

機関番号 : 37104

研究種目 : 若手研究 B

研究期間 : 2009 ~ 2010

課題番号 : 21791657

研究課題名 (和文) 自己フィブリン膜、濃厚血小板血漿による鼓膜再生の試み

研究課題名 (英文) experience of myringoplasty using autologous fibrin membrane and platelet rich plasma.

研究代表者:

松田 洋一 (Matsuda Yoichi)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号 : 90352179

研究成果の概要 (和文) :

鼓膜形成術は接着法の普及によって、より簡易的に確実に行われるようになり、現在では広く普及した手技となっている。しかしながら、接着のための献血由来フィブリン糊の必要性や、皮下結合組織片の採取に伴う皮膚切開の必要性がある。また、これらを代用する方法として、コラーゲン膜やキチン膜を使用する方法が報告されているが、現在まで血液由来の膜による鼓膜形成術の報告はない。この研究では、患者自身の末梢全血由来のフィブリン膜とフィブリンゲルの作製法を考案し、末梢血由来膜による鼓膜形成術を考案するにあたっての膜の安定性について検討した。フィブリン膜は自己血漿と自己トロンビンにより作成可能であり、鼓膜の再生過程での皮下結合組織片に代わる足がかりを築くことが可能であると考えられた。いずれも、20ml 程度の採血を行うのみで作成が可能であり、低侵襲かつ安全な方法と考えられた。

研究成果の概要 (英文) :

The simple underlay myringoplasty has evolved, enabling it to be performed more easily and safely. However, this procedure needs fibrin glue that is made from donated blood. Furthermore, a skin incision is necessary to take the subcutaneous connective tissue graft. There are some reports regarding the methods of using a collagen sheet or chitinous substance membrane as a substitute for the subcutaneous connective tissue graft. However, no report has appeared regarding a myringoplasty using a membrane made from the patient's own blood. The aim of this study is to establish the procedure of less invasive myringoplasty from the aspect of safety using autologous blood from the patient.

We have developed a procedure to make the autologous fibrin membrane and gel. We evaluated the histological stability of the fibrin membrane and gel using image analysis equipment. The fibrin membrane had less microscopic changes even at the 2-weeks assessment. There was no statistically significant difference between the density of the fibrin membrane fiber and the fascia at 2 weeks.

It is thought that the fibrin membrane might produce a base for the regeneration of the tympanic membrane as a substitute for the subcutaneous connective tissue or fascia. These results indicate that myringoplasty using the fibrin membrane could well be a safer and less invasive procedure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：鼓膜形成術、自己末梢血、フィブリン膜、フィブリンゲル、側頭筋膜

1. 研究開始当初の背景

鼓膜形成術は接着法の普及によって、より簡易的に確実に行われるようになり、現在では広く普及した手技となっている。従来の鼓膜形成術術式としては、1) 遊離筋膜、遊離皮下組織の移植片をフィブリン糊によって固定する方法。2) ウシ由来コラーゲン膜やキチン膜（甲殻類由来）の鼓膜欠損部への充填による方法。3) 鼓室形成術に準じた方法などが知られている。しかしながら、遊離筋膜、遊離皮下組織の移植片採取のための皮膚切開や、献血由来の薬剤やヒト以外に由来する被覆材を用いる必要が問題となる。

2. 研究の目的

本研究では、自己血由来フィブリン膜・フィブリンゲルを用いた、より低侵襲で簡易な鼓膜形成術の確立を目的とする。具体的には以下の項目について期待が持たれる。

- (1) 鼓膜形成のための筋膜、皮下組織採取が不要となるため、皮膚切開の必要がなく、外科的侵襲が軽減される。
- (2) 血液製剤を用いないため、感染の危険性がない。（従来の鼓膜形成術では、鼓膜穿孔部への移植片の固定のためにフィブリン糊を使う必要がある。このため、血液製剤による感染の危険性が回避できない。）

(3) 入院期間が短縮化される。

(4) 患者の経済的負担が軽減される

3. 研究の方法

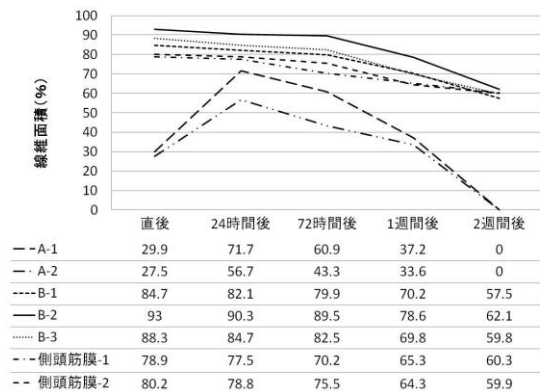
末梢血からフィブリンゲンとトロンビンを抽出する方法を考案し、これらをまず in vitro で混和させることで、フィブリン塊を作製する。強度の最も強い混和比を得た後、作製されたフィブリン塊について、in vitro での組織強度を検討する。

4. 研究成果

健常者ボランティア 5 名より、ACD-A 液入り採血管 8ml、RC(Rapid Clotting)管 8ml の末梢静脈血採血を行い。少量の末梢血から容易にフィブリンゲンと、トロンビンを抽出し得る方法を考案した。

