

## モルモット中耳粘膜の組織培養

——コラーゲンゲル法による中耳腔の部位別増殖能力の差に関する検討——

広島大学医学部耳鼻咽喉科学教室（主任：原田康夫教授）

竹 野 幸 夫

TISSUE CULTURE OF MIDDLE EAR EPITHELIUM OF THE GUINEA PIG  
—DIFFERENCES OF THE CELLULAR GROWTH ACTIVITY IN THE MIDDLE EAR  
CAVITY USING COLLAGEN GEL CULTURE METHOD—

SACHIO TAKENO, M.D.

Department of Otolaryngology, Hiroshima University School of Medicine, Hiroshima

Primary tissue culture system from the middle ear and the tracheal epithelium of the guinea pig was established using collagen gel method. The cultured epithelium was studied by phase-contrast microscopy, light and scanning electron microscopy. The outgrowth area of the epithelium was quantitatively measured for period of up to ten days. In the middle ear cavity, the mucosal explants were sampled from various sites in order to compare their differentiative and proliferative activities.

The mucosal explants attached on collagen substrates were composed of ciliated, non-ciliated, goblet and basal cells. This basic structure was similar to the natural middle ear epithelium. The ciliated cells showed well organized cilia. Most of the outgrowthal cells devoid of fibroblastic cells in the monolayer were polygonal shaped with numerous microvilli. The morphology of the outgrowthal cells changed from columnar or cuboidal to squamous shapes in the area away from the explants. There was a correlation between the distribution of the ciliated cells in the outgrowths and these in the explants.

The explants with columnar or cuboidal ciliated epithelia sampled from the opening of the eustachian tube or its neighborhood formed more than eightfold outgrowthal sheets in vitro. This is comparable to tracheal epithelia. On the other hand, the explants with simple squamous epithelia sampled from the area distal to the eustachian tube showed about fourfold proliferative activity.

We concluded that this culture system would be useful for the study of cellular multiplication and differentiation mechanisms of the respiratory tract epithelium.

---

**Key words:** 中耳粘膜, 呼吸上皮, 組織培養, コラーゲンゲル, 増殖面積A 93—2038—22090

---

## I. はじめに

中耳腔は気管、鼻、副鼻腔と同様に呼吸上皮の一部であり、線毛細胞、杯細胞、基底細胞等により構成される多列線毛上皮の形態をとっている<sup>1)</sup>。これらの細

胞により中耳腔においては、粘液線毛輸送機能 (mucociliary transportation system) が営まれており、耳管鼓室口へと向かうその排泄機能は、鼓室内の生体防御機構として重要な役割を果たしている<sup>2)3)</sup>。ま

た、中耳腔においては、その部位により粘膜上皮の形態が異なることが既に知られている。すなわち、耳管開口部付近は、線毛細胞並びに杯細胞が密に存在する多列円柱上皮におおわれているが、蝸牛骨胞表面から鼓膜付近へと中耳腔後方へ移行するにつれて、上皮の高さは次第に低くなり、いわゆる扁平上皮の形態を呈している。ここでは線毛細胞並びに杯細胞等の分泌細胞の存在密度も低くなり、大部分が無線毛細胞により占められている<sup>4)5)</sup>。中耳腔内のクリアランスは、耳管開口部周辺を中心として、線毛細胞と分泌細胞の協調作用により主として営まれているが、耳管開口部より離れた上述の無線毛細胞領域には、粘液線毛輸送機能は欠如している (inactive area)。この粘液線毛輸送能の存在、機能維持は、滲出性中耳炎等の疾患よりの治療過程あるいは、中耳炎手術後の粘膜修復過程にとって非常に重要であると言える。しかしながら、これら異なる上皮形態を持つ中耳粘膜の部位別の増殖、再生能力、及びその分化、発生過程の差異についての知見は、気管、副鼻腔など他の呼吸上皮と比較して、いまだ十分には解明されていない。

そこで今回、コラーゲンゲル法により、モルモットを用い、中耳粘膜及び気管の組織培養を行い、培養組織が増殖、分化する過程を顕微鏡及び電顕を用い経時的に観察するとともに、中耳粘膜については、その部位別の増殖能力についても比較、検討を行った。

## II. 実験方法

### 1) 組織培養系の確立

実験動物としては、プライエル耳介反射及び、鼓膜所見正常なハートレイ系モルモットを使用した。ネンブタール麻酔下に開腹し、腹部大動脈を切断、失血死させ、側頭骨中耳骨胞並びに気管を摘出した。中耳骨胞は Phosphate Buffered Saline (PBS) 中で、実体顕微鏡下に無菌的に開放し、所見正常の中耳粘膜を採取した。中耳粘膜の採取は、骨壁上より粘膜下結合組織も含め、約 1mm 四方の大ききで部位別に行った。一方、気管も同様の操作にて、軟骨を含めて約 1mm 四方の大ききで切除、採取した。採取した組織は、ペニシリン G (200unit/ml)、硫酸ストレプトマイシン (200 $\mu$ g/ml)、ホスホマイシン (100 $\mu$ g/ml)、ファンギゾン (2.5 $\mu$ g/ml) を含む Medium 199 (Gibco) 培地中で 4°C、約 2 時間洗浄し、マルチウェル (24well, Corning) 内で、あらかじめ調整したコラーゲンゲル上に移植し培養を開始した。ゲル上への移植は、実体顕

