する記録は消失し追跡できないことが判明した。さ

らに、その製造は個別処理では無く、プーリング処理であり、製造過程では300人分の硬膜を1つのポリ袋で保管するという杜撰な管理が明らかとなった。

ビー・ブラウン社が当時滅菌法として採用していたγ線滅菌法を採用していた。しかし、遅くとも1978年にはヤコブ病病原体に無効であることが判明していた³⁷。にもかかわらず、同社は1987年までγ線滅菌法による製品を継続した（医原性クロイツフェルト・ヤコブ病に関する調査報告書 平成12年8月11日 厚生省より）。

このように、Donorの採取から製造、管理において問題点が多い製品である事が判明した。これに対し、HD AMではDonorに関する医療情報は、厳重な情報管理環境の基で詳細に把握できている。そして、製品管理においては、HD AMでは個別処理で行われ、ロット管理で常にDonorと照合できる状態を堅持している。

このヒト乾燥硬膜（Lyodura[®]）に代わりW. L. Gore & Associates のexpanded polytetrafluoroethylene (ePTFE / Gore-Tex[®]) が広く使用されるようになった（図15）³⁸。

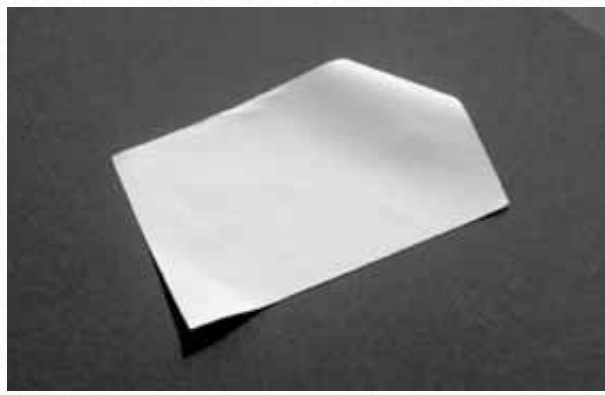


図15 ePTFE (Gore-Tex®)

これは周囲組織との結合は起こらず、それゆえに強固に縫合する必要がある。また、体内で吸収される事はないために、異物に対する慢性的な生体反応を起こす事が有る。ePTFEは生体内での組織との反応性は極めて低く、構造的に極めて安定であるため、人工血管³⁹、人工心膜⁴⁰、人工腱索⁴¹、遮蔽膜（歯周病組織再生誘導法）⁴²などで効果を発揮し、癒着を予防できる素材としての可能性も検討されている⁴³。しかし、利点である周囲組織との反応性の低さは接着性の乏しさにつながり、硬膜修復では髄液漏を来しやすい。ときに縫合の際の針穴から髄液漏を来す場合もある。また、構造的に安定である故に異物として長期間に遺残するため炎症や細菌感染の危険が問題点としてあげられるようになった。

GUNZE社から発売されたGM972 (SEAMDURA®) は、乳酸・カプロラクトン共重合体フィルム (LA/CL) の間にポリグリコール酸不織布(PGA)を挟み込んだ三層構造である (図16)⁴⁴。縫合可能な

機械的性質と強度を持ち、分解吸収素材であることから、感染や炎症に対して有利であると思われた。しかし、感染や取り回しにくさ（固さの為に皺になりやすい）などの不具合で広く使用されるに至らなかった。

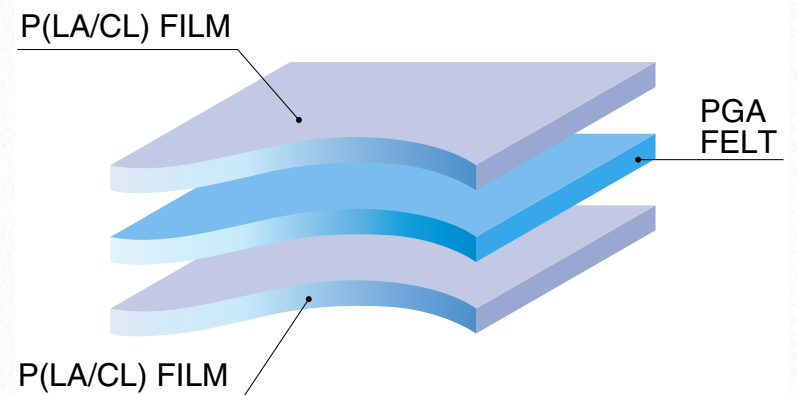


図16 GM972 (SEAMDURA®)

ビー・ブラウン社製のNeuro-patch® は、ポリエステルウレタン製の多孔性フリースであり、ePTFEやGM972と同様に縫合可能な機械的性質と強度を有しており、ePTFEと比較して組織結合性が高い点が優れていた (図17)⁴⁵。

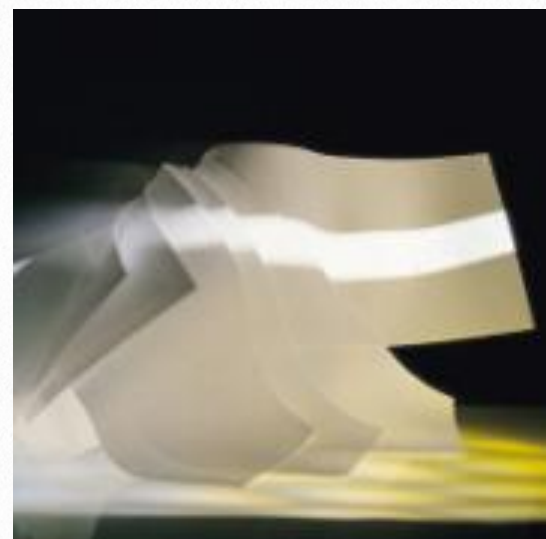


図17 ポリエステルウレタン製多孔性フリース (Neuro-patch®)

しかし、分解吸収されないため、遺残による感染と炎症の問題は残り、かつ期待さ

れたほどに硬膜修復効果は高くなく、髄液漏の予防ができなかった。

Collagen spongeも硬膜修復素材の一つである。これは、実験および臨床において有効な修復素材として報告された^{9, 46}。Collagen matrixは迅速な止血作用を有し、そのchemical sealによる刺激でfibroblastの浸潤を促した。これは移植後、3、4日から開始され10から14日で完成した。そして、fibroblastがspongeの気孔を足場として伸展し新しい膠原繊維を形成した。6から8週間後にはcollagen matrixは吸収され、新たな硬膜が形成された。そして、脳表とその上部の組織との癒着を最小限に抑えるよう、隔壁として作用していた。

Collagen matrixは、十分に硬膜と重ね合わせる事ができれば、追加の固定は必要なかった^{10, 11, 47, 48}。縫合を必要としないため、手術時間が短縮でき、解剖学的に作業しづらい箇所での修復を容易とした。これらのCollagen matrixの有した特徴は、硬膜修復素材として優れていた。

その他にも、吸収素材で形成された人工硬膜の開発が報告されている^{49, 50, 51, 52}。

再生医療

今回われわれは、その硬膜修復素材として、再生医療で注目されている羊膜の応用を検討した。羊膜には、これらCollagen matrixなどが持つ優れた特性と、それを上回る利点があると考えている。再生医療は、臓器不全に陥った患者に対する臓器移植に代わる優れた治療方法として期待されるようになってきている。

再生医療は、臓器の機能細胞を移植源とし、それを適所に生着させる事で機能補助・補完するという方法であり、通常の臓器移植に比しドナーおよびレシピエントの精神的・肉体的な負担を軽減し、加えて移植源の確保が比較的容易になることが期待できる。

細胞移植療法には3つの重要な要素がある。

- 1) 細胞源；移植するための細胞
- 2) 液性因子；増殖因子やサイトカインなど（細胞の増殖や分化を抑制する）
- 3) scaffold；細胞の適切な増殖や分化に必要な微小環境を構成する細胞外マトリックスや人工足場

などである⁵³。

特に細胞源に関しては、骨髄細胞、臍帯血細胞、体性幹細胞（組織幹細胞）などがある。幹細胞とは、臓器細胞の欠損・障害時の再生に大きく寄与するとされている細胞で、複数種の細胞に分化する能力を維持しつつ、自己複製できる細胞である。この細胞を細胞源とする事で、成熟細胞移植に比べ少量で効率のよい臓器再生が期待できる。1999年には神経幹細胞が、2001年には造血幹細胞が、胚葉を超えた分化能を持つ事が示唆され、移植細胞源として期待されるようになった。特にヒト胚性幹細胞（ES細胞）の樹立、およびその後の幹細胞研究の飛躍的な進展が細胞移植療法に大きく貢献すると期待されている。しかし、一方ではES細胞を含めたこれらの候補には、使用における倫理的問題の解決、移植時の免疫反応の回避、Donor細胞の確保など、さまざまな問題が提起されている⁵⁴。

Hyperdry Amnion

再生医療法における細胞供給源の倫理的な問題点を解決する為に、分娩後に廃棄される羊膜が新たな細胞源として着目されている。そして、羊膜では上皮細胞で分泌される蛋白質に、IL-1 antagonistに近い構造の蛋白質やCD59などがあり、抗炎症作用があることが期待されている⁵³。

羊膜は、胎児を形成する胚盤葉上層に由来する羊膜上皮、および胚外中胚葉の一部から構成されている。子宮内で胎児、臍帯および羊水を包んでいる薄い卵膜を構成する最も内側（胎児側）の膜である。通常分娩では、この羊膜は分娩後に廃棄されてしまう組織である。羊膜は胎児由来の組織であり、3層構造を有している（Single epithelial layer、Thick basement membrane、Avascular mesenchyme）。胎児が子宮に着床して発育を遂げるために必要な胎児身体以外の組織器官を胎児付属物といい、卵膜、胎盤、臍帯、羊水が含まれる。羊膜はこのなかの卵膜を形成する膜である。卵膜は子宮内で胎児、臍帯および羊水を包んでいる薄い膜で、羊膜、絨毛、脱落膜の3層の膜で構成される。このうち最外層の脱落膜は母体由来で子宮内膜が変化したものであり、羊膜と絨毛膜は受精卵から分化したものである。

羊膜は胎生の7～8日目に胎児外胚葉および中胚葉が進展して形成される。外胚葉由来の1層の上皮細胞（羊膜細胞）とその下の中胚葉組織からなり、卵膜の最内層を形成し、羊水を分泌する。さらに羊膜は胎盤胎児面および臍帯を被包し、胎児の表皮に移行する。妊娠11週の終わりには、絨毛膜と羊膜の中胚葉は密着し胚外体腔は閉鎖されるが、絨毛膜と羊膜の結合はゆるく、妊娠末期でも容易に分離することができる。ヒトにおいて絨毛膜と羊膜には血管はない。その羊膜の採取は、摘出された胎盤から用手的に容易に絨毛膜から剥離される⁵⁵。

この羊膜はあらゆる組織への移植に適していると考えられている。それは、抗炎症作用と低い抗原性を有しているからである^{56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65}。羊膜の低抗原性を証明する実験で行われたボランティアへの移植や、lysosomal storage disease 治療で試された移植において、腫瘍発現はなかった^{58, 66, 67}。通常において羊膜は出産後に破棄されている。当院では倫理委員会の承認のもと、インフォームドコンセントを得た上で、母体と新生児を傷つける事無く採取している。現在、Cryopreserved human AMは眼球の様々な疾患への移植で行われている⁶⁸。その移植では、羊膜は炎症と血

管新生、およびscarringを抑制し、眼球の再上皮化を促していた。羊膜は補修素材としての作用だけではなく、新しい正常の組織の伸展の足場となるとも考えられている。

しかし、羊膜は、cryopreservedの状態では準備作業が煩雑で、貯蔵には大型冷凍庫を必要とし、信頼できる滅菌が無いのが実情であった。また、ハンドリングも悪く、使用するには注意点が多い。そこで、新たな乾燥羊膜が開発された⁸。羊膜の乾燥では、蛋白質の変性を防ぐ為に低温で行う必要がある。これを実現した方法がhyperdry methodである。これは、真空乾燥、遠赤外線乾燥、マイクロ波乾燥の3つを組み合わせた方法である。

3

Material and Method

Preparation of Dried Human Amniotic Membrane

ヒト乾燥羊膜（HD AM）の作成は次の手順で行われた。富山大学付属病院において、帝王切開で出産された妊婦より、羊膜を採取した。採取に先立ち、Donorにはヘルシンキ宣言に沿った十分なインフォームドコンセントを得ている。問診による、家族歴と既往歴の十分な聴取によるCJDに対するmedical checkと（表2）⁶⁹、血清検査での、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ヒトT型リンパ好性ウイルス1型（HTLV-1）、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイル

ス、梅毒の陰性を確認した。帝王切開後、摘出された胎盤から無菌状態で用手的に絨毛から羊膜を剥離し採取した。羊膜は、妊娠中期には絨毛膜と密着するが、その結合はゆるく、妊娠末期でも容易に分離することができるため、この剥離作業は容易である。そして、安全キャビネット（クラスII：ドラフト + 排気滅菌 + 滅菌吸気エアカーテン）で滅菌リン酸リンゲル液での数回の洗浄を行い、10cm²に裁断した後、Hyperdry methodでの乾燥をおこない、 γ 線照射滅菌（25Gy）を施行した。

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">①ヒト成長ホルモンの投与を受けた者②硬膜移植歴がある者③角膜移植歴がある者④CJD 及びその類縁疾患の家族歴がある者⑤CJD 及びその類縁疾患と医師に言われたことのある者⑥1980年以降、英国、アイルランド、スイス、スペイン、ドイツ、フランス、ポルトガル、ベルギー、オランダ、イタリアの 10カ国に通算 6 ヶ月以上の滞在歴を有する者。 |
|---|

表2 クロイツフェルト・ヤコブ病診療マニュアル [改訂版]、厚生労働省特定疾患対策研究事業、厚生労働省遅発性ウイルス感染調査研究班

hyperdry method は、真空乾燥、遠赤外線乾燥、マイクロ波乾燥の3つを組み合わせた方法である。

真空乾燥は、飽和蒸気圧の原理を利用して、低温で乾燥を達成する方法である。通常、水の沸点は100°Cであるが、気圧の低下に伴い沸点は低下する。水では、飽和蒸気圧に示される圧力と温度の関係より、気液界面で気相中における蒸気分圧が蒸気圧に等しい状態で平衡状態になる。この平衡状態となったときの圧力が飽和蒸気圧であり、日常的な大気圧である約100kPa

(キロパスカル)では、その飽和蒸気圧での温度は100°Cとなる。そこで気圧を下げていくと、水はより低い温度で沸騰する性質を利用して乾燥を促進させる方法である。

遠赤外線は可視光線の赤に隣接する赤外線のうち可視光線から遠い方を指し、その波長域は3 μ m ~ 1mm である。遠赤外線的主要波長域である2.5 ~ 30 μ m は、多くの物質の固有振動領域と重なり、遠赤外線が物質に当たると、その表面で吸収され、固有振動が活発化される。この作用で物質の温度が上昇し乾燥が行われる。

マイクロ波は波長が約1mmから30cmまでの波で、電子装置によって発生される。マ

イクロ波は水分子を振動させ発熱させる。これを利用した乾燥方法である。赤外線同様に内部加熱であるが、水分子に直接働きかけるので、加熱にかかる時間が大幅に短縮されるといった特徴がある (図18) 70, 71。

