研 究

ツチ骨に接する実験的鼓膜穿孔の治癒過程

— 穿孔部位の違いによる治癒過程 —

小 林 正 明

Healing Process of Tympanic Membrane Perforations Adjacent to the Auditory Ossicles in Animal Models

Masaaki Kobayashi

(Kinki University)

We studied the healing process of tympanic membrane perforations in the external auditory canal in guinea pigs. The perforations were made apart from or adjacent to the malleus. The time for the closure of the tympanic membrane perforations was longest in perforations adjacent to the malleus, and in those cases the perforated part of the tympanic membrane regenerated and thickened around the malleus in the healing process. Moreover, immunohistological staining, using anti-BrdU antibody, revealed few stained cells in the intermediate layer except at the tip of the malleus. We consider that these findings were related to the delayed closure of the perforation.

Histological study of the regenerated tympanic membrane revealed that after closure of the perforation, a thinning of the epithelial layer was first observed, but cells in the layer later increased.

Key words : healing process, tympanic membrane perforations, auditory ossicles

はじめに

鼓膜穿孔は、急性中耳炎や慢性中耳炎およびさまざまな原因による外傷などにより生ずる。保存的な処置で早期に治癒する場合もあるが、穿孔が遷延化し手術的療法を選択せざるを得ないことがあり、治療に難渋することとなる。しかし、鼓膜穿孔の治癒過程を詳細に調べた基礎的な研究は多くはない。しかも、ヒトの鼓膜を対象とし鼓膜穿孔の治癒過程を組織学的に詳細に検討したものはきわめて少ない。基礎的な研究は困難な場合が多く、せいぜい臨床的な観察^{1)~2)}のみにとどまっている。鼓膜穿孔がどのような治癒過程をたどるかは、動物を使って実験的な鼓膜穿孔を作製して経過を観察し検討するしかない。実験的鼓膜穿孔の治癒過程の研究は Taylor ら³⁾

が組織学的変化を報告して以来多くの報告^{2)~11)}があるが、いまだに不明な点も多い。鼓膜穿孔の部位によっては創傷治癒が遷延したり永久穿孔となる症例を経験する。たとえばツチ骨柄に接して穿孔が存在する場合に穿孔が閉鎖しないことを臨床的に経験することがある。しかし、ツチ骨に接する穿孔の治癒過程を詳しく調べたものはない。これを解明するために先に老木¹²⁾が開発した実験的鼓膜穿孔の方法を用いツチ骨に接する鼓膜穿孔を作製し、その治癒過程を組織学的に検討した。これは鼓膜形成術の際のコルメラと新生鼓膜の間の関係を考える基礎にもなるはずである。

また、穿孔閉鎖術後の鼓膜には中間層がないともいわれている。しかし、穿孔閉鎖後の組織学的変化を経時的

に詳しく検討したものは少ない．そこで，穿孔閉鎖後の組織学的検討を行い，鼓膜閉鎖後の変化を検討した．

材料および方法

1. 実験動物

体重 260～320 g のハートレー系モルモット (日本エスエルシー) を使用した．手術用顕微鏡下に，鼓膜所見に異常のないことを確認し，92 耳を実験に供した．内訳は，ツチ骨から離れた部位の穿孔とツチ骨に接した部位の穿孔の，それぞれの径の経時的変化の手術用顕微鏡下での観察に 10 耳ずつ，同様に組織学観察に 24 耳ずつ，内訳はツチ骨から離れた部位に穿孔作製後 2，4，6 日目はそれぞれ 7 耳ずつ，8 日目は 3 耳，ツチ骨に接した部位に穿孔作製後 2，4，6，8 日目にそれぞれ 6 耳ずつである．また，鼓膜穿孔閉鎖後の組織学観察に 24 耳供した．内訳は鼓膜穿孔閉鎖直後，閉鎖後 7，14，28 日目にそれぞれ 6 耳ずつである．

2. 鼓膜穿孔の作製

ペントバルビタールナトリウム (ネンブタール®：ダイナボット) 30 mg/kg で麻酔，除痛後，耳周囲の皮膚および外耳道をポビドンヨード (イソジン®：明治製菓) で消毒し，剃毛した．次に，手術用顕微鏡下で鼓膜を視野に入れ，老木¹²⁾ が考案した穿孔を作製する装置で，外耳道経由で鼓膜に穿孔を作製した (図 1)．穿孔作製部位はツチ骨から離れた緊張部後上象限，ツチ骨に接した緊張部後上象限とした．同じ形，同じ大きさの穿孔を作製し穿孔部分の面積をできるだけ同じにした．

