実験的正円窓膜破裂治癒過程の観察

暁 清文・柳原 弘男・有友 宏・柳原 尚明

Healing Process of the Experimentally Produced Round-Window-Membrane Perforation

Kiyofumi Gyo, Hiroo Yanagihara, Hiroshi Aritomo
and Naoaki Yanagihara

(Ehime University)

Healing processes of the experimentally produced, round-window-membrane perforation were studied light and scanning-electronmicroscopically (SEM) in 33 guinea pigs. Some resulted in spontaneous healing as early as 3 days and all the others healed within 10 days. These results suggest that the round window membrane has a pronounced tendency to heal. In light microscopical examination, the sectioned preparations were stained by Gomori's aldehyde-fuchsin method because there was a great amount of elastic fibers in the middle layer of the round-window membrane.

Histological observations proved that the perforations of the roundwindow membrane were closed by covering with granulation, while the connective tissues of the middle layer were disrupted. The granulation was prominent on the epithelial layer and was less prominent on the inner layer. As connective tissues were the main composites of the round-window membrane to maintain its configuration, they played important roles in the healing process of the perforation.

はじめに

最近、内耳窓破裂症の臨床例が多く報告されるようになり、その診断や治療法とも関連して本症の病態に関心が向けられるようになってきた。しかし本症についての基礎的研究は少なく、はたして内耳窓破裂は自然閉鎖するのか、閉鎖するとすればその治癒過程はいかなるものであるかについて十分に研究されていない。そこで内耳窓破裂症の研究の一環として、モルモットの正円窓に人工的に穿孔をつくり、その修復過程を観察した。すなわち走査電顕により穿孔修復部の表面構造を、光学顕微鏡によりその断面構造を観察し、若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1. 走査電顕的観察

実験動物には白色成熟モルモット（体重 400
~750 g）を用いた。イソゾール® (thyamylal

sodium, 25~35mg/kg i.p.) で麻酔後、動物の頭部を固定した。さらにキシロカイン®による局所浸潤麻酔を加え、手術顕微鏡下に耳後部より

中耳骨胞を開放し, ツチ・キヌタ骨を除去して正円窓を明視下において, 正円窓膜の穿孔は先端を尖らせた 0.3mm 径のタングステン線をマニピュレーターを用いて正円窓膜に刺入することによって作製した. これらの処置は可能な限り無菌的におこない, AB-PC を腹腔内に注射することにより感染を予防した. 術後はそのまま動物を飼育ゲージにもどし, 一定の日時を経た後に創を再開放した. 手術顕微鏡にて穿孔部を観察した後, 蝸牛ごと正円窓を採取した. 直ちに 3% グルタルアルデヒドによる前固定, 1% オスミウム酸による後固定をおこない, 走査型電子顕微鏡 (日立 S500A) で正円窓の観察をおこなった.

2. 光学顕微鏡による観察

実験手技の大略は走査電顕の場合と同じであるが, アプローチならびに穿孔作製法を若干変更した. すなわち鼓膜・耳小骨などの伝音系を可能な限り保存するために外耳道後壁と顔面神経管の間の骨を削開して正円窓にアプローチした (図 1). このアプローチにより生理学的実験が可能となり, また中耳骨胞内での術後の肉芽の増殖を減らすことができた. 穿孔の作製には 25~27 ゲージの注射針を用いたが, これにより正円窓の線維走行を考慮して穿孔をつくることができた. すなわち正円窓の主線維の走行は楕円形をしている正円窓の短軸の方向なので, ここでは穿孔縁が主線維の走行と直交するように穿孔をおこした (図 2).

穿孔作製後, 一定の日時を経過したのち創を再開放し手術顕微鏡にて穿孔部を観察した. さらにイソゾール深麻酔下で生理食塩水と Heidenhain-Susa 固定液で生体還流をおこない蝸

図 1 正円窓の穿孔は外耳道後壁と顔面神経管の間を削開し注射針を刺入しておこした.

