蝸牛窓膜透過性に関する実験的研究 (第2報)

中耳内蛋白濃度の影響について

三重大学医学部耳鼻咽喉科学教室 (主任: 坂倉康夫教授)

浜口 幸吉, 坂倉 康夫

THE RELATIONSHIP BETWEEN ANTIGEN LEVEL IN THE MIDDLE EAR AND
ROUND WINDOW MEMBRANE PERMEABILITY IN ANTIGEN INDUCED OTITIS MEDIA

YUKIYOSHI HAMAGUCHI, M.D. and YASUO SAKAKURA, M.D.

Department of Otorhinolaryngology, Mie University School of Medicine, Tsu

By using an antigen induced (Arthus) otitis media (OM) model in chinchillas sensitized with human serum albumin (HSA), we investigated the passage of HSA through the round window membrane (RWM) by measuring HSA levels in both the middle ear fluid (MEF) and the perilymph (PL). The effect of corticosteroid treatment on HSA passage was also studied. HSA (0.5, 5, and 50mg/ml; 1 ml) was instilled into the left middle ear bulla (MEB) of both control and sensitized animals (control and Arthus group), and HSA containing 12.5mg/ml of Triamcinolone diacetate was instilled into the right MEB of both animals (control+steroid and Arthus +steroid groups). Mean values of HSA levels in both the MEF and the PL were proportional to the original three different HSA levels (0.5, 5 and 50mg/ml) instilled into the MEB. HSA levels in the MEF differed significantly among the three groups in the following order (Arthus <Arthus+steroid <control). In the control, HSA levels in the PL were significantly reduced by a steroid treatment ($p < 0.025$, 50mg/ml and $p < 0.05$, 5mg/ml). The percentage of HSA positive PL samples was significantly lower in the Arthus group than the control group ($p < 0.05$, 5mg/ml). HSA levels in the PL appear to depend on HSA levels in the MEF which were reduced in the sensitized animals. These results suggest that an immunological reaction may be involved in the reduction of HSA passage through the RWM by reducing HSA levels in the MEF. Corticosteroid treatment may reduce the passage of HSA into the PL in case of non-sensitized animals.

Key words: 蝸牛窓膜透過性, ヒトアルブミン, 中耳内蛋白濃度

A91—1864—23141

結 言

蝸牛窓膜透過性に関する研究は、点耳薬性難聴や中耳の炎症疾患などに合併する、感音難聴の機序解明の上で重要な研究課題である。

蝸牛窓膜を介する経路以外にも卵円窓や局所リンパ流を介するもの、また全身循環より内耳へと波及する経路も考えられるが、薄い生体膜のみで鼓室階と境される蝸牛窓膜が最も重要な経路と思われる。

急性中耳炎や滲出性中耳炎の中耳貯留液中には補体

成分、エンドトキシン、蛋白分解酵素などのさまざまな生理活性物質が存在し、起炎、組織障害的に作用している¹⁾²⁾。各種の中耳炎疾患において、これらの炎症産物の蝸牛窓膜透過によると推測される内耳障害(主として内耳性難聴)を合併する症例が報告されている³⁾⁴⁾。しかしながら、滲出性中耳炎や急性中耳炎において明らかな内耳障害を合併する症例は必ずしも多くはない。従って、何らかの機序を経て、蝸牛窓膜を介する炎症産物の内耳移行は通常制御されていると考え

た方がよい。ただし、炎症産物の濃度、蝸牛窓膜の状態によっては炎症産物の通過を許し、その結果内耳障害をきたすことも考えられる。従って、中耳内の炎症産物の濃度は蝸牛窓膜通過後の内耳障害の程度を考える上で重要な因子であると推測される。

ヒトアルブミン（分子量：67,000、以下 HSA と略す）を標識物質とし、チンチラを用いた我々の実験では、HSA は蝸牛窓膜を通過して外リンパ中に移行し、HSA 注入後24時間においてピークをみとめた⁵⁾。これに対して HSA で全身感作したチンチラで、HSA（抗原）の内耳移行を検討すると、中耳での炎症早期（注入12時間後）には一時的に亢進したものの、炎症の進展につれ非感作動物との間に差がなくなり、HSA の内耳移行に対する中耳での免疫学的防御能による抑制作用が示唆された。

今回の実験では、中耳内へ注入する HSA 濃度の内耳移行に対する影響をみるべく、50,5,0.5mg/ml の3種の抗原濃度を設定した上で、HSA 感作および非感作動物について中耳液および外リンパ中 HSA 濃度の変化を測定し、両動物間で比較検討を行った。また、ステロイド剤の局所注入時による影響についても検討を加えた。