### 1) 培地

Medium 199

(D-glucose 1mg/ml, L-glutamine 1mg/ml を添加)

with FBS 5%  
hydrocortisone 0.5  $\mu$ g/ml  
insulin 5  $\mu$ g/ml  
transferrine 5  $\mu$ g/ml  
isoproterenol  $10^{-5}$ M  
cholera toxin 5ng/ml  
mouse EGF 50ng/ml

### 2) コラーゲンゲル

Type I collagen : 8

HERPES buffer (20mM in 0.05N NaOH) : 1

X10 medium with serum and hormones : 1

図1 培地並びにコラーゲンゲルの組成

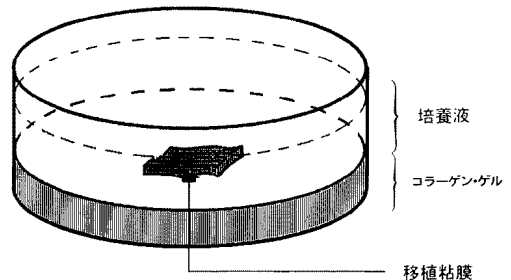


図2 コラーゲンゲル培養法

微鏡下に行い、生体下と同様の広がりて採取粘膜がゲル上に単層で接着するように行った。また、表裏方向も粘膜下組織がゲルに接着し、上皮側が上になるように設定した。培養条件は 5%CO<sub>2</sub>, 95%air, 37°C飽和湿度下とした。移植した採取組織のゲル上への接着 (attachment) がほぼ完了する 3 日目までは、培地量は 200 $\mu$ l/well とし、毎日培地交換を行った。4 日目以降は 2 日毎に交換を行い、培地量は 500 $\mu$ l/well とした。

培地としては図1に示したように、Medium199 に D-グルコース (1mg/ml)、L-グルタミン (1mg/ml) 及び 5%ウシ胎児血清 (FBS: Hazleton) をそれぞれ添加したものを用いた。さらにインスリン (5 $\mu$ g/ml)、ハイドロコチゾン (0.5 $\mu$ g/ml)、トランスフェリン (5 $\mu$ g/ml)、イソプロテレンール ( $10^{-5}$ M)、コレラトキシン (5ng/ml: 以上 Sigma)、マウス EGF (20 $\mu$ g/ml: Collaborative Research) を培地に加えた。マルチウェル上には図2のように細胞支持基剤としてコラーゲンを調整し、600 $\mu$ l/well にて用いた。コラーゲンゲルは、A) I 型コラーゲン (KOKENCELLGEN I-PC) に、B) HEPES 緩衝液と C) 10倍濃度培地並びに上記の血清、ホルモンを A: B: C=8: 1: 1の割合で混合しゲル化したものを使用した<sup>6)7)</sup>。

### 2) 培養組織の形態的観察、増殖面積の測定

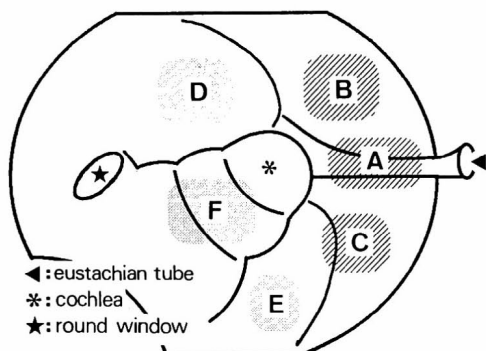


図3 モルモット中耳腔の模式図及び粘膜採取部位

A: 耳管鼓室口部  
B, C: 耳管鼓室口周辺部  
D, E: 耳管鼓室口遠位部  
F: 蝸牛骨胞部

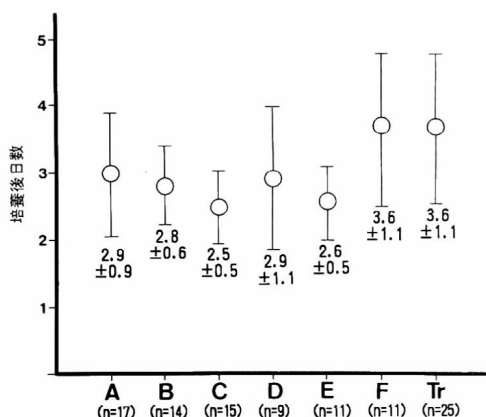


図4 各組織における新たな上皮の派生 (outgrowth) 開始日

(平均±標準偏差)

A～F: 中耳腔の各部位, Tr: 気管  
中耳腔A～E間では互いに有意差は認められていない。しかし部位F (蝸牛骨胞上) と気管ではA～Eに比較して派生上皮の出現は遅れている。(student t検定,  $P < 0.05$ )

マルチウェル内の培養細胞は、経時的に位相差顕微鏡下に観察を行った。また、細胞表面形態の観察のため、走査型電顕 (SEM) 用に試料を作製した。ゲル上の組織をPBSにて数回洗浄後、接着させたままの状態、グルタルアルデヒドにて固定しタンニン酸及び、四酸化オスミウムによる導電染色を施行し、アルコール脱水、臨界点乾燥を行い、白金蒸着後電顕により観察を行った。同時に細胞内部の検索には組織を固定後、エポキシ樹脂に包埋し、薄切片を作製、トリイ

