

## ROLE OF PHAGOCYTES IN ANTIMICROBIAL DEFENSE OF THE MIDDLE EAR

Hideyuki Kawauchi Noritsugu Kaneda Goro Mogi

Department of Otolaryngology, Medical college of Oita

### Abstract

The role of phagocytes in antimicrobial defence of the middle ear was examined in this experiment, using Hartley-strain guinea pigs with an experimental otitis media. Otitis media was induced with an instillation of *Streptococcus pneumoniae* (Sp)

(Biotype III) into the tympanic cavity through a ear drum with three different numbers ( $10^2, 10^4, 10^6$ ,). The guinea pigs were pretreated with an irradiation with different doses (250rad, 500rad) on 3 days before Sp instillation into middle ears, for the depletion of peripheral blood phagocytes, i.e. neutrophils and monocytes. Carageenan was administered intraperitoneally with a dose of 200mg/kg for blocking the phagocytic function of macrophages at 24 hours before Sp instillation. In order to evaluate severity of otitis media, ear drums were observed daily with an otoscope and the animals were killed on 7 days post Sp instillation for the macroscopic finding of middle ear mucosa and histologic analysis. The number of viable bacteria in middle ear on 7 days post Sp instillation was examined with a culture of bulla washing

solution. In the non-treated guinea pigs (controls), otitis media was seen in 8 out of 8 animals with  $10^6$  Sp instillation, 4 out of 8 with  $10^4$  Sp instillation, and 1 out of 8 with  $10^2$  Sp instillation. on the other hand, in 250 rad-irradiated guinea pigs, otitis media was seen in all animals (N=8) with  $10^4$  Sp instillation, and 6 out of 8 animals with  $10^2$  Sp instillation. In 500 rad-irradiated guinea pigs, otitis media was seen in all animals even with  $10^2$  Sp instillation. Bacteriological examination revealed that the numbers of viable bacteria present in middle ear of 250 and 500 rad-irradiated animals on 7 days post Sp instillation are much higher than those of control animals. However, no significant difference in occurrence of otitis media and number of viable bacteria recovered from bulla washings was seen between carageenan-treated and control animals.

These results herein suggest that phagocytes, particularly neutrophils are essential for the antimicrobial defence of middle ear when Sp infection take place for the first time in the host.

## 中耳感染における食細胞機能の役割

川内 秀之、金田 規嗣、茂木 五郎

大分医科大学耳鼻咽喉科学教室

はじめに

生体での細菌の侵入増殖に対して、非特異的防御機構としての好中球やマクロファージによる細菌の貪食、殺菌が行われていることは周知の通りであり、これらの食細胞の機能不全が中耳においても易感染性をもたらすことが知られている(1,2)。

中耳細菌感染における食細胞の役割を評価するため、肺炎球菌バイオタイプⅢを用いた中耳初感染モデルにおいて、放射線照射およびカラギーナン投与による食細胞機能低下の影響を検討したので報告する。

方 法

体重250-300gのHartley系白色モルモットを実験に用いた。放射線照射は、gammashell 40 ( $^{137}\text{Cs}$ ) を使ってガンマ線照射で行い、モルモットを2群に分け、各々250radと500radを単独照射した。カラギーナンは体重あたり200mg/kgを生理食塩水に溶解し2mlで腹腔内投与した。好中球活性酸素産生能の測定はBass(3)らの方法に従って行い、フローサイトメトリーで好中球を分画しその蛍光強度を測定し活性酸素産生能とした。肺炎球菌の鼓室内注入は、以下の如く行った。凍結保存していた肺炎球菌を融解し、ヒツジ血液寒天培地で12時間増殖させた後、燐酸緩衝化生食水(PBS)で $10^2$ 個/100 $\mu\text{l}$ ,  $10^4$ 個/100 $\mu\text{l}$ ,  $10^6$ 個/100 $\mu\text{l}$ に調整した。

