

Untersuchungen zu einer möglichen Masernviruspersistenz in der Otosklerose

Hans P. Niedermeyer^a Wolfgang Arnold^a Maria Schuster^a
Kirsten Wesemeier^a Jutta Kramer^{a,b} Christa Baumann^b
Wolfgang J. Neubert^b

^aHNO-Klinik und Poliklinik, Klinikum r.d. Isar, TU München, und ^bMax-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Virusforschung Martinsried, München, Deutschland

Zusammenfassung

Morphologische und biochemische Untersuchungen von verschiedenen Autoren haben gezeigt, dass die Otosklerose eine Masernvirus-assoziierte, entzündliche Erkrankung des menschlichen Felsenbeins ist. Das Ziel unserer Untersuchungen war es, Informationen über die Auswirkungen der Masernvirusinfektion im Felsenbein auf das Immunsystem des Innenohres zu erhalten und zu überprüfen, ob sich in Präosteoblasten, die aus dem Otoskleroseherd kultiviert wurden, Masernvirusgenom befindet. Während Stapedektomien wurde neben Fussplatten und Kontrollgewebe für die Präosteoblastenkultur Perilymphe entnommen und mit Westernblot auf Antikörperexpressionsmuster hin überprüft. Aus den Präosteoblasten konnte keine Masernvirus-RNA amplifiziert werden. In der Perilymphe konnten IgG gegen Masernviren nachgewiesen werden und das Expressionsmuster wies in 2 von 10 Fällen einen Unterschied im Vergleich zum Expressionsmuster im Serum des gleichen Patienten auf. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit der Hypothese, dass in der Otosklerose eine Masernviruspersistenz vorliegt.

Key Words

Otosclerosis · Measles virus · Persistence · Perilymph

Investigations of a Possible Measles Virus Persistence in Otosclerosis

Various authors have shown with morphological and biochemical methods that otosclerosis is a measles virus-associated inflammatory disease of the temporal bone. The aim of our study was to elucidate the effect of measles virus infection within the temporal bone on the immune system of the inner ear and to search for measles

virus RNA in preosteoblasts grown from otosclerotic tissue. Footplates and control tissue were obtained during stapedectomy and perilymph was sampled by glass capillaries. No measles virus RNA was detected in the preosteoblasts. Anti-measles virus IgG could be detected in the perilymph and the band pattern in the perilymph was different compared with the serum band pattern in two cases from ten. These results are in good agreement with the hypothesis that measles virus persistence occurs in otosclerosis.

Copyright © 2000 S. Karger AG, Basel

Recherche sur la persistance possible du virus de la rougeole associée à l'otospongiose

Des auteurs différents ont démontré que l'otospongiose est une maladie inflammatoire de l'os pétreux, associée au virus de la rougeole. Le but de nos recherches consistait à obtenir des informations sur les séquelles d'une infection virale dans l'os pétreux sur le système immunologique de l'oreille interne. En outre il était recherché, si le génome du virus de la rougeole se trouve dans le préostéoblastes, qui étaient extraits des foyers de l'otospongiose. A l'occasion des stapéctomies des prélèvements de la platine, du tissu de contrôle et de la périlymphe étaient effectués pour décrire le type de l'expression des anticorps par le Western blot. Dans les préostéoblastes la RNA du virus de la rougeole n'était pas trouvée. Par contre dans la périlymphe l'IgG contre le virus de la rougeole pouvait être démontré. Le type de l'expression a démontré dans 2 de 10 cas une différence par rapport du type de l'expression dans le serum des mêmes malades. Ces résultats supportent l'hypothèse que dans l'otospongiose une persistance du virus de la rougeole existe.

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2000 S. Karger AG, Basel
1014-8221/99/0094-0087\$17.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/journals/orn

Hans Peter Niedermeyer
HNO Klinik und Poliklinik, Klinikum r.d. Isar TU München
Ismaningerstr. 22, D-81675 München
Tel. +49 89 41402390, Fax +49 89 41404952
E-Mail H.P.Niedermeyer@lrz.tu-muenchen.de