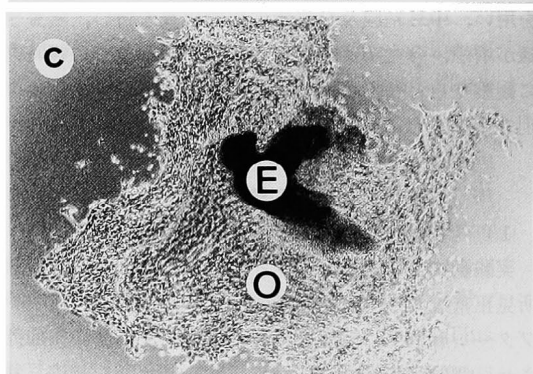
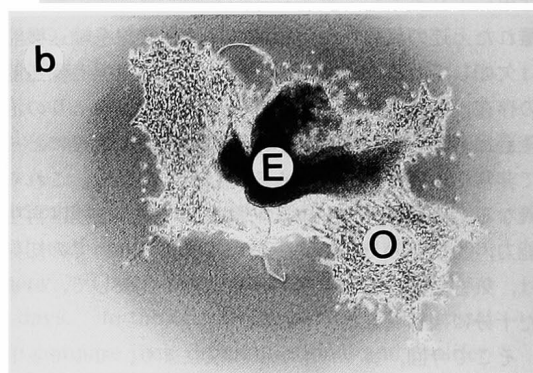
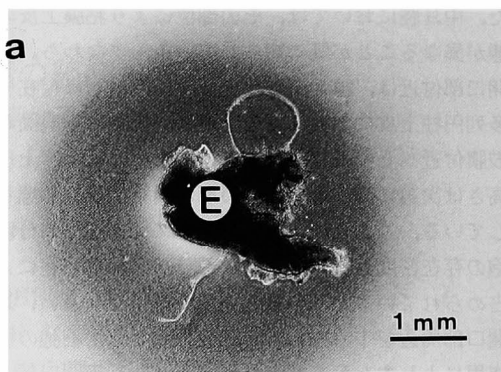


図5 中耳粘膜培養組織の経日的変化 (位相差顕微鏡写真)

a: 2日目 b: 3日目 c: 4日目

部位E (耳管鼓室口遠位部) における移植片 (E: explant) と派生上皮 (O: outgrowth) の形態的变化。経日的に派生上皮はゲル上に増殖している。

ジンブルー染色を施し光顕にて観察した。

コラーゲンゲル上に移植した組織 (explant) の面積並びに、新たに増殖、派生 (outgrowth) した細胞の面積を経日的に測定した。測定には画像解析装置 (Edec, Color Image PC) を用い、測定は2日毎に行った。

