

原 著

エンドトキシン中耳腔投与による内耳の出血部位

獨協医科大学越谷病院 耳鼻咽喉科

中島 規幸

要 旨 滲出性中耳炎の滲出液中にエンドトキシンが検出される事は知られている。エンドトキシンが正円窓より蝸牛に浸透するならば、内耳障害を起し急性感音難聴となりうる。エンドトキシンの影響による内耳出血部位を検討する事は重要である。

350 gのモルモットを10匹用いた。E. coliより抽出したエンドトキシン0.02 mgを腹腔投与し24時間後にエンドトキシン0.04 mgを含んだGelform[®]を正円窓膜上に留置した。24時間後正円窓より2%グルタルアルデヒドで蝸牛内を灌流固定後断頭し、蝸牛を摘出した。一側は顕微鏡用に10%EDTAで脱灰し、他側は電顕用に非脱灰とした。2%オスミウム酸で固定後、エポン812に包埋した。

出血は蝸牛全ての領域で認め、最も出血が顕著であった部位は鼓室階ラセン靭帯の集合静脈付近であり、最も強くエンドトキシンに影響されたと考えられた。この部位にはしばしばblood sludgeを認めた。血管条が破綻し赤血球が内リンパ液中に漏出する像も観察できた。蝸牛軸血管周囲の広範囲に出血を認め、蝸牛神経の変性像も観察できた。蝸牛軸血管からの出血は蝸牛全体の機能に大きく影響を及ぼすと考えられた。

Key Words : エンドトキシン, 出血, 集合静脈, 血管条, 蝸牛軸

はじめに

日常診療において、中耳炎を伴った感音難聴に遭遇した経験はあるが、その原因の詳細は不明とされることが多い。1941年にHuikaは急性中耳炎における感音難聴の原因は細菌毒素が蝸牛基底回転に浸透するためであろうと述べている¹⁾。内耳出血のある難聴の症例報告は、1965年ごろより、白血病^{2,3)}や再生不良性貧血⁴⁾といった血液疾患罹患患者に報告された以外、稀である。しかもこれらの症例報告は病理解剖所見において確認されたものであった。そのため、内耳出血をきたしたことが直接的に難聴をもたらしたという、はっきりとしたコンセンサスは得られていない。

一般的に急性感音難聴の原因の1つとして血管攣縮や血栓などが推測されている。しかし、ヒトでの急性感音難聴発症時の血栓や血管攣縮を実際に確認することはできない。ただし、静脈の閉塞により内外リンパ腔に出血が引き起こされることは動物実験で示されている⁵⁾。ま

た正円窓破裂により、鼓室階出血が起こると、蝸牛血流が低下し、内リンパ水腫が引き起こされる機序も実験的には推測されている⁶⁾。急性感音難聴を呈し内耳出血をMRIにて確認した症例報告もあるが、基礎疾患として重度の出血傾向があった⁷⁾。

急性中耳炎や慢性中耳炎において、急性感音難聴を呈することがある。慢性中耳炎は長期にわたると、感音難聴が進行していくことが臨床的に知られている。その機序についてサイトカインやエンドトキシンなどいくつかの推察はされているが、はっきりとは断定できていない。

エンドトキシンは滲出性中耳炎の滲出液中に高率に検出されることが報告されている^{8,9)}。エンドトキシンは白血球やマクロファージを滲出液中に誘導し、遊走した白血球からライソゾームのプロテアーゼや化学物質を放出させ、中耳粘膜障害を引き起こすと考えられている^{10,11)}。また白血球やマクロファージから大量の活性酸素が産生され、組織障害を引き起こすことも知られている¹¹⁾。従って、エンドトキシンにより内耳に遊走した白血球やマクロファージが内耳の種々の細胞に障害を与えていることは十分に考えられる。内耳出血の発生機序として大量の活性酸素とエンドトキシンの血管内皮細胞への直接的な傷害の両者が重要と考えられる。渡辺らは以前、エンドトキシンにより内外リンパ液中への炎症細胞