Einleitung

Die Otosklerose ist eine Erkrankung ausschliesslich des menschlichen Felsenbeins, die besonders häufig bei Kaukasiern, hingegen bei Asiaten und Schwarzen wohl eher selten auftritt. Man beobachtet sie ca. 1,4-fach häufiger bei Frauen im gebärfähigen Alter als bei Männern, und in grossen Autopsieserien ist bei histologisch gesicherter Otosklerose in 80% der Fälle ein beidseitiges Auftreten zu beobachten [1]. Über eine familiäre Inzidenz wird in der Literatur in 50% der Fälle berichtet [2]. In 10% der Autopsien werden otosklerotische Herde im Sinn einer histologischen Otosklerose beobachtet, die wegen fehlender Einbeziehung des ovalen Fensters nicht zu Schallleitungs- oder kombinierter Schwerhörigkeit geführt haben. Die Ursache der Otosklerose ist bisher noch nicht geklärt. Sicher ist, dass bei der Otosklerose alle morphologischen Kriterien einer chronischen Entzündung erfüllt sind [3]. Immunhistochemische Untersuchungen haben den Nachweis von Makrophagen, HLA-DR-positiven Zellen, beta-2-Mikroglobulin-exprimierenden Zellen und CD4- sowie CD8- positive Zellen im aktiven Otoskleroseherd erbracht. Ablagerungen von IgG und IgA sowie Komplement C3 lassen sich im Randsaum von Resorptionslakunen beobachten [4]. Unklar ist die Ursache dieses Entzündungsprozesses. Früher wurden unter anderen enzymatische Ursachen und mechanische Faktoren diskutiert [5–7]. Heute werden hauptsächlich eine immunologische, eine genetische und eine virale Hypothese verfolgt. Immunologische Untersuchungen haben den Nachweis von Antikörpern im Serum von Patienten mit Otosklerose gegen Kollagene erbracht [8–10]. In familiären Fällen wurden kürzlich Mutationen im Kollagen Gen Col 1A1 beschrieben und Tomek berichtete kürzlich über die Isolierung eines Otosklerose-Gens [11]. Auf der Suche nach einer möglichen viralen Ätiopathogenese wurden elektronenmikroskopisch Masernvirus-ähnliche Strukturen im Otoskleroseherd beschrieben [12] und die Expression von Masernvirusproteinen N und F immunhistochemisch nachgewiesen [13–16]. Biochemische Analysen von Fussplattenfragmenten aus Otoskleroseherden und Untersuchungen an Celloidin-eingebettetem otosklerotischen Gewebe haben den Nachweis von Masernvirus-RNA erbringen können [17, 18]. Der in der Otosklerose vorliegende Masernvirustyp konnte noch nicht näher charakterisiert werden, da bisher für die notwendige Sequenzierung nicht ausreichend lange RNA-Stränge isoliert werden konnten. Nicht ganz klar ist ausserdem, welche Zellen im Otoskleroseherd befallen sind.

Der Otoskleroseherd ist zumeist in unmittelbarem Kontakt mit dem Perilymphraum (Abb. 1), sodass im Falle einer Masernvirusantigenausschüttung das Immunsystem des Innenohres, das sich im Saccus Endolymphaticus befindet, stimuliert wird. Tierexperimente konnten zeigen, dass eine Antigenexposition im Innenohr zu einer

lokalen Immunreaktion führt [19, 20]. Studien beim Menschen unterstützen diese Ergebnisse. Es wurde beobachtet, dass in der Perilymphe von Patienten mit Otosklerose Antikörper gegen Masernviren vorhanden sind und der Anteil des spezifischen Masernvirus IgG am Gesamt-IgG in der Perilymphe grösser ist als im Serum [21, 22]. Gegen welche Virusantigene die IgGs gerichtet sind, ist bisher nicht untersucht worden. Es ist bekannt, dass im Fall einer persistenten Masernvirusinfektion es zu einer Veränderung der Genexpression kommen kann.

Das Ziel unserer Studie war die Bestimmung des Anti-Masernvirus-IgG-Musters in der Perilymphe, um einen Anhalt für den Masernvirustyp zu erhalten. Desweiteren haben wir überprüft, ob sich aus dem Otoskleroseherd über Zellkultur Masernvirusgenom isolieren lässt.