組織培養下における部位別の中耳粘膜の増殖能力を

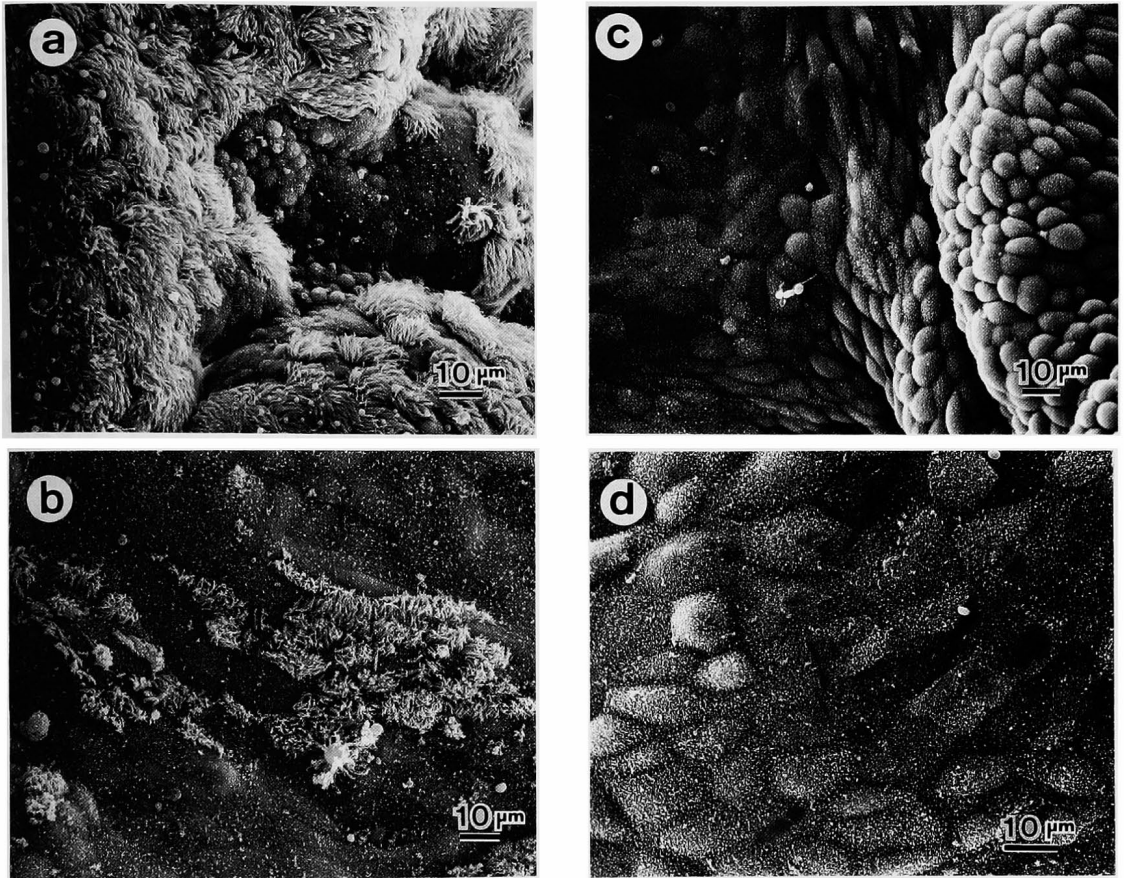


図6 中耳粘膜培養組織の走査電顕写真

- a : 耳管鼓室口周辺部 (部位B) より採取した移植片 (explant) の表面形態 (培養14日目)。生体下と同様に多くの線毛細胞が存在している。  
 b : a と同様、耳管鼓室口周辺部 (部位C) より採取した培養組織における派生上皮 (outgrowth)。線毛細胞は存在しているが、その比率は移植片に比べ低い (培養14日目)。  
 c : 耳管鼓室口遠位部 (部位D) より採取した移植片 (培養5日目)。上皮はすべて無線毛細胞から構成されている。  
 d : c と同様、耳管鼓室口遠位部 (部位E) からの派生上皮 (培養7日目)。移植片同様、構成上皮はすべて扁平な無線毛細胞である。

検索する目的にて、モルモットの中耳腔を図3のように、A: 耳管鼓室口部, B, C: 耳管鼓室口周辺部, D, E: 耳管鼓室口遠位部, F: 蝸牛骨胞部と6カ所に区分し比較、検討を行った。気管粘膜についても同様の方法で培養し、同じ呼吸上皮間での比較の対象とした。

### III 実験結果

#### 1) 位相差顕微鏡下の経時的変化

コラーゲングル上の移植片 (explant) より周囲への新たな細胞の派生 (outgrowth) は、早いもので培養開

始2日目より認められ、5日までにほとんどの移植片で確認された。中耳腔各部位及び、気管粘膜において培養開始より outgrowth 出現までに要した日数は、図4に示した通りである。部位A～Eの中耳腔各部位では培養開始後、平均2.5～2.9日で派生が始まり、これらの部位間では有意差は認められなかった。一方、中耳腔でも蝸牛骨胞上 (部位F) と気管粘膜では、それぞれ平均  $3.6 \pm 1.1$ SD 日、 $3.6 \pm 1.1$ SD 日と前記の5部位に比べ、上皮細胞の派生は有意に遅れていた (student t 検定,  $P < 0.05$ )。

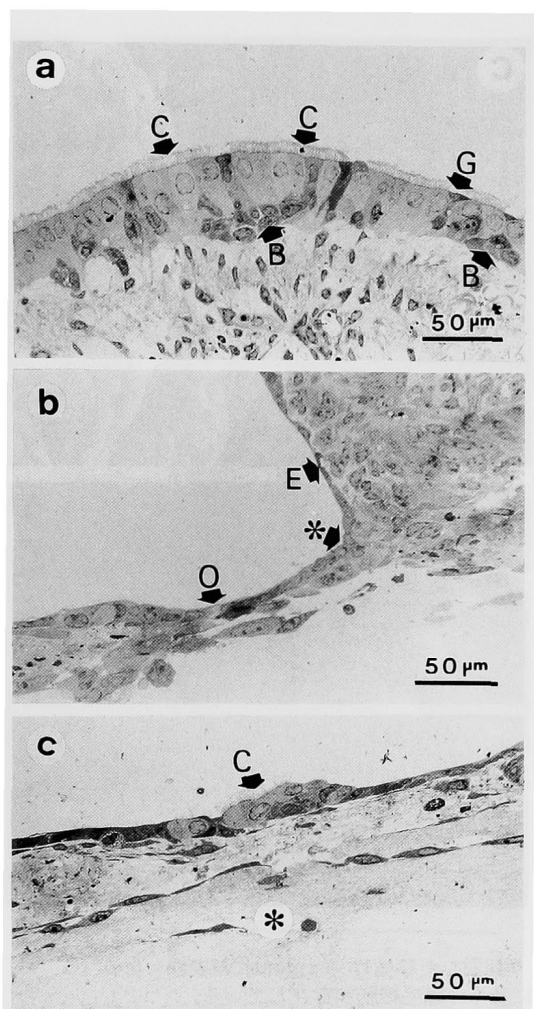


図7 中耳粘膜培養組織のトリイズンブルー染色写真  
 a: 耳管鼓室口周辺部(部位C)より採取した移植片(培養14日目)。粘膜上皮は生体と同様、多列円柱上皮の形態を保持しており、C: 線毛細胞、G: 杯細胞、B: 基底細胞が存在している。  
 b: 耳管鼓室口遠位部(部位E)よりの組織像(培養14日目)。移植片(E: explant)は扁平な無線毛細胞より構成されており、基底膜の連続性を保持したままコラーゲンゲル上の派生上皮(O: outgrowth)に移行している(\*)。  
 c: 耳管鼓室口周辺部(部位B)よりの派生上皮(培養14日目)。細胞はコラーゲンゲル(\*)上に単層性に増殖しており、大部分は扁平な無線毛細胞であるが一部線毛細胞(C)も存在している。

移植片の周囲に新たに派生した上皮は単層で存在しており、その個々の細胞は多角で明るい胞体を持ち、

上皮系細胞の特徴である数石状配列を呈していた(図5)。移植片及び周囲に派生した線毛細胞における線毛運動も、全培養期間を通じ観察可能であり、特に気管及び中耳腔耳管鼓室口部付近の採取粘膜では多く認められた。また、周囲への細胞の派生が経日的に広がるにつれて、細胞支持基剤として用いたコラーゲンゲルの厚みは、次第に薄くなる傾向を呈した。一方、線維芽細胞のゲル上への増殖は、今回実験を行った培養2週間までは観察されなかった。