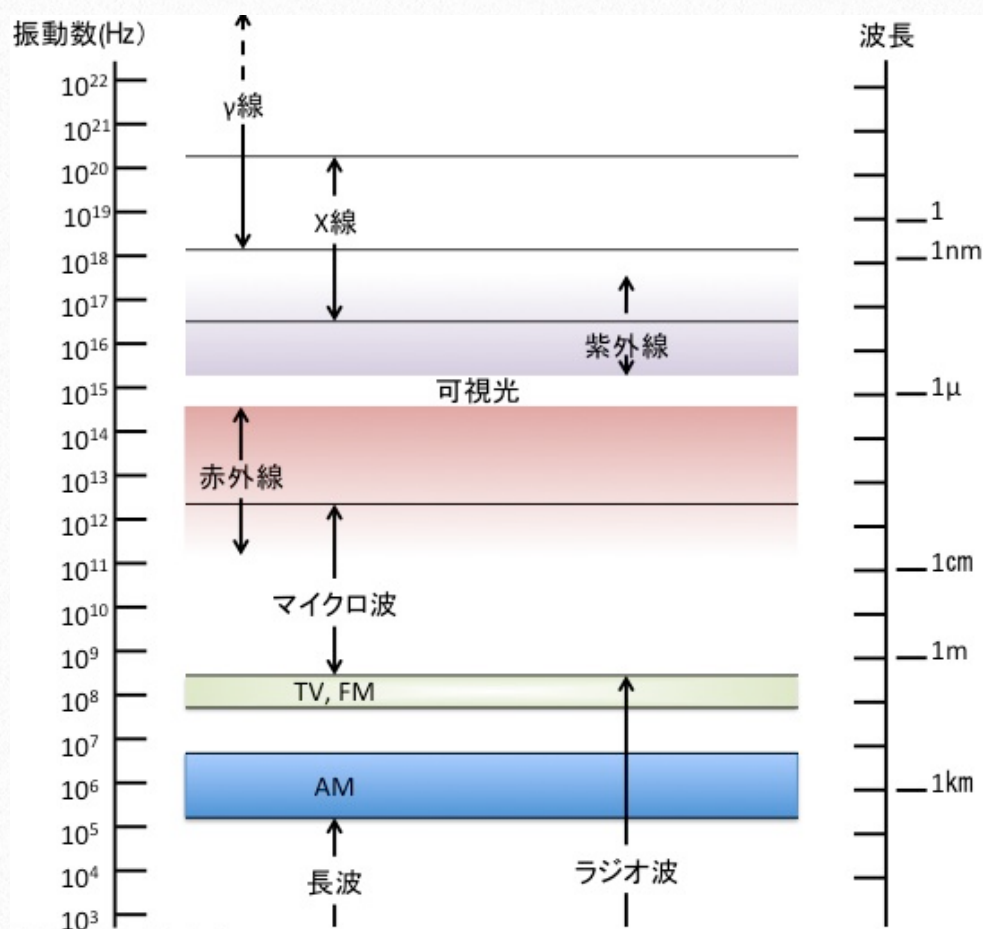


図18 電磁波のスペクトル

気圧の減圧で水の沸点を低下させ、遠赤外線により試料表面の水分を除去し、マイクロ波で水の運動エネルギーを上昇させることで、低温での乾燥を実現した方法である。羊膜がwetな時に、気圧を大気圧の101.3kPaから約0.4kPaまで最大限に減圧し、一旦、4.6kPaまで圧を戻し、0.1kWのマイクロ波の照射を1-3分行った。そして、再び気圧を最大限に減圧した。この工程を数回繰り返し、その間、0.4kWヒーターでの遠赤外線照射を平行して行った。その環境の温度は摂氏50°Cを超えないよう設定した。4.6kPaでの沸点は約30°Cであり、この作業によって羊膜は、その蛋白質の変質や酸化をほとんど起こさずに乾燥された（図19）。

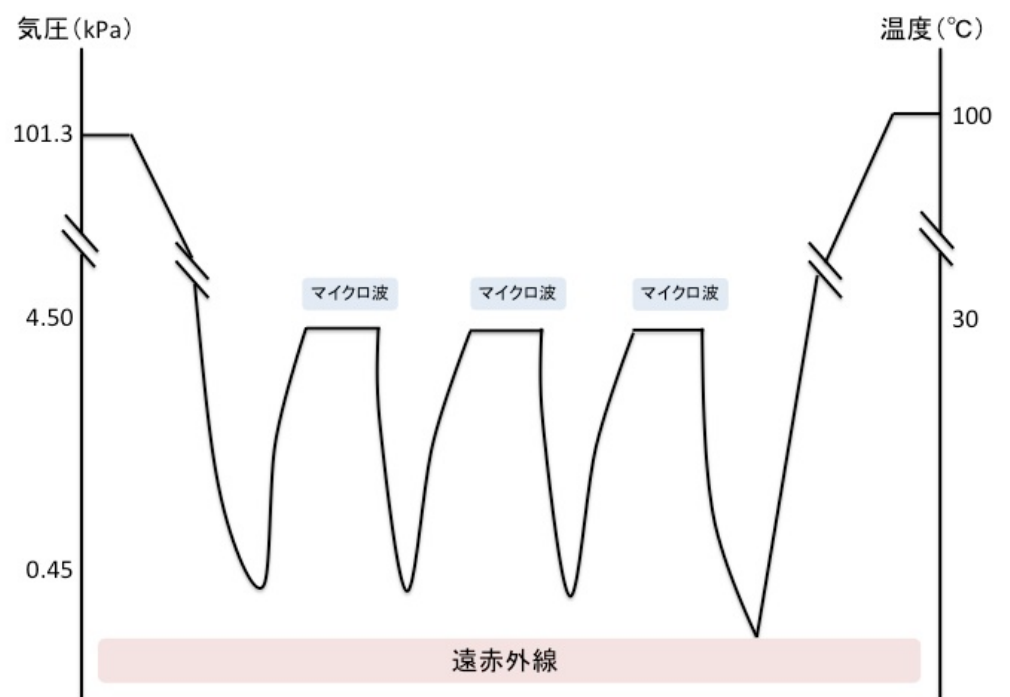


図19 hyperdry methodのプロトコール：羊膜がwetな時に、気圧を大気圧の101.3kPaから約0.4kPaまで最大限に減圧し、一旦、4.6kPaまで圧を戻し、0.1kWのマイクロ波の照射を1-3分行った。そして、再び気圧を最大限に減圧した。この工程を数回繰り返し、その間、0.4kWヒーターでの遠赤外線照射を平行して行った。その環境の温度は摂氏50°Cを超えないよう設定した。4.6kPaでの沸点は約30°Cであり、この作業によって羊膜は、その蛋白質の変質や酸化をほとんど起こさずに乾燥された。

Hyperdry methodはサクラ精機株式会社（東京）に、γ線照射滅菌は栄研化学株式会社（東京）に委託した。

この方法で作成されたHD AMは、常温で保存が可能であり、用途に応じた自在な裁断が容易である点は、臨床の場で使用する際に優れている（図20）。



図20 HD AM

Evaluation of Efficacy of Dried Human AM as Substitute for Dura

20匹の14週齢、雄のウイスラーラットを用いた。ペントバルビタールの腹腔内投与で全身麻酔後、頭部に1%リドカインで局所麻酔を施した。頭部に矢状切開を行い、手術顕微鏡下とmicro drillを用いて右前頭頭頂開頭を行った。そして、硬膜を5×7mmの長方形に摘出した(図21、22)。その作業の際には、直下の大脳皮質を損傷させないように慎重に行った。16個体に、硬膜欠損部にあわせたサイズのHD AMを縫合せずに覆った(HD AMグループ)。4個体に、expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE)で同様の処置を行った(対照グループ)。それぞれのグループで、頭蓋欠損部を骨漏で補填し頭皮は2-0 絹糸で縫合した。

2週間後にHD AMグループから4個体、1ヶ月後にHD AMグループと対照グループからそれぞれ4個体、3ヶ月後にHD AMグループから4個体、6ヶ月後にHD AMグループから4個体を灌流固定した。固定は、ペントバルビタールの腹腔内投与で深く全身麻酔を行った後、4% formalin solutionで行った。開頭を行った周囲の骨組織、硬膜、大脳皮質を一塊として取り出し、組織学的評価を行った。組織はformic acidでの脱灰後に切片とし、hematoxyline-eosin、azanでの染色を行った。組織学評価では、形態の観察と炎症の評価を好中球数とリンパ球数の計測で行った。好中球数およびリンパ球

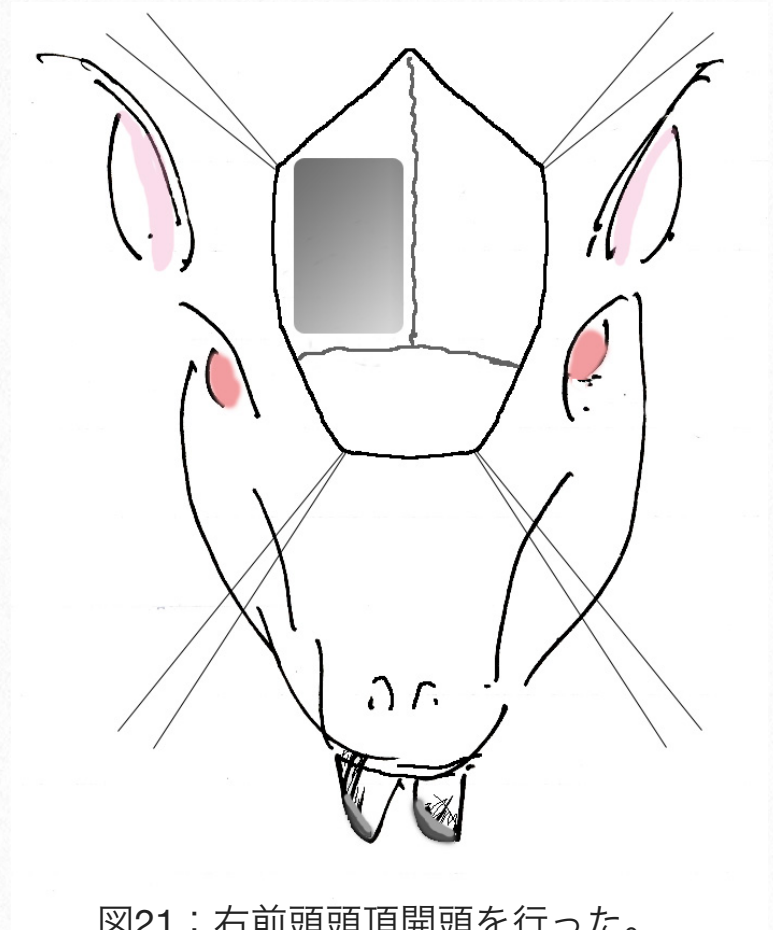


図21：右前頭頭頂開頭を行った。

【方法／断面図】

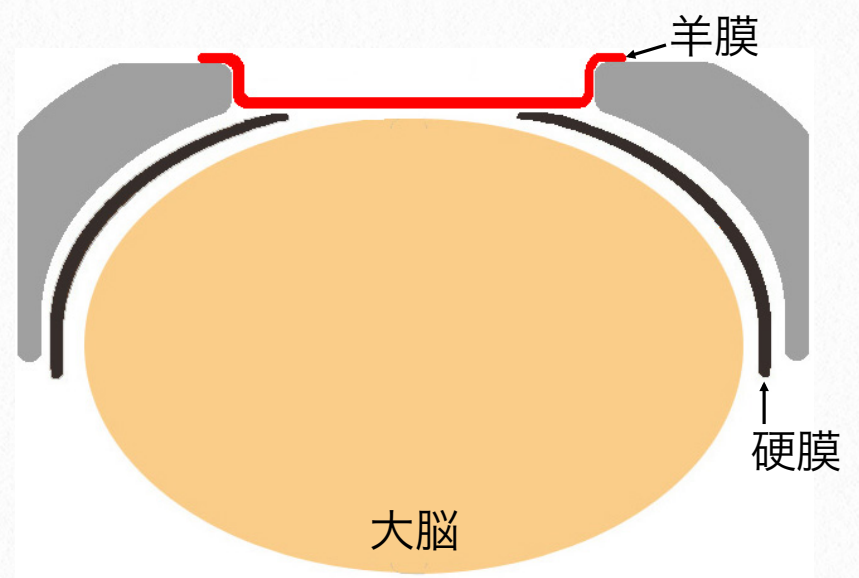


図22：開頭および硬膜切除を行い、その硬膜欠損部をHD AMで修復した。

数の計測は、硬膜欠損部の中央部での、強拡大×400での1視野で行った。実験動物の取り扱いガイドラインに従い行われた。

Clinical Studies

ラットでの硬膜再建実験でえられた結果に基づき、我々は倫理委員会の承認を得た上で臨床応用を行った（承認番号：臨認20-58）。

平成21年12月から平成22年5月の期間で、富山大学付属病院脳神経外科で施行された頭蓋底手術の10症例に対し、硬膜修復目的にヒト乾燥羊膜を使用した。症例詳細は表6に示した。すべての症例において、その手技のriskと他の方法に関する情報を聞いていただきインフォームドコンセントを得たうえで行われた。

HD AMはそれぞれの硬膜欠損に応じたサイズおよび形状に裁断した。硬膜欠損部位を覆うようにHD AMを硬膜下に敷き（underlay technique）、さらに硬膜外にも同様の欠損部を覆った（overlay technique）。この硬膜外に置いたHD AMはフィブリン糊で硬膜に固定した。そして、死腔は脂肪組織や有茎筋膜、あるいは骨膜、フィブリン糊で充填し、骨弁はチタンプレートで固定した。

術後には、創部の視診および触診とともに、頭部CTと頭部MRIでの髄液漏による皮下水腫の形成の有無を評価した。Primary endpointは再手術を要した髄液漏とし、

secondary endpointは感染、あるいは腫瘍増大による再手術とした。

統計解析データはmean±SDにて表記した。2群間の比較はunpaired t-testを用いた $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

4

Results

Experimental Studies

どの個体にも感染や髄液漏は発生しなかった。HD AMでは、2週間後に厚い結合組織が硬膜と骨膜から伸展し、完全にHD AMを取り囲んでいた。HD AMと大脳皮質には、癒着は観察されなかった。また、結合組織内には炎症細胞が観察された（図23）。HD AMの中央付近の炎症部分は、ほとんどが好中球であった（図24）。HD AMに多くの好中球が密着し、これを貪食しているように見えた。また、線維芽細胞の出現をみとめ、創傷治癒反応が進んでいると思われた（図25）。骨縁からは、厚い結合組織が硬膜と骨膜から伸展し、完全にHD AMを取り囲んでいた。中央付近に観察された強い炎症反応は無く、結合組織の形成が観察された（図26）。その結合組織には、増加した線維芽細胞が認められ、活発に線維芽細胞による創傷治癒が進んでいると思われた（図27）。その1ヶ月後には結合組織は薄く変化し、炎症細胞は減少し

ていた（図28）。移植されたHD AMグラフは短くなっていた。ここでは炎症はほとんど観察されなかった。また、別の標本では既にHD AMが観察できなくなっていた（図29）。形成された結合組織内では、膠原線維がピンク色に染まり、線維芽細胞の核は濃縮し細胞外線維の走行に一致して伸展していた。これらの所見は成熟した線維芽細胞の所見と思われ、創傷治癒は増殖期から再構築に至ったと考えられた（図30）。そして、3ヶ月後、6ヶ月後では、層状の膜構造の形成が観察された（図31）。

