研 究

鼓膜穿孔の治癒過程に関する実験的研究

— 上皮層および中間層の役割 —

竹 山 豊

Role of Outer and Middle Layers in Healing Process
of Tympanic Membrane Perforations

Yutaka Takeyama

(Kinki University)

This study was designed to demonstrate how each layer of the guinea pig tympanic membrane responds during the healing of a perforation. Epidermal growth factor (EGF) and platelet-derived growth factor (PDGF) were employed to stimulate the healing process of the outer and middle layers, respectively.

The tympanic membrane was perforated by an electrical burn, and each growth factor was injected daily into the otic bulla through the external auditory meatus. The tympanic membrane perforations were examined with hematoxylin-eosin and immunohistochemically with bromodeoxyuridine. The maximal thickness of each layer at the margin of the perforation was measured light microscopically and the labeling index of bromodeoxyuridine was calculated.

Tympanic membrane perforations closed more rapidly in the PDGF-treated than in the EGF-treated ears. Significant proliferation of the epithelial layer was obtained with both treatments. However, proliferation of the middle layer was greater in the PDGF-treated than the EGF-treated ears. These results suggest that proliferation of the middle layer stimulates the epithelial layer and that proliferation of the epithelial layer directly quickens the closure of perforation of the tympanic membrane.

Key words : tympanic membrane perforation, healing process, epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF), bromodeoxyuridine (BrdU)

緒 言

鼓膜穿孔は、急性中耳炎、慢性中耳炎、鼓膜外傷などの耳鼻咽喉科疾患においてしばしば遭遇するものである。穿孔が早期に治癒する場合もあれば、遷延する場合もあり時に観血的治療を要することもしばしば経験される。人においては治癒過程における組織学的検討が困難で、もっぱら臨床的観察の報告が多い。実験的鼓膜穿孔の治

癒過程の検討は Taylor ら¹⁾の報告以来多くの組織学的検討^{2)~23)}がある。通常の創傷治癒過程と異なる点は、鼓膜が空中にある臓器という特殊性、すなわち下床がない空間を充填しなければならない点である。そのため鼓膜穿孔の治癒過程については未だ解明されていないことが多く、治療への応用の面からも基礎的研究が急がれている。

このような事情を踏まえて、近年創傷治癒過程に影響を及ぼす細胞成長因子を鼓膜穿孔に作用させた報告^{21)~23)}が散見され、鼓膜の上皮層、中間層の役割も検討されつつある。老木²¹⁾は実験的鼓膜穿孔に上皮成長因子を作用させ、上皮層の増殖促進により穿孔治癒が促進したとしている²¹⁾。

本研究では、実験的に作成した鼓膜穿孔に上皮成長因子(EGF)、血小板由来成長因子(PDGF)を作用させ、鼓膜の上皮層、中間層の創傷治癒過程を刺激して穿孔治癒過程における各層の役割を組織学的に検討した。鼓膜各層の役割がはっきりすれば、鼓膜穿孔の閉鎖を促進する有効な手立てが議論でき臨床応用にも結びつくからである。

実験材料および実験方法

1. 実験動物

ハートレー系モルモット(日本エスエルシー)、雄57匹を使用した。この際モルモットは、温度 $23\pm1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\pm10\%$ 、12時間照明に制御された部屋で飼育した。飼料は、固形飼料(実験動物用固形飼料 RC4, オリエンタル酵母工業)を用い、水道水を自由摂取させた。

1週間飼育した後、手術用顕微鏡で観察し鼓膜所見に異常がないことを確認した。プライエル反射正常で体重 $350\sim400\text{ g}$ のモルモット、114耳を実験に供した。

2. 鼓膜穿孔の作製

pentobarbital sodium (ネンブタール®: ダイナボット) 30 mg/kg で除痛後、外耳道および皮膚を povidon iode (イソジン®: 明治製菓) で消毒、剃毛した。

手術用顕微鏡下に十分に視野を確保した後、老木²¹⁾の考案した穿孔作製装置で、鼓膜緊張部後上象限を焼灼して、一定の大きさ、形状の穿孔を作製した(図1)。

穿孔作製後に、感染予防のために 0.1% oxytetracycline hydrochloride (テラマイシン®: ファイザー)水溶液を経口投与した。

3. 穿孔径の観察

diethyl ether (ジエチルエーテル: 和光純薬工業)麻酔下に、接眼レンズにスケールを設置した手術用顕微鏡で、穿孔径の変化を観察した。槌骨柄に垂直の最大の径を横径、平行の最大の径を縦径として計測し、穿孔の治癒過程を観察した。その際下記に記す成長因子を23 G カテラン針つき1 ml 注射筒で局所に投与した。