ツチ骨から離して作製

ツチ骨に接して作製

図 1 作製した鼓膜穿孔の概略図

左がツチ骨から離して作製した穿孔．右がツチ骨に接して作製した穿孔．

3. 感染予防の処置

鼓膜穿孔を作製後，0.1% 塩酸オキシテトラサイクリン (テラマイシン®：ファイザー) 水溶液を経口投与し，穿孔径の計測時には 100% ペニシリン-ストレプトマイシン-ファンギゾン混合薬 (Whittaker M. A. Bioproducts, Inc.) 1000 倍希釈を外耳道より鼓膜穿孔部分が十分に浸るように局所投与した．

4. 穿孔径の経時的観察

接眼レンズにスケールが入った手術用顕微鏡で観察し，穿孔径の経時的変化をそれぞれ 10 耳ずつ計測した．ツチ骨柄に平行の径を縦径，垂直の径を横径とした．

5. 組織切片の作製

1) 穿孔作製後 2，4，6，8，15，22，36 日目にはプロモデオキシウリジン (BrdU：SIGMA) 20 mg/kg を静脈投与して 2 時間後に，ペントバルビタールナトリウム 50 mg/kg で麻酔した後，断頭し，中耳骨包を取り出した．それぞれ 95% エタノールで固定し，プランクリュクロ液で脱灰した．アルコール系列で脱水し，パラフィン包埋した．ツチ骨柄に垂直に 4 μm の厚さに連続切片を作製した．

2) 組織学的観察

作製した連続切片を，ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色と抗 BrdU モノクローナル抗体を用いた LSAB 法による免疫組織化学染色を行い，観察した．その手順を図 2 に示した．免疫組織化学染色用試薬にダコ LSAB キット (DAKO K680)，一次抗体に抗 BrdU モノクローナル抗体 (ペクトンディッキンソン社)，発色に 3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド (DAB：DAKO) を使用した．

6. 細胞増殖能

HE 染色した標本を光学顕微鏡で観察し，上皮層と中間層を確認した．HE 染色した標本と免疫組織化学染色した標本とを比べ，上皮層と中間層を確認し，1 視野内の各層での全細胞数に対する BrdU 陽性細胞の比率を顕微鏡下において観察した．

7. 穿孔閉鎖後の変化の観察

後上象限に穿孔を作製し，鼓膜穿孔閉鎖直後 (n=12)，閉鎖後 7 日目 (n=4)，14 日目 (n=4)，28 日目 (n=4) に同様に連続切片を作製し，HE 染色および免疫組織化学染色を行い，観察した．

図2 免疫組織化学染色する際の手順

結 果

1. 穿孔径の経時的観察

1) ツチ骨から離れた部位の穿孔

作製した鼓膜穿孔が閉鎖するまでの日数をそれぞれの部位ごとに示した。後上象限に穿孔を作製した場合、鼓膜穿孔が閉鎖するまでの期間は 8.0 ± 0.7 日(図3上)であった($n=10$)。

2) ツチ骨に接した部位の穿孔

ツチ骨に接して穿孔を作製した場合の鼓膜穿孔閉鎖までの期間は 10.7 ± 0.7 日(図3下)であった($n=10$)。

2. 組織学的検討

1) 正常鼓膜

正常鼓膜の組織をHE染色でみると、上から上皮層、中間層、粘膜層であった(図4上)。抗BrdU抗体による免疫組織化学的染色で上皮層に陽性細胞がみられた(図4下)。

2) HE染色

(1) ツチ骨から離れた部位の穿孔

ツチ骨から離れた部位に鼓膜穿孔を作製後2日目、上皮層が肥厚し、再生部分のほとんどを占めていた(図5-

1上)。穿孔辺縁がやや肥厚し細胞が集積していた。4日目、上皮層だけでなく中間層もみられた(図5-2上)。6日目、上皮層と中間層がともに肥厚し、特に中間層の肥厚が目立っていた(図5-3上)。上皮と線維束の間には組織が肥厚し結合組織が増加しており、結合組織の中に線維芽細胞の増生がみられた。8日目、再生部分はほとんど中間層であった(図5-4上)。

