内リンパ嚢局所免疫動物におけるフリーラジカルの関与について

日本医科大学耳鼻咽喉科学教室（主任：八木聰明教授）

木下俊之, 富山俊一

FREE RADICALS IN INNER EAR IMMUNE RESPONSES ;
IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF MYELOPEROXIDASE

TOSHIYUKI KINOSHITA, M.D. and SHUN-ICHI TOMIYAMA, M.D.

Department of Otolaryngology, Nippon Medical School, Tokyo

Previously, we reported that immune reactions in the endolymphatic sac of guinea pigs caused spontaneous nystagmus, a suppressed caloric response, and fluctuating hearing loss. In order to evaluate immune injury to the sensory organs of the inner ear, we conducted an immunohistochemical investigation of the distribution and time course of myeloperoxidase (MPO) following immune reaction in the endolymphatic sac. MPO staining can be seen in the endolymphatic sac, outer hair cells, stria vascularis and lateral canal (ampulla), from several hours to 3 weeks after a secondary KLH challenge, and its time course parallels the time course of neutrophil infiltration of the endolymphatic sac. This result indicates that free radicals in the MPO-H₂O₂-Cl system are responsible for the tissue damage and dysfunction resulting from inner ear immune reactions.

Key words: モルモット, 内リンパ嚢, 免疫反応,
ミエロペルオキシダーゼ, フリーラジカル

A97-1608-23941

I はじめに

メニエール病の病理組織学的特徴が内リンパ水腫にあることは山川¹⁾, Hallpike²⁾ 以来, 種々の報告がある。しかし, 内リンパ水腫自体の発生原因はいまだに明らかにされていない。

最近, 内リンパ嚢が内耳において唯一免疫応答能力を備えた部位であることが明らかとなってきた³⁾⁻¹¹⁾。以前我々はモルモットの内リンパ嚢局所でIII型免疫反応を惹起させた結果, 組織学的変化として内リンパ嚢の炎症細胞浸潤と内リンパ水腫¹²⁾¹³⁾, 内耳機能変化として自発眼振出現, 温度眼振抑制¹⁴⁾ および変動する感音難聴¹⁵⁾¹⁶⁾ が生ずることを示した。また, これがヒトのメニエール病に極めて類似した病態像であることから, 本法によって作製した動物がメニエール病の実験動物モデルとして有用であることを報告した。

内リンパ嚢におけるIII型免疫反応が主体である本動

物モデルでは, その組織傷害, 機能障害の原因として免疫反応を介してのフリーラジカル, 補体, サイトカインなど種々の因子が関与している可能性が考えられる。同様な好中球浸潤が生じる慢性糸球体腎炎の動物モデルやヒトの慢性関節リウマチにおいて, その組織傷害におけるフリーラジカルの関与が報告されており, ことに好中球から放出されるミエロペルオキシダーゼ (MPO) と, 組織傷害, 機能障害の関係が報告されている¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾。また, 慢性関節リウマチなどではフリーラジカルを制御することによって治療に結び付けようとする試みもなされ始めている。

今回, 内リンパ嚢局所免疫動物における組織学的傷害および機能的障害の機序の一つとしてのフリーラジカルの関与を調べる目的で, 好中球を介してのフリーラジカル産生において重要な役割を果たす MPO の局在および経時的な推移について免疫組織化学的検討を行った。結果として, 内リンパ嚢局所に浸潤した好中

球内のアズール顆粒内のみでなく、脱顆粒されたMPOが蝸牛や前庭に到達し沈着していることが明らかとなったので、その意義について考察を加えながらその局在および経時的な分布の変化について報告する。