4. 細胞成長因子

epidermal growth factor (EGF: 和光純薬工業 No. 057-04111) および platelet-derived growth factor (PDGF: R & D Systems, Inc. No. 2041-20) を 1% の penicillin-streptomycin-fungizone® mixture (Whittaker M. A. Bioproducts, Inc.) を含む生理食塩水で EGF $50\text{ }\mu\text{g/ml}$, PDGF 500 ng/ml の濃度の溶解液を作製した。

5. 細胞成長因子の投与

モルモットを自然治癒群(対照群)、EGF 投与群および PDGF 投与群に分け、対照群は生理食塩水を、細胞成長因子投与群は穿孔径の観察時に経外耳道的に穿孔を通して中耳骨包を満たし、また鼓膜表層が十分に浸るように23 G カテラン針つき1 ml 注射筒を用いて 0.2 ml 投与した。

6. 連続切片の作成

穿孔作製後、偶数日に5-Bromo-2'-Deoxyuridine (BrdU: SIGMA SIG-B5002-1) 20 mg/kg を静脈投与して2時間の後に、ネンブタール 50 mg/kg の麻酔下に断頭し、中耳骨包をとりだした。中耳骨包は 95% アルコール固定しプラנקリュクロ液にて脱灰した。アルコール系列で脱水しパラフィン包埋した。 $4\text{ }\mu\text{m}$ の厚さで槌骨柄に垂直に穿孔部の連続切片を作製した。

7. 組織学、免疫組織化学的観察

前項6. で作成した連続切片を、ヘマトキシリン・エ

図1 モルモット右鼓膜の後上象限に作成した穿孔のシェーマ

- ①縦径: 槌骨柄に平行の径
- ②横径: 槌骨柄に垂直の径

オジン (HE) 染色および ABC 法による抗 BrdU モノクローナル抗体を用いて免疫組織化学染色をした。

上記で作成した 4 μ m パラフィン包埋切片をキシレンで脱パラフィン後、0.3% H_2O_2 加メタノールで内因性ペルオキシダーゼを除去した(20分)後、親水化させ 2N 塩酸で DNA を 1 本鎖化した(30分)。非特異反応の阻止に 10% 正常ウマ血清で被覆した(30分)後、1 次抗体に抗 BrdU モノクローナル抗体 (Anti-BrdU Monoclonal Antibody: Becton Dickinson Immunocytometry Systems BDF-MA7580) を反応させ(2時間)、2 次抗体にビオチン化抗体マウス IgG 抗体 (Biotinylated Anti-Mouse IgG: Vector Laboratories BA-2000) (ウマ) を結合させ(30分)、アビジン-ビオチン複合体 (Avidin and Biotinylated Horseradish Peroxidase: DAKO K355) を反応させた(1時間)。発色には 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB: 和光純薬工業 No. 343-00901) を用い、ヘマトキシリンで核染色をおこなった。

8. 細胞増殖能 Labeling Index の検討

光学顕微鏡を用いて鼓膜穿孔辺縁部の上皮層、中間層を HE 染色標本で確認(図 2-A)し、これと対比しながら免疫組織化学染色標本での上皮層、中間層を識別した。これに基づいて各層での全細胞に対する BrdU 陽性細胞の比率(%)を求めた(図 2-B)。上皮層は最先端部の細胞が集積している領域 I と 2~3 層に肥厚している領域 II に分けた。

図 2 自然治癒 8 日目の HE, 抗 BrdU 抗体による免疫染色

上皮層、中間層の肥厚が HE 染色標本でわかる。

上皮層は最先端部の細胞が集積している領域 I と 2~3 層に肥厚している領域 II に分けた。

領域 I は穿孔縁最先端部における上皮層の肥厚、領域 II は 2~3 層の上皮層の変化と中間層の肥厚で、領域 I には BrdU 陽性細胞はみられないが領域 II には上皮層、中間層ともに BrdU 陽性細胞をみる。

★は BrdU 陽性細胞を示す。

域 II に分けた。中間層は上皮層で分けた領域 I, II に一致する領域での比率を求めた。

結 果

1. 作成された鼓膜穿孔の大きさ

モルモット 57 匹の鼓膜に図 1 に示す様に作成した穿孔について上下、前後方向の直径を測定した。それぞれ槌骨柄に平行の径を縦径、垂直の径を横径とした。その結果、縦径は 1.54 ± 0.16 mm, 横径は 1.30 ± 0.21 mm の穿孔が作られた。

2. 各群の治癒過程について

2-1 平均閉鎖日数:

図 3, 4, 5 に鼓膜穿孔の縦径、横径の経日変化を示す。閉鎖終了に要した日数をみると対照になる自然治癒群は 10.4 ± 1.5 日 ($n=9$), EGF 投与群は 8.0 ± 1.2 日 ($n=8$), PDGF 投与群は 6.2 ± 0.8 日 ($n=9$) であった。いずれも対照群に比べて有意に閉鎖日数が短縮していた (t 検定, $p < 0.05$)。

