酵素抗体法 (PAP) による内耳組織の 免疫グロブリンの検出

長崎大学医学部耳鼻咽喉科学教室 (主任: 隈上秀伯教授)

隈 上 秀 高, 吉 見 龍一郎

DETECTION OF IMMUNOGLOBULIN IN THE INNER EAR TISSUE BY PAP METHOD

HIDETAKA KUMAGAMI, M.D. and RYUICHIRO YOSHIMI, M.D.

Department of Otolaryngology, Nagasaki University, Nagasaki

The distribution of immunoglobulins IgG, IgA and IgM in the inner ear tissue from a patient who died of lung bleeding followed after sepsis was studied, and also the normal guinea pig inner ears and the inner ear disorders induced by Kanamycin injection were studied for the distribution of IgG.

The temporal bones were fixed in formaldehyde, decalcified in EDTA and embedded in paraffin. The PAP method was used for the demonstration of the immunoglobulins. In both the human inner ear tissue and the normal control inner ear tissue of the guinea pigs deposits of IgG were found in the sensory organs and the endolymphatic sac, however, in the stria vascularis was slight.

The severe damaged inner ears induced by Kanamycin the remarkable decreased deposits of IgG were found in the cochlea, but in the endolymphatic sac the remarkable increased deposits of IgG were found. No IgA and IgM were found in the human inner ear tissue.

Key words: ヒト・モルモット内耳, 脱灰パラフィン包埋, PAP 法
イムノグロブリン

A93-0407-23061

はじめに

最近内耳の免疫機構についての報告がなされるようになってきた。

内耳は骨迷路より成っているため組織レベルで内耳のイムノグロブリンの存在をみるには脱灰が必要である。側頭骨をホルマリン固定, エチレンジアミン 4 酢酸 2 ナトリウム (EDTA) にて脱灰を行っても抗原性が低下しないといわれている¹⁾²⁾。

著者らはヒトおよびモルモットの内耳について酵素抗体法 (PAP 法) を用いイムノグロブリンの局在を観察した。モルモットでは実験的内耳障害を作製し, イムノグロブリン G (IgG) について組織レベルで正常対照例と比較検討した。

対象および方法

ヒトの例は生下時体重 907g の未熟児で, 敗血症につづいて肺出血にて生後 16 日に死亡した側頭骨を用いた。側頭骨は死後 2 時間に摘出し 10%ホルマリンで固定した。聴力検査は行われていない。母親の血清梅毒反応は陰性である。頭部, 顔面には奇形は認めない。

モルモットは体重 300g 程度の白色モルモットを用いた。

1) 対照として無処置モルモット 2 匹を用いた。2) 実験的内耳障害として硫酸カナマイシン (KM) 100mg の筋注を隔日に行い, 3 週間継続し, その後筋注を行わず, 3 カ月経過してなおブライエル反射が保たれているもの 2 匹を用いた。3) さらに筋注を継続し, ブライエル反射が消失し, その後 6 カ月経過した 2 匹を用

いた。

以上の実験後、動物はネブタール全麻下に断頭し、耳胞を摘出、アブミ骨を除去した前庭より10%中性緩衝ホルマリンを注入し、その後耳胞を同ホルマリン液に浸漬した。脱灰はpH 7.2, 10% EDTAにて行い、毎日同液を変え、室温で行い、約2週間を要した。ヒトの例も脱灰の方法は同様である。

脱灰後エタノールにて脱水、パラフィン包埋し、5μの水平切片を作製し、キシロールにて脱パラフィン後水洗を行った。

イムノグロブリン染色は標識抗体に西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼを用いた酵素抗体法のPAP法を用いた。