## 2) 培養細胞の形態学的所見

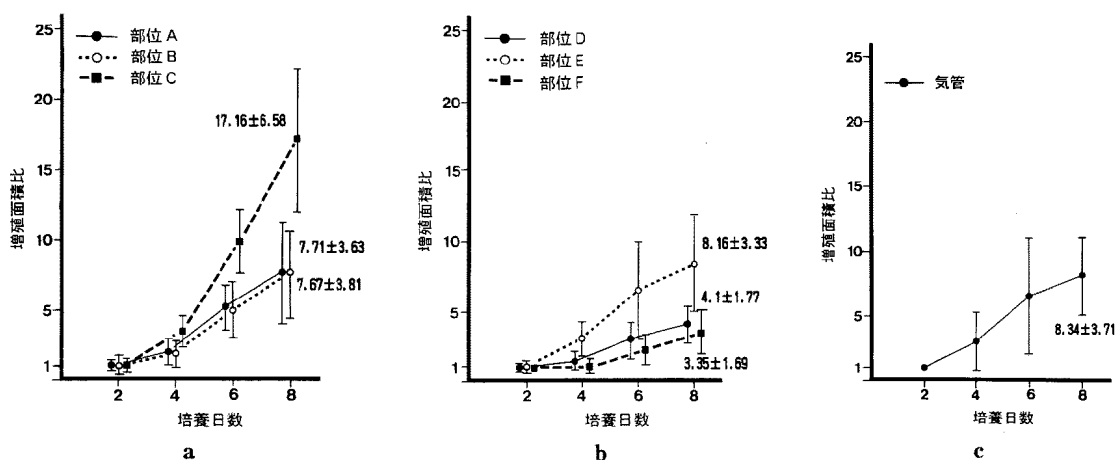
コラーゲンゲル上に培養された中耳及び、気管粘膜の表面微細構造並びに細胞構築を、走査型電顕(SEM)及び、光顕を用いて観察した。SEMによる観察では、採取した中耳粘膜移植片(explant)には、線毛細胞及び無線毛細胞が存在しており、線毛細胞の構成比率は、正常中耳腔と同様、粘膜採取部位によって異なっていた。耳管鼓室口部(部位A)より採取した移植片では、上皮の大部分が線毛細胞により構成されており、他部位に比べ、線毛細胞の存在比率は最も高かった。一方、耳管鼓室口遠位部(部位D, E)と蝸牛骨部(部位F)より採取、培養された移植片上には、線毛細胞はほとんど認められなかった(図6)。線毛の微細形態の観察では、線毛の短小化、複合線毛の出現、bleb formation等が一部に認められたが、全体的にその形態の保持は、培養2週間目においても良好であった。また、隣接細胞相互間における線毛の定方向性も移植片上では維持されていた。一方、無線毛細胞はその表面に、豊富な微絨毛を有しており、微絨毛間にはcross-linkageが認められた。

移植片の周囲に派生した細胞(outgrowth)では、線毛及び無線毛細胞とも、細胞自由表面積の拡大が見られた。また中耳腔内の粘膜採取部位によって、その細胞構築に相違が見られた。耳管鼓室口及びその周辺部(部位A, B, C)より採取した組織から派生した上皮には、線毛細胞が存在していた。その比率は移植片の近傍ほど高く、周辺に移行するにつれて次第に低くなり、ほとんどが扁平な無線毛細胞により占められていた。また、線毛細胞間における線毛の定方向性も移植片に比較すると消失する傾向が認められた。

トリイズンブルー染色切片による観察では、採取された移植片の粘膜上皮が、コラーゲンゲル上を基底膜を保持したまま連続的に周囲の派生上皮へと移行する所見が確認された。採取した移植片の細胞構築には、SEMによる所見と同様に、中耳粘膜の採取部位によ

表1 中耳腔各部位及び気管粘膜における増殖面積の経日的変化(平均±標準偏差, 単位 mm<sup>2</sup>)

部 位	耳管鼓室口	耳管鼓室口周辺部		耳管鼓室口遠位部		蝸牛骨胞部	気 管
	A (n=17)	B (n=14)	C (n=15)	D (n=9)	E (n=11)	F (n=11)	Tr (n=25)
採取時面積 (mm 2)	0.82±0.14	1.39±0.43	1.07±0.48	1.33±0.77	1.09±0.4	1.01±0.39	1.64±0.42
2 日 目	0.93±0.26	1.42±0.41	1.19±0.55	1.39±0.75	1.21±0.4	1.01±0.39	1.64±0.42
4 日 目	1.62±1.03	2.29±1.84	3.71±1.72	2.14±1.76	3.5 ±2.19	1.12±0.45	5.6 ±5.92
6 日 目	4.46±2.45	6.71±4.92	9.98±3.77	4.3 ±3.21	7.2 ±3.87	2.25±1.88	10.98±9.03
8 日 目	6.55±4.06	10.93±6.77	17.3 ±6.75	5.94±4.45	9.5 ±5.64	3.66±3.33	13.45±6.66

