実験的滲出性中耳炎モデルにおける免疫組織学的研究 (第1報)

——中耳粘膜の局所免疫能——

東北大学医学部耳鼻咽喉科学教室 (主任: 高坂知節教授)

朴 沢 孝 治

HISTOCHEMICAL ANALYSIS OF LOCAL IMMUNE SYSTEM
IN THE MIDDLE EAR

KOJI HOZAWA, M.D.

Department of Otolaryngology, Tohoku University School of Medicine, Sendai

To clarify the manifestations of a local immune system of the middle ear, 50 guinea pigs were examined histopathologically after various immunologic stimulations were given. The animals were classified into 4 groups by the methods of immunizations: 1) non-sensitized group, 2) intrabullar injection group, 3) intradermal injection group, and 4) intradermal and intrabullar injection group. Horseradish peroxidase (HRP) was used as an antigen and the animals of each group were rechallenged by intraperitoneal, intranasal, or intrabullar HRP injection. The local immunity of the middle ear was acquired only by the general immunization, and was enhanced by the additional local challenge. The local immune system consisted of resident macrophage containing antigen within its cytoplasm, lymphocytes forming lymph follicle-like structure, and the plasma cell producing specific antibody against challenged antigen. Immunoelectronmicroscopical observation also demonstrated the differentiation from the lymphocytes to the mature plasma cells producing specific antibody in the submucosal connective tissue. These immunocytes seemed to be under regulation of the newly formed capillary net-works with high columnar endothel and chemical mediators such as macrophage chemotactic factor as well as macrophage migration inhibitory factor in the middle ear effusion. To produce middle ear effusion, intratympanic inoculation was the only effective stimulation. Intranasal injection with nebulized vapor could not bring the antigen into the middle ear, and circulating immune complex could not be a pathogen of otitis media.

Key words: 滲出性中耳炎, 局所免疫, 動物実験

A91-0323-22860

I 緒 言

正常時にはわずかな線維細胞と毛細血管しか持たない鼓室粘膜に、病時には多数の浸潤細胞と共に形質細胞が認められるようになり、中耳貯留液中にも各種免疫グロブリンが検出され、中耳局所において抗体産生が行われることが明らかになった¹⁾²⁾³⁾。本実験は、中耳粘膜がどのような経路で抗原刺激をうけた場合に抗体

産生能を獲得するか、また中耳粘膜の免疫応答が宿主の免疫準備状態、抗原の侵入経路によってどのように変化するかを明らかにすることを目的とする。

II 方 法

中耳炎を持たないハートレー系白色モルモット50匹を4群に分け、horseradish peroxidase (HRP; sigma

type VI) を抗原として種々の経路で抗原刺激を加えた。第1群は未感作群, 第2群は 0.1mg HRP を 0.1ml 生理的食塩水に溶解した HRP 溶液を中耳腔内に注入する局所刺激群, 第3群は 0.5ml HRP 溶液を等量の Freund's complete adjuvant (FCA) と混和したものを週1回計3回皮内注射を繰り返した全身感作群, そして第4群は全身感作後局所刺激を加えたもので, 各群とも最終抗原刺激後3週目に断頭し, 鼓室粘膜及び耳管, 血清を採取した。特に第4群では, 2カ月後, 3カ月後にも断頭し, 頸部リンパ節, 脾臓も同時に採取した。免疫拡散沈降法にて血清中の抗 HRP 抗体価を測定し, 採取標本は periodate-lysine-paraformaldehyde 固定後 Luduc ら⁴⁾の方法に従い, 抗 HRP 抗体の局在を光顕, 電顕下に観察し, IgG, IgA, IgM を蛍光抗体法にて検出した。更に各群に対し, 経鼻ネブライザー, 中耳腔内注入, 腹腔内注入の3経路にて HRP をそれぞれ 5mg, 0.1mg, 1mg 再刺激し経時的に断頭して粘膜の組織像を観察した。

