内リンパ嚢局所免疫反応による前庭機能異常 —— 外リンパ抗体価と自発眼振との関係 ——

富山 俊一・野中 学・八木 聡明

Vestibular Disorder Following Immune Reaction in the Endolymphatic Sac

—— Relation of Spontaneous Nystagmus to Perilymph Antibody Levels ——

Shun-ichi Tomiyama, Manabu Nonaka, Toshiaki Yagi

Department of Otolaryngology, Nippon Medical School

The relationship between an episode of spontaneous nystagmus and perilymph antibody levels following secondary immune reaction in the endolymphatic sac (ES) was examined in guinea pigs. Spontaneous nystagmus was observed in 28 out of 46 animals. From day 2 to 7, the mean perilymph antibody levels in the animals demonstrating spontaneous nystagmus were significantly higher than in animals without nystagmus. However, from day 14 to 28, no significant difference was seen in the mean perilymph antibody levels between the animals with and without spontaneous nystagmus. These results suggest that immune reaction in the ES may actually induce vestibular disorders.

Key words: endolymphatic sac, immune reaction, spontaneous nystagmus, perilymph antibody

はじめに

近年、内耳機能異常発生の原因の一つとして、免疫組織障害を病因とする疾患が提唱され、ステロイド、免疫抑制剤などによる臨床的治療効果¹⁾が報告されている。しかし一方、免疫反応による内耳障害の病態を解き明かす臨床材料証拠には乏しく、本疾患の本体の多くは未解決のままである。そこで、我々は内耳免疫障害の病態解明の一助として動物モデルを用いた基礎的研究を行ってきた。その結果、モルモット内リンパ嚢局所の免疫反応

により、温度眼振反応の抑制^{2,3)}、自発眼振の出現^{4,5)}などの前庭機能異常が発生した。この結果は免疫反応の強さに依存した前庭機能異常を示唆した。実験に使用したハートレイ系モルモットは雑系のため、免疫反応の強さは均一ではない。今回の研究は、内耳免疫障害による前庭機能異常発症への関与をさらに検討する目的で、内耳免疫反応の強さを示す外リンパの抗原特異的抗体価と自発眼振出現の有無との関係について検討した。

方法と材料

動物：ハートレイモルモット（雌）350-400g 体重（埼玉実験動物）を用いた。

表1 外リンパ抗 KLH 抗体価と自発眼振出現との関係

生存期間 ¹⁾	実験匹数	自発眼振非出現群 (匹) 抗体価 ²⁾	自発眼振出現群 (匹) 抗体価
2	10	(4) 4.5 ± 1.4	(6) $15.4 \pm 9.2^{***}$
4	10	(5) 7.4 ± 4.4	(5) $21.7 \pm 9.2^{**}$
7	9	(3) 7.4 ± 4.8	(6) $22.1 \pm 10.5^*$
14	8	(3) 7.6 ± 1.5	(5) $11.9 \pm 7.6^{n.s.}$
28	8	(3) 2.4 ± 0.9	(6) $24.1 \pm 21.9^{n.s.}$

1) 日数, 2) 平均値 $\pm$ 標準偏差 $\times 10^4$ units/ml*** = $p < 0.01$, ** = $p < 0.02$, * = $p < 0.05$, n. s. = $p > 0.05$

自発眼振非出現群 VS 自発眼振出現群 (Wilcoxon T)

抗原: Keyhole limpet hemocyanine (KLH) (Calbiochemist, CA) の associated form を使用した。KLH の希釈には磷酸緩衝食水 pH 6.4 を用いた。

内耳免疫動物の作製: 詳細は既報したので簡略に述べる⁶⁾。KLH による全身感作を行い、次いで KLH を内リンパ嚢(右)に注入刺激した。全身感作には 500 μ g KLH と完全フロイントアジュバントを混合し、皮下に注射し、2週毎に 500 μ g KLH と不完全フロイントアジュバントの混合の追加免疫を行った。追加免疫の2週後、ネブタール、フェンタニール麻酔を行い、手術用顕微鏡下に、後頭骨を開き、硬膜内から右内リンパ嚢に直接 KLH (100 μ g/5 μ l) を注入した。

