鼓膜穿孔治癒機転と細胞増殖因子

—文献的考察—

嶋 田 高 明

Healing Process of Tympanic Membrane Perforation and Growth Factors

—A Review of Literature—

Takaaki Shimada

(The University of Tokushima)

Tympanic membrane perforation, among otic diseases, is an important condition often encountered in the routine outpatient clinic. There are many reports on experimental pathological study of animals trying to elucidate the healing process of tympanic membrane perforation. However, much remains to be clarified about the healing process and the various influencing factors.

In recent years, studies are reported using growth factors for tympanic membrane perforation. Some growth factors accelerate the healing of tympanic membrane perforation. Studies using growth factors have great potential for elucidating the healing process.

Key words: tympanic membrane, wound healing, growth factor

はじめに

耳疾患の中でも鼓膜穿孔は、日常外来診療において頻繁に経験される重要な病態である。その原因は、急性、慢性化膿性中耳炎などの炎症性穿孔と直接外力または間接外力による外傷性穿孔に分けられる。原因が何であれ、早期に穿孔が閉鎖する症例もあれば、穿孔が閉鎖せず閉鎖手術が必要となる症例も経験するところである。ヒトでは臨床的観察による推測しかできず、鼓膜が創傷に対していかなる反応を示し、どのような治癒過程をたどって行くかの解明は、動物を用いた実験病理学的研究に委ねられる。1965年 Taylor と McMinn¹⁾ が鼓膜穿孔の治癒過程

における細胞学的変化を報告して以来、鼓膜穿孔の治癒過程を明らかにするため、種々の動物を用いた実験病理学的研究に関する多くの報告がある^{2)~24)}。しかし、鼓膜穿孔の治癒過程およびそれに及ぼす種々の影響因子については未だ不明な点が多い。近年、創傷治癒に関与することが示唆されている細胞増殖因子を鼓膜穿孔に用いた研究報告が散見され^{21)~24)}、新たな展開を見せている。

そこで、今回実験的鼓膜穿孔の治癒過程およびそれに影響を及ぼすであろう細胞増殖因子について文献的考察を行い、この分野の現状把握を行ってみた。

実験的鼓膜穿孔作製法について

穿孔作製法はほとんどが機械的に鼓膜を破るものであり、鈍な消息子^{1)~3)5)10)}、鼓膜切開刀^{11)17)~20)}、針⁸⁾⁹⁾¹³⁾²⁴⁾等によるものがある。実験的鼓膜穿孔に何らかの物質を作用させその影響を比較検討するためには、穿孔の大きさ、辺縁の状態を可及的に同一にすることが必要である。老木²¹⁾は、この点を重要視し上記の方法では穿孔の大きさを一定にできているとはいいがたく、さらに、対象動物の鼓膜は非常に薄く、脆弱なため、穿孔辺縁の状態も均一にできていないと指摘している。彼は、ニクロム線による焼灼により穿孔を作成している。そして、この方法によれば、①穿孔径をほぼ一定にできる、②穿孔辺縁の状態が一定である、③同時に止血もできるため凝血塊などによるコンタミネーションがない、④手技上の熟練を要しない、⑤1回の操作でごく短時間に行える、などの利点を挙げている。他に電気焼灼法を用いたものとして Söderberg ら¹⁶⁾の報告がある。彼らは切開刀による鼓膜穿孔と電気焼灼によるものとの比較検討を行い、電気焼灼法によるものは、切開刀によるものより穿孔閉鎖が遅延すると報告している。その理由として、穿孔作製後の穿孔縁が中間層であり、穿孔治癒早期に反応を示す表皮層でなかったこと、ツチ骨柄の血管が穿孔作製後、9日目まで見出せず血流が乏しかったことを挙げている。焼灼による鼓膜穿孔治癒過程は機械的損傷によるものとは少し異なるようである。しかし、種々の条件による治癒の変化を比較検討するモデル作製には、非常に有益な手段の一つと考えられる。

