上皮成長因子 (epidermal growth factor: EGF) と真珠腫組織

——第二報；重層扁平上皮細胞角化層における EGF の局在——

甲南病院耳鼻咽喉科

後 藤 友佳子

EPIDERMAL GROWTH FACTOR IN CHOLESTEATOMA

——THE SECOND REPORT: THE LOCALIZATION IN THE HORNY LAYER——

YUKAKO GOTO, M.D

Department of Otolaryngology, Kohnan Hospital, Kobe

The localization of epidermal growth factor (EGF) in human cholesteatoma tissue, normal ear drum and external auditory canal skin was examined immunohistochemically, using avidin-biotin peroxidase complex method.

Bouin-fixed tissue was stained for investigation of horny layer in the epidermis, because fixation in Bouin's solution provides better preservation of the antigen. In the horny layer of cholesteatoma tissue, 19 out of 24 cases had EGF-positive immunoreactivity (79%). In 2 cases of normal external auditory canal skin, 4 cases of normal ear drum and a case of postauricular skin, no EGF-immunoreactivity was revealed in the horny layer.

EGF was assayed in the debris of cholesteatoma and the horny layer of the normal bony external canal with dot blot immunoassay. EGF content of the debris was higher than that of the horny layer of normal skin.

The result of the first report suggests the activity of cholesteatoma exists in the subcutaneous tissue (see the previous paper). In this report EGF content of cholesteatoma in the horny layer was found higher than that of normal external skin. This result demonstrates that EGF in the horny layer plays an important role in accelerating the growth and bony destruction in cholesteatoma.

To summarize these two reports, the following conclusion was reached. In the epidermis EGF content is equal in cholesteatoma and normal skin. But in the subcutaneous tissue and the horny layer EGF content of cholesteatoma is higher than that of normal skin. EGF in situ may be strongly related to the growth and bony destruction of cholesteatoma.

Key words: 真珠腫, 免疫組織化学, 上皮成長因子A93-1192-22131

I はじめに

第一報においては活動型真珠腫と非活動型真珠腫における上皮成長因子 (Epidermal Growth Factor: EGF—以下 EGF と略す) の局在を検討した。活動型真珠腫の組織では重層扁平上皮細胞と上皮組織の線維芽細胞に、非活動型に比べて、高い EGF の免疫組織活性を有していることがわかった。すなわち真珠腫の活

動性を EGF の存在が現わしている可能性が示唆された。また上皮組織の線維芽細胞では、EGF の陽性率は活動型真珠腫で91%、非活動型真珠腫で0%と、特に大きな違いがあり、上皮組織での活動性の違いが真珠腫の活動性の中心である可能性が考えられた。

真珠腫の上皮は重層扁平上皮細胞よりなるが、下層より基底層、有棘層、顆粒層、角化層で構築されてい

る。角化層はケラチンを大量に含んだ細胞の死骸の堆積であり、たえず表層から剝がれ落ちている。正常の鼓膜では上皮の発育は鼓膜の中心部に盛んで、角化層は周辺に向かって移動し、軟骨部外耳道で毛などにより押し上げられ、剝がれて耳垢腺の分泌物と共に耳垢となり、排泄される。真珠腫ではこの角化層の排泄がすすまず、大量に堆積し、場合により感染の産物である膿などと共に debris と呼ばれている。第二報ではこの角化層、さらに臨牀的には debris と呼ばれている部分に注目し、EGF の存在を検討した。

まず、EGF 抗原性の保持がホルマリン固定標本よりも良好である Bouin 固定標本の活動型真珠腫組織で、特に重層扁平上皮細胞の角化層での EGF の局在を、正常皮膚や鼓膜と比較検討した。またさらに真珠腫の debris における EGF 量を dot blot immunoassay で定量した。以上の研究結果をもとに真珠腫の進展に関して文献的考察を加えて検討したので報告する。

II 研究方法と結果

研究 1. 角化層における EGF の局在の検討 (Bouin 固定標本を用いた免疫組織学的検討)

〔目的〕

第一報ではホルマリン固定標本を用いて EGF の分布を調べた。ホルマリン固定標本は手技的に簡便であるが EGF の抗原性が失活しやすい。Gresik et al (1977)¹⁾ はマウス顎下腺での EGF の検索に際して、Bouin 固定が抗原性の保存の良い方法であると述べている。著者も、より正確に EGF の局在を検討するために Bouin 固定法を用いた。Bouin 固定液はピクリン酸水溶液 15：ホルマリン原液 5：酢酸 1 で調整した固定液で、ペプチドホルモンの固定によく用いられている。また固定時間は 2 時間、4 時間、6 時間、12 時間と比較検討したが、2 時間で十分固定し得た。