自発眼振の観察: 内リンパ嚢への KLH 抗原注入後から8時間毎に自発眼振の出現を観察した。

外リンパ液採取と抗 KLH 抗体価の測定: 詳細は既報したので簡略に述べる⁷⁾。外リンパ液の採取は実験終了時に蝸牛基底回転鼓室階に小孔を開き、ガラス毛細管を挿入し、血液を含まない外リンパ液を3~5 μ l 採取した。抗体価の測定には ELISA 法を用いた。二次抗体には羊抗モルモット IgG Fc 抗体を用いた。既知の高力価のモルモット抗 KLH IgG 抗体を有する血清を標準血清とし、力価を Unit/ml にて表した。

実験計画: 内リンパ嚢への KLH 抗原二次刺激後から2, 4, 7, 14, 28日間生存の5群を作成し、各生存期間での自発眼振の出現、持続時間を計測し、実験終了時に外リンパ液を採取した。実験終了時に中耳炎を認めた動物や、中耳腔骨異常発育により外リンパ採取不能であった動物を除外した46匹で検討した。

推計学的検定: 自発眼振の出現時期および持続時間、外リンパ抗体価は各動物群の平均値と標準偏差で表した。各群間の比較は Wilcoxon T (対応なし) にて検定した。

結 果

全観察期間で46匹中28匹に麻痺性自発眼振の出現を認めた。内5匹では刺激性眼振が先行した。

自発眼振が観察された28匹での平均出現時期は 21.5 ± 7.6 時間目であった。

自発眼振の平均持続時間は計測可能だった、4日間生存以上動物の22匹で 41.8 ± 18.1 時間であった。

生存期間別では、2日間生存で10匹中6匹、4日間生存で10匹中5匹、7日間生存で9匹中6匹、14日間生存で8匹中5匹、28日間生存で9匹中6匹に自発眼振を認めた。

実験終了時での外リンパ抗 KLH 抗体価を各生存期間別に自発眼振を認めた動物(眼振出現動物)と認めなかった動物(眼振非出現動物)とで比較検討した結果を表1に示す。眼振出現動物の外リンパ抗 KLH 抗体価が眼振非出現動物と比較して有意に上昇したのは、2日目、4日目、7日目であった(各々 $p < 0.001$, $p < 0.05$, $p < 0.05$, Wilcoxon T)。しかし、14日目、28日目採取時の外リンパ抗 KLH 抗体価では、眼振出現動物と眼振非出現動物とに有意な差がなかった。

考 察

本実験で観察された自発眼振が内リンパ嚢への非特異的刺激によるものではなく、内リンパ嚢での免疫反応に起因することをこれまでの研究で明らかにしてきた⁴⁾⁹⁾¹⁰⁾。今回の研究の結果、自発眼振出現群の外リンパ抗 KLH 抗体価が自発眼振非

出現群と比較して二次刺激後2日目、4日目、7日目では有意に上昇していた。この結果は本実験系における自発眼振の出現が免疫反応依存性の現象であることをさらに明らかにした。

自発眼振出現の機序として、膜迷路破裂による外リンパ K^+ イオンの上昇⁹⁾¹⁰⁾ や内耳圧の急激な変化¹¹⁾ が主因であると考えられている。

本実験系での自発眼振の出現機序には、化学作動物質による前庭感覚組織への直接刺激と膜透過性亢進によるリンパ液電解質変化と急激な内耳圧変化の3要素の関与が推測される。

本実験モデルでの内リンパ嚢での組織学的変化はⅢ型免疫反応を呈する。内リンパ嚢への KLH 原二次感作後3~4時間目頃から多核球を主体とした急性炎症細胞の内リンパ嚢への遊走浸潤が起り、12時間後には最大に達し、以後3日間は内リンパ嚢腔と周囲組織に炎症細胞が充満する¹²⁾。自発眼振の平均出現時期が今回の8時間毎の観察で平均21時間目であり、その持続期間が平均41時間であった。内リンパ嚢二次抗原刺激後1時間毎に観察した以前の結果では刺激性自発眼振が平均14時間目に、麻痺性自発眼振は平均23時間目に出現した⁹⁾。従って、本実験モデルにおける自発眼振の発生が内リンパ嚢での急性炎症反応の発生時期と殆ど一致していることから、自発眼振発生機序として急性炎症時に放出遊離された化学作動物質による前庭感覚組織への直接刺激、さらには内リンパ膜透過性亢進による電解質異常の発生が推測される。