2-2 上皮層、中間層の厚さ:

図 6, 7 にそれぞれ上皮層および中間層の厚さを老木²¹⁾に準じて測定した結果を示す。

対照群については穿孔作成後 2 日目までは HE 染色による観察で中間層の変化はほとんどないが、辺縁部に上皮層の細胞集積がみられた。4 および 6 日目には中間層の肥厚が加わるが、上皮層の厚さの変化は 4 日目と 6 日目ではほとんど差がなかった。EGF 投与群については

図 3 自然治癒群での鼓膜穿孔の縦径、横径の変化
平均閉鎖日数は 10.4 ± 1.5 日を要した。

2日目には上皮層の細胞集積がみられたが中間層の肥厚はさほどみられなかった。対照群に比べ4日目, 6日目も上皮層が肥厚していた。中間層は対照群に比べ類似の変化を示した。PDGF投与群については2日目より上皮層と中間層の肥厚がみられ4日目には血管様の管腔もみられた。6日目には上皮層は目立った肥厚を示さないが中間層はさらに著しく肥厚した。

対照群に比べEGF投与群は上皮層の肥厚が著しく,

図4 EGF投与群での鼓膜穿孔の縦径, 横径の変化

平均閉鎖日数は 8.0 ± 1.2 日で自然治癒群に比べ有意に短縮した。

図5 PDGF投与群での鼓膜穿孔の縦径, 横径の変化

平均閉鎖日数は 6.2 ± 0.8 日で自然治癒群に比べ有意に短縮した。

PDGF投与群では上皮層もやや肥厚するが中間層が著しく肥厚する様子がわかる。

3. BrdU 陽性細胞

穿孔のない正常鼓膜では中間層に陽性細胞をみなかった。上皮層において1, 2個の陽性細胞がみられた(図8-A, B)。

鼓膜穿孔を作成し自然経過を観察した対照群では, 治癒過程2日目に上皮層の辺縁部領域Ⅰに細胞集積がみられたがこの部位には陽性細胞はみられず, 辺縁よりやや離れた領域Ⅱに陽性細胞がみられた(図9-1 A, B)。4日目にはさらに細胞集積はみられるがやはり領域Ⅰでは陽性細胞がみられずやや離れた領域Ⅱに陽性細胞がみられた(図9-2 A, B)。6日目には上皮の細胞が最先端部

図6 上皮層における最大の厚さの変化

図7 中間層における最大の厚さの変化

を覆うように集積してくるが、やはり陽性細胞はやや離れた領域Ⅱに存在する(図9-3 A, B)．8日目には、上皮層はさらに先端部を覆うように集積してくる(図9-4

図8 正常鼓膜緊張部(×33)
(A : HE 染色 B : 抗 BrdU 抗体による免疫染色)

A, B)．一方、中間層では2日目では陽性細胞はほとんどみられない．4日目に中間層が肥厚してくる時期に一致して陽性細胞がみられるようになってくるが、上皮層と違い穿孔縁の肥厚した領域Ⅱに均一に陽性細胞がみられた．

EGF 投与群では、対照群に比較して上皮層の肥厚が著しく、陽性細胞も上皮層に多くみられる(図10-1 A, B, 図10-2 A, B, 図10-3 A, B, 図10-4 A, B)．PDGF 投与群では、中間層の肥厚が著しく、陽性細胞も中間層に多くみられる(図11-1 A, B, 図11-2 A, B, 図11-3 A, B)．

BrdU 陽性細胞が全細胞数に占める割合、すなわち Labeling Index を求めてみると上皮層で領域Ⅰでは各群とも陽性細胞がなかったので領域Ⅱでの値を図12に、領域Ⅱでの中間層の値を図13に示した．対照群の上皮層では2日目にやや高い傾向を示すが、4日目以降はほぼ同

図9-1 2日目

図9-3 6日目

図9-2 4日目

図9-4 8日目

図9 自然治癒群の穿孔縁(×33)
(A : HE 染色 B : 抗 BrdU 抗体による免疫染色)

じような値で経過する。一方、中間層は治癒過程が進むとともに割合が高くなっている。EGF 投与群では、上皮層において対照群に比べ陽性細胞が多い傾向にあったが、中間層では、むしろやや少なくなっていた。上皮層では経日的に減じて中間層では増加している。PDGF 投与群では上皮層の陽性率は、対照群と同じように経過し、中間層では治癒過程初期より高い値を示していることがわかった。