非特異的反応をあらかじめ阻止するため過酸化水素水、さらに正常ヒツジ血清でブロックした。以後次の3種の抗体を順次作用させた。

1. 1次抗体としてウサギ由来の抗ヒトIgG, IgA, IgMをそれぞれ別個の標本に作用させ、組織の抗原と作用させた。

2. 次に1次抗体のFc部分に2次抗体を反応させた。これにはヒツジ由来の抗ウサギ免疫グロブリンを作用させた。

3. 次に2次抗体のFab部分に標識抗体を反応させた。これにはペルオキシダーゼ・ウサギ抗ペルオキシダーゼ複合体を作用させた。

4. 次にAEC基質(3-amino-9-ethyl-carbazole)を作用させ、ペルオキシダーゼにより組織中の抗体の局在部位は赤色ないし赤褐色に発色する。

5. 核はMayerのヘマトキシニンにて染色し、グリセリンにて封入した。

以上はヒトの場合であるが、モルモットの場合には1次抗体としてウサギ由来の抗モルモットIgGを作用させた。その他の操作は同様である。なお、陰性コントロールとして1次抗体の代わりに正常ウサギ血清を用い、陽性コントロールとして口蓋扁桃切片を用いた。

以上の操作はオーソ・ダイヤノステック・システム社製のキットを用いた。なお、モルモットではIgGについてのみ検討した。

結 果

1. ヒトの内耳 IgGは蝸牛ではらせん靱帯、らせん稜、ライスネル膜、蓋膜、基底板内の血管壁など広範囲にみられた。しかし、コルチ器、血管条では軽度

の陽性を示し、神経線維はほとんど陰性であった(図1. A, B)。膨大部稜では感覚上皮下に強い陽性を示し、クブラにも軽度ではあるが陽性を示した(図2. A, B)。

前庭では卵形嚢斑、球形嚢斑ともに感覚上皮の基底膜、および感覚上皮下に強い陽性を示し、感覚上皮にも軽度の陽性を示した(図3. A, B)。

内リンパ嚢rugose部では上皮細胞膜および上皮下層に陽性を示し、嚢内の浮遊細胞にも陽性を示した(図4. A, B)。内耳の血管壁も強い陽性を示した。IgAおよびIgMについては以上の部位では染色されなかった。

2. モルモットの内耳

1) 正常コントロールではIgGの局在部位とその染色所見はヒトの場合とほとんど同様であった。

2) KM筋注例対象2)の内耳では、蝸牛有毛細胞が軽度変性におちいつている部位においても、頂回転部の有毛細胞が良く保たれている部位においても、また前庭の感覚器においてもIgGの局在所見は正常例とほとんど変わらなかった。内リンパ嚢においては正常対照例よりもIgG陽性所見が広い範囲に及び、内リンパ嚢の上皮細胞膜、上皮下層、嚢内の浮遊細胞に陽性所見がみられた。

3) KM筋注3)の内耳では、蝸牛コルチ器の有毛細胞は広い範囲にわたり消失しており、対照例において陽性を示した部位のIgG染色性は著明に低下していた。らせん神経節も広範囲に消失、血管条も基底回転部は萎縮をきたしていた。らせん神経節部の小血管の数も正常対照例に比較して減少していた(図5. A, B)。

しかし、前庭では感覚器は形態的に良く保たれており、そのIgG染色所見は対照例とほとんど変わらなかった。

内リンパ嚢においては、その全体に及んで陽性を示し、IgG陽性物質で充満したような所見がみられた。上皮細胞膜、上皮下層の深層にも陽性反応を示し、嚢内の浮遊細胞にも陽性反応を示した(図6. A, B)。

考 察

内耳の免疫組織学的検索には新鮮な生の組織を凍結切片を用いて内リンパ嚢³⁾や蝸牛の基底膜^{4,5)}などについて、あるいはモルモット蝸牛についてなされている⁶⁾。一方、ホルマリン固定、EDTAにて脱灰したヒト内耳について蛍光抗体法を用いた報告では、内リンパ

