

QUANTITATIVE ANALYSIS  
OF CHINCHILLA EUSTACHIAN TUBE MUCOSA  
AFTER INTRATYMPANIC INOCULATION  
OF INFLUENZA A VIRUS

Yoshihiro Ohashi, Yoshiaki Nakai, Yusuke Esaki,  
Hiroyuki Furuya, Yoshiharu Ohno, Yoshikazu Sugiura

Department of Otolaryngology, Osaka City University Medical School

Ultrastructural Study of the Eustachian Tube Mucosa following Intratympanic Influenza A virus Inoculation

Abstract

Epidemiologic studies have suggested a close relationship between respiratory viral infection and otitis media. Recent experimental investigations have demonstrated that respiratory viral infection contributes to the pathogenesis of otitis media. However, the mechanism by which viral infection enhances bacterial otitis media is not well understood. In order to elucidate the role the respiratory viruses play in the pathogenesis of otitis media, we have investigated the ultrastructural pathologies of the tubotympanic mucosa in chinchillas following

influenza A virus inoculation of the bullae. In addition to the general inflammatory cell infiltration of the epithelial mucosa, the most dramatic pathology was the degeneration of the mucociliary system, which included pathological cilia, loss of cilia, an abnormal mucus blanket, and a decreased number or loss of ciliated cells. Such pathological conditions should result in impaired tubotympanic protection and clearance. Regeneration of the mucociliary system was observed as early as 3 days post-inoculation, but peaked around 21 days post-inoculation. It took 28 days or longer to recover fully. In some cases, the mucociliary epithelium never regenerated.

インフルエンザウイルスの鼓室内注入後の  
チンチラ耳管粘膜病態の定量的観察

○大橋 淑宏、中井 義明、江崎 裕介  
古谷 博之、大野 義春、杉浦 欣一

大阪市立大学医学部耳鼻咽喉科学教室

David J. Lim (Ohio State University)

## 緒 言

滲出性中耳炎の原因には多くの因子が挙げられている。かつては耳管狭窄やアレルギーが主たる原因と考えられていたが、最近では中耳・耳管における感染が主たる原因とみなされている。ウイルスもまた中耳・耳管に感染しうることや疫学的にも上気道のウイルス感染が高頻度で滲出性中耳炎に先行することより、ウイルスもまた滲出性中耳炎の引き金となりうる可能性が示唆される。

しかし、ウイルス感染が中耳・耳管の粘膜にどのような影響を及ぼすかについての研究成績は乏しいのが現状である。

そこで、本研究においては実験動物にインフルエンザAウイルスを鼓室内注入し、これによって惹起される耳管粘膜の形態学的変化を定量的に検討した。

### 研究材料および方法

体重350—650グラムで、耳鏡所見で中耳に異常を認めないチンチラ32匹を用いた。これらチンチラの左側中耳腔内に経側頭骨性にインフルエンザAウイルス (Alaska/6/77) ( $2.8 \times 10^7$  PFU/ml) 溶液0.25mlを深麻酔下に注入した。また対照として、これらチンチラの右側中耳腔内には同様の方法により同量のMEMを注入した。これら動物を鼓室内注入の12時間後、1日後、3日後、5日後、9日後、14日後、21日後、28日後に断頭し実験に供した。断頭後に両側耳管全長を採取し、これを長軸方向に5等分した。このうち耳管咽頭口部、耳管中央部および耳管鼓室口部の粘膜を定法により資料作製した後に走査電子顕微鏡 (Hitachi, S-570) および透過電子顕微鏡 (Phillips EM-300) を用いて観察した。

インフルエンザウイルス注入後の粘膜病態については、以下に述べる方法を用いて、1) 線毛の長さ、2) 線毛細胞数、3) 杯細胞数、4) 基底細胞数、5) 上皮細胞層内に浸潤した炎症細胞数、6) 核上部に新生中心子を有

する無線毛細胞数、を定量的に測定した。すなわち、線毛の長さについては走査電子顕微鏡写真を用いて各群の50本の線毛の長さをジギタイザー・コンピューターにより測定した。その他に関しては、粘膜上皮50  $\mu$ m あたりの細胞数を同様のジギタイザー・コンピューター法により測定した。また、有意差に関してはt-testを用いて検定し、 $P < 0.05$ をもって有意差ありと判定した。