まず RC 管は採血後 30 分静置した後、3600 回転で 6 分の遠心分離を行い、得られた上澄みを 3.5ml 吸引し、20%塩化カルシウム溶液を 0.5ml 添加した上にシリンジ内で混和し、自己トロンビン液を作製した。ACD-A 液入り採血管は、1700 回転で 7 分の遠心分離の後、Buffy Coat 上（血球層との分離面上）約 1.5ml 程を残して血漿を吸引しシリンジ内で保存した。さらに Buffy Coat までを吸引し、これを滅菌スピッツに移して 3200 回転で 5 分の遠心分離を行った。2 回目の遠心分離後は上澄みを捨て、約 1ml の濃厚血小板血漿を得

た。次に、保存しておいた血漿に自己トロンビンを血漿：トロンビン=10：1の割合で加えフィブリン・ゲルを作成し、A群とした。さらに、これを滅菌ガーゼによって血清成分を可及的に除去したものを、圧迫伸展しフィブリン膜を作成しB群（フィブリン膜）とした。これらを0.3%オフロキサシン用液に浸したゼラチンスポンジの中に包埋の上、37℃の恒温槽内で保存し、作成直後、24時間後、72時間後、1週間後、2週間後の時点で10%ホルマリンで固定し、パラフィン包埋の後、HE染色を行い、検鏡して組織学的な安定性を検討した。さらに、これを画像解析装置（WinROOF ver. 5.5, Mitani Corporation）に取り込み、二値化処理を行い、線維密度を測定した対照として、鼓室形成術中に採取した側頭筋膜を用いた。統計学的有意差の検討にはWelchのt検定を用い、有意水準は $p < 0.01$ とした。A群においては、24時間後をピークに線維密度の低下を認めた。一方、B群と側頭筋膜においては線維密度の低下は緩やかであった。1週間後ではA群とB群との線維密度には $p < 0.01$ の有意差を認め、2週間後には $p < 0.001$ の有意差を認めた。一方、側頭筋膜とA群との間では、各観察時点において有意差は認められなかった。また、B群は4週間経過したのちでも肉眼的に膜としての形態を保っていた。以上のことより、B群では側頭筋膜と同等の組織強度があると考えられ、鼓膜形成術における新素材として臨床応用出来るものと考えられた。



以上の方法で作成されたフィブリン膜について、久留米大学倫理委員会の承認を得た後、慢性中耳炎患者に対する鼓膜形成術において臨床応用した。慢性中耳炎耳に対し、穿孔縁を切除し新鮮化した後で、鼓膜の内外にフィブリン膜を置いた。しかしながら、まだ症例数が少なく本手技が有効な方法かどうかの検討は行うに至っていない。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計12件）

- (1) 松田洋一・栗田知幸・上田祥久・伊藤信輔・中島 格：自己血由来フィブリン膜・フィブリンゲルの組織学的安定性に関する検討—鼓膜形成術における新素材—
Histological stability of the autologous fibrin membrane and fibrin gel. —New materials for myringoplasty—耳鼻臨床 103：71-75, 2010. 査読有り
- (2) 松田洋一：鼓膜穿孔が及ぼす伝音性難聴への影響. JOHNS 26：972-976, 2010 査読有り
- (3) 松田洋一・栗田知幸・上田祥久・伊藤信輔・中島 格：画像解析による鼓膜穿孔の評価と伝音障害との関連—慢性中耳炎を対象として— Analysis of the tympanic membrane perforation and its relation

with conductive disturbance using
image analysis system. 耳鼻と臨床 56 :
92-100, 2010. 査読有り

- (4) 松田洋一・松田孝一・栗田知幸・上田祥久・
伊藤信輔・中島 格：鼓膜穿孔が伝音障害
に及ぼす影響。一画像解析装置を用いた
検討— The effect of the perforation
of the tympanic membrane in middle ear
sound transmission. 耳鼻臨床 102:13-20,
2009. 査読有り

- (5) Yoichi Matsuda, Tomoyuki Kurita,
Yoshihisa Ueda, Shinsuke Ito, Tadashi
Nakashima : The effect of the
perforation of the tympanic membrane
in middle ear sound transmission. The
Journal of Laryngology & Otology 123 S31 :
81-89, 2009 査読有り

[学会発表] (計 10 件)

- (1) 松田洋一・松田孝一・栗田知幸・上田祥久・
伊藤信輔・中島 格：鼓膜穿孔が伝音障害
に及ぼす影響。一画像解析装置を用いた
検討— 耳鼻咽喉科臨床学会 倉敷 岡
山 2010/7/2-7/3
- (2) Yoichi Matsuda, Tadashi Nakashima:
Myringoplasty using the autologous fibrin
membrane and gel. The 2009 Annual
Meeting of the American Academy of
Otolaryngology – Head and Neck Surgery.
San Diego 2009/10/3-10/7
- (3) 松田洋一・栗田知幸・上田祥久・伊藤信輔・
中島 格自己フィブリン膜と自己濃厚血小
板血漿による鼓膜形成術：日本耳鼻咽喉科学
会、東京 2009/5/14-19
- (4)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 洋一 (Matsuda Yoichi)
久留米大学・医学部・講師
研究者番号：90352179

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：