

氏 名 とみた たかひろ
富田 隆浩

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博乙第 47 号

学位授与年月日 平成 26 年 2 月 27 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 4 項該当

学位論文題目 **New dried human amniotic membrane is useful as a substitute for dural repair after skull base surgery**
(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)

論文審査委員

(主査)	教授	齋藤	滋
(副査)	教授	笹原	正清
(副査)	教授	近藤	隆
(副査)	教授	野口	誠
(紹介教員)	教授	黒田	敏

論文内容の要旨

Objectives :

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し、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、硬膜損傷や欠損がある場合には何らかの修復素材が必要となる。自己組織、同種、異種、合成素材によるグラフトが使用されてきたが、それぞれに問題がある。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。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。

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。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。

Material and Methods

Preparation of Dried Human Amniotic Membrane

ヒト乾燥羊膜は以下の手順で精製された。羊膜は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採取した。Donor には十分なインフォームドコンセントを行い、梅毒、HIV、HTLV-1、B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルスの陰性を確認した。羊膜を滅菌リン酸緩衝液で洗浄し、低気圧 (0.4~4.6kPa) かつ 60°C 以下の環境で、遠赤外線連続

照射（約 12 分）とマイクロ波の間欠的照射（1-3 分）を繰り返し平行して行い乾燥した（hyperdry method）。乾燥した羊膜を 10 cm² に裁断し真空パックで包装し、 γ 線（25-kGy）照射で滅菌処理した。

Evaluation of Efficacy of Dried Human AM as Substitute for Dura

20 匹の 14 週齢、雄のウィスラーラットを用いた硬膜再建実験を行った。ペントバルビタールの腹腔内投与で全身麻酔後、1%リドカインで前頭部から頭頂部の正中に局所麻酔を施した。頭部に正中矢状切開を行い、手術顕微鏡と microdrill を用いて右前頭頭頂開頭を行った。硬膜を 5×7 mmの長方形に採取し欠損部を作成した。16 個体に対しては、その硬膜欠損部を HD AM で覆った（HD AM グループ）。4 個体においては同様の処置を expanded polytetrafluoroethylene(ePTFE)で行った（対照グループ）。すべての固体で、頭蓋欠損部は骨漏で補填し頭皮は縫合した。

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 から 4 個体、6 ヶ月後に HDAM グループから 4 個体を灌流固定（4% formalin solution）した。開頭部位の周囲を、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。

実験動物の取り扱いガイドラインに従い行われた。

Clinical Studies

2008 年 12 月から 2010 年 5 月の期間で、富山大学附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、硬膜修復素材として HD AM を使用した。これは富山大学倫理委員会での承認後にインフォームドコンセントを得た上で行った。

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、硬膜内外で羊膜片を貼付けた。硬膜外ではフィブリン糊で固定し、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。

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 グループでは、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。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。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。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。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。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。移植された HD AM グラフトは短くなっていた。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。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る。創傷治癒は増殖期から再構築に至ったと考えられた。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。

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。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。

Clinical Studies

術後の平均調査期間は 6.8 ヶ月（範囲、2 から 19 ヶ月）であった。この調査期間内では、硬膜の再修復を要する髄膜漏は観察されなかった。ヒト乾燥羊膜移植による直接的な不具合は発生しなかった。

Discussion

理想的な硬膜補填素材は、免疫学的に不活性で、毒性は無く、感染的要素が低いものであるべきである。硬膜との結合は強いが、大脳皮質との癒着は起こさず、次第に吸収され、結合組織に置き換わるものが好ましい。

羊膜は抗炎症作用と低い抗原性を有しているので、あらゆる組織への移植に適している。その素材として、再生医療で HD AM は注目されており、すでに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。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。

我々の 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た。HD AM は次第に吸収され、6 ヶ月後には消失し、新しい膜構造が形成された。HD AM は補修素材として作用し、さらに結合組織の伸展の足場となった。臨床応用においても経過は良好であった。

これらの結果より、HDAM は、髄液漏を効果的に予防できる有用な硬膜修復素材となりえると考えた。

学位論文審査の要旨

脳神経外科手術後に硬膜損傷や欠損により生じる髄液漏は感染、皮下水腫、髄液鼻漏や耳漏等の合併症を引き起こす。このため、硬膜の修復が必要となるが、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）の発生リスクがあるため使用されなくなった。他の素材では、長期間の炎症に伴う脳への刺激や癒痕形成、遅発性の出血、髄膜炎などの不具合がある。そこで富田隆浩君は、再生医療で注目されているヒト乾燥羊膜の硬膜修復への応用をラットモデルで証明し、その結果を基に 10 例の臨床例に使用し、ヒト乾燥羊膜が頭蓋内硬膜の修復に有用か否かを検討した。