平成21年12月16日受付, 平成22年2月10日受理
別刷請求先: 中島規幸

〒343-8555 埼玉県越谷市南越谷2-1-50
獨協医科大学越谷病院 耳鼻咽喉科

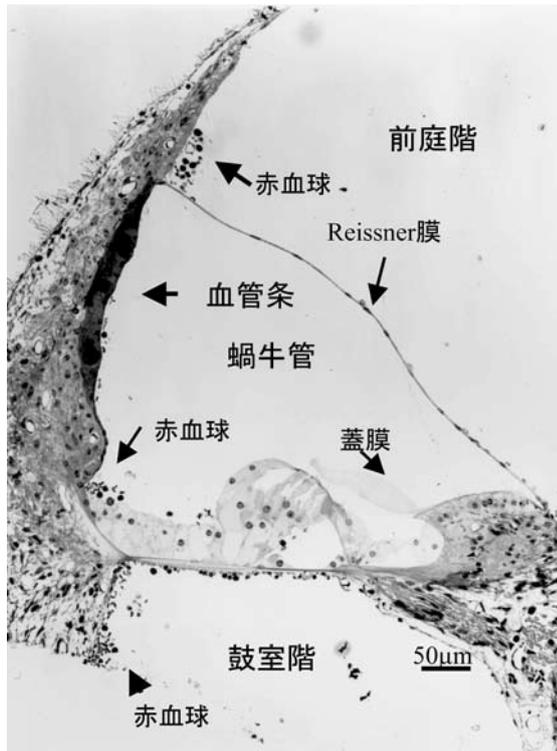


図1 蝸牛第2回転の光学顕微鏡像を示す。内リンパ液中に赤血球が認められる。外リンパ液中（鼓室階、前庭階）にも赤血球が認められる。血管条血管のBlood sludgeは基底回転以外の全回転の血管条血管に認められた。

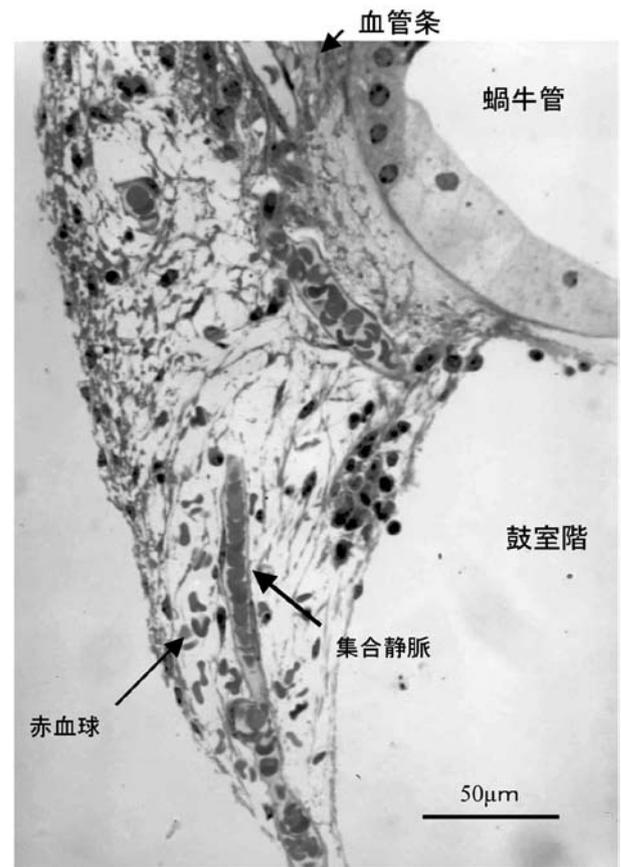


図2 第2回転の光学顕微鏡像を示す。多くの赤血球が集合静脈付近で認められる。

の浸潤と出血，炎症細胞の血管条，ラセン靭帯，コルチ器への浸潤，上部3回転での血管条血管内のblood sludgeの出現，さらに血管条中間細胞と辺縁細胞の萎縮と血管条細胞間隙の開大，さらに内外有毛細胞の細胞内空泡出現を報告している¹²⁾。内耳出血は難聴発症の上で重要な役割を担っている可能性が高く，繰り返す刺激や，強い刺激により不可逆性の変化をきたすことがあればそれは回復しない難聴の進行へとつながると推察される。内外リンパ液中に赤血球が観察されたとの報告はあるが^{11,13)}，出血が蝸牛内のどの血管に起こりやすいのかはまだ明らかにされていない。出血部位を知る事によりエンドトキシンによる内耳障害の機序の解明と，治療に役立つ可能性がある。今まで蝸牛側壁を中心に多数の研究がなされてきた。本研究では蝸牛軸を含めて詳細な出血部位の検討を行った。

