

I. はじめに

急性中耳炎は耳鼻咽喉科領域では頻度の高い炎症性疾患であり、上気道炎が耳管を經由して波及する細菌感染症である¹⁾。そしてその病原となる細菌は肺炎球菌、インフルエンザ菌、モラクセラ・カタラーリスが多く急性中耳炎の3大起因菌といわれており、各々の検出率はおおよそ30%、20%、10%程度である¹⁾。

細菌感染症は、近年の抗生物質の発達によって容易に制御されていくかと思われた時期もあったが、耐性菌の出現などの新しい問題が生じてその取扱いはむしろ複雑化してきている。細菌感染症の基礎研究には種々の動物実験モデルが開発、使用されてきたが、急性中耳炎モデルは旧来しばしば用いられてきた敗血症モデルなどのように短期間で致命的になることが少ないため、炎症の経時的な観察に適している²⁾。

当科では1980年代初頭より急性中耳炎の局所病態に注目し、留学者5人を派遣した米国ミネソタ大学での成果も併せて研究を継続してきた。動物実験モデルとしては当科においてモルモット中耳炎モデルを開発し、ミネソタ大学では同大学中耳炎研究センターで開発されたチンチラ中耳炎モデルを用いた研究を行った。一方、動物モデルの中耳炎を惹起する細菌種としては、前述の3大起因菌である肺炎球菌、インフルエンザ菌、モラクセラ・カタラーリスを使用した。

われわれの一連の研究では、まず細菌のどのような成分が中耳において病原性を持ち、一方中耳腔内では宿主の反応で生じるどのような物質が作用することにより急性炎症が発現されるかをいくつかの中耳炎モデルを用いて解明した。そして1990年代中期からは、さまざまな感染症での関与とともに急性中耳炎や滲出性中耳炎の臨床例で注目されてきた炎症性サイトカインの作用に重点を置いて中耳炎モデルによる基礎的な解析を行った。

本稿では、当科における中耳感染症研究の流れをまとめ、前半期の成果をII、III章に、その成果を継承して著者が中心となった後半期の実験をIV

章に述べ、今後の急性中耳炎をはじめとする新しい細菌感染症治療への展望にも言及したい。

II. モルモット中耳炎モデルの開発と応用

急性中耳炎の炎症が遷延すると滲出性中耳炎へ移行するが、その病態生理については論議が重ねられてきた。当科では、その機序を解明するひとつの手がかりとして、モルモットの中耳にインフルエンザ菌から抽出したエンドトキシン (lipopolysaccharide) を注入することにより炎症が遷延することを組織学的に証明して1986年に発表した³⁾。これが当科の中耳感染症研究の始まりとなり、この実験において開発したモルモット中耳炎モデルを応用して研究を継続し、インフルエンザ菌の外膜⁴⁾や走化因子のひとつであるformyl-methionyl-leucyl-phenylalanine⁵⁾の中耳における病原性を明らかにした。さらに、同モデルを発展させて組織学的評価のみならず中耳洗浄液の生化学的分析を行う技術を開発し、モルモットにインフルエンザ菌を感染させて作成した中耳炎モデルにおいて炎症細胞、非特異的局所防御因子であるリゾチーム、活性酸素などが総合的に作用して炎症が形成される経過を観察して報告した⁶⁾⁷⁾。また、細菌感染の重要な過程のひとつである細菌の付着に注目し、インフルエンザ菌やエンドトキシンにより障害された中耳粘膜には正常粘膜に比べ細菌の付着と感染が起こりやすいことを観察した⁸⁾⁹⁾。

III. チンチラ中耳炎モデルの開発と応用

チンチラは中耳骨胞が大きく、また中耳貯留液を採取しやすい解剖学的な形態を持つ。そのため中耳炎を生化学的に観察する動物実験に適しており1970年代より中耳炎モデルとして使用されてきた²⁾。当科では1987年から1998年にかけて、チンチラ中耳炎モデルを開発した米国ミネソタ大学中耳炎研究センターに著者を含む計5人の留学者を派遣して、同モデルを用いた肺炎球菌の病原性に関する研究に携わった。その結果、肺炎球菌感染により中耳において炎症細胞が浸潤して推移

