

①

スナネズミにおける中耳真珠腫に関する研究

ー換気チューブ挿入の影響と
真珠腫上皮の増殖能についてー

細川 雅史
弘前大学医学部耳鼻咽喉科教室
(主任：新川 秀一教授)

I 緒言

II 研究方法

- (1) 対象動物
- (2) ー① 耳管焼灼法
- ー② 換気チューブ挿入法
- ー③ BrdUの腹腔内投与
- ー④ パラフィン切片作製
- ー⑤ 免疫組織化学的染色

III 研究成績

- (1) 耳管閉塞動物における病理組織学的観察
- (2) 耳管閉塞と換気チューブ挿入動物における病理組織学的観察
- (3) 上記(1)(2)の真珠腫発生率
- (4) 真珠腫上皮増殖能についてBrdUを用いた免疫組織化学的観察
- (5) 小括

IV 考察

- (1) 耳管閉塞動物における真珠腫形成
- (2) 耳管閉塞動物における換気チューブ挿入による影響
- (3) 真珠腫上皮における過増殖の有無とその局在

V 結語

VI 参考文献

I 緒言

中耳真珠腫は中耳腔内に角化重層扁平上皮が侵入し様々な程度の炎症を伴い高度な骨破壊を来し中耳伝音系に重大な影響を与える疾患である。その成因としては、現在までに穿孔説 (Herbermann 1888¹⁾)、内陷説 (Pfaltz 1988²⁾, Bezold 1890³⁾)、基底細胞乳頭状増殖説 (Ruedi 1959⁴⁾, Chole & Tinling 1985⁵⁾)、上皮化生説 (Sade 1983⁶⁾)、移植説 (Diamant 1948⁷⁾) などが論ぜられているものの、統一した見解が得られていないのが現状である。真珠腫の成因を探る目的でラット、モルモット、チンチラ、ウサギ、スナネズミなどの動物を用いた実験的真珠腫モデルの作成が試みられてきた。真珠腫形成の方法としては、外耳道、中耳腔あるいは鼓膜に対して直接または間接的に化学的刺激、物理的刺激を加えるものが報告されている。化学的刺激としてはタール、オリーブ油、ベンツピレン、キニン、プロピレングリコールなどが使用され、物理的刺激としては外耳道の閉鎖、耳管咽頭口または耳管鼓室口に対して筋肉などを充填したり電気凝固するなどの処置が行われている (佐野 1981⁸⁾)。チンチラにおける真珠腫は、Wrightらが局所点耳薬剤であるCortisporin点耳液をチンチラの中耳腔に投与した結果、中耳粘膜に著明な炎症性変化に加えて粘膜のmetaplasiaを認め、2カ月以上経過を見た個体で真珠腫塊が発生し得ることを報告し (Wright 1985⁹⁾)、VassalliらがCortisporin点耳液の成分のうち溶媒であるpropylene glycol (PG) が中耳粘膜に高度の炎症性変化と共に真珠腫を形成すると報告 (Vassalli 1988¹⁰⁾) して以来様々な研究に用いられている。一方Mongolian gerbil (スナネズミ) は、自然経過中に真珠腫様病変を発生する唯一の動物として知られ、Choleらはその成獣において45.7%に真珠腫様病変が発生していたと報告している (Chole et al 1981¹¹⁾)。また、外耳道を結紮したスナネズミにおいては100%に真珠腫様病変が発生したとの報告もある (McGinn 1982¹²⁾)。しかもその進展様式、病理組織学的特徴はヒトの真珠腫と非常に近似している (Chole 1984¹³⁾)。Wolfmanらは上咽頭の耳管咽頭口を処置することにより弛緩部型の真珠腫を発生させたと報告し (Wolfman & Chole 1986¹⁴⁾)、この動物は真珠腫の実験モデル動物として注目されている (Fortuny et al 1993¹⁵⁾, Wolfman et al 1986¹⁶⁾, Chole et al 1985¹⁷⁾, Orisek et al 1987¹⁸⁾, Aberg et al 1990¹⁹⁾)。

真珠腫形成と中耳腔陰圧との関係についての研究は、Bezold³⁾の耳管の狭窄にその原因を求めた内陷説に始まり、疫学的調査では真珠腫の発生頻度は、米国Iowa州住民2,820,000人 (1970年) を対象にした報告で約6:100,000 (total annual incidence) であったのに対し (Harker 1977²⁰⁾)、口蓋裂患者における真珠腫の発生頻度について Severeid、Harkerらは、すべての患者が耳疾患の既往を持ちそのうち7.1%に中耳真珠腫が認められたと報告している (Severeid 1977²¹⁾, Harker 1982²²⁾)。そしてこのような口蓋裂患者に高率に真珠腫の発生を認めるのは、これら患者の90%以上に認められる耳管機能不全に由来するものであり、これにより惹起される中耳疾患のひとつの合併症であるとし、中耳腔陰圧との関連を示唆している。また、滲出性中耳炎からの真珠腫の発生頻度は、以前には Gundersen、Jordanなど高率な頻度の報告がされていたが

(Gundersen 1976²³⁾, Jordan 1963²⁴⁾), 最近では Tos, Kokko, Birk, McLelland, Berfoed、国内の報告としては大西など、その発生頻度は1.4~0%と自然発生と同等もしくは軽度の上昇を見るに過ぎない(Tos 1981²⁵⁾, Kokko 1976²⁶⁾, Birk 1976²⁷⁾, McLelland 1980²⁸⁾, Berfoed 1980²⁹⁾, 大西 1983³⁰⁾)。Meyerhoffらはチンチラの真珠腫モデルにおいて真珠腫形成には中耳腔陰圧は関与していないと報告しているが(Meyerhoff 1990³¹⁾)、今村らは同様のモデルで陰圧が関与している可能性について報告している(今村ら 1993³²⁾)。

また最近では、真珠腫上皮細胞の増殖能について様々なマーカーを用いて研究が行われている。サイトケラチン 16 (Broekaert et al 1992³³⁾, Bujia et al 1990³⁴⁾), Ki-67 (Mayot et al 1993³⁵⁾), transforming growth factor alpha (Schulz et al 1993³⁶⁾), 細胞接着因子 (Dallari et al 1994³⁷⁾), proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (Keizo Tsuruhara et al 1993³⁸⁾) などであるが、いずれの報告でも正常皮膚に比べその増殖能は亢進し過増殖を示すと考察している。5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) はDNAを構成しているチミジンの同族体で、分子量307.1のデオキシウリジンの誘導体であり、DNA合成能を有する細胞に取り込ませることができる。BrdUは取り込まれた細胞の放射線に対する感受性が高まることから、1960から1970年代にかけ放射線増感剤として脳腫瘍の治療などに用いられてきた(Szybalski 1974³⁹⁾, 星野孝夫 1968⁴⁰⁾)。1982年、GratznerによりBrdUに対するモノクローナル抗体が開発され(Gratzner 1982⁴¹⁾)、BrdUとこのモノクローナル抗体を用いることにより、DNA合成期(S期)に存在する細胞を免疫組織化学的に容易に同定することが可能となり、このBrdU取り込み細胞の分布から増殖能についての検討が可能となった。

本研究では、スナネズミにおいて一側耳管咽頭口を焼灼し病理組織学的変化および弛緩部型真珠腫の発生率を経時的に検討した。また、耳管咽頭腔の焼灼と同時に側頭骨骨包より換気チューブを挿入し、中耳腔圧などが真珠腫形成や進展に及ぼす影響について検討を行った。更に、真珠腫上皮における過増殖の有無と局在を明らかにするため、過増殖のマーカーであるBrdUを用い免疫組織化学的な検討を行った。

II 研究方法

(1) 対象動物

対象動物として、スナネズミ80匹を使用した。週齢は12~20週で外耳道及び鼓膜に異常所見のないことを確認し、これらを以下の2群に分けて検討を行った。

A群(耳管処置群) : スナネズミ40匹に対し耳管焼灼を行った。

B群(換気チューブ挿入群) : スナネズミ40匹に対し耳管焼灼と同時に側頭骨骨包より換気チューブを挿入・留置した。

(2) ー① 耳管焼灼法

スナネズミをペントバルビタール（ネンブタール、50mg/kg、腹腔内投与）麻酔し、外耳道および鼓膜の異常がないことを観察した後、Wolfmannら¹⁴⁾の方法を参考にして以下の方法で上咽頭右耳管開口部を焼灼した。尚、凝固器はセコム社製バイポーラ凝固器MS-20を使用した。

スナネズミの耳管は約1.8mmと極端に短く上咽頭耳管開口部は硬口蓋と軟口蓋の接合部より5mm後方に位置する（Daniel et al 1982⁴²⁾）。これを目安として、軟口蓋正中よりやや右側に注射針で5mm程度の切開を加え双極の凝固探索子（メラ社製メラバイポーラピンセットB05-17）を刺入し上咽頭右耳管咽頭口付近を焼灼した（図1）。軟口蓋を正中で切開し上咽頭耳管開口部を明視下に処置した方が確実であるが、この方法では処置後に経口摂取不能となり7日から10日で死亡したとの報告¹⁴⁾があり、耳管の処置は経口蓋的に行った。

ー② 換気チューブ挿入法

B群（換気チューブ挿入群）に対して、耳管の焼灼と同時に以下の方法で側頭骨骨包背側に中耳腔内の換気を目的としたチューブを挿入し留置した。チューブはKOKEN社製鼓膜ドレーンチューブBタイプを2つ接着して作製し、その外径、内径、高さはそれぞれ3,2,4mmであった。耳管焼灼の後、耳介後方に約10mmの切開を加え側頭骨骨包を露出し、直径3.5mmに開窓し換気チューブを挿入、留置し、シアノアクリレート系接着剤（アロンアルファ[®]）にて固定した（図2）。換気チューブの開存は頻回の肉眼的観察と2週間毎の手術用顕微鏡下観察によった。

A,B群間における真珠腫発生率の検討は、T検定にて行った。

ー③ BrdUの腹腔内投与

免疫組織化学的検討にはAmersham社製の細胞増殖検出キットを使用した。標識試薬はBrdUとフルオロデオキシウリジン（5-fluoro-2'-deoxyuridine）の混合液で、BrdUはチミジン類似構造を持ち、DNA合成期（S期）にある細胞に取り込まれDNAを標識する。フルオロデオキシウリジンはチミジン酸合成阻害剤であり、内在性チミジンによる競合を抑制してBrdUの取り込みを促進させる働きがある。この標識試薬をA,B両群とも断頭2時間前に1ml/100g（BrdU3mg/1ml）腹腔内投与した。

ー④ パラフィン切片作製

A,B群ともに処置後2、4、6、8、10週で外耳道および鼓膜を手術用顕微鏡下に観察した後、ネンブタールの大量腹腔内投与を行い、断頭し側頭骨を採取した。なお、

断頭の際、上咽頭耳管開口部が癒着化していることを確認した。採取した側頭骨は85%エタノールに48時間浸して固定した後、顕微鏡下に鼓膜および外耳道を観察した(図3,4)。10% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) と7.5% polyvinylpyrrolidone (PVP) を含む0.1mol/L Tris hydrochloride buffer (pH7.0)に4℃で約2週間浸し脱灰した。0.1mol/L Tris hydrochloride buffer (pH7.0)にて24時間洗浄し脱脂、脱水後にパラフィン包埋し、厚さ5 μ mで薄切して連続切片を作成した。