(2) ツチ骨に接した穿孔

ツチ骨に接して鼓膜穿孔を作製後2日目、再生部分はほとんど上皮層である(図6-1上)。4日目、上皮層だけでなく中間層もみられた(図6-2上)。6日目、上皮層と中間層がともに肥厚しており、同様に穿孔辺縁部先端には中間層を覆うように上皮層がみられ細胞が集積していたが、前者に比べ中間層の占める割合が多く、さらに中間層が外耳道側だけでなくツチ骨を取り囲むように鼓室側にもみられた。中間層の占める割合が多くなっており、同じ穿孔作製後6日目の組織で比べると、ツチ骨から離れた部位に鼓膜穿孔を作製した場合と比べて外耳道側だけでなく鼓室側にも中間層がみられた(図6-3上)。8日目、中間層がツチ骨全体を取り囲むようにみ

図3 後上象限に作製した鼓膜穿孔の穿孔径の変化
上: ツチ骨から離れた穿孔.
下: ツチ骨に接した穿孔.

られた(図6-4上).

3) 抗 BrdU 抗体による免疫組織化学的染色

(1) ツチ骨から離れた部位の穿孔

ツチ骨から離して鼓膜穿孔を作製後2日目, 上皮層の辺縁部に細胞が集積していたが, 抗 BrdU 抗体による免疫組織化学的染色で染色された細胞(以下, 陽性細胞と記す)は辺縁からやや離れた部位にみられた(図5-1下). 4日目, 上皮層で陽性細胞が同様にみられ, 中間層では細胞が集積していたが, 辺縁部を含めた再生部分全体に陽性細胞がみられた(図5-2下). 6日目, 陽性細胞は上皮層では穿孔辺縁部からやや離れた部位で, 中間層では中間層全体にみられた(図5-3下). 8日目, 中間層の占める部分が多くなり, 陽性細胞は再生部分全体にみられた(図5-4下).

図4 正常鼓膜の組織像(×400)

上: HE 染色.

下: 抗 BrdU 抗体による免疫染色. 矢印は染色された細胞.

(2) ツチ骨に接した穿孔

ツチ骨に接して鼓膜穿孔を作製後2日目, 上皮層で陽性細胞は, 辺縁からやや離れた部位にみられた(図6-1下). 4日目, 上皮層で陽性細胞が同様にみられ, 中間層では後上象限に鼓膜穿孔を作製した場合と同様に再生部分全体に陽性細胞がみられた(図6-2下). 6日目, 陽性細胞は上皮層では同様に穿孔辺縁部からやや離れた部位でみられたが, 中間層では穿孔辺縁部に近い部分に最も多くみられた(図6-3下). 8日目, 後上象限に鼓膜穿孔を作製した場合より中間層が肥厚し細胞が集積していたが, 陽性細胞が主に辺縁部にみられた(図6-4下).

(3) 陽性細胞の占める割合

陽性細胞が各層の全細胞数に占める割合を, ツチ骨から離して鼓膜穿孔を作製した場合(図7上)とツチ骨に接して鼓膜穿孔を作製した場合(図7下)のそれぞれについて調べた. 4日目以降ではいずれの場合も上皮層より中間層の方が陽性細胞の占める割合が高かった. 次に, 各層ごとに上記の2つの場合における陽性細胞の占める割合を調べた. 上皮層では(図8上)6日目以前でツチ骨から離して鼓膜穿孔を作製した場合の方が, 中間層では(図8下)いずれの時点でもツチ骨に接して鼓膜穿孔を作製した場合の方が, それぞれ他方に比べ陽性細胞の占める割合が高かった.

ツチ骨から離して穿孔を作製した場合とツチ骨に接して穿孔を作製した場合, それぞれ中間層での陽性細胞の

図5 後上象限にツチ骨から離して作製した穿孔縁の組織像(×100)

右端が穿孔縁である。それぞれ、上がHE染色、下が抗BrdU抗体による免疫染色。↔は上皮層、↔は中間層、▼は陽性細胞を示す。

1. 2日目 2. 4日目 3. 6日目 4. 8日目

占める割合を経過日数ごとに計測した。ツチ骨から離して穿孔を作製した場合には中間層全体で、ツチ骨に接して穿孔を作製した場合には比較的陽性細胞が多くみられた穿孔辺縁部で、それぞれの陽性細胞の占める割合を計測した。2日目、4日目では両者にほとんど差がみられなかったのに対して、6日目、8日目ではツチ骨に接して穿孔を作製した場合の方が陽性細胞の占める割合が高い結果となった。