Material und Methoden

In unsere Untersuchungen wurden 10 Patienten mit der klinischen Diagnose Otosklerose sowie 5 Patienten mit der klinischen Diagnose M. Menière als Kontrollen eingeschlossen. Im Rahmen der Stapedektomie bei Patienten mit der klinischen Diagnose Otosklerose wurden die Fussplattenfragmente und Knochenproben von der Gehörgangswand unmittelbar nach Entnahme in DMEM (Sigma, Germany) Kulturmedium gegeben und unter Zugabe von 1% Streptomycin und Penicillin bei 37°C kultiviert. Nach 3 Wochen wurden die Zellen erstmals gesplittet und ein Teil bei -70°C asserviert. Als Kontrollen wurden Masernvirus (Edmondston strain, ATCC, USA)-infizierte und nichtinfizierte Verozellen (ATCC, USA) eingesetzt. Mit «High Pure RNA Extraction Kit» (Boehringer, Mannheim, Germany) wurde die Gesamt-RNA extrahiert und die Masernvirus-PCR, wie publiziert, durchgeführt [23].

Während der Stapedektomie bei Otosklerose und der Vestibulotomie bei Patienten mit M. Menière wurden 0,5–2 µl Perilymphe gewonnen; Serumproben wurden prä- und postoperativ abgenommen und – wie die Perilymphe – bei -20°C aufbewahrt. Routinemässig wurden Masernvirus-Serum-IgG und -IgM bestimmt. Mit einem zuvor etablierten vertikalen midwide Westernblot-System wurden die Masernvirusproteine aufgetrennt und nach dem Blotten mit 1 µl Serum und 1 µl Perilymphe in 2 ml Inkubationspuffer inkubiert (Technische Details s. Niedermeyer et al. [24]). Als Kontrollen wurden Seren von Kleinstkindern ohne stattgehabte Masern und Seren von Patienten mit akuter Masernvirusinfektion eingesetzt.

Ergebnisse

Nach 8–12 Wochen konnte man in der Zellkultur Verkalkungsherde in von den Fussplattenfragmenten und von den Gehörgangskontrollen ausgehenden Präosteoblastenkulturen beobachten (Abb. 2). Morphologisch war zwischen den beiden Ausgangsgeweben kein Unterschied auszumachen, wie z.B. einen zytopathischen Effekt mit Syncytienbildung. In allen Fällen konnte genomische RNA (Aktin) nachgewiesen werden, allerdings blieb der Nachweis von Masernvirus-RNA in allen Patientenzellen und Negativkontrollen negativ bei positivem Nachweis in den Masernvirus-infizierten Vero-Zellen.

Serologisch wiesen alle Patienten einen IgG-Durchseuchungstiter auf, während das IgM negativ war. Im Westernblot vom Serum wurden bei allen Patienten (Otosklerose und M. Menière) Banden gegen die Masernvirusproteine N, F, P, H und M beobachtet. In der Perilymphe von Patienten mit Otosklerose wurden Antikörper gegen N,

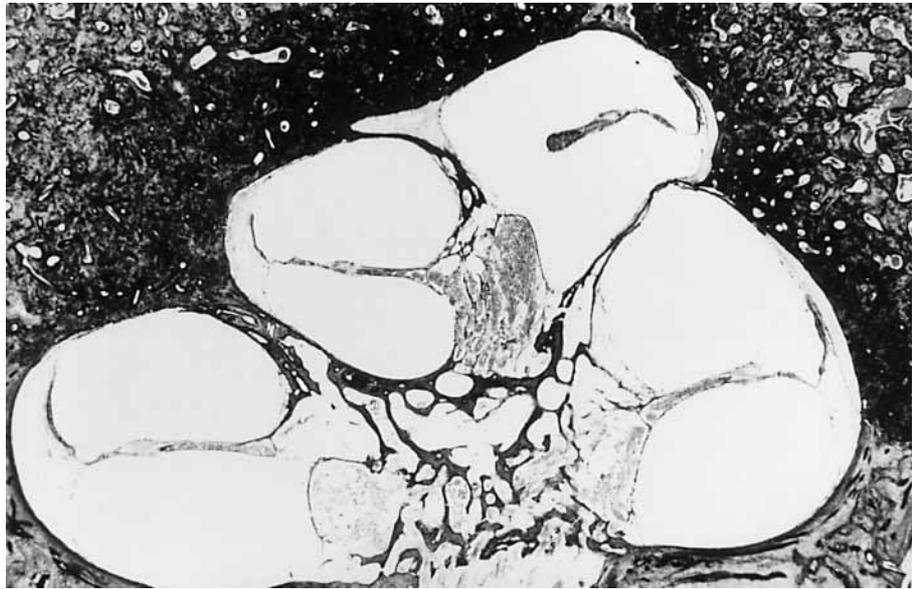


Abb. 1. Ausgedehnter Otoskleroseherd in unmittelbarem Kontakt mit dem Perilymphraum (Kapselotosklerose).