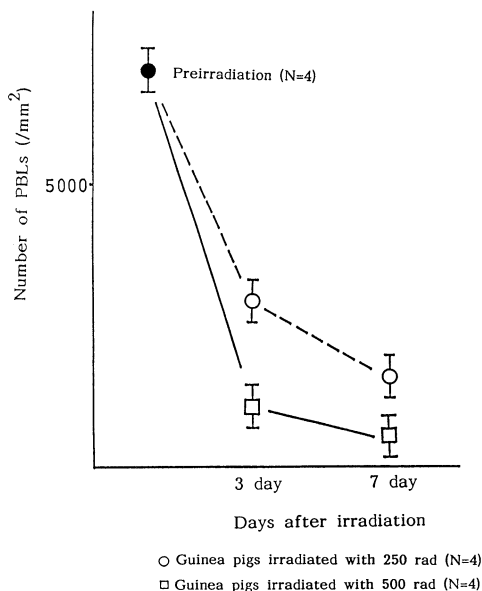
各菌量に調整した100 $\mu\text{l}$ のPBSを、照射後3日目あるいはカラゲニン投与24時間後の左鼓室内に経鼓膜的に27ゲージの注射針を用いて注入した。肺炎球菌鼓室内注入後、経日的にモルモットの鼓膜所見を観察し、1週間後に200 $\mu\text{l}$ のRPMI-1640培液で鼓室内を洗浄、同液を回収して、鼓室内細菌数の検討を行った。細菌数の検討は、回収した鼓室内洗浄液をPBSで段階希釈し(原液、 $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ )、各々の希釈液50 $\mu\text{l}$ を培地にまき12時間後のコロニー数を算定した。中耳粘膜

の組織学的検索も同時に行った。

結 果

末梢血白血球数に及ぼす放射線照射の影響をみると、250radおよび500rad照射いずれでも照射後3日目で低下し、7日目では更に減少した(Figure 1)。

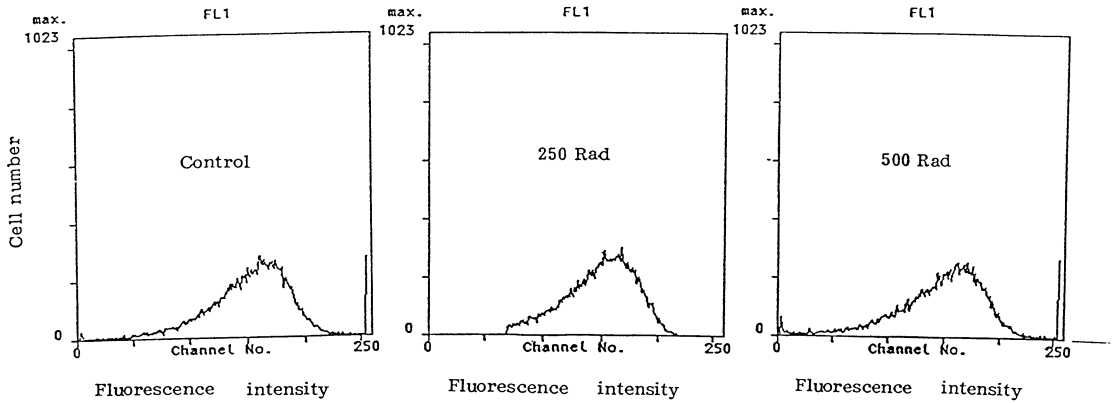
Figure 1. Kinetics of Peripheral Blood Leukocytes After Irradiation



しかし、白血球分画では、照射群と非照射群の間に差がなかった。また、好中球の活性酸素産生能すなわち殺菌能でも差はなかった(Figure 2)。

中耳炎成立の有無は、鼓室内細菌注入後1週間目の鼓膜所見、中耳貯溜液の有無、および組織所見より判定した。放射線照射の影響について先ず述べると、 $10^6$ 個の肺炎球菌鼓室内注入では、非照射群でも中耳炎は全例(N=8)に惹起されたが、 $10^4$ 個注入では8例中4例、 $10^2$ 個注入例では8例中1例にしか中耳炎が惹起されなかった。一方、250rad照射群では、 $10^4$ 個注入で全例に、 $10^2$ 個注入で8例中6例に中耳炎が見られた。500rad照射群では、 $10^4$ 個注入、 $10^2$ 個注入いずれでも