考 察

鼓膜は生体の中で特異な組織である。それは外気中に存在しこれを2つに分ける約0.1 mmの薄い膜であり音刺激で振動するからである。解剖学的に外耳、中耳に境して存在し、外耳道側の上皮層、中耳側の粘膜層とこれらの間に存在する固有層すなわち中間層の3者より成っている。鼓膜の創傷治癒が他の組織の創傷治癒と大きく異なる点は、他の組織であれば欠損部位をまず肉芽が充

図10-1 2日目

図10-2 4日目

図10-3 6日目

図10-4 8日目

図10 EGF 投与群の穿孔縁(×33)

(A : HE 染色 B : 抗 BrdU 抗体による免疫染色)

填しその上を上皮が再生するが、鼓膜は下床のない空間を埋めなければならない点である。その意味で鼓膜穿孔の修復過程は身体他の部位の創傷治癒過程と異なると

考えられ、しかも聴力の点で大切な組織ゆえに多くの先人の研究対象となってきた。

鼓膜穿孔の治癒に関する組織学的研究は、1965年に

図11-1 2日目

図11-2 4日目

図11-3 6日目

図11 PDGF 投与群の穿孔縁(×33)
(A : HE 染色 B : 抗 BrdU 抗体による免疫染色)

図12 上皮層の Labeling Index

図13 中間層の Labeling Index

Taylor ら¹⁾が鼓膜穿孔の組織学的変化を報告して以来多くの報告^{1)~23)}がなされている。穿孔治癒過程における穿孔縁での修復像について提唱されている説は大きく2つに分けられる。すなわち、まず上皮層の扁平上皮過形成が穿孔を橋渡しして閉鎖するという説⁶⁾⁸⁾⁹⁾¹¹⁾¹³⁾¹⁵⁾と、中間層の肉芽により穿孔閉鎖がなされその上を上皮が移動するという説^{1)~3)}である。上皮層がまず穿孔を閉鎖するという説を支持するものが多い。

上皮層が第一義とする考えに従い、上皮層の役割について検討した老木²¹⁾の報告においても結論が得られていない。彼の結果は上皮層の肥厚が目立ち、EGFによる上皮層刺激によって上皮層の肥厚が増し閉鎖も早くなったという報告にとどまっている²¹⁾。

しかし上皮層、中間層のいずれが閉鎖修復により重要な役割を果たすのか、両者の関係はどうなっているのかについては未だ明確ではない。

1. 今回の実験の目的

1-1 上皮層、中間層刺激時の変化：

老木²¹⁾はEGF投与により上皮層の肥厚が増し、穿孔閉鎖を促進すると報告した²¹⁾。しかし、中間層を肥厚させた場合の検討はなされていない。PDGFは、中胚葉由来の細胞を増殖刺激し^{24)~26)}、また創傷治癒を促進するという報告がある^{27)~31)}。これらの報告から鼓膜中間層の増殖を促進することが予想されたので、この細胞成長因子を作用させた。もし中間層の変化がみられるならば、EGFと比較検討することにより鼓膜穿孔治癒過程における上皮層、中間層が果たす役割の解明の一助になるのではないかと考えた。

1-2 細胞増殖能の検討：

鼓膜穿孔治癒過程を検討するのに上皮層、中間層の厚さの検討のみでは、肥厚が結果なのか実際増殖能が高いのかわからない。この点を考慮して細胞増殖能をみて実際に回復機能が高いのかも検討した。

Thymidineの誘導体であるBromodeoxyuridine (BrdU)はDNAの合成期(S期)の細胞核に取り込まれる。GratznerがBrdUのモノクローナル抗体を作成し、増殖期にある細胞を免疫組織学的に検出する方法を報告³²⁾して以来、免疫組織化学的にも細胞増殖の動態を把握することが可能になった。この成果を利用して、BrdUでDNAの合成期にある細胞つまり増殖期にある細胞を検出し、上皮層および中間層における細胞増殖能の指標とした。

2. 結果の考察

2-1 穿孔閉鎖日数と上皮層、中間層の肥厚について：

対照群と比べ、EGF投与群、PDGF投与群はいずれも閉鎖日数が短縮していた(図3~5)が、両群ともに上皮層が対照群に比べより肥厚していた(図6)。前項において述べたように上皮層の扁平上皮がまず穿孔を閉鎖するという説と一致する。しかし、穿孔閉鎖日数をみると中間層刺激のPDGF投与群の方が上皮層刺激のEGF投与群より早く治癒している。EGF投与群もPDGF投与群もコントロール群より閉鎖日数が短い。つまり両群ともに閉鎖を促進していることがわかる。しかも、中間層刺激の方が早く閉鎖する。注目すべきはPDGF投与群はEGF投与群では見られなかった中間層肥厚が著明で、しかも上皮層も肥厚した点である。この結果のみでは上皮層、中間層の働きのいずれが中心か、互いに関連があるのかないのかなどについてはわからない。上皮層肥厚は中間層刺激の結果かもしれないと考えられるからである。この確認のためには上皮層、中間層の増殖能をみるが必要となった。