3. 穿孔閉鎖後の変化

1) 厚さの変化

組織学的変化から判断すると、穿孔閉鎖後よりも鼓膜は薄くなっていた。

2) 組織学的変化

(1) HE染色

穿孔閉鎖直後、上皮層は閉鎖しているが、中間層はまだ閉鎖しておらず、上皮層から先に閉鎖することを確認した(図9-1上, 2)。後に中間層も閉鎖した時点の所見で、上皮層では先端部分がさほど肥厚していなかったが、中間層は穿孔辺縁全体にわたって肥厚し(図9-3上)、再生した部分の左右で組織の厚さに差を認めた。これはツチ骨寄りの穿孔辺縁、向かって左側の組織が、向かって右側の鼓膜輪寄りの穿孔辺縁よりも厚いことが多いためである。また中間層が閉鎖せず上皮層が外耳道皮膚と連続しているものもあった。

図6 後上象限にツチ骨に接して作製した場合の穿孔縁の組織像

右端が穿孔縁である。それぞれ、上がHE染色、下が抗BrdU抗体による免疫染色。↔は上皮層、↔は中間層、▼は陽性細胞を示す。

1. 2日目(×100) 2. 4日目(×100) 3. 6日目(×40) 4. 8日目(×40)

鼓膜閉鎖後7日目、上皮層は1～2層で菲薄しているが、中間層も閉鎖した直後よりは菲薄している(図10-1上)。

鼓膜閉鎖後14日目、上皮層は菲薄しており、中間層も菲薄していた。また、穿孔部と考えられる部分では、新しく作られたと考えられる細い線維が並び、本来の線維層と一部連続している。膜の厚さはさらに薄くなっていた(図10-2上)。

鼓膜閉鎖後28日目、さらに全体の層の厚さは菲薄し、細胞数は減少していた。表面は上皮層が一層性に並ぶ。

全体的にみると、穿孔閉鎖後の経時的变化で、中間層では閉鎖した直後より徐々に組織が菲薄し、上皮層では

閉鎖後より1～2層に菲薄している状態が続いていた(図10-4上)。穿孔の修復過程での中間層と上皮層との違いを認めた。

(2) 抗BrdU抗体による免疫染色

穿孔部が上皮層だけで覆われて閉鎖した時点で、上皮層の陽性細胞は閉鎖した部位より離れた位置にみられ、肥厚した部位にはみられなかった。中間層は肥厚し再生した部分全体に陽性細胞がみられた(図9-1下)。中間層も穿孔部を覆い穿孔が閉鎖した時点で、中間層の辺縁部を含めた再生部分全体に陽性細胞がみられたが、その細胞数は閉鎖するまでよりも減少していた。上皮層での陽性細胞は肥厚している部分にはみられず、その周りで

図7 穿孔を作製時の陽性細胞の占める割合

上：後上象限にツチ骨から離して作製した場合。

下：ツチ骨に接して作製した場合。

図8 穿孔部位の違いによるそれぞれの層での陽性細胞の占める割合

上：上皮層。

下：中間層。

さほど肥厚していない部分にみられた(図9-3下)。

鼓膜閉鎖後7日目と14日目、上皮層は1～2層と菲薄しているが、陽性細胞がみられた。部位はもともとあった部分と再生した部分との境界付近に比較的多くみられ、再生した部分にはあまりみられなかった。中間層では陽性細胞はほとんどみられなかった(図10-1下, 10-2下, 10-3)。鼓膜閉鎖後28日目では再生部分がまだ十分に菲薄していない部分の上皮層に陽性細胞がみられた(図10-4下, 図10-5)が、中間層ではみられなかった。陽性細胞の分布に経過によってまたはどの修復過程にあるかによって違いがあった。

考 察

鼓膜は外耳と中耳を境する厚さ約0.1 mmの強靱な膜で、空気の振動をツチ骨に伝える振動板である。組織は3層よりなり、外側は重層扁平上皮で外耳道の皮膚の続きである。内側は単層扁平上皮で中耳粘膜の一部であり、両者間に緻密な線維層を含む組織が存在する。