⑤ 免疫組織化学的染色

作成した切片は以下に示すAmersham社製の細胞増殖検出キットに従い免疫組織化学的に染色した。また、連続切片は5枚毎にHematoxylin-Eosin染色(以下H-E染色と略す)し光学顕微鏡下に観察した。

- 1) 脱パラフィン: キシレン 5分間3回、
99%・95%・90%・70%・50%エタノール 各1分間
- 2) Phosphate-buffered saline(PBS)pH7.25洗浄 5分間3回
- 3) 一次抗体(抗BrdUモノクローナル抗体,100倍) 室温 60分間
- 4) PBS pH7.25 洗浄 5分間3回
- 5) 二次抗体(ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体,66.7倍) 室温 30分間
- 6) PBS pH7.25 洗浄5分間3回
- 7) 0.05% 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB)およびH₂O₂による発色
室温 7分間
- 8) PBS pH7.25 洗浄5分間3回
- 9) 蒸留水洗浄 5分間2回
- 10) 脱水、透徹、封入

Ⅲ 研究成績

(1) 耳管閉塞動物(A群)における病理組織学的観察

各週数における個々の側頭骨所見は表1-a,bに示した。

本動物モデルにおける真珠腫は、鼓膜上皮が中耳腔側へ陥凹しただけのretraction pocketは含めず、角化重層扁平上皮が中耳腔に侵入し肉芽組織を伴い耳小骨破壊が認められたものを真珠腫と定義した。

この定義に従ったところ本群では、真珠腫形成が40耳中25耳に認められた。これらの中耳腔には炎症性細胞を含む滲出液を認め、鼓膜弛緩部の鼓膜皮膚層が著しく肥厚し、粘膜層側には肉芽組織の増生を伴い、中耳腔へ陥凹、進展し、耳小骨の骨破壊が観察された(図5,6)。10週および8週断頭例では著しく耳小骨が破壊され、真珠腫上

皮は中耳腔内へ深く進展していた。しかしながら6,4,2週断頭例では耳小骨破壊、真珠腫上皮の中耳腔内進展ともに軽度であった。また、外耳道におけるkeratin debrisの蓄積は生存週数の多い動物ほど高度であった。

真珠腫が観察されない15耳では、2、4週と早期に断頭した10耳全例で炎症性細胞を含む滲出液が貯留していた(図7)。このうち6例には弛緩部の鼓膜肥厚が観察され、この肥厚は鼓膜皮膚層の肥厚とともに鼓膜粘膜層側では炎症性細胞の浸潤を伴った肉芽組織の増生が認められた。この鼓膜肥厚および肉芽組織は断頭週数が進むに従いその程度、頻度ともに高い傾向が認められ、耳小骨破壊はないものの鼓膜が肥厚するに従い徐々に中耳腔側へ陥凹していた。肥厚のない鼓膜が中耳腔に陥凹していた例(retraction pocket)は40耳中3耳のみであり(図8)、陥凹鼓膜は大部分が肥厚していた(図9)。外耳道におけるkeratin debrisの蓄積は、鼓膜肥厚を認めた10例中7例に観察され、逆にkeratin debrisが蓄積し鼓膜肥厚がなかったものは2例に過ぎなかった。

(2) 耳管閉塞と換気チューブ挿入動物(B群)における病理組織学的観察

各週数における個々の側頭骨所見は表2-a,bに示した。

本群では真珠腫が40耳中6耳に認められ、その病理組織学的特徴は耳管閉塞動物と同様であった。その鼓室内には炎症性細胞を含む滲出液が貯留し、また弛緩部鼓膜肥厚を伴い中耳腔へと進展、耳小骨破壊や外耳道のkeratin debrisの蓄積が観察された。しかしながら、これら6例の換気チューブ周囲では異物反応による肉芽組織の増生や骨新生が著明であり、肉眼的にチューブは開存していたが病理組織学的には閉塞されていた。

真珠腫を形成しなかった34耳では病理組織学的変化は極めて軽度であった(図10)。炎症性細胞を含む滲出液の貯留は5耳で観察され、鼓膜肥厚が13耳に、外耳道のkeratin debrisの蓄積が9耳に観察されたがすべて軽度であった。また、換気チューブ周囲においてはチューブに対する異物反応として肉芽組織や骨新生が観察されたものの、病理組織学的に換気チューブの閉塞は認められなかった。

(3) 処置後週数別の真珠腫発生率の変化

A群では処置後10週で断頭した10例中8例に真珠腫形成が認められ、その発生率は80%であった。以下8、6、4、2週のそれぞれの発生率は80、70、40、0%であった(図11)。

一方、B群では処置後10週で断頭した10例中2例に真珠腫形成が認められ、その発生率は20%であった。以下8、6、4、2週のそれぞれの発生率は20、10、20、0%であった。しかし、B群において真珠腫形成を認めた6耳の換気チューブは全例病理組織学的に閉塞されており、従って換気チューブが開存している耳において真珠腫は形成

されなかった(図11)。

処置後週数別に真珠腫発生率を比較すると、10、8、6週においてB群はA群に比し有意に発生率が低かった($p < 0.01$)。

(4) 真珠腫の増殖能についてBrdUを用いた免疫組織化学的観察

角化重層扁平上皮の増殖能は、正常群(表3-a)、鼓膜肥厚群(表3-b)、真珠腫群(表3-c)の3群に分けて検討した。正常群(表3-a)は鼓膜、中耳腔に明らかな炎症性変化を認めないものとし、鼓膜肥厚群は中耳腔への滲出液の貯留、鼓膜の肥厚、肉芽組織といった炎症性変化を認めるものの、角化重層扁平上皮は中耳腔内まで侵入しておらず真珠腫の前段階と考えられるものとした。それぞれにおいて鼓膜または真珠腫上皮、外耳道-鼓膜移行部、骨部外耳道の部位でその基底細胞100個に対するBrdU取り込み細胞の数を測定した。

正常群では鼓膜にほとんどBrdU取り込み細胞は認められず(表3-a,図12-B)、外耳道-鼓膜移行部、骨部外耳道では基底細胞層の核が散在性に染色されBrdUの取り込みが認められた(表3-a,図12-A,C,D)。鼓膜肥厚群では肥厚鼓膜に多数のBrdU取り込み細胞(BrdU陽性細胞)が認められ(表3-b,図13-B)、正常鼓膜に比べ有意な陽性細胞の増加が認められた($p < 0.01$)。この群の外耳道-鼓膜移行部でも正常と比べ有意なBrdU陽性細胞の増加を認めたものの($p < 0.01$)、骨部外耳道においては有意差はなかった(表3-b,図13-A,C,D)。

真珠腫上皮においてはBrdU陽性細胞はさらに増加し、基底細胞層のみならず有棘細胞層にもBrdU陽性細胞が認められた(表3-c,図14-B)。本モデルにおける真珠腫上皮は鼓膜皮膚層である角化重層扁平上皮が中耳腔に侵入したものであり、正常鼓膜との間で比較検討を行ったところ、陽性細胞の有意な増加を認めた($p < 0.01$)。この群の外耳道-鼓膜移行部および骨部外耳道と正常群を比較したところ、BrdU陽性細胞に関して前者では有意差を認めたものの($p < 0.01$)、後者では差はなかった(表3-c,図14-A,C,D)。

真珠腫群と鼓膜肥厚群で比較検討すると、外耳道-鼓膜移行部、骨部外耳道ではBrdU陽性細胞の明らかな出現率の違いは認められなかった。しかし、真珠腫上皮と肥厚鼓膜の間に有意差を認め($p < 0.05$)、真珠腫上皮においてBrdU取り込み細胞は最も多く出現した。

(5) 小括

1) 耳管閉塞動物では、初期より炎症細胞を含む滲出液の貯留など中耳腔内の炎症が観察され、鼓膜の肥厚、肉芽組織の増生を伴い角化重層扁平上皮は中耳腔へ陥凹、侵入し耳小骨破壊を伴い真珠腫形成が認められた。また、真珠腫形成が認められた耳

はすべて外耳道にkeratin debrisが蓄積していた。

2) B群では40耳中6耳に真珠腫形成が認められたものの、これらの換気チューブ周囲には肉芽組織や骨新生が認められ、病理組織学的にはチューブは閉塞されていた。しかしながら、換気チューブが病理組織学的に開存している例では真珠腫形成は1例も認められず、その中耳腔の病理組織学的変化は極めて軽微であった。

3) A群(耳管処置群)では、真珠腫の発生率は4週から6週にかけて急激に増加し6、8、10週の発生率は70、80、80%であった。B群(換気チューブ群)ではその発生率は10から20%と低値を示し、6、8、10週の各発生率は有意差を認めた($p < 0.01$)。

4) 真珠腫上皮では正常鼓膜、肥厚鼓膜と比較し有意にBrdU陽性細胞の増加が認められた。

IV 考察

(1) 耳管閉塞動物における真珠腫形成

スナネズミは、Choleらの報告¹¹⁾以来、真珠腫の動物モデルとして様々な研究に用いられ報告^{12) 13) 14) 15) 16) 17) 18) 19)}されている。しかしながら、これらの真珠腫モデルはすべて外耳道真珠腫であり、ヒトにおいては鼓膜弛緩部や後上象限型の陥凹型真珠腫がほとんどで、これらの本態を研究する上ではいささか問題があると思われる。しかしWolfmanら¹⁴⁾は上咽頭の耳管咽頭口を処置することにより弛緩部型の真珠腫を発生させることに成功した。この報告では、凝固チップを軟口蓋の正中に刺入して電気凝固することにより両側の耳管咽頭口を閉塞し凝固後4週目には8耳中4耳に6週目では8耳中4耳に16週目には8耳中6耳に真珠腫が発生したと報告している。本研究では軟口蓋の正中ではなくやや右側を処置し、さらに軟口蓋を約10mm切開し右耳管咽頭口に対してほぼ確実な焼灼を行った。

本研究では耳管咽頭口焼灼の初期変化として、まず中耳腔に炎症細胞を含む滲出液の貯留を認めた。これは耳管の焼灼により耳管が物理的に閉塞され、加えて粘液線毛系による粘液線毛輸送機構が破綻し中耳腔の換気や排泄を阻害し、その結果中耳腔に炎症が惹起されたと考えられる。この炎症性変化に引き続き、鼓膜弛緩部では鼓膜肥厚が認められた。この肥厚は、鼓膜皮膚層の肥厚とともに鼓膜粘膜層側では炎症細胞浸潤を伴った肉芽組織の増生が認められた。中耳腔内の炎症性刺激が表皮細胞の細胞分裂を活性化させたとの報告や(Reijnen 1971⁴³⁾)、また佐野⁸⁾は弛緩部型真珠腫の場合、中耳腔陰圧のみで上皮の中耳腔内への進展を説明するのは無理があり、鼓膜弛緩部上皮が中耳腔内へactiveなpowerをもって進展するには炎症による細胞分裂能の亢進が関係していると報告している。またHuangらは真珠腫の進展は角化上皮基底細胞の増殖と分化によって進み基底細胞の増殖と分化には炎症性の肉芽が関与しているとし

