ETUDE IMMUNO-ELECTROPHORETIQUE DE LA PERILYMPHE HUMAINE NORMALE

L. G. CHEVANCE • A. GALLI • Mme J. JEANMAIRE

La ligne de nos précédentes recherches sur les structures protéiques de la périlymphe de l'homme et des mammifères (1) nous a tout naturellement conduit à l'étude immuno-électrophorétique de la périlymphe humaine, en envisageant, cette fois, les différentes fractions protéiques susceptibles d'être révélées par cette technique.

La présente étude qui, à notre connaissance, est la première en ce domaine, fut effectuée d'après la technique de GRABAR et WILLIAMS (2) laquelle est, sinon une technique de routine, du moins une technique dont l'emploi est actuellement largement répandu pour de telles études.

TECHNIQUE & CONDITIONS EXPERIMENTALES

Les prélèvements de périlymphe humaine furent effectués sur des cadavres de malades décédés d'affections n'intéressant ni l'oreille interne, ni les centres cérébraux. Les corps étaient conservés à une température de $+3^{\circ}$ à $+5^{\circ}$. La périlymphe fut prélevée après fistulisation du canal semi-circulaire externe, en suivant la voie d'abord utilisée pour la fenestration. De façon habituelle, les prélèvements provenant de trois ou quatre oreilles étaient mélangés pour effectuer chaque expérience. Préalablement à chacune d'elle, on s'assura, par examen microscopique direct, qu'il n'existait pas de souillure sanguine (pas plus de cinq hématies par champ microscopique -objectif $\times 7$ - oculaire $\times 10$). Les prélèvements étaient conservés à 0° et étudiés aussi rapidement que possible-généralement dans les douze heures qui suivirent leur recueil.

Nous avons toujours utilisé, pour la présente étude, des liquides fraîchement prélevés. Nous n'avons pas utilisé de prélèvements liophylisés (à la différence de certaines de nos précédentes recherches), mais nous pensons que la liophilisation n'aurait pas modifié de façon significative nos résultats.

L'électrophorèse est effectuée sur les plaques de verre (15×18 cm), préalablement enduites de gelose, de l'appareil de GRABAR. La couche de gelose est d'une épaisseur uniforme de 5 cm, elle est constituée par le mélange suivant :

Solution à 0.9% de gelose diluée à moitié dans le tampon suivant

Véronal sodique	10.3 g
Véronal	1.84 g
Eau distillée	1000 ml

Solidification à $+4^{\circ}$ environ.

Le prélèvement de périlymphe à étudier est déposé dans une petite excavation creusée à l'emporte pièce, à égale distance des bords de la plaque. Le volume de chaque prélèvement de périlymphe étudié était compris entre 0.25 et 0.40 ml.

La tension aux bornes est d'environ 120 volts, l'intensité de 10 mA. Le temps de passage du courant fut de trois heures et demie dans tous les cas.

En de telles conditions la longueur de chaque tracé électrophorétique obtenu fut

d'environ 10 cm. Les réactions de précipitations immunologiques furent obtenues à l'aide de deux immun sérums qui furent généralement utilisés simultanément.

Ces deux types d'immun sérums étaient en l'occurrence :

1/ un sérum équin anti-humain, préparé et testé par l'Institut Pasteur de Paris (Drs GRABAR & BURTIN) ;

2/ un sérum de lapin, anti-liquide céphalo-rachidien humain, spécialement préparé par nous en vue de la présente étude.

En raison de la faible teneur en protéines du liquide céphalo-rachidien normal, nous utilisâmes pour immuniser un lapin, 1.000 ml de L. C. R. Ce liquide fut liophylisé, stocké et dilué au moment de l'emploi dans une quantité appropriée d'eau distillée. Simultanément, des injections d'aquaphor furent effectuées, afin de stimuler la production d'anticorps. L'immun sérum obtenu ainsi fut testé de façon répétée, on le trouva toujours pauvre en anti-alpha 2 globulines, mais particulièrement riche en anti-béta, en sidérophylle et en anti-gamma globulines.

Ces deux immuns sérums étaient déposés dans deux rigoles creusées à égale distance du point de dépôt de la périlymphe, sur 12cm le long des plus longs côtés de la plaque.

Le contact des sérums immuns avec la périlymphe se traduit comme dans toute électro-immunophorèse positive par l'apparition de fronts de précipitations incurvés en segments d'arcs de cercle. On pratiqua les premières observations après 48 heures et les photographies de contact 72 heures après le début de chaque expérience (fig. 1)

Nous avons ainsi pratiqué vingt expériences différentes dont le résumé statistique est figuré dans le diagramme de la fig. 2.