鼓膜穿孔の自然治癒過程について

鼓膜穿孔の治癒過程が一般の創傷治癒過程と大きく異なる点は、穿孔のため生じた下床のない間隙を埋めなければならないという点である。鼓膜穿孔の治癒過程については、中間層の増生した肉芽により穿孔が閉鎖され、その土台の上に上皮が移動定着するという説と、表皮層の扁平上皮過形成がまず穿孔を閉鎖するという説と

の二つに分けられる。動物実験でその治癒過程を形態学的に検討した報告は多く、その結果は前者を支持する者^{1)~3)}より後者⁶⁾⁸⁾⁹⁾¹¹⁾¹³⁾¹⁵⁾を支持する者の方が多い。

穿孔治癒過程における細胞増殖活性については、オートラジオグラフィによる観察報告がある²⁾³⁾⁸⁾⁹⁾¹³⁾。Taylor と McMinn ら²⁾³⁾は穿孔後10時間頃より表皮層の細胞は分裂増殖を始め、その増殖活性は穿孔後48時間でピークをむかえる。また、穿孔縁から離れた周囲の細胞にも増殖活性を認め、互いに厚くなった穿孔縁を押しつけ治癒を助けていると報告している。Reijnen ら⁸⁾は穿孔後2日目で穿孔に近い鼓膜輪とツチ骨柄で著明に増殖活性が増し、その後は穿孔に向かって増殖活性の範囲が広がる。そして穿孔閉鎖後、増殖活性は速やかに減少すると報告している。鼓膜各層の細胞増殖動態を知ることとは、鼓膜穿孔の治癒過程を一層明らかなものにすると考えられる。

鼓膜穿孔の治癒過程を論じる時、上皮の移動(migration)の問題がある。文献的には1964年のAlberti²⁵⁾の報告がよく知られている。彼は、鼓膜表皮に色素を点状に塗布して、migrationを詳細に検討している。鼓膜のmigrationの中心は鼓膜臍あるいはツチ骨柄にあり、鼓膜表皮はその中心部から鼓膜周辺部さらに外耳道へと放射状に移動する。外耳道壁から鼓膜へ向かうことはないし、鼓膜の周辺部から中心部へ向かうこともないと述べている。migrationの発生機序については、Litton²⁶⁾がオートラジオグラフィを用いた実験的研究で、鼓膜のmigrationの原動力は鼓膜表皮におけるgeneration center と他の部位との増殖力の差により生ずるとしている。鼓膜、外耳道皮膚のmigrationは、種々の鼓膜、外耳道および中耳病変により障害される²⁷⁾。また病的鼓膜では、migrationの速度低下および異常パターンを認めるという報告がある²⁸⁾。鼓膜穿孔の閉鎖にmigrationが関与しているとする報告は多い。他の諸因子の存在に加えて、migrationが穿孔閉鎖の一つ

の重要な因子であると思われる。

鼓膜穿孔に対する薬剤の影響について

鼓膜穿孔部に薬剤を作用させその影響を検討したものは少ない。Rogers ら⁴⁾はフェノール、マイトロジェンマスタード等を作用させ永久穿孔の作成を試み、Fry ら¹⁴⁾は点耳薬の鼓膜穿孔に及ぼす影響を検討しているが、いずれも鼓膜穿孔の治癒過程は明らかにされていない。

1985年 Stenfors ら¹⁷⁾がヒアルロン酸を作用させその影響を検討し、Hellström ら¹⁹⁾、Laurent ら²⁰⁾、が追及報告している。ヒアルロン酸は細胞外マトリックスの一つであり、発生や損傷修復の過程のように細胞が盛んに移動する組織において特別な機能を持つと言われている²⁹⁾。鼓膜穿孔治癒過程においても有利に働くことが示唆されている。