実際次項に示すごとく、増殖能が中間層では著明だが上皮層では高くないことがわかった。つまり、中間層の増殖が高く上皮層もその結果肥厚したと考える根拠があることが確認された。

2-2 細胞増殖能の検討について：

上皮層において穿孔縁のやや後退した部位(領域Ⅱ)でBrdU陽性細胞がみられ、穿孔縁最先端部(領域Ⅰ)にはBrdUでラベルされた細胞がみられなかった。このことは上皮層において穿孔縁最先端部(領域Ⅰ)で細胞分裂が起こっているのではなく、先端部よりやや離れた部位(領域Ⅱ)に分裂の場があることを示している。つまり上皮細胞は穿孔縁からやや離れた部位(領域Ⅱ)で分裂、増殖が起こり細胞が穿孔縁最先端部(領域Ⅰ)に押し出されて集積したものとする。Labeling Indexを経日的に見れば2日目以後徐々に低下してくる。これを上皮層の肥厚と見比べると一見矛盾するようにも見えるが、図6での計測は上皮層の最大の厚さを測ったものであるのだから、かえれば穿孔縁最先端部に押し出されて集積した上皮細胞をはかったものである。このように穿孔縁の上皮層が経日的に肥厚してくることを説明できる。

中間層ではBrdU陽性細胞の局在は見られなかった。すなわち肥厚した部位と細胞分裂の場が一致していた。

また、Labeling Index が経日的に高くなるにしたがい中間層の肥厚が見られた。このことから中間層では穿孔縁に向かう細胞の移動が上皮層に比べ少ないと考える。

EGF 投与群においては対照群と比べて上皮層では増殖能が亢進し(図12)中間層ではやや抑制された結果となった(図13)。PDGF 投与群では上皮層の増殖能は対照群とはかわりない(図12)が中間層では著しく亢進した結果となった(図13)。すなわち、上皮層の修復が亢進した場合には穿孔治癒が促進する。しかも、中間層の修復が亢進した場合にはより早く穿孔治癒が促進したことになる。中間層では細胞の移動が上皮層に比べ少ないことと中間層が鼓膜の支持組織であることを参照すると中間層の増殖が鼓膜穿孔閉鎖には重要ではないかと考える。

2-3 閉鎖日数、上皮・中間層肥厚および細胞増殖能の関係:

中間層刺激で中間層増殖能は経日的に著明な増加を続け、中間層も著しく肥厚し上皮層もこれに伴って肥厚する。しかし上皮層の刺激では上皮層の増殖能は当初は増加するが経日的に低下していく。言い換えると、肥厚は大きいが増殖能は経日的に低下して、回復能は低くなっていると考えられる。

つまり中間層刺激の方が細胞増殖能の増加傾向が大きく、結果としての上皮層、中間層肥厚が起こり、閉鎖日数も短くなっていると説明できる。

これは中間層刺激の方が治療薬として使えることを示している。

2-4 臨床的側面:

外傷性鼓膜穿孔において問題となるのは、鼓膜穿孔の遷延化がしばしば日常の臨床で経験されることである。一般に穿孔遺残の要因としては火傷などの特殊な外傷、遷延する感染、全身的因子などがあげられる^{33)~35)}。これらの報告では臨床的観察が主で基礎的検討はきわめて少ない。今回の研究はこの点で意義があると考ええる。

次に問題となるのは、鼓膜穿孔閉鎖後の状態に鼓膜の菲薄化がみられ、この菲薄化には中間層が関与していることである³⁶⁾³⁷⁾。治療に難渋する癒着性中耳炎では、中間層の欠如が関与している³⁸⁾。すなわち鼓膜緊張部のコラーゲン線維の破壊がみられ、中間層のこの組織の破壊が正常の生理的機能をもった鼓膜から、可動性に富んだ鼓膜になる。また数ミリメートル水柱の圧で簡単にポケットを生じることになる³⁷⁾³⁸⁾。中間層が十分に修復されれば菲薄化した鼓膜はできないはずであり、PDGF の