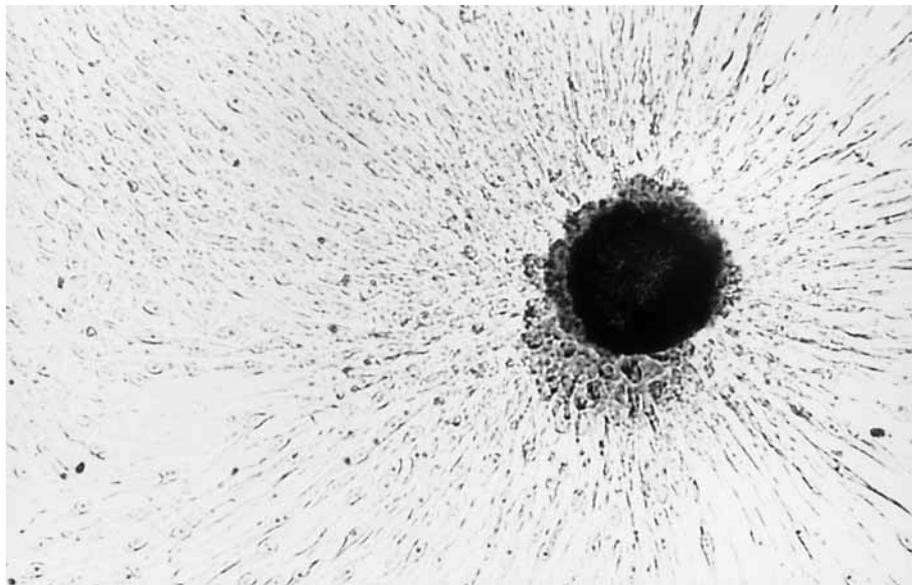


Abb. 2. Verkalkungsherd in einer aus einem Otoskleroseherd gewachsenen Primärzellkultur. Aufnahme nach 10 Wochen. Zytopathische Effekte waren nicht zu erkennen.

F und P detektiert, bei einem Patienten war zusätzlich in Höhe von M und bei einem weiteren Patienten mit Otosklerose eine H-Bande zu sehen (Abb. 3). In der Perilymphe der Patienten mit M. Menière waren auch die N-, F-, und P-Banden vorhanden, allerdings war die Bandenintensität geringer als die der Perilymphe von Patienten mit Otosklerose. Zusätzliche Banden traten nicht auf. Bei der Negativkontrolle kam es zu keiner spezifischen Reaktion, die Positivkontrolle wies alle Banden mit Ausnahme von L auf.

Diskussion

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe und um McKenna zeigten, dass in einem Grossteil der Fälle Masernvirusgenom im otosklerotischen Gewebe nachweisbar ist [17, 18]. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit elektronenmikroskopischen und immunhistochemischen

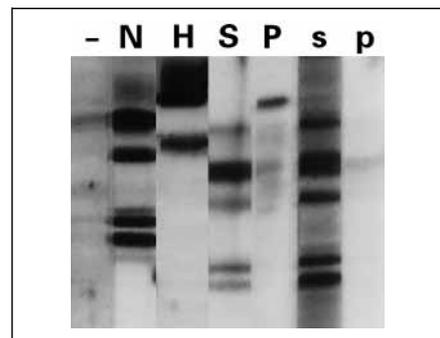


Abb. 3. Nachweis von Antimasernvirus IgG in Serum und Perilymph von Patienten mit Otosklerose im Vergleich zu M. Menière-Patienten. In der Perilymphe des Patienten mit Otosklerose (P) erkennt man in Höhe von H eine Zusatzbande. N = N-Protein, H = H-Protein, - = Negativkontrolle, S/P = Serum/Perilymphe Otosklerosepatient, s/p = Serum/Perilymphe M. Menière-Patient.