RESULTATS

On peut les grouper suivant chaque type d'anti-sérum utilisé :

1) Précipitation par contact avec le sérum équin anti-humain

Les différentes fractions suivantes furent identifiées de façon constante, ou à peu près constante :

a-fraction albumine - toujours présente et révélée par une ligne nettement marquée ;
b-fraction alpha 1 globuline - révélée par une ligne toujours présente, mais d'assez faible importance ; à plusieurs reprises on mit en évidence deux lignes révélatrices d'alpha 1 globuline ;

c-fraction alpha 2 globuline - elle fut révélée par une seule ligne et de façon non constante, mais en deux cas on mit en évidence respectivement 3 et 4 lignes révélatrices des alpha globulines ;

d-fraction beta 1 globuline - une ligne très nettement marquée est retrouvée de façon constante, dans un seul cas on trouva deux lignes révélatrices ;

e-fraction beta 2 globuline -avec le serum equin on ne révéla en aucun cas cette fraction (ce qui ne veut pas dire qu'elle soit inexistante dans la périlymphe normale);

f-fraction gamma globuline-constante, révélée par une ligne d'assez faible intensité.

2) Précipitation par contact avec le serum de lapin anti-L. C. R. humain.

Les différentes fraction suivantes furent mises en évidence:

a-fraction albumine -indiquée par une ligne unique nettement marquée. En en un seul cas une ligne pré albuminique nettement indiquée fut mise en évidence (nous ne l'avons jamais trouvée en étudiant la constitution immuno-chimique du serum humain);

b-fraction alpha 1 globuline -elle fut mise en évidence de façon inconstante (1/3 des cas environ);

c-fraction alpha 2 globuline -elle fut trouvée de façon presque constante, mais traduite par une ligne de faible intensité; en quelques cas deux lignes traduisirent l'existence de fractions alpha 2 globulines;

d-fraction beta 1 globuline -toujours présente, très nettement marquée; en un cas la ligne était double;

e-fraction beta 2 globuline -fut très inconstamment retrouvée (en deux cas seulement);

f-fraction gamma globuline -toujours retrouvée sous forme d'une ligne d'importance moyenne, en deux cas cette ligne se dédoublait au voisinage de la cathode.

Ainsi, à ne considérer que l'ensemble des fractions constantes (ou quasi constantes), les fractions suivantes furent mises en évidence au niveau de la périlymphe humaine normale:

- 1 fraction albuminique
- 3 fractions de globulines alpha 1
- 4 fractions de globulines alpha 2
- 3 fractions de globulines beta 1
- 1 fraction de globulines beta 2
- 1 fraction de globulines gamma

Ces treize différentes fractions peuvent être considérées comme normales (constitutionnelles, pourrait-on dire) dans la constitution de la périlymphe normale chez l'homme.

DISCUSSION

Une telle étude, si elle prouve, pour la première fois, qu'on peut actuellement appliquer la technique de l'immuno-électrophorèse aux très petites quantités de périlymphe, n'aurait qu'un intérêt purement biochimique si ses résultats n'entraînaient pas une comparaison avec ceux obtenus par différents auteurs qui ont appliqué la même méthode au liquide céphalo-rachidien de l'homme (par utilisation de serum antihumain).

Pour le liquide céphalo-rachidien, les fractions suivantes ont été signalées:

- 1 fraction pré albuminique-très rarement.
- 1 fraction séro mucoïde
- 1 fraction albumine
- 1 fraction alpha 1
- 3 fractions alpha 2
- 2 fractions beta 1
- 1 fraction beta 2 -en faible quantité et très inconstante.
- 1 fraction gamma

Par comparaison avec nos premiers résultats, il apparaît que la périlymphe est plus riche en fractions alpha et beta 1 que le liquide céphalo-rachidien. Ceci d'autant plus que les études sur le liquide céphalo-rachidien de l'homme furent effectuées sur des prélèvements liophylisés et dilués extemporanément dans des proportions qui les rapprochent de la teneur en albumine du serum-alors que les concentrations protéiques de nos prélèvements de périlymphe étaient certainement au moins 4 à 5 fois plus faibles. D'autre part, tout ce que l'on sait de la liophylisation autorise à penser qu'elle n'altère pas les propriétés immunologiques des protéines.

Il serait prématuré de vouloir conclure de façon définitive à la lumière de ces premiers résultats; qu'il nous suffise d'indiquer que la comparaison des structures immuno-électrophorétiques du liquide céphalo-rachidien et de la périlymphe n'est pas en faveur de la théorie qui fait de ce dernier fluide un simple dialysat du liquide céphalo-rachidien.

