内リンパ嚢局所免疫反応による内耳障害 ——聴性脳幹反応への影響——

日本医科大学耳鼻咽喉科学教室（主任：奥田 稔教授）

後 藤 裕 一，富 山 俊 一

IMMUNO-INJURY TO THE INNER EAR AUDITORY SYSTEM FOLLOWING SECONDARY ENDOLYMPHATIC SAC IMMUNE RESPONSE

YUICHI GOTO, M.D. and SHUNICHI TOMIYAMA, M.D.

Department of Otorhinolaryngology, Nippon Medical School, Tokyo

This study investigated immuno-injury to the inner ear auditory system following inner ear immune response in the guinea pig. The endolymphatic sac (ES) was directly challenged with keyhole limpet hemocyanin (KLH). Auditory brainstem response with click sound stimulation was assessed pre and post KLH challenge of the ES. In systematically presensitized animals, secondary KLH challenge to the ES produced significant elevation of the mean threshold level on day 3 and 17 as compared to that of pre challenge levels. However, no significant prolongation of the latency (N1—N3) was observed. On the other hand, neither phosphate buffered saline injection into the ES nor primary KLH challenges of the ES were capable of elevating the threshold level and changing the latency. These results indicate that elevation of threshold was apparently induced by a secondary immune response of the ES, not by nonspecific mechanical damage to the ES, the central auditory system or KLH toxicity to the inner ear, suggesting that local immune response of the ES is a possible pathogenesis of sensorineural hearing loss.

Key words: メニエール病, 内耳免疫反応,
Auditory Brainstem Response, 内リンパ水腫

A95—0963—23560

はじめに

メニエール病の病因は、いまだに解明されていない。しかし、その病理所見に関しては、1938年に山川¹⁾および Hallpike & Cairns²⁾ が、メニエール病患者の側頭骨所見を発表して以来、多くの報告がある。その病理組織学的特徴は、内リンパ水腫および内リンパ嚢周囲結合組織の線維化、血管、リンパ管網の消失などである³⁾。これらの病理組織学的所見は、主に剖検所見であり、メニエール病の終末像と考えることができる。したがって、このような内リンパ嚢の病的変性をもたらすなんらかの変化が、反復性のめまい発作や聴覚変動などの機能障害を引き起こすものと推測できる。

一方、最近の免疫学的研究によって、内耳独自の免疫反応系の存在や内耳局所免疫反応における内リンパ嚢の重要性が証明されてきている^{4)~7)}。さらに、内リンパ嚢での免疫担当細胞の詳細な分析⁸⁾ から、内耳免疫反応による内耳組織障害もメニエール病の一因と成り得る可能性が十分にあると推測されている。

そこで、本研究は、内リンパ嚢局所の免疫反応が、聴覚系にどのような影響を及ぼすか明らかにすることを目的とした。実験動物に与える侵襲が少なく頻回に測定が行えるという点や、対側耳への影響、あるいは実験手技などによる脳幹への影響をも観察できるという点から Auditory Brainstem Response (以下 ABR)

をその指標として用いた。

なお、今回と同様の実験系を用いて野中ら⁹⁾¹⁰⁾が前庭系に関して既に検討している。すなわち、二次抗原内リンパ嚢刺激動物では温度眼振反応の低下と自発眼振の出現が見られ、メニエール病類似の障害がおきることを報告した。したがって、本研究では前庭系障害に関しては言及しなかった。

方法と対象

1) 動物

体重 400～600g のハートレイ系モルモット（雌）31 匹を用いた。使用した動物は、内リンパ嚢感作直前の ABR 閾値が、クリック刺激で 53dBpeSPL 以下とした。また、実験終了時点で中耳炎を認めた動物は、実験群から除外した。

2) 抗原と免疫方法

全身感作方法の詳細は既に報告しているので¹¹⁾、簡単に述べる。抗原は、KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) (Calbiochemist, San Diego, CA) の associated form を用いた。抗原の希釈溶液には、PBS (リン酸緩衝食液) pH 6.4 を用いた。全身感作は、KLH (500 μ g) とフロイント完全アジュバントと混じて全身皮下に注射し、2 週間の間隔をあけて、2 度同量の KLH をフロイント不完全アジュバントと混じて追加免疫した。