図8 中耳腔各部位及び気管粘膜における増殖面積比の経日的変化  
(採取時面積を1, 平均±標準偏差)

a: 部位A, B, C (中耳腔耳管鼓室口とその周辺部)

b: 部位D, E, F (同耳管鼓室口遠位部と蝸牛骨胞上)

c: 気管

グラフ中の数値はそれぞれ8日目の増殖面積比を示してある。

り相違が見られた。すなわち、耳管鼓室口とその周辺部(部位A, B, C)は、豊富な粘膜下組織を伴った多列円柱線毛上皮形態をとっており、他方、鼓室口遠位部と蝸牛骨胞部(部位D, E, F)では、粘膜下組織も疎で、大部分が無線毛細胞よりなる扁平上皮の形態を維持していた(図7)。一方、派生上皮(outgrowth)では上皮細胞の多くは、扁平な無線毛細胞よりなり、基底膜を介し直接コラーゲンゲル上に存在していた。また、移植片に豊富に存在していた線維芽細胞については、周囲のコラーゲンゲル内への侵入が抑制されていた。

### 3) 経時的な増殖面積の変化

中耳腔各部位及び気管粘膜における経日的な増殖面積値の変化を表1に示した。また、組織採取時の面積

を1とした時の、培養8日目までの増殖面積比の経日的変化のグラフが図8である。今回のコラーゲンゲル法による培養実験では、中耳、気管のすべての採取部位において、表1のごとく経日的に増殖面積の拡大を認めた。また培養下の各部位における、粘膜増殖能の差異について検討すると、培養4日目頃より、各部位間で派生した上皮の広がりには差が出現し始め、この傾向はそのまま引き続き8日目では、統計的に有意差をもって、次の3群に分けられた。すなわち、1)部位C(耳管鼓室口周辺部)が17.16±6.58倍と、最も高い増殖面積の増大を示し、次に、2)部位A(耳管鼓室口部: 7.67±3.81倍)、部位B(同周辺部: 7.71±3.63倍)、部位E(同遠位部: 8.34±3.71倍)、気管(8.16±3.33倍)となり、3)部位D(耳管鼓室口遠位部: 4.1±1.77



倍)と部位F(蝸牛骨胞部:  $3.35 \pm 1.69$ 倍)において、最も増殖面積は小さかった(student t検定,  $P < 0.01$ )。

#### IV. 考 察

##### 1) コラーゲンを用いた組織培養法

気管、鼻、副鼻腔などの呼吸上皮粘膜を分離、培養し、その増殖及び分化の過程を、*in vitro* 下により単純な形で再現し解析する試みに関しては、既に多くの報告がされている<sup>8)~12)</sup>。中耳粘膜もまた多列線毛上皮の形態を持ち、気管などと同様に粘液線毛輸送機能を保持しているが、その *in vitro* の培養実験に関する報告は、いまだほとんどされていない<sup>13)~16)</sup>。これら気道粘膜上皮の組織培養においても、最近では他臓器と同様、培養細胞の分化発現、機能維持が重要な問題とされている。これに関しては、従来のプラスチックシャーレ上に直接培養する方法から、線維芽細胞の feeder layer を使用する方法<sup>9)</sup>、さらにはコラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンなどの細胞外マトリックスを用いて、より生体に近い存在環境を *in vitro* で再構成する方法<sup>8)~10)~11)</sup> が検討されている。この中でもコラーゲンは、組織の立体構築の骨格を構成し、固形性の細胞調節因子として、他の液性ホルモン、増殖因子などとともに細胞の増殖、分化、接着、形態保持などに深く関与している<sup>17)</sup>。このコラーゲン法を用いた培養実験では、既に、ハムスターの気管上皮において増殖速度、培養期間の向上、線毛細胞の良好な形態維持と分泌細胞内の PAS 陽性顆粒の出現<sup>11)</sup>、犬の気管細胞培養における細胞接着率の増加<sup>12)</sup>、さらにウサギの気管上皮におけるムチン様糖蛋白物質の分泌と線毛運動の長期間維持<sup>18)</sup> などが報告されている。モルモット中耳粘膜を用いた本実験でも、経日的な増殖面積の増加、線毛細胞における線毛の微細構造並びに定方向性の維持<sup>19)</sup>、さらには移植片上皮が基底膜の連続性を保持したまま、線維芽細胞の混入なしに、ゲル上に増殖する所見が確認され、コラーゲン法の有用性が示された。しかしながら、コラーゲン培養法においては最近、ハムスター気管上皮を用いた実験で、長期間培養下では、コラーゲン細線維の自己変性(spontaneous denaturation)あるいは、上皮細胞よりの geratinase-type enzyme の分泌により、ゲルの溶解が生じると報告されている<sup>20)</sup>。本実験においても、培養後期において、コラーゲン層の厚みが薄くなっているのが観察されており、細胞支持基剤としてコラーゲンを