II 方 法

KLH 抗原 (Keyhole Limpet hemocyanin, Calbiochemist, La Jolla, CA, Lot730052) による全身感作、および内リンパ嚢局所免疫の方法は既に報告した¹²⁾¹³⁾ので簡略に述べる。ハートレー系モルモット (350g—400g 雌, 埼玉実験動物) に, KLH 500 μ g を complete Freund's adjuvant とともに全身皮下感作し, さらに KLH を incomplete freund's adjuvant とともに2回, 2週毎に追加免疫として皮下投与した。内リンパ嚢局所感作は pentobarbital sodium, fentanyl citrate による麻酔下の後頭蓋硬膜内経由で行い, KLH 100 μ g/5 μ l を右内リンパ嚢内に注入した。感作後2, 5, 10時間, 1, 2, 3, 7, 14, 21日を経過した時点でそれぞれ5匹ずつ屠殺し, 酢酸加10%ホルマリン生食による心灌流固定ののち組織を採取, 同固定液に一晩固定し, EDTA 脱灰, パラフィン包埋, 切片薄切, 脱パラフィンの後, 免疫組織染色を行った。一次抗体としてウサギ抗ヒト MPO ポリクロナール抗体 (DAKO 社製), 免疫染色には LSAB キット (DAKO) を用い, 内因性ペルオキシダーゼを 3% H_2O_2 で阻止し, DAB で発色させ, Glycerol-gel (DAKO) で封入した。一次抗体濃度は900倍とした。ポジティブコントロールとしてモルモットの脾臓を用い, また, ネガティブコントロールとしては一次抗体の代わりにウサギ正常血清を用いた。また, 対照実験として, 全身感作を行わずに磷酸緩衝生理食塩水 Ph 6.4 (PBS) を内リンパ嚢に注入した動物を作製し, 内リンパ嚢への手術操作のみによる影響についての対照とした。また, 正常内耳についても検討した。

染色後組織を光顕で観察し, 組織の染色の度合いを肉眼的にネガティブコントロールと同等を一, ポジティブコントロールのアズール顆粒と同等を+++として, -, ±, +, ++, +++の5段階に分類した。

内リンパ嚢局所への細胞浸潤の程度についても経時的に検討した。光顕下400倍1視野あたり炎症細胞10個までを grade I, 11—100個を grade II, 101個以上を grade III, 無数に細胞浸潤を認めるものを grade IV とした¹³⁾。

III 結 果

1. ポジティブコントロール (脾臓)

モルモット脾臓組織では, 好中球のアズール顆粒のみに褐色に染まる明瞭な MPO 染色を認めた (図1)。

2. ネガティブコントロール

モルモット脾臓について, ウサギ抗ヒト MPO 抗体の代わりにウサギ正常血清を用いて脾臓組織を反応させたが, 特異的な反応は認めなかった (図2)。

3. 正常内耳

正常内耳では, 内リンパ嚢, 蝸牛, 半規管とも MPO 染色は認めなかった。

4. 対照耳 (PBS 注入群)

内リンパ嚢上皮にはごくわずかな MPO 染色を認めたが, 前庭, および蝸牛組織での MPO 染色は認めなかった (図3)。

5. 実験耳

内リンパ嚢, 前庭, 蝸牛各部位の MPO 染色性の経時的推移を図4 (a—e) に示した。また, 内リンパ嚢への炎症細胞浸潤の程度の経時的推移を図4 f に示した。

1) 内リンパ嚢

上皮, 内リンパ嚢周囲組織に二次感作5時間後から MPO の染色を認め, 1—2日をピークとして次第に染色性が減弱し, 21日目にはほとんど染色を認めなくなった (図4 a, 5, 6)。内リンパ嚢腔内, 浮遊細胞も同様な経過で染色を認めた。内リンパ嚢近位部と比して遠位部, 中間部に MPO 染色が強かった。

内リンパ嚢局所への好中球浸潤は二次感作2時間から5時間後より認められ, 1日目で grade IV と著明な浸潤を示した (図4 f)。図4 a—e, 4 f の比較から明らかなように, 今回の実験での内リンパ嚢の MPO 染色性と内リンパ嚢局所の好中球浸潤の経時的推移はほぼ一致していた。また, 14日, 21日目では, 浸潤している細胞はほとんどがリンパ球におきかっていた。

2) 蝸牛

蝸牛局所には好中球の浸潤を認めなかった。らせん器では, 外有毛細胞に明瞭な MPO による染色が認められた。他に, クラウディウス細胞, ヘンゼン細胞についても二次感作5時間目から染色を認めはじめ, 1—2日目をピークとして次第に減弱し, 21日目では極めて軽微となった (図4 b, 7, 8)。外リンパ腔領域には MPO 染色は認めなかった。

