内耳の局所防御機構に関する基礎的研究 —特に非特異的防御機構について—

井口 広義・中井 義明・山根 英雄

Non-specific Local Defense of Inner Ears of Guinea Pigs

Hiroyoshi Iguchi, Yoshiaki Nakai, Hideo Yamane

Department of Otorhinolaryngology, Osaka City University Medical School

To clarify the non-specific defense mechanism (first defense mechanism) of the inner ear against pathogens, we injected

K562 myelogenous leukemia cells into guinea pigs' perilymphatic space through the round window membrane and observed the reaction in the inner ear on day 1 to day 9. K562 cells injected into the perilymphatic space could survive and multiply for a couple of days. At 67 hours, however, some macrophages entered the perilymphatic space, and at 86 hours some K562 cells had degenerated a little, but most of them seemed to be intact.

NK (natural killer) cells which were positive for anti-asialo GM1 appeared in the perilymphatic space on day 7 when most K562 cells were still intact. On day 9 there were many K562 cells with adherent phagocytes in the perilymphatic space, and most of them had degenerated.

K562 cells were attacked by NK cells coming from the surrounding venules. The source of NK cells in the perilymphatic space may be vessels around the modiolus and the cochlear bony wall. Also, NK cells derived from white blood cells of guinea pig whole blood could attach to, recognize, and attack K562 cells, and their attack showed an ordinary pattern of NK cell-induced cytotoxicity.

The emergence of NK cells was much later in the perilymphatic space than in the skin after the injection of K562 cells. It is possible that this delay can lead to an irreversible change in the cochlea due to pathogens before the mobilization of NK cells.

In addition, humoral factors in the inner ear fluid are not so powerful in suppressing viral infection, and the endolymphatic sac does not seem to play an important role to rescue the cochlea from viral infection.

Thus the inner ear seems to be an environment in which it is relatively difficult for immunocompetent cells to function.

Key words: NK cell, large granular lymphocyte (LGL), non-specific defense, K562 cell, endolymphatic sac

はじめに

生体には抗原による感作なしに、抗原に対して抵抗（防御）する機構（非特異的防御機構）が存在する。その主たるものは、好中球、マクロファージ、natural killer (NK) 細胞などの細胞性因子であるが、各種酵素、補体などの液性因子もその補助的役割を担っている。これらの非特異的防御機構は、さまざまな生体組織において、ごく初期の感染防御という観点で非常に重要で、この機構によりかなりの異物が排除され、疾病が未然に防がれているといえる。内耳においては、Lundquist¹⁾の内リンパ嚢におけるマクロファージなどの浮遊細胞の存在の報告はあるものの、McCabe²⁾が自己免疫疾患の特徴をもった感音性難聴の症例を報告するまで、免疫反応の場という考え方にたつて内耳をみつめた報告はほとんどみうけられない。その後、Rask-Andersen, Stahle の、内リンパ嚢におけるリンパ球、マクロファージの存在³⁾およびそれらの細胞の相互反応の報告⁴⁾、Mogi ら⁵⁾⁶⁾の内耳液中の免疫グロブリンの存在の報告、さらには、Harris⁷⁾、Mogi ら⁸⁾の内耳局所での抗体産生の報告、Tomiyama ら⁹⁾の内リンパ嚢削除時における産生抗体価の有意な低下の報告など、内耳における免疫応答の存在がクローズアップされてきた。内耳においても、恒常性維持のために非特異的防御機構は存在するのではないかと想像されうが、今日までの報告は特異的防御機構についてのものがほとんどで、不思議なことに、より重要視されるべき非特異的防御機構が具体的にどのように働いているかの観察の報告はほとんどみうけられない。内耳においても、二次免疫応答を議論する以前に、直接の病原性異物の侵入に対する非特異的防御機構が惹起されるのか、惹起されるとするならどのようにされるか、についての検討がまずなされるべきである。原因不明の感音性難聴、突発性難聴、メニエール病などについて免疫実験動物での解析が行われているが、現時点で、これら疾患が臨床的に内耳の免疫応答に直接起因して生じているという証拠はない。これは、内耳には免疫機構が働く以前に非特異的防御機構があり、二次免疫応答が生ずる以前に攻撃因子、防御因子の相互関係から疾病が修飾、終結されてしまうことに起因するのかもしれない。このような観点より、モルモット内耳に病原性異物（腫瘍細胞）

表1 検討項目

- 1) 内耳に注入された腫瘍細胞は生存しつづけることができるのか？
- 2) 内耳では特異的な免疫機構の動員以前に腫瘍細胞を排除しようとする動きがおこるのか？
- 3) 排除しようとする動きがおこるとするならどのような時間経過でおこるのか？
- 4) 特異的な免疫機構の動員まで内耳は傷害を免れることができるのか？
- 5) 内耳には組織固着型(resident type)の抗原認識機構は存在するのか？

が直接侵入した場合の実験モデルをつくり、時間経過を追ってその異物の動向および内耳の応答を観察することを目的とした（表1）。

実験材料および方法

〔1〕 K562 細胞の組織内注入実験（表2 A）

表2 実験材料および方法（A）

〔1〕 K562 細胞の組織内注入実験

実験動物として体重250～300gの有色モルモットを用いた。

1) K562 細胞のモルモット内耳（外リンパ腔）内注入実験

2) K562 細胞のモルモット皮膚内注入実験

3) K562 細胞のモルモット水晶体内注入実験

図1 K562細胞の透過型電子顕微鏡像

K562細胞はほぼ球形で、直径は約15 μ mである。核は大型、不整形で染色質に富み、核小体は大きく数も多い。細胞質にはリボゾームが豊富で、ミトコンドリアやゴルジ装置には乏しい。

実験動物として、体重250～300gのブライエル反射正常な有色モルモット29匹を用いた。

1) K562細胞のモルモット内耳(外リンパ腔)内注入実験

ペントバルビタールナトリウム(30 mg/kg)による腹腔内麻酔のもと、Lundquist¹⁾の方法による外側アプローチにて、皮膚切開後に側頭骨を削開した。蝸牛窓を直視下におき、前庭窓よりアブミ骨をピンセットにて一部遊離させた後、RPMI 1640(阪大微生物病研究会製)にて1 mlあたり 1×10^6 cellに調整したヒト慢性骨髄性白血病由来のK562細胞(図1) 0.1 mlを、蝸牛窓膜経由で、鼓室階にマイクロガラスピペットにて注入した。操作は極力出血がおこらないように注意して行った。穿孔した蝸牛窓膜および前庭窓膜は、瞬間接着剤にて閉鎖した。皮膚切開部を縫合後、抗生物質(セファゾリンナトリウム)の全身投与を行った。注入24時間、48時間、67時間、86時間、7日後にこれら動物にペントバルビタールナトリウム(30 mg/kg)による腹腔内麻酔下、左心室より1.5%のグルタルアルデヒド(0.067 M カコシル酸ナトリウム緩衝液:pH 7.4, 1%ショ糖加)にて灌流固定を行った。その後、側頭骨を摘出、内耳を採取し、同固定液にて4 $^{\circ}$ Cで一晩浸漬固定後、0.1 M Na-EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid)にて1ヶ月間脱灰操作を行い、2%の四酸

