中耳疾患と内リンパ水腫†

八 川 公 爾・山 根 英 雄・加 藤 匠 子
加 藤 元 章・愛 場 庸 雅
松 田 泰 明・中 井 義 明

目 的

慢性中耳炎罹患者の臨床経過中に、骨導聴力の低下やめまいの出現する例があることは以前よりよく知られている。また中耳炎者の摘出側頭骨病理標本に、鼓室の変化はもちろん内リンパ水腫を含む内耳の変化もまた見られる事が報告されている^{1,2,3)}。よって今回我々は、実験的に中耳炎動物を作成し、内耳における変化を生化学的、形態学的に検討し以下の結果を得たのでここに報告する。

方 法

近來モルモットの中耳腔に暴露することで実験的に滲出性中耳炎を起炎することが知られている endotoxin の本体をなす lipopolysaccharide (以下 LPS とする)^{4,5)} 及び、種々の exotoxin を出すことで知られている *Staphylococcus aureus*⁶⁾ を用いた。

LPS としては Westphal 法⁷⁾にて抽出され、精製された List biological laboratories 製の *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031由来のものを用いた。これを生理食塩水中にいれ超音波に暴露して出来る限り細かく均一に分散させるように処理した。

Staphylococcus aureus としては分離培養して単離した本菌を Heart infusion 培地で24時間培養したものをを用いた。

対象となる動物としては、プライエル反射正常の白色 Hartley 系体重 300~400 g のモルモットを用いた。

1. Toxicolor test^{8,9)} による LPS の定量

Pentobarbital Na 腹腔内麻酔 (30 mg/kg) 後、中耳骨包を開放し LPS 生理食塩水中分散液 (0.1 mg/ml) 2 microl をゼルフォームにしみこませ、正円窓や鼓室上方に置き直後及び25分後にゼルフォームを除去し、生理食塩水 20 ml にて洗浄した後正円窓より鼓室階や前庭階

の外リンパ液を採取しこれを蒸留水 100 microl に希釈後凍結保存した。

これを図 1 のごとく処理した後、545 nm にて検光し図 2 の検量曲線にて LPS 濃度を測定した。

対象としては、生理食塩水のみをしみこませたゼルフォームを正円窓に置き25分後に鼓室階より外リンパ液を採取し同じく LPS を測定した。

図 1 Toxicolor test による LPS の定量法

† Middle ear disease and endolymphatic hydrops
Kouji Hachikawa, Hideo Yamane, Shoko Kato,
Motoaki Kato, Tsunemasa Aiba, Yasuaki Matsuda
and Yoshiaki Nakai
大阪市立大学医学部耳鼻咽喉科学教室

検量曲線

図 2

2. 内耳の形態学的検討

Pentobarbital Na 腹腔内麻酔 (30 mg/ml) 後、手術用顕微鏡下に鼓膜を 27G 針にて穿刺し鼓室内に LPS 生理食塩水中分散液 (0.05 mg/ml) 及び *Staphylococcus aureus* 純培養液 0.1~0.2 ml 注入した。一定時間経過後再び Pentobarbital Na 腹腔内麻酔し顕微鏡下に鼓膜を観察後、側頭骨を取り出し、中耳骨包を開放、ホルマリン固定し脱灰脱水後セロイジン包埋した。連続切片を作成し H-E 染色したのち光学顕微鏡にて観察した。

次に全身的なストレスとして冷水刺激を用いた後 LPS を暴露した。即ちモルモットを氷水中にしばらく衰弱した時点 (3~5 分後) で引き上げ、Pentobarbital Na 腹腔内麻酔し中耳に LPS を注入した。3 日後同様にして光学顕微鏡にて観察した。

結 果

1. 外リンパ液内の LPS の定量

各々の群における LPS の平均値及び標準偏差を表 1 に示し、更に各測定値をプロットして図 3 に示す。外リンパ液中での LPS の測定値は、何れの群においても直後及び 25 分後ではここに示す通り統計学的には有意の変化を指摘できなかった。しかし図 3 に示す通り他の値に比べ若干の高値を示すものが鼓室階外リンパ液採取群の 11 耳中 3 耳にみられた。

2. 光学顕微鏡による観察

LPS 注入後第 1 日目、第 3 日目、第 5 日目の側頭骨を比較検討した。中耳における上皮の浮腫や炎症細胞浸潤といった変化は第 3 日目前後が特に強いと考えられているが、蝸牛においては基底回転から頂回転に至る各回転で前庭階、鼓室階の両外リンパ腔内に precipitation が見られ、これは第 1、第 3、第 5 日目群いずれにも見られたが特に第 3 日目群に強いと考えられた。今回は前庭階や鼓室階に他の特筆すべき所見を指摘することは出来なかった。蝸牛管部では何れの群においてもライスネル膜は良く保たれ膨隆や虚脱は認められず血管条やコルチ器を含め他の部位に光顕レベルでの異常所見を指摘することは出来なかった。