局所使用の安全性が確かめられれば癒着性中耳炎の治療に応用できる可能性がある。

上皮層、中間層増殖に及ぼす PDGF、EGF の影響を臨床的側面からさらに考察してみる。PDGF は軟部組織に対する遊走能、分裂能を活性化する事が知られている^{24)~26)}。また動物実験においても創傷治癒を促進することが報告されており^{27)~31)}、これらのことをふまえて近年 PDGF の臨床応用がはじめられた。すなわち褥創に対して PDGF-BB を局所投与して治癒を促進した報告があり³⁹⁾、耳鼻咽喉科領域においても臨床応用の可能性が大いに期待できるものである。実験的鼓膜穿孔にステロイドを局所投与した際に穿孔閉鎖が遷延化した。理由の1つとして、結合組織の重要な構成成分の1つであるヒアルロン酸の合成を抑えている可能性があるという報告がある⁴⁰⁾。PDGF はヒアルロン酸の合成を促進する²⁹⁾ことが知られており穿孔治癒において細胞外マトリクスを介して働くことも考えられる。このような機序を考察すれば鼓膜中間層の著明な増殖と鼓膜穿孔閉鎖促進の成績を理解できる。

鼓膜に EGF を作用させると、先に老木²¹⁾が報告した結果と同様になった。すなわち、中間層ではやや抑制されていた。鼓膜以外の臓器の報告^{41)~45)}では結合組織の増生もみられたとある⁴¹⁾⁴³⁾⁴⁵⁾ことと異なっている。EGF は上皮系細胞にとどまらず、各種培養細胞に対して増殖作用を示す^{46)~48)}。しかし多くの場合、EGF 単独の作用はわずかでありインスリン、IGF-I、レチノール酸、アスコルビン酸などは相乗的にその作用を増強するといわれている^{46)~48)}。EGF とリセプターの結合は他の成長因子 PDGF、fibroblast growth factor (FGF) の前処理により一時的に抑制される⁴⁶⁾。鼓膜の中間層にはこのような成長因子が存在すると考えられる。これらのようなことから EGF は鼓膜においては上皮細胞のみ促進するのかもしれない。

最近、EGF とそのリセプターとの関係が中耳真珠腫において検討されている。中耳真珠腫は、慢性中耳炎の一病態であるが、著しい骨破壊と壊死組織片を伴った上皮の異常増殖がその特徴である。その異常増殖の手がかりに EGF とそのリセプターとの関係が示唆されている^{49)~51)}。たとえば最近、EGF リセプターが中耳真珠腫において正常皮膚よりも強くみられるとした報告、真珠腫上皮のほぼ全層にみられたという報告がある⁵¹⁾。この事実から EGF を鼓膜穿孔の局所へ作用させると新た

な疾病の発生にも結びつきかねない危惧があり、臨床応用は難しい。

以上のような事実を参照すると、鼓膜穿孔の閉鎖に中間層増殖を刺激することが有効な手段となりうると考えられ臨床的応用の可能性も高いと考える。

結 論

モルモット鼓膜に一定の大きさや形状の穿孔を作成し、以下のような結論を得た。

1) 電気焼灼により一定の大きさ、形状の鼓膜穿孔を作成できる。

2) 鼓膜穿孔閉鎖に要した日数は、自然治癒群は 10.4 ± 1.5 日、EGF 投与群は 8.0 ± 1.2 日、PDGF 投与群は 6.2 ± 0.8 日であった。EGF 投与群、PDGF 投与群はいずれも対照群に比べて有意に閉鎖日数が短縮した(t 検定, $p < 0.05$)。

3) 自然治癒群に比べ EGF 投与群は上皮層の肥厚が著しく、PDGF 投与群では上皮層も肥厚するが中間層が著しく肥厚する。

4) BrdU 陽性細胞が各層での全細胞数に占める割合、すなわち Labeling Index を求めてみると穿孔縁最先端の上皮細胞が集積している領域 I では各群とも陽性細胞がなかった。上皮が2~3層に肥厚している領域 II での対照群の上皮層では2日目にやや高い傾向を示すが、4日目以降はほぼ同じような値で経過する。一方、中間層は治癒過程が進むとともに割合が高くなっている。

5) EGF 投与群では、上皮層において対照群に比べ陽性細胞が多い傾向にあったが、中間層では、むしろやや少なくなっていた。上皮層では経目的に減じて中間層では増加している。

6) PDGF 投与群では上皮層の陽性率は、対照群と同じように経過し、中間層では治癒過程初期より高い値を示していることがわかった。

7) 中間層刺激因子は細胞増殖能の増加傾向が大きく、その結果中間層、上皮層肥厚が起こり、閉鎖日数も短くなったと考察した。

謝 辞

稿を終えるに当たり、御指導、御校閲を賜りました近畿大学医学部耳鼻咽喉科学教室村田清高教授に深謝いたします。また御助言を賜りました近畿大学第1生化学教室西田升三博士、耳鼻咽喉科学教室老木浩之博士、楠 威志博士、中野貴之博士を