図 1. A IgG

図 1. B negative control

図 2. A IgG

図 2. B negative control

図 3. A IgG

図 3. B negative control

図 4. A IgG

図 4. B negative control

図 5. A IgG

図 5. B 対照 2 IgG

図 6. A IgG

図 6. B normal control IgG

嚢に IgG, IgA が認められ, 他の部位の内耳では認められていない¹¹²⁾。

今回用いた PAP 法ではホルマリン固定を行い, ヒト内耳では約 1 カ月の脱灰を行っても抗原性はよく保たれていた。IgG, IgA, IgM について検討したが, このうち IgG は内耳の感覚器に広く赤褐色に染色されてみられた。同様に本法を用いたメニエール病例の内リンパ嚢についても二木ら⁷⁾により陽性所見が報告されている。

本法で注意すべき点は固定による diffusion artifact⁸⁾である。これは血清中および組織間液中に多量に存在する血清蛋白が, 組織内の特定の細胞にのみ染色されることが, ホルマリン固定, パラフィン切片で時にみられる。この現象は固定液の浸透が初期に不十分であった部位に生じやすく, 細胞が十分固定される以前に細胞の小さなキズを通して血清蛋白が passive diffusion により非特異的にしみ込んだものと考えられている。

今回の症例では陰性コントロールにおいても, また IgA および IgM についても同様な操作で行い, すべて陰性であった。モルモットの高度蝸牛障害例では染色性が低下していること, 形態的に良く保たれている前庭では対照と同じ程度の陽性所見を示したことで, さらに 1 次抗体の代わりに IgG と抗 IgG を等量に混ぜたものを作用させた場合には, すべて陰性であり, 陽性所見は単なる artifact ではないと思う。

内耳の内リンパ嚢の IgG の局在についてはすでに報告されている²⁾³⁾⁷⁾。

内リンパ嚢の血管は fenestrated type であり, 内リンパ嚢周辺にはリンパ網を形成している。従って, この部位に IgG が存在することは理解できる。一方, 感覚器が存在する部位では血管は non-fenestrated type で, 血液成分は容易に血管外には流出しなく, 選択的にしかできない, いわゆる関門が存在している。

内リンパ嚢と感覚器における IgG の染色性を比較すると, 内リンパ嚢の上皮細胞層ではその膜面が染色されており, 上皮下のリンパ網部, 蝸牛, 前庭, 半規管の感覚器および膜様部ではびまん性に IgG の沈着が認められた。

これらの染色性の差異については血流を介しての IgG か, リンパ網を介しての IgG かにより異なった局在様式を示すものとも思われるが, 正確には不明である。

分子量が 40,000 の HRP を髄液中に注入するとコル

チ器, 平衡斑, 半規管内の細胞内にとりこまれているが⁹⁾, 血管を介してはとりこまれない¹⁰⁾。外リンパ液の IgG 濃度は髄液のそれより高く, その供給源はおもに外リンパ腔をとり囲む血管から移行するものと推定されている¹¹⁾。

内リンパ嚢から注入された thorium dioxide は 24 時間後に中央階に達し, おそらく蛋白で被われているとする観察もある¹²⁾。

分子量が 15 万といわれる IgG が如何なる経路で内耳の感覚器に存在するかは不明であるが, 今回の KM による蝸牛の有毛細胞が高度に障害をうけた例では IgG の染色性が著明に低下していた。この所見は, これらの蝸牛のらせん神経節も広い範囲にわたり著明に消失し, この部位の小血管は正常対照例に比較してその数が減少しており IgG の染色性の低下に関係していると推定される。IgG の存在と内耳感覚器の機能と何らかの関連があるように思われる。

結 語

敗血症, 肺出血で死亡したヒト内耳および正常対照例のモルモットと KM によるモルモットの内耳障害例について IgG, IgA および IgM について観察した。

側頭骨はホルマリン固定, EDTA 脱灰, パラフィン包埋, 切片作製し, PAP 法にて染色し次の結果をえた。

本方法においては内耳の感覚器および内リンパ嚢に IgG が検出されたが, 血管条では軽微であった。KM による蝸牛の高度障害例では, 蝸牛の IgG の染色性は著明に低下したが, 内リンパ嚢では IgG の沈着が著明に増加した所見がみられた。ヒトの内耳では IgA および IgM は染色されなかった。