用いる場合、ゲルの長期間の安定性を得るためには培養温度、ゲル濃度などについての検討がさらに必要と思われる<sup>21)</sup>。

##### 2) 組織培養下における増殖、再生過程

正常な生体下における気道粘膜の増殖、再生能力に関しては、ラットの気管を用いた粘膜搔爬後の再生上皮についての服部らの報告がある<sup>22)</sup>。この実験では、傷害後2時間より、既存上皮の上皮欠損部への移動が、断裂した基底膜の再生及び、線維芽細胞の増殖、血管新生などの間質反応を伴いつつ開始され、搔爬後約14日目には、正常粘膜の再生が認められている。またこの過程では、その初期に増殖能と分化能を同時に有する基底細胞が、移動上皮として出現し、その後、幼若な線毛細胞と分泌細胞に分化するとしている。組織培養下にてモルモット中耳粘膜と気管を用いた本実験においても、生体下での既存上皮にあたる移植片より、周囲への上皮派生が約3日以内に生じていた。さらに SEM 並びに光顕による観察で、上皮細胞が基底膜のコラーゲンゲル上への連続性を維持しつつ、経時的に増殖する所見が認められており、この系においても、生体下の粘膜再生過程の再現がある程度可能である点が示された。特に気管粘膜と同様に円柱上皮の形態を有し、線毛細胞と分泌細胞が豊富に存在する耳管鼓室口周辺部では、約8倍の面積増加が培養8日目で認められ、同時に培養した気管粘膜の増殖速度とほぼ等しかった。従って、中耳粘膜でも、特に粘液線毛輸送能を有する耳管鼓室口周辺部は、気管と同程度の粘膜再生、修復能を有しているものと思われる。また鼻粘膜に関しても、豊富に線毛細胞を有するヒト篩骨洞粘膜を用いた細胞培養下の実験で、同様の増殖速度を認めたと報告されている<sup>23)</sup>。

しかしながら、段階的鼓室形成術時にヒト中耳粘膜の再生状態を観察した報告では<sup>24)</sup>、術後の正常な粘膜上皮の再生には、中耳腔の良好な含気化の維持及び肉眼的炎症像の消退が必要であり、中耳真珠腫の遺残に伴う肉芽性病変などの存在下では、中耳粘膜の再生は、術後数カ月経た後でも不良であったとしている。中耳腔は気管と比較すると、腔内の異物排泄、ガス交換の交通路は耳管のみに限定されており、この点で粘膜の再生、増殖に不利な環境条件にあるといえる。今後はさらに、このような周囲の環境因子がどのように影響を与えるかの検討が必要と思われる。

##### 3) 中耳粘膜上皮の部位別増殖能に関して

正常中耳腔粘膜における部位別の上皮形態、細胞構

成、線毛運動能などの相違に関しては、モルモットにおいてもヒトと同様、既に多くの報告がある<sup>1)4)5)25)</sup>。今回の実験では、生体と同様に採取した部位の上皮形態の相違を反映して、培養下に増殖した上皮細胞の種類及び構成比率に違いが認められた。また、粘膜組織の経時的増殖面積の広がりにも違いが見られた。すなわち、耳管鼓室口より遠位の線毛細胞をほとんど欠如する、いわゆる扁平上皮部では、その派生上皮も同様に扁平な無線毛細胞であり、線毛細胞を欠如していた。また、増殖面積についても、耳管開口部付近の多列、立方上皮部が約8倍以上の広がり呈したのに比較して、扁平上皮部は約4倍程度と低い値を示した。

中耳粘膜は生後、哺乳期中期には、既に成熟期と相似した部位別の細胞分布、上皮形態が完成するとされているが<sup>26)</sup>、同時にその成長の過程における中耳腔の生理的、病理的環境の変化に応じて、動的にその構成細胞の割合、形態が変化することもよく知られている。細菌感染等により中耳腔に炎症が生じた場合や、滲出性中耳炎等における腔内への貯留液の存在下では、特に無線毛扁平上皮部において、杯細胞の増加、粘膜下の腺組織の出現等を伴う上皮の立方、円柱化が生じるとされている<sup>27)28)29)</sup>。また、外傷性顔面神経麻痺の減圧術時におけるヒト乳突部粘膜では、正常では扁平な無線毛細胞が大部分を占めるのに比較して、線毛細胞の増加していることが報告されている<sup>30)</sup>。これらの現象は、粘膜防御能及び病変よりの修復力が扁平上皮部では乏しいことに対して、中耳腔内の有効なクリアランスを増加させるという、生理的変化として説明されている。しかしながら、中耳腔各部位の粘膜上皮の分化、増殖能に対して具体的にどの因子が、どの程度作用するかは、いまだ明らかではない。このような問題解明の目的には、*in vitro*の実験系は非常に有用であり、今後はさらにガス分圧、機械的刺激、各種の薬剤、増殖因子、ホルモン、生理活性因子、細胞間物質等がそれぞれ具体的にどのように作用するかを検討が必要に思われる。