Bouin 固定標本を用いて重層扁平上皮細胞層の角化層の検索に主眼を置き、非角化重層扁平上皮細胞層とその表層の角化層における EGF の局在を検討した。

〔対象〕

活動型真珠腫 24 例（年齢 9～70 歳、平均 41.3 歳）を対象とした。比較として正常皮膚と鼓膜を計 7 例用いた。正常外耳道皮膚 2 例と耳介後部皮膚 1 例は、良性腫瘍摘出症例の標本で切断端の正常皮膚部分を調べた。鼓膜 4 例はいずれも死後 6 時間以内の死体より採取した。

〔方法〕

手術時採取材料を Bouin 液にて室温 2 時間固定の後、60% エタノールを用いて室温で一晩脱水した。パラフィン包埋後、5 μ m に薄切し、酵素抗体法の avidin-biotin peroxidase complex method (ABC 法)²⁾ で染色し、EGF の局在を検討した。一次抗体は抗ヒト EGF 単クローン抗体（湧永製薬）を用い、予備実験にて希釈濃度を 20 倍とした。ABC 法は universal kit (OMNITAG；Lipshaw 社) を用いた。以下に染色手順を示す。

薄切切片を、キシレンにて脱パラフィン後、蒸留水洗し 3% 過酸化水素水にて内因性ペロキシダーゼの失活を行った。さらに非特異的反応の抑制のため、正常ブタ血清を 37°C にて 20 分間反応させた。一次抗体を室温にて 2 時間反応させ、Tris buffered saline (TBS, pH 7.6) 洗浄の後、2 次抗体であるビオチン化抗マウス IgG 抗体を 37°C にて 20 分間反応させた。TBS にて洗浄後、avidin-biotin complex を 37°C にて 20 分間処理した。TBS にて洗浄し、3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) 溶液を室温にて 20 分間反応させ発色させた。流水にて洗浄後、マイヤーヘマトキシリン液（武藤化学）を 5 分間処理し核染色を行った。流水で 15 分間洗浄の後、Kaiser のグリセリンゼラチン液（MERCK 社）にて封入した。また negative control として一次抗体のかわりに正常マウス血清を用いた。

〔結果〕

非角化重層扁平上皮細胞層、その表層の角化層、上皮組織の線維芽細胞、及び血管内皮細胞において、EGF の局在を検討した。EGF の局在の判定は、第一報と同様に細胞質内の赤褐色微細顆粒状染色像を陽性とし、各症例ごとに陽性（+）、弱陽性（±）、陰性（-）で評価した。陽性（+）と判定した例は、図 1 や図 2 の重層扁平上皮細胞のようにはっきりと赤褐色に染まった例で、弱陽性（±）と判定した例は、図 2 の角化層のように淡くピンク色の例である。陽性の症例と弱陽性の症例を合わせた症例数を全症例に対する陽性率とした。また negative control として一次抗体の代わりに正常マウス血清を用いたが陽性像は得られなかった（図 3）。

図 1 は活動型真珠腫の一例で、非角化重層扁平上皮細胞層と角化層に共に赤褐色の染色像を認め、陽性と判定した。図 2 は別の症例で、非角化重層扁平上皮細胞層は陽性、角化層は弱陽性と判定した。真珠腫 24 例について検討し、EGF 染色像が陽性または弱陽性を示

表1 研究1 真珠腫組織におけるEGFの局在(Bouin固定法24例)

	陽 性 (+)	弱 陽 性 (±)	陰 性 (-)	陽 性 率 陽性例+弱陽性例 24例
角 化 層	6 (25 %)	13 (54 %)	5 (21 %)	79 %
重層扁平上皮細胞	20 (83 %)	4 (17 %)	0 (0 %)	100 %
線 維 芽 細 胞	3 (12 %)	15 (63 %)	6 (25 %)	75 %
血 管 内 皮 細 胞	0 (0 %)	8 (33 %)	16 (67 %)	33 %

した症例の割合(陽性率)は非角化重層扁平上皮細胞層で100%,角化層79%,線維芽細胞75%と高値であった。血管内皮細胞は33%と低値であった(表1)。

一方図4は正常外耳道皮膚であるが、非角化上皮細胞層は陽性で、角化層は陰性である。図5は正常鼓膜例であるが、同様に非角化上皮細胞層は陽性で角化層は陰性であった。正常外耳道皮膚2例、鼓膜4例、耳介後部皮膚1例においてはいずれも非角化重層扁平上皮細胞層は陽性であったが角化層は陰性で、真珠腫例において非角化重層扁平上皮細胞層と角化層が共に陽性であることと比べ、特に角化層でのEGFの局在に違いが認められた。

〔小 括〕

Bouin固定標本を用いてEGFの免疫組織染色を行った。非角化重層扁平上皮細胞層は、活動型真珠腫、正常皮膚及び鼓膜においていずれもEGFの局在を認めた。これに対して表層の角化層では正常皮膚や鼓膜の角化層は陰性であるのに対して、真珠腫は79%の陽性率であり、角化層においてEGFの局在に大きな違いが示された。