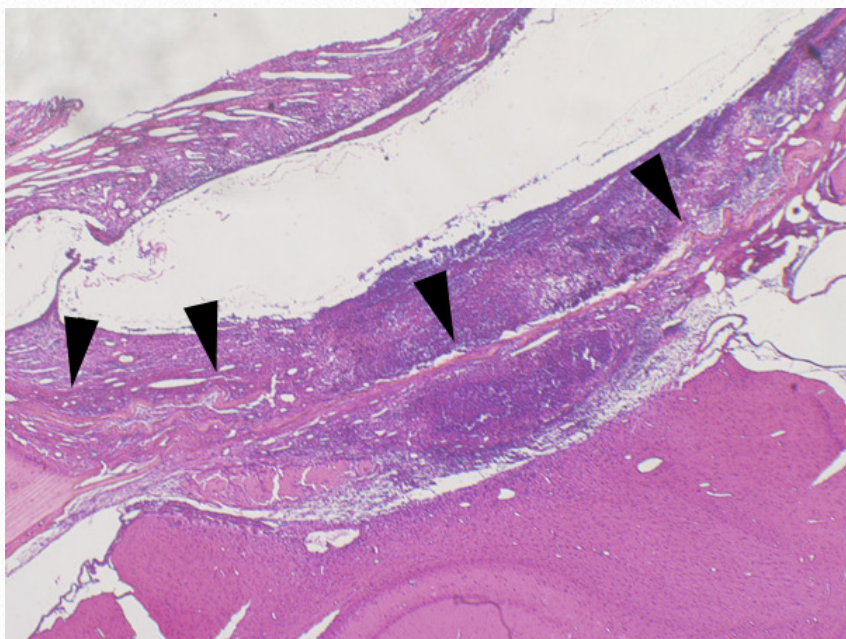


図23 HD AM移植後2週間目 (×40) : 硬膜および骨膜の断端から厚い結合組織が伸展し、HD AM (▲) を完全に囲んでいるのが観察された。大脳皮質との癒着は観察されなかった。

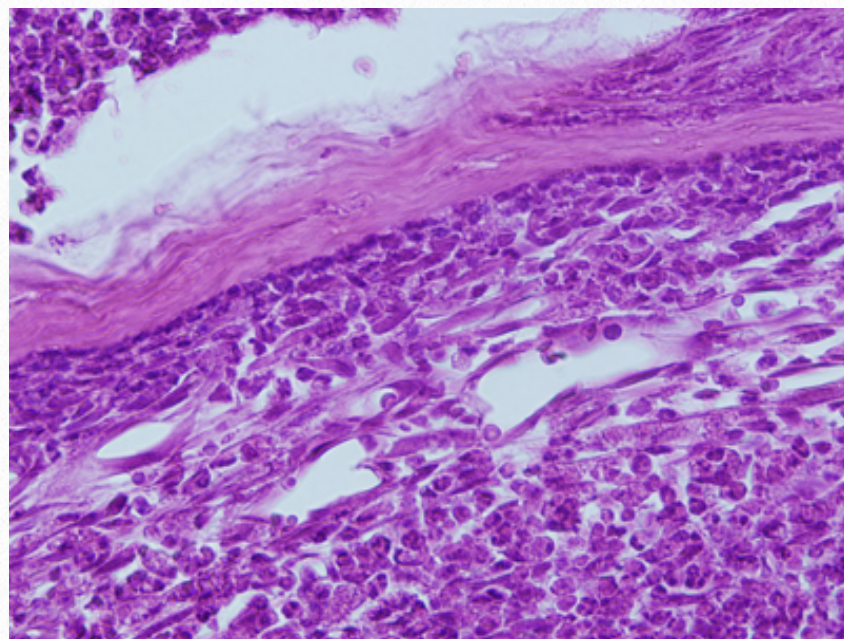


図25 HD AM移植後2週間目 (×400) : HD AMに多くの好中球が密着し、これを貪食しているように見えた。線維芽細胞の出現をみとめ、創傷治癒反応が進んでいると思われた。

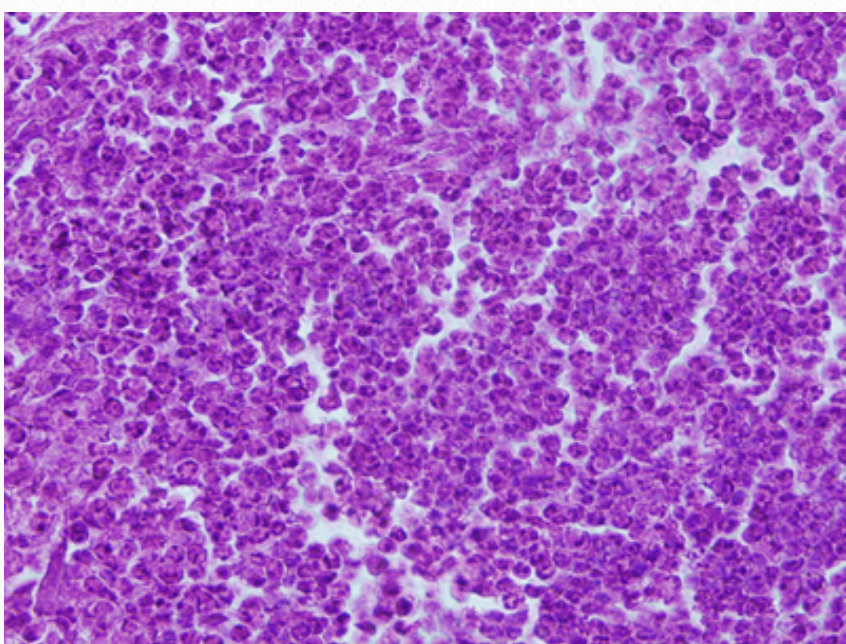


図24 HD AM移植後2週間目 (×400) : HD AMの中央付近の炎症部分は、ほとんどが好中球であった。

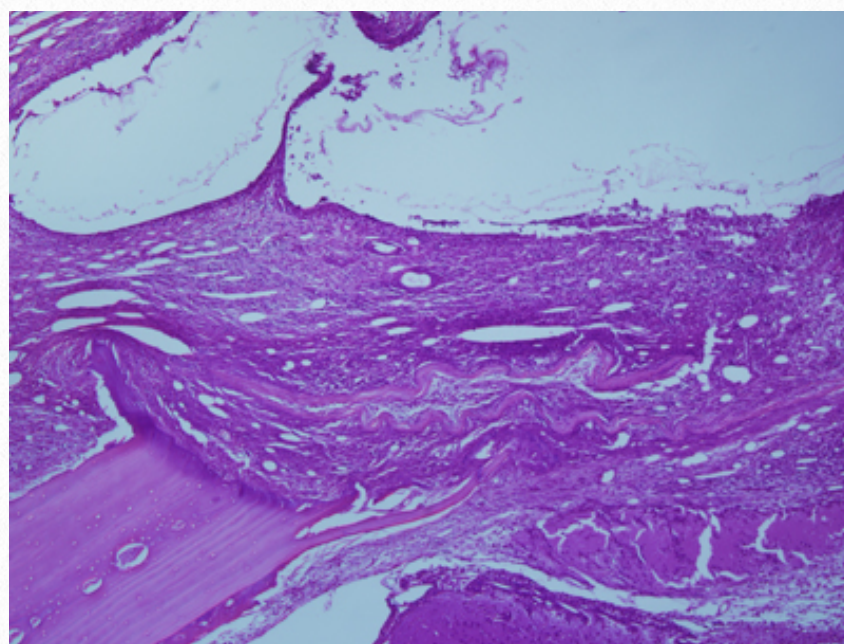


図26 HD AM移植後2週間 (×100) : 骨縁からは、厚い結合組織が硬膜と骨膜から伸展し、完全にHD AMを取り囲んでいた。中央付近に観察された強い炎症反応は無く、創傷治癒は増殖期に入っている様子であった。

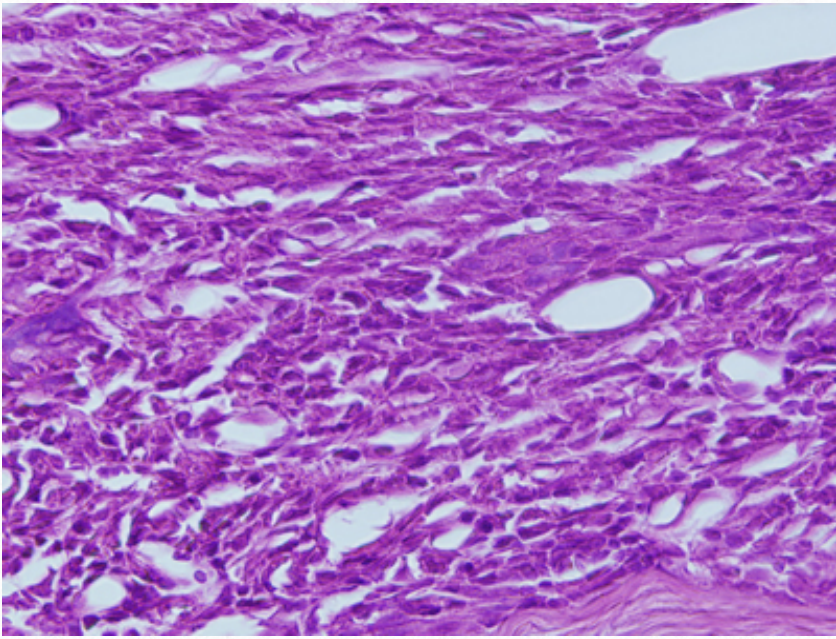


図27 HD AM移植後2週間 (×400) : 活発に線維芽細胞による創傷治癒が進んでいると思われた。

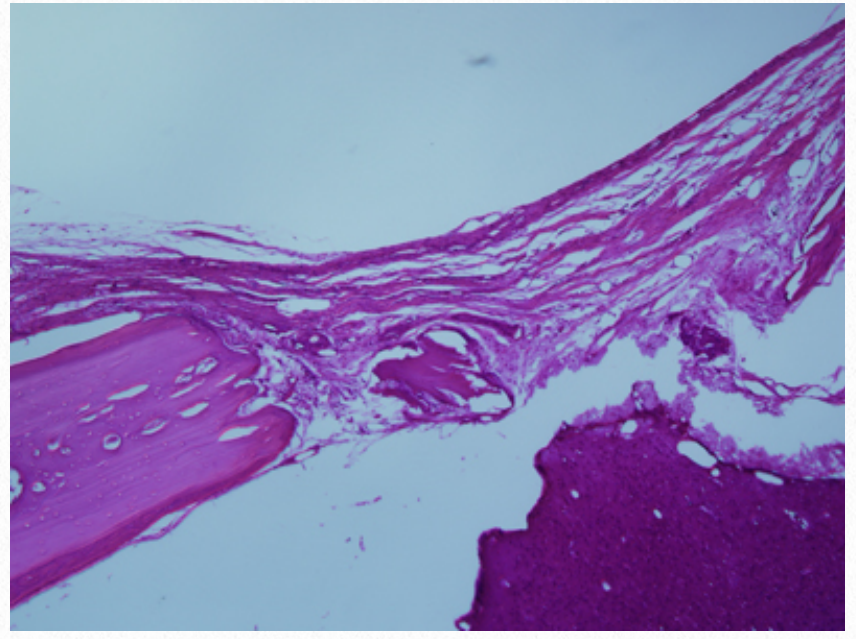


図29 HD AM移植後1ヶ月 (×100) : 図とは別の標本である。ここでは炎症はほとんど観察されなかった。また、この標本では既にHD AMが観察できなかった。

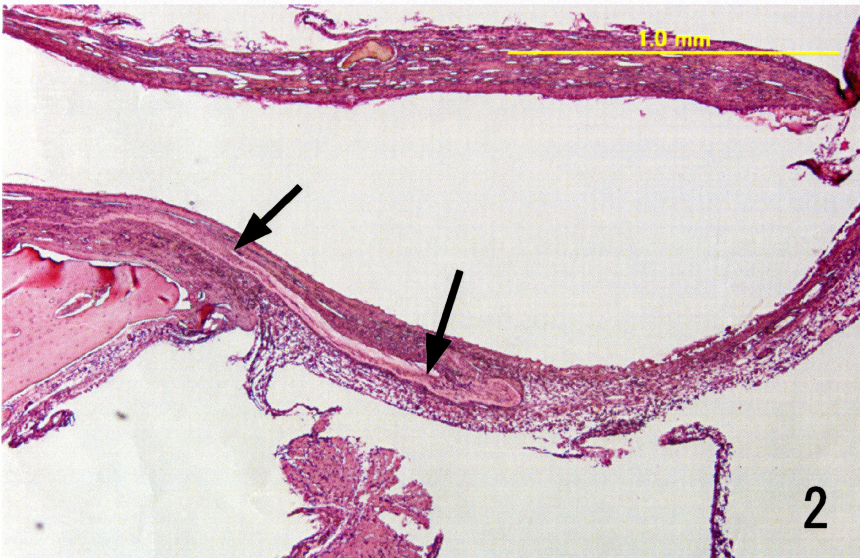


図28 HD AM移植後1ヶ月 (×40) : 結合組織が薄く変化していた。そして、移植したHD AMが短くなっていた(→)。周囲の炎症反応の減少が観察された。

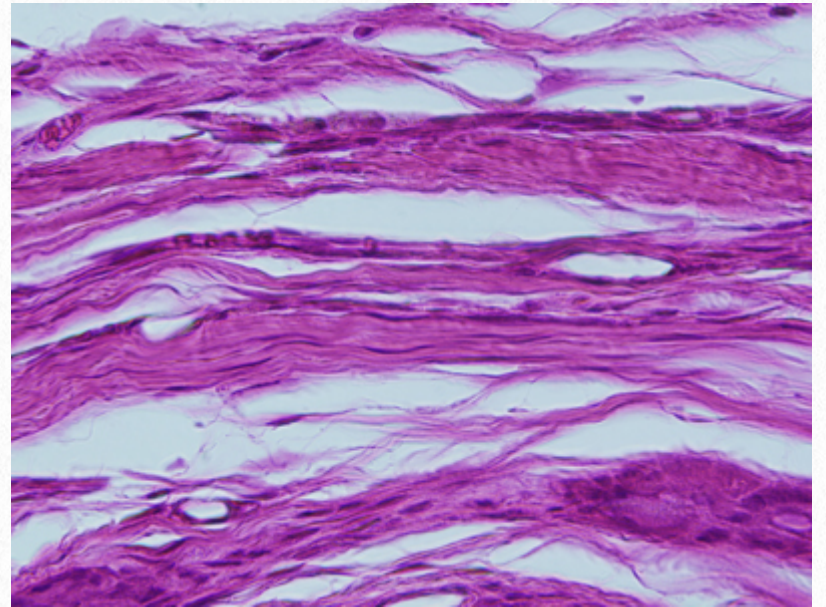


図30 HD AM移植後1ヶ月 (×400) : 膠原線維がピンク色に染まり、線維芽細胞の核は濃縮し、細胞外線維の走行に一致して伸展し、成熟した所見が観察された。創傷治癒は増殖期から再構築に至ったと考えられた。