図 2 穿孔の状態を示す. 正円窓を観察するために鼓膜, ツチ・キヌタ骨等は除去してある.

牛を採取し, 同固定液で一昼夜浸漬した後, 5% 三塩化酢酸で脱灰, パラフィン包埋をおこなった. 連続切片は破裂縁と直交する方向, すなわち主線維と平行な方向に切り出した. 染色には弾力線維の染色法であるアルデヒド・フクシン法を用いた. この方法により弾力線維は紫色に染まる. 弾力線維を染色したのはモルモットの固有層では膠原線維は極めて少なく弾力線維が豊富だからで, この染色法により固有層の識別が容易となり粘膜層 (外側層) や内層と区別できる.

結

表 1 に手術顕微鏡にて観察した穿孔修復の経過を示す. 早い例では 3 日目に遅くとも 10 日目ごろには閉鎖していた. 表の中耳炎例は中耳骨胞内に膿が充満し内耳炎を合併していたが, 多くは正円窓が肉芽でおおわれ穿孔は一応閉鎖し

果

ていた. なお穿孔作製直後の前庭症状 (偏倚あるいは自発眼振) は全く生じない例もあったが, 生じた例においても 1~2 日後には回復した.

表1 穿孔修復の経過、手術顕微鏡下での観察結果による

	穿孔作製から観察までの期間 (日)													計
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	14	21	28	
穿孔閉鎖例		1	1	1		3	2		2	1	4	1	1	17
非閉鎖例	3	1	2	1		3	1							11
中耳炎			1		1	1		1		1				5
計	3	2	4	2	1	7	3	1	2	2	4	1	1	33

図3 穿孔後2日目。穿孔は閉鎖していない。

1. 走査電顕的観察

図3は穿孔作製後2日目例の所見である。断端部に肉芽の増殖傾向がみられるが穿孔は大きく開いたままである。図4(a, b)は4日目例であるが肉芽の形成が著明で穿孔はすでにみられなかった。正円窓左辺の大きな亀裂は組織固定中に生じたアーチファクトである。図5(a, b)は7日目例であるがやはり肉芽性に閉鎖されていた。

考

正円窓膜は鼓室側の粘膜層、外リンパ液と接する内層、その間にある固有層の3層からなり、その微細構造についてはすでに多くの報告

のように正円窓の穿孔は肉芽にて閉鎖されるが、この肉芽は中耳側で増殖傾向が強く内耳側ではあまりみられなかった。

2. 光学顕微鏡的観察

図6(a, b)は穿孔後10日目の正円窓の断面である。弾力線維の断裂とそれを覆う粘膜層側の肉芽の増殖がみられる。左側の線維は途中から拡がるように疎となっているが、おそらく穿孔を作った際に線維が折れ込んでほぐれたためと思われる。図7も10日目例であるが、この例では正円窓の辺縁部に穿孔が生じていた。左中央付近で線維の部分的断裂がみられるが、おそらくこの部で内耳側に折れ込んだ断端が元の位置にもどり肉芽性に閉鎖したものと推察される。図8は11日目例で手術顕微鏡下で閉鎖していると思われたが、断面所見では閉鎖は完全ではない。弾力線維の断端は巻き込んだようになっている。肉芽の増生は著明でない。

このように穿孔により線維が断裂したり、はぐれたりしても断端部は元の位置にもどる傾向を示していた。これは穿孔を中耳側から内耳側に向けておこしたため、内耳の液圧と正円窓膜の剛性によって穿孔の断端縁は元の位置にもどりやすかったためと思われる。一般の創傷治癒におけると同様、創面の密着が治癒過程において重要であるのは当然である。

按

がなされている¹⁾²⁾³⁾。服部ら⁴⁾によると粘膜層は鼓室粘膜の延長で1~2層の扁平あるいは低立方状の細胞からなり、その直下に基底膜があ

図 4 a. 穿孔後 4 日目. 穿孔は肉芽性に閉鎖していた. 左縁の亀裂は固定中に生じたアーチファクトである. b. その拡大図.