第一報の非活動型真珠腫におけるEGFの局在については重層扁平上皮細胞で陽性率56%の結果であったが、これは今回の正常皮膚や鼓膜の上皮細胞の陽性率よりも低い。島田(1967)³⁾は生化学的検索により真珠腫の上皮はむしろ退行変性期にある細胞群で占められていると述べたが、上皮下組織のactivityが無くなった状態では真珠腫の上皮は正常皮膚よりも増殖能力が少ないと考えられ、EGFの局在が少ないという事実と一致すると考える。

また血管内皮細胞におけるEGFの局在については陽性率が33%と低く、第一報のホルマリン固定標本の染色結果の64%とは異なる結果であった。血管内皮細胞におけるEGFの局在は判定し難く、この差異の理由は不明である。

研究2. debrisと正常外耳道皮膚角化物とのEGF量の比較検討 (dot blot immunoassay)

〔目 的〕

研究1では角化層において真珠腫組織と正常皮膚や鼓膜にEGFの局在が異なる結果を得た。そこで真珠腫表層の角化層に含まれるEGFの量的な差を確かめるために、debrisのEGFの定量を試みた。

〔対 象〕

活動型真珠腫2例のdebrisを術中に採取し、トラジロール加phosphate buffered saline (PBS, pH7.6)溶液にいれ、凍結保存(-20°C)した。対照として6例の正常外耳道皮膚角化物(外耳道深部の薄い膜様物一すなわち耳垢腺の分泌物を含まず、単に角化層の剝脱物と考えられる部分—以下正常角化物と略す)を同様に処理した。

〔方 法〕—dot blot immunoassay—

今回著者はdot blot immunoassayを用いてEGFを定量した。本方法は検体から既知蛋白の量を測定する方法で、手技はBayer et al⁴⁾、Suresh et al⁶⁾に従った。以下に具体的方法を示す。

検体をPBSにて洗浄後ホモゲナイズし、4°Cにて遠沈(10,000rpm, 10分間)した。この上澄液をPBSにて連続希釈し(×2～×128)、Durapore紙(Millipore社)に10μlずつ吸着させた。また同様に既知濃度のヒトEGF(湧永製薬)も処理した。3% bovine serum albumin (BSA, Sigma社製)を37°C 1時間、さらに10% bovine serum (sigma社)を37°C 1時間のdouble blockingを行い、一次抗体である抗ヒトEGF単クローン抗体(1% BSAにて10倍希釈)と室温一晚反応させた。Durapore紙を0.05% Tween 20(和光純薬)にて洗浄後、ビオチン標識抗マウスIgG抗体(Vector社)と37°C 1時間反応させ、0.05% Tween 20にて洗浄の後、avidin-biotin complex (Amersham社)と室温15分反応させた後、3,3'-Diaminobenzidine

後 藤 論 文 付 図 (1)

図1 研究1 活動型真珠腫例 (Bouin 固定標本)
非角化重層扁平上皮細胞層と角化層に赤褐色の染色像 (陽性) を認める。
(左×33, 右×66)

図2 研究1 活動型真珠腫例 (Bouin 固定標本)
非角化重層扁平上皮細胞層は陽性, 角化層は弱陽性と判定した。
(左×33, 右×132)

図3 negative control
一次抗体として抗ヒトEGF単クローン抗体
の代わりに正常マウス血清を用いた。(×66)

図4 研究1 正常外耳道皮膚
(Bouin 固定標本)
非角化上皮細胞層は陽性で角化層は陰性と
判定した. (× 132)

図5 研究1 正常鼓膜 (Bouin 固定標本)
非角化上皮細胞層は陽性で角化層は陰性と判定した.
(左 × 33, 右 × 132)

図6 研究2 dot blot immunoassay

表2 研究2 debrisと正常角化物におけるEGF量

		総蛋白量1mgあたりの hEGF量 (μg)
debris	case 1	120
	case 2	120
正常角化物	case 3	50
	case 4	19
	case 5	(-)
	case 6	(-)
	case 7	(-)
	case 8	(-)

(一): 検出不可

(DAB, 和光純薬)と反応させた。さらに3% H_2O_2 を加え発色させた。

既知濃度のヒトEGFの発色を判定の基準とし、比較検討して検体のEGF量を求めた。例えば図6で示すように、本方法ではヒトEGFは12ng/10 μl 以上のEGF濃度にて発色が認められた。sample Aは8倍希釈で同程度の発色を認め、含有されるEGF量は約96ngであると考えた。また抽出組織から可溶性蛋白を抽出し、protein dye assay (Bio-Rad社)にて総蛋白量を測定し、検体中総蛋白量1mgあたりのEGF量を出した。

〔結 果〕

検体中総蛋白量1mgあたりのEGF量はdebrisでは2例とも約120 μg であった。これに対して正常角化物では約50 μg と約19 μg で、他の4例は発色せず検出不能であった(表2)。また抗ヒトEGF抗体のかわりに抗ヒトEGF活性を持たない正常マウス血清を用いた場合と、抗ヒトEGF抗体をヒトEGFで前もって吸収した場合のコントロール実験では明らかな発色を認めなかった。