方 法

体重350 g前後，4週齢のプライエル反射正常のHartley系モルモット10匹を用いて実験を行った。実験方法は獨協医科大学動物実験委員会で承認を得ている。

エンドトキシンの少量を局所に投与し，24時間後に

全身投与をすると反応が強くなる現象をシュワルツマン反応と言う。渡辺ら¹²⁾は逆に経中耳的に投与する24時間前に少量のエンドトキシンを腹腔に投与しておいても内耳変化が強く出現すると報告しているので，全ての動物にあらかじめE.coliより抽出した0.02 mgのエンドトキシン (lipopoly saccharide, phenol extract : Sigma, NO. L-2880) を腹腔投与した。

エンドトキシン0.02 mg腹腔投与24時間後にネンブタールにて腹腔麻酔を行い，中耳骨胞を開き，正円窓上にエンドトキシン0.04 mgを含ませたゼルフォーム[®]の小塊を留置した。留置24時間後に正円窓膜の破綻がない事を顕微鏡で確認の上，正円窓より2%グルタルアルデヒドで蝸牛内を5分間灌流固定後断頭した。断頭後，中耳骨胞を採取し，さらに2%グルタルアルデヒド固定液中に2時間保存した。一侧の蝸牛は光学顕微鏡用としグルタルアルデヒド固定後10%EDTA液 (pH7.4) に6時間浸漬して脱灰を行った。反対側の蝸牛は電子顕微鏡用に非脱灰とし，血管条を顕微鏡下に骨からはずし蝸牛軸は骨のついたまま標本作製を行った。脱灰，非脱灰標本とも2%オスミウム酸で40分，後固定を行った。