最近になって鼓膜各層に影響を持つであろう細胞増殖因子を用いた研究が報告されている。すなわち老木²¹⁾は上皮成長因子 (epidermal growth factor; EGF)、ヒト腫瘍細胞増殖因子 (TGF- β)、O'Daniel ら²²⁾は EGF、竹山²³⁾は血小板由来成長因子 (PDGF)、Mondain ら²⁴⁾は線維芽細胞増殖因子 (FGF) を用いて鼓膜穿孔の治癒過程における各々の増殖因子の影響を検討している。各々の増殖因子については次の項で詳述する。EGF は鼓膜の上皮細胞の増殖、進展を促進させ、中間層に対してはむしろ増殖抑制的に働く傾向がある²¹⁾。鼓膜穿孔の閉鎖を有意に早める²¹⁾²²⁾。鼓膜には EGF と高い親和性を示すリセプターが存在する²²⁾。TGF- β は鼓膜の上皮細胞の増殖進展を軽度抑制し、中間層においても増殖抑制的に働く。結果として、鼓膜穿孔の治癒に対しては抑制的に働く傾向がある²¹⁾。竹山²³⁾は老木との一連の研究において、PDGF は EGF よりもさらに治癒促進的に働くと報告し、PDGF が早期より中間層の肥厚を促す可能性があることを示唆している。FGF は鼓膜穿孔の閉鎖を早める。治癒過程における経過は自然治癒過程とほぼ同様である。高濃度の FGF は鼓膜炎の惹起する可能性が高

い²⁴⁾。以上、増殖因子を用いた研究は鼓膜穿孔の治癒過程解明に大きな一助となる可能性があり、さらなる詳細な報告が待たれる。

細胞増殖因子について

増殖因子 (growth factor) は in vivo, in vitro において、動物細胞の成長を促進するものであって、栄養物質ではないものと定義されている³⁰⁾。ここでいう栄養物質とは、細胞内に入って代謝基質、または補酵素として利用されるもののことである。現在、増殖因子と呼ばれているものは非常に多数にのぼっている。これらの増殖因子のうち鼓膜穿孔治癒過程との関連が示唆されている FGF, EGF, PDGF, TGF について最近の知見を紹介する。

1. FGF (線維芽細胞増殖因子)

1974年、Gospodarowicz³¹⁾はウシ下垂体から線維芽細胞の増殖を強く刺激する分子量約 17,000の蛋白質を見出し FGF と命名した。遺伝子がクローニングされた結果、アミノ酸配列の相同性より FGF ファミリーは現在のところ aFGF, bFGF, INT2, HST1, FGF5, HST2, KGF の7つの遺伝子産物が知られている。増殖因子としての活性を指標に得られたもの、ウイルスが挿入したときに活性化される細胞側遺伝子として得られたもの、トランスフォーミング遺伝子として得られたもの、またそれと相同性を有する遺伝子として得られたものなど、その分離、同定のされ方は様々であるが、これらの蛋白質のうちほとんどのものは増殖因子としての活性を示し、また強弱はあるにせよトランスフォーミング活性を示す。また、これらの増殖因子群はヘパリンに結合する能力あるいは結合する特異的なアミノ酸配列をもっており、ヘパリン結合増殖因子群ともいえる³²⁾。これら FGF ファミリーのうち増殖刺激活性の強力な bFGF について詳解する。

bFGF は分子量約17,000、等電点9.6の塩基性単鎖ポリペプチドで、酸性条件や60度以上の熱処理で失活する³³⁾³⁴⁾。bFGF は線維芽細胞ばかりでなく血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、角

膜内皮細胞、骨芽細胞、軟骨細胞など多種の細胞に対する細胞増殖を刺激することが明らかにされている³⁵⁾。また血管内皮細胞の遊走、内皮細胞からの urokinase-plasminogen activator 産生を促進し in vivo で強力な血管新生作用を有することも報告されている³⁶⁾。細胞増殖作用、血管新生作用、コラーゲン産生促進作用を示す結果 in vivo で肉芽形成を刺激する。更に、ケラチノサイトの増殖、遊走を促進することも報告され、再上皮化に関与していることが示唆されている³⁷⁾。bFGF は生体内で、下垂体、網膜、黄体、前立腺、胎盤、軟骨、骨など広範な組織に分布している³⁸⁾。組織中 bFGF は、細胞外マトリックス成分の一つであるヘパリンに結合した形で存在し、損傷部位に集積した炎症細胞が分泌する酵素などにより遊離し損傷部位の修復に寄与することが示唆されている³⁹⁾。以上、bFGF は創傷治癒過程において重要な細胞増殖、遊走、血管新生、肉芽形成、再上皮化、いずれの反応も促進する。