〔小 括〕

少数例ではあるが、真珠腫のdebrisのEGF含有量が正常外耳道の角化物のEGF量と比較して多いという結果は、研究1で真珠腫表層の角化層においてEGFの免疫染色性が高いという事実と一致する。これは活動型真珠腫の表層の角化層やその落屑物ともいえるdebrisの存在が、単に上皮細胞増殖の結果であるのみでなく、debrisの存在がさらに上皮の増殖を亢進させる一つの因子である可能性を示唆していると考えらる。

III 考 察

1. EGFに関する文献的考察

上皮成長因子(epidermal growth factor; EGF)は、1962年Cohen⁷⁾により分離同定された。その作用は皮膚、角膜上皮、肺・気管上皮などの上皮系細胞の増殖と分化を促進するのみでなく、多種の細胞に作用して増殖を促進するといわれている⁸⁾。これらのEGFの多彩な作用に関しては第一報に詳述した。本編ではEGFの骨組織に対する作用に関して述べる。

EGFは骨組織に対しては吸収の方向に働く。Tashjian & Levine (1978)⁹⁾は器官培養を行ったマウス頭蓋冠にEGFを作用させると、プロスタグランディン E_2 の合成促進により骨吸収が起こると報告した。Canalis & Raitz (1979)¹⁰⁾はラットの頭蓋冠でEGFがDNA合成を促進し、コラーゲン合成を抑制したとし、さらにRaitz et al (1980)¹¹⁾はラットの長管骨を用いEGFによる骨吸収を確認したが、プロスタグランディンの産生には影響がみられなかったと報告した。Hiramatsu et al (1982)¹²⁾は新生仔マウス頭蓋冠から分離された骨芽細胞様細胞(clone MC3T3-E1 cell)を用いて、EGFがコラーゲン合成を抑制するという結果を得た。このようにEGFが骨組織に対してコラーゲン合成を抑制する形で吸収的に作用するという事実は共通した結果として認められている。プロスタグランディンの関与については実験動物、方法により結果が一致せず検討が続いている。一方コラーゲンの分解に関与するコラゲナーゼに関してはChikuma et al (1984)¹³⁾は先述した骨芽細胞様細胞(clone MC3T3-E1 cell)を用いて、EGFがコラゲナーゼ様ペプチダーゼなどの活性を高めコラーゲン分解に関与しているとしたが、Hata et al (1984)¹⁴⁾や角井(1984)¹⁵⁾は同じ細胞に対するEGFの作用を調べ、DNA合成の促進と共に、特にType Iコラーゲン合成を抑制するが、コラゲナーゼ活性の上昇はみられなかったと報告した。最近ではPatridge et al (1987)¹⁶⁾がラットのosteogenic sarcoma cellでEGFがコラゲナーゼの放出を刺激すると報告している。このようにコラゲナーゼに関しては異論が多く、EGFとの関連は確定されていない。

Shupnik et al (1980)¹⁷⁾はマウス頭蓋冠にEGFレセプターを証明し、Ibbotson et al (1985)¹⁸⁾はEGFによるラット長管骨の骨吸収促進作用をEGFレセプター抗体が抑制することを確認した。さらにEGFレセプターにEGFと競合するtransforming growth fac-

tor (TGF- α) が EGF と同じように骨吸収に作用することから、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症の原因物質として注目されている¹⁹⁾²⁰⁾。

以上多彩な EGF の作用の中で、骨組織に対する作用について述べたが、上皮細胞に対しては増殖促進に働き、骨組織は吸収するという EGF の作用特性が真珠腫組織の進展様式に一致しており大変興味深い。

また EGF の定量は radioimmunoassay (RIA) radioreceptorassay (RRA), enzyme immunoassay (EIA), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) などが行われている。本研究では dot blot immunoassay を用いて EGF を定量した。この方法は ELISA 法と同じく抗原抗体反応と発色を定量に取り入れた方法である。ELISA 法では検体を detection plate に吸着させるが、dot blot immunoassay では検出蛋白を、水素結合で蛋白を吸着する性質を持つ Durapore 紙に吸着させる。本方法は従来に比べ手技的に容易であり、また放射性同位元素を用いないため安全である点が特徴である。発色の程度は肉眼で判定したが、薄層クロマトスキャナーによる吸光度測定 (405nm) も可能である。

2. 真珠腫に関する文献的考察

1) 真珠腫の成因論について

中耳真珠腫の成因はさまざまに議論されてきた。先天説 (epidermoid theory, heteroplasmic theory) や化生説 (metaplasia theory), 侵入説 (immigration theory) に続いて、鼓室内の陰圧が外耳道上皮の侵入に関係するという陰圧説 (invagination theory) が登場した。Bezold (1891)²¹⁾ は耳管狭窄による鼓室の陰圧が特に弛緩部に陥凹を起こし穿孔し上皮が侵入すると考え、Wittmaack (1930)²²⁾ は耳小骨周囲の結合組織により上鼓室が独立し陰圧になり弛緩部鼓膜が陥凹すると考えた。