化オスミウムで2時間の後固定を行った。固定終了後、上昇アルコール系列にて脱水、プロピレンオキシドにて置換後、Epon812に包埋した。ミクロトームにて薄切し、光顕切片はトルイジンブルーで染色を、電顕切片は酢酸ウランおよびクエン酸鉛による二重染色を施した後、日立H-300型透過型電子顕微鏡にてK562細胞の動向ならびに内耳の応答を観察した。また注入48時間、4日、9日後のものについては、4%のパラホルムアルデヒドを用いて、上記と同様の方法にて灌流固定後、側頭骨を摘出、内耳を採取し、同固定液にて4 $^{\circ}$ Cで一晩浸漬固定を行った。その後、0.1 M Na-EDTAにて1ヶ月間脱灰操作を行い、10%、20%、30%のショ糖溶液に順次浸漬し、O.C.T.コンパウンドに包埋後、クリオスタットにて凍結切片を作製した。この切片上で、抗 asialo GM₁抗体(rabbit polyclonal: Wako Chemicals製)を一次抗体とした酵素抗体法(ABC法: Vector社のABC Kitを使用)を行い、asialo GM₁陽性細胞を標識し光学顕微鏡にて観察した。

2) K562細胞のモルモット皮膚内注入実験

内耳における防御反応と比較するために、RPMI1640にて1 mlあたり 1×10^6 cellに調整したK562細胞0.2 mlをモルモットの腹部の皮膚に注入し、24時間、48時間、3日、4日、7日後に注入部を摘出した。2.5%のグルタルアルデヒドにて4 $^{\circ}$ Cで一晩浸漬固定を行った後、1%の四酸化オスミウムで2時間の後固定を行った。固定終了後、上昇アルコール系列にて脱水、プロピレンオキシドにて置換後、Epon812に包埋した。ミクロトームにて薄切し、トルイジンブルーで染色後、光学顕微鏡にて観察した。

3) K562細胞のモルモット水晶体内注入実験

内耳における防御反応と比較するために、RPMI1640にて1 mlあたり 1×10^6 cellに調整したK562細胞0.05 mlをモルモットの水晶体に注入し、24時間、48時間、3日、4日、5日、7日後に摘出した。4%のパラホルムアルデヒドにて4 $^{\circ}$ Cで一晩浸漬固定後、0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.4)にて洗浄、10%、20%、30%のショ糖溶液に順次浸漬した。その後、O.C.T.コンパウンドに包埋し、クリオスタットにて凍結切片を作製、H-E染色を施し、光学顕微鏡にて観察を行った。

表2 実験材料および方法 (B)

〔2〕 K562細胞の外リンパ液添加の有無の両条件下での培養実験

実験動物として体重250~300gの有色モルモットを用いた。
ペントバルビタールナトリウム腹腔内麻酔のもと、外側アプローチ
にて側頭骨を削開し、蝸牛窓を直視下におく

↓
蝸牛窓よりマイクロガラスピペットにて外リンパ液
を採取 (約 0.1 ml)

↓
この外リンパ液添加の有無の両群でK562細胞をCO₂ gas
incubator 中 37°C 5%CO₂ 加の条件下で40時間培養

↓
培養前後でK562細胞の傷害状況を光学顕微鏡にて比較観察

〔3〕 K562細胞の白血球との培養実験

実験動物として体重250~300gの有色モルモットを用いた。
ペントバルビタールナトリウム腹腔内麻酔のもと、開胸下で
左心室よりヘパリン加採血

↓
この血液を800gにて25分間遠心分離後、buffy coat部を採取

↓
この採取液に塩化アンモニウムを添加し赤血球を溶血後、
150gにて5分間遠心分離

↓
白血球を含む液とK562細胞をCO₂ gas incubator 中に
37°C 5%CO₂ 加の条件下で2時間培養

↓
光学顕微鏡にて観察後、1.5%グルタルアルデヒド
にて固定を行い、150gにて5分間遠心分離

↓
1.5%グルタルアルデヒドにて4°Cで一晩浸漬固定後、
2%四酸化オスミウムにて後固定

↓
上昇アルコール系列にて脱水、プロピレンオキシド
にて置換後、Epon 812に包埋

↓
薄切後、酢酸ウラン、クエン酸鉛による二重染色を施し、透過型
電子顕微鏡にて培養前後でのK562細胞の傷害の状況を観察

〔4〕 正常マウス内耳における、NK細胞、マクロファージ、
γδ型T細胞の抗原の局在の検討

実験動物として体重20~30gのBALB/cマウスを用いた。
ペントバルビタールナトリウム腹腔内麻酔のもと、内耳を採取、
4%パラホルムアルデヒドにて4°Cで一晩浸漬固定

↓
EDTAにて1ヶ月間脱灰、10%、20%、30%のショ糖溶液に順次
浸漬後、O.C.T.コンパウンドに包埋、凍結切片を作製

↓
この切片上で、

抗 asialo GM₁ 抗体 (rabbit polyclonal)
抗 mature mouse macrophages 抗体 (rat monoclonal)
抗 murine interdigitating cells 抗体 (rat monoclonal)
抗 murine resident tissue macrophages 抗体 (rat monoclonal)
抗 human γδ Tcell δ chain 抗体 (mouse monoclonal)

を一次抗体とした酵素抗体法 (ABC法) にて、各々の
抗原陽性部位の標識を行い、光学顕微鏡にて観察

〔2〕 K562細胞の外リンパ液添加の有無の両条
件下での培養実験 (表2B)

実験動物として、体重 250~300 g のブライエル反射正常な有色モルモットを用いた。ペントバルビタールナトリウム (30 mg/kg) による腹腔内麻酔のもと、前述の外側アプローチにて、皮膚切開後、側頭骨を削開した。蝸牛窓を直視下におき、マイクロガラスピペットにて外リンパ液を採取した (約 0.1 ml)。K562細胞を、この外リンパ液を

添加した群としない群の両群で、CO₂ gas incubator 中、37°C 5%CO₂ 加の条件下で RPMI 1640 (10% fetal calf serum および Streptomycin sulfate 加) にて40時間培養した。培養前後での K562 細胞の状態を光学顕微鏡にて比較観察した。