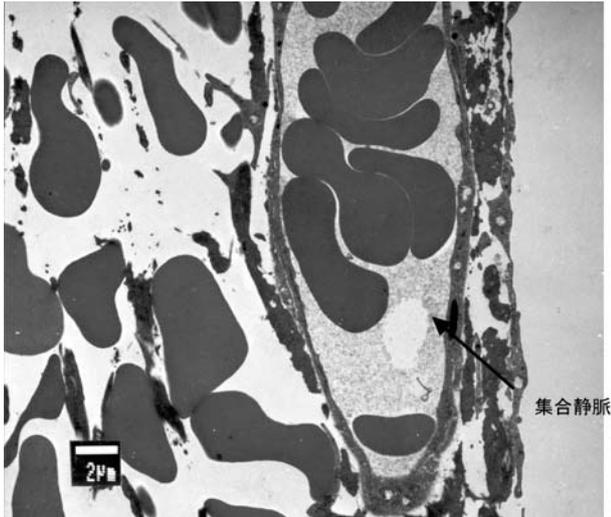


図3 第2回転の電子顕微鏡像を示す。集合静脈の周囲に多くの赤血球が認められる。



図5 第2回転の血管条の光学顕微鏡像を示す。血管条は破綻(矢印)し、内リンパ液中に赤血球が漏出している像が認められる。

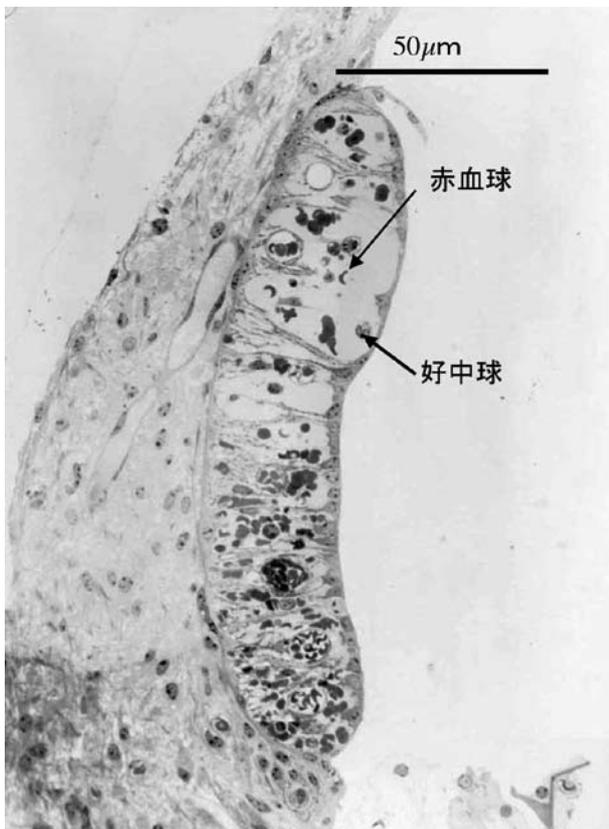


図4 基底回転の血管条の光学顕微鏡像を示す。血管条の細胞間隙に赤血球だけでなく好中球の浸潤を認める。血管条は浮腫により細胞間隙が広がっている。

アルコールで脱水後エポソ812に包埋した。超薄切片作製後ウラン・鉛二重染色を行い透過電子顕微鏡で観察した。光学顕微鏡用に作製した脱灰標本は1mmに薄切し、トルイジンブルーで染色した。光顕、電顕とも基底回転

と上回転の第3回転の切片を作製した。

コントロールとして4匹のモルモットを、生理食塩水を含んだゼルフォーム®を正円窓上に置き標本作製した。

結 果

出血は蝸牛内の広範囲に認められた。内外リンパ液中、ラセン靱帯、蝸牛軸、そして稀ではあるが血管条にも出血を認めた(図1)。外リンパ液中の出血は全例に認められ、内リンパ中の出血は5匹(50%)に認められた。最も出血が顕著であったのは鼓室階ラセン靱帯の集合静脈付近であった(図2, 3)。この部位にはしばしばblood sludgeを認めた。血管条では細胞間隙が開き好中球の遊走を認めたが、出血は稀であった。しかし血管条の浮腫が顕著で、血管条が膨隆した部位では細胞間隙に好中球だけでなく赤血球も認められた(図4)。また2匹(20%)に血管条そのものが破綻した箇所も観察された(図5)。その部位からは多数の赤血球が内リンパ腔に漏出していた。蝸牛軸にも広範囲に出血を認めた(図6)。蝸牛軸の神経束周辺には炎症細胞のリンパ球や白血球も遊走して