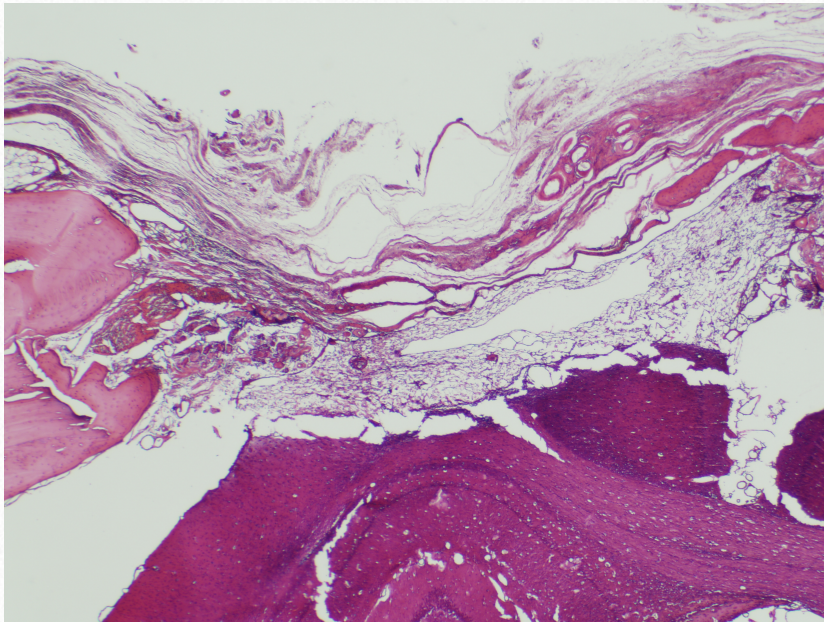


図31 HD AM移植後6ヶ月 (×40) : 層状の膜構造の形成が観察された。

ePTFEにおいては、骨膜から薄い結合組織が伸展していたが、まばらであった。水泡形成が観察され、出血も伴っていた。

ePTFEと欠損部を覆うような結合組織の形成は観察されなかった (図32)。

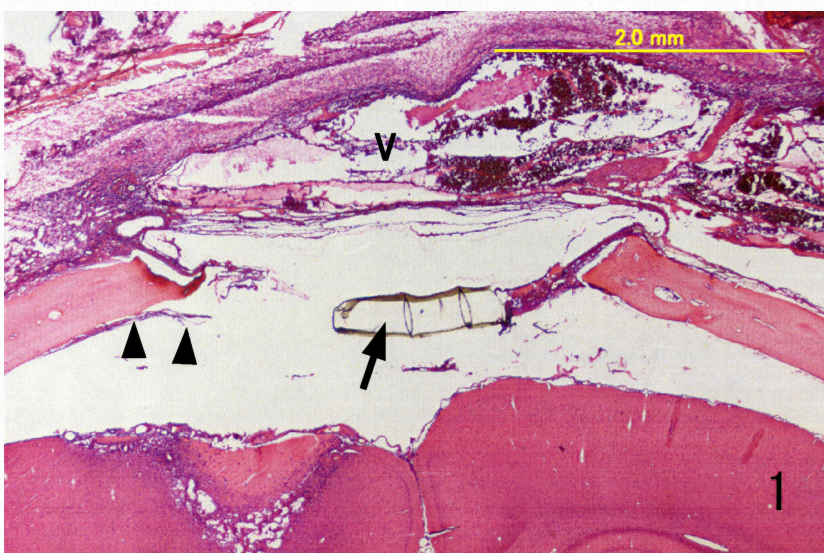


図32 ePTFE移植後1ヶ月目 (×40) : 骨膜から薄い結合組織 (▲) が伸展していたが、まばらであった。水泡形成が観察された(V)、出血も伴っていた。PTFE (→) と欠損部を覆うような結合組織の形成は観察されなかった。

そして、炎症の評価として好中球数とリンパ球数を計測し評価した。HD AMグループでは、2週間目に比較的強い炎症が観察された。組織学的には、ほとんどが好中球であり、リンパ球はわずかであった。好中球の浸潤は1ヶ月目にほぼ消退した (図33)。1ヶ月目での、HD AMグループと対照グループとの炎症の比較では、好中球数、リンパ球数ともに対照グループが多かった (表4、5)。

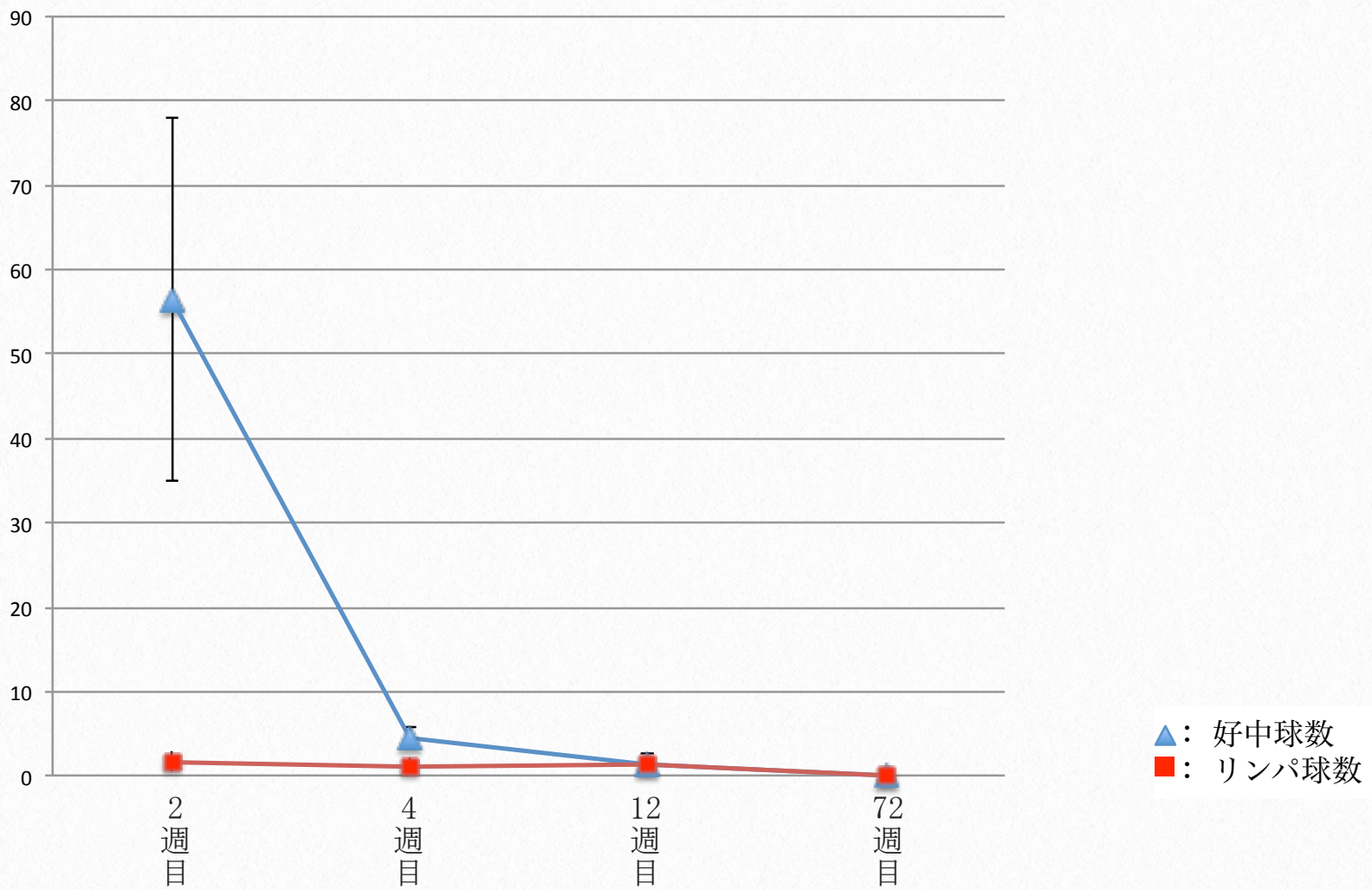


図33 HD AMグループでの好中球数とリンパ球数

ヒト乾燥羊膜	4.5 ± 1.3
ePTFE	12.0 ± 3.6

p = 0.0074

表4. ヒト乾燥羊膜とePTFEを用いた際の移植局所での1ヶ月目の好中球数の比較

(強拡大 ×400での一視野あたり； Mean±SD)

ヒト乾燥羊膜	1.25 ± 1.0
ePTFE	4.75 ± 1.5

p = 0.0077

表5. ヒト乾燥羊膜とePTFEを用いた際の移植局所での1ヶ月目のリンパ球数の比較

(強拡大 ×400での一視野あたり； Mean±SD)

Clinical Studies

Primary endpointとした再手術を要した髄液漏の頻度は、術後、1例に皮下の髄液貯留が発生したが、次第に消失したため、0% (0/10) であった (表6)。

Secondary endpointとしての、感染、あるいは腫瘍増大による再手術を検討では、1例において術後1ヶ月後に創部感染を起こし皮下膿瘍を形成した (case4)。その膿瘍は手術で摘出され、その術中所見では、HD AMとは隔離された箇所での感染であった事が証明された。その為、移植羊膜に関連する感染は0% (0/10) と判定した。10例中、手術により一部に腫瘍が残存した例は

6例 (case1、case3、case4、case6、case7、case8) があった。再手術はcase3、6、8に行われたが、残存腫瘍に対しての手術であった。case1、case4ではサイバーナイフ治療、case3では陽子線治療、case6ではXナイフ治療が行われた。これらを総合すると腫瘍増大による再手術は30% (3/10) に認められた。これらは、初回手術では切除不可能であった残存腫瘍に対する手術であり、ヒト乾燥羊膜による影響ではないと判断した。

術後の平均調査期間は6.8ヶ月 (範囲：2~19ヶ月) であった (表6)。

	Age/ Sex	Pathology	Approach	Follow-Up (Month)	Cerebrospinal fluid leakage
1	70/F	Chondrosarcoma	Anterior transpetrosal approach	19	none
2	38/M	Meningioma	Orbitozygomatic approach	16	none
3	5/M	Chordoma	Anterior transpetrosal approach	6	transient
4	54/M	Chondrosarcoma	Anterior transpetrosal approach	6	none
5	71/F	Cavernoma	Lateral suboccipital approach	5	none
6	59/M	Meningioma	Orbitozygomatic approach	5	none
7	46/F	Meningioma	Anterior transpetrosal approach	4	none
8	70/F	Craniopharyngioma	Orbitozygomatic approach	3	none
9	67/M	Meningioma	Orbitozygomatic approach	2	none
10	69/F	Meningioma	Frontobasal approach	2	none

表6. ヒト乾燥羊膜で硬膜の修復を行った10症例

<症例1>

70歳、女性

診断：軟骨肉腫

経過：2004年2月28日に頭部を打撲し近医を受診した。その時の頭部CTで頭蓋内腫瘤性病変の指摘を受けた。自覚されていなかったが、診察で左外転神経麻痺が指摘された。頭部MRIで左海綿状脈洞を主座とする約3cmほどの腫瘍を認めた。自覚症状が無いために経過観察となっていたが、画像での経過観察で腫瘍は次第に増大傾向が

観察された(図34)。次第に左動眼神経麻痺を伴うようになり2008年12月1日に摘出術を施行した。Approachはanterior trans-petrosal approachを選択した。しかし、斜台周囲の腫瘍な摘出できず亜全摘に終わった。摘出後に左中頭蓋窩の底部に硬膜の欠損が生じた。HD AMで欠損部を覆い修復を行った。術後、感染や髄液漏は発生せず、神経学的にも良好な経過をとった(図35)。術後、3ヶ月後に残存腫瘍に対してサイバーナイフ治療を行い経過観察を継続している。

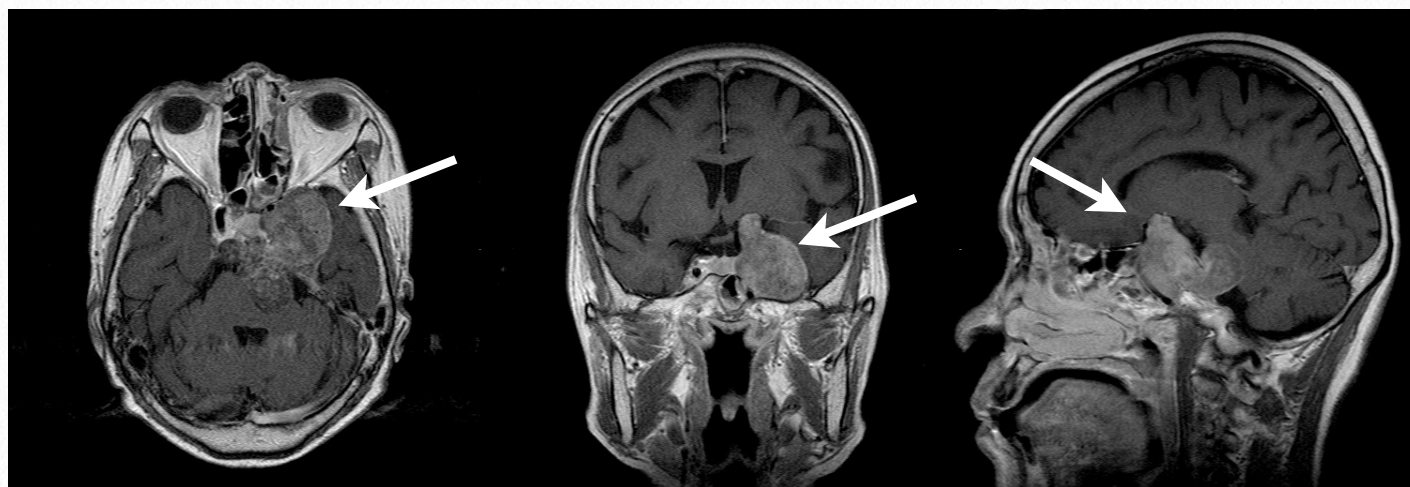


図34 症例1・術前頭部MRI：頭部MRIでは左海綿静脈洞に主座を置く腫瘍が観察される(→)。内側への進展は、斜台を破壊しながら硬膜を貫き硬膜下腔へと至り、腫瘍は脳幹を強く圧迫していた。

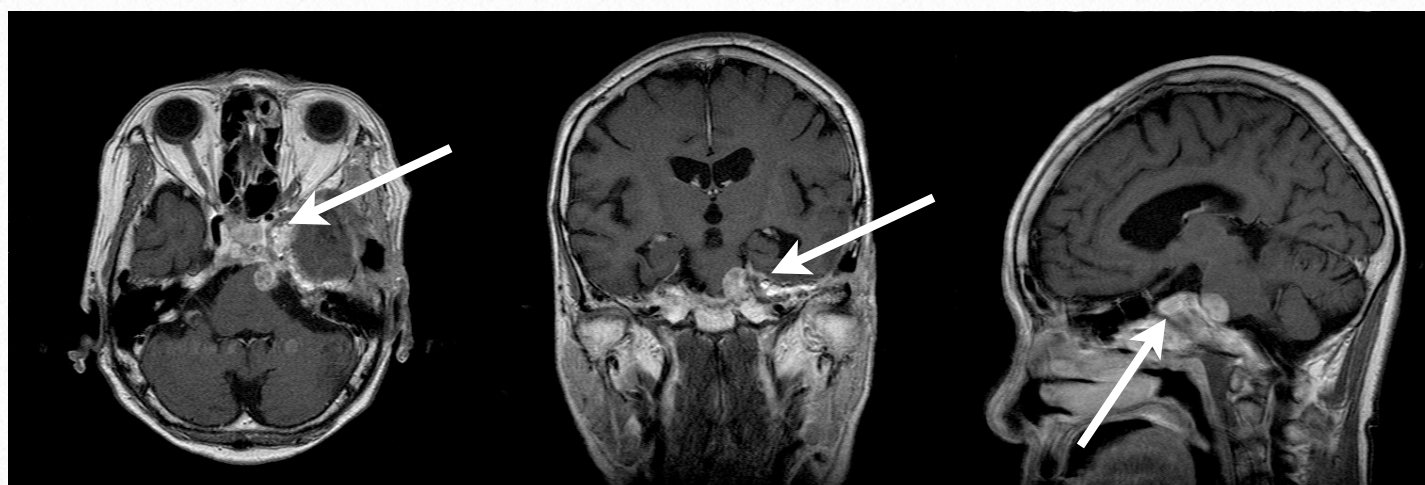


図35 症例1・術後MRI：腫瘍の大部分は摘出された。しかし、内側には残存し(→)、これに対してはサイバーナイフ治療を受けていただいた。術後、髄液漏は観察されなかった。