〔3〕 K562細胞の白血球との培養実験 (表2B)

実験動物として、体重 250~300 g のブライエル反射正常な有色モルモットを用いた。ペントバルビタールナトリウム (30 mg/kg) による腹腔内麻酔を施し、開胸下にて左心室よりヘパリン加採血を行った。この血液を 800×g にて25分間遠心分離し、赤血球の上層の白血球を含む buffy coat 部を採取した。この採取液に塩化アンモニウムを添加し、赤血球を溶血させ、150×g にて5分間遠心分離した。この液と K562 細胞を CO₂ gas incubator 中、37°C 5%CO₂ 加の条件下で RPMI 1640 (10% fetal calf serum および Streptomycin sulfate 加) にて2時間培養した。その後、1.5%のグルタルアルデヒド (0.067 M カコシル酸ナトリウム緩衝液: pH 7.4, 1%ショ糖加) にて固定後、150×g にて5分間遠心分離を行い、4°Cで一晩前固定を、2%の四酸化オスミウムで2時間の後固定を行った。固定終了後、上昇アルコール系列にて脱水、プロピレンオキシドにて置換後、Epon 812 に包埋した。ミクロトームにて薄切し、光顕切片はトルイジンブルーで染色を、電顕切片は酢酸ウランおよびクエン酸鉛による二重染色を施した後、光学顕微鏡ならびに日立 H-300 型透過型電子顕微鏡にて培養前後での K562 細胞の状態を観察した。

〔4〕 正常マウス内耳における、NK細胞、マ
クロファージ、γδ型T細胞の抗原の局在の
検討 (表2B)

体重 20~30 g の鼓膜所見正常な BALB/c マウスを用い、ペントバルビタールナトリウム (30 mg/kg) による腹腔内麻酔のもと、側頭骨を摘出、内耳を採取し、4%のバラホルムアルデヒドにて4°Cで一晩浸漬固定を行った。その後、0.1 M Na-EDTA にて1ヶ月間脱灰操作を行い、10%、20%、30%のショ糖溶液に順次浸漬し、O.C.T. コンパウンドに包埋した後、クリオスタットにて凍結切片を作製した。この切片上で、抗 asialo GM₁ 抗体、抗 mature mouse macrophages 抗体 (rat monoclonal: Serotec 製)、抗 murine inter-

digitating cells 抗体 (rat monoclonal: BMA 製), 抗 murine resident tissue macrophages 抗体 (rat monoclonal: BMA 製), 抗 human $\gamma\delta$ T cell δ chain 抗体 (mouse monoclonal: T cell sciences 製) を一次抗体とした酵素抗体法 (ABC 法: Vector 社の ABC Kit を使用) にて, 各々の抗原陽性部位の標識を行い, 光学顕微鏡にて観察した。

結 果

〔1〕 K562 細胞の組織内注入実験結果

1) K562 細胞のモルモット内耳 (外リンパ腔) 内注入実験結果

① 注入24時間後

この時期では, K562 細胞は外リンパ腔, すなわち, 鼓室階と前庭階に生存していた。K562 細胞はほぼ球形で, 直径は約 $15\ \mu\text{m}$ であった。核は大型, 不整形で染色質に富み, 核小体は大きく数も多かった。細胞質にはリボゾームが豊富で, ミトコンドリアやゴルジ装置には乏しかった (図1)。大きさ, 形態的に, 炎症細胞や他の生理的細胞との鑑別は容易であった。K562 細胞は, 一部は外リンパ腔に浮遊していたものの, ほとんどは外リンパ腔を形づくる膜組織に付着するような形で存在していた (図2)。この時間経過では防御機構が出現している様子は観察されなかった。

② 注入48時間後

この時期でも, K562 細胞は外リンパ腔に生存

図2 K562 細胞の外リンパ腔内注入24時間後の光学顕微鏡像 (基底回転)

K562 細胞 (矢印) は, 外リンパ腔, すなわち鼓室階 (ST) と前庭階 (SV) に生存している。一部は外リンパ腔に浮遊しているものの, ほとんどは外リンパ腔を形づくる膜組織に付着するような形で存在している。SM: 蝸牛管

図3 K562 細胞の外リンパ腔内注入48時間後の光学顕微鏡像 (基底回転)

K562 細胞は外リンパ腔 (鼓室階: ST) に生存している。注入24時間後群と比較して, 細胞数が増加しているようである。多くの細胞は, 外リンパ腔を形づくる膜組織に付着するような形で存在しているが, 一部では, 細胞どうしが集まりあっている (矢印)。SM: 蝸牛管

図4 K562 細胞の外リンパ腔内注入48時間後の透過型電子顕微鏡像 (基底回転)

K562 細胞 (K) の多くは, 外リンパ腔を形づくる膜組織に付着するような形で存在している (矢印)。ST: 鼓室階 B: 基底板

していた。注入24時間後群と比較して, 細胞数が増加しているようであった (図3)。やはりほとんどの細胞は, 外リンパ腔を形づくる膜組織に付着するような形で存在していた (図4) が, 一部で

図5 (A) K562 細胞の外リンパ腔内注入48時間後の内リンパ囊の光学顕微鏡像
(B) K562 細胞の外リンパ腔内注入4日後の内リンパ囊の光学顕微鏡像
(C) K562 細胞の外リンパ腔内注入9日後の内リンパ囊の光学顕微鏡像
(A), (B), (C) ともに内リンパ囊 (ES) に著明な変化は認められない。F: 常在性の浮遊細胞

は、細胞どうしが集まりあっている様子もみうけられた。K562 細胞の傷害像は観察されなかった。また、内リンパ囊には著明な変化は認められなかった (図5A)。外リンパ腔、内リンパ囊ともに、asialo GM₁ 陽性細胞は認められなかった。

図6 K562 細胞の外リンパ腔内注入67時間後の光学顕微鏡像 (基底回転)
ごく少数ながらマクロファージ (M) の出現がみられる。ST: 鼓室階 SM: 蝸牛管 B: 基底板

図7 K562 細胞の外リンパ腔内注入86時間後の光学顕微鏡像 (基底回転)
K562 細胞は、この時期でも外リンパ腔 (前庭階: SV) に生存しているばかりでなく、活発に細胞分裂している所見もみられる (矢印)。