2. EGF (上皮成長因子)

Cohen⁴⁰⁾ は雄マウス顎下腺中の神経成長因子 (nerve growth factor; NGF) を精製する過程で、顎下腺抽出物を新生児マウスに投与したところ、眼瞼開裂および切歯出現が早期に起こることに気づき、歯瞼因子 (toothlid factor) と名付けた。後に彼はこの作用が上皮細胞の顕著な増殖と、それに伴う角化に基づくことを組織学的に明らかにし、1964年この因子を epidermal growth factor (EGF) とあらためて命名した⁴¹⁾。1975年 Cohen と Carpenter⁴²⁾ は、ヒト尿中にも EGF が存在することを発見し、ヒト EGF (hEGF) を精製に成功している。一方、これとは別に Gregory⁴³⁾ は、強力な胃酸分泌抑制物質の β -ウロガストロン (UG) をヒト尿から単離、同定した。 β -UG とマウス EGF (mEGF) の一次構造は極めて類似し、しかも両者は共通の生物作用、すなわち EGF が胃酸の分泌を抑制し、 β -UG が新生児マウスの眼瞼開裂を早期に起こすことから、彼は両者が同一種類の物質であろうと報

告した。以来、EGF/UG と総称されて現在に至っている⁴⁴⁾。

hEGF は分子量6,021、等電点4.5で、53個のアミノ酸からなるペプチドである。EGF の作用は極めて広範囲にわたり、また種特異性が少ない⁴⁴⁾⁴⁵⁾。EGF は上皮系細胞にとどまらず、各種の培養細胞に対して強い増殖作用を示す。すなわち各種の線維芽細胞、軟骨細胞、平滑筋細胞、乳腺上皮細胞、甲状腺細胞、肝細胞、グリア細胞等の DNA 合成や細胞増殖を ng/ml の濃度で促進する。しかし多くの場合、EGF 単独の作用はわずかでありインシュリン、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⁴⁶⁾。hEGF は顎下腺、十二指腸、甲状腺、膵、上部空腸、腎などに存在していることが知られており、免疫組織学的にもその局在が証明されている。しかし、その濃度はマウス顎下腺と比べると極めて低値で、ヒトにおける真の hEGF 産生部位は現在なお明らかではない⁴⁷⁾。hEGF は尿、血漿、唾液、髄液、乳汁などほとんどすべての体液に含まれている⁴⁸⁾。おそらく hEGF 産生細胞は全身に広く分布し、パラクリン系細胞と同じように、局所ホルモン様物質として合成、分泌されている可能性がある。EGF の作用は、標的細胞の細胞膜に存在する特異的 EGF リセプターと結合することから発現する。EGF リセプターは分子量約170,000の糖タンパクである⁴⁹⁾。遺伝子工学的に大量の EGF が入手可能となり、合成 EGF の治癒への試みがなされている⁵⁰⁾。

3. PDGF (血小板由来成長因子)

Balk⁵¹⁾ は、ニワトリ胚正常細胞が低カルシウム条件下で、血漿添加培地ではほとんど増殖しないが、血清添加培地では活発に増殖することを観察した。Kohler ら⁵²⁾ は、単離したヒト血小板からマウス 3T3 細胞の増殖を促進する物質を見出した。同じ頃、サル動脈の平滑筋細胞の増殖を研究していた Ross ら⁵³⁾ は、血清添加培地では増殖促進作用が著しく低いことを観察した。一方、Antoniades ら⁵⁴⁾ は、ヒト血清

からインシュリン様活性をもたないが、マウス 3T3 細胞の増殖促進作用を示す因子を精製した。ラジオイムノアッセイにより、この因子が血小板に多量に含まれていることがわかった。以来、この血小板中に存在し、血清の調整過程で血清中に移行し、線維芽細胞、平滑筋細胞、グリア細胞などの増殖を促進する因子を PDGF と呼ぶようになった。