III 結 果

未感作群, 局所刺激群の中耳粘膜及び血清中には, 抗 HRP 抗体は認められなかったが, 全身感作群では, 粘膜上皮直下に少数の抗 HRP 抗体産生形質細胞が存在し, 全身感作に局所刺激を加えた群では, 粘膜浅層から深層にわたり多数の抗 HRP 抗体産生形質細胞が認められた(図1)。血清中にも16倍希釈まで沈降線を形成する抗 HRP 抗体価が両群とも確認された。また, これらいずれの2群においても, 抗 HRP 抗体産生形質細胞は主に鼓室粘膜に認められ, 耳管粘膜には極く少数散見されるにすぎなかった。蛍光抗体法によれば, これら抗 HRP 抗体は IgG が主体となっており(図2), これに IgA を一部含むもので, IgM は極く少数であった。これら抗 HRP 抗体は時間経過と共に徐々に減少するが, 最終抗原刺激後3カ月目まで十分な数の抗 HRP 抗体産生形質細胞が確認された。全身感作に局所刺激を加えた群の鼓室粘膜を電顕下に観察すると, 最終抗原刺激後1カ月を経たにもかかわらず, 胞体内に HRP を貪食保持したマクロファージが認めら

図1 第4群において, 抗 HRP 抗体産生形質細胞が最も多く認められた。(×400)

図2 抗 HRP 抗体の主体は IgG である。(蛍光抗体法, ×100)

れ、その周囲に抗 HRP 抗体産生形質細胞が認められた。これらは、ゴルジ装置、粗面小胞体に抗 HRP 抗体が存在し、核膜周囲には認められない成熟した形質細胞であった(図3)。一方、脾臓、頸部リンパ節にも抗 HRP 抗体が認められた。この場合、粗面小胞体の発達した形質細胞も散見されるが、多くは核膜及び perinuclear cistern にのみ抗 HRP 抗体の存在する形質細胞への分化成熟途中の細胞であった。

種々の抗原刺激を行った4群の動物に対し再度抗原刺激を加えた場合、経鼻ネブライザー、腹腔内注入では、中耳粘膜に炎症性変化を惹起できなかったが、鼓室内に HRP を注入した場合には、各群によって異なる組織変化が得られた。抗 HRP 抗体のみられない未感作群では、吸収された HRP は24時間以内に粘膜内より除去され、軽い浮腫と充血のみが認められた。全身感作群では、HRP の吸収態度からみて一部粘液中の抗体と反応しているが、粘膜下の血管壁に沈着する免疫複合体に示されるように(図4)、大部分の HRP は流血中の循環抗体と抗原抗体反応し、これに基づく

滲出性炎症が観察された。血管系に注目すると、免疫複合体の沈着による血管炎の後、注入後5日目より血管内皮細胞の細胞分裂が頻発し(図5)、その後 postcapillary venule 様の丈の高い内皮細胞よりなる毛細血管網が新生された(図6)。一方、全身感作に局所刺激を加えた群においては、粘膜下に多数の形質細胞の増殖がみられ、これと混在するように免疫複合体となった HRP を貪食するマクロファージ、好中球が観察され(図7)、この場合は、血清中にも十分な抗 HRP 抗体が存在するが、局所の形質細胞が産生する抗 HRP 抗体が主に抗原抗体反応に関与していると考えられた。更に抗原の再刺激後7日目には、リンパ球の集団によるリンパ濾胞様構造も認められ、これらリンパ球の中には、頸部リンパ節にみられた未熟な形質細胞への分化過程の細胞も観察された(図8)。

IV 考 察

以上の観察結果より、中耳内への微量の抗原刺激では抗体産生のトリガーとはなりえないが、全身感作の

図3 抗 HRP 抗体が粗面小胞体、ゴルジ装置に存在する分化成熟した形質細胞が中耳粘膜下にみられる。(HRP-EM, ×1000)

図4 粘膜下の血管壁に免疫複合体の沈着がみられ、血管内腔より好中球が貪食している(矢印)(×1000)。

図5 注入後5日目頃に、粘膜下の血管内皮細胞の細胞分裂が頻発する(矢印)(×400)。

図7 免疫複合体を貪食したマクロファージ、好中球が形質細胞と混在するのが、2次応答の際の特徴である。(×1000)