する病態¹⁰⁾、炎症発現に関与するアラキドン酸代謝産物の推移¹¹⁾、リゾチームの中耳局所での動態¹⁰⁾とその産生源¹²⁾、活性酸素の動態¹³⁾¹⁴⁾などを観察して報告した。また、髄膜炎モデルで発見された、細胞壁阻害型抗生物質であるペニシリンが細菌を破壊するとともに炎症反応を増強させる現象が中耳内でも起こることを証明した¹⁵⁾。さらに、細胞培養¹⁶⁾や上皮細胞の観察¹⁷⁾による *in vitro* の実験も行い活性酸素¹⁶⁾や細菌の付着¹⁷⁾の急性中耳炎への関与についても報告した。

IV. 2つの中耳炎モデルを用いた中耳における細菌感染症の局所病態の解析

1. モラクセラ・カタラーリスによる実験的中耳炎モデル¹⁸⁾

前述の急性中耳炎の3大起因菌のうち、モラクセラ・カタラーリスはかつて弱毒菌であり中耳炎の起因となり得るかが論議されていたこともあり、本実験を開始した当時は同菌による動物実験中耳炎モデルは存在しなかった。そこで、われわれのモルモット中耳炎モデルを応用して新しい中耳炎モデルを作成した。

モルモット中耳骨胞にモラクセラ・カタラーリス死菌を注入し6から72時間後に中耳骨胞を摘出、PBSで骨胞内を洗浄した洗浄液を生化学的に分析した。炎症細胞数は6から72時間、リゾチームとミエロペルオキシダーゼ(MPO)濃度は48, 72時間で死菌注入耳において有意に上昇していた。

この実験では、炎症細胞、リゾチーム、活性酸素代謝系に重要な酵素であるMPOが注入耳で上昇していた。すなわち、中耳局所で細菌感染による炎症が形成される過程では炎症細胞、非特異的防御因子、活性酸素が関与していた。

2. ペニシリン投与時期による急性中耳炎の局所病態の変化¹⁹⁾

ペニシリンは細菌感染症の治療には基本的な抗生物質であるが、細胞壁阻害抗生物質であるため菌体が破壊され細菌の構成成分が放出されて炎症反応が一時増強する¹³⁾。しかしその現象には感

染後早期のデータしかなかったため、感染後期との反応の違いを検討した。

肺炎球菌3型の生菌をチンチラの中耳骨胞に注入、発育させて、少量の生菌注入12時間後にペニシリンを投与した早期治療群と多量の生菌注入24時間後に投与した後期治療群の炎症反応の経過を比較検討した。その結果、早期治療群では対照群に比べ有意な炎症細胞数の増加がみられたが、後期治療群ではみられなかった(図1)。

この実験では、ペニシリン早期治療により炎症反応の増強が観察された。後期治療で炎症反応増強がみられなかったのは既に中耳腔内で過剰に発育した細菌が自己融解を起こしているため有意差がなかったと推察され、抗炎症治療は感染後早期に行う方が有用であると考えられた。

3. 肺炎球菌の細胞壁、pneumolysinの中耳における病原性²⁰⁾²¹⁾

肺炎球菌の病原性の本態は莢膜の polysaccharide、細胞壁の peptideglycan と teichoic acid、細胞内成分の外毒素 pneumolysin や autolysin が考えられており、特に細胞壁と pneumolysin は重要と認識されていた。そこで、ペニシリンが菌体成分を放出して炎症反応を増強させる現象を応用し、細胞壁と pneumolysin のどちらが炎症惹起に重要であるかを検討した。

肺炎球菌3型の wild type (WT)、外毒素 pneumolysin を欠損する変異株 (P-1)、自己融解酵素 autolysin を欠損する変異株 (A-1) をチンチラ中耳に注入し12時間後にペニシリン投与をした治療群と非治療群の炎症反応の経過を比較検討した。その結果、ペニシリン投与による炎症細胞数の有意な増加は WT と P-1 でみられたが A-1 ではみられなかった(図2)。