(方法ならびに対象)

- 1) ヒト乾燥羊膜は、富山大学附属病院において帝王切開で出産した妊婦より文書で同意を得た上で採取した。問診による家族歴と CJD に対する検証と血清検査での HIV、HTLV-1、HBV、HCV、梅毒の陰性を確認した。得られた羊膜を安全キャビネット（クラス II）内で洗浄後、10cm²に裁断した後に、Hyperdry method での乾燥を行ない、 γ 線（25 Gy）照射により滅菌した。
- 2) 20 匹の 14 週齢雄のウィスターラットを用い、全身麻酔下にて右前頭頂開頭を行ない、硬膜を 5×7mm の長方形に摘出した。16 個体に硬膜欠損部にあわせた乾燥硬膜を縫合せずに被った。4 個体では、expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) で同様の処置を行なった。2 週間後、1 ヶ月後、3 ヶ月後、6 か月後に乾燥羊膜群から各 4 個体を、ePTFE 群では 1 か月後に 4 個体を 4% ホルマリンで灌流固定し、開頭後、周囲の骨組織、硬膜、大脳皮質を一塊として取り出し、組織学的評価を行なった。

- 3) 富山大学附属病院で頭蓋底手術を行なった 10 例に文書にて同意を得た上で、硬膜修復目的で、ヒト乾燥羊膜を用いた。硬膜欠損部を被うようにヒト乾燥羊膜を敷き、さらに硬膜外にも同様の欠損部をフィブリン糊を用いて固定した。術後に、頭部 CT、MRIにて髄液漏、皮下水腫形成の有無を検討した。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。

(結果)

- 1) ラットを用いた検討では、ヒト乾燥羊膜、ePTFE 群いずれも感染、髄液漏は発生しなかった。乾燥羊膜群では 2 週間後には厚い結合組織が硬膜と骨膜から伸長し、完全にヒト乾燥羊膜を取り囲んでいた。ヒト乾燥羊膜とラット大脳皮質には癒着は観察されず、結合組織内には好中球が中心で、リンパ球は少数であった。1 ヶ月後には炎症細胞が減少し、ヒト乾燥羊膜はラット結合組織に置換され、3 ヶ月後、6 か月後では層状の膜構造が観察され、創傷治癒が観察された。一方、ePTFE は骨膜から薄い結合組織が伸展していたがまばらであり、水泡形成、出血も認め、1 か月後の比較では ePTFE 群の方がヒト乾燥羊膜群に比し、強拡大 1 視野中の好中球数 (12.0 ± 3.6 vs 4.5 ± 1.3 ; $p=0.0074$)、リンパ球数 (4.8 ± 1.5 vs 1.3 ± 1.0 ; $p=0.0077$) は、それぞれ有意に高値であった。

- 2) 臨床症例において、ヒト乾燥羊膜を用いた 10 症例中、1 例に皮下に髄液貯留を認めたが次第に消失したので、primary endpoint とした術後髄液漏の発生率は 0% (0/10) であった。Secondary endpoint とした感染では、1 例に皮下膿瘍を認めたが、乾燥羊膜移植とは隔離された箇所の感染であったので、移植羊膜に関連する感染は 0% (0/10) であった。術後、腫瘍の増大による再手術は 3 例 (30%) に認めた。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かった。

(総括)

富田隆浩君は、ラットを用いた検討でヒト乾燥羊膜が硬膜修復素材として有用であることを実験的に証明し、その結果を基に 10 例の頭蓋底手術症例にヒト乾燥羊膜を使用し、安全性・有効性を明らかにした。少数例の検討であり、今後、追加実験や症例の蓄積が必要であるが、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効性をラットモデル、ヒト臨床例で初めて明らかにした点には新規性がある。また、ヒト乾燥羊膜移植後の硬膜の組織修復機構を病理学的に明らかにした点において医学における学術的重要性も高く、基礎的研究を基に 10 例のヒト乾燥羊膜を臨床例に使用し、その有用性を明らかにした理由により、臨床的発展性が期待できる。

以上より本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。