図 5 a. 穿孔後 7 日目. 穿孔は肉芽性に閉鎖していた. 辺縁部の亀裂はアーチファクトである. b. その拡大図

図6. a. 穿孔後10日目. 上方が中耳側. 穿孔部には弾力線維の断裂がみられる. また粘膜層側には著しい肉芽がみられ穿孔部をおおっている. ($\times 100$) b. その拡大図. ($\times 200$)

図7 穿孔後10日目. 上方が中耳側. 正円窓辺縁部に穿孔を生じた例. 写真の中央部に弾力線維の部分断がみられる. ($\times 100$)

図8 穿孔後11日目. 上方が中耳側. 穿孔の閉鎖は不完全であり, 破裂断端部の弾力線維は巻き込んでいる. ($\times 200$)

り固有層に移行する. 内層は鼓室階を被覆する細胞の連続で1~2層の扁平な細胞よりなり, 基底膜は認められず固有層との境界は明瞭でない. 固有層は主として線維性結合組織よりなる厚い層で, 線維芽細胞, 血管, 神経なども含んでいるという. この線維性結合組織は比較的規則正しく配列・走行しているといわれ, Link⁵⁾は1) Längsfaser 2) Anulus fibrosus externus 3) Anulus fibrosus internusの3種類に分類している. このうち Längsfaser は主線維とも呼ばれ⁶⁾, 線維性結合組織の大部分を占め, 楕円形を呈する正円窓膜の短軸と平行に走行する. この主線維はヒトでは太い膠原線維と弾力線維からなる. しかし, モルモットでは線維性結合組織の配列・走行はヒトと類似しているものの膠原線維の量はヒトに比べて極めて少なく弾力線維が豊富であるという⁴⁾.

このように正円窓は中間層として結合織を持

つ以外は4~5層の細胞からなり, 中央で10 μm , 辺縁部で70 μm と非常に薄い⁷⁾. 従って従来から中耳の炎症や局所使用薬剤の内耳への侵入経路としても注目されていた³⁾. さらに最近では内耳窓破裂症の存在が広く知られるようになり, 臨床面からも強く関心が持たれている.

ところで正円窓膜破裂の機転としては内耳側から力が作用する場合と中耳側から力が作用する場合とが考えられる. 正円窓を間にはさんで内耳と中耳に圧差が生じ, それが一定限度をこえれば破裂するのであるが, どれだけの圧差で破裂が生じるかという実験は少ない. Harker⁸⁾ はネコの脳脊髄圧を上げることによって正円窓に破裂をおこしている. それによると最低120 mmHg で破裂を生じる例もあったが非常に個体差が大きかったという.

正円窓の破裂と聴力との関係についてはすでに Simmons⁹⁾, Axelsson¹⁰⁾ の報告があ

る. Simmons らは CM を聴力回復の指標としてネコで実験をおこない, 破裂によって生じた聴覚障害は数日中に急激に回復し, 1~4 週間目にはほぼ正常 (6 dB 以内) にまで回復するという. さらに, 正円窓に穿孔をつくることによって前庭症状が生じたとしても手術の翌日には回復していることから, 外リンパ液の流出は 1 日で停止するのではないかと推察している. 一方, Axelsson らはモルモットを用いて実験をおこなっているが, 聴覚障害は全く生じないものから 40 dB の障害をおこすものまで個体差があったが聴覚障害と解剖学的変化とは必ずしも一致しなかったという. しかし 13 匹中 12 匹に正円窓穿孔の自然治癒がみられたのだから, 少なくともモルモットの正円窓は自然治癒傾向が強いといえる.