この実験で WT に加え P-1 でもペニシリン投与による炎症増悪がみられたことで、pneumolysin よりも細胞壁が病原性の主体であることが示唆された。

4. 急性中耳炎とサイトカイン：肺炎球菌/チンチラ中耳炎モデル²²⁾

急性中耳炎への関与が臨床例において注目されてきた炎症性サイトカインにつき前述の肺炎球菌

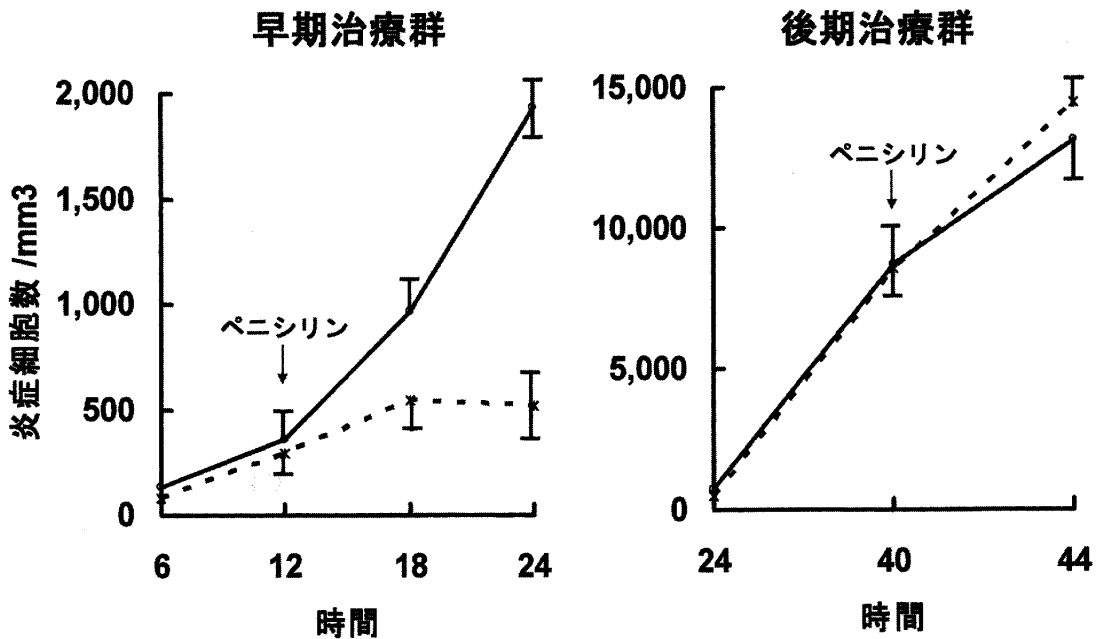


図1 (文献19)より改変: ペニシリン投与時期による局所反応増強の有無.
 実線: ペニシリン治療群, 点線: 対照群.
 左の早期治療群でペニシリン投与後に炎症細胞数の増加を認める.

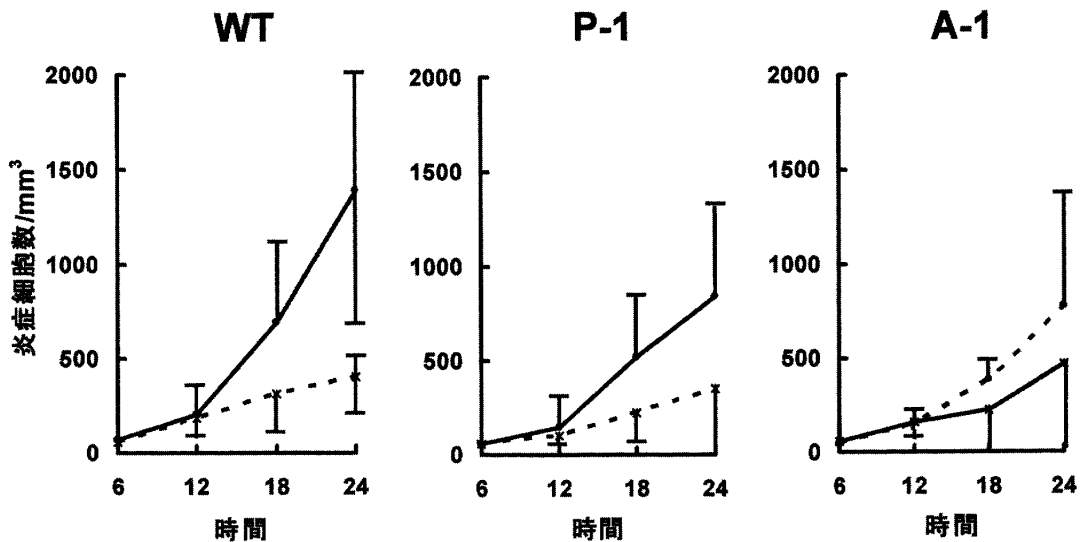


図2 (文献20)より改変: 肺炎球菌3型 wild type (WT3 ; 左), pneumolysin 欠損変異株 (P-1 ; 中), autolysin 欠損変異株 (A-1 ; 右) のペニシリン投与に対する反応.
 実線: ペニシリン治療群, 点線: 対照群.
 左のWT3, 中のP-1でペニシリン投与後に炎症細胞数の増加を認める.