<症例2>

38歳、男性

診断：髄膜種

経過：2007年より頭痛を自覚し、次第に悪化した。2008年12月に近医脳神経外科を受診し、頭部CT、MRIで右中頭蓋窩の腫瘤性病変が指摘された（図36）。激しい頭痛を自覚し、眼底検査では鬱血乳頭が観察され、長期間にわたる頭蓋内圧亢進があったと考えられた。2009年3月4日に摘出術を行った。Approachはorbito-zygomatic

approachを選択した。腫瘍は右中頭蓋窩の硬膜から発生しており、腫瘍の全摘出により硬膜欠損が生じた。HD AMで欠損部を覆いフィブリン糊で固定した。術後、感染や髄液漏は発生しなかった（図37）。術後、一時的に左片麻痺が起こったがリハビリテーションで次第に回復した。現在も外来で経過観察中である。

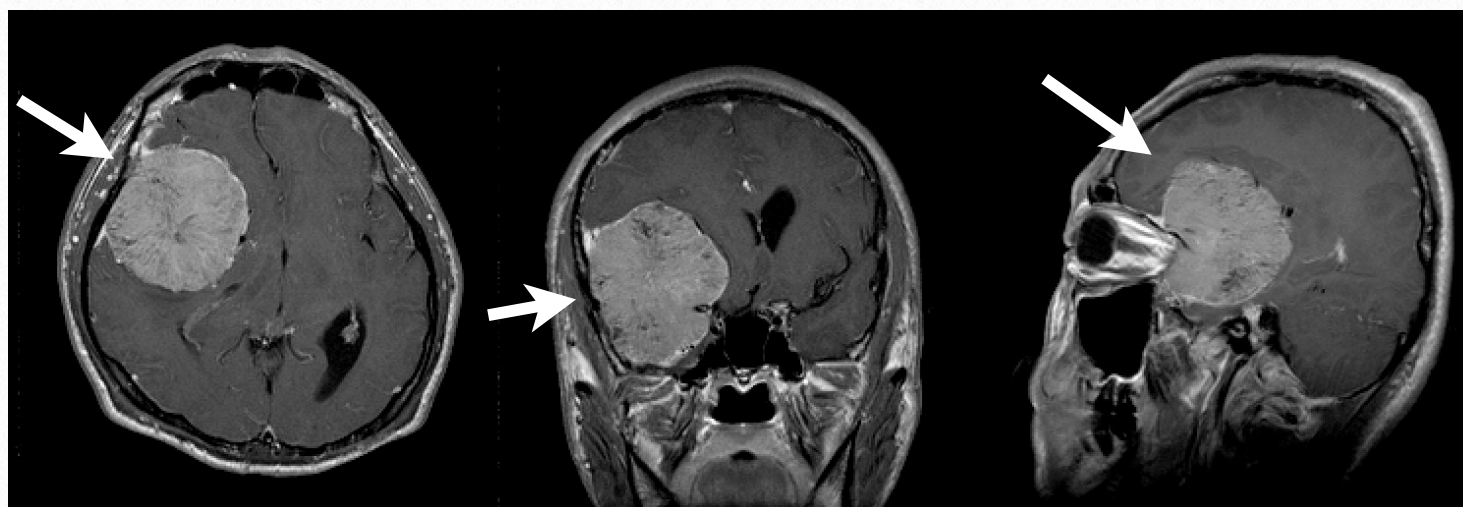


図36 症例2・術前MRI：頭部MRIでは左海綿静脈洞に主座を置く腫瘍が観察される（→）。内側への進展は、斜台を破壊しながら硬膜を貫き硬膜下腔へと至り、腫瘍は脳幹を強く圧迫していた。



図37 症例2・術後MRI：腫瘍は全摘できている。髄液漏は観察されなかった。

<症例3>

5歳、女児

診断：類上皮腫

経過：2009年11月より右顔面の激しい痛みを自覚するようになった。近医脳神経外科を受診し、撮像した頭部MRIで脳幹腹側の腫瘤性病変が指摘された（図38）。激しい顔面の痛みはこの病巣による右三叉神経痛であった。当科に紹介となり、2010年1月12日に摘出術を施行した。Approachはanterior trans-petrosal approachを選択した。可及的に腫瘍摘出を行ったが、蝶形骨洞と海綿静脈洞へ浸潤していた病変の摘出は出来なかった。硬膜の切開は右中頭蓋窩から小脳テントに至る、複雑かつ深いものとなった。硬膜切開部をHD AMで覆いフィブリン糊で固定した。術後、右外転神経麻痺が出現した。右三叉神経痛は軽減した。同年7月に蝶形骨洞内の残存腫瘍に対しては虎ノ門病院で経鼻的摘出を受けた。そして、同年10月に海綿静脈洞内の病変に対しては静岡がんセンターで陽子線治療

(66Gy)を行った。経過中に一時的な髄液漏による皮下水腫が観察されたが自然に消失し、再手術を必要としなかった。感染は観察されなかった。腫瘍の再発無く経過した（図39）。

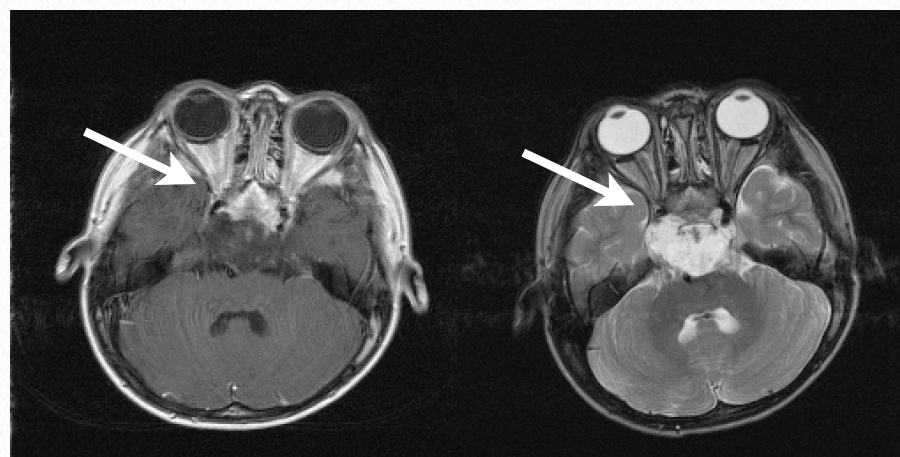


図38 症例3・術前頭部MRI：頭部MRI T1WIでは、斜台を破壊して伸展した低信号の腫瘍が観察される。この病巣はT2WIでは脳脊髄液とほぼ同等の高信号を呈していた（→）。腫瘍は斜台を破壊し、腹側は蝶形骨洞へと伸展し、両側外側は海綿静脈洞まで伸展していた。さらに腹側では脳底動脈と橋を圧迫していた。

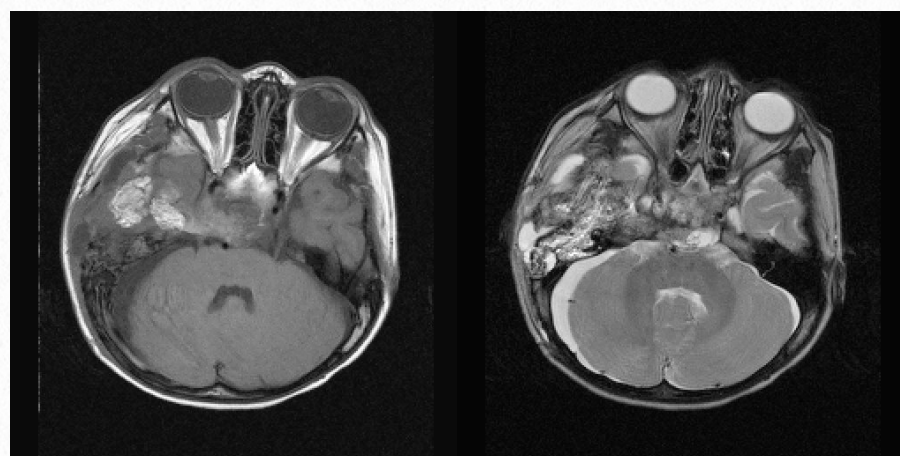


図39 症例3・術後頭部MRI：摘出はR anterior transpetrosal approachで行われた。腫瘍のほとんどは摘出されている。右中頭蓋窩には手術に変化が観察されるが髄液漏による皮下水腫の形成は認められなかった。

<症例4>

54歳、男性

診断：軟骨肉腫

経過：2004年より構音障害と嚥下障害を認めていた。近医耳鼻咽喉科での精査を受けていたが、診療が自己判断で中断していた。その後、症状は徐々に悪化した。2009年10月近医脳神経外科を受診した。下位脳神経麻痺を認め、頭部MRIで左椎体骨に腫瘍性病変が指摘された（図40）。頭部CTでは、左椎体骨先端部が腫瘍による破壊を認めた（図41）。当科に紹介となり、2010年1月13日に摘出術を行った。

Approachはanterior trans-petrosal approachを選択した。腫瘍は左椎体骨先端部を破壊するように存在し、硬膜を破壊して硬膜内へと進展していた。可及的に摘出を加えたが、下位脳神経周囲の病巣は残存した。硬膜切開は左中頭蓋窩から小脳テントに至る、複雑かつ深いものとなり、腫瘍の硬膜浸潤による欠損もあった。HD AMで欠損部を覆いフィブリン糊で固定し修復した。1ヶ月後に創部感染を起こし皮下膿瘍を形成した。その膿瘍は手術で摘出され、その術中所見では、HD AMとは隔離された箇所の感染であった事が証明された。髄液漏は起こすこと無く経過した（図42）。術後、構音障害と嚥下障害に対してリハビリテーションに取り組んでいただき、次第に症状は改善した。残存腫瘍に対しては同年2月にサイバーナイフ治療を行った。

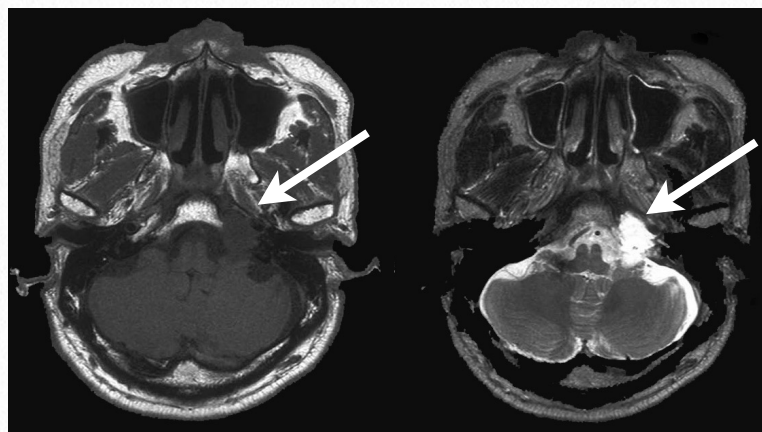


図40 症例4・術前頭部MRI：頭部MRI T1WIでは等信号の病変が左椎体骨先端を破壊し、硬膜内へ伸展しているのが観察された。T2WIでは病巣は高信号であった（→）。

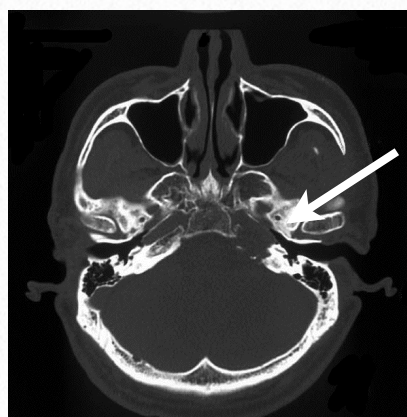


図41 症例4・術前頭部CT：左椎体骨先端部が腫瘍で破壊されている。



図42 症例4・術後頭部MRI：腫瘍は摘出されていた。明らかな髄液漏を認めなかった。

<症例5>

71歳、女性

診断：海綿状血管腫

経過：2008年11月19日よりふらつきを自覚し近医脳神経外科を受診した。頭部CTで左小脳橋角部に出血を認めた。同年12月12日には再出血を起こした。MRIでの評価で、海綿状血管腫からの出血と診断した（図43）。その治療目的で当科に紹介となり、同17日に手術を行った。Approachはlateral suboccipital approachを選択した。血腫がクモ膜下腔に存在し、これを除去すると小脳脳表に暗赤色で葡萄の房状に凸凹した血管腫が確認できた。病変は脳内へと潜在し、これを一塊として摘出した。硬膜を縫合で修復したが、乾燥のため十分に寄せることが出来ず欠損となった。これに対し、HD AMで欠損部を覆いフィブリン糊で固定し修復を行った。経過中に感染と髄液漏は観察されなかった（図44）。術後の経過は良好であった。

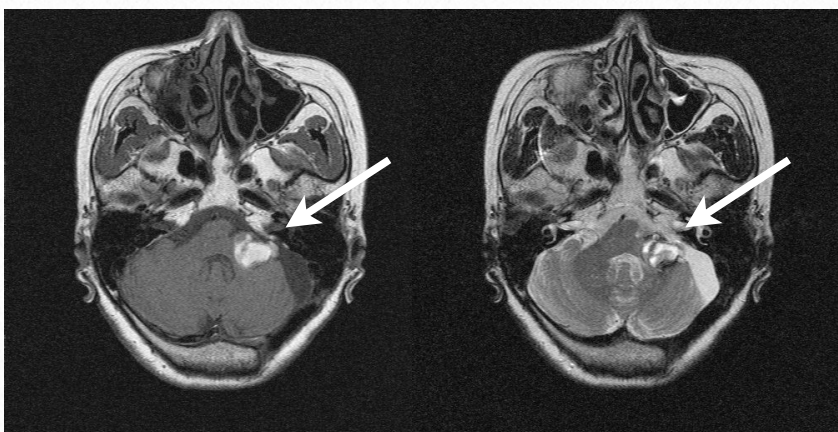


図43 症例5・術前頭部MRI：頭部MRIで左小脳橋角に嚢胞性病巣が認められた。T1WIでは壁が等信号で内容物が高信号であった。T2WIでは壁は津強い低信号と等信号を呈し、内容は高信号と等信号を呈していた（→）。

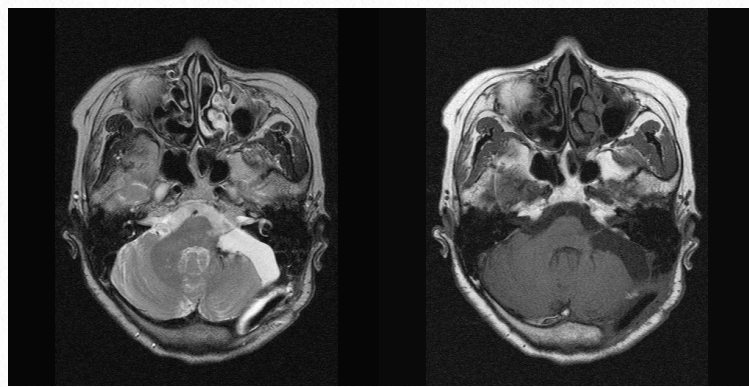


図44 症例5・術後頭部MRI：腫瘍は摘出されていた。明らかな髄液漏を認めなかった。

<症例6>

59歳、男性

診断：髄膜腫

経過：2002年2月失語症が発症し当科を受診、精査の結果、頭部MRIで左中頭蓋窩から左側頭下窩へと進展する腫瘍が指摘された（図45）。これに対し2回の手術での摘出術を行った（1回目：左中頭蓋窩の病巣、2回目：左側頭下窩）。しかし、左海綿静脈洞へと進展した病巣は残存したため、Xナイフ治療を行った。その後、小康状態が続いていたが、2009年6月に腫瘍の増大による左動眼神経麻痺が出現した。その後、腫瘍はさらに増大し、視交叉を圧迫し、これに伴い視力障害も出現した。これに対し再手術での摘出を行った。

Approachはorbit-zygomatic approachを選択した。可及的に腫瘍を摘出し、視交叉の除圧は十分に行えた。しかし、海綿静脈洞へ進展した病巣は残存した。硬膜は病巣の