今回の我々の実験の目的の 1 つは, 穿孔を生じた正円窓膜はどの程度の期間で自然治癒するか, また穿孔部にどのような組織学的変化が生じるかを検討することにあった. その結果, 早い例では 3 日目に遅くとも 10 日目ごろには閉鎖し, やはりモルモットでは自然治癒傾向が強い

ことがうかがわれた. しかしヒトにおいては正円窓の構造が幾分異なることからこの動物実験の結果をそのままヒトに適応することはできないが, 多くの正円窓破裂の臨床例で安静が保たれていれば自然治癒がみられているのでやはりヒトにおいても自然治癒傾向は強いものと推察される.

また穿孔部の SEM, 及び弾力線維染色による観察から, 穿孔部の閉鎖は肉芽によってなされ, それは中耳側において著明であることが知られた. 従って肉芽の発生を抑制するステロイドなどは穿孔の閉鎖を遅延させる可能性があり, 临床上その使用には注意が必要であると考えられる.

本実験の結果から, 正円窓に穿孔が生じても比較的短期日の間に自然治癒しうることを示した. しかし実際には穿孔の成因, 部位, 大きさなどにより治癒期間は異なるはずであり, これらを考慮した検討が必要である. さらに穿孔による内耳の機能障害や解剖学的変化についても不明の点が多く今後の課題と考えている.

ま と め

モルモットの正円窓膜に実験的に穿孔をつくり, その治癒過程を走査電顕と光学顕微鏡にて観察した. その結果穿孔は早いものでは 3 日目に遅くとも 10 日目ごろまでには閉鎖することが分った. 走査電顕による観察から治癒した穿孔部は肉芽でおおわれているのが確認された. これは光顕標本においても確かめられた. また光顕標本を弾力線維染色することによりモルモットの固有層の結合組織線維の染色ができ, 穿孔部の断面構造の観察が容易になることを示した.

本論文の要旨は第 26 回および第 27 回内耳生化学研究会において発表した.

文

- 1) Kawabata, I. and Paparella, M.M.: Fine structure of the round window membrane, Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 80: 13~26, 1971.
- 2) 川端五十鈴, 石井英男: 正円窓膜の微細構造, 特に固有層について—透過および走査電子顕微鏡による観察—. 日耳鼻 75: 429~435, 1972.
- 3) 中井義明, 金子実: 正円窓膜—微細構造ならびに

献

- 透過性について—. 耳鼻臨床 68: 223~232, 1975.
- 4) 服部康夫, 弓削庫太: 鼓膜ならびに正円窓膜の電顕的研究—加齢による変化について—. 耳鼻 25: 1115~1138, 1979.
- 5) Link, R.: Beitrag zur Histologie der Membran des runden Fensters, Ztsch. Hals-Nasen-Ohrenarzt, Teil 1. 32: 295~307, 1941~

- 1942.
- 6) Harty, M. : The secondary tympanic membrane and annular ligament. *Ztsch. Mikr. Anat. Forsh.* 70 : 484~489, 1963.
- 7) Head, P.W. : Physiological considerations of pressure effects on the ear and sinuses in deep water diving. *Diseases of the Ear, Nose and Throat, Basic Science*, edited by J. Balantyne and J. Groves, Fourth Edition, 245~262, Butterworths Co., England, 1979.
- 8) Harker, L., Norante, J. and Rzu, J. : Experimental rupture of the round window membrane. *Trans Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol.* 78 : 448~452, 1974.
- 9) Simmons, F. B., Burton, R. D. and Beatty, D. : Round window injury : auditory, behavioral and electrophysiological consequences in the cat. *Trans Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol.* 66 : 715~722, 1962.
- 10) Axelsson, A. et al. : Experimentally induced round window membrane lesions. *Acta Otolaryngol. (Stockh)* 84 : 1~11, 1977.
- 原稿到着 : 昭和55年4月24日
別刷請求先 : 暁 清文
〒791-02 愛媛県温泉郡重信町大字志津川
愛媛大学医学部耳鼻咽喉科学教室