ている (Huang 1988⁴⁴⁾)。最近では細胞増殖の亢進にtransforming growth factor alpha等のサイトカインが関与しているとの報告³⁶⁾もある。本研究においても中耳腔内の炎症が刺激となって種々のサイトカイン等による反応が引き起こされ上皮の細胞増殖の亢進が引き起こされている可能性が示唆された。また、Sadeはretraction pocketの表皮のmigrationは障害されkeratin debrisの蓄積が起りやすいことを報告し、Pfaltzはそのkeratin debrisの蓄積に感染が伴うようになると、endotoxinなどの作用により扁平上皮の乳頭増殖をきたし真珠腫に進展する可能性について報告し、Tosは鼓膜弛緩部由来の真珠腫について、最初にretractionが起りそこにkeratin debrisの蓄積、感染が伴い鼓膜表皮の乳頭状増殖による表皮の侵入をもたらすと報告している (Sade 1979⁴⁵⁾, Tos 1988⁴⁶⁾)。本研究においては初期に明らかなretraction pocketを認めないものの、真珠腫形成を認めた例はすべて外耳道にkeratin debrisの蓄積を認め、keratin debrisの蓄積が鼓膜上皮層の細胞増殖の亢進に関与している可能性が示唆された。ではなぜその変化が弛緩部に限局するのか。以前より鼓膜弛緩部の固有層には疎な膠原繊維しか存在しないため陰圧に対する形態学的な影響を受けやすいといわれている。しかし本研究では鼓膜の陥凹はその肥厚の後に認められており、陰圧による物理的な影響の可能性は少ないものと推察される。また鼓膜において弛緩部には血管が豊富に存在するため炎症性変化が起り易いとの推察も可能であるが詳細は今後の課題と思われた。肥厚した鼓膜は肉芽組織と共に増殖し骨破壊を伴って中耳腔へ陥凹、侵入をはじめ、真珠腫を形成するものと推察された。この一連の変化は耳管咽頭口焼灼後約2週から6週で起り、6週以降では77%以上に真珠腫が認められた。この発生率はWolfmanらの報告¹⁴⁾よりもやや高く、より確実に耳管咽頭口を焼灼できたためと推察された。また、本動物モデルはヒトの中耳真珠腫の大部分を占める弛緩部型真珠腫と極めて類似した病理組織学的特徴が認められた。

(2) 耳管閉塞動物における換気チューブ挿入による影響

耳管閉塞動物の処置後6週以降において30例中23例 (77%) に真珠腫形成が認められたのに対し、換気チューブを挿入することによって30例中5例 (17%) と有意に真珠腫の形成が抑制されたことは、真珠腫形成において耳管の閉塞による換気障害が重要な役割を演じているものと推察できる。1890年にBezold³⁾は真珠腫形成の成因として耳管の狭窄にその原因を求め、耳管が閉塞すると中耳腔は陰圧になり、鼓膜は内陷する。特に繊維層のない弛緩部は上鼓室に強く内陷することになり、そこに剥脱表皮が蓄積し感染が起れば穿孔を来し表皮は穿孔を通して上鼓室に侵入し真珠腫を形成すると報告し、真珠腫の成因を中耳腔の陰圧に求めた内陷説を唱えた。その後Wittmaackは弛緩部の陥凹を耳管の狭窄だけでなく上鼓室・乳突洞口は中鼓室以下と耳小骨周囲の粘膜や結合組織により分けられ、幼少時の中耳炎などによる肥厚や肉芽化、また胎生結合組織の遺残などにより、上鼓室は中鼓室と遮断されるため気胞化の悪い上鼓室は陰圧となり鼓膜の弛緩部は陥凹すると報告している (Wittmaack 1933⁴⁷⁾)。ま

たTumarkin、Sade⁴⁵⁾、Pfaltz²⁾、Tos⁴⁶⁾と、いずれも弛緩部の陥凹がありそこに感染が惹起されるとし弛緩部陥凹の重要性について報告している(Tumarkin 1961⁴⁸⁾)。今回の結果も耳管閉塞に基づく中耳腔の換気障害が重要な役割を果たしており内陷説を支持するものと思われる。しかしながら組織学的な検討では中耳腔の炎症性細胞を伴った滲出液の貯留、鼓膜肥厚が先行し、弛緩部陥凹は最終的な変化として観察された。このことは換気障害による中耳腔の陰圧が直接的に真珠腫の形成に関与したとは考えにくく、滲出液の貯留、排泄の遅延といった間接的な役割を果たしているものと推察された。一方動物モデルを用いた研究では、Meyerhoffら³¹⁾はチンチラのsuperior bullaに換気チューブを挿入した個体においてもpropylene glycol (PG)による真珠腫の形成が認められたとして、この真珠腫動物モデルにおける真珠腫形成には中耳腔陰圧は関与していないと報告している。それに対し今村ら³²⁾は、同様にチンチラのモデルで鼓膜所見とティンパノメトリーの測定を経時的に行い、PG投与後初期には滲出性中耳炎様の病態が観察され、PGによる耳管粘膜に対する起炎作用とその粘稠性に由来する物理的な閉塞との両因子による耳管機能障害が出現し、耳管機能障害に基づく中耳腔内の陰圧による鼓膜の伸展、陥凹および中耳腔内のクリアランス低下によるPGの鼓室内貯留の遷延による炎症の長期化が起こるものと推察している。これらの報告は中耳腔内に先ず炎症を惹起させており本研究と単純に比較はできないものの、真珠腫形成には中耳腔陰圧が直接的に作用しているというよりも、中耳腔の炎症の存在が必要であると言う点で今回の結果と一致するものと考えられた。

今後、中耳腔に陰圧が負荷されない状態で中耳腔に炎症を惹起させる様な実験、たとえばスナネズミの骨包に換気チューブを挿入した状態でPGを用い炎症を惹起させるなどの実験が必要であろうと考えられた。

(3) 真珠腫における過増殖の有無とその局在

BrdUはDNAを構成しているチミジンの同族体で、DNA合成能を有する細胞に取り込ませることができる。Gratznerら⁴¹⁾によりBrdUに対するモノクローナル抗体が開発され、DNA合成期(S期)に存在する細胞はBrdU取り込み細胞として描出する事が可能となった。つまりBrdU取り込み細胞の出現の増加は細胞分裂周期のDNA合成期(S期)の細胞の増加を意味し、その部位における細胞増殖能の亢進(過増殖)があるものと推察することが出来る。本研究において正常鼓膜および外耳道皮膚に比べ有意に真珠腫上皮や外耳道・鼓膜移行部上皮でBrdU取り込み細胞が増加したことは、この部位における細胞増殖能が極めて亢進していることを示していると思われ、従って真珠腫上皮および外耳道・鼓膜移行部上皮は中耳腔の炎症性刺激により活発な細胞増殖を繰り返し、角化重層扁平上皮が中耳腔へ陥凹、侵入して行くものと推察された。ヒトの真珠腫に対するBrdUを用いた検討では、木場らは手術の際に採取したヒト真珠腫組織、外耳道皮膚および耳後部皮膚に培養液内でBrdUを取り込ませ検討を行っている(木場ら 1994⁴⁹⁾)。この報告ではそれぞれの部位の間に有意差を認めず、真珠腫上

皮は外耳道皮膚、耳後部皮膚に比べ増殖能が亢進しているとはいえないと報告している。しかしヒトの真珠腫上皮を用いた研究の問題点として、組織採取直前まで十分な抗生剤投与など治療が施されている場合が多く、活動期の真珠腫上皮の状態を反映していない可能性が考えられる。サイトケラチン 16^{33) 34)}、Ki-67³⁵⁾、transforming growth factor alpha³⁶⁾、細胞接着因子³⁷⁾といったその他の過増殖のマーカーでは、正常皮膚に比べ真珠腫上皮は過増殖を示すと報告されており、今回の結果もこれらの報告を支持するものと考えられた。

現在、真珠腫上皮に存在するランゲルハンス細胞が免疫学的に活性を有する報告や、上皮組織内にIL 2 receptorを持った活性化T細胞や活性化マクロファージも検出され、また様々なサイトカインの検出が進み、増殖能亢進のメカニズムが解明されつつある。今後スナネズミによる実験的真珠腫を用い、更に増殖能亢進のメカニズムの解析を行っていきたいと考えている。

V 結語

(1) スナネズミの耳管咽頭口を焼灼することにより処置後6週以降では、30匹中23匹の77%に真珠腫の発生を認めた。病理組織学的な観察より真珠腫の形成には中耳腔の炎症が関与しているものと推察された。

(2) 換気チューブを挿入することにより真珠腫形成は抑制され、このことは耳管機能障害による中耳腔陰圧の関与が示唆されたが、病理組織学的観察から直接的な陰圧作用とは考え難く、真珠腫形成には中耳腔の炎症が重要な役割を演じているものと推察された。

(3) 真珠腫上皮はBrdU陽性細胞が多数出現し、細胞増殖能の亢進した状態にあるものと推察された。真珠腫形成が認められた例では外耳道鼓膜移行部における細胞増殖能も亢進し、真珠腫の形成や進展に関与している可能性が示唆された。

VI 参考文献

- 1) Herbermann, J.: Zur Entstehung des Cholesteatomas des Mittelohrs. Arch Ohrenh., 27: 42-50, 1888.
- 2) Pfaltz, C.: Retraction pocket and development of cholesteatoma in children. Adv Oto-Rhino-Laryng., 40: 118-123, 1988.
- 3) Bezold, F.: Perforation of Shrapnell's membrane and occlusion of the tubes. Arch. Otolaryngol., 19: 232-254, 1890.

