エンドトキシンによる聴覚障害に関する実験的研究

—その二 局所投与による聴覚障害—

川 田 育 二

Experimental Study on Auditory Disturbance due to Endotoxin Part 2: Effect of Topical Administration

Ikuji Kawata
(Anan Kyoei Hospital)

A small percentage of patients with secretory otitis media also have perceptive deafness. Endotoxins existing in the fluid retained in the middle ear are noted as a causative substance of perceptive deafness. Endotoxin was administered to the middle ear cavity and auditory brainstem response (ABR) was determined. At the same time, the effect of the endotoxin on the auditory system was examined. In the group receiving 0.2 ml/kg of endotoxin (1 mg/ml), no significant change in the latency was observed in any of the ABR waves. In the group receiving 0.2 ml/kg of endotoxin (5 mg/ml), no significant change was observed in wave I three days after administration. However, a significant prolongation in the latency was seen in the waves II, III and IV. As for the interpeak latency, a significant prolongation was observed in the I-II interpeak latency. When endotoxin was administered at high concentrations, such as 50 and 100 mg/ml, there were cases in which ABR was not present.

Key words: endotoxin, ABR, sensorineural hearing loss

はじめに

滲出性中耳炎患者の数%に骨導聴力の低下した患者がいるという報告が散見される。その原因として、耳小骨等の振動抑制や、中耳貯留液中の種々の物質の内耳波及等が考えられている^{1)~3)}が詳細は不明である。一方、滲出性中耳炎等の中耳貯留液中にかなりの率でエンドトキシンが含まれていることが明らかになっている⁴⁾⁵⁾。我々はこのエンドトキシンに着目し、モルモットを用い経動脈的にエンドトキシンを投与し、ABR および外リンパ酸素分圧を測定

することにより、エンドトキシンが聴覚系に及ぼす影響を検討し報告した⁶⁾。今回は、より実際の臨床に近い実験として、中耳腔内にエンドトキシンを注入し、ABR を測定することによりエンドトキシンが聴覚系に及ぼす影響を検討した。

方 法

動物はプライエル耳介反射良好なモルモットを用いた。まず、ネブタールがモルモットのABR に及ぼす影響をみるために、ネブタール 25 mg/kg を腹腔内投与後、他の処置を加えずに、10分後より10分毎に50分後まで、80

dBSPL のクリック音を聞かせ、各波潜時を測定した（ネンブタール投与群）。次に、ネンブタール 25 mg/kg を腹腔内投与後、経鼓膜的に、DIFCO 社製の E. coli 055 : B5 のエンドトキシン 1 mg, 5 mg, 10 mg, 50 mg, 100 mg を生理食塩水 1 ml に溶解し、中耳腔内に 0.2 ml/kg 注入し、注入直後、72 時間後、7 日後、4 週間後に ABR を測定した（エンドトキシン投与群）。対照として同量の生理食塩水を注入し、同様の測定を行った（対照群）。ABR は Medelec 社製 BS1 を用い、ネンブタール注射後 20 分後に、80 dB SPL のクリック音を聞かせ、適宜 5~10 dB ステップで漸減し、各波潜時を測定した。加算回数は 1024 回とした。また、電極はステンレス製針電極を用い、記録用を頭頂部に、不関電極を耳介付着部に、アース用電極を体幹に装着した。結果については t 検定を用いて検定した。

結 果

今回の実験では、ネンブタール投与時に ABR I~IV 波については全てのモルモットにおいて確認できたが、V 波については不明瞭なものが多かったので、I~IV 波を検討の対象とした。また、7 日後、4 週間後では経過観察できた動物数が少なかったため、注入直後と注入 3 日後のみを検討対象とした。

1. ネンブタール投与群

各波潜時は表 1 に示す通りであった。ネンブタール投与 10 分後と比較して、20 分後では III 波のみ有意な延長を示した。30 分後、40 分後、50 分後では各波潜時共有意な延長を示した。また、翌日同様の実験を行ったが、ほぼ同様の結果を得た。