実験方法

図1に実験方法の概要を示す。

1. 非感作群：体重400～600gmのチンチラ19匹を用いた。塩酸ケタミン（20mg/kg、筋注）麻酔後、滅菌生理食塩水にて溶解した HSA（1ml、50,5,0.5mg/ml、pH7.4、Sigma 社、St. Louis）を経皮的に左中耳

骨腔内へ注入した（対照群）。また、0.5ml の Triamcinolone diacetate（25mg/ml、Aristocort®, Lederle 社、Carolina）を含む HSA（1ml、50,5,0.5mg/ml）を右中耳骨腔内へ注入した（対照＋ステロイド群）。注入24時間後に中耳骨腔を開放し、残存する中耳液を回収した。中耳内を生食にて十分洗浄後、外リンパ5μl を蝸牛窓膜よりガラスチューブ（内径0.7mm）にて穿刺後吸引採取した。回収した中耳液は細菌学的検査の後に、遠心処理し（3,500回転、10分、4℃）上清を回収した。また、心臓穿刺にて採血し遠心後、血清を採取した。

2. 感作群：正常チンチラ32匹を用い、HSA にて全身感作した。0.1ml の HSA（10mg/ml）と等量の完全フロイントアジュバント（Sigma 社）を混じ、十分乳化した後、少量ずつ動物の背部、下肢皮下に注射した。初回注射後、7日、14日目に同量の HSA を追加注射した。血中抗体価が十分上昇した段階（ $\times 2^4 \sim \times 2^6$ ）で、1ml の HSA（50,5,0.5mg/ml）を左中耳骨腔内へ（アルサス群）また、等量の Triamcinolone（25mg/ml）を含む 1ml の HSA（50,5,0.5mg/ml）を右中耳骨腔内へ注入した（アルサス＋ステロイド群、以下ア＋ス群と略す）。注入後、24時間目に中耳骨腔内に残存する中耳液を回収し、以下非感作群と同様の操作にて外リンパ、血清を採取した。外リンパ以外の検体は -70°C に保存した。

A. HSA 定量

ヤギ抗 HSA（Cooper Biomedical, Malvern）抗体を用いて免疫電気泳動法により⁷⁾、HSA を測定した（測定下限：10μg/ml）。チンチラアルブミンとの交叉

A. 非感作群

B. 感 作 群

図1 実験手順

反応を回避するため、市販抗血清をあらかじめ等量のチンチラ血清と1時間37°C下で保持、吸収処理した。外リンパ中のHSA定量は、検体採取後直ちに、また中耳液中のHSA定量は検体を $\times 1 \sim \times 100$ の間で希釈後に行った。

B. 細菌学的検査

回収された中耳液の細菌学的検査は、血液寒天およびチョコレート寒天平板を用いて行った。

C. 血中抗体価測定

抗体価は、オクタロニー法にて測定し、沈降線形成のみられた最大血清希釈度にて示した。

統計学的観察は、t検定もしくはペアードt検定にて行った。なお、外リンパ中のHSA値については対数変換後に統計学的観察を行った。

結 果

細菌学的検査では、中耳液全例に培養陰性であった。

1. 中耳液中のHSA濃度 (図2-A, B)

中耳液中のHSA濃度は対照群の場合、0.5mg/ml下で 0.23 ± 0.04 mg/ml, 5mg/ml下で 3.03 ± 0.61 mg/ml, 50mg/ml下で 39.6 ± 2.74 mg/mlであった。対照+ステロイド群の場合は、それぞれの条件下で 0.30 ± 0.01 mg/ml, 2.83 ± 0.42 , 41.1 ± 3.83 であり、0.5mg/ml下において両群間で有意差をみとめた ($p < 0.01$)。HSA濃度の平均値は両対数表示において、各濃度との間にほぼ直線関係が得られた。

アルサス群では0.5mg/ml下で 0.035 ± 0.041 mg/ml, 5mg/ml下で 1.29 ± 0.87 mg/ml, 50mg/ml下で 16.4 ± 3.7 mg/mlであり、すべての濃度下において、対照群との間に有意差をみとめた ($p < 0.01$)。また、ア+ス群では 0.051 ± 0.065 , 1.63 ± 0.73 , 20.0 ± 5.09 であり、5, 50mg/ml下でアルサス群に比して有意に高値を示した ($p < 0.05, 0.01$)。

2. 外リンパ中のHSA濃度 (図3-A, B)