Tumarkin (1961)²³⁾ は小児期の反復性感染に基づいた耳管閉鎖により中耳陰圧化をきたし、鼓膜弛緩部や後上部に陥凹 (collapse) が起こることを真珠腫の前段階 (pre-epidermosis) と考えた。さらに角化物の蓄積、炎症の続発により急激に上鼓室、乳突洞へ真珠腫が進展すると考え、cholesteatoma ではなく epidermosis と称した。このように鼓室の陰圧、鼓膜の陥凹を真珠腫の原因として考える Bezold 以来の陰圧説から、さらに滲出性中耳炎と真珠腫の係わりが検討された。

Zalin (1963)²⁴⁾ は滲出性中耳炎と pre-epidermosis は非常に近い関係にあると述べ、Dawes (1970)²⁵⁾ は滲

出性中耳炎の後遺症として真珠腫をとらえ、Mackinnon (1971)²⁶⁾ は滲出性中耳炎の進行した例で鼓膜上皮の advanced keratosis (epidermosis) を認め、これが真珠腫になると推察し、その治療法として鼓膜チューブ留置を挙げている。Tos (1980)²⁷⁾ は小児滲出性中耳炎の 527 耳を 3～8 年後再観察すると、34% にさまざまな鼓膜弛緩部の陥凹があり、4.2% は骨性輪の骨吸収を認め、0.2% で上鼓室真珠腫があると報告し、陥凹部分の自浄作用の欠如により真珠腫に進行していくと述べた。佐野 (1981)²⁸⁾ は家兎耳管鼓室口を閉鎖し、鼓膜穿孔を起こさず、また中耳腔に肉芽の存在も無い家兎で、滲出液の貯留と鼓膜弛緩部上皮が中耳腔内に進展した例を示している。また弛緩部表皮では外耳道表皮に比べ活発な分裂像を示すことをコルヒチンテクニックで証明した。大西 (1983)²⁹⁾ は小児滲出性中耳炎の一例で、外耳道後上壁に突然肉芽性病変が出現し、骨破壊を起こし上鼓室真珠腫に進展した例を示し、外耳道深部後上壁の骨破壊が滲出性中耳炎における真珠腫発症の一つの原因であると述べた。本多は (1985)³⁰⁾ はそれまでの佐野²⁸⁾ 杉田³¹⁾ 宮島³²⁾ らの研究を総合して弛緩部型真珠腫の成立機転を次のように考えた。幼児期に滲出性中耳炎に長く罹患することにより発育の悪い上鼓室～乳突腔に粘稠液の貯留が起こる。7～8 歳以後耳管機能が改善されて中鼓室以下は正常化するが上鼓室の粘液 (グルー) は残存し、tympanic isthmus の閉鎖を来し上鼓室が陰圧化する。また弛緩部鼓膜は上鼓室よりグルーによる持続的刺激を受けることになり上皮の増殖を来し、陰圧と相まって真珠腫に発育していくというものである。このように鼓室内の陰圧ないし肉芽、滲出液などの持続刺激が鼓膜上皮の活動性を高め、上皮の連続が保たれながら鼓室内へ進展していくという考えに基づいて研究を進めている学者が多いようである。著者も上皮下組織における EGF の存在が真珠腫上皮の成長に関与しているという考えを第一報に示した。

さて臨床においても、Tumarkin のいう pre-epidermosis すなわち鼓膜弛緩部ないし後上部の陥凹 (collapse) があるが感染はなく、debris のない状態をししばしば経験する。陥凹部表面の自浄作用は保たれ、角化物の堆積が起こらない状態と考えられ、これを真珠腫とは考えない。しかしその後耳漏、耳痛を訴えて再診すると、感染を伴い debris が多い進行した真珠腫になっている場合もある。これは何らかの炎症機転が加わり鼓膜上皮が活性化したものか、または徐々に陥凹が

囊状に拡大し、自浄作用の限界を越えて角化物が堆積し、炎症が加わったものか不明である。逆に感染を伴い aural polyp が存在する鼓膜上皮でも、polyp を除去し十分な耳内清掃などの治療を続けると、元の乾燥した debris のない陥凹の状態に戻ることもある。Tumarkin も角化堆積物を早期に吸引すれば、pre-epidermosis の状態に戻ると述べている。つまり鼓膜上皮に inactive stage と active stage があり、active stage になると真珠腫に進展していく。また active stage を inactive stage に戻せば元の陥凹に戻すことができるという考え方である。また進展した真珠腫で、乳突洞にまで上皮が侵入していても debris がなく、上皮が薄く、あたかも真珠腫の最終段階として停止しているかのごとき真珠腫もある。言うなれば inactive stage と考えられる。そこでどんな因子により鼓膜上皮は活性化されるのかについて、真珠腫組織の活動性の本質を追求するための、真珠腫の組織学的、生化学的検討が多くなされたが、これについては文献的考察も含めて、第一報に詳述した。