図6 注入後5日目以降、postcapillary venule様の血管が新生される。(×2000)

みでも中耳粘膜内に少数ながら特異抗体産生形質細胞が動員され、局所刺激が更に加わるとその数が著しく増加することが明らかとなった⁵⁾。抗 HRP 抗体は、頸部リンパ節が一つの供給源となっていることが示唆されるが、中耳粘膜においては抗原を長期にわたって貪食保持したマクロファージ及びリンパ濾胞様構造をとるリンパ球の集団が、局所抗体産生能の獲得に重要な役割をなしていると推定された⁶⁾。これら免疫担当細胞が中耳内に動員されるには、抗原抗体反応後の炎症産物中に含まれる白血球遊走因子や migration inhibitory factor 等の液性因子が重要な役割を果たすと思われるが⁷⁾、炎症後に新生された postcapillary venule 様の high columnar endothel を持つ血管網も特にリンパ球浸潤の鍵を握っていると思われる。以上の実験事実は臨床データともよく一致するものであり⁸⁾⁹⁾、滲出性中耳炎に上気道感染や急性中耳炎が先行する事実は¹⁰⁾、宿主の免疫準備段階として捉えることもでき興味深い。一方、成熟モルモットの耳管は咽頭からの異物の侵入に対してバリアーとなっており、HRP の経

図8 2次応答後みられるリンパ球集団の中には核膜及びperinuclear cisternaに抗HRP抗体をみる未熟な細胞がみられた。(HRP-EM, $\times 1000$)

鼻ネブライザーにては中耳炎はいずれの群においても惹起できず、また感作動物腹腔内にHRPを注入することにより形成されるであろう流血中の循環免疫複合体も中耳炎の原因とはならないことが判明した。

参考文献

- 1) Bernstein JM, Tomasi TB, Minn R, Ogra PL: The immunochemistry of middle ear effusions. *Arch Otolaryngol* 99: 320-326, 1974.
- 2) Meurman OH, Sarkkinen HK, Puhakka HJ et al: Local IgA-class antibodies against respiratory viruses in middle ear and nasopharyngeal secretions of children with secretory otitis media. *Laryngos-*

cope 90: 304-311, 1980.

- 3) Lewis DM, Schram JL et al: Antibody activity in otitis media with effusion. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 88: 392-396, 1979.
- 4) Leduc EH, Avrameas S, Bouteille M: Ultrastructural localization of antibody in differentiating plasma cells. *J Exp Med* 127: 109-118, 1968.
- 5) Ryan AF, Catanzaro A, Wasserman SI et al: Secondary immune response in middle ear; immunological, morphological, and physiological observations. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 95: 242-249, 1986.
- 6) Bernstein JM, Tsutsumi H, Ogra PL: The middle ear mucosal immune system in otitis media with effusion. *Am J Otolaryngol* 6: 162-168, 1985.
- 7) Bernstein JM: Biological mediators of inflammation in middle ear effusions. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 85 (suppl 25): 90-96, 1976.
- 8) Sloyer JL et al: The immune response to acute otitis media in children. II Serum and middle ear fluids antibody in otitis media due to *Haemophilus influenzae*. *J Infect Disease* 132: 685-688, 1975.
- 9) Bernstein JM, Ogra PL: Mucosal immune system; implication in otitis media with effusion. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 89 (suppl 68): 326-332, 1980.
- 10) Giebink GS et al: The microbiology of serous and mucoid otitis media. *Pediatr Pediatr* 63: 915-919, 1979.