Befunden [14, 16, 25]. Mit konventionellen virologischen Methoden gelang es bisher allerdings nicht, infektiöse Masernviren aus dem otosklerotischen Gewebe zu gewinnen. Mit biochemischen Methoden, insbesondere der PCR, konnten Masernvirussequenzen in otosklerotischem Gewebe – sowohl in Frischmaterial als auch in fixiertem, Celloidin eingebetteten Material – isoliert werden. Allerdings konnten wir in diesem Versuchsansatz in Präosteoblasten, die aus dem Otoskleroseherd kultiviert wurden und deren Identität bereits zuvor gesichert wurde, keine Masernvirus RNA unter Einsatz der PCR nachweisen. Dies könnte möglicherweise auf das Fehlen eines Otoskleroseherdes im in Kultur eingesetzten Fussplattenfragment zurückzuführen sein bzw. auf das Fehlen von infizierten Zellen. Histologische Untersuchungen haben gezeigt, dass im Narbenstadium der Otosklerose die Zellzahl drastisch reduziert ist [4, 26]. Eine weitere Erklärung könnte das Vorhandensein eines persistenten Masernvirustyps sein. Präosteoblasten, die nicht masernvirusinfiziert sind, haben möglicherweise einen Wachstumsvorteil gegenüber infizierten Zellen, wie es bei Tumorzelllinien (z.B. HeLa) bekannt ist. Die Etablierung einer persistent masernvirusinfizierten Osteoblastenzelllinie dürfte zu einem besseren Verständnis der Auswirkung einer Masernvirusinfektion auf Knochenzellmetabolismus und der persistenten Masernvirusinfektion in der Otosklerose führen.

Histologische und immunhistochemische Untersuchungen zeigten in der Vergangenheit, dass das Innenohr ein eigenes Immunsystem mit Lokalisation im Saccus endolymphaticus besitzt [27, 28]. Im Tierexperiment konnte bestätigt werden, dass das Innenohr nach Antigenstimulus mit einer immunologischen, lokalen, zellulären und humoralen Antwort reagiert [19]. Im Menschen hatte unsere Arbeitsgruppe in der Vergangenheit beobachtet, dass in der Perilymphe von Otosklerosepatienten der Anteil von Masernvirus-IgG am Gesamt-IgG grösser ist als im Serum [29]. Bei M. Menière wurden für anti-Herpes simplex-Virustyp I-IgG ähnliche Beobachtungen gemacht [30]. Somit dürfte man am Vorhandensein einer lokalen Immunabwehr im Innenohr des Menschen nicht mehr zweifeln. Die aktuellen Ergebnisse zeigen im Einklang mit vorhergehenden Untersuchungen (mittels ELISA), dass sich Antikörper gegen verschiedene Masernvirusproteine in der Perilymphe nachweisen lassen. Der Nachweis von N-, P- und F-Masernvirusproteinen entspricht auch dem bei gewöhnlichen Masernvirusinfekten auftretenden 3'-5'-Expressionsgradienten. Bei persistenten Masernvirusinfektionen wie der SSPE kann eine Veränderung des Expressionsmusters mit vermehrter oder verminderter Produktion von Proteinen auftreten [31, 32]. Was letztere angeht, so ist eine exakte Quantifizierung im Westernblot nicht möglich. Eine Veränderung des Expressionsmusters trat in 2 Fällen, mit einer Bande auf Höhe von M

in einem Fall und in einer in Höhe von H im anderen, auf. Die Ursache hierfür könnten Mutationen sein, die zu veränderter Regulation der Virusgenexpression führen oder zu Mutationen in der Aminosäuresequenz, die einen veränderten Proteinabbau zur Folge haben können. Aufschluss hierüber kann letztendlich nur die Sequenzierung des Virus geben.

Der Nachweis von Antikörpern gegen N-, F-, und P-Protein in der Perilymphe bei Patienten mit M. Menière sind einerseits auf die natürliche Diffusion von Immunglobulinen über die Blut-Perilymphschranke zurückzuführen. Thalmann bestimmte hier einen Quotienten von 1:35, der für den Grossteil der Serumproteine wie z.B. auch den Immunglobulinen zutreffen soll [33]. Bei der Perilymphentnahme während Stapedektomie oder Vestibulotomie ist eine – wenn auch noch so geringe – Blutkontamination unvermeidbar. Die Perilymphproben wurden stets unmittelbar nach Entnahme niedertourig abzentrifugiert und in allen Fällen war blutiges Sediment zu erkennen. In den hier durchgeführten Untersuchungen war die Relation Sediment versus Überstand konstant. Da nach Eröffnen des Innenohres nur 0,5–2 µl Probenvolumen zur Verfügung standen, war bei den geplanten Westernblot-Untersuchungen für die Bestimmung der Kontaminationsmenge über z.B. Albumin und Gesamt-IgG nicht ausreichend Perilymphe vorhanden. Unter diesen Bedingungen waren die Perilymphbanden gegen N, P und F der Patienten mit M. Menière deutlich schwächer als die der Otosklerosepatienten. Daraus kann man folgern, dass in der Perilymphe von Otosklerosepatienten zu den physiologisch oder über Kontamination vorhandenen Antikörpern noch eine lokale Produktion hinzukommen dürfte, im Einklang mit zuvor publizierten Ergebnissen [22]. Diese Vermutung wird auch von dem Nachweis von Banden in Höhe von H und M in der Perilymphe im Vergleich zum Serum des Patienten im Westernblot unterstützt.