摘出によって広範に欠損したため、HD AMで欠損部を覆いフィブリン糊で固定した。術後、感染や髄液漏を起こすことなく経過した（図46）。術後、左動眼神経麻痺による複視に改善はなかったが、視力は回復しADLは自立した状態となった。

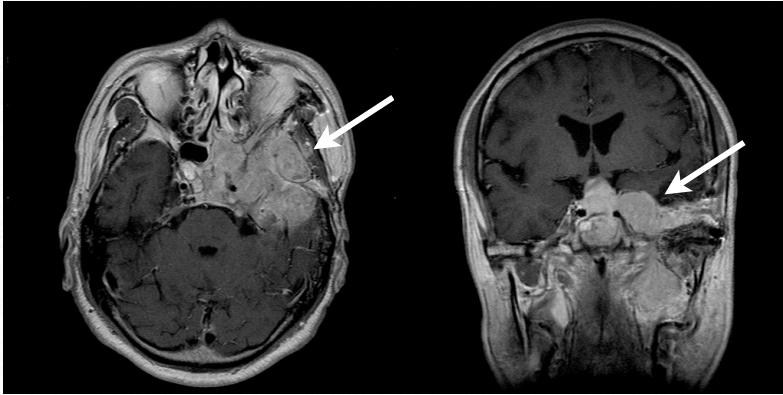


図45 症例6・術前頭部MRI：腫瘍は左中頭蓋底に広く伸展していた。内側では左海綿静脈洞からトルコ鞍、鞍上部、蝶形骨洞へと伸展していた。頭部MRI T1WI Gdでは均一に造影されていた（→）。

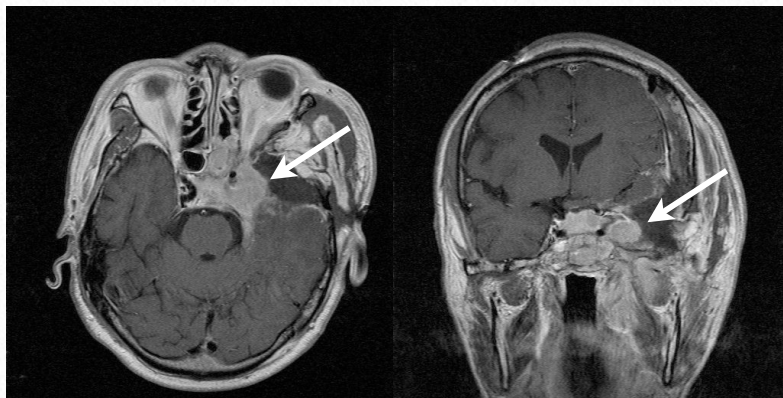


図46 症例6・術後頭部MRI：腫瘍の外側は摘出されているが、海綿状脈洞から内側は残存した。これによって、左眼の視力は回復した。髄液漏は起こさなかった。

<症例7>

46歳、女性

診断：髄膜腫

経過：2009年1月より右顔面の激しい痛みを発作的に自覚するようになった。これに対し同年3月に当科を受診した。問診からは顔面の痛みは三叉神経痛を示唆するものであり、頭部MRIで右小脳橋角部の腫瘤性

病変が指摘され、これが責任病巣であった（図47）。これに対し同8日に摘出術を施行した。Approachはanterior trans-petrosal approachを選択した。腫瘍は小脳テントより発生し右三叉神経第三枝を圧迫し、かつ強く癒着していた。さらには右滑車神経とも強く癒着していた。摘出操作により右滑車神経が切断され、この縫合処置を加えた。右三叉神経第三枝からの腫瘍の剥離も困難を極め、一部残存した。術野での硬膜切開は複雑かつ深いものとなった。そして、腫瘍摘出による硬膜欠損もあり、この修復にHD AMを使用した。HD AMで欠損部を覆いフィブリン糊で固定した。感染や髄液漏は起こすことなく経過した（図48）。術後、右三叉神経痛は軽減したが、右滑車神経麻痺による複視が出現した。

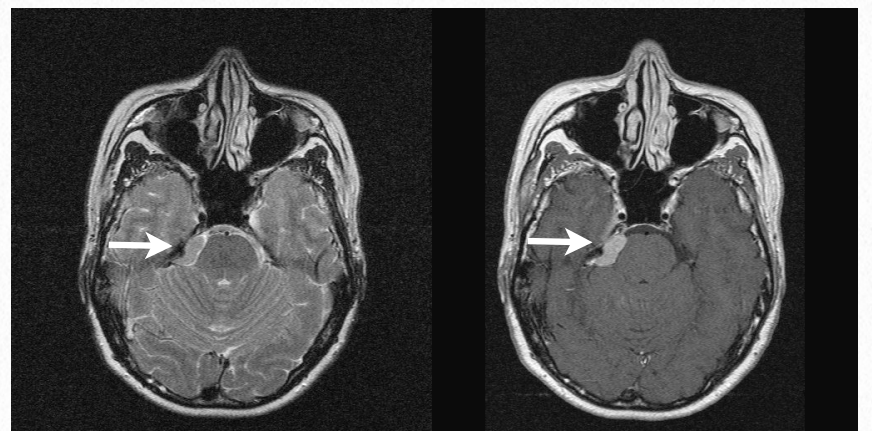


図47 症例7・術前頭部MRI：右椎体骨先端部の内側に腫瘍を認めた。腫瘍は頭部MRI T2WIでは等信号、T1WI Gdで均一に造影されていた。腫瘍は内側で橋を圧迫していた（→）。

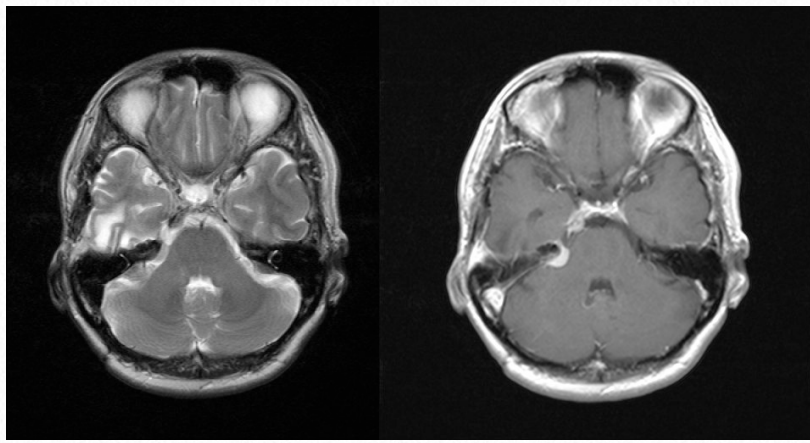


図48 症例7・術後頭部MRI：腫瘍の内側の一部が残存した。髄液漏は起こさなかった。

<症例8>

71歳、女性

診断：頭蓋咽頭腫

経過：2009年12月ごろから視力低下が出現し、次第に悪化した。2010年2月に近医眼科を受診し、そこで両耳側半盲が指摘され頭蓋内病変の疑いで他院脳神経外科に紹介となった。頭部MRIでトルコ鞍上部に腫瘤性病変を認めた。病巣は視交叉を下方か

ら強く圧迫し、これが症状の原因であった（図49）。この治療のため当科に紹介となり、同3月31日に頭蓋内腫瘍摘出術を施行した。Approachはorbit-zygomatic approachを選択した。腫瘍と視交叉、および両側大脳半球との癒着は強く、部分摘出術で終了した。硬膜に損傷による欠損を生じたため、HD AMで欠損部を覆いフィブリン糊で固定した。術後、感染や髄液漏は観察されなかった（図50）。しかし、残存腫瘍が徐々に増大したため、同年11月（8ヶ月後）に再手術を行った。この時の術中所見では、髄液漏は無く良好な硬膜修復の状態が観察された。

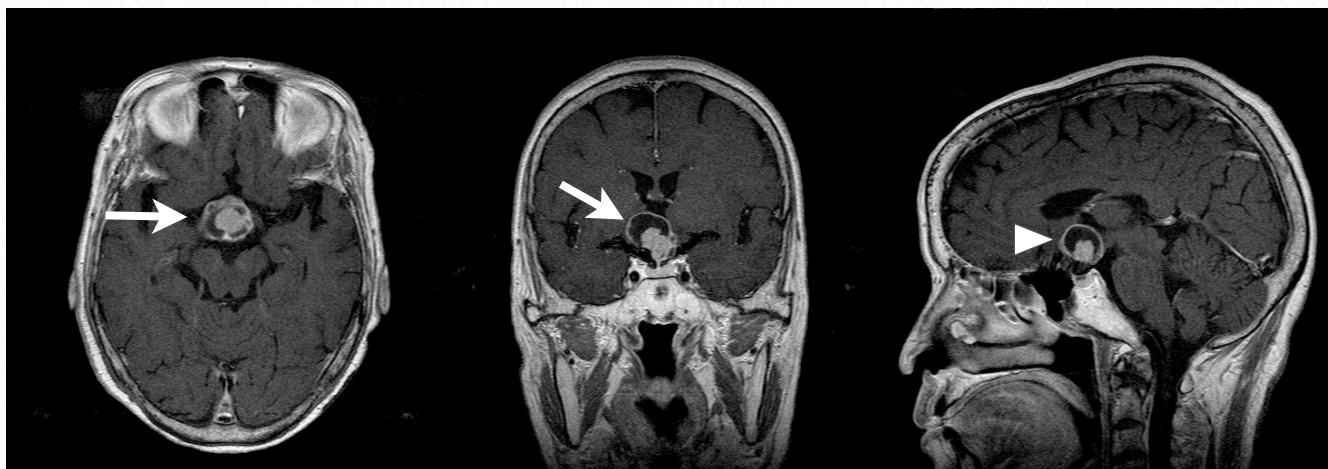


図49 症例8・術前頭部MRI：トルコ鞍上部に嚢胞性病巣を認める。T1WI Gdでは、嚢胞の壁が均一に造影されていた。嚢胞の正中には充実性病巣が伴っており、これも均一に造影されていた（→）。腫瘍によって視交叉は上方へ圧排されていた（△）。

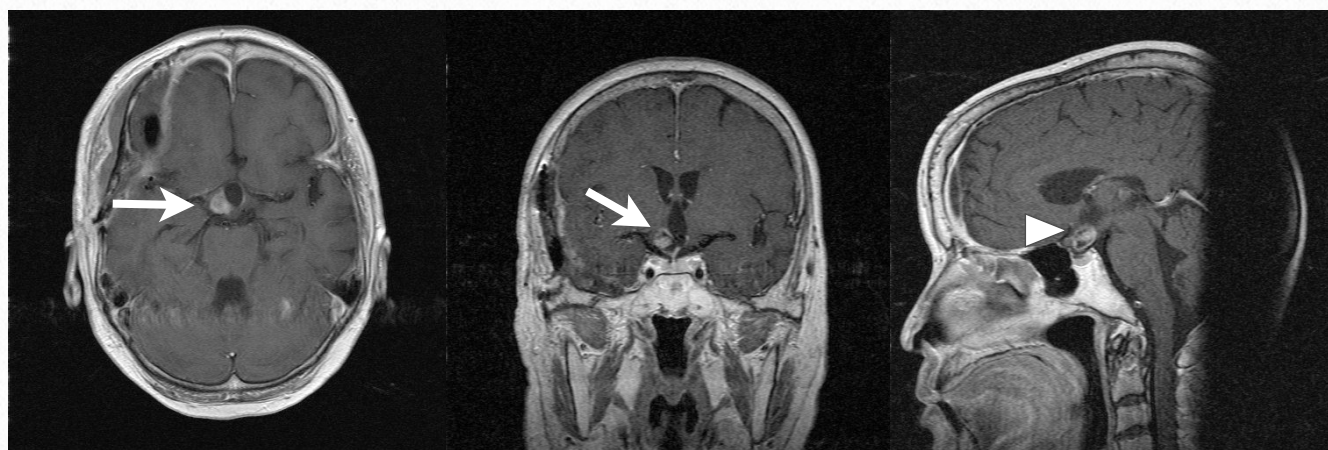


図50 症例8・術後頭部MRI：腫瘍の一部が残存したが（→）、容積は縮小し、視交叉の圧迫も改善された（△）。髄液漏は観察されなかった。

<症例9>

60歳、男性

診断：髄膜腫

経過：2010年6月より左顔面の激しい痛みを自覚するようになり近医脳神経外科を受診した。左三叉神経第二枝、第三枝領域の三叉神経痛を認めた。頭部MRIでは左椎体骨先端部に腫瘤性病変が指摘され、これが原因による神経痛と診断した（図51）。これに対する手術目的で当科に紹介となった。同年11月29日に摘出術を施行した。Approachはposterior trans-petrosal approachを選択した。左滑車神経は腫瘍

と強く癒着していた。腫瘍は全摘出できたが、硬膜の修復は縫合では行えなかった。このためHD AMで硬膜切開部を覆いフィブリン糊で固定し、修復をおこなった。術後に左滑車神経麻痺が出現したが、三叉神経痛は改善した。感染や髄液漏は起こさずに経過した（図52）。