血管条では, 辺縁細胞に5時間目から MPO 染色を

図4 各部位のMPO染色性の経時的推移 (a-e) および内リンパ嚢局所への細胞浸潤の程度 (f) を示した。横軸が内リンパ嚢二次感作から屠殺までの期間、縦軸がa-eではMPO染色の程度を示し、fでは内リンパ嚢局所への細胞浸潤の程度を示す。点1個が動物1匹を示し、実線は中央値を結んだもの。a: 内リンパ嚢, b: 血管条, c: 外有毛細胞, d: 半規管膨大部稜, e: 球形嚢

認め、1-2日目をピークとして21日目にかけて染色性が減弱した (図4 c)。

らせん靱帯では5時間目からMPO染色を特に血管周囲に認め、1-2日目をピークとして21日目にかけて減弱した。

3) 前庭

半規管、卵形嚢、球形嚢には好中球の浸潤を認めなかった。

半規管では、外側半規管膨大部のクプラ、クプラ下腔、感覚上皮細胞、膨大部稜で二次感作5時間目からMPO染色を認め、1-2日をピークとして21日目には消退した (図4 d, 9, 10)。

球形嚢でも局所好中球浸潤はないにもかかわらず、感覚上皮細胞に5時間目から染色を認めはじめ、1-2日目をピークとして次第に減弱した (図4 e)。球形嚢腔内には染色は認めなかった。

IV 考 察

近年、種々の疾患にフリーラジカルや活性酸素が関与していることを示す報告が散見される。活性酸素とは、狭義には H_2O_2 、 O_2^- 、 $\cdot OH$ 、 1O_2 の4種類である。これらは分子内に不対電子を持ち、この不対電子

が隣接する分子に移動し、その分子膜やDNAの過酸化を生じさせることにより組織傷害を引き起こすものである。フリーラジカルとは上記の4種類のみでなく、不対電子を持ち、近接分子への過酸化能力を持つすべての分子をいう。

MPOは、好中球アズール顆粒内に存在する分子量約11,800のヘム蛋白である²⁰⁾。MPOは、炎症刺激により好中球が活性化されると脱顆粒によって好中球外に放出され、好中球膜で生じた O_2^- により生じる H_2O_2 と、体液中に豊富に存在する塩素イオンを基質として次亜塩素酸($HOCl$)を生じる¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾。 $HOCl$ は、それ自体がラジカルとして働いたり、最も強い酸素種である $\cdot OH$ を生じたりする。これらが生体膜のリン脂質二重膜構造を過酸化し、組織傷害や機能障害を生じさせるとされている。この好中球を介してのフリーラジカルの反応系を、JohnsonらはMPO- H_2O_2 -Cl systemと呼んでいる¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾。種々の炎症のモデルにおいて、局所に浸潤した好中球によってこのような機序の組織傷害が生じることが確かめられている。今回用いた動物モデルでも、III型免疫反応によって内リンパ嚢局所に著明な好中球浸潤が確認されていること¹³⁾から、好中球から脱顆粒されたMPOを介したMPO- H_2

木 下 論 文 付 図 (1)

図1 ポジティブコントロール：モルモット脾臓組織。好中球アズール顆粒の明瞭なMPO染色を認める。

図2 ネガティブコントロール：モルモット脾臓。ウサギ正常血清では染色を認めなかった。

図3 対照実験耳（PBS注入群）：内リンパ囊上皮にのみごくわずかな染色を認めたが、好中球浸潤はみられなかった。

図5 内リンパ囊（二次感作1日目）：内リンパ腔に著明な好中球浸潤を認めた。MPO染色性+++。

図6 内リンパ囊（二次感作21日目）：内リンパ腔内の細胞は主にリンパ球におきかわっており、MPO染色性も低下している。

木 下 論 文 付 図 (2)