螺旋神経

図6 蝸牛軸の光学顕微鏡像を示す。蝸牛軸血管周囲に多くの赤血球が認められる。

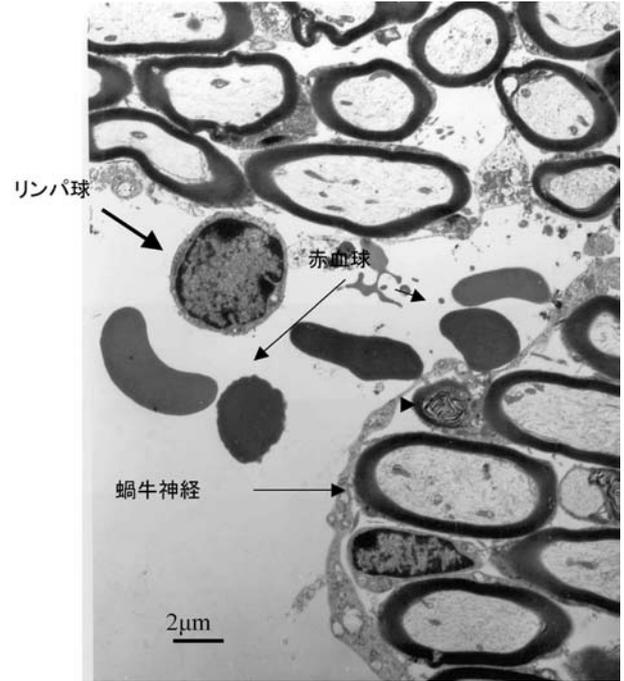


図8 蝸牛軸の電子顕微鏡像を示す。いくつかの蝸牛神経は変性(矢印)を示していた。

コントロール動物においては蝸牛内に出血を認めなかった。

考 察

滲出性中耳炎のなかで骨導聴力の低下を経験することがあるが、その詳細は不明である。その発生様式や経過も様々であり、徐々に低下する症例もあれば、突発性難聴として発症することもある¹⁴⁾。中耳貯留液中のエンドトキシンが、内耳障害を引き起こすことを組織的に観察報告し、原因不明の感音難聴や平衡障害の一因となる可能性があるとして報告されている¹⁵⁾。ヒトの滲出性中耳炎の中耳滲出液から8割という高率でエンドトキシンが検出され、その濃度はインフルエンザ菌 (157 ± 190 ng/ml)、肺炎球菌 (21.8 ± 29.5 ng/ml) と報告され¹⁶⁾、飯野らは実験的に臨床的な濃度のエンドトキシンの中耳腔投与では内耳に移行する可能性は低い¹⁷⁾ と述べているが、Kawauchiらは1 mgのエンドトキシンを0.5 mlの生理食塩水に溶解し、中耳腔に注入し、経時的に中耳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を測定比較すると注入後24-48時間で最も多く外リンパに移行し、組織学的に内耳障害を起こすことを観察報告している¹⁸⁾。同じSigma社のエンドトキシン (lipopoly saccharide) であってもロットナンバーにより力価に大きな差がある。ロットによっては、たとえ25 mg/kgを静注しても生存する場合もある。飯野らとKawauchiらで内耳

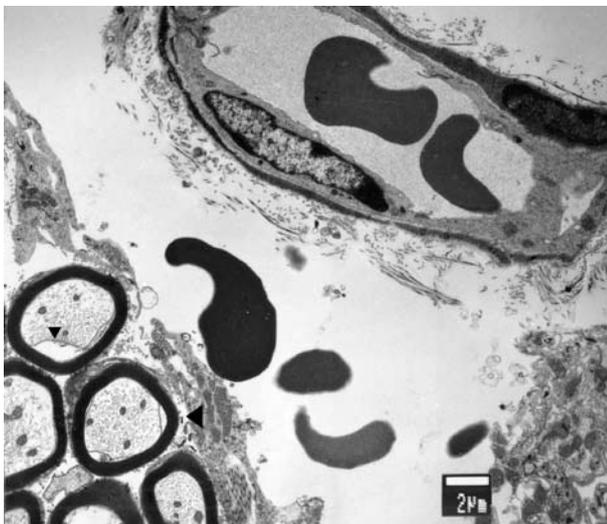


図7 蝸牛軸の電子顕微鏡像を示す。多数の蝸牛神経の萎縮(矢印)を認めた。シュワン細胞と蝸牛神経の間に間隙を認める。

いた。蝸牛神経の萎縮(図7; 矢印)や変性(図8; 矢印)も認められた。出血は基底回転にやや頻度は多かったが上部回転とほとんど差を認めなかった。

に影響するエンドトキシンの濃度を単に比較しても使用していたロットナンバーが異なれば結果は当然違ってくると思われる。今回は Watanabe ら¹²⁾ が用いたのと同じロットナンバー (Sigma, NO. L-2880) を彼らと同量の 0.04 mg を小塊に含ませて正円窓に留置した。ヒトの場合は正円窓窩膜の粘膜のひだは様々な形で張っていることが知られている¹⁹⁾。欠如している open type (30%)、閉鎖している closed type (13%)、穿孔がある perforation type (54%)、網状になっている reticular type (3%) が存在する。モルモットでは正円窓窩に粘膜ひだはないが、ヒトではこれらの形態の違いがエンドトキシンの permeability に関係している可能性も考えられる。