③注入67時間後

K562 細胞は、この時期でも外リンパ腔に生存

図8 K562 細胞の外リンパ腔内注入7日後の透過型電子顕微鏡像（基底回転）
K562 細胞は外リンパ腔内で活発に細胞分裂している。

図9 K562 細胞の外リンパ腔内注入7日後の光学顕微鏡像（基底回転）

K562 細胞はさらに活発に増殖しており、多数のK562 細胞どうしが接着しあって、塊状となっている（矢印）。しかしこの時期には、多数の炎症細胞の外リンパ腔への集合像がみられる。ST: 鼓室階 SV: 前庭階 SM: 蝸牛管

図10 (A)～(D) K562 細胞の外リンパ腔内注入7日後の large granular lymphocyte (LGL) の諸相：透過型電子顕微鏡像
内部の電子密度が濃く、周囲は電子密度がやややすい顆粒 (G) を有する。K562 細胞 (K) に接着・結合 (矢印) し、これを傷害している。

図11 (A) K562 細胞の外リンパ腔内注入 7 日後のホルチ器の光学顕微鏡像 (基底回転)
有毛細胞が著明に傷害を受けている。
O: 外有毛細胞 I: 内有毛細胞 T: 蓋膜
(B) 同時期の外有毛細胞の透過型電子顕微鏡像
小胞体の増大, 細胞膜下槽の乱れがみられる。
(C) 同時期の血管条の光学顕微鏡像 (基底回転)
辺縁細胞 (M) の蝸牛管 (SM) 側への脱出像がみられ, 強度の傷害の様子がうかがわれる。SL: ラセン靱帯

していた。しかし, K562 細胞の傷害像は観察されなかったものの, ごく少数のマクロファージの

図12 K562 細胞の外リンパ腔内注入 7 日後の蝸牛軸周囲の透過型電子顕微鏡像 (基底回転)

(A) 蝸牛軸らせん静脈 (SMV: spiral modiolar vein) と集合細静脈 (CV: collecting venule) の周囲腔に著明な炎症細胞の浸潤像を認める。また, これら炎症細胞の鼓室階 (ST) への流入所見を認める (矢印)。large granular lymphocyte (L) による K562 細胞 (K) の傷害像がみられる。
(B) 蝸牛軸らせん静脈 (SMV) 周囲腔の拡大像。

出現が観察された (図 6)。

④注入86時間後

K562 細胞は, この時期でも外リンパ腔に生存しているばかりでなく, 活発に細胞分裂している所見も観察された (図 7)。しかし一方で, K562 細胞の傷害像が散見された。

⑤注入 4 日後

K562 細胞は, この時期でも外リンパ腔に生存していた。内リンパ嚢には著明な変化は認められなかった (図 5B)。外リンパ腔, 内リンパ嚢ともに, asialo GM₁ 陽性細胞は認められなかった。

⑥注入 7 日後

K562 細胞はさらに活発に増殖していた (図 8)。多数の K562 細胞どうしが接着しあい、塊状となっている様子が観察された (図 9)。しかしこの時期には、多数の炎症細胞の外リンパ腔への集合像を認めた。なかでもマクロファージやリンパ球に混じって、特徴的な顆粒を有する大型のリンパ球である large granular lymphocyte (LGL) の出現を認め、この細胞の接着、結合による K562 細胞の傷害像が観察された (図 10A~D)。この時期のコルチ器では、有毛細胞が著明に変性し (図 11 A, B)、血管条では、辺縁細胞の内リンパ腔側への脱出像がみられ (図 11C)、強度の傷害の様子がうかがわれた。また、蝸牛軸の静脈や細静脈周囲腔 (perivascular space) には多数の炎症細胞の浸潤像が観察された (図 12A, B)。このような所見は、鼓室階外側壁の細静脈周囲腔でも観察された。基底板下部や鼓室階内側壁部で炎症細胞の浸潤像が著明であった。鼓室階の下部では、各種の細胞が凝集するように存在し、一部では fibrosis を疑わせる所見であった (図 13)。これらの所見は、特に下方回転で著明であった。形質細胞の出現は観察されなかった。反対側の外リンパ腔には変化は認められなかった。

⑦注入 9 日後

外リンパ腔には、K562 細胞や炎症細胞が多数

図13 K562 細胞の外リンパ腔内注入 7 日後の鼓室階の透過型電子顕微鏡像 (基底回転)

鼓室階 (ST) は、傷害をあまり受けていない K562 細胞、傷害された K562 細胞、浸潤してきた炎症細胞、線維芽細胞などではほぼ充満しており、fibrosis にすすむと考えられる組織像を呈している。

図14 K562 細胞の外リンパ腔内注入 9 日後の光学顕微鏡像 (基底回転)

外リンパ腔 (鼓室階: ST と前庭階: SV) には、K562 細胞や炎症細胞が多数存在しているが、炎症細胞の比率が大きい。SM: 蝸牛管

図15 K562 細胞の外リンパ腔内注入 9 日後の光学顕微鏡像 (基底回転: ABC 法)

外リンパ腔 (鼓室階: ST と前庭階: SV) 内の炎症細胞のなかに、多数の asialo GM₁ 陽性細胞がみられる (矢印)。SM: 蝸牛管 R: ライスネル膜

存在していたが、炎症細胞の比率が大きいようであった (図 14)。この時期では、炎症細胞のなかに多数の asialo GM₁ 陽性細胞が観察された (図 15)。内リンパ囊には著明な変化は認められず (図 5C)、asialo GM₁ 陽性細胞も観察されなかった。

図16 K562 細胞のモルモット皮膚内注入48時間後の光学顕微鏡像

注入48時間後の群で、すでに多数の K562 細胞（白矢印）に混じってリンパ球（黒矢印）の集合像が観察される。

2) K562 細胞のモルモット皮膚内注入実験結果

注入24時間後の群では、K562 細胞に混じって、好中球を主体とした炎症細胞浸潤が観察された。注入48時間後の群では、すでに K562 細胞に混じって、マクロファージやリンパ球の集合像が観察された（図16）。その後の時間経過では、炎症細胞の集合像は観察されたものの K562 細胞が生存しつつけている様子は観察されなかった。

3) K562 細胞のモルモット水晶体内注入実験結果

水晶体内では、K562 細胞はいずれの時期にお

いても観察されなかった。炎症細胞出現などの防御機構の動員も観察されなかった。

〔2〕 K562 細胞の外リンパ液添加の有無の両条件下での培養実験結果

40時間の培養前後に比較したが、光学顕微鏡上、外リンパ液添加の有無の両条件下で著しい差は認められなかった（図17A, B）。

〔3〕 K562 細胞のモルモット白血球との培養実験結果

2時間の培養前後で比較したが、2時間の経過でもすでに光学顕微鏡上、K562 細胞の膨化が観察された（図18A, B）。透過型電子顕微鏡上、K562 細胞の多くは傷害を受けており、LGL (large granular lymphocyte) と考えられるリンパ球の接着・結合にもとづく K562 細胞の傷害像が観察された（図19A, B）。