はじめ教室員各位に心から感謝いたします。

本論文の一部は、第38回日本基礎耳科学会(平成3年2月、仙台)、7th Asia Oceania Congress of Otorhinolaryngeal Society(平成3年12月、香港)、日本耳鼻咽喉科学会大阪地方連合会第245回例会(平成5年6月、大阪)において発表した。

参考文献

- 1) Taylor M and McMinn RMH : Healing of experimental perforations of the tympanic membrane. *J Laryngol Otol* **79** : 148~158, 1965.
- 2) McMinn RMH and Taylor M : The cytology of repair in experimental perforations of the tympanic membrane. *Br J Surg* **53** : 222~232, 1966.
- 3) Taylor M and McMinn RMH : Cytology of repair in experimental perforations the tympanic membrane and its relationship to chronic perforations in man. *Tr Am Acad Ophthal Otol* **71** : 802~812, 1967.
- 4) Rogers KAJr and Snow JBJr : Closure of experimental tympanic membrane perforations. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **77** : 66~71, 1968.
- 5) 稲川敏文 : 鼓膜穿孔に関する臨床的ならびに実験的研究. *日耳鼻* **72** : 687~718, 1969.
- 6) McIntire C and Benitez JT : Spontaneous repair of the tympanic membrane ; histopathological studies in the cat. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **79** : 1129~1131, 1970.
- 7) Hildmann H and Steinbach E : Experimental studies on closing of artificial eardrum perforations in rabbits. *J Laryngol Otol* **85** : 1173~1176, 1971.
- 8) Reijnen CJH and Kuijpers W : The Healing pattern of the drum membrane. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* **287** : 1~74, 1971.
- 9) Clowson JP and Litton WB : The healing process of tympanic membrane perforations. *Tr Am Acad Ophthal Otol* **75** : 1302~1312, 1971.
- 10) McMinn RMH : Electron microscopic observations on the repair of perforated tympanic membranes in the guinea pig. *J Anat* **120** : 207~217, 1975.
- 11) Reeve DRE : Repair of large experimental perforations of tympanic membrane. *J Laryngol Otol* **91** : 767~778, 1977.
- 12) Boedts D and Ars B : Histopathological research on eardrum perforations. *Arch Otorhinolaryngol* **215** : 55~59, 1977.
- 13) Boedts D : The tympanic epithelium in normal and pathological conditions. *Acta Otorhinolaryngol Belg* **32** : 296~419, 1978.
- 14) Fry TL, Chen B, Fischer ND, et al : Evaluation of otic drops on infection and healing of traumatic tympanic mem-