2) 角化層と骨破壊について

今回著者は角化層における EGF の存在について検討したが、この領域についても研究が進んでいる。湯浅ら (1978)³³⁾ は debris は酸性で debris を除去清掃した後の matrix 表面の pH は中性に近づくことと述べ、飯野ら (1979)³⁴⁾ は debris 内の酸性物質として低級脂肪酸 (酢酸、プロピオン酸など) を検出し、それが細菌感染による産物であると考えた。金子ら (1978)³⁵⁾ は真珠腫表皮層の破裂部位から酸性物質を含む debris が matrix 外へ流出し、骨組織の脱灰破壊が起こると報告した。大崎ら (1983)³⁶⁾ はレーザーラマン分光法で真珠腫により破壊された骨表面を検索し、藤田 (1987)³⁷⁾ はさらに同じ方法でプロピオン酸によるモルモット中耳骨胞骨の変化を検索し、骨の無機塩の脱灰が起こっていることを示した。

真珠腫による骨破壊には酸性環境における骨の無機塩の脱灰と有機物であるコラーゲンの分解という機序が必要である。コラーゲナーゼは Abramson et al (1977)³⁸⁾ が蛍光抗体法で真珠腫組織における局在を示した。Gantz et al (1979)³⁹⁾ はコラーゲナーゼが骨破壊縁の肉芽組織中の単核炎症細胞に免疫組織学的に証明できたとし、慢性炎症反応が骨破壊機序に大きな意味を持つと考えたが、Bretlau et al (1981)⁴⁰⁾ は免疫不全ヌードマウスにヒト真珠腫上皮を移植し炎症所見無くしても骨破壊が起こり得ることを示した。

Moriyama et al (1987)⁴¹⁾ は培養細胞を用いて線維芽様細胞に上皮細胞の抽出液を作用させるとコラーゲナーゼの産生が高まることを報告した。

このようにこれまで単なる老廃物と考えられていた debris が酸性環境を作ることによって骨破壊に関与している可能性が示された。また骨破壊に関しては無機塩の脱灰のみでなく有機物のコラーゲンを分解するコラーゲナーゼの存在が注目されている。しかし上皮成長因子 (EGF) と真珠腫の関係については発表されていない。そこで次項において著者の EGF と真珠腫組織の関係についての研究結果に考察を加える。

3. 研究結果の総括

今回の研究 1 では EGF の保存が比較的良好な Bouin 固定の標本を用い、特に第一報のホルマリン固定標本では判定しにくかった重層扁平上皮細胞層の角化層を主に検討し、活動型真珠腫と正常皮膚 (正常鼓膜、外耳道皮膚と耳後部皮膚) で比較検討した。

重層扁平上皮細胞層はいずれも EGF の陽性率が 100% で、正常鼓膜上皮や皮膚表皮層も常に EGF の作用を受けて上皮細胞の増殖が起こっていると考えられる。しかし角化層については正常鼓膜や皮膚では EGF が陰性であるのに対して、真珠腫では陽性率 79% と高く、また角化層も厚いので、この部分に多くの EGF 活性が存在すると考えられ、単に上皮細胞の増殖の結果であるだけでなく、真珠腫の成長に関係している可能性があると考えられる。Tumarkin (1961)²³⁾ の言う pre-epidermosis の状態が epidermosis に移行する機序に陥凹部表面の自浄作用の欠如がある。表面の角化物が外耳道側へ輸送されず、鼓膜上に蓄積されて真珠腫に進行していく理由の一つに、角化物の中での EGF の蓄積があるのではないかと考えられる。active stage の真珠腫でも十分に debris を吸引し清掃することで、inactive stage に戻すことができる場合があるが、これも鼓膜表面の EGF の作用を除去できたことが原因である可能性がある。すなわち真珠腫組織の inactive stage が active stage へと進行する要因として鼓膜裏面からの持続刺激だけでなく、鼓膜表面の debris による刺激も考えなくてはならないが、その一端を担うのが EGF であると考えられる。

さらに表層の角化物に含まれる EGF 量を見るために、真珠腫の debris の EGF 定量を研究 2 で試みた。dot blot immunossay にて debris と正常角化物の EGF 量を比較した。それぞれ検体中の総蛋白量 1mg あたりの EGF 量を求めたが、正常角化物に比べて

debris では EGF 量が多かった。これは研究 1 の免疫組織染色の結果と一致する。湯浅ら (1978)³⁹⁾ は debris は酸性であると述べているが、EGF は酸や蛋白分解酵素に比較的強く、等電点 4.6 の酸性ペプチドであり、炎症を起こした debris の中で分解されにくく、他の蛋白に比べて残存している可能性がある。