〔4〕 正常マウス内耳における、NK 細胞、マクロファージ、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の抗原の局在の検討結果

抗 asialo GM₁ 抗体を用いた酵素抗体法では、マウスの血管条毛細血管内皮細胞周辺部に標識された（図20）。抗 mature mouse macrophages 抗体、抗 murine interdigitating cells 抗体、抗 murine resident tissue macrophages 抗体、抗 human $\gamma\delta$ T cell δ chain 抗体を用いた酵素抗体法では内耳に標識される部位は認められなかった。

考 察

現在、耳鼻咽喉科領域で原因不明の内耳疾患と

図17 (A) 外リンパ液が存在しない条件下での K562 細胞の培養40時間後（光学顕微鏡像）
(B) 外リンパ液が存在する条件下での K562 細胞の培養40時間後（光学顕微鏡像）
(A), (B) の両群間で、光学顕微鏡上、著しい差はみられない。

図18 (A) K562 細胞のモルモット白血球との培養直後 (光学顕微鏡像) 白矢印: K562 細胞 矢頭: 白血球
(B) K562 細胞のモルモット白血球との培養 2 時間後 (光学顕微鏡像)
白血球 (矢頭) による K562 細胞 (白矢印) の取り囲み像がみられる。また、K562 細胞の膨化像 (黒矢印) がみられる。

図19 (A), (B) K562 細胞のモルモット白血球との培養 2 時間後の large granular lymphocyte (LGL) の諸相: 透過型電子顕微鏡像
K562 細胞 (K) に接着・結合し (矢印), これを傷害している。顆粒 (G) が特徴的である。

いわれている感音性難聴, 突発性難聴, メニエール病などについて, その原因として免疫反応が関与しているのではないかと¹⁰⁾¹¹⁾との考察のもと, さまざまな動物実験が行われてきている。そして, 近年内耳においても免疫応答が存在し, 内リンパ嚢がその中心的役割を担う部位であることが明らかにされてきた^{12)~18)}。しかしながら, これまでの動物実験的報告は, 内耳に抗原が侵入した場合に内耳が免疫応答の門戸になり, 内耳局所での二次防御機構 (特異的防御機構) が起こりうることを証明したにすぎず, 内耳局所における初期防御機構 (非特異的防御機構) の存在の有無については明らかにされていない。本研究では, これまで主に二次防御機構にあてられていた焦点を, 二次防御機構以前の初期防御機構にあて, 検討することに主眼をおいた。

図20 マウスの血管条 (SV) における, asialo GM₁ 陽性部位の光学顕微鏡像 (ABC 法)
血管条の毛細血管内皮細胞周辺部に標識を認める (矢印)。SM: 蝸牛管 SL: ラセン靱帯

生体にはその恒常性を維持するために、侵入してきた外来異物を非特異的に排除しようとする防御機構が備わっている。野本^{19)~21)}によれば、これには、秒単位で異物と接触するリゾチーム、トランスフェリンなどの体液性活性物質、分単位で機能発現が始まる補体、10分の単位で作用を始める好中球、10時間の単位で作用を始めるマクロファージ、異物侵入後約7日間を要する抗体産生や感作リンパ球出現までをカバーするNK (natural killer) 細胞や $\gamma\delta$ 型T細胞などが含まれる。宿主と異物との力関係や異物の種類にもよるが、これらの初期防御に関与する液性因子および細胞性因子によって、かなりの外来異物は排除され、重篤な疾病に至らずにすんでいると考えられる。よって、この初期防御機構の解明こそが原因不明の内耳疾患の病因把握につながるものと考えられる。

内耳疾患については、突発性難聴の病因の1つとしてウィルス感染が重要視されている。これまで、いくつかのウィルスで実験動物による内耳ウィルス感染モデルが作成され、形態学的に内耳病変の検討が行われている^{22)~28)}が、ウィルス感染に対する初期防御機構についての詳細な報告はみうけられない。ウィルス感染には、一般的にマクロファージ以降の防御機構(主としてNK細胞²⁹⁾、特異的免疫機構)が動員され感染に対処する。この研究の主題は非特異的防御機構であるため、特にNK細胞の内耳への出現の有無に注目した。NK細胞は、明らかな抗原による感作なしにMHC(主要組織適合遺伝子複合体)非拘束性に標的細胞(腫瘍細胞やウィルス感染細胞など)を破壊排除する能力をもったリンパ球で、胞体にアズール顆粒を有する大型のリンパ球(large granular lymphocyte: LGL)という形態学的特徴を有する。電子顕微鏡にて観察すると、顆粒は内部は電子密度が濃く、周囲は電子密度がやや小さいものが多い³⁰⁾。標的細胞に接着・結合することにより、顆粒(パーフォリンなど)の放出を介してまたは介さずに傷害作用を発揮する³¹⁾。LGLは末梢血リンパ球の約10~15%をしめ、そのうちの約70%はNK細胞であるといわれている。NK細胞は肺の間質、腸管粘膜、肝にも分布している。肝ではPit細胞と同一とみなされており、血管内皮細胞に密着している³²⁾。内耳においては、その存在は現在まで報告されていない。また、内耳に

動員されてくるのかも明らかにされていない。

本研究では、ウィルスの代わりにNK細胞のtarget cellとしてこれまでの実験で頻用されている腫瘍細胞である、ヒト慢性骨髄性白血病由来のK562細胞を用いた^{30)33)~35)}。このK562細胞が外リンパ腔内に侵入した場合、外リンパ液という環境や外リンパ液中の各種の非特異的防御因子によって比較的早期に排除されるのではないかと予想された。実際、外リンパ液中には、免疫グロブリンが存在するとの報告もみうけられ⁵⁾⁶⁾³⁶⁾また、外リンパ液中に補体が存在するという報告は検索した範囲ではみられなかったが、髄液中には微量ではあるがその存在が知られており³⁷⁾、外リンパ腔は蝸牛小管で髄液腔と交通していることから、外リンパ液中にも微量ながら補体は存在するものと思われる。しかしながら、予想に反し、外リンパ腔内に注入したK562細胞は観察したすべての時期(注入9日後まで)において生存しうることが判明した。外リンパ液はK562細胞の増殖に何ら不都合な影響を与えないのであろうか、外リンパ液中の液性因子はK562細胞の増殖をおさえるほど強い因子を有していないのであろうか、という疑問が残る。そこで、外リンパ液中の液性因子が果たしてK562細胞に対して傷害的な作用を有するのかを調べるため、外リンパ液添加の有無の両条件下でK562細胞を40時間培養する実験を行った。その結果、培養前後でK562細胞には光学顕微鏡上、形態学的に著明な変化はみられなかったことより、外リンパ液中の液性因子のみによる防御機構は弱いものであることが判明した。しかしながら、培養時に外リンパ液が約20倍に希釈されているため、濃度についても考慮に入れるべきではある。次に、血液中の白血球がK562細胞と遭遇した場合、K562細胞を攻撃するかどうかを調べるために、K562細胞と白血球とを培養する実験を行った。その結果、2時間の培養ですでにK562細胞は白血球に取り囲まれ、一部は膨化し、LGLによる攻撃を受けている様子が観察された。これらの実験結果より、K562細胞が今回観察した時間経過内で外リンパ腔内に生存できたのは、次述のように細胞性防御因子(特にNK細胞)の動員の時間的遅延にもとづくものと考察された。