文 献

- 1) Arnold W: Möglichkeiten der immunfluoreszenz-mikroskopischen Diagnostik am entkalten menschlichen Felsenbein. Laryng Rhinol Otol 63: 260-265, 1984.
- 2) Arnold W, Altermatt HJ, Gebbers JO: Qualitativer Nachweis von Immunglobulin im menschlichen Saccus endolymphaticus. Laryng Rhinol Otol 63: 464-467, 1984.
- 3) Yamane H, Nakai Y, Sugiyama M et al: The occurrence of IgG in the endolymphatic sac of the guinea pig. Arch Otorhinolaryngol 243: 370-373, 1980.
- 4) Elies W, Pleater D: Sensorineural hearing loss and

immunity. Immunology, autoimmunity and transplantation in otolaryngology. (ed) Veldman JE et al. Kugler Publication, Amsterdam, 1987, pp 111-117.

- 5) Quick CA, Fish A, Brown C: The relationship between cochlea and kidney. Laryngoscope 83: 1469-1482, 1973.
- 6) Soliman AM: An improved technique for the study of immunofluorescence using non-decalcified frozen guinea pig cochlea. J Lar Otol 89: 283-294, 1980.
- 7) 二木 隆, 周 明仁: メニエール病患者内リンパ囊の免疫組織学的研究その4. Equilibrium Res Suppl 4: 31-36, 1987.
- 8) 堤 寛: 酵素抗体法の病理診断への応用(その1). 病理と臨床 2: 703-725, 1984.
- 9) 西條 茂: HRPの中耳から内耳への移動と内耳内分布. 曾田豊二監修: 内耳の病態をさぐる. 金原出版, 東京, 1987, 56-75頁.
- 10) 阪上雅史: 内耳毛細管の透過性. 曾田豊二監修: 内耳の病態をさぐる. 金原出版, 東京, 1987, 65-75頁.
- 11) 茂木五郎: 内耳の免疫応答. 耳鼻免疫アレルギー 5: 1-6, 1987.
- 12) Arnold W, Morgenstern, C, Miyamoto H: Morphology and function of the endolymphatic sac. Ménière's Disease. (ed) Vosteen KH et al. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1981, pp 110-114.

稿を終えるに臨み, 標本の観察, 染色法の御指導を載いた本学第3解剖学教室中根一穂教授に深謝いたします。

(1989年7月12日受稿 1989年12月15日受理)

別刷請求先 〒852 長崎市坂本町7-1

長崎大学医学部耳鼻咽喉科学教室 隈上秀高

付 図 説 明

- 図1 A. ヒト蝸牛のIgG所見
らせん靱帯, らせん稜, コルチ器, 蓋膜などの陽性所見(赤褐色を呈す)を示す。血管条は軽度の陽性。核はMayerのヘマトキシリンにて染色(以下同じ)
- B. 同例の陰性コントロール
- 図2 A. ヒト外側半規管膨大部稜のIgG所見。
感覚上皮下層, クブラ(矢印)の陽性所見を示す。
- B. 同例の陰性コントロール, クブラ(矢印)
- 図3 A. ヒト球形囊斑のIgG所見
感覚上皮下層の陽性所見を示す。
- B. 同例の陰性コントロール
- 図4 A. ヒト内リンパ囊rugose部のIgG所見
上皮および浮遊細胞の陽性所見を示す。(矢印)
- B. 同例の陰性コントロール
- 図5 A. モルモットの蝸牛. KM注射により高度な蝸牛障害をきたした例. IgGはらせん靱帯およびらせん稜にわずかに認められる。(矢印)
- B. モルモットの蝸牛. KM注射後なお, プライエル反射が保たれている例. IgG所見は正常例とほとんど変わらない。
- 図6 A. 図5のA例の内リンパ囊のIgG所見. 著明なIgGの沈着所見を示す. sは球形囊の方向を示す。
- B. 正常対照例(モルモット)の内リンパ囊のIgG所見を示す. sacは内リンパ囊。