2. 対照群

生理食塩水注入による各波潜時は表 2, 3 に示した。

3. エンドトキシン群

エンドトキシン注入時の ABR 各波潜時は表 2, 3 に示した。また、より高濃度（5 mg/ml）のエンドトキシンを投与した場合、ABR が無反応になる

場合もあった（図 1）。以上の結果を対照群と比べると、エンドトキシン 1 mg 投与群では各波潜時に、注入直後、3 日後共に、対照群との間で有意差を認めなかった。エンドトキシン 5

表 1 ネンブタール腹腔内投与後のモルモット ABR の各波潜時の平均値と標準偏差
(単位 : msec)

	I	II	III	IV
10 分後	1.05 ± 0.10	1.68 ± 0.05	2.30 ± 0.00	3.30 ± 0.08
20 分後	1.15 ± 0.58	1.78 ± 0.05	2.43 ± 0.05*	3.50 ± 0.20
30 分後	1.18 ± 0.10*	1.90 ± 0.08*	2.60 ± 0.08**	3.73 ± 0.25*
40 分後	1.25 ± 0.10*	2.00 ± 0.14*	2.78 ± 0.17*	3.93 ± 0.40*
50 分後	1.33 ± 0.13*	2.10 ± 0.12*	2.93 ± 0.15**	4.10 ± 0.46*

* : 10 分後と比べて 5 % の危険率で有意差あり

** : 10 分後と比べて 1 % の危険率で有意差あり

表 2 生理食塩水およびエンドトキシン注入直後のモルモット ABR の各波潜時の平均値と標準偏差
(単位 : msec)

	I	II	III	IV
生理食塩水 (n = 6)	0.97 ± 0.05	1.75 ± 0.08	2.43 ± 0.08	3.45 ± 0.18
エンドトキシン 1 mg/ml (n = 4)	0.98 ± 0.05	1.73 ± 0.05	2.40 ± 0.08	3.35 ± 0.06
エンドトキシン 5 mg/ml (n = 4)	0.94 ± 0.06	1.66 ± 0.06	2.36 ± 0.06	3.32 ± 0.08

表 3 生理食塩水およびエンドトキシン注入 3 日後の ABR の各波潜時の平均値と標準偏差
(単位 : msec)

	I	II	III	IV
生理食塩水 (n = 6)	1.03 ± 0.08	1.73 ± 0.14	2.42 ± 0.15	3.38 ± 0.16
エンドトキシン 1 mg/ml (n = 4)	1.13 ± 0.15	1.90 ± 0.18	2.63 ± 0.17	3.60 ± 0.25
エンドトキシン 5 mg/ml (n = 4)	1.23 ± 0.21	2.18 ± 0.32*	2.95 ± 0.41*	3.95 ± 0.47*

* : 生理食塩水投与群と比較して 5 % 危険率で有意差あり

mg 投与群では、I 波は注入直後、注入 3 日後共に有意差を認めなかった。しかし、II 波、III 波、IV 波では、注入直後は有意差を認めなかったが、3 日後では対照群のそれぞれの値との間で有意差を認めた。

エンドトキシン 1 mg/ml, 5 mg/ml を中耳腔内に投与した時の中耳腔粘膜の変化は軽度であったが、より高濃度のエンドトキシンを投与し

た場合、中耳腔に貯留液や高度の粘膜肥厚を認めた。

4. ピーク間潜時について

また、エンドトキシンおよび生理食塩水投与 3 日後において、それぞれのピーク間潜時についても検討した。その結果は表 4 に示した。これらの値のうち、エンドトキシン 5 mg/ml 投与群の I-II 波ピーク間潜時だけが、対照群と比べて有意の延長を示していた。