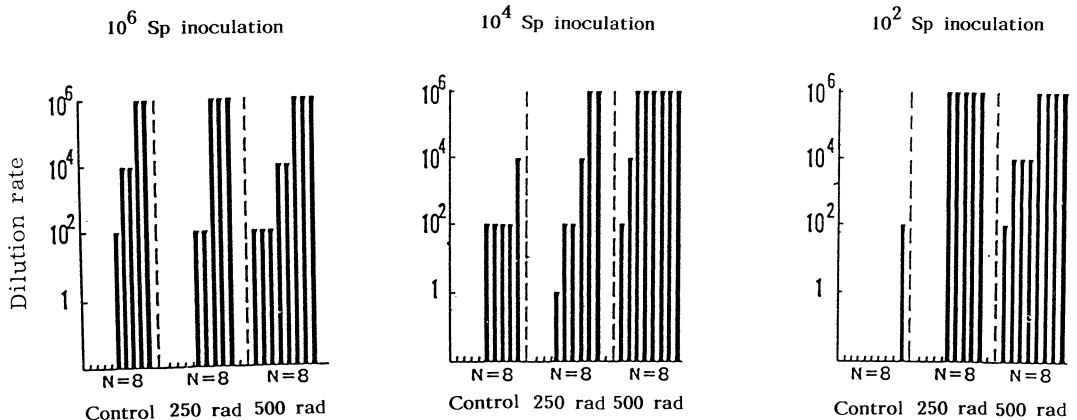
Figure 2. Flow cytometric analyses of oxidative product formation by neutrophils



全例 (N=8) に中耳炎が見られた。カラギーナン投与モルモットでは、 $10^6$ 個の肺炎球菌鼓室内注入で全例 (N=8) に中耳炎が惹起され、 $10^4$ 個注入で8例中5例、 $10^2$ 個注入で8例中1例に中耳炎が見られた。しかし、同一条件で行った対照群でも、 $10^6$ 個注入で全例 (N=8) に、 $10^4$ 個注入で8例中4例、 $10^2$ 個注入で8例中1例に中耳炎が惹起され、カラギーナン投与群と対照群との間に有意差はなかった。

放射線照射モルモットにおける鼓室内洗浄液希釈列の細菌培養の結果は図3に示した。放射線照射群では $10^6$ 個、 $10^4$ 個いずれの鼓室内注入でも、非照射群に比べ、照射線量が増すにつれ鼓室内から細菌が検出される頻度が高くなり細菌数も増加した (Figure 3)。カラギーナン投与群の間では、鼓室内細菌の検出頻度および細菌数に統計学的な有意差は認められなかった。

Figure 3. Recovery of *S. pneumoniae* from bulla washing solution



## 考 察

今回の実験結果から、放射線照射モルモットでは照射量が増加するにつれ肺炎球菌の少量 ( $10^2$ 個および $10^4$ 個) 鼓室内注入例でも中耳炎の発症例が多くなり、1週間後の細菌培養でも陽性例が多くなって鼓室内生菌数も増加していることが示された。放射線照射により末梢白血球数が減少し、好中球や単球の機能が低下することが知られており (4, 5)、マウスにおけるブドウ球菌皮内接種による感染実験や、(6)、溶連菌や少量の緑膿菌筋肉内接種による感染実験において放射線照射が細菌感染を助長させることが報告されている (7, 8)。肺炎球菌など多糖体夾膜を有する菌は、一般に食細胞による貪食に抵抗するといわれ、感染抵抗性の発現のためにオプソニン抗体が必要である (9)。Giebinkら (10) は、肺炎球菌 (7F型) を用いた中耳感染実験モデルで、既感染のある血清抗体陽性例では中耳炎の発生率が有意に低下したと報告している。しかし、抗体のない初感染においても、菌体成分により第二経路を介して活性化されたC3bがオプソニンとして働き、C3bレセプターを有する好中球やマクロファージの細菌への付着に有効なリガンドとなって、貪食が容易になることも知られている (11)。Lewis (12) はチンチラを用いて肺炎球菌による中耳感染実験を行い、 $10^4$ 個以下の鼓室内注入では中耳炎が見られなかったとしている。この結果は、夾膜を有す肺炎球菌であっても $10^4$ 個以下の少量であればオプソニン抗体の非存在下でも食細胞の働きで中耳腔から完全に排除されることを意味するものと考えられる。今回の実験で、250radさらに500radの放射線照射を行ったモルモットでは、 $10^4$ 個あるいは $10^2$ 個の鼓室内細菌注入でも中耳炎発症例が多くなり、鼓室内生菌数も増加していたが、この結果は放射線照射により食細胞である好中球やマクロファージが減少したため