- 4) Ruedi, L.: Cholesteatoma formation in the middle ear in animal experiments. *Acta Otolaryngol.*, 50: 233-242, 1959.
- 5) Chole, R., Tinling, S.: Basal lamina breaks in the histogenesis of cholesteatoma. *Laryngoscope.*, 95: 270-275, 1985.
- 6) Sade, J., Babiacki, A., Pinkus, G.: The metaplastic and congenital origin of cholesteatoma. *Acta Otolaryngol.*, 96: 119-129, 1983.
- 7) Diamant, M.: Cholesteatoma and chronic otitis. *Arch Otolaryngol.*, 47: 61-67, 1948.
- 8) 佐野真一: 実験的中耳真珠腫—とくに上鼓室型真珠腫の成因に関して—, 耳展, 補2: 129-171, 1981.
- 9) Wright, C. G., Meyerhoff, W. L., Burns, D. K.: Middle ear cholesteatoma. An animal model. *Am J Otolaryngol.*, 6: 327-341, 1985.
- 10) Vassalli, L., Harris, D. M., Gradini, R. et al.: Inflammatory effects of topical antibiotic suspensions containing propylene glycol in chinchilla middle ears. *Am J Otolaryngol.*, 9: 1-5, 1988.
- 11) Chole, R. A., Henry, K. R., McGinn, M. D.: Cholesteatoma; spontaneous occurrence in the mongolian gerbil *Meriones unguiculatus*. *Am J Otolaryngol.*, 2: 204-210, 1981.
- 12) McGinn, M., Chole, R., Henry, K.: Cholesteatoma; Experimental induction in the mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Acta Otolaryngol.*, 93: 61-67, 1982.
- 13) Chole, R.: Cellular and subcellular events of bone resorption in human and experimental cholesteatoma: the role of osteoclasts. *Laryngoscope.*, 94: 76-95, 1984.
- 14) Wolfmann, D., Chole, R.: Experimental retraction pocket cholesteatoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol.*, 95: 639-644, 1986.
- 15) Fortuny, J. C., Palomar, V. M., Nogues, A.: Bacterial flora in the external ear canal and in induced cholesteatoma in the mongolian gerbil. *Ann Otol Rhinol Laryngol.*, 102: 559-561, 1993.
- 16) Wolfmann, D., Chole, R.: Osteoclast stimulation by positive middle-ear air pressure. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.*, 112: 1037-1042, 1986.
- 17) Chole, R., McGinn, M., Tinling, S.: Pressure induced bone resorption in the middle ear. *Ann Otol Rhinol Laryngol.*, 94: 165-170, 1985.
- 18) Orisek, B., Chole, R.: Pressure extended by experimental cholesteatomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.*, 113: 386-391, 1987.
- 19) Aberg, B., Bagger-Sjoberg, D., Edstrom, S., et al.: A comparative study of enzyme histochemical features in the gerbilline and human cholesteatoma. *Acta Otolaryngol (Stockh)*, 109: 130-136, 1990.
- 20) Harker, L. A.: Cholesteatoma: An incidence study. In: Cholesteatoma. First International conference. ed. by McCabe, B. F., Sade, J. and Abramson, M., Aesculapius Publishing Company, Birmingham, AL: 308-310, 1977.
- 21) Severeid, L. R.: Development of cholesteatoma in children with cleft palate: A

longitudinal study. In : Cholesteatoma. First International conference. ed. by McCabe, B. F., Sade, J. and Abramson, M., Aesculapius Publishing Company, Birmingham, AL.: 287-292, 1977.

22) Harker, L. R., Severeid, L. R.: Cholesteatoma in the cleft palate patient. In : Cholesteatoma and Mastoid Surgery, ed. by Sade, J., Kugler, Amsterdam, : 37-40, 1982.

23) Gundersen, T., Tonning, F. M.: Ventilating tubes in the middle ear. Long-term observation. Arch Otolaryngol., 102: 195-199, 1976.

24) Jordan, R. E.: Secretory otitis media in etiology of cholesteatoma. Arch Otolaryngol., 78: 261-265, 1963.

25) Tos, M.: Relationship between secretory otitis in childhood and chronic otitis and its sequelae in adults. J Laryng Otol., 95: 1011-1022, 1981.

26) Kokko, E., Palva, T.: Clinical results and complication of tympanostomy. Ann Otol Rhino Laryng., 85, Suppl. 25: 277-279, 1976.

27) Birk, H. G., Mravec, J. J.: Myringostomy for middle ear effusions : Results of a two year study . Ann Otol Rhino Laryng., 85, Suppl. 25: 263-267, 1976.

28) McLelland, C. A.: Incidence of complications from use of tympanostomy tubes. Arch Otolaryng., 106: 97-99, 1980.

29) Barfoed, C., Rosborg, J.: Secretory otitis media. Long-term observation after treatment with grommets. Arch Otolaryng., 106: 553-556, 1980.

30) 大西俊郎, 真崎正美, 深見雅也, 他 : 小児滲出性中耳炎経過中における中耳真珠腫の発現. 耳鼻咽喉科, 55: 691-696, 1983.

31) Meyerhoff, W. L., Wright, C. G., Gerken, G. M.: Effects of middle ear ventilation on cholesteatoma development in experimental animals. Acta Otolaryngol (Stockh.), 110: 279-285, 1990.

32) 今村俊一, 今村まゆみ, 橋本かおり, 他 : 実験的中耳真珠腫動物モデル (第2報) . Otol Jpn., 3: 334-339, 1993.

33) Broekaert, D., Couck, P., Lepercque, S., et al.: Immunohistochemical analysis of the cytokeratin expression in middle ear cholesteatoma and related epithelial tissue. Ann Otol Rhinol Laryngol., 101: 931-938, 1992.

34) Bujia, V., Schilling, A., Holly, M., et al.: Hyperproliferation-associated Keratin Expression in Human Middle Ear Cholesteatoma. Acta Otolaryngol (Stockh), 113: 364-368, 1993.

35) Mayot, D., Bene, M. C., Perrin, C., et al.: Restricted expression of Ki-67 in cholesteatoma epithelium. Arch Otolaryngol Head Neck Surg., 119: 656-658, 1993.

36) Schulz, P., Bujia, J., Holly, A., et al.: Possible autocrine growth stimulation of cholesteatoma epithelium by transforming growth factor alpha. Am J Otolaryngol., 114: 82-87, 1993.

37) Stefano, Dallari, Andrea, Cavani, Giuseppe, Bergamini, et al.: Integrin Expression In

Middle Ear Cholesteatoma. *Acta Otolaryngol (Stockh)*, 114:188-192, 1994.

38) Tsuruhara, K., Iwano, T., Ushiro, K., et al.: Proliferative activity of cholesteatoma epithelium. *Cholesteatoma and Mastoid Surgery*, 223-226, 1993.

39) Szybalski, W.: X-ray sensitization by halopyrimidines. *Cancer Chemother. Rep.*, 58: 539-557, 1974.

40) 星野孝夫: BAR療法による悪性脳腫瘍の治療. *脳と神経*, 20: 601-611, 1968.

41) Gratzner, H. G.: Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine : a new agent for detection of DNA replication. *Science*, 218: 474-475, 1982.

42) Daniel, H., Fulghum, R., Brinn, J., et al.: Comparative anatomy of eustachian tube and middle ear cavity in animal models for otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol.*, 91: 82-89, 1982.

43) Reijnen, C. J. H.: The healing pattern of the ear drum membrane. *Acta Oto Sup.*, 207, 1971.

44) Hung, C. C., Yi, Z. X., Chao, W. Y.: Effect of granulation tissue conditioned medium on the in vitro differentiation of keratinocytes. *Arch Otorhinolaryngol.*, 254: 325-329, 1988.

45) Sade, J.: The atelectatic ear, In Sade J, editor : *Secretory otitis media and its sequelae*, New York, 1979, Churchill Livingstone, Inc.

46) Tos, M.: Incidence, etiology and pathogenesis of cholesteatoma in children. *Adv. Oto-Rhino-Laryngo.*, 40: 110-117, 1988.

47) Wittmaack, K.: Wie entsteht ein reines cholesteatoma ? *Arch Otorhinolaryngol.*, 137: 306-323, 1933.

48) Tumarkin, A.: Pre-epidermosis. *J. Laryngol. Otol.*, 75: 487-500, 1961.

49) 木場玲子, 八木昌人, 田部浩生, 他: 真珠腫表皮組織の細胞増殖能. *日耳鼻*, 97:1794, 1994.

N.O.	外耳道所見	鼓膜所見	中耳腔所見			真珠腫
	keratin debris	肥厚	滲出液	肉芽組織	骨破壊	
A群(10w) 1	+++	+++	+	++	+	+
2	+++	+++	+	+++	+	+
3	+++	+++	+	+++	+	+
4	+++	+++	+	+++	+	+
5	+++	++	+	++	+	+
6	+++	++	+	++	+	+
7	+++	+	+	++	+	+
8	+++	+	+	+	+	+
9	-	++	-	-	-	-
10	-	+	-	-	-	-
A群(8w) 1	+++	+++	+	+++	+	+
2	+++	+++	+	+++	+	+
3	+++	+++	+	+++	+	+
4	++	+++	+	+	+	+
5	+++	+++	+	+	+	+
6	+++	++	+	++	+	+
7	+++	++	+	++	+	+
8	++	+	+	++	+	+
9	+	+	+	+	-	-
10	++	+	-	-	-	-

表 1-a 耳管処置群（10週～8週）の側頭骨所見

外耳道所見としてkeratin debrisの蓄積を認めるものを+とし、充満しているものを+++その中間を++とした。中耳腔所見として、滲出液の貯留は固定前に骨包を解放しているため+または-で評価した。肉芽組織の増生は鼓膜裏に局限して認めるものを+とし、中耳腔内に充満しているものを+++その中間を++とした。耳小骨破壊は+または-で評価した。真珠腫形成は、鼓膜が肥厚し鼓膜粘膜層側に肉芽組織の増生を伴い角化重層扁平上皮が中耳腔へ侵入し耳小骨破壊を認めるものを真珠腫とし+とした。

N.O.	外耳道所見	鼓膜所見	中耳腔所見			真珠腫	
	keratin debris	肥厚	滲出液	肉芽組織	骨破壞		
A群(6w)	1	++	+++	+	++	+	+
	2	+++	+++	+	+++	+	+
	3	+++	+++	+	+++	+	+
	4	+++	+++	+	+	+	+
	5	++	++	+	++	+	+
	6	++	++	+	++	+	+
	7	-	+	+	+	+	+
	8	+	+	-	-	-	-
	9	-	+	-	+	-	-
	10	-	-	-	-	-	-
A群(4w)	1	++	+++	+	+++	+	+
	2	+	+++	+	++	+	+
	3	+	+++	+	+	-	-
	4	-	-	+	++	-	-
	5	+	+	+	-	-	-
A群(2w)	1	+	+	+	+	-	-
	2	+	+	+	-	-	-
	3	+	-	+	+	-	-
	4	+	-	+	-	-	-
	5	-	-	+	-	-	-

表 1-b 耳管処置群（6週～2週）の側頭骨所見

N.O.	外耳道所見	鼓膜所見	中耳腔所見			真珠腫
	keratin debris	肥厚	滲出液	肉芽組織	骨破壊	
B群(10w) 1	++	+++	+	++	+	+
2	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	-	-
4	+	+	+	-	-	-
5	-	+	-	-	-	-
6	-	+	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
B群(8w) 1	+	+	+	+	+	+
2	++	+	+	+	-	+
3	+	+	-	-	-	-
4	+	+	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-