Im Serum von Patienten und Kontrollen waren keine wesentlichen Unterschiede im Expressionsmuster zu erkennen. Selbst wenn im Innenohr eine Immunreaktion gegen andere oder veränderte Masernvirusproteine vorhanden ist, so wird sich das bei einer lokal begrenzten chronisch verlaufenden Entzündung im Serum nicht bemerkbar machen. Die absolute Menge der Masernvirus-IgG in der Perilymphe mit einem Gesamtvolumen von 1,5 ml ist deutlich niedriger als die des übrigen Kreislaufes, sodass sich der IgG-Übertritt in das Serum serologisch nicht erfassen lässt.

Schlussfolgerung

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass auch mit sensitiven Methoden kein Masernvirusgenom in Zellkultur aus Otoskleroseherden nachweisbar ist. Dies ist aller-

dings bei persistenten Masernvirusinfektionen nicht ungewöhnlich, da die infizierten Zellen in der Primärkultur einen Wachstumsnachteil haben. Die Identität der Präosteoblasten war über die Expression von mRNAs wie Osteonectin, Osteocalcin sowie Zellverkalkungen bei weiter fortgeführter Kultur gesichert. Der Nachweis von Antikörpern in der Perilymphe hat die Ergebnisse vorhergehender Studien bestätigt. Es konnten auch in der Perilymphe von Patienten mit Otosklerose-Antikörper gegen N-,

P-, F-, in 2 von 10 Fällen auch gegen M- und H-Protein nachgewiesen werden. Diese Antikörper wurden auch bei den M. Menière-Patienten nachgewiesen, allerdings war das Signal deutlich schwächer. Unsere Ergebnisse sind im Einklang mit der Hypothese, dass in der Otosklerose eine Masernvirus-IgG-Produktion vom Innenohr ausgeht. Weitere Untersuchungen müssen die Lokalisation des Masernvirus im Otoskleroseherd aufklären sowie die Charakterisierung des Virus zum Ziel haben.