金子ら (1978)³⁵⁾ は真珠腫表層の破裂部位から debris が上皮下に流出し骨組織の脱灰に関係している可能性を考えたが、同時に debris に残存する EGF も上皮下に流出するとすれば、骨吸収作用をもつ EGF が上皮下の骨破壊にかかわっている可能性も考えられる。

以上真珠腫組織における EGF の存在とその作用について、今回は特に重層扁平上皮細胞の角化層について検討した。正常鼓膜や皮膚と比べて真珠腫組織の上皮の角化層には EGF が多く存在することが、免疫組織染色と dot blot immunoassay による定量で明らかとなった。第一報では主に上皮下組織における EGF の存在の多寡が真珠腫の活動性と関係があると考えられたが、さらに今回の検討により、角化層における EGF の存在も真珠腫の成長と骨破壊に大きく関与している可能性が示唆された。

今後真珠腫組織における細胞表面の EGF レセプターの検索などにより、さらに EGF と真珠腫の関係が解明されるものと期待する。

IV ま と め

手術時摘出材料を用いて真珠腫組織における EGF の存在を Bouin 固定で免疫組織学的に検討し、さらに debris の EGF 量を dot blot immunoassay で測定し、以下の結論を得た。

真珠腫組織において重層扁平上皮細胞の角化層に EGF の存在が免疫組織学的に証明され、さらに debris の EGF 量の測定によっても、真珠腫の角化層の EGF 量が多いことが定量された。このことにより、真珠腫の成長と骨破壊に角化層の EGF が関与している可能性があることを、文献的考察と共に述べた。

参 考 文 献

- Gresik E, Barka T: Immunocytochemical localization of epidermal growth factor in mouse submandibular gland. *J Histochem Cytochem* 25: 1027-1035, 1977.
- 渡辺慶一, 中根一穂 編: 改訂版 酵素抗体法. 学際企画, 東京, 1985.
- 島田忠雄: 真珠腫上皮の組織学的並びに組織化学的研究. *日耳鼻* 70: 649-661, 1967.
- Bayer EA, Zalis MG, Wilchek M: 3-(N-Maleimido-propionyl) Biotin: A Versatile thiol-specific biotinylation reagent. *Analytical Biochemistry* 149: 529-536, 1985.
- Bayer EA, Ben-Hur H, Wilchek M: A sensitive enzyme assay for biotin, avidin, and streptavidin. *Analytical Biochemistry* 154: 367-370, 1986.
- Suresh MR, Milstein C: A direct antigen-binding assay to screen hybridoma supernatants. *Analytical Biochemistry* 151: 192-195, 1985.
- Cohen S: Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem* 237: 1555-1562, 1962.
- 平田結喜緒: 蛋白, ポリペプチド系成長因子—上皮成長因子. *日本臨床* 44: 7-15, 1986
- Tashjian AH, Levine L: Epidermal growth factor stimulates prostaglandin production and bone resorption in cultured mouse calvaria. *Biochem Biophys Res Commun* 85: 966-975, 1978.
- Canalis E, Raitz LG: Effect of epidermal growth factor on bone formation in vitro. *Endocrinol* 104: 862-869, 1979.
- Raitz LG, Simmons HA, Sandberg AL et al: Direct stimulation of bone resorption by epidermal growth factor. *Endocrinol* 107: 270-273, 1980.
- Hiramatsu M, Kumegawa M, Hatakeyama K et al: Effect of epidermal growth factor on collagen synthesis in osteoblastic cells derived from newborn mouse calvaria. *Endocrinol* 111: 1810-1816, 1982.
- Chikuma T, Kato T, Hiramatsu M et al: Effect of EGF on dipeptidyl-aminopeptidase and collagenase-like peptidase activities in cloned osteoblastic cells. *J Biochem* 95: 283-286, 1984.
- Hata R, Hori H, Nagai Y et al: Selective inhibition of type I collagen synthesis in osteoblastic cells by epidermal growth factor. *Endocrinol* 115: 867-876, 1984.
- 角井真弓理: 骨形成細胞に対する EGF の影響に関する研究—特にマウス頭蓋冠由来 clone MC3T3-E1 細胞を指標として—。城歯大紀要 13: 331-349, 1984.
- Patridge NC, Jeffrey JJ, Ehlich LS et al: Hormonal regulation of the production of collagenase and a collagenase inhibitor activity by rat osteoblastic