内リンパ嚢への KLH 抗原の注入は、全身感作終了 2 週間後に、pentobarbital sodium と fentanyl citrate 麻酔下に行った。まず、後頭部に皮膚切開を加え開頭し小脳を露出し、硬膜を切開し小脳を圧排して内リンパ嚢を明視下においた。ついで、ガラス毛细管より KLH 5 μ l (100 μ g) を直接内リンパ嚢に注入した。抗原注入部には、ジェルフォームの薄片を当て、抗原が漏出しないようにした。KLH 抗原および PBS 注入側はすべて右側とした。

3) 実験計画

実験には、以下のように 3 群を用意した。

KLH 抗原での全身感作を行わないで、直接右内リンパ嚢に KLH 抗原を注入したものを一次刺激群。KLH 抗原による全身感作の後、直接右内リンパ嚢に KLH 抗原を注入したものを二次刺激群とした。これに対して、KLH 抗原全身感作後、5 μ l の PBS を右内リンパ嚢に注入した群を対照群とした。

4) ABR の測定方法

ABR の測定は、モルモットを pentobarbital

図 1 最大音圧負荷時(103dBpeSPL)の ABR 波形

sodium (35mg/kg) の腹腔内注射で麻酔し、内耳抗原注入前、および注入後 3, 10, 17 日目に施行した。刺激音には、持続 100 μ sec の矩形波によるクリック音を用い、open field で与えた。クリック刺激の間隔は、100msec とした。加算回数は 200 回、解析時間は 12.8msec とした。刺激音圧の測定は、動物の耳の位置で行った。閾値の判定は、最大音圧刺激の 103dBpeSPL より開始し、ABR 波形が消失するまで、10dBpeSPL ずつ減少させて行った。波間潜時の検討は、その波形が明瞭な N1 と N3 波間潜時を指標とし、103dBpeSPL 刺激時の反応を用いて行った(図 1)。なお、記録電極は、針電極を用い、頭頂部を陽極、検査側耳朶を陰極に置き、下腿筋を接地した。この際、対側耳は、90dB のホワイトノイズでマスキングした。なお、マスキングの効果は、一側内耳破壊動物にて確認した。

結 果

1) 対照群

内リンパ嚢への注入手技による物理的、あるいは機械的な刺激が、聴覚障害を惹起するか否かを知る目的で、KLH 抗原全身感作後、PBS を右内リンパ嚢に注入した 6 匹の動物で検討した。

ABR 閾値は、左右耳とも PBS 注入前、3, 10, 17 日目のいずれの時期においても、有意な差は認められなかった($P < 0.05$ 図 2)。(有意差検定には、Student の t-test を用いた。以後の統計的分析も同様に行った。) すなわち、左耳および右耳の PBS 注入前と注入後の各時期および、注入後の各時期の間に有意差が認められなかった。また、N1—N3 波間潜時も、閾値と同様に PBS 注入前後のいずれの時期にも統計的に有意な変化は認められなかった(表 1)。

2) 一次刺激群

KLH 抗原自体の毒性、あるいは一次的な KLH 抗原

図2 対照群の ABR 閾値の経時的変化
横軸は、内リンパ嚢に PBS を注入した後
の経過、縦軸は、ABR 閾値(平均と標準偏
差)を示す。(図3, 4 も同じ) 白丸点線は
右耳、黒丸実線は左耳を示す。

表1 対照群の N1-N3 潜時(msec)の経過

	PBS注入前	3日後	10日後	17日後
右 耳	1.5±0.1	1.5±0.1	1.5±0.2	1.5±0.2
左 耳	1.4±0.1	1.5±0.1	1.4±0.1	1.4±0.1

注入により、聴覚障害が起きる可能性を検討するため、右内リンパ嚢に直接 KLH 抗原を注入した9匹の動物で検討した。

右内リンパ嚢に KLH 抗原を注入しても図3(白丸)に示すように、右耳の ABR 閾値は、いずれの時期においても KLH 注入前と比して有意差を認めなかった。同様に、非注入側である左耳の閾値も抗原注入前後のいずれの時期にも有意差は認められなかった(図3, 黒丸)。また、対照群の右耳(図3, 三角)と一次刺激群の右耳との閾値の比較も行ったが、同様に有意な変化は認めなかった。表2に示したように、N1-N3 波間潜時も抗原注入前後のいずれの時期でも、有意な変化を認めなかった(表2)。