表 2-a 耳管処置+換気チューブ挿入群（10週～8週）の側頭骨所見

N.O.	外耳道所見	鼓膜所見	中耳腔所見			真珠腫
	keratin debris	肥厚	滲出液	肉芽組織	骨破壊	
B群(6w) 1	++	++	+	++	+	+
2	++	++	+	++	-	-
3	+	+	-	-	-	-
4	-	+	-	-	-	-
5	+	-	+	-	-	-
6	-	-	+	-	-	-
7	+	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
B群(4w) 1	+++	++	+	+	+	+
2	+	+	-	-	-	-
3	-	+	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
B群(2w) 1	+	+	-	-	-	-
2	-	+	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-

表 2・b 耳管処置+換気チューブ挿入群（6週～2週）の側頭骨所見

N.O.	鼓膜	鼓膜移行部	骨部外耳道
1	0	7	30
2	0	10	17
3	0	8	7
4	0	17	13
5	2	9	18
6	3	15	10
7	3	15	23
平均	1.14±1.46	10.86±3.72	17.57±7.35

表3-a 正常群におけるBrdU取り込み細胞の分布
(個/100細胞)

N.O.	鼓膜	鼓膜移行部	骨部外耳道
1	23	19	20
2	21	43	9
3	30	25	16
4	7	30	17
5	36	28	20
6	29	6	22
7	16	25	35
8	17	30	33
9	16	23	27
10	8	22	34
平均	20.3±9.43	25.1±9.39	23.3±8.69

表3-b 鼓膜肥厚群におけるBrdU取り込み細胞の分布
(個/100細胞)

N.O.	真珠腫上皮	鼓膜移行部	骨部外耳道
1	31	54	41
2	52	34	31
3	19	32	28
4	43	22	26
5	27	18	10
6	37	40	30
7	35	26	24
8	54	15	2
9	10	15	26
10	36	22	27
平均	34.4±13.65	25.8±8.8	24.5±10.98

表3-c 真珠腫群におけるBrdU 取り込み細胞の分布
(個/100細胞)

附図説明

- 図1. 耳管咽頭口焼灼直後の口腔内
HP: 硬口蓋, T: 舌
- 図2. 換気チューブを挿入・留置されたスナネズミ
→: 換気チューブ
- 図3. 中耳骨胞を開放した状態
鼓膜緊張部は正常であるのに対し弛緩部は白色に突出し血管の怒張を認める。
- 図4. 中耳骨胞を開放した状態
巨大真珠腫により中耳骨胞内は充満している。
- 図5. 真珠腫のH.E染色標本 冠状断 (bar = 500 μ m)
鼓膜弛緩部が肥厚、陥凹し肉芽組織を伴い耳小骨に癒着。中耳腔には滲出液の貯留、外耳道側にはdebrisの蓄積を認める。
- 図6. 真珠腫のH.E染色標本 軸位断 (bar = 500 μ m)
鼓膜弛緩部が肥厚、陥凹し肉芽組織を伴い耳小骨に癒着。中耳腔には滲出液の貯留、外耳道側にはdebrisの蓄積を認める。
- 図7. 耳管焼灼初期のH.E染色標本 冠状断 (bar = 500 μ m)
中耳腔内に炎症性細胞を含む滲出液の貯留と中耳粘膜の肥厚を認めるものの鼓膜は極軽度の肥厚に留まっている。
- 図8. retraction pocketを呈した鼓膜のH.E染色標本 冠状断 (bar = 500 μ m)
鼓膜は陥凹し耳小骨に接しているが、鼓膜肥厚は認められない。
- 図9. 肥厚鼓膜のH.E染色標本 冠状断 (bar = 500 μ m)
鼓膜は肥厚し、一部中耳腔側に陥凹しているが軽度であり耳小骨の骨破壊などは認めない。中耳腔内に滲出液の貯留を認める。
- 図10. 耳管閉塞と換気チューブ挿入動物 (8週断頭例) のH.E染色標本 冠状断 (bar = 500 μ m)
鼓膜および中耳腔に明らかな変化を認めない。

図11. 処置後週数別の真珠腫の発生率のグラフ

A群（耳管処置群）は6週から10週にかけて70～80%と高値を示しているのに対し、B群（換気チューブ群）は10～20%と有意差を認めた。

（*： $p<0.01$ ）

図12. A：正常群のBrdU所見（ $\text{bar} = 500 \mu\text{m}$ ）

B：鼓膜にはBrdU取り込み細胞を認めない。（ $\text{bar} = 100 \mu\text{m}$ ）

C：鼓膜移行部ではBrdU取り込み細胞を数個認める。（ $\text{bar} = 100 \mu\text{m}$ ）

D：骨部外耳道では散在性にBrdU取り込み細胞が認められる。

（ $\text{bar} = 100 \mu\text{m}$ ）

図13. A：鼓膜肥厚群のBrdU所見（ $\text{bar} = 500 \mu\text{m}$ ）

B：基底細胞層にBrdU取り込み細胞が多数認められる。（ $\text{bar} = 100 \mu\text{m}$ ）

C：鼓膜移行部でも同様に多数認められる。（ $\text{bar} = 100 \mu\text{m}$ ）

D：骨部外耳道でもBrdU取り込み細胞はやや増加の傾向を認める。

（ $\text{bar} = 100 \mu\text{m}$ ）

図14. A：真珠腫群のBrdU所見（ $\text{bar} = 500 \mu\text{m}$ ）

B：著しいBrdU取り込み細胞の増加を認め、有棘細胞層にも出現しているように観察できる。（ $\text{bar} = 100 \mu\text{m}$ ）

C：鼓膜移行部でも同様に多数認められる。（ $\text{bar} = 100 \mu\text{m}$ ）

D：骨部外耳道でもBrdU取り込み細胞はやや増加の傾向を認める。

（ $\text{bar} = 100 \mu\text{m}$ ）

图1.

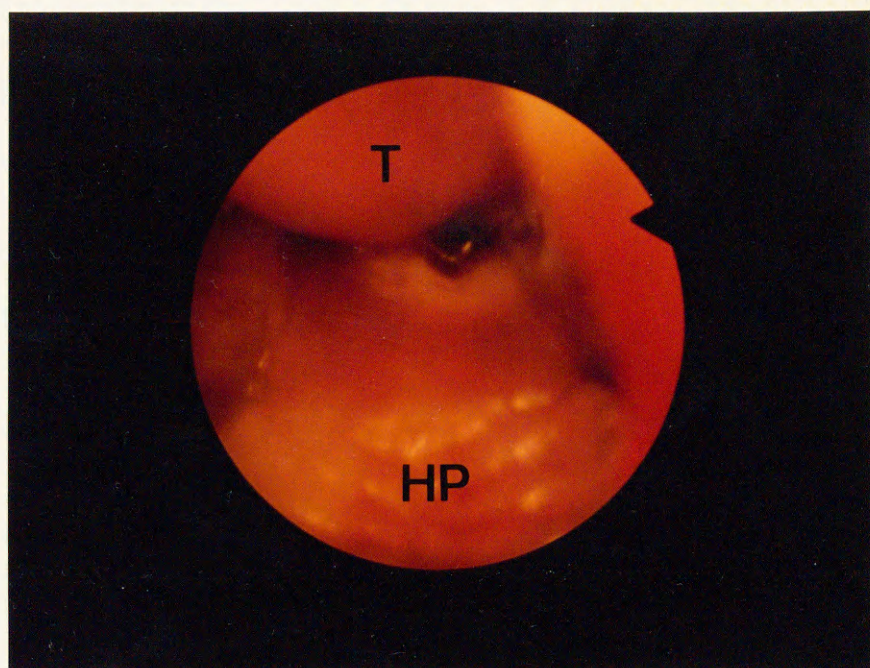


图2.



图3.



图4.

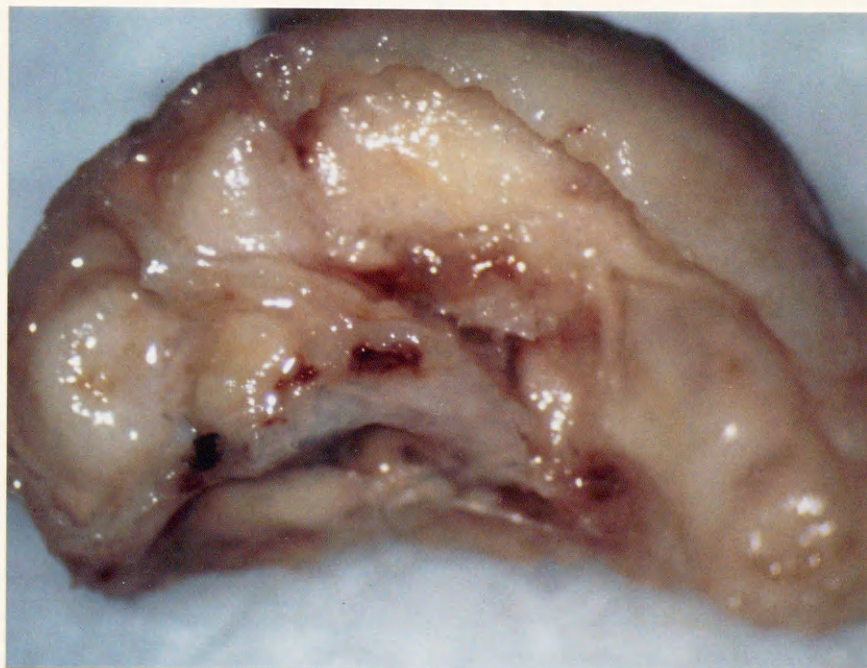


图5.

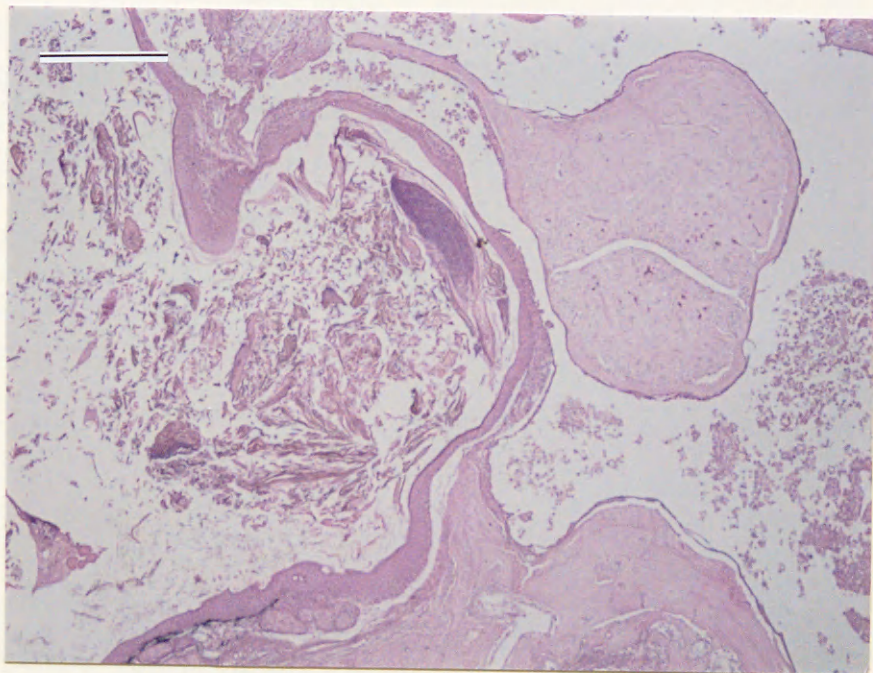


图6.