En conclusion, il est possible que de telles études pratiquées sur l'animal de laboratoire puissent mettre en évidence au cours d'altérations expérimentales de l'oreille interne des modifications protéiques susceptibles d'éclaircir certains aspects du métabolisme physiopathologique encore très mystérieux des liquides et des cellules nobles de l'oreille interne.

Travail du Service d'O. R. L. de l'Hôpital de la Pitié-Paris

Chef de Service : Docteur R. MADURO

& de la Pharmacie de l'Hôpital de la Salpêtrière-Paris

Pharmacien chef : Mr MANGEOT

BIBLIOGRAPHIE

I—L. G. CHEVANCE, A. GALLI, Mme JEANMAIRE

- 1) Note préliminaire sur l'étude des protéines de la périlymphe chez les mammifères. Les acides aminés libres -Soc de Laryng des Hopitaux de Paris, 10 Juin 1955 -Annales d'O. R. L. Paris 1956-731-2, 84-89
- 2) Contribution à l'étude biochimique de la périlymphe chez l'homme et certains mammifères -53me Congrès de la Société française O. R. L. 1956.
- 3) La constitution chimique des protéines de la périlymphe chez les mammifères. Etude électrophorétique -Annales d'O. R. L. Paris 1956 73, 4-5-273-282.
- 4) Preliminary note on the study of the proteins of the mammalian perilymph -Acta Scand. 1956-46, 6-15.
- 5) Syndrome de REILLY et oreille interne -Annales d'Oto-Laryng. Paris 1957, 74-10616.
- 6) Deuxième note sur "Syndrome de REILLY et oreille interne". Annales d'O. R. L. Paris-1958, 75-12.
- 7) Preliminary note on the biochemical aspect of the stimulation of the autonomic nervous system of the guinea pig., Acta Ot.-Laryng Scand 49, fac 6-1958.
- 8) Occurrence of the C Reactive Protein in the perilymphatic fluid., Acta Ot. Laryng. Scand. 50-Fas 1-1959/

II—GRABAR P. & WILLIAMS C. A.

—Biochim. et Biophys. Acta 1953-10-193; 1955-17-67

III—BURTON P.

—Clinica Chimica Acta 1959-4-n°1-72

正常人外リンパ液の免疫学的電気泳動法による研究

シュヴァンス博士 (パリ)

〔訳者 金子敏郎 千葉大学医学部耳鼻咽喉科 (主任 北村 武教授)〕

人および哺乳類の外リンパ液蛋白構造に関する我々の一連の研究は、この度人外リンパ液の種々なる蛋白分層を免疫学的電気泳動法によつて研究を進める迄に立ちいたつた。

我々の知る限り、この領域における最初のものであるこの研究は、Grabar et Williamsの方法に従つたもので、routine technique ではないが、現在この方法による研究は他の分野では広く行なわれているものである。

方法および実験条件

人外リンパ液の採取は耳疾患あるいは脳中枢に關係のない疾患で死亡した患者から行なつた。死体を3~5℃に保存し、外リンパは fenestration の術式で外半規管に小孔を開けて採取し、3~4個の耳から得た採取液を混合して各実験に使つた。尚あらかじめ各々について直接顕微鏡下に採取液が血液で汚染されているかどうかを確めた。(1視野に70倍の拡大で5個以上の赤血球がある場合は不適当とした。)採取液は0℃に保存し出来るだけ早く(大体12時間以内)検査に使用した。この度の実験では採取液そのものを使い、以前のように Lyophilization した形のものを使わなかつた。しかし結果は2方法の間に違いはないと考えられる。

電気泳動は Grabar の15×18cmガラス板上に寒天を(厚さは一様に5cm)ひいて行なつた。構成は0.9%の寒天液と同量の次の混合液を+4℃で凝固させたものである。

Véronal sodique	10.3 g
Véronal	1.84 g
蒸留水	1000 ml

実験材料は上記ガラス板の端から等距離に打錐で掘つた小さな凹みに滴らしたがその体積は0.25~0.40mlである。調節電位は大体120 volts, 電流は10 mA, 時間は3時間半である。

上記の条件で得た電気泳動の各跡線の長さは大体10 cmである。免疫学的反応は2つの免疫血清を使つて行なつた。2種の免疫血清とは、

1. パスツール研究所で試験準備した抗一人一馬血

清 (Drs. Grabar & Burtin).