また、本実験モデルでは内リンパ水腫の急激な成長が内リンパ嚢二次抗原刺激後12時間目頃から観察され¹²⁾、その成長速度は外リンパ抗 KLH 抗体価依存性であった¹³⁾。従って、本実験で外リンパ抗 KLH 抗体価が高値を示した動物には急激な内耳圧変化の発生が推測される。

本実験で14日目以後に採取した外リンパ抗 KLH 抗体価でも、自発眼振出現動物に抗 KLH 抗体価の高い傾向が見られたが、推計学的には有意ではなかった。この結果は、自発眼振出現を決定している因子が免疫反応初期の免疫反応程度と密接に関係していることを示唆した。以上のことから、急性炎症反応で放出されるアナフィラトキシン、PAF、活性酸素、ライソゾーム物質などの化学作動性因子による内耳組織障害の発生を示唆し、今

後検討が必要である。

まとめ

今回の研究結果は、内リンパ嚢局所での免疫反応の程度と自発眼振出現との密接な関係を明示し、臨床においても前庭機能異常病因として内耳免疫障害による発生機序の存在を推察させるものであった。

本研究の一部は厚生省特定疾患前庭機能異常調査研究班および文部省一般研究Cの研究費によるものである。

文 献

- 1) McCabe BF : Autoimmune sensorineral hearing loss. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 88 : 585-589, 1979
- 2) 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に及ぼす影響. *日耳鼻* 93 : 1973-1977, 1990
- 3) 富山俊一, 野中 学, 八木聡明 : 内リンパ嚢局所二次免疫反応動物での温度眼振経過とその組織学的検討. *Otol Jpn* 1 : 28-35, 1991
- 4) 野中 学, 富山俊一 : 内リンパ嚢局所免疫反応モルモットのの前庭機能障害について. *日耳鼻* 94 : 1748-1755, 1991
- 5) Nonaka M, Tomiyama S, Gotoh Y : Vestibular disorders following immune response of the endolymphatic sac in the guinea pig. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 101 Suppl 157 : 54-57, 1992
- 6) Tomiyama S, Harris JP : Elevation of inner ear antibody levels following direct antigen challenge of the endolymphatic sac. *Acta Otolaryngol* 107 : 202-209, 1989
- 7) Tomiyama S, Harris JP : The endolymphatic sac : Its importance in inner ear immune response. *Laryngoscope* 96 : 685-691, 1986
- 8) Tomiyama S, Nonaka M, Toshiaki Y, et al : Immunological approach to Meniere's disease : Vestibular immune injury following immune reaction of the endolymphatic sac. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* (in print)
- 9) Lawrence M, McCabe BF : Inner ear mechanism and deafness ; Special considera-

- tion of Meniere's syndrome. JAMA 171 : 1927-1932, 1959
- 10) Silverstein H : The effects of perfusing the perilymphatic space with artificial endolymph. Ann Otol Rhinol Laryngol 79 : 754-765, 1970
- 11) Williams HL Jr : A review of the literature as to the physiologic dysfunction of Meniere's disease : a new hypothesis as to its fundamental cause. Laryngoscope 75 : 1661-1689, 1965
- 12) Tomiyama S, Yagi T, Sakagami M, et al : Immunological pathogenesis of endolymphatic hydrops and its relation to Meniere's disease. Scanning Electron Microscopy International. in print.
- 13) Tomiyama S : Endolymphatic hydrops induced by immune response of the endolymphatic sac : Relation to perilymph antibody levels. Ann Otol Rhinol Laryngol 101, Suppl 157 : 48-53, 1992

（原稿到着：平成5年4月16日
別刷請求先：富山俊一
〒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）