鼓膜は外耳と中耳を境する位置にあり、いわば鼓膜の両面のほとんどが空中に浮かんでいるために、何らかの原因により穿孔を生じやすい。その創傷治癒過程は第一に穿孔部を閉鎖することである。これは他の組織とは違って組織のない部分を周辺組織からどのように再生させて穿孔部を閉鎖するかということになる。また皮膚の真皮層に相当する結合組織がごく少量であることなどから鼓膜穿孔の創傷治癒は他の組織と違った過程を経ることが考えられる。また、鼓膜が聴力の一端を担う重要な組織であることから諸家の研究対象になっていた。実験的鼓膜穿孔の治癒過程の研究についてはTaylorら³⁾が組織的变化を報告して以来多くの報告がある^{2)~11)}。また近年になりEGF^{12)~14)}, PDGF¹⁴⁾¹⁵⁾, FGF¹⁶⁾¹⁷⁾などの成長因子やヒアルロン酸¹⁸⁾¹⁹⁾などを用いて鼓膜穿孔閉鎖の様式を観察し、その治癒過程について検討されている。最近の鼓膜穿孔の実験では穿孔部に成長因子を作用させてその様子を観察し検討した報告が多い。老木¹²⁾

図9 鼓膜穿孔閉鎖直後の組織像

TMは鼓膜、TCは鼓室、Eは外耳道を示す。

1. 上皮層だけが閉鎖したところ。上はHE染色(×40)、下は抗BrdU抗体による免疫染色(×40)。黒枠で囲んだところを2.に示す。
2. 上皮層がつながっている(×200)。
3. 上皮層と中間層が閉鎖したところ。上がHE染色、下が抗BrdU抗体による免疫染色(×40)。↔は穿孔が閉鎖し再生した部分を示す。

はEGFなどを、竹山¹⁴⁾はEGFとPDGFを、嶋田¹⁷⁾はFGFをそれぞれ鼓膜穿孔に作用させた結果、いずれも作用させなかった群と比べて穿孔が閉鎖するまでの期間が短縮したと述べている。これらは鼓膜穿孔に成長因子を与えて創傷治癒を促進させたものである。それに対して鼓膜穿孔にある物質を作用させて創傷治癒を遷延させた実験は少なく、わずかにステロイドを作用させたものがみられるだけである²⁰⁾²¹⁾。

ツチ骨柄に沿って穿孔が存在する場合に穿孔が閉鎖するまでの期間が長くなかったり、永久穿孔となったりす

る症例を経験する。これらは創傷治癒が遷延したか、または何らかの理由により中断したためと推測できる。そこでツチ骨柄に沿って穿孔が存在する場合に創傷治癒が遷延したり停止したりする理由を動物を使って解明することにした。最初に鼓膜穿孔を作製してその後の経過を経時的に観察し、経過日数ごとに組織を採取し、主にその時点での上皮層と中間層の所見を観察し、各層が鼓膜穿孔の治癒過程でどのような役割を果たしているかを組織学的に検討した。

図10 鼓膜穿孔閉鎖後の組織像

1. 7日目。上がHE染色，下が抗BrdU抗体による免疫染色($\times 100$)。▼は陽性細胞を，↔は穿孔が閉鎖し再生した部分を示す。
2. 14日目。上がHE染色，下が抗BrdU抗体による免疫染色($\times 100$)。↔は穿孔が閉鎖し再生した部分で，黒線で囲んだ部分を3.に示す。
3. 14日目。▼は陽性細胞を示す($\times 200$)。
4. 28日目。上がHE染色，下が抗BrdU抗体による免疫染色($\times 100$)。←は穿孔が閉鎖し再生した部分で，黒線で囲んだ部分を5.に示す。
5. 28日目。▼は陽性細胞を示す($\times 200$)。

1. 後上象限にツチ骨から離れた鼓膜穿孔を作製した場合とツチ骨に接して鼓膜穿孔を作製した場合の比較

ツチ骨から離れて穿孔を作製した場合、鼓膜穿孔が閉鎖するまでの期間は 8.0 ± 0.7 日、ツチ骨に接して穿孔を作製した場合は 10.7 ± 0.7 日であり、後者で閉鎖するまでの期間が長くなり、臨床での経験と同じ結果であった。ツチ骨から離れて後上象限に穿孔を作製した場合では、中間層は穿孔を作製する前からあった鼓膜に沿うように増殖しているようにみえた。ツチ骨に沿って穿孔を作製した場合では穿孔辺縁の組織、特に中間層が肥厚し外耳道側だけでなくツチ骨を取り囲むように鼓室側にもみられ、ツチ骨を中心にあらゆる方向へ増殖しているようにもみえた。後上象限に穿孔を作製した場合に比べてツチ骨に沿って穿孔を作製した場合で、鼓膜穿孔が閉鎖するまでの期間が長かったにもかかわらず、ツチ骨を取り囲むように鼓室側にも穿孔辺縁の組織が肥厚していた。穿孔辺縁の組織が肥厚しているのは細胞増殖が著しく創傷治癒過程が促進されると考えると鼓膜が閉鎖するまでの期間が短縮すると思われるのが妥当である。しかし、実際は閉鎖するまでの期間が延長しており、創傷治癒が遷延していた。そこでそれぞれの鼓膜穿孔の治癒過程で上皮層と中間層がどのような役割を担っているのかを各層での細胞増殖能について検討することにした。