最近、突発性難聴患者の 50% で患側内耳の 3D-FLAIR 画像に高信号領域を認め、ガドリニウム造影前の 3D-FLAIR 画像に高信号領域が認められることは、聴力の予後不良と関連するとの報告がある²⁰⁾。これらの信号領域は内耳における微小な出血、あるいは血管透過性亢進や死滅した細胞からの蛋白質の集積を反映するものと考えられている。蝸牛においてはエンドトキシンを中耳に投与する事により血管条血管の内皮細胞間隙が開き、HRP (horseradish peroxidase) の透過性が亢進している事が報告されている²¹⁾。Kawauchi らは外リンパ液のエンドトキシンにより凝固系や非特異的に免疫系に作用し、炎症細胞を惹起させ、内耳の有毛細胞、ラセン靭帯の血管、血管条血管などに傷害を与えることを報告している¹⁸⁾。3D-FLAIR 画像による高信号の描出は透過性亢進に起因しているのかもしれない。通常毛細血管の周囲には、基底膜が存在し、分子量の小さな HRP は血管外に広範囲に漏出するが²¹⁾、赤血球の透過は阻止される。出血するという事は、大きく血管壁が損傷するか、内皮細胞間隙が大きく開き、血圧に耐え切れなくなって血管基底膜が破綻した時と考えられる。すなわち赤血球が血管外へ漏出する出血は単なる透過性亢進よりもさらに激しい変化が血管内皮細胞又は血管基底膜に加わったことを意味している。中耳粘膜においてはエンドトキシンにより血管内皮細胞間隙が開き、赤血球が血管外に漏出する事がすでに報告されている²²⁾。

エンドトキシン投与により鼓室階および前庭階の外リンパ液中及び、内リンパ液中に多数の赤血球が認められ、内外リンパ液内に出血していることはすでに明らかであったが^{12,13)}、出血を起しやすい部位はどこであるのかは興味のあるところであった。エンドトキシンによって遊走した炎症細胞からの大量の活性酸素やエンドトキシンの直接的な血管内皮細胞傷害により^{23,24)}、血管内皮細胞の収縮機能が失われ、その結果細胞間隙が開くものと考えられる。出血部位を明らかにすることは、エンドトキシ

ンによる難聴発症のメカニズムを突き止める鍵になるのではないかと考えられる。今回の実験で出血は蝸牛の広い範囲で認められ、鼓室階のラセン靭帯集合静脈付近で最も頻繁に発生することが明らかとなった。またこの部位はしばしば血管内に blood sludge も認められ、エンドトキシンの影響を受けやすい事が想定された。この部位は正円窓から侵入したエンドトキシンが直接的に作用する部位であるからかもしれない。集合静脈付近のラセン靭帯は組織が疎であり、ラセン靭帯と外リンパ液を隔てる膜は存在しない。従って、漏出した赤血球は容易に外リンパ液中に漏出してくると考える。しかし、内リンパ腔はしっかりと細胞の壁で囲まれているため、内リンパ腔を構築している壁細胞が破綻してはじめて赤血球が内リンパ腔に認められる事になる。今回の実験で出血を起こした血管条が破綻した部位を観察できた。おそらく内リンパ液中に認められた赤血球は血管条破綻部位より漏出したものと考えられる。従って外リンパ液中の出血よりも重篤な所見と考えられる。

蝸牛軸すべての領域においても出血が認められたことは大変興味深い。エンドトキシン侵入経路に関してははっきり特定することはできないが、おそらく鼓室階に侵入したエンドトキシンが蝸牛軸を被覆している骨の裂隙を通過したものと考えられる²⁵⁾。蝸牛軸血管の出血は蝸牛全体の血流にとって重大な障害となる。しかも蝸牛軸の神経束に変性を認めた。この変化がエンドトキシンによる直接の影響なのか、出血による循環障害の二次的変化なのかは不明だが、変性部位が広範囲に及べば不可逆性難聴の原因にもなり得ると考える。出血部位が基底回転であれば高音障害をきたし、全域にわたればすべての領域に難聴をきたすと推察される。渡辺ら¹³⁾によると、赤血球は外リンパ液中の方が内リンパ液中より高頻度に観察され、基底回転の方が上部回転より高頻度に観察されると報告している。今回の実験からラセン靭帯集合静脈付近で最も出血し易いことが明らかになり、外リンパ液中に高頻度に多数の赤血球が認められた事は矛盾のない結果と考えられた。内リンパ液中の赤血球の供給部位は血管条の破綻部位と考えられるが、図5のような血管条の破綻部位は10匹中2匹にしか観察できなかった。これは連続切片の観察ではないので断定はできないが、出現頻度の少ない変化と考えられる。