- sarcoma cells. *Endocrinol* 120: 1956-1962, 1987.
- 17) Shupnik MA, Yuk-yu N, Tashjian AH: Characterization and regulation of receptors for EGF in mouse calvaria. *Endocrinol* 107: 1738-1746, 1980.
- 18) Ibbotson KJ, D'Souza SM, Smith DD et al: EGF receptor antiserum inhibits bone resorbing activity produced by a rat leydig cell tumor associated with the humoral hypercalcemia of malignancy. *Endocrinol* 116: 469-471, 1985.
- 19) Ibbotson KJ, Twardzik DR, D'Souza SM et al: Stimulation of bone resorption in vitro by synthetic transforming growth factor-Alpha. *Science* 228: 1007-1009, 1985.
- 20) Stern PH, Krieger NS, Nissenson RA et al: Human TGF- α stimulates bone resorption in vitro. *J Clin Invest* 76: 2016-2019, 1985.
- 21) Bezold F: Ueber das Cholesteatom des Mittelohrs. Klinischer und therapeutischer Teil *Z Ohrenheilk* 21: 252, 1891. cited by Dota.
- 22) Wittmaack K: Cholesteatomhiludung, Pneumatisation und Pneumatisationlehre. *Arch Ohren-USW Heilk* 125: 218-234, 1930.
- 23) Tumarkin A: Pre-epidermosis. *J Laryngol Otol* 75: 487-500, 1961.
- 24) Zalin H: On the aetiology of pre-epidermosis with special reference to the role of exudative otitis media. *J Laryngol Otol* 77: 453-461, 1963.
- 25) Dawes JDK: The aetiology and sequelae of exudative otitis media. *J Laryngol Otol* 84: 583-610, 1970.
- 26) Mackinnon DM: The sequel to myringotomy for exudative otitis media. *J Laryngol Otol* 85: 773-793, 1971.
- 27) Tos M, Poulsen G: Attic retractions following secretory otitis. *Acta Otolaryngol* 89: 479-486, 1980.
- 28) 佐野真一: 実験的中耳真珠腫一特に上鼓室型真珠腫の成因に関して一. *耳展* 24: 129-171, 1981.
- 29) 大西俊郎, 眞崎正美, 深見雅也, 本郷 了: 小児滲出性中耳炎経過中における中耳真珠腫の発現. *耳喉* 55: 691-696, 1983.
- 30) 本多芳男, 佐野真一, 溝呂木紀仁, 杉田尚史, 宮島逸郎: 滲出性中耳炎と真珠腫性中耳炎との関係. *耳展* 28: 351-355, 1985.
- 31) 杉田尚史: 中耳真珠腫上皮の増殖に関する研究. *耳展* 25: 153-175, 1982.
- 32) 宮島逸郎: tympanic mucosal fold の臨床解剖学的研究. *耳展* 24: 217-258, 1981.
- 33) 湯浅 涼, 伊勢郁夫, 金子 豊: 真珠腫 MATRIX 内の pH. *耳鼻* 24: 163-165, 1978.
- 34) 飯野ゆき子, 伊勢郁夫, 富岡幸子, 河本和友, 湯浅 涼 他: 真珠腫の骨破壊について. *日耳鼻* 82: 996-997, 1979.
- 35) 金子 豊, 湯浅 涼, 伊勢郁夫, 飯野ゆき子, 新川秀一 他: 真珠腫における耳小骨破壊に関する我々の考え. *耳鼻* 24: 167-170, 1978.
- 36) 大崎勝一郎, 藤田 彰, 増田 游, 吉田萬子, 小倉義郎 他: ラマン分光法による構造分析—真珠腫性中耳炎の骨破壊—. *耳鼻* 29: 236-242, 1983.
- 37) 藤田 彰: 真珠腫性中耳炎の骨破壊機序に関する実験的研究—レーザーラマン分光法による分析—. *日耳鼻* 90: 706-716, 1987.
- 38) Abramson M, Huang C: Localization of collagenase in human middle ear cholesteatoma. *Laryngoscope* 87: 771-791, 1977.
- 39) Gantz BJ, Maynard J, Bumsted RM et al: Bone resorption in chronic otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 88: 693-700, 1979.
- 40) Bretlau P, Sorensen CH, Jorgensen MB et al: Experimental studies of cholesteatomas. *Acta Otolaryngol* 91: 575-584, 1981.
- 41) Moriyama H, Honda Y, Huang CC et al: Bone resorption in cholesteatoma: epithelial - mesenchymal cell interaction and collagenase production. *Laryngoscope* 97: 854-859, 1987.
-
- 稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った恩師天津陸郎教授に深甚なる謝意を表します。また終始暖かい御指導、御協力をいただきました谷口郷美先生、神戸市立中央市民病院臨床病理科内田博也先生、神戸海星病院臨床病理部中院邦彦先生に深く感謝いたします。dot blot immunoassay について御指導、御協力いただきました東海大学第1分子生物学教室渡辺 泰教授、小川良一先生に深謝いたします。さらに、御協力いただきました神戸大学医学部法医学教室溝井泰彦教授、福永龍繁先生、神戸市立中央市民病院臨床病理科中村寛治氏、金子祐一郎氏に深謝いたします。最後に病理組織標本採取に御協力いただきました諸先生方の御協力に感謝いたします。
- なお、本論文の一部は第14回日本臨床耳科学会総会、第34回日本基礎耳科学会において口演した。
-
- (1990年2月2日受稿 1990年3月27日受理)
印刷請求先 〒658 神戸市東灘区鴨子ヶ原1-5-16
甲南病院耳鼻咽喉科 後藤友佳子