図2 3種類の濃度条件下における中耳液中のヒトアルブミン濃度：A., 非感作群；□, 対照群；▨, 対照+ステロイド群；*, 対照群に比して有意に高値を示す ($p < 0.01$)。B., 感作群；□, アルサス群；▨, アルサス+ステロイド群。感作群はすべての濃度条件下において非感作群に比して低値を示す ($p < 0.01$)。*, アルサス群に比して有意に高値を示す ($p < 0.01, 50\text{mg/ml}$ 下, $p < 0.05, 5\text{mg/ml}$ 下)。

図3 3種類の濃度条件下における外リンパ中のヒトアルブミン濃度：A., 非感作群；□, 对照群；▨, 对照+ステロイド群；*, 对照+ステロイド群に比し有意に高値を示す ($p < 0.025$, 50mg/ml 下, $p < 0.01$, 5mg/ml 下)。
B., 感作群；□, アルサス群；▨, アルサス+ステロイド群；*, アルサス+ステロイド群に比し有意に高値を示す ($p < 0.05$)。

図5 外リンパ中 HSA 検出群と非検出群における中耳液中ヒトアルブミン濃度の検討。5mg/ml 条件下, *, 非検出群に比し有意に高値を示す ($p < 0.01$, アルサスおよびアルサス+ステロイド両群共)。

15.5mg/dl) であった。これに対して、ア+ス群では、 0.18 ± 0.34 (GM: 1.51mg/dl), 0.83 ± 0.70 (GM: 6.76mg/dl) であり、50mg/ml 下においてのみ、両群間で有意差をみとめた ($p < 0.05$)。0.5mg/ml 下では、両群共に HSA は測定下限以下を示した (図3-B)。

外リンパ中での HSA 検出率について、対照群とアルサス群とで比較検討すると 5mg/ml 下において、対照群では 6/7 (85.7%) であったのに対して、アルサス群では 5/22 (22.7%) と有意に低率を示した (X^2 -検定, $P < 0.01$)。

3. 中耳液および外リンパ中 HSA 濃度の相関関係
5mg/ml 条件下についてさらにアルサスおよびア+ス群で中耳液および外リンパ中の HSA 濃度を検討すると、アルサス群では中耳液中 HSA 濃度が 1.8mg/ml 以下の場合には 1 例も HSA が外リンパ中には検出されず、それ以上の場合には、8 例中 5 例 (62.5%) において外リンパ中に HSA を検出し得た (図4-A)。ア+ス群においても 2mg/ml 以下の HSA の場合には、外リンパ中に HSA は検出し得ず、アルサス群と同様の傾向を示した (図4-B)。

さらに、両群で外リンパ中に HSA が検出し得た群と検出し得なかった群とに細分してその中耳液中 HSA 濃度について検討を加えたところ、アルサス群では、 2.27 ± 0.31 mg/ml (検出群), 0.94 ± 0.73 mg/ml (検出不能群) であり、検出群において有意に高値を示した ($p < 0.01$)。ア+ス群においても同様に、検出群

で有意に中耳液中 HSA 濃度は高値を示した ($p < 0.01$, 図5)。

考 察

1. 非感作群における蝸牛窓膜透過性

非感作群では、非抗原物質である HSA の内耳移行をみている。50mg/ml HSA の注入により中耳内に非特異的炎症反応が惹起され、これが蝸牛窓膜透過性に影響する点はずに第1報で述べた⁶⁾が、今回、50, 5, 0.5mg/ml の3段階の HSA 濃度下では、外リンパ中の HSA 濃度との間に両対数表示において、ほぼ直線関係が得られた。このことは中耳内の HSA 濃度が外リンパ中の HSA 濃度に関与する重要な因子であることを意味している。

また、ステロイド剤の局所投与にて外リンパ中 HSA 濃度を有意に制御する方向に働いているものと思われる。50mg/ml 条件下では、12, 24時間後においてかなりの血漿蛋白滲出および白血球浸潤がみられており⁵⁾⁶⁾、HSA により中耳粘膜に対して非特異的炎症反応が生ずると考えられる。この炎症早期において白血球より放出される各種血管作動物質 (ヒスタミン、キニン、プロスタグランジン) による蝸牛窓膜上皮の細胞間隙離開やライソゾーム由来の蛋白分解酵素 (特にコラーゲン分解作用をもつコラーゲナーゼやカテプシン B) などによる直接的な膜上皮障害が透過性亢進に関係するものと思われる。ステロイド剤局所投与は中耳液中 HSA 濃度にはほとんど影響せず、早期の炎症反応を抑制することにより⁸⁾、蝸牛窓膜に対して膜保護的作用を果たすものと推測される。また、ステロイド剤投与により滲出性炎症反応が抑制された結果、HSA の希釈効果も抑制されるが、逆に耳管からの HSA 排除が容易となり HSA の総量としては減少することも考えられる。この点、HSA 濃度と共に中耳液中 HSA 総量の動態もみる必要がある。