蝸牛軸からの出血の影響は蝸牛全体の機能に影響を及ぼす可能性が考えられる。今回の実験は経時的变化を見ていないが、内外リンパ液中の赤血球はエンドトキシンを正円窓に留置してから72時間でも認められると報告されている¹³⁾ので蝸牛軸でも同程度の長時間にわたって出血が持続すると蝸牛機能の回復にはかなりの時間を

必要とすると考えられる。

さらに実際の滲出性中耳炎の場合は滲出液が貯留している限り正円窓より蝸牛にエンドトキシンが作用し続ける事が考えられる。従って滲出液を鼓膜穿刺によりすみやかに吸引除去する事は内耳保護の点から重要になってくると思われる。

結 論

滲出性中耳炎で中耳滲出液中に認められるエンドトキシンは内耳の血管の透過性亢進、及び出血により難聴を引き起こす可能性がある事が示唆された。出血部位は蝸牛全体に認められた。最も出血頻度の高い部位はラセン靭帯集合静脈であった。内リンパ液中の赤血球は血管条の破綻の結果と考えられ、場合によって不可逆性変化となる可能性がある。さらに蝸牛軸での出血は蝸牛全体の機能低下を導き、難聴へのより大きな要因となり得ると考えられた。

謝 辞 終稿に際し、常に御指導を賜りました渡辺建介教授に深甚なる謝意を表します。

参考文献

- Hulka JH : Bone conduction changes in acute otitis media. *Arch Otolaryngol* **33** : 333-350, 1941.
- Schuknecht HF, Iharashi M, Chains WD : Inner ear hemorrhage in leukemia. A case report. *Laryngoscope* **75** : 662-668, 1965.
- Sando I, Egami T : Inner ear hemorrhage and endolymphatic hydrops in a leukemia patient with sudden hearing loss. *Ann Otol Laryngol* **86** : 518-524, 1977.
- Ogawa K, Kanzaki J : Aplastic anemia and sudden sensorineural hearing loss. *Acta Otolaryngol suppl* **514** : 85-88, 1994.
- Prelman H, Kimura R : Experimental obstruction of venous drainage and arterial supply of the inner ear. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **66** : 537-546, 1957.
- 劉秀麗, 曾根三千彦, 富永光雄, 他 : モルモット蝸牛窓破裂の蝸牛血流, 蝸牛内直流電位への影響. *日耳鼻* **106** : 723-729, 2003.
- 永野由起, 河野浩万, 奥田匠, 他 : 急性感音難聴を呈し内耳出血を示唆された2症例. *Audiology Japan* **51** : 214-220, 2008.
- DeMaria TF, Prior RB, Briggs BR, et al : Endotoxin in middle ear effusions from patients with chronic otitis media with effusion. *J Clin Microbiol* **20** : 15-17, 1984.
- Iino Y, Kaneko Y, Takasaka T : Endotoxin in middle ear effusions tested with Limulus assay. *Acta Otolaryngol* **100** : 42-50, 1985.
- Sakakura K, Hamaguchi Y, Harada T, et al : Endotoxin and Lysosomal protease activity in acute and chronic otitis media with effusion. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **99** : 379-385, 1990.
- 吉川敏一, 高野裕久, 近藤元治 : Adult Respiratory Distress Syndrome (ARDS). *化学療法の領域* **8** : 1306-1312, 1992.
- Watanabe K, Naito N, Tanaka Y : Morphological changes in the inner ear induced by bacterial endotoxin. *Med Electron Microsc* **28** : 80-87, 1995.
- 渡辺建介, 博久博子 : エンドトキシン中耳内投与後の蝸牛の経時的変化. *日耳鼻* **99** : 1738-1745, 1996.
- 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* **61** : 38-41, 1993.
- Nakai Y, Morimoto A, Chang K, et al : Inner ear damage induced by bacterial endotoxin. *Arch Otorhinolaryngol* **229** : 209-220, 1980.
- DeMaria TF, Prior RB, Briggs BR, et al : Endotoxin in Middle-Ear Effusions from Patients with Chronic Otitis Media with Effusion. *Journal of clinical microbiology* **20** : 15-17, 1984.
- 飯野ゆき子, 鳥山稔, 金ヶ崎士朗, 他 : 中耳投与エンドトキシンの内耳移行. *Otol Jpn* **1** : 39, 1991.
- Kawauchi H, Thomas FD, David JL : Endotoxin permeability through the round window. *Acta Otolaryngol Suppl* **457** : 100-115, 1988.
- 野村恭也 : 蝸牛窓. *日耳鼻* **87** : 268-271, 1984.
- Yoshida T, Sugiura M, Naganawa S, et al : Three-Dimensional Fluid-Attenuated inversion recovery magnetic resonance imaging findings and prognosis in sudden sensorineural hearing loss. *Laryngoscope* **118** : 1433-1437, 2008.
- Watanabe K, Tanaka Y : Horseradish peroxidase permeation from the capillaries of the stria vascularis after inoculation of endotoxin into the middle ear. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **106** : 394-398, 1997.
- DeMaria TF, Briggs BR, Okazaki N, et al : Experimental otitis media with effusion following middle ear inoculation of nonviable H influenzae. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **93** : 52-56, 1984.
- Gidlöf A, Lewis DH : Do endotoxemia and sepsis impair the regulatory functions of capillary endothelial cells? *Prog Clin Biol Res* **308** : 157-162, 1989.