前庭においては、全群のうち 1 例をのぞいて特に異常と考えられる所見を指摘出来なかった。第 3 日目群の 1 匹において図 4 に示す様に、外リンパ腔内に precipitation が見られ球形囊の膜が外リンパ側へ膨隆しているものが見られた。同耳の卵形囊については連続切片中に一部膨隆を疑わせる所見の見られたものもあったが、囊全体を通覧すると卵形囊については明かな膨隆を指摘し得なかった。また各半規管には特筆すべき所見は認められなかった。

Staphylococcus aureus を注入後第 1 日目、第 3 日目、第 5 日目の側頭骨を比較検討した。(今回は鼓膜が穿破した例は除いた) 中耳腔では強い細胞浸潤や上皮の肥厚

表 1 各条件下の LPS 濃度

	結 果				
	投与部位	洗浄までの時間	採取外リンパ	n	平均±SD
LPS 投与群	正門窓上	25分	鼓室階	11	684±508
	正門窓上	25分	前庭階	5	333± 81
	正門窓上	0分	鼓室階	4	431± 97
	鼓室上方	25分	鼓室階	5	550±376
生食投与群	正門窓上	25分	鼓室階	6	325±129
無処置群	—	—	鼓室階	5	493±169

(pg/ml)

図3 Toxicolor test による外リンパ内 LPS の定量値

図4 LPS 注入後3日目の球形囊膨化例

図5 冷水負荷後 LPS 注入耳3日目の球形囊膨隆

といった炎症所見が得られ、この部で強い炎症が起こっていることを示した。前庭においては、第3日目群の1耳のみではあるが球形囊の外リンパ側への膨隆の所見が得られた。第1、第5日目群ではこの様な所見を示す耳は見られなかった。

冷水負荷後 LPS 注入群では、氷水負荷中に頭部～外耳の水没した例や氷水負荷後ショックに陥った例を除いたため、実際に検討出来たのは2匹のみであったので

今回の所見は参考にとどまるが、その2匹とも球形囊の外リンパ側への膨隆(図5)が認められた。これは氷水負荷後鼓室に生理食塩水を注入した対象耳では認められなかった。

考 察

主としてグラム陰性菌が産生すると言われる endotoxin は、種々の病態に関与することがよく知られている。これを鼓室内に注入する事で実験的に滲出性中耳炎

を惹起しうる事より, endotoxin の中耳での炎症に対する関与については検討されている^{4,5)}。endotoxin の惹起しうる種々の生体反応から考えて内耳へも何等かの影響を及ぼしうると考えられる^{10,11)} ので今回生化学的, 形態学的にそれを検討した。

まず中耳のいろいろな場所にゼルフォームにしみこませた LPS をおき, 直後及び25分後の内耳における LPS の定量を行った所, 置いた中耳の場所及び時間に関わらず統計学的に有意の移行を認めることが出来なかったが, 中に他の例に比べ高値を示すものがみられた。更に球形嚢の水腫様変化と考えられる所見が見られた。同一の動物で両方を検討する事は技术上困難であるため内耳への移行が高いものに変化が出たと結論することは出来ないが, これはその可能性を示唆するものと考えられた。

球形嚢における水腫様の変化についてはこの部における特異的な変化なのかあるいは内リンパ全体の変化の一部なのかを検討の必要があるが, 球形嚢の置かれる解剖学的な位置とさきの LPS の希少なながらも内耳へ移行しうる可能性とを併せ考えると, LPS の内耳への関与の現れを示唆するものと思われる。ただ, 球形嚢と周囲組織との関係を重視するならば球形嚢は一侧が骨に対してあるので他の内リンパ領域に比べ水腫様のこういった変化を来しやすい(特に今回のような比較的穏やかな変化については)とも考えられる。さらに LPS が内耳に移行するとしてその経路については第一に正円窓が考えられるが, そこを通りうる物質の動態^{12,13)}についてはその物質の分子量が関係すると思われ^{14,15,16,17)}, LPS の生理食塩水分散液中分子量が 10^6 以上とかなり大きいことからこういった結果になったのではないかと考えられるが, なおその本態については検討を加えなければならない。

ま と め

1. Toxicolor test により中耳に LPS を暴露したときの直後及び25分後の内耳における LPS の移行を検討した所, 統計学的には有意の移行をするときは考えられなかったが中に少数ながら高値を示すものが見られた。
2. LPS を鼓室内に注入し, 一定時間経過後内耳を観察したものでは少数ではあるが球形嚢の膨隆を見たものがあった。