- brane perforations. *Laryngoscope* **89** : 818~821, 1979.
- 15) Stenfors LE, Calsöö B, Salén B, et al : Repair of experimental tympanic membrane perforations. *Acta Otolaryngol (Stockh)* **90** : 332~341, 1980.
  - 16) Söderberg O, Hellström S and Stenfors LE : The healing pattern of experimental heat myringotomy. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)* **106** : 81~85, 1985.
  - 17) Stenfors LE, Bergherm L, Bloom GD, et al : Exogeneous hyaluronic acid (Healon®) accelerates the healing of experimental myringotomies. *Auris Nasus Larynx* **12** : Suppl 1 : 214~215, 1985.
  - 18) 朴 茂男 : 実験的鼓膜切開創の修復に関する電子顕微鏡的観察. *日耳鼻* **89** : 843~853, 1986.
  - 19) Hellström S and Laurent C : Hyaluronan and healing of tympanic membrane perforations; an experimental study. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* **442** : 54~61, 1987.
  - 20) Laurent C, Hellström S and Fellenius E : Hyaluronan improves the healing of experimental tympanic membrane perforations. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **114** : 1435~1441, 1988.
  - 21) 老木浩之 : モルモット鼓膜穿孔の治癒過程における細胞成長因子の影響. *近畿大医誌* **14** : 485~499, 1989.
  - 22) O'Daniel TG, Petijean M, Jones SC, et al : Epidermal growth factor binding and action on tympanic membrane. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **99** : 80~84, 1990.
  - 23) Mondian M, Saffiendine S and Uziel A : Fibroblast growth factor improves the healing of experimental tympanic membrane perforations. *Acta Otolaryngol (Stockh)* **111** : 337~341, 1991.
  - 24) Grotendorst GR, Seppä HEJ, Kleinman HR, et al : Attachment of Smooth muscle cells to collagen and their migration toward platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **78** : 3669~3672, 1981.
  - 25) Deuel TF, Senior RM, Griffin GI, et al : Chemotaxis of monocytes and neutrophils to platelet-derived growth factor. *J Clin Invest* **69** : 1046~1049, 1982.
  - 26) Seppä H, Grotendorst G, Martin GR, et al : Platelet-derived growth factor is chemotactic for fibroblasts. *J Cell Biol* **92** : 584~588, 1982.
  - 27) Pierce GF, Mustoe TA, Senior RM, et al : In vivo incisional wound healing augmented by platelet-derived growth factor and recombinant c-sis gene homodimeric proteins. *J Exp Med* **167** : 974~987, 1988.
  - 28) Pierce GF, Mustoe TA, Lingelbach J, et al : Platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β enhance tissue repair activities by unique mechanisms. *J Cell Biol* **109** : 429~440, 1989.
  - 29) Mustoe TA, Purdy J, Pierce GF, et al : Reversal of im-
  - paired wound healing in irradiated rats by platelet-derived growth factor-BB. *Am J Surg* **158** : 345~350, 1989.
  - 30) Pierce GF, VandeBerg J, Mustoe TA, et al : Platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor-beta 1 selectively modulate glycosaminoglycans, collagen, and myofibroblasts in excisional wounds. *Am J Pathol* **138** : 629~646, 1991.
  - 31) Lynch SE, Colvin RB and Antoniades HN : Growth factors in wound healing. *J Clin Invest* **84** : 640~646, 1989.
  - 32) Gratzner HG : Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine; a new reagent for detection of DNA replication. *Science* **218** : 474~476, 1982.
  - 33) 山本令子, 高山幹子, 石井哲男 : 外傷性鼓膜穿孔. *JOHNS* **3** : 679~684, 1987.
  - 34) 小野寿之, 村上匡孝, 内田真哉 : 外傷性鼓膜穿孔. *JOHNS* **8** : 925~930, 1992.
  - 35) 南谷肇子, 村田清高, 太田文彦, 他 : 外傷性鼓膜穿孔症例の統計的観察. *耳鼻臨床* 補45 : 48~53, 1991.
  - 36) Govaerts PJ, Jacob WA and Marquet J : Histological study of the thin replacement membrane of human tympanic membrane perforations. *Acta Otolaryngol (Stockh)* **105** : 297~302, 1988.
  - 37) Luntz M and Sadé J : Daily fluctuations of middle ear pressure in atelectatic ears. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **99** : 201~204, 1990.
  - 38) Sadé J : Atelectatic tympanic membrane; histologic study. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **102** : 712~716, 1993.
  - 39) Robson MC, Phillips LG, Pierce GF, et al : Platelet-derived growth factor BB for the treatment of chronic pressure ulcers. *Lancet* **339** : 23~25, 1992.
  - 40) Spandow O and Hellström S : Animal model for persistent tympanic membrane perforations. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **102** : 467~472, 1993.
  - 41) Franklin JD and Lynch JB : Effects of topical applications of epidermal growth factor on wound healing. *Plast Reconstr Surg* **64** : 766~770, 1979.
  - 42) Niall M, Ryan GB and O'Brien BM : The effect of epidermal growth factor on wound healing in mice. *J Surg Res* **33** : 164~169, 1982.
  - 43) Buckley A, Davidson JM, Woodward SC, et al : Sustained release of epidermal growth factor accelerates wound repair. *Proc Natl Acad Sci USA* **82** : 7340~7344, 1985.
  - 44) Laato M, Niinikoski J, Lebel L, et al : Stimulation of wound healing by epidermal growth factor. *Ann Surg* **203** : 379~381, 1986.
  - 45) Buckley A, Davidson JM, Woodward SC, et al : Epidermal growth factor increases granulation tissue formation dose dependently. *J Surg Res* **43** : 322~328, 1987.

- 46) 今井康夫 : Epidermal Growth Factor. 細胞成長因子 (日本組織培養学会編). 20~30頁, 朝倉書店, 東京, 1984.
- 47) 今井康夫 : Epidermal Growth Factor. 細胞成長因子 part II (日本組織培養学会編). 10~15頁. 朝倉書店, 東京, 1987.
- 48) 對馬敏夫 : 成長因子. ホルモンと臨床 33 : 1105~1111, 1985.
- 49) 後藤友佳子 : 上皮成長因子 (epidermal growth factor : EGF) と真珠腫組織 —第一報 ; 活動型真珠腫と非活動型真珠腫における EGF の局在の比較—. 日耳鼻 93 : 1186~1191, 1990.
- 50) 後藤友佳子 : 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 の局在一—. 日耳鼻 93 : 1192~1199, 1990.
- 51) Bujia J, Holly A, Schultz P, et al : Aberrant expression of epidermal growth factor receptor in aural cholesteatoma. Laryngoscope 103 : 326~329, 1993.

(原稿受付 : 平成 6 年 9 月 2 日
原稿採択 : 平成 6 年 9 月 28 日 急載
別刷請求先 : 竹山 豊
〒589 大阪狭山市大野東377-2
近畿大学医学部耳鼻咽喉科学教室)