感音性難聴患者の内耳自己抗体陽性率

小坂 和己・山野辺滋晴・八木 聰明

Inner Ear Autoantibodies in Patients with Sensorineural Hearing Loss

Kazumi Kosaka, Shigeharu Yamanobe, Toshiaki Yagi

Department of Otorhinolaryngology, Nippon Medical School

Using the western blotting technique, we examined the serum of patients with sensorineural hearing loss or vertigo for the presence of inner ear autoantibodies. The SDS soluble extract was prepared as the inner ear antigen from bovine inner ear tissues.

About 70% of patients had inner ear specific autoantibodies which reacted with 32kD (8.1%), 33-35kD (14.9%), 42kD (14.9%) and 68kD (9.4%) determinants.

In some patients sensorineural hearing loss may result from autoimmune reactions directed against proteins derived from the inner ear. The inner ear specific autoantibodies may also enable us to diagnose autoimmune-mediated inner ear disorders and to treat these patients more effectively. It is necessary to purify the inner ear specific antigens for exact diagnosis of inner ear disorders.

Key words: autoimmunity, autoantibody, sensorineural hearing loss, inner ear

はじめに

1958年に Lehnhardt¹⁾ は内耳に対する自己免疫反応が原因不明の感音性難聴に關与している可能性を示唆している。その後 McCabe²⁾ は自己免疫性感音性難聴という概念を提唱し、ステロイドやサイクロフォスファミドを用いた治療を試みている。また、本邦では神崎ら³⁾ のステロイド依存性感音性難聴についての報告のように、臨床的には自己免疫的機序による感音性難聴が存在することが確立されつつある。

内耳自己免疫反応の病態を明らかにする目的で、Harris ら⁴⁾ は、最初に western blotting 法で内耳自己抗体をスクリーニングした。一方、Yama-

nobe ら⁵⁾ は、その抗体が内耳に特異的かどうかを検討したが、68kD で反応する内耳自己抗体は内耳組織以外にも肝臓、腎臓、脳組織などとも反応し、内耳組織に特異的な抗体ではないとした。また、Yamanobe ら⁶⁾ は68kD 以外にも32kD、33-35kD で内耳組織と反応する抗体があり、これらの抗体は肝臓、腎臓、脳組織などとは反応せず、内耳特異的な抗体であるとした。その後、我々は、メニエール病および突発性難聴患者について、内耳に対する自己免疫反応が關与している可能性について検討したところ、対象の59-60%の患者血清が内耳抗原との間に何らかの反応を示すことを認めた⁷⁾。

そこで今回は、特定の分子量の位置での反応が自己免疫的機序による感音性難聴の鑑別診断に役立

つかどうか否かについて検討した。

対象と方法

1988年10月から1992年10月の間に日本医科大学耳鼻科を受診し、血清を保存されていた感音難聴患者およびめまい患者235例について、血清中の内耳自己抗体の有無を western blotting 法でスクリーニングした。検討項目は、難聴の程度、聴力変動の有無、患耳が一侧か両側か、疾患による差とした。

実験に用いた抗原は以下の方法で準備した。牛の内耳迷路を側頭骨10個から顕微鏡下に摘出し、アプロチニン(1 μ g/ml)を含む50mM Tris溶液、pH 6.8に採取した。この組織をホモジネートし100,000 gにて1時間遠沈した。得られた沈渣を2mM PMSF, 4mM EDTA, 10mM NEMを含む0.5% SDS, 50mM Tris溶液、pH 6.8に再び溶解した後、1,000 gにて10分間遠沈し、得られた上清をSDS可溶性分画とした。今回の報告ではこのSDS可溶性分画を内耳抗原として用いた。

この内耳抗原をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)にて分離した。SDS-PAGEはLaemmliの方法⁹⁾に準じて、またwestern blotting法は、Towbinらの方法⁹⁾に準じて行なった。内耳抗原は試料溶液と混合し、95 $^{\circ}$ Cで5分間加熱した後、8%分離用ゲル(縦横10 $\times$ 10cm, 厚さ1mm)を用い、200Vで約40分電気泳動して分離した。次にSDS-PAGEにて分離された蛋白を電氣的にニトロセルロース膜に転写し、蛋白が吸着していない部分を5%ドライミルクでブロックした後、200倍希釈した患者血清と反応させた。最後に、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG抗体と反応させ、ペルオキシダーゼをDABで発色し、内耳抗原に対する自己抗体の反応を観察した。

結 果

全患者血清について内耳自己抗体をスクリーニングし、分子量別に反応陽性率を検討した結果を図1に示す。今回は、このうち全患者血清のなかで特に陽性率が高かった32(8.1%), 33-35(14.9%), 42(14.9%), 68(9.4%) kDについて注目し検討した。68kDでは、難聴の程度が高度になると陽性率が高くなる傾向がみられ、聴力の正常なめまい患者では陰性例が多い傾向がみられた(表