と考えられる。一方、カラギーナンを投与された動物では、フリーマクロファージである血中の単球のみならず組織に分布する固定マクロファージの非特異的貪食能が障害されることが知られている (13)。今回の実験で、マクロファージの貪食能をブロックしたカラギーナン投与群において、対照群に比べ感染抵抗性の減弱は見られなかった。従来、細胞外寄生性の細菌に対してはマウスなどの実験成績から主として好中球が貪食細胞として働き、非特異的あるいは特異的感染防御に関与していると言われていた (14)、今回の実験結果も好中球の重要性を示している。

以上の結果をまとめると、肺炎球菌の初感染による中耳炎において、非特異的防御機構としての食細胞ことに好中球による貪食および殺菌作用が重要であることを示唆された。

## 参 考 文 献

1. Hill Hr, Book LS, Hemming VG et al : Defective neutrophil chemotactic responses in patients with recurrent episodes of otitis media and chronic diarrhea. *Am J Dis Child* 131 : 433-436, 1977.
2. Giebink GS, Mills EL, Huff JS et al : Polymorphonuclear leukocyte dysfunction in children with recurrent otitis media. *J Pediatr* 94 : 13-18, 1979.
3. Bass DA, Parase JW, Dechatelet LR, et al : Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils ; A graded response to membrane stimulation. *J Immunol* 130 : 1910-1917, 1983.
4. Townsend WA, Campbell B : The effects of Roentgen Rays on the Inflammatory Cells of the Mouse and Rabbit. *Blood* 4 : 1346-1350, 1949.
5. Tsuru S, Nomoto K, Mitsuyama M, et al : Importance of polymorphonuclear leukocytes in protection of mice against

- Escherichia coli. J Gen Microbiol 122 : 335-338, 1981.
6. Tsuda S, Sasai Y, Minami D et al : contribution of T-cell mediated immunity to the resistance to staphylococcal infection. J Invest Dermatol 70 : 345-347, 1978.
  7. Kaplan HS, Speck RS, Jawetz E : Impairment of antimicrobial defences following total body irradiation of mice. J Lab Clin Med 40 : 682-691, 1952.
  8. Tatsukawa K, Mitsuyama M, Takeya K et al : Differing contribution of polymorphonuclear cells and macrophages to protection of mice against Listeria monocytogenes and Pseudomonas aeruginosa. J Gen Microbiol 115 : 161-166, 1979.
  9. Fukutome T, Mitsuyama M, Takeya K et al : Effect of antiserum on the contribution of polymorphonuclear cells and macrophages to the protection against Klebsiella pneumoniae. J Gen Microbiol 119 : 225-229, 1980.
  10. Giebink GS, Berzins IK, Quie PG : Animal models for studying Pneumococcal otitis media and Pneumococcal vaccine efficacy. Ann Otol Rhinol Laryngol 89 (suppl 68) : 339-343, 1980
  11. Horwitz MA : The roles of the Fc and C3 receptors in the phagocytosis and killing of bacteria by human phagocytes. J Reticuloendothel Soc Suppl 28 : 17-21, 1980.
  12. Lewis DM, Schram JL, Maedema SJ et al : Experimental otitis media in chinchilla. Ann Otol Rhinol Laryngol 89 (suppl 68) 344-350, 1980.
  13. Takeya K, Mitsuyama M : Self-defense mechanisms. Role of macrophages (ed. d y Mizuno D, Cohn ZA, Takeya K, & Ishida N), Tokyo, University of Tokyo Press, 1982, pp. 253.