PDGF は分子量約30,000、等電点9.8のペプチドである。分子量18,000のA鎖と分子量16,000のB鎖から成り立っており、A-Bのヘテロダイマー、A-A、B-Bのホモダイマーが存在する⁵⁵⁾⁵⁶⁾。PDGF は、血小板の細胞小器官である α -顆粒中に、幾種類かの他のペプチドとともに貯蔵されている⁵⁷⁾。現在では血小板以外にもマクロファージ、血管壁の内皮細胞、平滑筋細胞のいずれもが PDGF を産生することが知られている⁴⁸⁾。PDGF は線維芽細胞、グリア細胞、平滑筋細胞などの中胚葉由来の細胞に作用する。その作用は FGF と類似し、休止期の細胞に作用し適格状態 (competence) とする。しかし、これだけでは細胞は細胞周期を進行せず、さらに周期を進行 (progression) させるためにはインシュリン、IGF-I など progression factor が必要である⁴⁶⁾。従来は PDGF は内皮細胞や上皮由来の細胞には作用しないものと考えられていたが、現在では、場合によってはどちらの細胞にも作用することが確かめられている。PDGF の体の中での働きを理解するうえで重要なのは細胞の遊走促進作用である。PDGF は線維芽細胞や平滑筋細胞、好中球、単球などに作用してその遊走を促進する⁴⁸⁾。この作用により間接的に細胞増殖活性を高めると考えられている。

4. TGF (トランスフォーミング成長因子)

TGF の研究は1978年の sarcoma growth factor (SGF) の発見に始まる⁵⁸⁾。Todaro らのグループは Molony 肉腫ウイルスで形質転換したマウス 3T3 細胞が、その培養無血清培地中に正常細胞を悪性細胞様に転換させる作用をもつ

因子を多量産生していることを報告した。その後、各種の腫瘍細胞からもそのような作用を示す物質が見い出され、SGF を含めこの作用を示す物質をすべて包括して TGF と呼ぶようになった。ところがさらに検索が進んだ結果、TGF 活性を有する物質は正常組織や胎児その他からも見い出され、今日では TGF は必ずしも腫瘍に特異的なものとはいえなくなっている⁵⁹⁾。

TGF は分子量を異にするいくつかの分子種が報告されており、現在は α 、 β 、 γ の3つに分類されている⁴⁶⁾。

TGF- α は分子量約7,000のペプチドであり、各種の腫瘍細胞の培養メジウム、抽出物中に存在する。TGF- α はその構造が EGF と極めて類似しており、EGF の受容体と結合しうる⁶⁰⁾。TGF- α の作用の発現は EGF の受容体を介するものと考えられるが、それだけでは十分ではない。EGF 自体には TGF 活性がないからである⁴⁶⁾。EGF の結合部位以外にも TGF- α との結合部位が存在するとの報告がある⁶¹⁾。

TGF- β は分子量約25,000のペプチドである⁶²⁾。TGF- β は腫瘍組織の他ほとんどすべての正常組織中に存在する。ヒトでは血小板⁵⁸⁾、胎盤⁶³⁾に多量に含まれている。TGF- β は独自の受容体を有し各種の標的細胞に同定されているが、その物理化学的性質は未だ不明である。TGF- β は細胞の種類や、ともに添加する他の成長因子の種類によっては細胞増殖を抑制する (bifunctionality)⁶⁴⁾。したがって、TGF- β は細胞増殖の regulator ではないかとの仮説も提唱されている。

一方、 α 、 β に属さない新しいタイプの TGF- γ の存在が明らかにされている。TGF- γ は EGF の受容体と結合する作用はなく、かつその TGF 活性の発現に EGF の存在を必要としない⁴⁶⁾。

以上3種類の TGF は正常細胞に作用する軟寒天培地での増殖、すなわち anchorage-independent growth を惹起する特異的な一群の増殖因子である。