まず、鼓膜穿孔の治癒過程において穿孔辺縁が肥厚しているのは上皮層や中間層にある細胞が増殖したためであるが、各層で細胞増殖能が創傷治癒にどのぐらい関与しているのかわからない。そこで細胞増殖能を把握することにより創傷治癒能力を検討することにした。ボロモデオキシウリジン (BrdU) は DNA の構成塩基の一つであるチミジンの誘導体で DNA の合成期 (S 期) の細胞に人工的に取り込ませることにより、抗 BrdU モノクローナル抗体と核とを特異的に反応させるのに用いられる。Gratzner²²⁾ がこの方法を報告してから BrdU を利用して増殖している細胞を検出できるようになった。今回は BrdU を検出することにより細胞増殖能を知る目安とした。後上象限に穿孔を作製した場合とツチ骨に沿って穿孔を作製した場合のそれぞれを抗 BrdU モノクローナル抗体を使って免疫組織化学的染色し、上皮層と中間層での BrdU 陽性細胞の占める率を示した(図 7, 8)。

ツチ骨から離れて穿孔を作製した場合、上皮層では穿

孔作製後 2 日目から穿孔辺縁よりやや離れた部位からツチ骨までの部位で BrdU 陽性細胞がみられたが、上皮層で最も肥厚している穿孔辺縁ではみられなかった。これは鼓膜に穿孔が生じた後、上皮細胞がツチ骨付近で増殖し、穿孔辺縁の先端部分に押し出されて集積したためと考える。一方、中間層では穿孔作製後 4 日目から全体的にほぼ偏りなく BrdU 陽性細胞がみられ、肥厚した部位で細胞が増殖していた。また日数が経つにつれ上皮層よりも中間層が肥厚し、細胞増殖能も上皮層がやや低下するのに比べて中間層は上昇した。これは、少なくとも鼓膜穿孔の治癒過程の中盤から後半にかけて上皮層よりも中間層が穿孔閉鎖に関与していると考えるのが妥当である。このことは次の点からも支持される。穿孔辺縁では中間層全体に BrdU 陽性細胞がみられたのに対して上皮層には細胞が集積しているものの、BrdU 陽性細胞はほとんどみられなかった。増殖している中間層が上皮層を引っ張っているようにもみえた。この結果からも、穿孔が閉鎖し始めて数日後からは中間層の方が穿孔閉鎖に関与していると考ええる。

ツチ骨に接して穿孔を作製した場合、上皮層では同様に穿孔辺縁よりやや離れた部位からツチ骨までの部位で BrdU 陽性細胞がみられたが、上皮層で最も肥厚している穿孔辺縁ではみられなかった。中間層でも同様に全体的にほぼ偏りなく BrdU 陽性細胞がみられ、肥厚した部位で細胞が増殖していた。特徴的な所見が 2 つあり、ともに中間層の肥厚が著しくなる 6 日目から 8 日目にかけてみられた。1 つは中間層での BrdU 陽性細胞が穿孔縁全体ではなく主にその先端部にみられたことである。言い換えれば、中間層がある程度以上に肥厚した段階では中間層での細胞分裂が穿孔辺縁の先端部分だけになったということである。ツチ骨に接して穿孔を作製した場合の創傷治癒過程で中間層が外耳道側だけでなく鼓室側にも広がってみられたことと、細胞分裂の場所が減って創傷治癒が遷延することと関連があると考えた。もう 1 つは、経時的に中間層が肥厚し陽性細胞が多くなるにつれて上皮細胞での陽性細胞の占める割合が逆に低下していることである(図 7)。穿孔の治癒過程で中間層が肥厚しその役割が重要になると中間層では穿孔辺縁の先端部分での細胞分裂を優先させ、その他の先端部分から離れた部位や上皮層での細胞分裂が自然に低下していくと考える。