本論文は、東北大学審査学位論文(博士)「実験動物モデルによる滲出性中耳炎病因解析の試み」の第3章である。御指導、御教授頂いた耳鼻咽喉科河本和友名誉教授、高坂知節教授、第1病理京極方久教授に深く感謝いたします。更に技術的援助をして下さった、耳鼻咽喉科佐藤裕子、白井祐子、第一病理加藤貞雄の諸氏にも感謝いたします。

(原稿受付 昭和62. 4. 3日)

別刷請求先 〒980 仙台市星陵町1-1

東北大学医学部耳鼻咽喉科学教室 朴沢孝治

<p>A 91—0333—52161</p> <p>Chlamydia trachomatis による慢性扁桃炎 小川浩司・田中寿一（北里研究所病院） 和山行正（北里大衛生科学検査研究センター） 川井田政弘・橋口一弘・山崎嘉司（慶大）</p> <p>習慣性扁桃炎も含む慢性扁桃炎患者26名の陰窩より <i>C. trachomatis</i> の分離培養を行い6名で感染を確認した。2名はオーラル・セックスによって感染し、他の4名の感染経路は不明であったが、乳児の1例は経産道感染によることが考えられた。<i>C. trachomatis</i> による慢性扁桃炎は炎症所見は軽いが咽頭痛は長く続き、しばしば急性増悪を繰り返した。オーラル・セックスによるものは、咽頭異物感を執拗に訴えたが、これは心理的要因によるものと思われる。治療にはマクロライド系、テトラサイクリン系抗菌剤やサルファ剤が有効である。</p>	<p>A 91—0323—22860</p> <p>実験的滲出性中耳炎モデルにおける免疫組織学的研究（第1報） ——中耳粘膜の局所免疫能—— 朴沢孝治（東北大）</p> <p>中耳の局所免疫応答能を知るため、白色モルモットに対し種々の経路で horseradish peroxidase (HRP) を用い抗原刺激を加え免疫応答を観察した。抗 HRP 抗体産生形質細胞は、中耳に対する抗原刺激のみでは得られず、全身感作を必要とすること、全身感作に局所刺激を加えることにより著しく数を増やすこと、少なくとも最終抗原刺激後3カ月は粘膜中に残存することが明らかとなった。HRP に対する局所免疫を獲得した中耳に再度 HRP を注入すると、2次応答はより速やかで、浸潤したりリンパ球によってリンパ濾胞様構造も形成され、リンパ球から抗 HRP 抗体産生形質細胞への分化過程も観察された。以上より、中耳粘膜も潜在的な局所免疫応答能を持つことが判明した。</p>
<p>A 91—0341—22182</p> <p>Acoustic Otoscope Recorder Model 501 の使用経験 浅野公子・高岡佳弘・根岸正之・小林一女 杉内智子・三辺武幸・岡本途也（昭和和大）</p> <p>本機を滲出性中耳炎 (OME) の検診に使用したところ、正答率は94.7%で、OME 検出率 (sensitivity) は50.0%と低かったが、正常検出率 (specificity) は98.0%と高かった。本機が OME 群と判定した例のうち、実際に OME である確率 (＋) の predictivity) は66.7%、正常群の判定のうち、実際に鼓膜所見正常である確率 (－) の predictivity) は92.6%であった。</p> <p>次に本機を臨床診断に使用したところ、正常検出率 (specificity) は92.7%と高かったが、貯留液耳検出率 (sensitivity) は64.1%と低く、穿孔耳、チューブ挿入耳、アテレクタシス耳は検出できなかった。貯留液耳検出率 (sensitivity) は年代による差を認めなかった。</p>	<p>A 91—0328—22160</p> <p>実験的滲出性中耳炎モデルにおける免疫組織学的研究（第2報） ——免疫複合体の生理活性と中耳病態—— 朴沢孝治（東北大）</p> <p>滲出性中耳炎は小児に多発する等宿主側因子の関与も大きいと考えられる。そこで宿主の免疫準備状態によって変化する免疫複合体の性状の変化が中耳炎病態に与える影響を調べるため低分子量及び高分子量の免疫複合体を in vitro で作製して中耳炎惹起実験を行った。この結果、低分子量免疫複合体は、高分子量のものに比べマクロファージ遊走活性が強く、このような生理活性は中耳炎の病態にもよく反映されていた。また可溶性免疫複合体は、抗原単独よりも中耳腔内に滞留し、特に低分子量のものにこの傾向があった。以上より、未熟な免疫準備状態の際に形成されるであろう低分子量免疫複合体は、滲出性中耳炎の遷延化に寄与する可能性が示された。</p>