尚, 本研究は厚生省特定疾患前庭機能異常調査研究班の研究費援助により行われたものである。

文 献

- 1) Yamashita T, Schuknecht HF : Apical endolymphatic hydrops. Arch Otolaryngol 108 : 463-466, 1982
- 2) Walby AP, Barrera A, Schuknecht HF : Cochlear pathology in chronic suppurative otitis media. Ann

Otol Rhinol Laryngol (suppl) 103 : 1-19, 1983

- 3) Paparella MM, Carlos de Sousa L, Mancini F : Meniere's syndrome and otitis media. Laryngoscope 93 : 1408-1415, 1983
- 4) Nonomura N, Nakano Y, Satoh Y, et al : Otitis media with effusion following inoculation of Haemophilus influenzae type B endotoxin. Arch Otolaryngol 243 : 31-35, 1986
- 5) 谷村史子, 橘 正芳, 水越 治, 森岡宏行 : 実験的滲出性中耳炎 第2報 lipid A 鼓室内注入によるモデルの形態学的研究. Ear Res Jpn 17 : 132-137, 1986
- 6) Goycoolea MV, Paparella MM, Goldberg B : Permeability of the middle ear to Staphylococcal pyrogenic exotoxin in otitis media. Int J Pediatr Otolaryngol 1 : 301-308, 1980
- 7) Whetsthal O, Jann K : Methods in carbohydrate chemistry vol 5 : pp83 Academic press, New York 1965
- 8) 田中重則, 岩永貞昭 : Limulus test と Toxicolor test. 肝胆脾12 : 523-528, 1986
- 9) 丹生 充 : リムルステストによる内毒素微量定量臨床検査 23 : 343-348, 1979
- 10) Bernstein JM, Praino MD, Neter E : Detection of endotoxin in ear specimens from patients with chronic otitis media by means of the limulus amoebocyte test. Can J Microbiol 26 : 546-548, 1980
- 11) Meyerhoff WL, Giebink GS, Shea D : Pneumococcal otitis media following middle ear deflation. Ann Otol 90 : 72-76, 1981
- 12) 中井義明, 金子 実 : 正円窓一微細構造ならびに透過性について一耳鼻臨床 68 : 223-232, 1975
- 13) Goycoolea MV, Paparella MM, Juhn SK, et al : Oval and round window changes in otitis media potential pathways between middle and inner ear. Laryngoscope 90 : 1387-1391, 1980
- 14) Galle E, Siegel G : The transport of radio-active labelled sodium ions at the round window. Acta Otolaryngol 79 : 108-110, 1975
- 15) Goycoolea MV, Paparella MM, Goldberg B, et al : Permeability of the round window membrane in otitis media. Arch Otolaryngol 106 : 430-433, 1980
- 16) Goldberg B, Goycoolea MV, Schleivert PM, et al : Passage of albumin from the middle ear to the inner ear in otitis media in the chinchilla. Am J Otolaryngol 2 : 210-214, 1981

- 17) Lundman LA, Holmquist L, Bager-Sjoebaeck D:
Round window membrane permibility. Acta Otolaryngol (Stockh) 104 : 472-480, 1987

Abstract

After middle ear infection, the inner ear has been shown to be affected in various ways, such as by endolymphatic hydrops. We studied this relationship biochemically and morphologically in guinea pigs after lipopolysaccharide (LPS) or Staphylococcus aureus was injected into the middle ear.

1. LPS in the inner ear fluids was calculated by the toxicolor test after LPS had been injected into the middle ear. Immediately and 25 minutes later, no statistically significant change of LPS concentration was observed in the inner ear fluids, but in a few cases the concentration was high.

2. One, 3 and 5 days after the middle ear injection of LPS or Staphylococcus aureus, light microscopic studies were performed. The cochleae showed precipi-

tations in the scala tympani and scala vestibuli, but no other outstanding changes were observed in these cochleae and vestibula except that in a few cases after 3 days, there were distended membranes of the sacculus.

After being dipped in cold water, two other guinea pigs were injected in the middle ear with LPS. After 3 days, distended membranes were observed in the sacculi.

3. These results indicate no statistically significant changes of LPS concentration in the inner ear after middle ear injection of LPS, but in a few cases the LPS concentration was high and the inner ear seemed to be affected with endolymphatic hydrops.

Key words: lipopolysaccharide, Staphylococcus aureus toxicolor test, Sacculi

(原稿到着：昭和63年4月30日
別刷請求先：八川公爾
〒545 大阪市阿倍野区旭町1-5-7
大阪市立大学医学部耳鼻咽喉科学教室)