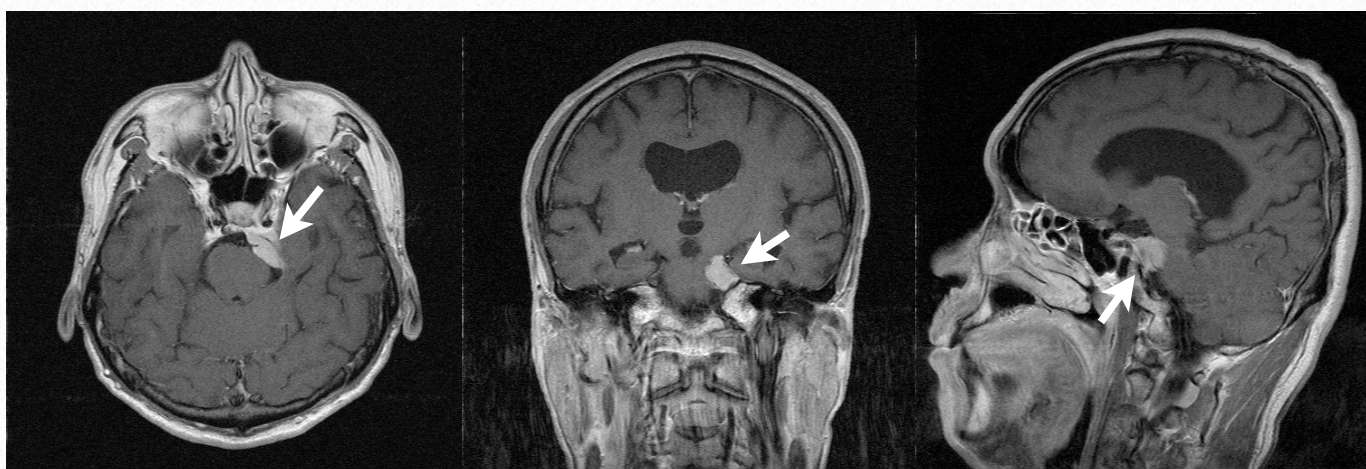


図51 症例9・術前頭部MRI：頭部MRI T1WI Gdでは、左椎体骨先端部に均一に造影される腫瘍が認められる（→）。腫瘍は内側に伸展し橋を圧迫していた。

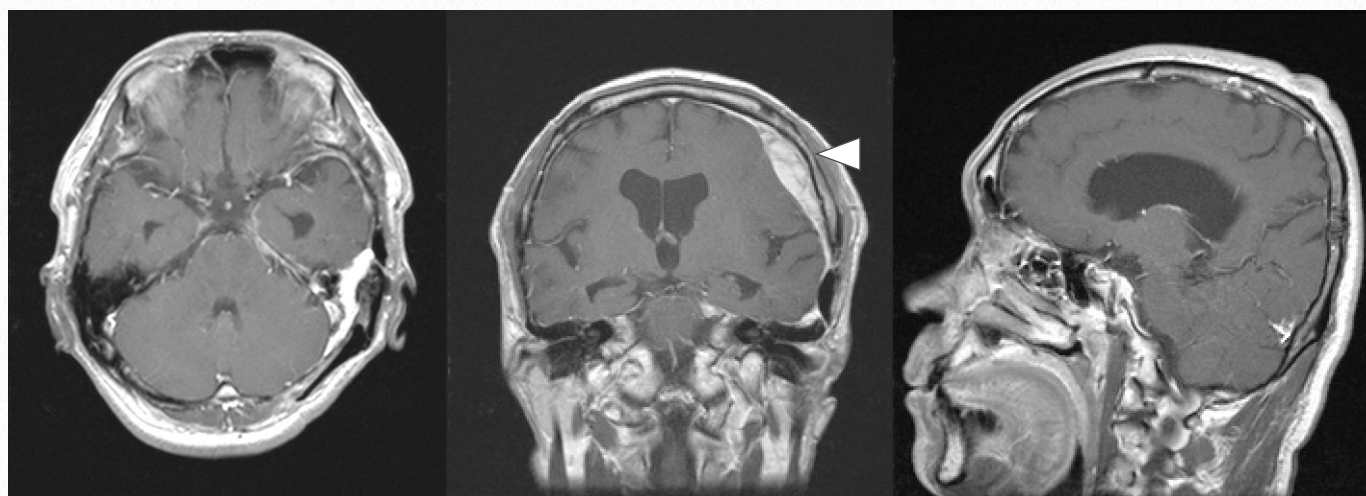


図52 症例9・術後頭部MRI：腫瘍は前摘出されていた。左前頭部円蓋部に急性硬膜下血腫の形成が観察された（△）。髄液漏は観察されなかった。

<症例10>

69歳、女性

診断：髄膜腫

経過：2009年8月頃より意欲の低下が観察されるようになった。次第に物忘れも出現、悪化した。尿失禁も伴い2010年3月頃には転倒を繰り返すようになり、近医脳神経外科を受診した。頭部MRIで前頭蓋底に大きな腫瘤性病変が指摘され（図53）、その治療目的で当科に紹介となった。同年5月26日に頭蓋内腫瘍摘出術を施行した。Approachはfronto-basal approachを選択した。病巣はplanum sphenoidaleの硬膜から発生していた。この硬膜とともに腫瘍

を全摘出した。これによって生じた硬膜の欠損部をHD AMで覆いフィブリン糊で固定し修復した。感染や髄液漏は起こすことなく経過した（図54）。術後の経過は良好であった。

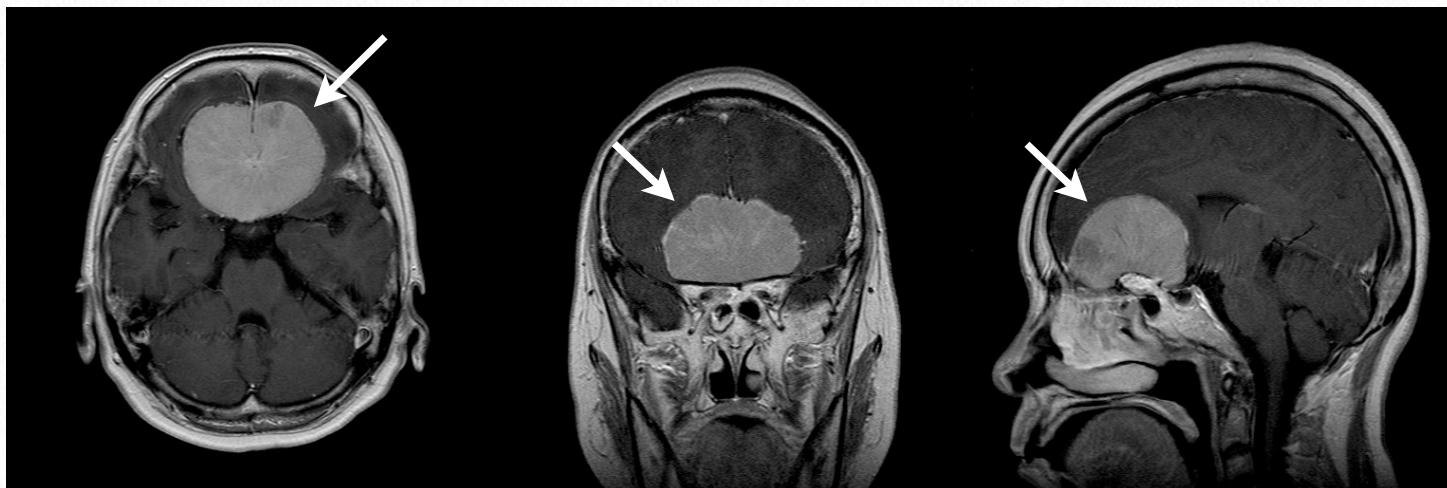


図53 症例10・術前頭部MRI：頭部MRI T1WI Gdでは、planum sphenoidaleの硬膜から発生し、両側前頭葉底面から上方へと伸展していた。（→）。腫瘍は内側に伸展し橋を圧迫していた。

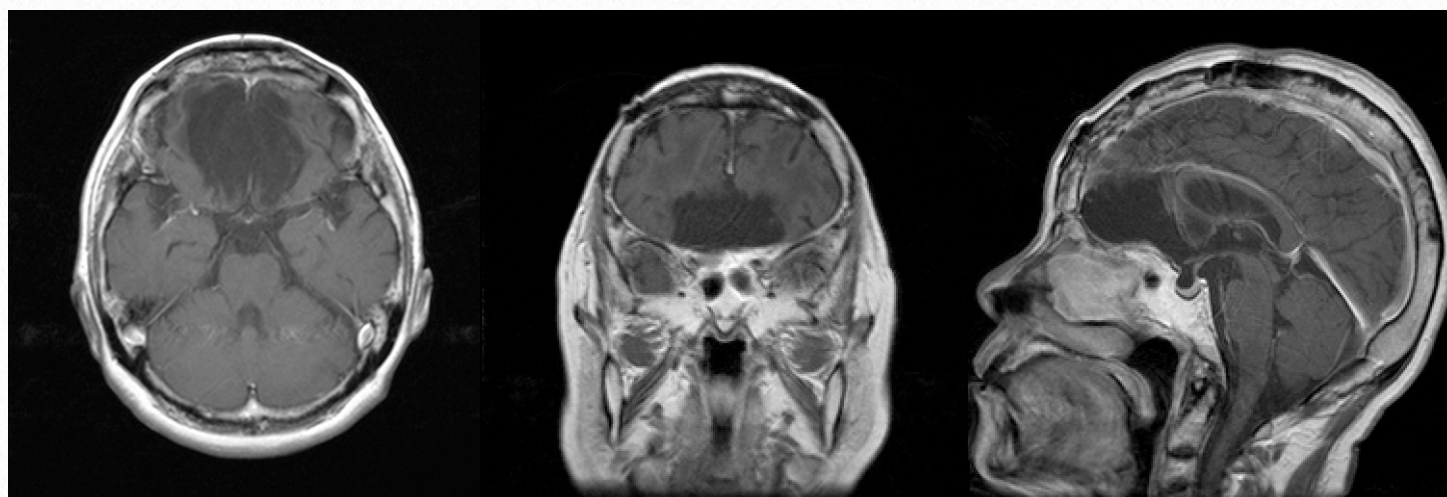


図54 症例10・術後頭部MRI：腫瘍は全摘出された。髄液漏は観察されなかった。

5

Discussion

脳神経外科手術後の髄液漏は、皮下水腫の形成、髄液鼻漏、耳漏を引き起こすので、美容上の問題や感染の温床となる不都合な合併症である。これを防ぐにはwater-tightな縫合が理想的であるが、しばしばこれが厳しい状態となる。この場合、欠損部の修復には何らかのgraftを用いる必要がある。自己組織、同種、異種、合成素材によるgraftが使用されてきたが、それぞれに問題がある^{9, 10}。

理想的な硬膜補填素材は免疫学的に不活性であり、毒性は無く、感染的要素が低いものであるべきである^{11, 12, 13}。硬膜との結合は強いが、大脳皮質との癒着は起こしてはならない。そして、次第に吸収され生来の結合組織に置き換わるものが好ましい¹⁴。

修復素材として、同種、異種、あるいは合成素材を選ぶ必要がある。帽状腱膜、骨膜、側頭筋膜などのautologous tissueは

移植による感染の危険は低く有利である。しかし、皮膚切開の拡大や追加が必要となり侵襲が増える¹。他の素材では、長期間の炎症に伴う脳への刺激や瘢痕形成、遅発性の出血、あるいは髄膜炎などの不具合がある^{4, 5, 6}。

その素材として、再生医療で注目されている羊膜の応用を検討した。すでにHD AMは、眼科での角膜損傷に対する修復、耳鼻咽喉科での真珠腫性中耳炎に対するcanal wall down法⁷²施行時の修復、そして、歯科口腔外科での手術における組織欠損部の修復において、効果的であることが報告された^{73, 74, 75, 76, 77}。今回我々は、この優れた修復素材であるHD AMを用いた硬膜修復を検討した。

Ratでの硬膜修復実験では、HD AMの移植後2週間で、その組織を取り囲むように結合組織が発達していた。炎症が観察されたが、その主体は好中球であり、リンパ球

は極わずかであった。この炎症も1ヶ月後には消退していた（図28、29、33）。これは、創傷治癒過程の初期である炎症期の状態と考えられた。

今回の我々の実験では、マウスにヒト羊膜を移植しているので、拒絶反応の懸念があり、これに関しての評価を行った。拒絶反応とは移植された非自己の組織または臓器に対する免疫反応で、移植組織または臓器の排除に向かう反応である。拒絶反応という免疫反応により移植臓器が機能廃絶に至ることのあることは1944年Medawarらによって初めて明らかにされた⁷⁸。拒絶反応の強弱は移植される組織や臓器によっても異なり、一般に角膜、肝臓では軽く、皮膚では強く認められ、心臓、腎臓はその中間程度とされる。拒絶反応はその起こる時期や機序の違いから、超急性期拒絶反応、急性拒絶反応、慢性拒絶反応に大きく分類される⁷⁹。

超急性拒絶反応は、ドナー抗原に対する抗体が移植時にレシピエントに存在する場合に認められる拒絶反応である。腎、肝、心など血管吻合を必要とする臓器移植にのみ認められる反応であり、移植臓器の機能は通常数分から数時間で廃絶する。原因となる既存抗体は以前の移植、輸血、妊娠などによりレシピエントが前感作を受けて生

じる場合が多い。またABO血液型不適合間の移植や異種移植で認められる反応もこれに属する。Humoral rejection、antibody-mediated rejectionなどとも呼ばれることがある。移植臓器への血流再開後、既存抗体がグラフト内皮細胞表面の抗原に結合し、補体が活性化され、内皮細胞が障害されることが機序と考えられている。抗体や補体などにより内皮細胞が障害されると、血栓が形成され、血流が途絶えて移植臓器の機能は廃絶する。この超急性期拒絶反応はいったん起こってしまうと治療法はないので、移植前に交差試験を行って既存抗体のない組み合わせを選ぶ予防法が重要である。やむを得ない場合には移植前に血漿交換や吸着療法をおこなって既存抗体を除去する方法が行われることもある。異種移植の場合には、抗原抗体反応に引き続く補体活性化を抑制する方法としてコブラ毒や可溶性補体抑制因子の投与、さらには膜接着型補体抑制因子の遺伝子導入などが試みられている。硬膜移植では血流の再開は必要としないため、この反応は起こりにくいと考えられる。

急性拒絶反応は、移植臓器に対する細胞性免疫反応が主体となる拒絶反応である。ヘルパーT細胞が移植抗原を認識し、インターロイキン(IL)をはじめとする各種サイトカインを産生し、移植抗原に対する細胞障

害性T細胞クローンが増殖し、移植臓器に遊走、浸潤のうえ、障害を生ずるものである。またヘルパーT細胞は直接移植臓器に浸潤し、そこで各種サイトカインを産生し、マクロファージやNK細胞を集合、増殖させて、臓器を障害する。この反応ではヘルパーT細胞による抗原認識と、その後のサイトカイン産生には抗原提示細胞によるMHCクラスIIに包まれた形での抗原の提示と接着分子の結合によるシグナルが必要である。羊膜ではMHCクラスIIの発現が無い⁷ため、この反応は起こしにくいと考えられた。組織像ではリンパ球の活動が乏しかった所見からも、この反応は起こしていなかったと判断した。

慢性期拒絶反応とは、一般に3ヶ月以降に認められる移植臓器の進行性不可逆性の機能低下を指すものである。急性拒絶反応時にステロイド治療に抵抗を示した症例や急性拒絶反応を繰り返した症例では慢性拒絶反応を起こす頻度が高いと考えられる。その機序としては液性免疫をはじめとする多くの因子が関与していると考えられるが、不明の部分も多く、単に急性拒絶反応の終末像というような病態ではなく、移植時の虚血や再還流障害、薬剤性障害などを含めた移植臓器に加わった各種障害の総合された結果とも考えられている。この反応も血流再開に関与していると予想され、硬

膜移植においては起こりにくいと考えられた。

今回の実験では、2週間目で炎症とともに線維芽細胞の増殖も観察された。1ヶ月後には、炎症の消退とともに、線維芽細胞による膠原線維の形成が認められた。これより、創傷治癒が炎症期から増殖期を経て、再構築期に至っていると考えられ、組織修復が達成されたと考えられた。

HD AMは1ヶ月目ですでに縮小ないしは消失しており、好中球と、おそらくは過程において出現していたマクロファージによる活発な貪食作用によって消失したと考えられた。

今回の臨床応用では、HD AMを硬膜修復にunderlayおよびoverlay technique で使用した。HD AMは容易に形状とサイズをハサミで裁断できるので、硬膜欠損部に合わせたサイズと形状に容易に整えられた。これを頭蓋底手術での術野の深部に生じた硬膜欠損部位に貼付けた（underlay technique）。そして、さらにフィブリン糊で固定した上にヒト乾燥硬膜を置いた（overlay technique）。HD AMは、水分を吸収すると構造が新鮮羊膜に近くなる。その結果、防水効果の発揮も期待された。我々が行ったHD AMによる硬膜修復の臨床応用では、

再手術を必要とした髄液漏は生じなかった。また有意な副作用も観察されなかった⁸⁰。

経過中に、髄膜炎を示唆する髄膜刺激症状や高熱を起こした症例は無かった。これは、マウスの実験の初期（2週間目）で観察された炎症反応が、clinicalでは発生していなかった事を示唆すると思われる。これに関しては、腫瘍の再増大等で再手術となった際に、標本を採取し検討する必要があると考えている。

今回の我々の報告では、症例数がまだ少ないので、比較試験等を行ってゆきながら、より有用性を証明する必要がある。ヒト乾燥羊膜は、その優れた組織的合成により、硬膜修復素材として効果的に髄液漏を予防した。さらに、修復過程で吸収され、生来の結合組織による膜構造に置き換えられた。これらの点で、硬膜修復の理想的な素材と考えられた。

Conclusion

今回、我々は頭蓋底手術における硬膜修復にヒト乾燥羊膜を用いる事で、効果的に髄液漏の合併を予防できた。ヒト乾燥羊膜は、頭蓋底手術で生じた硬膜欠損の修復素材の選択肢になり得ると考える。

謝辞

このような貴重な研究課題を小生に与えて下さった、富山大学 遠藤俊郎学長、富山大学再生医療学講座 二階堂敏雄教授、実験指導を下さった富山大学再生医療学講座 吉田淑子准教授、静岡がんセンター 林央周先生、そして、指導のみならず叱咤激励を下さった黒田敏先生、さらに御世話になった多くの諸先生がたに深謝いたします。