ま と め

1) 鼓膜穿孔治癒機転について, 実験病理学的研究を中心に文献的に考察した。

2) 鼓膜穿孔治癒機転との関連が示唆されている細胞増殖因子について文献的に考察した。

3) 鼓膜の各層に特異的に影響する物質を作らせることにより, 穿孔治癒の促進や, 穿孔閉鎖不全の予防に役立つような詳細な知見を得られる可能性がある。

稿を終えるにあたり, 御校閲を頂いた徳島大学医学部耳鼻咽喉科学教室小池靖夫教授に深謝致します。

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 of the tympanic membrane and its relationship to chronic perforations in man. *Tr Am Acad Ophth 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.
- 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 Ophth 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 the 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 membrane 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, Berghem L, Bloom GD, et al : Exogenous hyaluronic acid (Healon®) accelerates the healing of experimental myringotomies. *Auris Nasus Larynx* **12 Suppl 1** : s214~s215, 1985.
- 18) 朴 茂男 : 実験的鼓膜切開創の修復過程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, Petitjean M, Jones SC, et al : Epidermal growth factor binding and action on tympanic membranes. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **99** : 80～84, 1990.
- 23) 竹山 豊, 老木浩之, 村田清高, 他 : モルモット鼓膜穿孔の治癒過程における血小板由来成長因子 (PDGF) の影響. *Otol Jan* **1** : 164, 1991.
- 24) Mondain M, Saffiendine S and Uziel A : Fibroblast growth factor improves the healing of experimental tympanic membrane perforations. *Acta Otolaryngol (Stockh)* **111** : 337～341, 1991.
- 25) Alberti PW : Epithelial migration on the tympanic membrane. *J Laryngol* **78** : 808～830, 1964.
- 26) Litton WB : Epithelial migration in the ear. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* **240** : 1～39, 1968.
- 27) Saad EF : The epidermis of the drumhead in some otologic conditions. *Arch Otolaryngol* **103** : 387～388, 1977.
- 28) Makino K and Amatsu M : Epithelial migration on the tympanic membrane and external canal. *Arch Otorhinolaryngol* **243** : 39～42, 1986.
- 29) Laurent TC and Fraser JRE : The properties and turnover of hyaluronan. In *Functions of the Proteoglycans* (ed by Evered D and Whelan J). pp 9～29, Ciba Foundation, New York, 1986.
- 30) Gospodarowicz D and Moran JS : Growth factors in mammalian cell culture. *Ann Rev Biochem* **45** : 531～558, 1976.
- 31) Gospodarowicz D : Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortizone on 3T3 cell growth. *Nature* **249** : 123～127, 1974.
- 32) 坂本裕美 : ヘパリン結合性増殖因子ファミリーの構造と機能. *実験医学* **1** : 19～24, 1992.
- 33) 加藤洋一 : Fibroblast Growth Factor. 細胞成長因子 (日本組織培養学会編). 31～39頁, 朝倉書店, 東京, 1984.
- 34) 菅 幹雄 : Fibroblast Growth Factor. 細胞成長因子 part 2 (日本組織培養学会編). 15～20頁, 朝倉書店, 東京, 1987.
- 35) Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L, et al : Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocrinol Rev* **8** : 95～114, 1987.
- 36) Saksela O, Moscatelli D and Rifkin DB : The opposing effect of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta on the regulation of plasminogen activator activity in capillary endothelial cells. *J Cell Biol* **105** : 957～963, 1987.
- 37) O'Keefe EJ, Chiu ML and Payne RE Jr : Stimulation of growth of keratinocytes by basic fibroblast growth factor. *J Invest Dermatol* **90** : 767～769, 1988.
- 38) Baird A, Esch F, Mormède P, et al : Molecular characterization of fibroblast growth factor ; distribution and biological activities in various tissues. *Recent Prog Horm Res* **42** : 143～205, 1986.