によるチンチラ中耳炎モデルを応用して観察した.

肺炎球菌3型の生菌をチンチラの中耳骨胞に注入し, 注入後1時間から7日後に中耳貯留液を採

取して炎症細胞数, 炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α) の濃度を測定してその経時的变化を観察した. 炎症細胞数は注入後緩やかに増加した後, 24から48時間にかけて急激に増

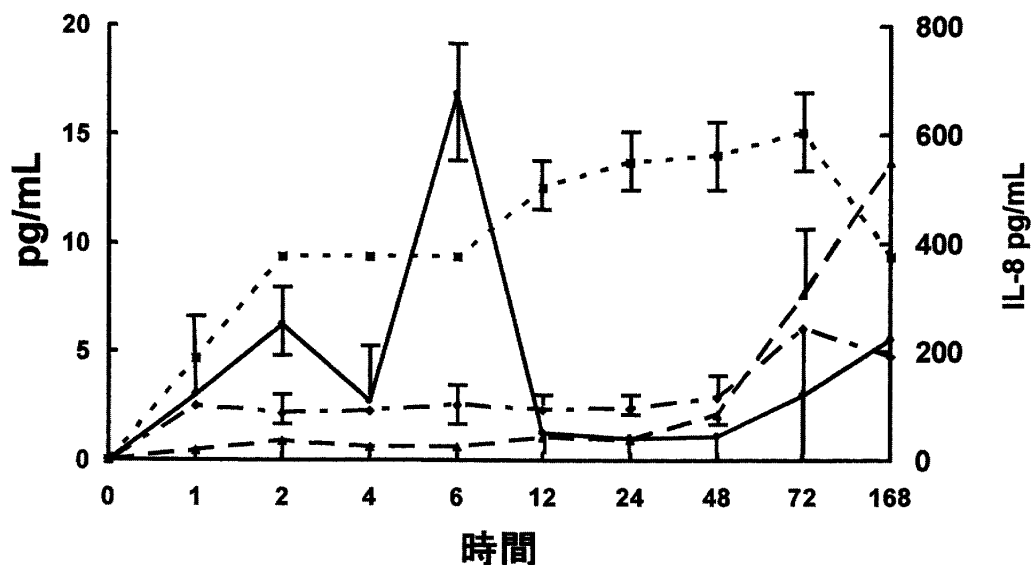


図3 (文献22)より改変)：肺炎球菌/チンチラ中耳炎モデルでのサイトカイン濃度。

実線：IL-1 β ，破線：IL-6，点線：IL-8，一点破線：TNF- α 。
IL- β は細菌注入後6時間，IL-8とTNF- α は72時間でピークがみられ，IL-6は注入1週間後も増加傾向にある。

加し72時間まで持続した。サイトカイン濃度では，IL-1 β は注入後6時間の早期に高いピークを示した。IL-6は実験中上昇傾向を示し続け，7日後も上昇傾向にあった。IL-8とTNF- α は注入後72時間でピークがみられた(図3)。また，各々のサイトカイン濃度と炎症細胞数の相関を検討したところ，IL-6，IL-8，TNF- α では有意な相関がみられたもののIL-1 β ではみられなかった。

この実験のサイトカイン濃度の推移から，各々のサイトカインの作用点はIL-1 β が生菌注入後6時間の早期に，IL-8およびTNF- α は3日後に，IL-6は7日以降の後期にあると考えられた。また，IL-1 β 濃度のみ炎症細胞数と相関しなかったことより，IL-1 β の産生源は炎症細胞ではなく中耳局所の粘膜上皮と推察された。一方他の3種のサイトカイン濃度は炎症細胞数と相関し，局所に浸潤した炎症細胞由来と考えられた。