考 察

滲出性中耳炎の後遺症のなかに、骨導聴力の低下があるが、その詳細は不明である。我々の行った統計⁷⁾でも、骨導聴力の低下が数%に認められたが、その発生様式や経過は色々であった。徐々に骨導聴力の低下していく例や、初診時にすでに骨導聴力の低下しているもの、外來観察が途切れた間に骨導聴力の低下が発生したと考えられる例などである。我々は、中耳貯留液中に存在していることが明らかになっているエンドトキシンを骨導聴力低下の原因物質の一つと想定し、経動脈的に投与し、ABR と外リンパ酸素分圧を測定した。その結果、ABR 各波潜時、特に I 波潜時および I-II 波ピーク間潜時が延長し、外リンパ酸素分圧が低下したことより、内耳への微小血管内で blood sludging が発生し、内耳への酸素供給が低下し、ABR の各波潜時が延長するのではないかと推論した⁶⁾。今回、より臨床に近い実験として、エンドトキシンを経鼓膜的に中耳腔内に注入した後に ABR を測定した。その結果、1 mg/ml を注入した場合は、各波潜時に有意な延長は認めなかったが、5 mg/ml を注入した場合は、I 波潜時には有意な延長は認めなかったものの、II 波、III 波、IV 波では有意な延長をみとめたことより、聴覚系のより末梢に近い部分で障害が強いと考えられた。

さて、これらの実験を行う時、麻酔剤としてネブタールを用いたが、ネブタール (pentobarbital) は、鎮静、睡眠作用の他に、呼吸抑制や循環系の抑制作用等があり、ネブタール

図 1 エンドトキシン (100 mg/ml) をモルモットの鼓室内に注入した時の ABR (24 時間後)
上段：同側 下段：反対側

表 4 生理食塩水およびエンドトキシン注入 3 日後の ABR ピーク間潜時の平均値と標準偏差

(単位：msec)

	I - II IPL	II - III IPL	III - IV IPL
生理食塩水 (n = 6)	0.70 ± 0.11	0.68 ± 0.41	0.93 ± 0.08
エンドトキシン 1mg/ml (n = 4)	0.78 ± 0.05	0.73 ± 0.05	0.88 ± 0.17
エンドトキシン 5mg/ml (n = 4)	0.95 ± 0.13*	0.78 ± 0.10	1.00 ± 0.08

* : 生理食塩水投与群と比較して 5 % 危険率で有意差あり

IPL : ピーク間潜時

を使用して、ABR を記録する場合にはネプタールが ABR に及ぼす影響を考慮する必要がある⁸⁾。我々の行った実験においても、ネプタール腹腔内投与10分後と、投与20分後、30分後、40分後、50分後の各波潜時をそれぞれ比較すると、投与20分後には差は認めなかったが、30分後、40分後、50分後には有意差を認めた。佐々木は超短時間作用性バルビタール剤であるサイアミラールは、通常臨床麻酔の導入に用いる5 mg/kg 程度の投与では ABR には抑制は認められなかったが、MLR の Pa 波に軽度から中程度の抑制が認められたとしている⁹⁾。本実験においては、麻酔剤の影響を一定にするために、ネプタールを腹腔内投与20分後に ABR を測定した。

エンドトキシンを局所投与した場合、すなわちエンドトキシンを中耳腔内に注入した場合について、中耳腔内に投与されたエンドトキシンが聴覚障害を起こす機序としては、正円窓を介して内耳障害を生じる場合と、中耳腔という局所に投与されたエンドトキシンが血管を介して聴覚障害を引き起こす場合が考えられる。では、正円窓を介して内耳障害が生じるとすると、はたしてエンドトキシンが正円窓膜を透過するのかという問題が生じてくる。Brady らは、正常な正円窓ではアルブミンが通過しないとしている¹⁰⁾。一方、Goycoolea らは人工的に耳管を閉塞し中耳炎を起こしたネコでは、アルブミンが正円窓膜を透過すると報告している¹¹⁾。また、horse radsh peroxidase (HRP) も、正円窓膜を透過すると報告もある¹²⁾¹³⁾。いずれにせよ、中耳炎のように炎症をきたした病的な正円窓膜では、いろいろな物質が透過すると思われる。しかし、飯野らはエンドトキシン 0.1~1 μ g/ml を中耳腔に投与し内耳への移行を検討した結果、中耳炎の際に検出されるのと同程度の濃度のエンドトキシンでは内耳に移行する可能性は低いと報告している¹⁴⁾。今回の我々の実験でも、エンドトキシン濃度が 1 mg/ml の場合は ABR 各波潜時に有意な変化はなく、5