図7 蝸牛（二次感作1日目）：血管条辺縁細胞，
外有毛細胞，ヘンゼン細胞，クラウディウ
ス細胞，らせん靱帯に染色を認めた。

図8 蝸牛（二次感作21日目）：MPO染色性は
ほとんど認めない。矢印のごとく内リンパ
水腫を認めた。

図9 外側半規管（二次感作2日目）：クプラ，ク
プラ下腔，感覚上皮細胞，膨大部稜に染色
を認めた。

図10 外側半規管（二次感作21日目）：MPO染
色性をほとんど認めない。感覚上皮の空
胞化を認めた。

O₂-Cl system によりフリーラジカルの反応が生じ、組織傷害、機能障害が引き起こされているであろうことは容易に想像される。

モルモット脾臓を用いたポジティブコントロールでは、好中球アズール顆粒に一致した特異的 MPO 染色を認め、ウサギ抗ヒト MPO ポリクロナール抗体はモルモット MPO に対しても交叉性を持つことが示された。対照群 (PBS 注入群) では、内リンパ嚢にのみごくわずかな染色を認めたが、これは PBS を内リンパ嚢に注入した手術操作自体でごく軽微な組織損傷や炎症が生じたものと考えられる。しかし、蝸牛、前庭には MPO は到達しておらず、この対照群においては聴力障害、平衡障害は生じないであろうことが推測される。これは、以前に我々が報告した、PBS 注入群では温度眼振反応、聴力の低下は来さないという結果と一致する¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。

実験耳 (二次感作群) では、KLH 内リンパ嚢注入後 1-2 日をピークとして、蝸牛外有毛細胞、クラウドイウス細胞、ヘンゼン細胞、血管条の辺縁細胞、らせん靱帯、外側半規管膨大部の感覚上皮細胞、クプラ、クプラ下腔、膨大部後、球形嚢に MPO の染色を認めている。以前我々は、二次感作後 1 日以降の内耳組織を検討し、1 日目で内リンパ嚢局所の著明な好中球浸潤を認め始め、約 1 週間で好中球が消退しリンパ球におきかわることを報告した¹³⁾。今回の実験では、さらに詳細に感作後 2 時間、5 時間、10 時間後での内リンパ嚢細胞浸潤の程度を検討した結果、二次感作後 5 時間で明らかな内リンパ嚢への多数の多核白血球の浸潤を認めた。今回得られた内リンパ嚢での染色性のピークは、この内リンパ嚢への好中球浸潤の経過とほぼ一致していた。また、蝸牛や球形嚢、半規管局所には好中球浸潤を認めなかったことから、内リンパ嚢局所に好中球が遊走した後、MPO が脱顆粒によって好中球から放出され、放出された MPO が内リンパ嚢から蝸牛や半規管局所に到達して沈着したことが示唆された。内リンパ嚢から蝸牛、前庭に MPO が到達する経路として、内耳血管系を介するもの、内リンパ管、球形嚢を経て半規管や蝸牛に至るものが考えられる。今回の実験で球形嚢にも染色がみられたことから、内リンパ嚢から内リンパ管、球形嚢を経て蝸牛、前庭に到達する経路が最も考えられた。

蝸牛、前庭に分布した MPO がどのように消退してゆくか、という点が解明されれば、MPO 消退を早めるような操作を行えばメニエール病の治療に結びつくの

で重要であるが、今回の実験ではこれに関しての情報は得られなかった。

Johnson らは、陽性荷電をもつ分子である MPO は陰性荷電をもつ部位に沈着しやすく、腎臓においても陰性荷電をもった糸球体基底膜に MPO が沈着して糸球体腎炎を生じると報告している¹⁷⁾¹⁸⁾。また、Tomoda ら²¹⁾ はモルモット蝸牛組織における陰性荷電関門の存在を報告しており、陽性電荷をもった MPO が、陰性荷電をもった血管条などに沈着しやすいであろうことが推測される。

これらを考え合わせると、内リンパ嚢に惹起された二次免疫反応によって好中球が内リンパ嚢に遊走浸潤し、その好中球から放出された MPO が血管条、外有毛細胞、外側半規管膨大部などに沈着し、MPO-H₂O₂-Cl system によるフリーラジカルの反応が引き起こされ、組織傷害、機能障害を生じたと推測された。

今後、ヒトのメニエール病でもフリーラジカルの反応を制御することで、発作を制御し得る可能性が示された。

V 結 語

1. 内リンパ嚢免疫動物におけるミエロペルオキシダーゼの局在を免疫組織学的に検討した。
2. 内リンパ嚢、外有毛細胞、血管条、らせん靱帯などに MPO による染色を認めた。
3. これらの MPO 染色のピークは、好中球浸潤のピークとほぼ一致していた。
4. 内リンパ嚢に遊走した好中球から MPO が放出され、蝸牛、半規管組織に沈着することによって、MPO-H₂O₂-Cl system を介してフリーラジカルの反応が起り、組織傷害、機能障害が生じることが推測された。
5. ヒトのメニエール病でも、フリーラジカルの反応を制御することで、発作を制御し得る可能性が示された。

文 献

- 1) 山川強四郎：メニエール氏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 Laryngol 53: 626-655, 1938.
- 3) Guild SR: The circulation of the endolymph. Am J Anat 39: 57-81, 1927.