3) 二次刺激群

KLH 抗原全身感作後に、右内リンパ嚢に KLH 抗原を注入し、二次的免疫反応を惹起させた16匹で検討した。

右耳の ABR 閾値は、図4(白丸)に示すように抗原注入前に比べ、注入後3日目および17日目に有意に上昇を示した($P<0.01$)。また、注入後3日目に比し10

日目に有意な低下を示した($P<0.01$)。これに対して、左耳の ABR 閾値には、抗原注入前後のいずれの時期にも有意な変化はみられなかった(図4, 黒丸)。

また、対照群の右耳と二次刺激群の右耳では、図4に示すように抗原注入3日目に二次刺激群の閾値は対照群に比べ有意に上昇していたが、17日目には差は認められなかった($P<0.01$)。

N1-N3 波間潜時に関しては、抗原注入前後のいずれの時期でも他の群と同様に有意な変化は認められなかった(表3)。

考 察

1938年に山川¹⁾および Hallpike & Cairns²⁾がメニエール病の側頭骨病理所見を発表してから、メニエール病の病態は、内リンパ水腫および内リンパ嚢の線維化を特徴とすることは、既に多数の報告により知られている。しかし、どのような病因により、これらの病的変化が引き起こされてきているかは不明である。

一方、メニエール病の病因として、1923年に Duke¹²⁾が食物アレルギーとの関与を提唱して以来、免疫機序の関与が様々な研究によりなされてきている。その根拠としては、内外リンパ液中に免疫グロブリンが含まれていること¹³⁾、補体が存在すること¹⁴⁾などがあげられる。その後、内耳の免疫学的研究により、様々な実験的内リンパ水腫動物の作成がなされている¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾。さらに、メニエール病患者の内リンパ嚢の分析により、

図3 一次刺激群の ABR 閾値の経時的变化と対照群右耳の ABR 閾値との比較
白丸点線は一次刺激群の右耳，黒丸実線は左耳，三角破線は対照群の右耳を示す。

表2 一次刺激群の N1-N3 潜時(msec)の経過

	抗原注入前	3日後	10日後	17日後
右 耳	1.5±0.1	1.5±0.2	1.5±0.1	1.5±0.1
左 耳	1.4±0.1	1.4±0.1	1.4±0.1	1.4±0.1

内リンパ嚢を含めた内リンパ腔のどこかになんらかの免疫機構の障害が存在すること¹⁸⁾，内リンパ嚢内にマクロファージやリンパ球，形質細胞と言った免疫担当細胞が存在すること¹⁹⁾，内リンパ嚢に IgG が存在すること²⁰⁾ などが証明され，内リンパ嚢が内耳における免疫防御に重要な役割をしていると指摘されるに至っている。また，Harris は⁴⁾，モルモットを用いて内耳局所で抗体産生能力が存在することを示唆し，さらに，Tomiyama ら⁵⁾⁶⁾ は，内リンパ嚢を削除することにより内耳免疫反応が，抑制されることから内リンパ嚢局所がその中枢であることを明らかにした。また，野中ら⁹⁾ は，温度眼振反応を指標として，内リンパ嚢局所免疫反応により前庭機能の障害が惹起されることを述べている。

一方，内リンパ水腫動物による聴覚障害に関する検討は，物理的に内リンパ水腫を形成させた動物²¹⁾ や免疫反応による実験的内リンパ水腫作成動物¹⁴⁾ において，蝸电图上の変化を指標としてなされている。池園ら²²⁾ は，今回の実験で用いたのと同様の実験系を用い，その蝸电图記録で，一過性の AP 潜時の延長，振幅の低下および SP・AP 比の上昇といった蝸牛障害を

報告している。しかし，彼らの実験では，その実験上の性質から内リンパ嚢に直接抗原を注入することによる聴覚中枢に対する影響，すなわち物理的な脳幹圧迫などによる脳幹障害や KLH 抗原注入時の漏れなどによる対側内耳への影響の有無についての検討はなされていない。また，蝸电图記録上の制約から同一動物の経時的な聴覚閾値の変化については検討されていない。