平成25年11月

6

References

- 1 Parizek J, Mericka P, Husek Z, et al. Detailed evaluation of 2959 allogeneic and xenogeneic dense connective tissue grafts (fascialata, pericardium, and dura mater) used in the course of 20 years for dura plasty in neurosurgery. *Acta Neurochir (Wien)* 1997; 139:827-838
- 2 Masullo C, Pocchiari M, Macchi G, Alema G, Piazza G, Panzera MA. Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by dural cadaveric graft. *J Neurosurg* 1989; 71: 954-955
- 3 Thadani V, Penar PL, Partington J, et al. Creutzfeldt-Jakob disease probably acquired from a cadaveric dura mater graft. Case report. *J Neurosurg* 1988; 69: 766-769
- 4 Cohen AR, Aleksic S, Ransohoff J. Inflammatory reaction to synthetic dural substitute. Case report. *J Neurosurg* 1989; 70: 633-635
- 5 Simpson D, Robson A. Recurrent subarachnoid bleeding in association with dural substitute. Report of three cases. *J Neurosurg* 1984; 60: 408-409
- 6 Thompson DN, Taylor WF, Hayward RD. Silastic dural substitute : experience of its use in spinal and foramen magnum surgery. *Br J Neurosurg* 1994; 8: 157 – 167
- 7 Toda A, Okabe M, Yoshida T, Nikaido T. The potential of amniotic membrane / amnion-derived cells for regeneration of various tissues. *J Pharmacol Sci* 2007; 105: 215-228
- 8 Okabe M, Kitagawa K, Yoshida T, Suzuki T, Waki H, Koike C, Furuichi E, Katou K, Nomura Y, Uji Y, Hayashi A, Saito S, Nikaido T. Hyperdry human amniotic membrane is useful material for tissue engineering: Physical, morphological properties, and safety as the new biological material. *J Biomed Mater Res A* 2013; 1-9

9 永田和哉, 河本俊介: 脳神経外科手術の基本手技. 中外医学社, 東京, 2004年, p220

10 van Loveren T. Atlas of operative microneurosurgery, W.B.SAUNDERS COMPANY, Philadelphia, 1994, p30

11 Macfarlane MR, Symon L. Lyophilised dura mater: experimental implantation and extended clinical neurosurgical use. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1979; 42: 854-858

12 Narotam PK, van Dellen JR, Bhoola KD. A clinicopathological study of collagen sponge as a dural graft in neurosurgery. *J Neurosurg* 1995; 82: 406-412

13 Narotam PK, Qjao F, Nathoo N. Collagen matrix dura plasty for posterior fossa surgery: evaluation of surgical technique in 52 adult patients. Clinical article. *J Neurosurg* 2009; 111: 380-386

14 Stendel R, Danne M, Fiss I, et al. Efficacy and safety of a collagen matrix for cranial and spinal dural reconstruction using different fixation techniques. *J Neurosurg* 2008; 109: 215-221

15 山田英智, 石川春律, 廣澤一成. 機能を中心とした 図説 組織学. 医学書院 第2版, 東京, 1992年, p112

16 大畑建治, 馬場元毅, 内田耕一. 手術のための脳局所解剖学, 中外医学社, 東京, 2008年, p60-61

17 Mino Y, Hirashima Y, Hamada H, Masuoka T, Yamatani K, Takeda S, Masuda R, Nogami K, Endo S. Effect of arachnoid plasty using fibrin glue membrane after clipping of ruptured aneurysm on the occurrence of complications and outcome in the elderly patients. *Acta Neurochir (Wien)* 2006; 148: 627-31

18 Otani N, Kinoshita M, Fujie T, Saito A, Takeoka S, Saitoh D, Hagsisawa K, Nawashiro H, Shima K. Novel therapeutic use of polysaccharide nanosheets for arachnoid plasty and enhancement of venous tensile strength in rat microneurosurgery. *J Clin Neurosci* 2013; 20: 301-305

19 Hakuba A, Ohata K, Motoki B. Surgical of the skull Base. MIWA SHOTEN, Tokyo, 1996, p77-108

20 Becker SS, Jackler RK, Pitts LH. Cerebrospinal fluid leak after acoustic neuroma surgery: a comparison of the translabyrinthine, middlefossa, and retrosigmoid approaches. *Otol Neurotol* 2003; 24: 107-112

21 Ganly I, Patel SG, Singh B, et al. Complications of craniofacial resection for malignant tumors of the skull base: report of

an international collaborative study. *Head Neck* 2005; 27: 445-451

22 Leonetti JR, Anderson D, Marzo S, Moynihan G. Prevention and management of cerebrospinal fluid fistula after transtemporal skull base surgery. *Skull Base* 2001; 11: 87-92

23 Mangham CA. Complications of trans-labyrinthine vs. suboccipital approach for acoustic tumor surgery. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1988; 99: 396-400

24 Sen C, Snderman CH, Sekhar LN. Complications of skull base operation. In: Sekhar LN, Janacka IP, eds. *Surgery of Cranial Base Tumors*. New York: Rave Press; 1993: 831-839

25 Hakuba A, Nishimura S, Jang BJ. A combined retroauricular and preauricular transpetrosal-transtentorial approach to clivus meningiomas. *Surg Neurol* 1988; 30: 108-116

26 Jackson IT, Adham MN, Marsh WR. Use of the galeal frontalis myofascial flap in craniofacial surgery. *Plast Reconstr Surg* 1986; 77: 905-910

27 Kryzanski JT, Annino DJ, Gopal H, Heilman CB. Low complication rates of cranial

and craniofacial approaches to midline anterior skull base lesions. *Skull Base* 2008; 18: 229-241

28 Prichard J, Thadani V, Kalb R, et al. Rapidly progressive dementia in a patient who received a cadaveric dura mater graft. *MMWR* 1987; 36: 49-55

29 Miyashita K, Inuzuka T, Kondo H, et al. Creutzfeldt-Jakob disease in a patient with a cadaveric dural graft. *Neurology* 1991; 41: 940-941

30 厚生省調査研究「クロイツフェルト・コブ病等に関する緊急全国調査研究班」研究報告書（班長 佐藤 猛），1997年

31 Hoshi K, Yoshino H, Urata J, et al: Creutzfeldt-Jakob disease associated with cadaveric dura mater grafts in Japan. *Neurology* 2000; 55: 718-721

32 Takashima S, Tateishi J, Taguti Y et al: Creutzfeldt-Jakob disease with florid plaque after cadaveric dural graft in a Japanese woman. *Lancet* 1997; 350: 865-867

33 Schimizu S, Hoschi K, Muramoto T, et al.: Creutzfeldt-Jakob disease with florid-type plaques after cadaveric dura mater grafting. *Arch Neurol* 1999; 56: 357-362

- 34 佐藤 猛. プリオン病：21世紀に向けての課題. 順天堂医学, 東京, 2001年, p311-321
- 35 Nakamura Y, Yanagawa H, Kitamoto T, et al. Epidemiologic features of 65 Creutzfeldt-Jakob disease patients with a history of cadaveric dura mater transplantation in Japan. *Epidemiol Infect* 2000; 125: 201-205
- 36 Sato T, Masuda M. Dura mater related Creutzfeldt-Jakob disease in Japan: relationship between sites of grafts and clinical features. *Nihon Rinsho* 2007; 65: 1521-1527
- 37 Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC, Latarjet R. Unusual resistance to ionizing radiation of the viruses of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and scrapie. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978; 75: 6268-6270
- 38 Yamagata S, Goto K, Oda Y, Kikuchi H. Clinical experience with expanded polytetrafluoroethylene sheet used as an artificial dura mater. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 1993; 33: 582-585
- 39 Hastings OM, Jain KM, Hobson RW 2nd, Swan KG. A prospective randomized study of three expanded polytetrafluoroethylene (PTFE) grafts as small arterial substitutes. *Ann Surg* 1978; 188: 743-747
- 40 Ozeren M, Han U, Mavioglu I, Simsek E, Soyal MF, Guler G, Yucel E. Consequences of PTFE membrane used for prevention of re-entry injuries in rheumatic valve disease. *Cardiovasc Surg* 2002; 10: 489-493
- 41 Kollender Y, Bender B, Weinbroum AA, Nirkin A, Meller I, Bickels J. Secondary reconstruction of the extensor mechanism using part of the quadriceps tendon, patellar retinaculum, and Gore-Tex strips after proximal tibial resection. *J Arthroplasty* 2004; 19: 354-360
- 42 Lindfors LT, Tervonen EA, Sándor GK, Ylikontiola LP. Guided bone regeneration using a titanium-reinforced ePTFE membrane and particulate autogenous bone: the effect of smoking and membrane exposure. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; 109: 825-830
- 43 Montz FJ, Monk BJ, Lacy SM. The Gore-Tex Surgical Membrane: effectiveness as a barrier to inhibit post-radical pelvic surgery adhesions in a porcine model. *Gynecol Oncol* 1992; 45: 290-293
- 44 Yamada K, Miyamoto S, Nagata I, et al. Development of a dural substitute from

synthetic bioabsorbable polymers. J Neurosurg 1997; 86: 1012-1017

45 Malliti M, Page P, Gury C, Chomette E, Nataf F, Roux FX. Comparison of deep wound infection rates using a synthetic dural substitute (neuro-patch) or pericranium graft for dural closure: a clinical review of 1 year. Neurosurg 2004; 54: 599-603

46 Narotam PK, Van Dellen JR, Bhoola K, Raidoo D. Experimental evaluation of collagen sponge as a dural graft. Br J Neurosurg 1993; 7: 635-641

47 McCall TD, Fults DW, Schmidt RH. Use of resorbable collagen dural substitutes in the presence of cranial and spinal infections-report of 3 cases. Surg Neurol 2008; 70: 92-96

48 Pettorini BL, Tamburrini G, Massimi L, Paternoster G, Caldarelli M, Di Rocco C. The use of a reconstituted collagen foil dura mater substitute in paediatric neurosurgical procedures-experience in 47 patients. Br J Neurosurg 2010; 24: 51-54

49 Yamada K, Miyamoto S, Nagata I, et al. Development of a dural substitute from

synthetic bioabsorbable polymers. J Neurosurg 1997; 86: 1012-1017

50 Bejjani GK, Zabramski J; Durasis Study Group. Safety and efficacy of the porcine small intestinal submucosa dural substitute: results of a prospective multicenter study and literature review. J Neurosurg. 2007; 106: 1028-1033

51 Islam S, Ogane K, Ohkuma H, Suzuki S. Usefulness of acellular dermal graft as a dural substitute in experimental model. Surg Neurol 2004; 61: 297-302

52 Cosgrove GR, Delashaw JB, Grotenhuis JA, Tew JM, Van Loveren H, Spetzler RF, Payner T, Rosseau G, Shaffrey ME, Hopkins LN, Byrne R, Norbash A. Safety and efficacy of a novel polyethylene glycol hydrogel sealant for watertight dural repair. J Neurosurg 2007; 106: 52-58

53 二階堂敏雄. 羊膜と再生医学. 日産婦誌 2007年; 59: 536-539

54 Smith S, Neaves W, Teitelbaum S. Adult stem cell treatments for diseases? Science 2006; 313: 439

55 坂元正一, 水野正彦, 武谷雄二. プリンシプル産科婦人科学 改訂版 [第2版], メディカルビュー社, 東京, 1997年, p8-10

- 56 Adinolfi M, Akle CA, McColl I, et al. Expression of HLA antigens, beta 2-microglobulin and enzymes by human amniotic epithelial cells. *Nature* 1982; 295: 325-327
- 57 Akle CA, Adinolfi M, Welsh KI, Leibowitz S, McColl I. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet* 1981; 2: 1003-1005
- 58 Hammer A, Hutter H, Blaschitz A, et al. Amnion epithelial cells, in contrast to trophoblast cells, express all classical HLA class I molecules together with HLA-G. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37: 161-171
- 59 Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 2000; 19: 348-352
- 60 Kamiyama K, Wang M, Uchida S, et al. Topical application of culture supernatant from human amniotic epithelial cells suppresses inflammatory reactions in cornea. *Exp Eye Res* 2005; 80: 671-679
- 61 Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, Usui M. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 1539-1546
- 62 Li H, Niederkorn JY, Neelam S, et al. Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells. *Invest Ophthalmol VisSci* 2005; 46: 900-907
- 63 Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC, Tseng SCG. Suppression of interleukin 1 alpha and interleukin 1 beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol* 2001; 85: 444-449
- 64 Talmi YR, Sigler L, Inge E, Finkelstein Y, Zohar Y. Antibacterial properties of human amniotic membranes. *Placenta* 1991; 12: 285-288
- 65 Tseng SCG, Li DQ, Ma X. Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol* 1999; 179: 325-335
- 66 Sakuragawa N, Yoshikawa H, Sasaki M. Amniotic tissue transplantation: clinical and biochemical evaluations for some lysosomal storage diseases. *Brain Dev* 1992; 14: 7-11
- 67 Scaggiante B, Pineschi A, Sustersich M, Andolina M, Agosti E, Rome D. Successful therapy of Niemann-Pick disease

by implantation of human amniotic membrane. *Transplantation* 1987; 44: 59-61

68 Burman S, Tejwani S, Vemuganti GK, Gopinathan U, Sangwan VS. Ophthalmic applications of preserved human amniotic membrane: a review of Current indications. *Cell Tissue Bank* 2004; 5: 161-175

69 クロイツフェルト・ヤコブ病診療マニュアル [改訂版], 厚生労働省特定疾患対策研究事業、厚生労働省遅発性ウイルス感染調査研究班, 2002年

70 特許で分かる乾燥技術

<http://www.jpo.go.jp/shiryousonota/map/ippan22/frame.htm>

71 Serway RA, [訳] 松村博元. 科学者と技術者の為の物理学III. 学術図書出版社, 東京, 1995年, p999

72 三代康雄. 真珠腫性中耳炎の手術—Canal wall down法の立場から. *Otol Jpn* 2006; 16: 107-110

73 Kitagawa K, Yanagisawa S, Watanabe K, et al. A hyperdry amniotic membrane patch using a tissue adhesive for corneal perforations and bleb leaks. *Am J Ophthalmol* 2009; 148: 383-389

74 Kitagawa K, Okabe M, Yanagisawa S, Zhang XY, Nikaido T, Hayashi A. Use of a

hyperdried cross-linked amniotic membrane as initial therapy for corneal perforations. *Jpn J Ophthalmol* 2011; 55: 16-21

75 Shojaku H, Takakura H, Okabe M, Fujisaka M, Watanabe Y, Nikaido T. Effect of hyperdry amniotic membrane patches attached over the bony surface of mastoid cavities in canal wall down tympanoplasty. *Laryngoscope* 2011; 121: 1953-1957

76 Arai N, Tsuno H, Okabe M, Yoshida T, Koike C, Noguchi M, Nikaido T. Clinical application of a hyperdry amniotic membrane on surgical defects of the oral mucosa. *J Oral Maxillofac Surg* 2012; 70: 2221-2228

77 Tsuno H, Arai N, Sakai C, Okabe M, Koike C, Yoshida T, Nikaido T, Noguchi M. Intraoral application of hyperdry amniotic membrane to surgically exposed bone surface. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012: e1-e5

78 Medawar PB. The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits: A report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council. *J Anat* 1944; 78: 176-199

79 小川道雄, 齋藤英昭. 臨床侵襲学. へるす出版, 東京, 1998年, p374-393

80 Tomita T, Hayashi N, Okabe M, Yoshida T, Hamada H, Endo S, Nikaido T. New dried human amniotic membrane is useful as a substitute for dural repair after skull base surgery. *J Neurol Surg B Skull Base* 2012; 73: 302-307