2. 穿孔閉鎖後の変化

鼓膜穿孔の治癒過程における説は2つある。1つは上皮層がまず穿孔部を閉鎖するという説⁵⁾⁹⁾である。上皮層の増殖がその自浄作用である migration と関与するとの報告^{23)~25)}があり、それを抗 BrdU 抗体を用いて検討した報告²⁶⁾²⁷⁾もある。もう1つは中間層により穿孔閉鎖が起こり上皮が後で移動するという説³⁾⁴⁾である。今回の成績は前者の説を支持している。今回の実験では、上皮層が先に穿孔部を閉鎖することを確認した。鼓膜が空中にあるために穿孔が生じると、土台となる組織が欠損してしまう。これは下床を埋めなければならないという他の組織の創傷治癒過程と異なることを示している。例えば穿孔が閉鎖して再生した鼓膜の組織の中間層は菲薄していたり欠如している^{28)~30)}ために臨床では薄く透けて見えるとされている。そこで穿孔部の閉鎖後の経過を組織学的に観察し、穿孔が閉鎖した後の鼓膜の治癒過程を検討した。

鼓膜閉鎖後14日目、上皮層と中間層がともに菲薄し、中間層では新しく作られたと考えられる細い線維を認めており、線維の再生が行われている過程である。同28日目、中間層にみられる線維層に大食細胞が集簇し、再生部と考えられる部位で密な線維束を認め、新生の線維層にみえたことからこの時点ではまだ修復過程が持続していると考えられる。修復完了後の組織については今回の実験では確認できなかった。

ここで注目すべき点が2つある。1つは、抗 BrdU 抗体による免疫染色所見で、鼓膜穿孔が閉鎖後において中間層でみられる陽性細胞が閉鎖前に比べて減少していたのに対して、上皮層は1~2層と菲薄していたが陽性細胞が比較的多くみられたことである。これは鼓膜穿孔閉鎖後、中間層は菲薄し細胞増殖能も低いのに対して上皮層は菲薄しているが細胞増殖能が比較的高いということを示した結果である。HE 染色の所見とともに考えると、鼓膜穿孔閉鎖後で中間層では線維の破壊と構築を繰り返して徐々に層が菲薄するが、ほとんど組織増殖を認めない。上皮層では層が菲薄しつつも絶えず細胞増殖があるという結果である。再生鼓膜は変化の途中であったといえる。もう1つは、上皮層で陽性細胞のみられる部位である。上皮細胞での陽性細胞が穿孔閉鎖前では穿孔辺縁からやや離れた部位に、穿孔閉鎖後では閉鎖後14日目までは元来あった鼓膜と再生された部分との境界部に多くみられた。一方、閉鎖後28日目では再生された部分で

周囲よりもまだ十分に菲薄していない部分にみられたことである。上皮層で陽性細胞のみられる部位が鼓膜のどの場所がどの治癒過程にあるかによって変化することが考えられる。中間層で陽性細胞が集中したり組織がまだ十分に肥厚している部位ではそこからやや離れたところにみられ、肥厚していた組織が菲薄して修復過程が終わりに近づいて元の厚さになりつつある部位ではみられず、まだ治癒過程の途中にある組織にみられることである。

結 語

- 1) モルモットを使い、実験的に鼓膜穿孔を作製した。
- 2) ツチ骨から離して鼓膜穿孔を作製後、閉鎖するまでに 8.0 ± 0.7 日かかり、ツチ骨に接して作製後、同様に 10.7 ± 0.7 日かかった。後者で鼓膜穿孔の治癒過程が遅延した。
- 3) ツチ骨に接して鼓膜穿孔を作製すると、組織学的所見でツチ骨を取り囲むように鼓室側にも中間層を主とした組織が増生していた。
- 4) 穿孔作製後6日目、8日目ではツチ骨に接して穿孔を作製した場合の方が、抗 BrdU 抗体を使った免疫組織化学的染色で染色された陽性細胞の占める割合が高かった。
- 5) 穿孔閉鎖は上皮層から先に閉鎖した。
- 6) 穿孔閉鎖後、上皮層は1~2層と菲薄しており、中間層も菲薄していた。
- 7) 穿孔閉鎖後で上皮層は1~2層と菲薄しているが、抗 BrdU 抗体を使った免疫組織化学的染色で染色された陽性細胞がみられた。中間層では陽性細胞が激減していた。
- 8) 陽性細胞の分布は経過によってまたはどの修復過程にあるかによって差があった。

謝 辞

稿を終えるに当たり、本研究に御指導、御校閲を賜りました村田清高教授に深謝致します。また、御助言賜りました竹山豊博士をはじめ教室員各位に心から感謝致します。

本論文の一部を日本耳鼻咽喉科学会大阪地方連合会第267回例会(平成10年12月、大阪)、日本耳鼻咽喉科学会第100回総会(平成11年5月、仙台)、同第101回総会(平成12年5月、東京)で発表した。