今回の研究では，対照群，つまり PBS 注入耳では，いずれの時期においても ABR 閾値，および脳幹聴覚路の状態を示す N1-N3 波間潜時に有意な変化は認められなかった。このことから，内リンパ嚢への注入手技による物理的，機械的刺激によっては，脳幹聴覚路を含め，聴覚系への影響はほとんど起こらないと推測された。また，一次刺激群でも，ABR 閾値，N1-N3 波間潜時ともに，いずれの時期で対照群と同様に有意差を認めなかった。このことから，直接的な内リンパ嚢への KLH 抗原の刺激では，聴覚系に影響がないこと，あるいは KLH 抗原自体の毒性がないことが推測された。また，同時に KLH 抗原注入時の漏れなどによる脳幹障害の可能性も否定してよいものと思われる。一方，KLH 抗原全身感作後に内リンパ嚢に KLH 抗原を注入した二次刺激群では，抗原注入 3 日目に ABR 閾値に有意な上昇が認められ，その後の回復が認められた。このことは，蝸牛に可逆性の障害が起きていたことを示している。また，対照群と一次刺激群の比較では ABR 閾値に有意な変化はみられなかった。

図4 二次刺激群の ABR 閾値の経時的変化と対照群右耳の ABR 閾値との比較。

二次刺激群の右耳では、抗原注入前に比べ3日後と17日後に閾値の有意な上昇を認めた ($p < 0.01$)。また、対照群右耳と二次刺激群右耳との比較では、3日目に二次刺激群の閾値が有意に上昇 ($p < 0.01$) していた。白丸点線は二次刺激群の右耳、黒丸実線は二次刺激群の左耳、三角破線は、対照群の右耳を示す。* ; $p < 0.01$

表3 二次刺激群の N1-N3 潜時(msec)の経過

	抗原注入前	3日後	10日後	17日後
右 耳	1.5±0.2	1.4±0.3	1.4±0.1	1.5±0.1
左 耳	1.4±0.1	1.5±0.1	1.4±0.1	1.5±0.2

のに対して、対照群と二次刺激群との比較では二次刺激群の ABR 閾値に有意な上昇を認めており、二次的刺激により聴覚障害が惹起されたことを裏付けている。

今回述べた ABR 閾値と本実験系を用いた池園ら²²⁾の蝸电图による聴覚障害の経過はほぼ一致しており、本実験での N1-N3 波間潜時の結果に示されたように聴覚中枢路に対する影響が本実験方法では考えにくいことから、ABR 閾値の二次刺激群における変化は蝸牛の状態を反映しているものと推測された。

Tomiyama ら⁶⁾は、今回の研究と同様な内リンパ嚢局所免疫反応により一次刺激群と二次刺激群の外リンパ液中の KLH 抗体価の比較を行い、二次刺激群では KLH 抗体価の有意な上昇がみられることを示している。さらに、富山ら²³⁾は、これらの内リンパ嚢局所二次免疫反応による急性内リンパ水腫にも言及してい

る。すなわち、一次刺激群では、内リンパ嚢腔内におよぶ多核球の浸潤を認めるのみで、内リンパ水腫の形成は観察されていない。これに対して、二次刺激群では、二次刺激翌日から2日目をピークに多核球、マクロファージを主体とした炎症細胞浸潤が内リンパ嚢周囲や内リンパ腔内に約1週間にわたって認められ、これらにともなう内リンパ水腫の急激な成長が起こることを報告している。

これらの事実から、対照群や一次刺激群では、内リンパ水腫の形成がみられず、聴覚系にも影響してこないこと、二次刺激群では、急性炎症反応および急性内リンパ水腫の形成による圧変化などにより聴覚機能障害を惹起したものと推測された。