5. 急性中耳炎とサイトカイン：インフルエンザ菌/モルモット中耳炎モデル²³⁾²⁴⁾

さらにわれわれの開発したもう一つのモデルであるインフルエンザ菌によるモルモット中耳炎モ

デルでの炎症性サイトカインの中耳における動態を観察した。

モルモット中耳骨胞にインフルエンザ菌死菌を注入し，6から96時間後に中耳骨胞を摘出し洗浄液中の炎症細胞数，IL-1 β ，IL-6，IL-8，TNF- α の濃度を測定した。炎症細胞数は注入後48時間をピークに増加し，全ての時点で対照耳に比べ有意に上昇していた。サイトカイン濃度は，IL-1 β は注入後24時間でピークを示したが対照耳との有意差はなかった(図4A)。IL-6は使用したELISAキットでの検出率が低く一定の傾向は見出せなかった。IL-8は注入後48，96時間で有意に上昇した(図4B)。TNF- α はまず注入後6時間で高値を示した後低下，再び上昇して48，96時間で有意に高値であった(図4C)。炎症細胞数とサイトカイン濃度の間ではIL-8とTNF- α に有意な相関がみられた。

この実験においては前半にIL-1 β とTNF- α が働き，後半に有意差をもってIL-8とTNF- α が作用したと考えられた。また，炎症細胞数とはIL-8とTNF- α の濃度が有意に相関したことから，IL-8とTNF- α の産生源は中耳腔内に浸潤