本研究で、細胞性防御因子の外リンパ腔への出現は、K562細胞の外リンパ腔への注入24時間後

群と48時間後群では観察されず、67時間後群で初めてマクロファージが観察された。しかしごく少数であり、本格的な細胞性防御因子の動員は注入7日後になってからであった。この時間経過は、皮膚などでの一般的な炎症細胞出現時間に比べて遅延していることが判明した。コントロールとして皮膚に注入した群では、注入48時間後群のものですでに細胞性防御因子の出現をみとめている。これは、皮膚には異物抗原の初期認識機構が備わっているためと考えられた³⁸⁾。

Harris³⁹⁾ は、Keyhole limpet hemocyanin (KLH) 抗原を外リンパ腔に直接注入し、血清および外リンパ液中の抗 KLH 抗体価を測定しているが、それによると、注入1週間後では血清中の抗 KLH 抗体価は有意に上昇しているものの、外リンパ液中の抗 KLH 抗体価は注入4週間後でも上昇せず、注入7週間後に上昇したと報告している。また、KLH 抗原を皮膚に注入することによって前感作した後に KLH 抗原を外リンパ腔に二次感作した場合には、二次感作の2週間後でも外リンパ液中の抗 KLH 抗体価の有意な上昇を報告している。また別の報告でTakahashi ら¹⁴⁾、Harris ら²⁷⁾ は KLH 抗原の全身感作（皮下注入）後に KLH 抗原を外リンパ腔に二次感作させた場合には、炎症細胞は数時間で外リンパ腔へ出現すると報告しているが、このことと本研究の結果より、二次感作時に比べ初感染時の内耳の応答の時間的遅延の原因として、内耳は抗原侵入の情報を入手するのに時間がかかるのではないかとということ、細胞性防御因子の動員に時間がかかるのではないかとことの2点が推測されうる。すなわち、内リンパ嚢にはマクロファージやリンパ球などの抗原侵入を認識できる細胞が存在する¹³⁾⁴⁾、もしくは周囲の毛細血管の特異性 (fenestrated type)⁴⁰⁾ から容易に動員できるものの、外リンパ腔に侵入した抗原の認識機構（組織固着のマクロファージなど）が皮膚などに比べ弱いのではないかと考えられる。

水晶体は、眼組織のなかでも、免疫担当細胞の常在する結膜やぶどう膜と対照的に、免疫機構の存在しない組織である⁴¹⁾。それゆえ防御機構の面では弱く、注入された K562 細胞は生存してもおかしくはないと考えられ、内耳との比較のため注入実験を行った。しかし、K562 細胞の生存して

いる様子は観察されなかった。これは水晶体の密な構造および無血管ということが K562 細胞の生存に不適な環境であったのではないかと考えられた。

細胞性防御因子の由来は、K562 細胞の外リンパ腔内注入7日後群の蝸牛軸や蝸牛外側壁細静脈周囲腔 (perivascular space) に多数浸潤する像が観察されたこと、および内リンパ嚢には光学顕微鏡上、形態学的に変化が認められなかったことから、内耳免疫の主役と考えられている内リンパ嚢よりもむしろ Harris, Fukuda ら²⁷⁾²⁸⁾ のウィルス注入実験での報告と同様、全身の血管系（細静脈）である可能性が高いと考えられた。Harris, Fukuda らは、ウィルス感染時の炎症細胞の由来として、spiral modiolar vein (蝸牛軸らせん静脈) と collecting venule (集合細静脈) の重要性を報告している。これらの血管は蝸牛からの還流血管であり、また、蝸牛軸の血管は内リンパ嚢と同様に fenestrated type と報告されている⁴²⁾。本研究でも蝸牛軸らせん静脈と集合細静脈の周囲腔に著明な炎症細胞の浸潤像を認め、またこの部より炎症細胞が鼓室階に流入するのを示唆する像を認めたことより、Harris, Fukuda らの結果を支持するものである。

K562 細胞の外リンパ腔内注入7日後に LGL が認められ、注入9日後の切片で外リンパ腔内の炎症細胞のなかに asialo GM₁ 陽性細胞が多数認められた。asialo GM₁ は murine NK 細胞の surface marker として有用な glycolipid である⁴³⁾⁴⁴⁾ が、NK 細胞の他にも活性化マクロファージや CTL (cytotoxic T lymphocyte) でも陽性となる³⁰⁾。肝の Kupffer 細胞でも陽性になると報告されている。しかしながら、LGL の形態をとり asialo GM₁ 陽性となること、および細胞の出現時期より、これらの asialo GM₁ 陽性細胞は NK 細胞である可能性が高いと考えられた。Kataoka ら³⁴⁾³⁵⁾ は、抗 asialo GM₁ 抗体はモルモットの NK 活性を低下させないことから、モルモットの NK 細胞は抗 asialo GM₁ 抗体に感受性がないようだと報告しているが、逆に Weinberg ら⁴⁵⁾ は、抗 asialo GM₁ 抗体によってモルモットの NK 活性および LAK (lymphokine-activated killer) 活性が低下し、モルモットの NK 細胞および LAK 細胞は asialo GM₁ を表出すると報告している。

本研究の結果は、Weinberg らの報告を支持するものである。

外リンパ腔内注入7日後あたりから積極的な防御機構が動員されたわけであるが、外リンパ腔は傷害をあまり受けていない K562 細胞、傷害をうけた K562 細胞、浸潤してきた炎症細胞、線維芽細胞などが混在してほぼ充満しており、特に下方回転の鼓室階下部では、fibrosis にすすむと考えられる組織像を呈していた。同様の所見は Harris ら²⁷⁾ のウィルス注入実験でも得られており、早期に排除しきれない抗原侵入に対する炎症反応の結果であると考えられた。また、内耳組織、特に聴覚に非常に重要なコルチ器および血管条はこの時期には著明な傷害をうけていた。すなわち、外リンパ腔内に注入された異物に対して積極的な防御機構が動員されるにはされたものの、それは内耳傷害がおこってからのできごとであることが観察された。