ま と め

KLH 抗原による内耳免疫反応が聴覚系におよぼす影響を、聴性脳幹反応を指標として検討した。実験にはモルモットを用い、内耳への抗原刺激は直接内リンパ嚢に行った。

KLH 抗原全身感作の後、二次的に内耳刺激をした動物では、刺激後3日目と17日目の平均聴覚閾値が抗原刺激前のそれと比較して有意に上昇した。しかし、

潜時 (N1-N3 波間) の延長は観察されなかった。

内リンパ嚢に PBS を注入した群や、一次 KLH 抗原内耳刺激群では、平均聴覚閾値の上昇および潜時の変化はなかった。

これらの結果から、聴覚閾値の上昇は内リンパ嚢での二次免疫反応によるものであり、内リンパ嚢あるいは聴覚中枢に対する非特異的な物理的障害や内耳に対する KLH 抗原の毒性によるものでないことが証明された。したがって、内リンパ嚢局所での免疫反応が、感音難聴の一要因である可能性が示唆された。

参考文献

- 1) 山川強四郎：メニエール病ヲ呈セシ患者ノ聴器。日耳鼻 44：2310-2312, 1938.
- 2) Hallpike CS & Cairns H: Observations on the pathology of Meniere's syndrome. J Laryng 53: 625-655, 1938.
- 3) 矢沢代四郎：内リンパ水腫に関する組織学的研究。耳鼻臨床 4 増 5 2450-2506, 1981.
- 4) Harris JP: Immunology of the inner ear: Evidence of local antibody production. Ann Otol Rhinol Laryngol 93: 157-162, 1984.
- 5) Tomiyama S, Harris JP: The endolymphatic sac: Its importance in inner ear immune response. Laryngoscope 96: 685-691, 1986.
- 6) Tomiyama S, Harris JP: The role of the endolymphatic sac in inner ear immunology. Acta Otolaryngol 103: 182-188, 1987.
- 7) Tomiyama S, Harris JP: Antigen specific Immune response of inner ear. Ann Otol Rhinol Laryngol 98: 447-450, 1989.
- 8) Rask-Andersen H, Stahl J: Lymphocyte-macrophage activity in the endolymphatic sac: an ultrastructural study of the rugose endolymphatic sac in the guinea pig. J Otorhinolaryngol Rerat Spec 41: 177-192, 1979.
- 9) 野中 学, 富山俊一, 八木聡明：モルモット内リンパ嚢局所免疫反応の温度眼振反応に及ぼす影響について。日耳鼻 93: 1973-1977, 1990.
- 10) 野中 学, 富山俊一：内リンパ嚢局所免疫モルモットの前庭機能障害について。日耳鼻 94: 1748-1755, 1991.
- 11) Tomiyama S, Harris J: Elevation of inner ear antibody levels following direct antigen challenge of the endolymphatic sac. Acta Otolaryngol 107: 202-209, 1989.
- 12) Duke WW: Meniere's syndrome caused by allergy. JAMA 81: 2179-2181, 1923.
- 13) Chevance LG, Galli A, Jeanmare MJ: Immunoelectrophoretic study of the human perilymph. Acta Otolaryngol 52: 41-46, 1960.
- 14) 原田 保, 松永 亨, Kyongsu Hong: 内リンパ水腫と補体-補体の存在と活性系について。耳鼻臨床 77 増 6: 2148-2154, 1984.
- 15) 内藤 偽, 長谷川義夫：メニエール氏病の実験的研究。日耳鼻 55: 234-235, 1952.
- 16) 朴沢二郎：メニエール病の反復性めまいに対する免疫アレルギー学的考察。耳鼻臨床 73: 527-539, 1980.
- 17) 澤田 泉：内リンパ嚢局所免疫法による実験的内リンパ水腫。Equilibrium Res 45: 231-251, 1986.
- 18) 二木 隆, 永雄裕美子：メニエール病患者内リンパ嚢の免疫組織化学的研究。一その 2— 耳鼻臨床 補 8: 59-62, 1986.
- 19) Lim DJ, Shimada T, Yoder M: Distribution of mucus-secreting cell in normal middle ear mucosa. Arch Otolaryngol 98: 2-9, 1973.
- 20) 山根英雄, 中井義明, 杉山正夫, 小西一夫, 桜井敏恵 他：内リンパ嚢における免疫グロブリン G の分布について。耳鼻臨床 補 82: 63-67, 1986.
- 21) 竹田泰三：メニエール病の聴覚に関する実験的研究。耳鼻臨床 74 増 5: 2507-2561, 1981.
- 22) 池園哲郎, 富山俊一：内リンパ嚢局所免疫動物の蝸電図。日耳鼻 95: 809-816, 1992.
- 23) 富山俊一, 野中 学, 八木聡明, 後藤裕一, 池園哲郎：内リンパ嚢局所二次免疫反応による急性内リンパ水腫 I：短期観察。日耳鼻 94: 333-342, 1991.