## V. ま と め

モルモット中耳粘膜及び気管を用い、組織培養下に中耳腔の部位別の増殖、分化能を検索し、以下の結果を得た。

1. コラーゲンゲル法を用いることにより、良好な採取組織の接着、周囲への上皮の派生(outgrowth)が認められた。

2. 培養開始後より outgrowth 出現にまで要した期間は、中耳腔蝸牛骨胞上と気管において、他の部位に比べ遅れていた。

3. 中耳粘膜では生体下における部位別の上皮形態の違いを反映して、組織培養下においても増殖する細胞の構成に相違が認められた。

4. 組織培養下における採取粘膜の増殖面積は、中耳腔耳管鼓室口部、同周辺部、気管>耳管鼓室口遠位部、蝸牛骨胞部であった。

## 参 考 文 献

- 1) Lim DJ, Paparella MM and Kimura RS: Ultrastructure of eustachian tube and middle ear in the guinea pig. *Acta Otolaryngol* 63: 425-444, 1967.
- 2) Sade J, Eliezer N, Silberberg A et al: The role of mucous in transport by cilia. *Am Rev Resp Dis* 102: 48-52, 1970.
- 3) Harada Y: Scanning electron microscopic study on distribution of epithelial cells in the eustachian tube. *Acta Otolaryngol* 83: 284-290, 1977.
- 4) Hussel B and Lim DJ: Secretory cells in the middle ear mucosa of the guinea pig. *Arch Otolaryng* 89: 691-699, 1969.
- 5) 高坂知節: 中耳・耳管粘膜の機能的形態学—正常と病態との比較—, 耳喉 56: 721-736, 1984.
- 6) 榎並淳平, 肥塚正博, 羽多正隆, 川村和男, 橘 陽一 他: コラーゲン・ゲル培養法 (I). 組織培養 13: 26-30, 1987.
- 7) Yang NS, Kube D, Park C et al: Growth of human mammary epithelial cells on collagen gel surfaces. *Cancer Res* 41: 4093-4100, 1981.
- 8) Kennedy JR and Ranyard R: Morphology and quantitation of ciliated outgrowth from cultured rabbit tracheal explants. *Eur J Cell Biol* 29: 200-208, 1983.
- 9) Lechner JF, Haugen A, Autrup H et al: Clonal growth of epithelial cells from normal adult human bronchus. *Cancer Res* 41: 2294-2304, 1981.
- 10) Wiesel JM, Gamiel H, Vlodavsky I et al: Cell attachment, growth characteristics and surface morphology of human upper-respiratory tract epithelium cultured on extracellular matrix. *Eur J Clin Invest* 13: 57-63, 1983.
- 11) Lee TC, Wu R, Brody AR et al: Growth and differentiation of hamster tracheal epithelial cells in culture. *Exp Lung Res* 6: 27-45, 1984.



- 12) Widdicombe JH, Coleman DL, Finkbeiner WE et al: Primary culture of the dog's tracheal epithelium: fine structure, fluid, and electrolyte transport. *Cell Tissue Res* 247, 95-103, 1987.
- 13) 竹野幸夫: モルモット中耳粘膜の細胞培養—培養細胞における酵素組織化学的検索一, 日耳鼻 93: 33-39, 1990.
- 14) Van Blitterswijk CA, Ponc M, Van Muijen GNP et al: Culture and characterization of rat middle-ear epithelium. *Acta Otolaryngol* 101: 453-466, 1986.
- 15) Drucker I, Weisman Z and Sade J: Tissue culture of human adult adenoids and of middle ear mucosa. *Ann Otol* 85: 327-333, 1976.
- 16) Van Blitterswijk, Hesselting SC and Grote JJ: The effect of external stimuli on cultured rat middle ear epithelium. *Acta Otolaryngol* 109: 101-110, 1990.
- 17) 林 利彦: 細胞外マトリックスの成分とその機能. 細胞 21: 3-7, 1989.
- 18) Kim KC: Possible requirement of collagen gel substratum for production of mucin-like glycoproteins by primary rabbit tracheal epithelial cells in culture. *In Vitro* 21: 617-621, 1985.
- 19) 滝沢敏夫: 気道線毛系の構造とその異常. 日胸疾会誌 22: 833-844, 1984.
- 20) Niles R, Kim KC, Hyman B et al: Characterization of extended primary and secondary cultures of hamster tracheal epithelial cells. *In Vitro* 24: 457-463, 1988.
- 21) 春日繁夫, 原田康夫: 浮遊コラーゲン・ゲル培養によるウサギ気管上皮細胞の微細構造. 気食 41: 283-291, 1990.
- 22) 服部康夫, 中村兼一, 村上忠也, 渡辺 充, 弓削庫太: 気管粘膜の再生・修復に関する電顕的観察. 日耳鼻 85: 891-902, 1982.
- 23) Bohm F, Wenzel M and Gerhardt HJ: Cultivation of ethmoidal sinus ciliated epithelia. *Acta Otolaryngol* 108: 136-141, 1989.
- 24) 湯本英二, 柳原尚明: 鼓室形成術における中耳粘膜の再生に関する電顕的観察. 耳鼻臨床 72: 1647-1654, 1979.
- 25) Ohasi Y, Nakai Y and Kihara S: Ciliary activity of the middle ear lining in guinea pigs. *Ann Otol Laryngol* 94: 419-423, 1985.
- 26) 前田昇一: 中耳粘膜上皮の発生学的研究—電子顕微鏡による—. 日耳鼻 79: 568-578, 1976.
- 27) Tos M: Anatomy and Histology of the middle ear. *Clin Rev Allergy* 2: 267-284, 1984.
- 28) 平田文久: 中耳粘膜の形態とその特徴. 日耳鼻 84: 215-218, 1981.
- 29) Inagaki M, Sakakura Y, Shimizu T et al: Ultrastructure of mucous blanket in otitis media with effusion. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 97: 313-317, 1988.
- 30) 川端五十鈴, 野村恭也: ヒト乳突部粘膜について一走査電顕的観察一. 耳喉 51: 91-97, 1979.

---

稿を終えるにあたり, ご指導ならびにご校閲を賜った恩師原田康夫教授に深甚なる謝意を表します。また本研究に際し、終始懇切なるご助言を頂いた鈴木衛先生、平川勝洋先生、村尾学技官、春日繁男研究員に深謝致します。また画像解析に関し、快く装置の使用を許可して下さいた広島大学学校教育学部地学研究室の鈴木盛久、林武広両先生に深く感謝致します。

また本研究は平成元年度文部省科学研究費(奨励研究(A) 課題番号01771339)の補助を受けた。なお本論文の要旨は、第37回日本基礎耳科学会にて発表した。

---

(1990年8月22日受稿 1990年10月16日受理 急載)  
別刷請求先 〒734 広島市南区霞1-2-3

広島大学医学部耳鼻咽喉科学教室 竹野幸夫