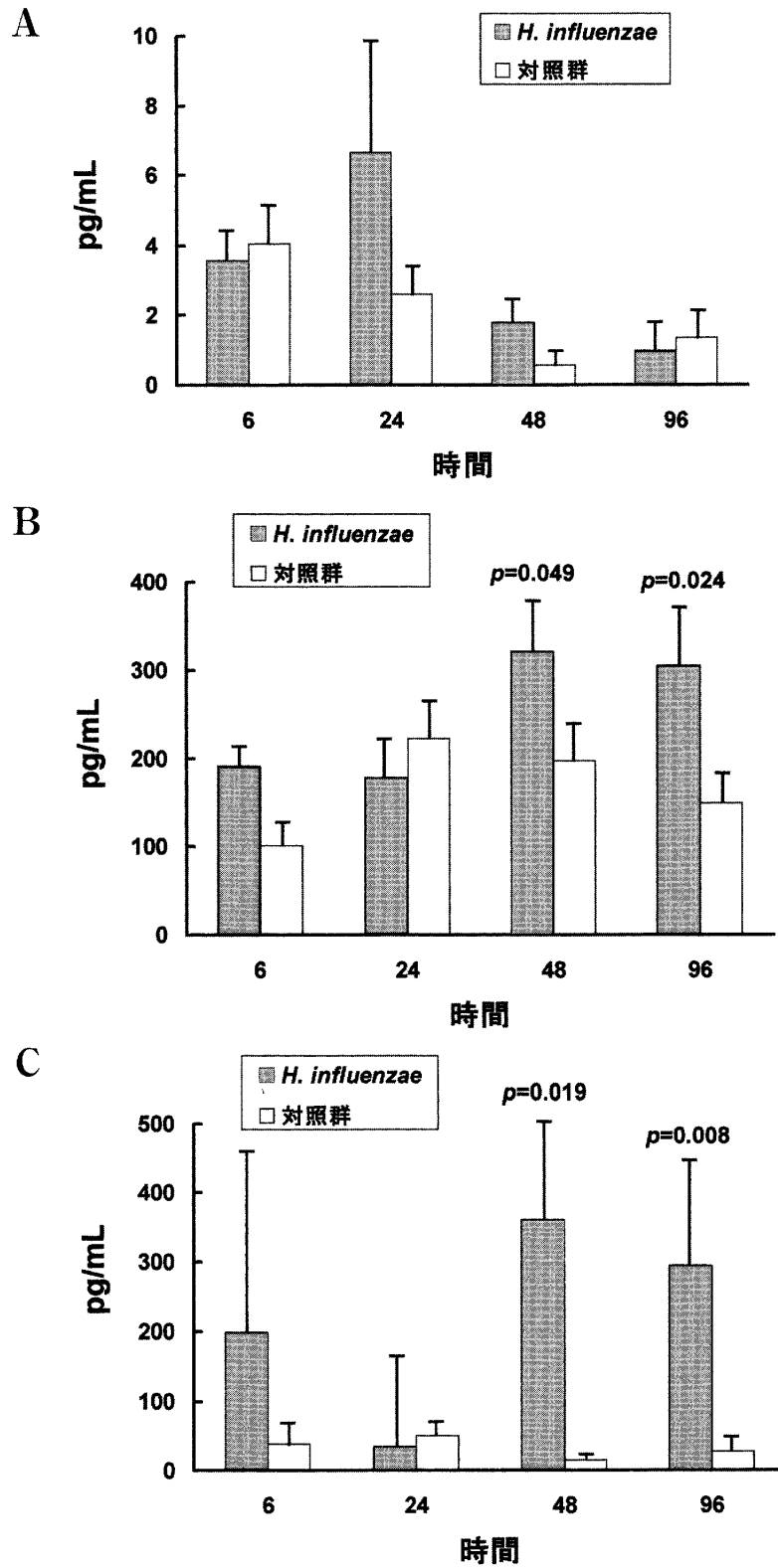


図4 (文献24) より改変) : インフルエンザ菌/モルモット中耳炎モデルでのサイトカイン濃度.

A : IL-1 β は死菌注入24時間後にピークを認める.

B : IL-8は48, 96時間後で有意に上昇している.

C : TNF- α はまず6時間後に一度上昇し, その後48, 96時間後で有意に上昇している.

した炎症細胞であり、相関のない IL-1 β と IL-6 は局所の粘膜上皮由来であることが推察された。

以上 4. 5. の結果は実験系が異なるため一概にまとめることはできないが、両実験を総合して推察すると、急性中耳炎におけるサイトカインの作用時期としては IL-1 β は感染直後、IL-6 と IL-8 は感染後数日から 1 週間、TNF- α は前半と後半の 2 峰性の作用点があると推察された。そして、急性中耳炎において中耳腔内で作用するサイトカインの産生源は、IL-1 β は粘膜上皮、IL-8 は浸潤した炎症細胞、IL-6 と TNF- α はそれら両者と考えられた。さらに両実験で急性中耳炎へのサイトカインの関与が明らかにされたことにより、細菌感染症の遷延化の予防には抗サイトカイン抗体や可溶性サイトカインレセプターなどの抗サイトカイン治療が有用であることが示唆された。そして、抗サイトカイン治療の適用時期としては、IL-1 β は感染直後、IL-6 および IL-8 は感染後数日から 1 週間にかけて、TNF- α は感染直後と数日後の両者が適切であると考えられた。

V. ま と め

以上、当科で行ってきた中耳細菌感染症研究につき概説したが、医学における基礎研究の目標は治療への臨床応用である。この一連の成果から治療への示唆として、まず細菌の病原性に対する新しい対応法としては、菌体を破壊せず細菌の病原成分を放出しない抗菌治療や放出された病原成分に対するワクチン療法などが考えられる。一方、宿主の反応に対する対応法としては、炎症細胞、非特異的防御因子、活性酸素、サイトカインなどの作用の制御があげられる。さらに炎症性サイトカインに注目した観点から、抗サイトカイン抗体投与、可溶性サイトカインレセプター投与、遺伝子治療などの抗サイトカイン治療が今後期待される細菌感染症の治療法のひとつであろうと推察される。

本原稿の内容は第 596 回新潟医学会特別講演にて発表した。

文 献

- 1) 佐藤克郎, 野々村直文, 高橋 姿: 急性中耳炎. 日本臨床 別冊「感染症症候群」Ⅲ巻: 275-278, 1999.
- 2) Giebink GS: Otitis media: The chinchilla model. Microbial. Drug resistance 5: 57-72, 1999.
- 3) Nonomura N, Nakano Y, Satoh Y, Fujioka O, Nijima H and Fujita M: Otitis media with effusion following inoculation of *Haemophilus influenzae* type b endotoxin. Arch Otorhinolaryngol 243: 31-35, 1986.
- 4) Nonomura N, Nakano Y, Fujioka O, Nijima H, Kawana M and Fujita M: Experimentally induced otitis media with effusion following inoculation with the outer cell wall of nontypable *Haemophilus influenzae*. Arch Otorhinolaryngol 244: 253-257, 1987.
- 5) Nonomura N: Otitis media induced by inoculation of a chemotactic factor. Auris Nasus Larynx 18: 323-329, 1991.
- 6) Kawana M, Nonomura N, Fujioka O and Nakano Y: Early inflammatory changes of the middle ear in *Haemophilus influenzae*-induced experimental otitis media. Recent Advances in Otitis Media 591-594, 1994.
- 7) Kawana M: Early inflammatory changes of the *Haemophilus influenzae* induced experimental otitis media. Auris Nasus Larynx 22: 80-85, 1995.
- 8) Hando S, Nonomura N, Nijima H, Fujioka O and Nakano Y: Adherence of *Haemophilus influenzae* to middle ear mucosa injured by killed *H. influenzae*. Auris Nasus Larynx 19: 69-74, 1992.
- 9) Hando S, Nakano Y, Nonomura N, Nijima H and Fujioka O: Adherence of *Haemophilus influenzae* to middle ear mucosa injured by endotoxin. Recent Advances in Otitis Media 355-357, 1993.
- 10) Nonomura N, Giebink GS, Juhn SK, Harada T and Aeppli D: Pathophysiology of *Streptococcus pneumoniae* otitis media: kinetics of the middle ear biochemical and cytologic host responses.