- 24) Worthen GS, Haslett C, Smedly LA, et al : Lung vascular injury induced by chemotactic factors : enhancement by bacterial endotoxins. *Fed Proc* **45** : 7-12, 1986.
- 25) Kuenk B, Abe K, Ushiki T, et al : Microstructures of the bony modiolus in the human cochlea. *J Electron Microsc* **40** : 193-197, 1991.

Bleeding from Cochlear Vessels Induced by Bacterial Endotoxin into the Middle Ear

Noriyuki Nakajima

Department of Otorhinolaryngology, Dokkyo Medical University, Koshigaya Hospital, Japan

It was reported that endotoxin was detected in middle ear effusions from patients of otitis media with effusion. If the bacterial endotoxin penetrates into the cochlea through the round window inner ear trouble causes, which will cause the acute hearing loss. It is important to make clear which area of cochlea the hemorrhage caused by endotoxin.

Ten guinea pigs weighing 350 g each were used in this study. A small piece of Gelform[®] containing 0.04mg of E.coli-derived endotoxin was set on the round window, 24 hours after intraperitoneal injection of 0.02mg endotoxin. 24 hours after the inoculation of endotoxin, the cochleas were infused with 2% glutaraldehyde through the round window. After decapitation, the cochleas were removed. One cochlea was decalcified in 10% EDTA for light microscopy, and the other was not decalcified for electron microscopy. They were postfixed for 40 min in 2% osmium tetroxide

and embedded in Epon 812.

Hemorrhage was observed in all turns of cochlea, and the most remarkable hemorrhage was recognized in the vicinity of collecting venules of spiral ligament of scala tympani, where the blood sludge was also observed in many vessels. Therefore, the endotoxin most strongly influenced this portion. It was observed the stria vascularis was collapsed and the red blood cells escaped to the endolymphatic space. Hemorrhage was observed in the wide area of the modiolus blood vessels. In addition, the nerves of modiolus were degenerated. It was thought the bleeding in modiolus vessels greatly affected the function of whole cochlea.

Key words : endotoxin, hemorrhage, collecting venules, modiolus, stria vasularis