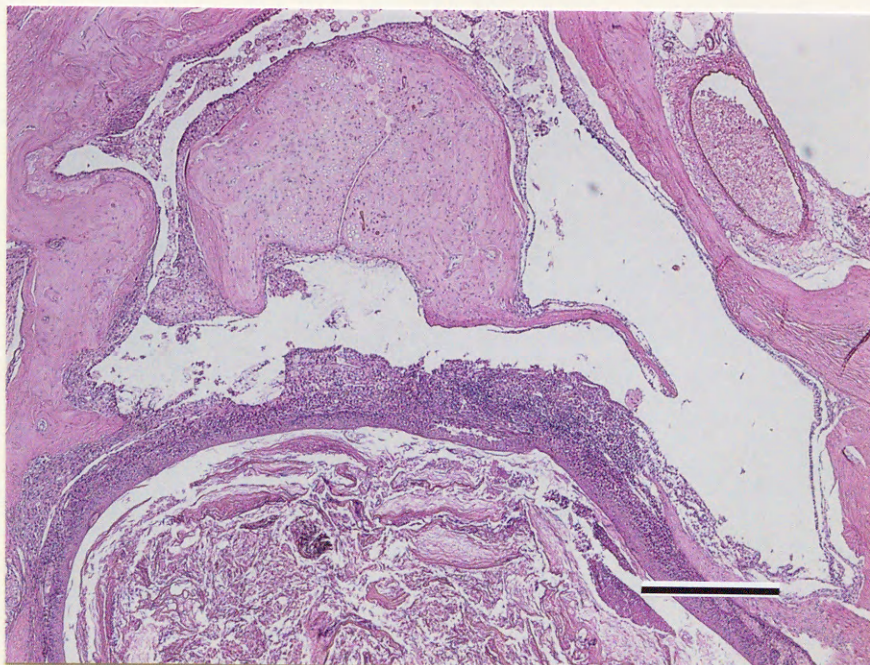


图7.

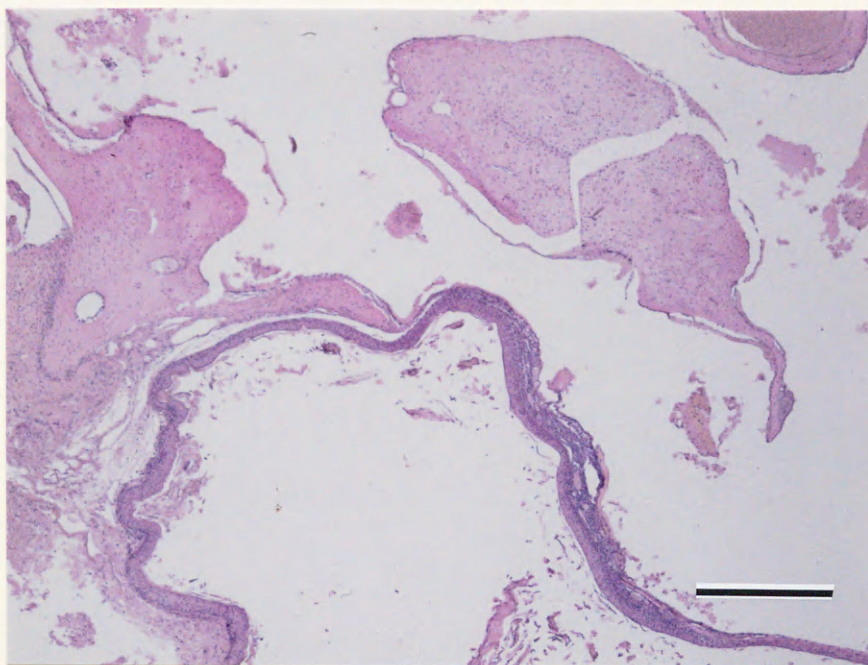


图8.

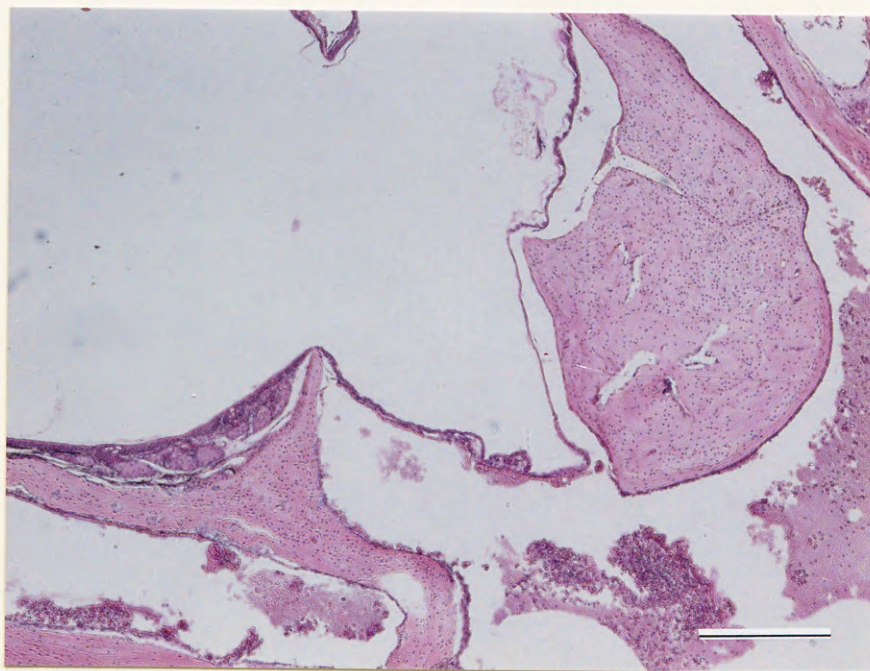


图9.

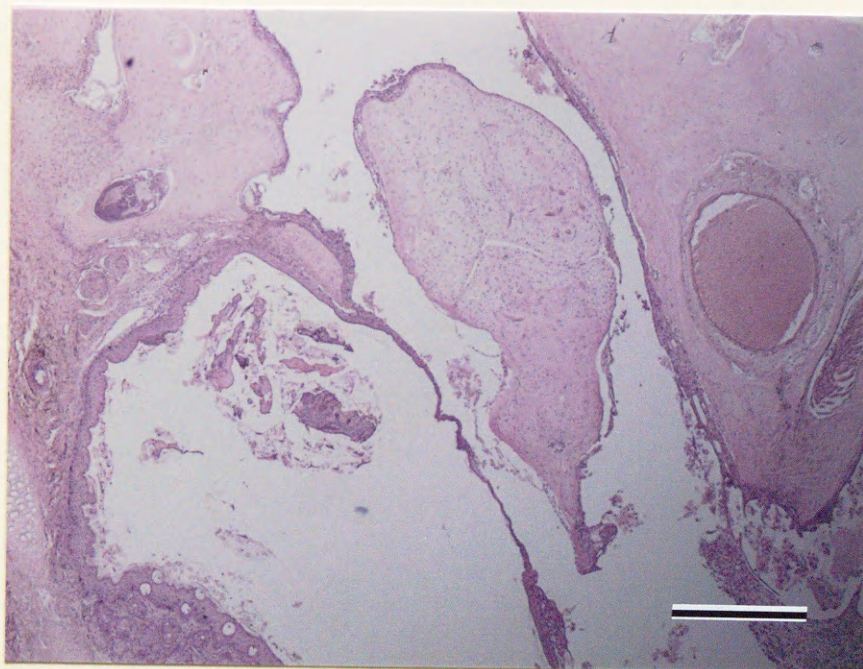


図10.

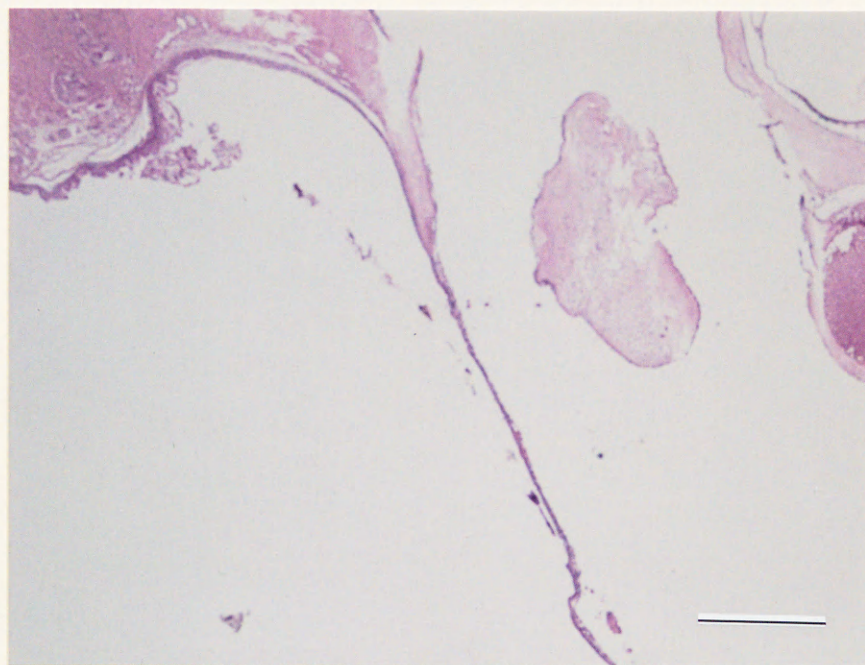


図11.

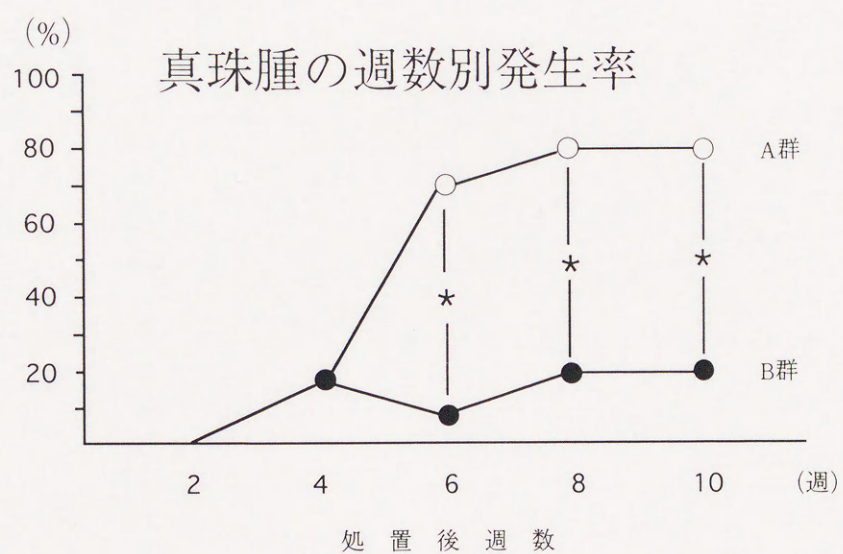


図12-A.