- Ann Otol Rhinol Laryngol 100: 236 - 243, 1991.
- 11) Nonomura N, Giebink GS, Zelterman D, Harada T and Juhn SK: Early biochemical events in pneumococcal otitis media: arachidonic acid metabolites in middle ear fluid. Ann Otol Rhinol Laryngol 100: 385 - 388, 1991.
 - 12) Nonomura N, Giebink GS, Zelterman D, Harada T and Juhn SK: Middle ear fluid lysozyme source in experimental pneumococcal otitis media. Ann Otol Rhinol Laryngol 100: 593 - 596, 1991.
 - 13) Kawana M, Kawana C, Yokoo T, Quie PG and Giebink GS: Oxidative metabolic products released from polymorphonuclear leukocytes in middle ear fluid during experimental pneumococcal otitis media. Infect Immun 59: 4084 - 4088, 1991.
 - 14) Kawana M, Yokoo T, Kawana C, Juhn SK, Quie PG and Giebink GS: Polymorphonuclear leukocytes contribute inflammatory metabolic products in the middle ear during experimental otitis media. Recent Advances in Otitis Media: 202 - 204, 1993.
 - 15) Kawana M, Kawana C and Giebink GS: Penicillin treatment accelerates middle ear inflammation in experimental pneumococcal otitis media. Infect Immun 60: 1908 - 1912, 1992.
 - 16) Kawana M, Kawana C, Amesara R, Juhn SK and Giebink GS: Neutrophil oxygen metabolite inhibition of cultured chinchilla. Ann Otol Rhinol Laryngol 103: 812 - 816, 1994.
 - 17) Hando S and Giebink GS: Adherence of different *Streptococcus pneumoniae* serotypes to chinchilla middle ear and tracheal epithelial cells. Recent Advances in Otitis Media 613 - 618, 1994.
 - 18) Sato K: Experimental otitis media model induced by nonviable *Moraxella catarrhalis* in the guinea pig model. Auris Nasus Larynx 24: 233 - 238, 1997.
 - 19) Sato K, Quartey MK, Liebeler CL and Giebink GS: Timing of penicillin treatment influences the course of *Streptococcus pneumoniae* - induced middle ear inflammation. Antimicrob Agents Chemother 39: 1896 - 1898, 1995.
 - 20) Sato K, Quartey MK, Liebeler CL, Le CT and Giebink GS: Roles of autolysin and pneumolysin in middle ear inflammation caused by a type 3 *Streptococcus pneumoniae* in the chinchilla otitis media model. Infect Immun 64: 1140 - 1145, 1996.
 - 21) Sato K, Quartey MK, Liebeler CL, Le CT and Giebink GS: *Streptococcus pneumoniae* cell wall products not pneumolysin contribute to middle ear inflammation. Recent Advances in Otitis Media 486 - 489, 1997.
 - 22) Sato K, Liebeler CL, Quartey MK and Giebink GS: Middle ear fluid cytokine and inflammatory cell kinetics in the chinchilla otitis media model. Infect Immun 67: 1943 - 1946, 1999.
 - 23) Sato K, Kawana M, Nonomura N and Nakano Y: Course of inflammatory cytokines in the guinea pig otitis media model induced by nonviable *Haemophilus influenzae*. Otitis Media Today. 191 - 194, 1999.
 - 24) Sato K, Kawana M, Nonomura N and Nakano Y: Course of IL-1 β , IL-6, IL-8, and TNF- α in the middle ear fluid of the guinea pig otitis media model induced by nonviable *Haemophilus influenzae*. Ann Otol Rhinol Laryngol 108: 559 - 563, 1999.
-