組織定着型の抗原認識機構として、マクロファージ、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞、NK 細胞などが候補としてあげられる。 $\gamma\delta$ 型 T 細胞は、 $\alpha\beta$ 型 T 細胞よりも系統発生的に早期に出現した細胞と考えられており⁴⁶⁾、 $\alpha\beta$ 型 T 細胞が主に存在する末梢のリンパ性組織 (lymphoid organ) には一般に数は少なく、代わりに皮膚、腸管、肺などの上皮細胞層に局在し、最も感染を受けやすい部位を守るために進化してきた T 細胞ではないかとの仮説が有力という。現在までに調べられたすべての動物種で存在する⁴⁷⁾。生体防御の面では、heat shock protein の認識などによる感染微生物やその生体感染細胞の排除、腫瘍細胞に対する初期防御の面で注目されている^{48)~51)}。現在まで内耳においては heat shock protein の存在の報告はあるものの^{52) 53)}、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の存在は報告されていない。本研究ではマクロファージ、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞は免疫組織化学的手法による検出上検出されなかった。しかし、asialo GM₁ 陽性部位が血管条毛細血管内皮細胞周辺部に検出されたことは、この部位が初期抗原認識に関与している可能性を示唆するものと思われる。本研究で $\gamma\delta$ 型 T 細胞は検出されなかったが、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞は加齢にともなって増加するとの報告があり⁵⁴⁾、さらに週齢を増した (感染をうけた) マウスなどを用いると検出される可能性はあるかもしれない。

本研究の結果より、内耳には液性因子による強力な防御機構は存在せず、また NK 細胞を主体とする非特異的防御機構はその発現が一般的な時間経過に比し遅れることが判明した。但し、これはあくまで中耳という場を越えた内耳そのものの防御機構をみたものであり、臨床面で起こりうる中耳から内耳への感染による症状発現から考えると、中耳の感染防御機構が内耳の感染防御機構を大きく修飾するものと思われる。このような点から、今後は中耳を含めた、いわゆる中耳と内耳を一体化とした感染防御機構の検討が望まれる。

まとめ

モルモット内耳に病原性異物 (腫瘍細胞) が直接侵入した場合の実験モデルをつくり、時間経過を追ってその異物の動向および内耳の応答を観察することを目的とした。結果は以下のとおりであった。

1) K562 細胞は、観察したすべての時間経過 (注入9日後まで) において外リンパ腔に生存しえた。

2) K562 細胞の内耳への注入67時間以降では、炎症細胞が外リンパ腔に少数ながら出現し、また7日後では、形態的に large granular lymphocyte (LGL) と考えられるリンパ球による K562 細胞の傷害像が観察された。このリンパ球は asialo GM₁ 陽性であること、およびその出現時間経過より NK (natural killer) 細胞であると考えられた。

3) K562 細胞の傷害作用は外リンパ液中の液性防御因子のみでは弱く、細胞性防御因子が主な役割を果していることが判明した。

4) これら細胞性防御因子は、内リンパ囊よりむしろ全身の血管系より供給される可能性が示唆されたが、外リンパ腔への動員には他の一般的組織と比較して時間がかかることが判明した。

5) K562 細胞の内耳への注入7日後には積極的な防御機構の出現が観察されたものの、この時期ではコルチ器および血管条の著明な傷害像が観察された。

6) 血管条の毛細血管内皮細胞周辺部は、初期抗原認識に関与している可能性が示唆された。

以上の結果は、病原性異物侵入に対する内耳の即座に対処できる防御機構 (初期防御機構) はそれほど強いものではないことを示すものであり、逆説的には内耳の恒常性維持における非特異的防

御機構の重要性を示唆するものである。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導を賜りました恩師中井義明教授に深甚なる謝意を捧げますとともに、御指導、御協力をいただきました山根英雄助教授に深く感謝の意を表します。また、本研究において、終始適切な御指導、御協力をいただきました大阪府立看護大学医療技術短期大学部解剖生理学教室 高橋研一教授、および種々の御協力をいただきました本学耳鼻咽喉科学教室の諸先生方に厚く感謝いたします。

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って行われたものである。

文 献

- 1) Lundquist P-G: The endolymphatic duct and sac in the guinea pig. *Acta Otolaryngol Suppl* 201, 1965
- 2) McCabe BF: Autoimmune sensorineural hearing loss. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 88 : 585-589, 1979
- 3) Rask-Andersen H, Stahle J: Lymphocyte-macrophage activity in the endolymphatic sac. An ultrastructural investigation of the rugose endolymphatic sac in the guinea pig. *ORL* 41 : 177-192, 1979
- 4) Rask-Andersen H, Stahle J: Immunodefense of the inner ear? Lymphocyte-macrophage interaction in the endolymphatic sac. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 89 : 283-294, 1980
- 5) Mogi G, Lim DJ, Watanabe N: Immunologic study on the inner ear: immunoglobulins in perilymph. *Arch Otolaryngol* 108 : 270-275, 1982
- 6) Mogi G, Watanabe N, Kawauchi H: Immunoglobulin in inner ear fluids. *Acta Otolaryngol Suppl (Stockh)* 468 : 77-80, 1989
- 7) Harris JP: Immunology of the inner ear: evidence of local antibody production. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 93 : 157-162, 1984
- 8) Mogi G, Kawauchi H, Suzuki M, et al: Inner ear immunology. *Am J Otolaryngol* 6 : 142-147, 1985
- 9) Tomiyama S, Harris JP: The endolymphatic sac: Its importance in inner ear immune responses. *Laryngoscope* 96 : 685-691, 1986
- 10) Veldman JE: The immune system in hearing disorders. *Acta Otolaryngol Suppl (Stockh)* 458 : 67-75, 1988
- 11) Veldman JE: Immunology of hearing: experiments of nature. *Am J Otol* 10 : 183-187, 1989
- 12) Tomiyama S, Harris JP: The role of the endolymphatic sac in inner ear immunity. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 103 : 182-188, 1987
- 13) Takahashi M, Harris JP: Anatomic distribution and localization of immunocompetent cells in normal mouse endolymphatic sac. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 106 : 409-416, 1988
- 14) Takahashi M, Harris JP: Analysis of immunocompetent cells following inner ear immunostimulation. *Laryngoscope* 98 : 1133-1138, 1988
- 15) Tomiyama S, Harris JP: Elevation of inner ear antibody levels following direct antigen challenge of the endolymphatic sac. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 107 : 202-209, 1989
- 16) Gloddek B, Harris JP: Role of lymphokines in the immune response of the inner ear. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 108 : 68-75, 1989
- 17) Tomiyama S, Nonaka M, Gotou Y, et al: Inner ear damage by local immune response of the endolymphatic sac in the guinea pig. *Acta Otolaryngol Suppl (Stockh)* 481 : 176-178, 1991
- 18) Tomiyama S: Endolymphatic hydrops induced by immune response of the endolymphatic sac: relation to perilymph antibody levels. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 101 : 48-53, 1992
- 19) 野本亀久雄 : PMN, Mφ の食菌と生体防御. *日本細菌学会誌* 43 : 899-910, 1988
- 20) 野本亀久雄 : 生体防御のしくみ. *炎症* 9 : 9-14, 1989
- 21) 野本亀久雄 : 生体における異物処理機構. *アレルギー* 39 : 437-441, 1990
- 22) Harris JP, Woolf NK, Ryan AF, et al: Immunologic and electrophysiological response to cytomegaloviral inner ear infection in the