稿を終えるにあたり、ご校閲を賜りました恩師奥田 稔教授に深謝致します。また、終始直接のご指導、ご配慮を頂きました八木聡明助教授に心より感謝いたします。

本研究の一部は、第34回日本聴覚医学会総会、第35回日本聴覚医学会総会において発表した。

(1991年12月11日受稿 1992年1月18日受理)

印刷請求先 〒113 東京都文京区千駄木1-1-5

日本医科大学耳鼻咽喉科学教室 後藤裕一

A 95-0974-60096 日耳鼻 嚙下における舌骨運動の X 線学的解析 ——男女差及び年齢変化について—— 金子 功 (北里大) 男女による違いや加齢により嚙下時の舌骨運動がどのように変化しているかを解析し、嚙下動態を定量的に評価することを今回の研究目的とした。対象は咽喉頭異常感症の男性44例、女性27例とした。頸部側面から X 線映画撮影を行い、舌骨体下端の測定点の運動をモーションアナライザーで分析した。 ＜結果＞ 1. 舌骨の安静時位置は男女差があり、女性が男性よりも高位にあった。 2. 舌骨の安静時位置は、男性女性とも加齢により下降が認められた。 3. 嚙下時間、拳上距離は加齢により延長し、これは拳上第一相時間、拳上第一相距離の延長によると考えられた。	A 95-0963-23560 日耳鼻 内リンパ嚢局所免疫反応による内耳障害 ——聴性脳幹反応への影響—— 後藤裕一・富山俊一 (日医大) 内リンパ嚢局所免疫反応が聴覚系にどのような影響を及ぼすかを明らかにするためにモルモットで聴性脳幹反応 (ABR) を指標とした検討を行った。KLH 抗原全身感作後に、KLH 抗原を内リンパ嚢に注入した群では、注入前と比較して注入後3日目と17日目に ABR 閾値の有意な上昇が認められた。これに対し、全身感作後に PBS を内リンパ嚢に注入した群や全身感作をせずに直接内リンパ嚢の KLH 抗原を注入した群では ABR 閾値に変化はみられなかった。また、N1-N3 波間潜時は、各群とも、どの時期にも有意な変化がなかった。以上より、可逆的な聴覚障害は、内リンパ嚢局所免疫反応による蝸牛障害に起因すると推測された。
A 95-0988-21481 日耳鼻 埋没耳の計測学的特徴と統計学的観察 矢野健一 秦 維郎 (香川医大・形成外科) 片側埋没耳症例の患側と健側耳介の計測結果を分析検討し、さらに自験例と本邦報告例の統計学的観察を行った。その結果、埋没耳は下向きと内向きに働く力のベクトルの総和により生じる耳介上1/3の変形であると定義され、内向きのベクトルよりも下向きのベクトルの方が強いことが判明した。片側埋没耳症例の健側耳介に耳輪癒着症様変形が3例に認められ、軟骨の変形により二次的に耳介上部が埋没するという説が有力と考えられた。本邦集計例における男女比、左右両側比はそれぞれ2:1、5:2:3であった。家族内発生が、自験例で母親に2例、従兄弟と叔父に1例ずつ認められ、遺伝的関与の強い疾患であることが示唆された。	A 95-0969-22401 日耳鼻 先天性真珠腫が疑われた4症例の臨床的観察 津田哲也・川本浩子 田中誠史 西田 功・渡部 浩 多田 渉・平川勝洋 鈴木 衛 原田康夫 (広島大) 過去15年間に、4例の先天性真珠腫と思われる症例を経験した。患者の年齢は4歳から17歳であった。すべての症例で真珠腫は中耳より発生していた。1例は真珠腫が乳突洞まで進展していた。コルメラIII型の鼓室形成術が施行された。術後聴力改善度は20から30dB程度であった。まれではあるが、鼓膜所見正常の伝音性難聴の治療にあつては、耳鼻科医は先天性真珠腫に留意しなければならない。