Literatur

- 1 Morrison AW, Bunday SE: The inheritance of otosclerosis. *J Laryngol Otol* 1970;84:921–932.
- 2 Morrison AW: Genetic factors in otosclerosis. *Ann R Coll Surg Engl* 1967;41:202–237.
- 3 Arnold W, Plester D: Active otosclerosis of the stapes footplate: Histological and clinical aspects of its influence on the perilymph. *Arch Otorhinolaryngol* 1977;215:159–178.
- 4 Arnold W, Friedmann I: Otosclerosis – an inflammatory disease of the otic capsule of viral aetiology? *J Laryngol Otol* 1988;102:865–871.
- 5 Chevance LG, Causse JR, Berges J: Alpha 1-antitrypsin activity of perilymph. Occurrence during progression of otospongiosis. *Arch Otolaryngol* 1976;102:363–364.
- 6 Chevance LG, Bretlau P, Jorgensen MB, Causse J: Otosclerosis. An electron microscopic and cytochemical study. *Acta Otolaryngol Suppl (Stockh)* 1970;1–44.
- 7 Chevance LG, Causse J, Jorgensen MB, Bretlau P: Otospongiosis, a cellular and enzymatic lysosomal disease. Cyto-clinical correlation. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac* 1972;89:5–34.
- 8 Lolov SR, Edrev GE, Kyurkchiev SD, Kehayov IR: Elevated autoantibodies in sera from otosclerotic patients are related to the disease duration. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1998;118:375–380.
- 9 Yoo TJ, Stuart JM, Kang AH, Townes AS, Tomoda K, Dixit S: Type II collagen autoimmunity in otosclerosis and Meniere's Disease. *Science* 1982;217:1153–1155.
- 10 Buijiq J, Burmester G: The presence of antibodies directed against specific cartilagenous collagens in patients with otosclerosis. *Acta Otorrhinolaryngol Esp* 1993;44:277–280.
- 11 Tomek MS, Brown MR, Mani SR, Ramesh A, Srisailapathy CR, Coucke P, Zbar RI, Bell AM, McGuirt WT, Fukushima K, Willems PJ, Van CG, Smith RJ: Localization of a gene for otosclerosis to chromosome 15q25-q26. *Hum Mol Genet* 1998;7:285–290.
- 12 McKenna MJ, Mills BG, Galey FR, Linthicum FJ: Filamentous structures morphologically similar to viral nucleocapsids in otosclerotic lesions in two patients. *Am J Otol* 1986;7:25–28.
- 13 McKenna MJ, Mills BG: Immunohistochemical evidence of measles virus antigens in active otosclerosis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1989;101:415–421.
- 14 Arnold W, Altermatt HJ, Kraft R, Pfaltz CR: Otosclerosis. A paramyxovirus-induced inflammatory reaction. *HNO* 1989;37:236–241.
- 15 Arnold W, Friedmann I: Detection of measles and rubella-specific antigens in the endochondral ossification zone in otosclerosis. *Laryngol Rhinol Otol (Stuttg)* 1987;66:167–171.
- 16 Arnold W, Friedmann I: Immunohistochemistry of otosclerosis. *Acta Otolaryngol Suppl (Stockh)* 1990;124–128; discussion.
- 17 Niedermeyer H, Arnold W, Neubert WJ, Höfler H: Evidence of measles virus RNA in otosclerotic tissue. *ORL* 1994;56:130–132.
- 18 McKenna MJ, Kristiansen AG, Haines J: Polymerase chain reaction amplification of a measles virus sequence from human temporal bone sections with active otosclerosis. *Am J Otol* 1996;17:827–830.
- 19 Harris JP, Ryan AF: Immunobiology of the inner ear. *Am J Otolaryngol* 1984;5:418–425.
- 20 Fukuda S, Keithley EM, Harris JP: Experimental cytomegalovirus infection: viremic spread to the inner ear. *Am J Otolaryngol* 1988;9:135–141.
- 21 Niedermeyer HP, Arnold W: Otosclerosis: A measles virus associated inflammatory disease. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1995;115:300–303.
- 22 Arnold W, Niedermeyer HP, Lehn N, Neubert W, Höfler H: Measles virus in otosclerosis and the specific immune response of the inner ear. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1996;116:705–709.
- 23 Niedermeyer HP, Arnold W, Kramer J, Schuster M, Sedlmeier R: Characterization of cells grown from human temporal bone. *ORL* 1999; submitted.
- 24 Niedermeyer HP, Sedlmeier R, Arnold W, Kramer J, Baumann Ch, Neubert WJ: Technical report: Analysis of small perilymph samples by mini-western blot and midi wide western blot system. *Laryngoscope* 1999; submitted.
- 25 McKenna MJ, Mills BG: Ultrastructural and immunohistochemical evidence of measles virus in active otosclerosis. *Acta Otolaryngol Suppl (Stockh)* 1990;130–9; discussion.
- 26 Nager GT: Histopathology of otosclerosis. *Arch Otolaryngol* 1969;89:341–363.
- 27 Altermatt HJ, Gebbers JO, Müller C, Arnold W, Laissue JA: Human endolymphatic sac: Evidence for a role in inner ear immune defence. *ORL* 1990;52:143–148.
- 28 Arnold W, Altermatt HJ, Gebbers JO, Laissue J: Secretory immunoglobulin A in the human endolymphatic sac. An immunohistochemical study. *ORL* 1984;46:286–288.
- 29 Arnold W, Niedermeyer HP, Altermatt HJ, Neubert WJ: Pathogenesis of otosclerosis. 'State of the art'. *HNO* 1996;44:121–129.
- 30 Arnold W, Niedermeyer HP: Herpes simplex virus antibodies in the perilymph of patients with Meniere disease. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;123:53–56.
- 31 ter Meulen V: Molecular and cellular aspects of measles virus persistence in the CNS. *J Neurovirology* 1997;3:3–5.
- 32 Norrby E, Kristensson K: Measles virus in the brain. *Brain Res Bull* 1997;44:213–220.
- 33 Thalmann I, Comegys TH, Liu SZ, Ito Z, Thalmann R: Protein profiles of perilymph and endolymph of the guinea pig. *Hear Res* 1992; 63:37–42.