- guinea pig. *J Infect Dis* 150 : 523-530, 1984
- 23) Fukuda S: Experimental paramyxovirus induced labyrinthitis in the guinea pig-an immuno-histochemical study of the cochlear lesion. *Ear Res Jpn* 17 (Suppl 1) : 52-58, 1986
- 24) Fukuda S, Keithley EM, Harris JP: Experimental cytomegalovirus infection: viremic spread to the inner ear. *Am J Otolaryngol* 9 : 135-141, 1988
- 25) Keithley EM, Sharp P, Woolf NK, et al: Temporal sequence of viral antigen expression in the cochlea induced by cytomegalovirus. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 106 : 46-54, 1988
- 26) Keithley EM, Woolf NK, Harris JP: Development of morphological and physiological changes in the cochlea induced by cytomegalovirus. *Laryngoscope* 99 : 409-414, 1989
- 27) Harris JP, Fukuda S, Keithley EM: Spiral modiolar vein: Its importance in inner ear inflammation. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 110 : 357-365, 1990
- 28) Fukuda S, Harris JP, Keithley EM, et al: Spiral modiolar vein: Its importance in viral load of the inner ear. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 101 : 67-71, 1992
- 29) Janeway CA: A primitive immune system. *Nature* 341 : 108, 1989
- 30) Trinchieri G: Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 47 : 187-376, 1989
- 31) 八木田正人: NK 細胞—研究の進歩と最近の動向. 腫瘍免疫—研究の新展開 (内田温士編著). 179-188頁, 中外医学社, 東京, 1992
- 32) 押味和夫: NK 細胞上の血管内皮細胞との接着分子. *臨床免疫* 24 : 713-718, 1992
- 33) Altman A, Rapp HJ: Natural cell-mediated cytotoxicity in guinea pigs: properties and specificity of natural killer cells. *J Immunol* 121 : 2244-2252, 1978
- 34) Kataoka T, Kamiyama T, Ohnuki T, et al: Natural killer cell activities of several inbred strains of the guinea pig and their susceptibilities to rabbit antiserum directed to guinea-pig brain tissue. *Jpn J Med Sci Biol* 35 : 97-104, 1982
- 35) 片岡哲朗: モルモットにおける細胞性免疫に関する基礎的研究. *結核* 59 : 491-497, 1982
- 36) Fritsch JH, Jolliff CR: Protein components of human perilymph. I. Preliminary study. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 75 : 1070-1076, 1966
- 37) 佐野雄二, 井形昭弘: 免疫学的指標の臨床的意義—補体—. *神経進歩* 28 : 929-936, 1984
- 38) 塩原哲夫: 各臓器における免疫応答の特殊性「特異な免疫組織としての皮膚」. *臨床免疫* 23 : 73-84, 1991
- 39) Harris JP: Immunology of the inner ear: response of the inner ear to antigen challenge. *Otolaryngol Head Neck Surg* 91 : 18-23, 1983
- 40) Lundquist P-G, Kimura R, Wersäll J: Ultrastructural organization of the epithelial lining in the endolymphatic duct and sac in the guinea pig. *Acta Otolaryngol* 57 : 65-80, 1963
- 41) 田川義継: 各臓器における免疫応答の特殊性「眼」. *臨床免疫* 23 : 128-135, 1991
- 42) Kimura RS, Ota CY: Ultrastructure of the cochlear blood vessels. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 77 : 231-250, 1974
- 43) Kasai M, Iwamori M, Nagai Y, et al: A glycolipid on the surface of mouse natural killer cells. *Eur J Immunol* 10 : 175-180, 1980
- 44) Young WW Jr, Hakomori SI, Durdik JM, et al: Identification of ganglio-N-tetraosylceramide as a new cell surface marker for murine natural killer (NK) cells. *J Immunol* 124 : 199-201, 1980
- 45) Weinberg A, Basham TY, Merigan TC: Regulation of guinea-pig immune functions by interleukin 2: critical role of natural killer activity in acute HSV-2 genital infection. *J Immunol* 137 : 3310-3317, 1986
- 46) 安保 徹: $\gamma\delta$ T 細胞の生体内分布. *臨床免疫* 22 : 1445-1454, 1990
- 47) 利根川進: $\gamma\delta$ T 細胞の分化と特異性. *臨床科学* 27 : 1431-1438, 1991
- 48) 安保 徹: 細菌感染と $\gamma\delta$ T 細胞 (総論). *Medical Immunology* 19 : 431-437, 1990
- 49) 細川暢子, 永田和宏: Heat Shock Protein と免疫応答. *臨床免疫* 23 : 1339-1347, 1991

- 50) 吉開泰信： $\gamma\delta$ 型 T 細胞とストレス蛋白質.
Medical Immunology 21 : 579-587, 1991
- 51) 吉開泰信： $\gamma\delta$ 型 T 細胞による抗腫瘍機構.
腫瘍免疫—研究の新展開（内田温士編著）44
-54頁，中外医学社，東京，1992
- 52) Neely JG, Thompson AM, Gower DJ: Detec-
tion and localization of heat shock protein 70
in the normal guinea pig cochlea. Hear Res
52 : 403-406, 1991
- 53) Dechesne CJ, Kim HN, Nowak TS Jr, et al:
Expression of heat shock protein, HSP72, in
the guinea pig and rat cochlea after hyper-
thermia: Immunochemical and in situ hybridi-
zation analysis. Hear Res 59 : 195-204, 1992
- 54) 野本亀久雄，松崎吾朗： $\gamma\delta^+$ T 細胞の加齢に
よる変化. 臨床免疫 22 : 1455-1460, 1990

（原稿到着：平成 6 年 5 月 10 日
別刷請求先：井口広義
〒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）