mg/ml にはじめて有意な延長を認めた。Kawauchi らは、2 mg/ml のエンドトキシンを中耳腔内へ注入し、経時的に中耳貯留液中のエンドトキシン濃度と外リンパ液中のエンドトキシン濃度を測定比較し、このエンドトキシンが注入後24~48時間で最も多く外リンパ液中に移行し、組織学的に内耳障害を起こすことを観察報告している¹⁵⁾。また、Odd らは、1 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.0001 mg/ml の濃度のエンドトキシンをラットの中耳腔に投与し、ABR を測定した結果、1 mg/ml, および 0.01 mg/ml のエンドトキシンを投与した時に、ABR の域値に変化を認め、その域値の変化は2週間後には回復したと報告している¹⁶⁾。実際の臨床例の中耳貯留液中に存在するエンドトキシン量よりもかなり高濃度でないと内耳障害はおこりにくいと考えられる。一方、血管を介しての聴覚障害について、まず、直接エンドトキシンを血管内に投与した場合、渡辺らはエンドトキシンをモルモットに経静脈的に投与すると、組織学的に内耳の血管条血管に blood sludging が発生したと報告している¹⁷⁾。また、第一、第二回転にはあまり変化がなく、頭頂回転の方が変化が大きかったと述べている。また、あらかじめエンドトキシンの全身感作をしておき、24時間にエンドトキシンをゼルフォームの薄片にひたし蝸牛窓膜上に留置し、24時間後に内耳を組織学的に検討した結果、基底回転では変化は少なく、第二回転以上で変化が大きかったと述べている¹⁸⁾。エンドトキシンが蝸牛窓膜を透過して内耳障害を起こすとすると、膜に近い基底回転の方に大きい変化が起こるはずである。中井らはマウスを用い、大腸菌のエンドトキシン 50 mg の皮内注射を2時間間隔で2回行い、その2時間後同量を静注した後、3日後、1.5カ月後、3カ月後に内耳組織学的検討を加えた結果、Schwartzman 反応による内耳障害が起こり得ると報告した¹⁹⁾。また、同時に角膜やその他の諸組織にも変化が起こったと述べている。Schwartzman 反応とは皮膚に細菌エンドトキシンを注射し、その24

時間後に同じエンドトキシンを静注すると同部に強い出血壊死を生ずる反応であり、組織学的には局所循環障害によると考えられる微小血栓形成像を最大の特徴としている。また、大野らは、ある限局された臓器に Schwartzman 反応が起こり得る事を報告し、臓器 Schwartzman 反応という概念を提唱している²⁰⁾。

以上、中耳貯留液中のエンドトキシン濃度では飯野らのいうように内耳障害は生じにくいかもしれないが、実際の臨床例では中耳貯留液中のエンドトキシンが低濃度であっても、長期罹患例であるとか、再発を繰り返している例では、血管および正円窓膜の透過性が亢進し²¹⁾、内耳やより中枢の聴覚系にエンドトキシンが入り、聴覚系が感作された状態になり、再びエンドトキシンと接触すると、中井らがいう¹⁹⁾ Schwartzman 反応が内耳および聴覚系の局所で生じ、その結果、感音性難聴が生ずるという考え方も成り立つと思われる。今後、さらに濃度と投与回数及び時間の関係につき検討が必要と思われる。

ま と め

エンドトキシンをモルモット中耳腔内に投与し、ABR を測定することにより、次の結果を得た。

1. エンドトキシン 1 mg/ml を中耳腔内に投与した場合、ABR 各波潜時には有意な変化を認めなかった。

2. エンドトキシン 5 mg/ml を中耳腔内に投与した場合、投与3日後に、I波は有意な変化は認めなかったが、II波、III波および、IV波において有意な延長を示した。また、ピーク間潜時では、I-II波ピーク間潜時が有意な延長を示した。

3. 50 mg/ml や 100 mg/ml の高濃度のエンドトキシンを中耳腔内に投与した場合は ABR が無反応になる例があった。

稿を終えるにあたり、御校閲頂いた徳島大学医学部耳鼻咽喉科学教室小池靖夫教授に深謝致します。また、本研究にあたり御指導、御助言頂いた徳島大学医学部耳鼻咽喉科学教室石谷保夫講師に深謝致します。