- 4) Lundquist PG, Kimura RS, Wersall J: Ultrastructural organization of the epithelial lining in the endolymphatic duct and sac in the guinea pig. *Acta Otolaryngol* (Stockh) 57: 65-80, 1964.
 - 5) Lim D, Silver P: The endolymphatic duct system. A light and electron microscopic investigation. In Barany Society Meeting, Los Angeles, CA, 1974, J Plec ed, p 390.
 - 6) Rask-Andersen H, Stahle J: Immunodefense of the inner ear? Lymphocytemacrophage interaction in the endolymphatic sac. *Acta Otolaryngol* (Stockh) 89: 283-294, 1980.
 - 7) Arnold W, Altermatt HJ, Grebbers JO: Demonstration of immunoglobulin (SIgA, IgG) in the human endolymphatic sac. *Laryngol Rhinol Otol* 63: 464-467, 1984.
 - 8) Tomiyama S, Harris JP: The endolymphatic sac. its importance of inner ear immune response. *Laryngoscope* 96: 685-694, 1986.
 - 9) Wackym PA, Friberg U, Linthicum FH et al: Human endolymphatic sac: Morphologic evidence of immunologic function. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 96: 276-81, 1987.
 - 10) Takahashi M, Harris JP: Anatomic distribution and localization of immunocompetent cells in normal mouse endolymphatic sac. *Acta Otolaryngol* (stockh) 106: 409-416, 1988.
 - 11) Takahashi M, Harris JP: Analysis of immunocompetent cells following inner ear immunostimulation. *Laryngoscope* 98: 1133-1138, 1988.
 - 12) Tomiyama S, Harris JP: The immunofunction of the endolymphatic sac in the inner ear immune response and endolymphatic hydrops following endolymphatic sac immune response. *Otol Jpn* 1 suppl (1): 31-39, 1989.
 - 13) 富山俊一, 野中 学, 八木聡明, 後藤祐一, 池園哲朗: 内リンパ嚢局所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.
 - 14) 野中 学, 富山俊一: 内リンパ嚢局所免疫モルモットのの前庭機能障害について. *日耳鼻* 94: 1748-1755, 1991.
 - 15) 後藤祐一, 富山俊一: 内リンパ嚢局所免疫反応による内耳障害. *日耳鼻* 95: 963-968, 1992.
 - 16) 池園哲朗, 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.
 - 17) Johnson RJ, Couser WG, Klebanoff SJ et al: New mechanism for glomerular injury: Myeloperoxidase-hydrogenperoxide-halide system. *J Clin Invest* 79: 1379-1387, 1987.
 - 18) Johnson RJ, Klebanoff SJ et al: Participation of the myeloperoxidase-H₂O₂-halide system in immune complex nephritis. *Kidney int* 32: 342-349, 1987.
 - 19) Johnson RJ, Guggenheim SJ, Klebanoff SJ et al: Morphologic correlates of glomerula oxidant injury induced by the myeloperoxidase-hydrogenperoxide-halide system of the neutrophil. *Lab Invest* 58: 294-301, 1988.
 - 20) Matheson NR, Wong PS, Travis J: Isolation and properties of human neutrophil myeloperoxidase: *Biochem* 20: 325-330, 1981.
 - 21) Tomoda K, Maeda N, Kumazawa T: An anionic charge barrier in the guinea pig cochlea. *Arch Otorhinolaryngol* 245: 307-310, 1988.
-
- 稿を終えるにあたり、ご指導並びにご校閲を賜りました八木聡明教授に深甚なる謝意を捧げます。また、本研究にあたりご助言を頂いた Ruby Pawankar 先生に感謝いたします。
- 本論文の要旨は第3回日本耳科学会総会(名古屋)で口演した。
-
- (1994年1月27日受稿 1994年4月7日受理)
- 別刷請求先 〒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 木下俊之