2. 我々が特別準備した抗一人脳脊髄液一家兔血清である。

正常人脳脊髄液内含有蛋白量は微量なため、1匹の家兔を免疫化するのに1000mlの脳脊髄液を使用した。脳脊髄液は Lyophilization を行なつた後保存し、使用時には適当量の蒸留水に溶解して使つた。同時に抗体産生を促進するため Aquaphor の注射を行なつた。得られた免疫血清は繰返し検査をして、常に微量な anti- α_2 globuline, 多量な anti- β globuline, Siderophyline, anti- γ globuline の各成分が存在することを確めた。この2種の免疫血清はガラス板の長い方面に、外リンパの材料を滴らした点から等距離に掘つた2つの溝に滴らした。

免疫血清と外リンパ液との接触はすべて免疫学的電気泳動陽性として現われる。

各円弧の内面に沈降反応として見られる。各実験の最初から数えて観察は48時間後、接触写真撮影は72時間後に行なつた。

このようにして我々は20回余にわたつて実験したがその結果は図に示す通りである。

成績

我々は使用した各抗血清の各型についてそれを分類した。

1. 抗一人血清—馬血清との接触沈降反応。

次の各分層が常にあるいは殆んど常に確認された。

a. albumine 分層—常に存在し、明瞭な線で確認される。

b. α_1 globuline 分層—常に存在する一線で確められるが、一般に弱い線である。時に α_1 globuline 分層に2本の線が明らかな場合もある。

c. α_2 globuline 分層—1つ線でその存在が明らかにされるが constant のものではない。しかし2例で α_2 globuline 分層に3~4本の線が確認されたこともある。

d. β_1 globuline 分層—一般に明瞭な1線で而も常に見出されるが、1例では2つの線が認められた。

e. β_2 globuline 分層—馬血清ではこの分層は認め

られない。しかし正常人外リンパ液にこの分層がないとはいきれない。

f. γ globuline 分層—常にかなり弱い1つの線でその存在が確められた。

2. 抗—人脳脊髄液—家兎血清との沈降反応
次の分層が確認された。

a. albumine 分層—常に明瞭な1つの線で確認された。1例では pre-albumine 分層ともいふべき他の線が認められた。(免疫学化学ではこの線は見出されていない。

b. α_1 globuline 分層—かなり不定的に認められた(1/3例)。

c. α_2 globuline—殆ど常に認められるが、線は非常に薄い。数例では2線を認めたので α_2 globuline の存在が考えられた。

d. β_1 globuline—常に存在し非常に廓然としているが、1例では2つの線を認めた。

e. β_2 globuline 分層—非常に不定的に認められた(僅かに2例に。)

f. γ -globuline—中等度の強さでしかも1つの線により常に確認された。2例では Cathode の近くで線が重なっていた。

以上から常に存在する、あるいは殆んど常に存在する分層全体を考えると、人正常外リンパ液には次の各分層があることを確認し得る。

- 1 albumine 分層
- 3 α_1 globuline 分層
- 4 α_2 globuline 分層
- 3 β_1 globuline 分層
- 1 β_2 globuline 分層
- 1 γ globuline 分層

以上の13の分層が正常の(あるいは生まれつきの)人外リンパ液の蛋白分層であると考えられる。

考 察

若し採取外リンパ液の微量分析にこの免疫学的電気泳動法の応用を認めるなら、最も興味を惹く問題は外リンパ液の成績と同様方法によつた人脳脊髄液分析の結果を比較することである。脳脊髄液では次の各分層が既に確認されている。

- 1 稀に Prealbumine 分層
- 1 Rero-mucoide 分層
- 1 albumine 分層
- 1 α_1 globuline 分層
- 3 α_2 globuline 分層
- 2 β_1 globuline 分層
- 1 β_2 globuline 分層 (微量且つ不定)
- 1 γ globuline 分層

これを我々の成績と較べると、外リンパ液には脳脊髄液と較べ α と β_1 分層が高いことがわかる。しかも脳脊髄液の研究は試料を Lyophilization して、使用時には血清 albumine 含量と濃度が同じになるような稀釈のしかたをするので、蛋白含量は我々の外リンパ液の方が4〜5倍も薄いことになる。

以上のことから決定的な結論を急ぐべきでないとはいへ、人脳脊髄液と外リンパ液との免疫学的電気泳動法の比較をしてみると、外リンパ液が脳脊髄液の単なる透析液であるとする従来の考え方には賛成できないことになる。

内耳の実験的変性を考える際、敏感な蛋白変化、また現在迄まだよく知られていない内耳液および細胞の物理病理学的代謝の様相の一面を、この実験が明らかにする可能性をもっているといつてよからう。