参考文献

- 1) 川田育二, 石谷保夫, 和田好純, 他: 滲出性中耳炎と感音性難聴. 耳鼻臨床 補24: 65~69, 1988.
- 2) 佐藤宏昭, 高橋晴雄, 林 正彦, 他: 滲出性中耳炎の骨導聴力. 日耳鼻 90: 583~589, 1987.
- 3) Arnold W, Ganzger U and Kleinmann H: Sensorineural hearing loss in mucous otitis. Arch Otorhinolaryngol 215: 91~93, 1977.
- 4) Iino Y, Yuasa R, Kaneko Y, et al: Prognosis and endotoxin contents in middle ear effusions in cases after acute otitis media. Acta Otolaryngol Suppl 435: 85~89, 1987.
- 5) 嶽 良博, 中西 弘, 楠本健夫, 他: 滲出性中耳炎とエンドトキシン. 耳鼻臨床 78: 577~581, 1985.
- 6) 川田育二: エンドトキシンによる聴覚障害に関する実験的研究 —その一— 全身投与による聴覚障害一. 耳鼻臨床 補61: 9~13, 1993.
- 7) 川田育二, 遠藤悦男, 金村 章, 他: 滲出性中耳炎における感音性難聴の臨床統計的検討. 耳鼻臨床 補61: 38~41, 1993.
- 8) 田所作太郎: 睡眠薬. 標準薬理学 (曾我部博文編). 61~62頁, 医学書院, 東京, 1979.
- 9) 佐々木均: 麻酔の聴性脳幹反応に及ぼす影響. 日耳鼻 94: 1834~1843, 1991.
- 10) Brady DR, Pearce JP and Juhn SK: Permeability of round window membrane to ^{22}Na or RISA. Arch Otorhinolaryngol 214: 183~184, 1976.
- 11) Goycoolea MV, Paparella MM, Goldberg B, et al: Permeability of the round window membrane in otitis media. Arch Otolaryngol 106: 430~433, 1980.
- 12) Tanaka K and Motomura S: Permeability of the labyrinthine windows in guinea pigs. Arch Otorhinolaryngol 233: 67~75, 1981.
- 13) Saijo S and Kimura RS: Distribution of HRP in the inner ear after injection into the middle

- ear cavity. *Acta Otolaryngol* **97** : 593~610, 1984.
- 14) 飯野ゆき子, 鳥山 稔, 金ヶ崎士朗, 他 : 中耳腔投与エンドトキシンの内耳移行. *Otol Jpn* **1** : 3; 39, 1991.
- 15) Kawauchi H, Thomas FD and David JL : Endotoxin permeability through the round window. *Acta Otolaryngol Suppl* **457** : 100~115, 1988.
- 16) Odd S, Matti A and Sten H : Inner ear disturbances following inoculation of endotoxin into the middle ear. *Acta Otolaryngol* **107** : 90~96, 1988.
- 17) 渡辺健介, 原田宏美 : エンドトキシンの血管条への影響. *Ear Res Jpn* **20** : 55~56, 1989.
- 18) 渡辺健介, 清野 仁, 田中康夫 : エンドトキシンの蝸牛への影響. *Otol Jpn* **2** : 1; 55, 1992.
- 19) 中井義明, 森本明子, 張 寛正, 他 : 細菌内毒素による内耳障害. 耳鼻臨床 **71** 増1 : 559~571, 1978.
- 20) 大野康治, 志賀淳治, 森 亘 : Schwartzman 反応を用いた選択的肝部分壊死モデル. 第8回エンドトキシン臨床研究会記録, エンドトキシン臨床研究の現状と展望. 62~72頁, 羊土社, 東京, 1989.
- 21) 鈴木正志, 川内秀之, 藤吉達也, 他 : 滲出性中耳炎の外リンパ液と正円窓膜に及ぼす影響. 日耳鼻 **92** : 1354~1358, 1989.

(原稿受付 : 平成4年10月13日
原稿採択 : 平成4年12月2日
別刷請求先 : 川田育二
〒779-11 徳島県那賀郡羽ノ浦町中ノ庄
阿南共栄病院耳鼻咽喉科)