2. 感作群における蝸牛窓膜透過性

HSA 感作群の場合は、抗原物質である HSA の特異的炎症下における内耳移行をみていることになる。従って HSA の内耳移行は蝸牛窓膜を含めた中耳における炎症反応と免疫学的防御反応の両者の影響を受けることになる。今回、3段階の HSA 濃度下では非感作群と同様に外リンパ中 HSA 濃度は中耳へ注入した HSA 濃度に依存する傾向を示した。HSA は複合体化していない Free の HSA を測定したもの、HSA 定量法の感度が十分でなく、0.5mg/ml HSA 注入動物で

は全例共外リンパ中に HSA が検出されなかった。しかしながら、5mg/ml 下においては非感作群に比して感作群で有意に外リンパ中での HSA 検出率が低いという結果を得た。

ここで注入した HSA の動態を考えてみると、注入された HSA は、中耳粘膜より滲出してきた特異的 IgG 抗体と免疫複合体（以下 IC と略す）を形成してその抗原性を失うと共に、アルサス型炎症反応が惹起される。IC は迅速にどん食処理され、耳管などから排除され、また滲出液による希釈効果も加わって、中耳内に残存する。Free の HSA 濃度は非感作群に比べて有意に減少する（図 2—B）。しかしながら、これらの一連の反応は投与する抗原（今回は HSA）濃度によって中耳内に残存する HSA 総量が異なるため⁹⁾、50, 5, 0.5mg/ml の各条件下で著しく異なる。さらに著しい滲出性炎症反応が蝸牛窓膜自体にも生じてその透過性に影響するため、非感作群に比べて HSA の内耳移行は非常に複雑化する。従って、感作動物においては抗原物質のみならず、非抗原物質を用いた膜透過性の検討が今後さらに必要と思われる。今回、5mg/ml 下についてみると、前述したように感作群においては、外リンパ中に HSA が検出し得た群では、し得なかった群に比べて有意に中耳液中の HSA 濃度が高かった。このことは、抗原（HSA）の免疫学的排除能や希釈効果などによる中耳液中 HSA 濃度の減少が HSA の内耳移行を抑制する因子のひとつであることを意味する。

HSA の内耳移行に対するステロイド剤の影響についても各濃度下で異なる結果を得た。50mg/ml 下でのみステロイド剤投与により、外リンパ中の HSA 濃度は有意に低値を示した。ステロイド剤の抗炎症作用が、蝸牛窓膜に対しては膜保護的に作用して HSA の内耳移行を抑制する方向に働くと思われる。しかしながら中耳液中の HSA 濃度がステロイド剤投与によって滲出液による希釈効果を抑えて、非注入側に比べて有意に高値を示した結果からは、ステロイド剤が中耳内の HSA 濃度低下を押えることでかえって HSA の内耳移行を高めることも考えられる。従って、感作群におけるステロイド剤の抗原の内耳移行に対する作用機序については抑制、亢進の両面が考えられ、今後さらに検討を要するものと思われる。

3. 中耳炎における蝸牛窓膜透過性に関する検討

今回の実験結果よりみて、感作、非感作群共、外リンパ中蛋白濃度は中耳側へ注入した蛋白濃度の影響を受けており、さらに抗原蛋白の場合には、中耳での免

疫学的な抗原排除能を含めたアルサス反応によってその内耳移行は修飾されることが考えられた。Horse-radish peroxidase（以下 HRP と略す）を標識とし、滲出性中耳炎ネコモデルを用いた長期観察の場合には、中耳炎発症後 2 週間目で明らかに HRP の内耳移行は減少しており、非抗原物質の場合でも炎症の進展と共にその内耳移行は制御されるとしている¹⁰⁾。また、比較解剖学上、チンチラの蝸牛窓膜の厚さは約 15μm であり、ヒトのそれに比して非常に薄く（約 1/4）¹¹⁾、また niche の形成も浅く¹²⁾、チンチラに比べてヒトでは炎症産物の蝸牛窓膜透過に対して防御因子がより優位と思われる。