1)。

聴力変動のある患者血清では、42kDで陽性率がやや高い傾向がみられ、聴力変動のない患者血清では、内耳抗体陰性例がやや多い傾向がみられた(表2)。

疾患別に検討すると、メニエール病では42kD、突発性難聴では68kD、老人性難聴では42kDと68kDでやや高い陽性率を示す傾向がみられた(表3)。患者の年齢、性別、めまい感の有無、患耳が一侧か両側かに関しては、内耳抗体の陽性率が高い傾向を示すものは認められなかった。

考 察

内耳に隔絶された抗原が存在するかどうかを証明するには内耳特異的抗原の精製と同定を待たな

図1 全患者血清における各分子量別内耳自己抗体陽性率

32kDは実際には、33kDの位置で反応した分子量を示したもので33-35kDと区別するために図では、33kDの位置に表記した。33-35kDとは、34kDの位置を中心にやや幅の広い一つのパンドであるため便宜上34kDの位置に表記した。反応陽性率は32, 33-35, 42, 68kDの位置で高い。

表1 難聴の程度と内耳自己抗体陽性率(%)

分子量(kD)	32	33-35	42	68	その他	陰性
無難聴(n=40)	3.3	26.7	13.3	6.7	10.0	40.0
軽度(n=67)	9.0	13.4	19.4	3.0	30.0	25.2
中等度(n=82)	12.2	17.1	15.9	15.9	15.9	23.0
高度(n=46)	4.3	8.7	10.9	10.9	39.1	26.1

表2 聴力変動の有無による内耳自己抗体陽性率(%)

分子量(kD)	32	33-35	42	68	その他	陰性
変動あり(n=59)	6.1	12.2	20.4	10.2	30.6	20.5
変動なし(n=176)	9.1	16.5	14.2	9.7	21.6	29.0

表3 疾患別による内耳自己抗体陽性率(%)

分子量(kD)	32	33-35	42	68	その他	陰性
メニエール(n=41)	9.8	9.8	22.0	4.9	28.1	25.4
突発性難聴(n=49)	6.1	8.2	12.2	16.3	30.9	26.3
老人性難聴(n=20)	10.0	15.0	20.0	10.0	20.0	25.0

ければならないが、内耳障害が自己免疫学的機序によって起こり得るかどうかを判断する一助として、感音難聴患者およびめまい患者血清と牛内耳抗原の反応陽性率をもとに、いくつかの角度から検討を試みた。今回の検討では、内耳抗原となんらかの反応を認めた例を陽性とした場合、難聴が高度になる、あるいは、聴力変動を認める患者群では、内耳抗体陽性率が高い傾向を示した。一方、無難聴例では内耳抗体陰性例が多い傾向があった。このことから、これらの対象中には、自己免疫学的機序によって発症している感音難聴症例が含まれている可能性のあることが示唆された。しかし、陽性例を反応がみられた位置の分子量別に分け、最も陽性率が高かった32kD、33-35kD、42kD、68kDの位置で反応する内耳自己抗体例では、その陽性率が、診断名、難聴やめまいの程度などと高い相関を示す傾向はみられず、自己免疫性感音難聴を診断する上で役立つ特定の内耳自己抗体を同定するには至らなかった。また、難聴がないめまい患者でも50%前後の内耳抗体陽性例があり、聴力正常な健常者でも内耳抗原と反応陽性例を認める場合もあり、今後抗体を定量的に測定した上

で、健常者と内耳障害を伴う患者とを比較検討することが必要であると思われた。

まとめ

内耳自己抗体陽性患者の臨床症状、臨床経過、原因疾患などに関して検討を試みた。その結果、特定の内耳自己抗体を同定するまでには至らなかった。しかし今回示したように、難聴の程度や聴力の変動と自己抗体陽性率との間に多少の関連性をみたことより、自己免疫学的機序が感音性難聴の発症因子として、一定の役割を演じている可能性が示唆された。

文 献

- 1) Lehnhardt E : Plotzliche Horstorungen, auf beiden Seiten gleichzeitig oder nacheinander aufgetreten. Z Laryngol Otol 37 : 1-17, 1958
- 2) McCabe BF : Autoimmune sensorineural hearing loss. Ann Otol Rhinol Laryngol 88 : 585-589, 1979
- 3) Kanzaki J, Ouchi T : Circulating immune complexes in steroid responsive sensorineural hearing loss and the long-term ob-

- servation. Acta Otolaryngol Suppl 393 : 77-84, 1983
- 4) Harris JP, Sharp PA : Inner ear autoantibodies in patients with rapidly progressive sensorineural hearing loss. Laryngoscope 100 : 516-524, 1990
- 5) Yamanobe S, Harris JP : Spontaneous remission in experimental autoimmune labyrinthitis. Ann Otol Rhinol Laryngol 101 : 1007-1014, 1992
- 6) Yamanobe S, Harris JP : Inner ear specific autoantibodies. Laryngoscope 103 : 319-325, 1993
- 7) 山野辺滋晴, 八木聰明 : メニエール病患者および突発性難聴患者血清中の内耳自己抗体. Equilibrium Res Suppl 8 : 38-40, 1992
- 8) Laemmli UK : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 : 680-685, 1970
- 9) Towbin H, Staehelin T, Gordon J : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 76 : 4350-4356, 1979
- (原稿到着 : 平成 5 年 4 月 16 日
別刷請求先 : 小坂和己
〒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)