参考文献

- 1) 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.
- 2) 稲川俊文 : 鼓膜穿孔に関する臨床的並びに実験的研究. 日耳鼻 72 : 687~718, 1969.
- 3) Taylor M and McMinn RMH : Healing of experimental perforations of the tympanic membrane. J Laryngol Otol 79 : 148~158, 1965.
- 4) McMinn RMH and Taylor M : The cytology of repair in experimental perforations of the tympanic membrane. Br J Surg 53 : 222~232, 1966.
- 5) McIntire C and Benitez JT : Spontaneous repair of the tympanic membrane ; histological studies in the cat. Ann Otol Rhinol Laryngol 79 : 1129~1131, 1970.
- 6) Hildmann H and Steinbach E : Experimental studies on closing of artificial eardrum perforations in rabbits. J Laryngol Otol 85 : 1173~1176, 1971.
- 7) McMinn RMH : Electron microscopic observations on the repair of perforated tympanic membranes in the guinea pig. J Anat 120 : 207~217, 1975.
- 8) Boedts D and Ars B : Histopathological research on eardrum perforations. Arch Otorhinolaryngol 215 : 55~59, 1977.
- 9) Boedts D : The tympanic epithelium in normal and pathological conditions. Acta Otorhinolaryngol Belg 32 : 296~419, 1978.
- 10) 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.
- 11) Soderberg O, Hellström S and Stenfors LE : The healing pattern of experimental heat myringotomy. Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord) 106 : 81~85, 1985.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 竹山 豊 : 鼓膜穿孔の治癒過程に関する実験的研究. 耳鼻臨床 88 : 93~104, 1995.
- 15) Pierce GF, Mustoe TA, Senior RM, et al : Platelet-derived growth factor and recombinant c-sis gene homodimeric proteins. J Exp Med 167 : 974~987, 1988.
- 16) 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.
- 17) 嶋田高明 : モルモット鼓膜穿孔治癒過程における細胞増殖動態(第2報). Otol Jpn 4 : 668~676, 1994.
- 18) Hellström S and Laurent C : Hyaluronan and healing of tympanic membrane perforations ; an experimental study. Acta Otolaryngol Suppl (Stockh) 442 : 54~61, 1987.
- 19) 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.
- 20) Spandow O and Hellström S : Animal model for persistent tympanic membrane perforations. Ann Otol Rhinol Laryngol 102 : 467~472, 1993.
- 21) Spandow O, Hellström S and Schmid SH : Hydrocortisone delay of tissue repair of experimental tympanic membrane perforations. Ann Otol Rhinol Laryngol 99 : 647~653, 1990.
- 22) Gratzner HG : Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine ; a new reagent for detection of DNA replication. Science 218 : 474~475, 1982.
- 23) Alberti PW : Epithelial migration on the tympanic membrane. J Laryngol 78 : 808~830, 1964.
- 24) Litton WB : Epithelial migration in the ear. Acta Otolaryngol Suppl (Stockh) 240 : 1~39, 1968.
- 25) 牧野邦彦, 天津睦郎 : 外傷性鼓膜穿孔治癒過程と migration. Otol Jpn 9 : 211~215, 1999.
- 26) Kakoi H and Anniko M : Auditory epithelial migration ; an immunohistologic study using anti-BrdU antibody on tympanic membrane in mouse. Ann Otol Rhinol Laryngol 106 : 414~421, 1997.
- 27) Koba R : Epidermal cell migration and healing of the tympanic membrane ; an immunohistochemical study of cell proliferation using bromodeoxyuridine labeling. Ann Otol Rhinol Laryngol 104 : 218~225, 1995.
- 28) 山下敏夫, 北尻雅則, 友田幸一, 他 : ヒト再生鼓膜の組織学—再生鼓膜は中間層を持たないか—. 耳鼻臨床 75 : 2567~2574, 1982.
- 29) Yamashita T : Histology of the tympanic perforation and the replacement membrane. Acta Otorhinolaryngol (Stockh) 100 : 66~71, 1985.
- 30) Govaerts PJ, Jacob WA and Marquet J : Histological study of the thin replacement membrane of human tympanic membrane perforations. Acta Otorhinolaryngol (Stockh) 105 : 297~302, 1988.

(原稿受付 : 平成12年 5 月15日
 原稿採択 : 平成12年 7 月19日 急載
 別刷請求先 : 小林正明
 〒589-8511 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)