非感作群の場合、中耳液と外リンパとの HSA の濃度比は 0.2～0.4% を示しており、それは家兎気管粘膜（マーカーは IgG, 13）、口腔粘膜（マーカーは HSA, 14）を用いた *in vitro* の吸収率（0.009%, 0.003%）に比べて約 50—100 倍高い。この理由として、*in vivo*, *in vitro* の相違以外に、中耳内に注入した HSA 量（1ml）に比べ、外リンパ腔は約 1/70（約 15ul, 15）であり、ごく少量の HSA が内耳へ移行しても外リンパ中の HSA 濃度は著しく上昇することが考えられる。このような解剖学的特徴は膜透過後の内耳障害を検討する上で重要な点である。つまり、中耳側よりの移行が少量であっても容易に外リンパ中の濃度が内耳機能障害をきたす閾値以上に上昇して、内耳機能障害に至るものと考えられる。

ま と め

1. 中耳液中蛋白濃度はその物質の外リンパ中濃度を決定する重要な因子のひとつであり、感作の有無を問わず、蛋白濃度が高いほど内耳への移行量も多いと思われる。

2. 非感作群においては、ステロイド剤の局所投与が HSA による非特異的炎症反応を抑制することで膜透過性に関しても抑制的に作用すると思われる。

3. 感作群、5mg/ml HSA 下では、非感作群に比し外リンパ中での HSA 検出率が有意に低く、抗原物質（HSA）の内耳移行に対して免疫学的防御を含むアルサス反応による抑制作用が考えられた。

文 献

- 1) 坂倉康夫：III. 成因 4. 感染・炎症。河本和友編，滲出性中耳炎，医学教育出版社，東京，1985，pp. 55-60.
- 2) Juhn SK, Hamaguchi Y, Jung TTK: Biochemistry

- of middle ear effusion. Bernstein JM, Ogra PL (eds) : Immunology of the ear. Raven Press, New York, 1987, pp. 319-329.
- 3) Paparella MM, Goycoolea MV, Meyerhoff WL : Inner ear pathology and otitis media: A review. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 89 (Suppl 68) : 249-253, 1980.
 - 4) Walby AP, Barrera A, Schuknecht HF : Cochlear pathology in chronic suppurative otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 92 (Suppl 103) : 3-19, 1983.
 - 5) Hamaguchi Y, Morozono T, Juhn SK : Round window membrane permeability to human serum albumin in antigen induced otitis media. *Am J Otolaryngol* (in press).
 - 6) 浜口幸吉, 坂倉康夫 : 蝸牛窓膜透過性に関する実験的研究 (第1報). *日耳鼻* 91 : 356-363, 1988.
 - 7) Laurell CB : Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Analyt Biochem* 15 : 45-52, 1966.
 - 8) Haynes RCJr, Murad F : Adrenocortical steroids, Gilman AG, Goodman LS, Gilman A (eds) : The pharmacological basis of therapeutics. Macmillan Publishing Company, New York, 1975, pp. 1478-1480.
 - 9) Hensen DM : Mechanism of tissue injury produced by immunologic reactions, Bellanti JA (ed) : Immunology II. WB Saunders, Philadelphia, 1978, pp. 309-325.
 - 10) Schachern PA, Paparella MM, Goycoolea MV et al : The permeability of the round window membrane during otitis media. *Arch Otolaryngol* 113 : 625-629, 1987.
 - 11) Schachern PA, Paparella MM, Duvall AJ : The normal round window membrane. *Arch Otolaryngol* 108 : 550-554, 1982.
 - 12) Browning GG, Gaanich MS : Surgical anatomy of the temporal bone in the chinchilla. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 87 : 875-882, 1978.
 - 13) Sakakura Y, Majima Y, Mitsui H et al : Absorption of various drugs through the rabbit's respiratory mucosa in vitro. *Arch Otorhinolaryngol* 238 : 87-96, 1983.
 - 14) Tolo K, Brandtzaeg P, Jensen J : Mucosal penetration of antigen in the presence or absence of serum-derived antibody. *Immunology* 33 : 737-743, 1977.
 - 15) Juhn SK, Papastavros RT, Jung TTK : Biochemical aspects of inner ear fluids and possible implication for pharmacological treatment. *Scand Audiol (Suppl 26)* : 7-10, 1986.
-
- 本論文の要旨は第3回 International Academic Otologic Workshop on Interaction between the Middle Ear and the Inner Ear (Umeå, Sweden) にて講演された。
-
- (原稿受付 昭和63. 2. 4日)
- 別刷請求先 〒514 津市江戸橋 2-174
三重大学医学部耳鼻咽喉科学教室 浜口幸吉