- 39) Baird A and Ling N : Fibroblast growth factors are present in the extracellular matrix produced by endothelial cells in vitro ; implications for a role of heparinase-like enzymes in the neovascular response. *Biochem Biophys Res Commun* **142** : 428～435, 1987.
- 40) 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.
- 41) Cohen S : Isolation and biological effects of an epidermal growth-stimulating protein. *Metabolic Control Mechanisms in Animal Cells* (ed by Rutter WJ). pp 13～27, National Cancer Institute, Maryland, 1964.
- 42) Cohen S and Carpenter G : Human epidermal growth factor ; isolation and chemical and biological properties. *Proc Natl Acad Sci USA* **72** : 1317～1321, 1975.
- 43) Gregory H : Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. *Nature* **257** : 325～327, 1975.
- 44) 平田結喜緒 : 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.
- 45) 今井康雄: Epidermal Growth Factor. 細胞成長因子 part 2 (日本組織培養学会編). 10~15頁, 朝倉書店, 東京, 1987.
- 46) 封馬敏夫: 成長因子. ホルモンと臨 33: 1105~1111, 1985.
- 47) Hirata Y and Orth DN: Epidermal growth factor (urogastrone) in human tissues. J Clin Endocrinol Metab 48: 667~672, 1979.
- 48) 宮園浩平: 増殖因子のプロフィール. 細胞増殖因子のバイオロジー (一戸裕子編). 32~69頁, 羊土社, 東京, 1992.
- 49) Carpenter G, King LJr and Cohen S: Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro. Nature 276: 409~410, 1978.
- 50) 高久史磨: 増殖因子の臨床応用; 現状と展望. 蛋白質核酸酵素 36: 1406~1410, 1991.
- 51) Balk SD: Calcium as a regulator of the proliferation of normal but not of transformed chicken fibroblasts in a plasma-containing medium. Proc Natl Acad Sci USA 68: 271~275, 1971.
- 52) Kohler N and Lipton A: Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity. Exp Cell Res 87: 297~301, 1974.
- 53) Ross, R, Glomset JA, Kariya B, et al: A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 71: 1207~1210, 1974.
- 54) Antoniades HN, Stathakos D and Scher CD: Isolation of a cationic polypeptide from human serum that stimulates proliferation of 3T3 cells. Proc Natl Acad Sci USA 72: 2635~2639, 1975.
- 55) 加治和彦: Platelet-derived Growth Factor. 細胞成長因子 (日本組織培養学会編). 44~53頁, 朝倉書店, 東京, 1984.
- 56) 加治和彦: Platelet-derived Growth Factor. 細胞成長因子 part 2 (日本組織培養学会編). 20~25頁, 朝倉書店, 東京, 1987.
- 57) Kaplan DR, Chao FC, Stiles CD, et al: Platelet alpha-granules contain a growth factor for fibroblasts. Blood 53: 1043~1052, 1979.
- 58) DeLarco JE and Todaro GJ: Growth factors from murine sarcoma virus transformed cells. Proc Natl Acad Sci USA 75: 4001~4005, 1978.
- 59) 梅田 誠: Transforming Growth Factor. 細胞成長因子 (日本組織培養学会編). 99~105頁, 朝倉書店, 東京, 1984.
- 60) Marquardt H, Hunkapiller MW, Hood LE, et al: Rat transforming growth factor type I; structure and relation to epidermal growth factor. Science 223: 1079~1082, 1984.
- 61) Massague J, Czech MP, Iwata K, et al: Affinity labeling of a transforming growth factor receptor that does not interact with epidermal growth factor. Proc Natl Acad Sci USA 79: 6822~6826, 1982.
- 62) Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, et al: Transforming growth factor-beta in human platelets. J Biol Chem 258: 7155~7160, 1983.
- 63) Frolik CA, Dart LL, Meyers CA, et al: Purification and initial characterization of a type beta transforming growth factor from human placenta. Proc Natl Acad Sci USA 80: 3676~3680, 1983.
- 64) Roberts AB, Anzano MA, Wakefield LM, et al: Type beta transforming growth factor; a bifunctional regulator of cellular growth. Proc Natl Acad Sci USA 82: 119~123, 1985.

(別刷請求先: 嶋田高明
〒770 徳島市蔵本町2-50-1
徳島大学医学部耳鼻咽喉科学教室)