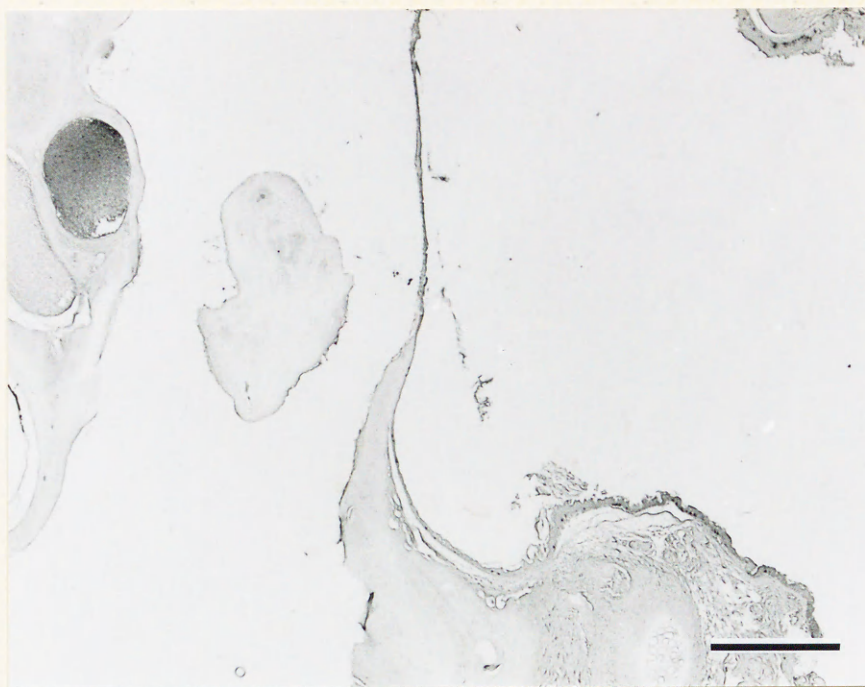


図12-B.

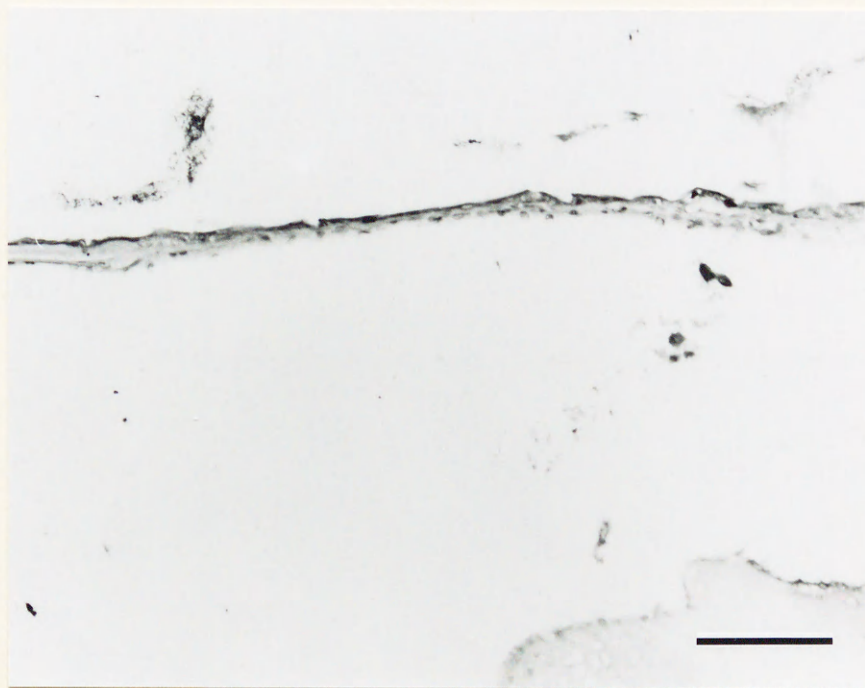


図12-C.

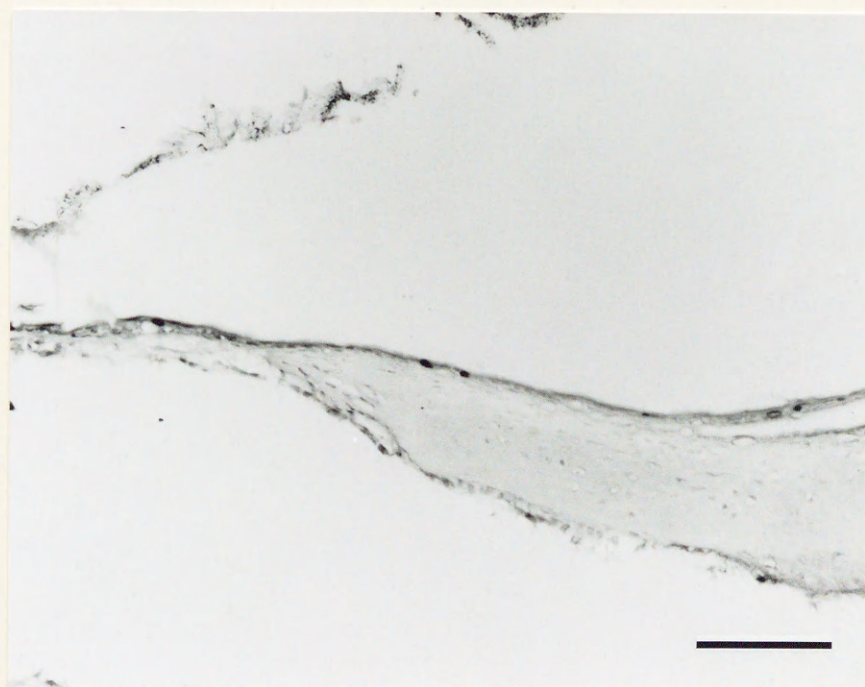


図12-D.

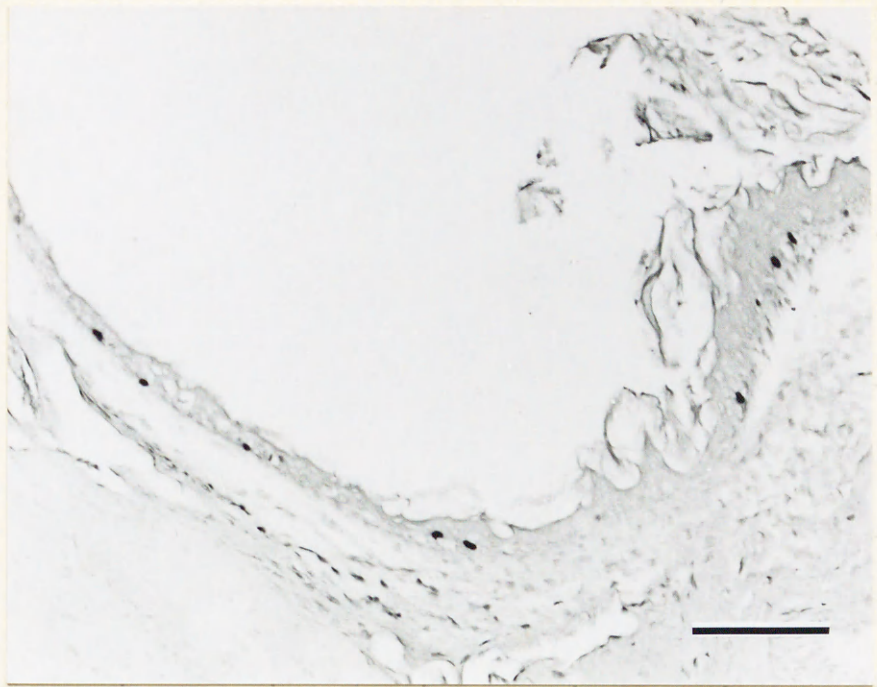


図13-A.

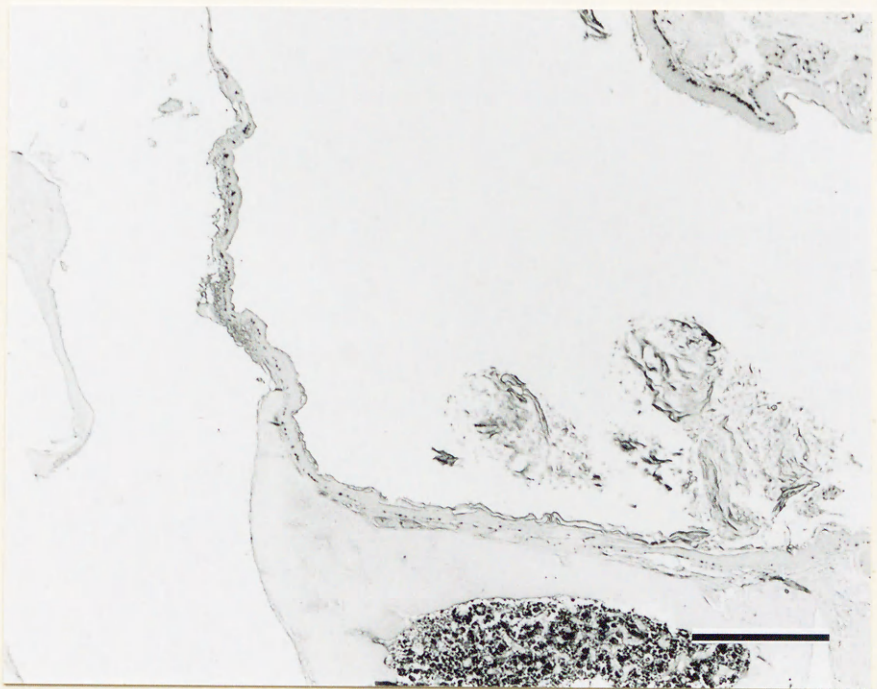


図13-B.

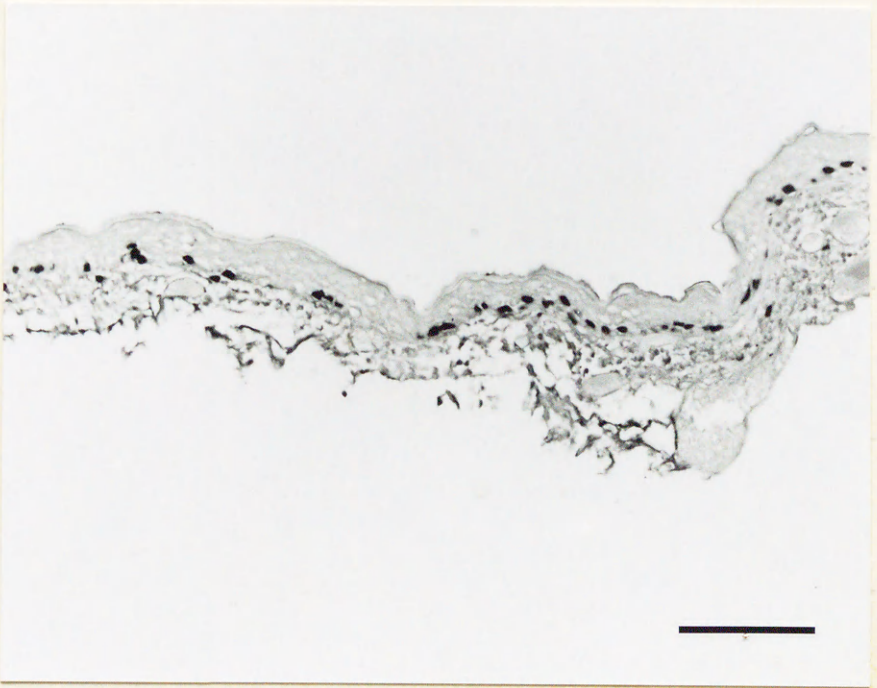


图13-C.

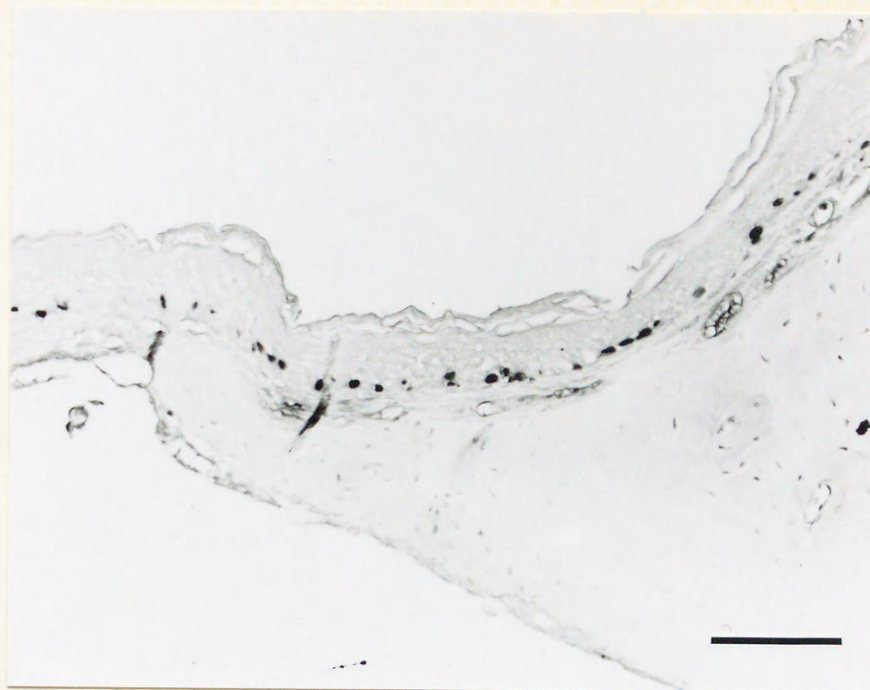


图13-D.

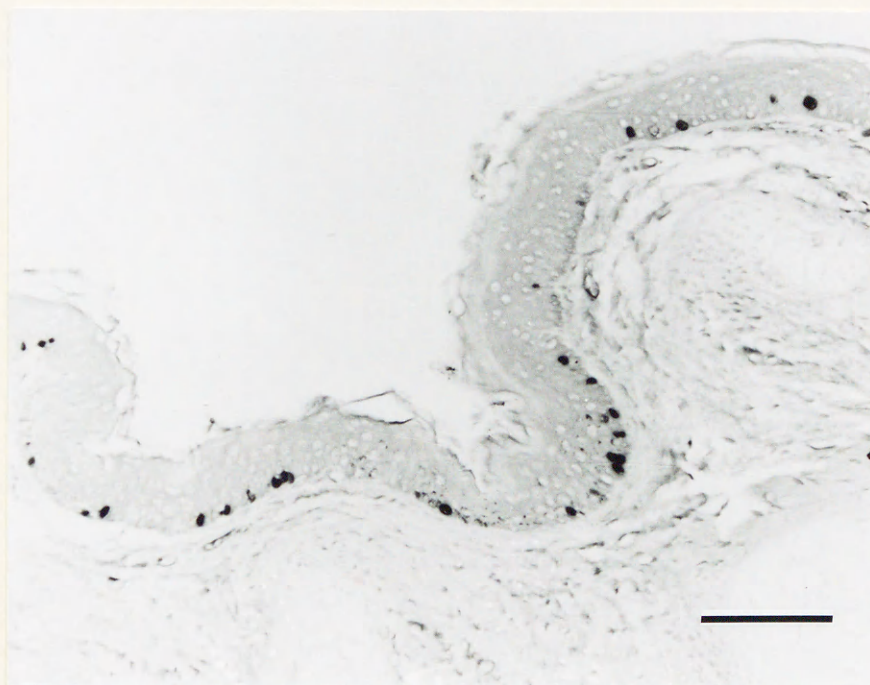


图14-A.

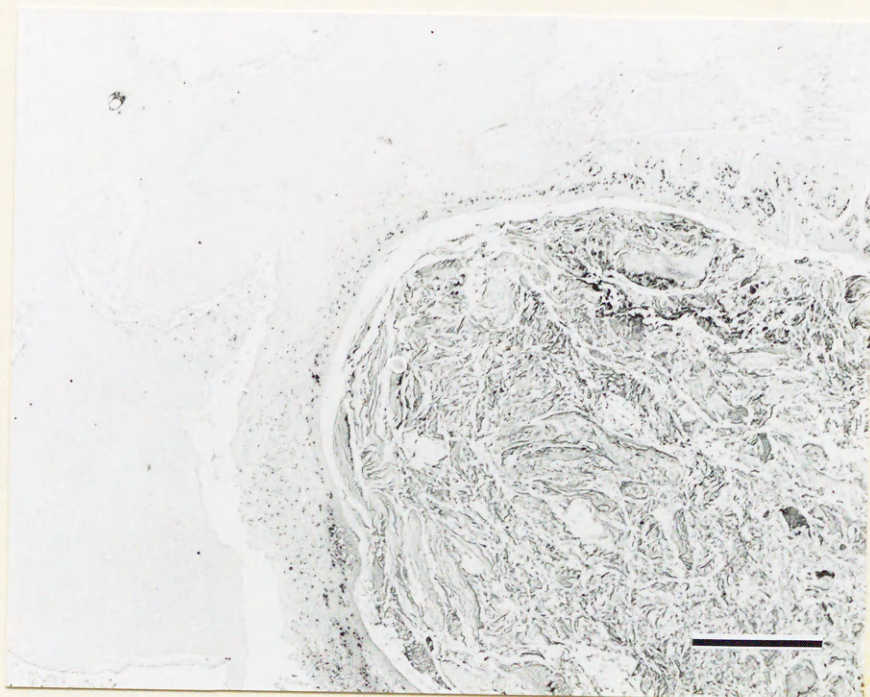


図14-B.

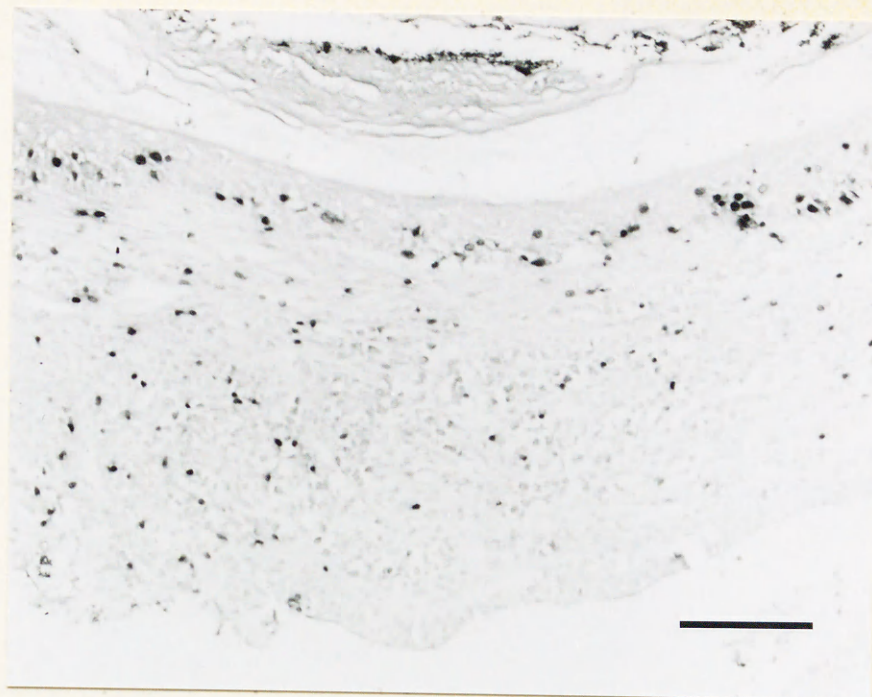


図14-C.

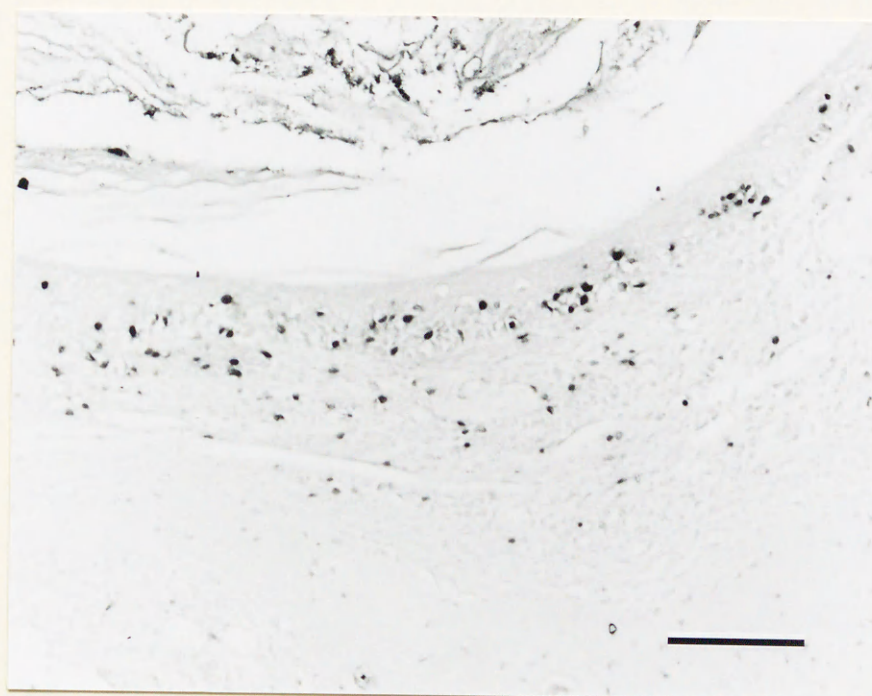


図14-D.