## 成 績

### 1. 対照耳管粘膜 (右側)

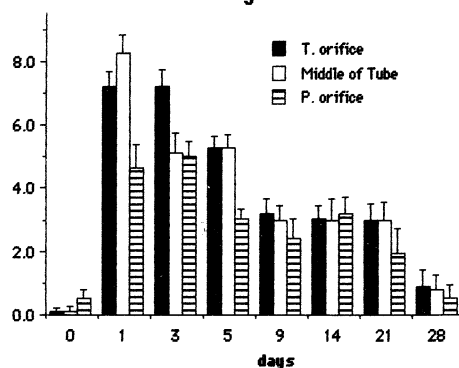
対照32耳中より任意に10耳の耳管粘膜を電子顕微鏡を用いて観察した。このうち1耳には明らかな細菌感染を認めたので、これを除外した9耳の耳管粘膜を対照群の耳管形態の定量的観察に用いた。

### 2. ウイルス感染側耳管 (左耳)

ウイルス感染側の耳管粘膜には種々の病理的变化が観察された。主たる変化としては、非特異的な炎症細胞浸潤と粘液線毛系の障害が観察され、また粘液線毛系の障害に引き続いて粘液線毛系の修復が観察された。

1) 炎症細胞浸潤 耳管粘膜への炎症細胞の出現はウイルス注入12時間後よりみられ、PMNがその主たるものであった。5日後よりリンパ球の出現が多くなり、炎症細胞浸潤のピークは注入1—3日ごろに認められた。5日後からは炎症細胞数は減少する傾向となり、28日後には対照耳と有意差のないレベルに至った(図1)。

Fig. 1 Number of Inflammatory Cells following Viral Infection



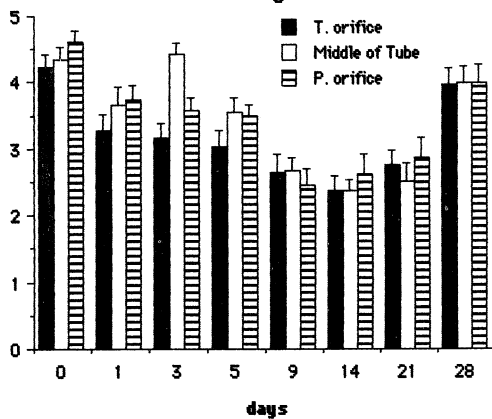
2) 粘液線毛系の障害

粘液線毛系には質的及び量的な障害性変化が観察された。質的变化としては、複合線毛の形成、基底小体の方向性的変化、粘液層の二重構造の消失などが観察された。量的な変化としては、線毛の短小化、線毛細胞数の減少などが観察された。しかし、杯細胞数には有意の変化は観察されなかった。

(1) 線毛の長さ

ウイルス感染後には線毛の短小化が観察された。短小化した線毛の先端部には高電子密度の収束像がみられ、線毛の短小化は線毛フィラメントの重合障害によるものと考えられた。線毛の長さの経時的变化は図2に示すように、1日後より認められ、14日後でその変化は最高に達した。21日後より線毛の長さは増加傾向を示し、28日後では咽頭口以外の部位では対照と同一レベルに達した。

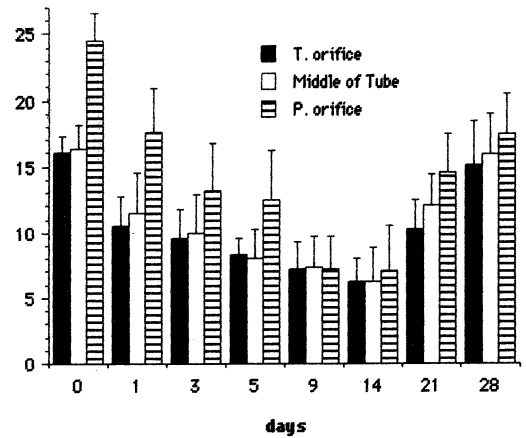
Fig. 2 Length of Cilia following Viral Infection



(2) 線毛細胞数

線毛細胞の高度障害や脱落に伴い、線毛細胞の減少が耳管のいずれの部位においても観察された。図3に経時的な線毛細胞数を示した。1日後ですでに線毛細胞数の減少が観察され、14日後までは対照群よりも

Fig. 3 Number of Ciliated Cells following Viral Infection

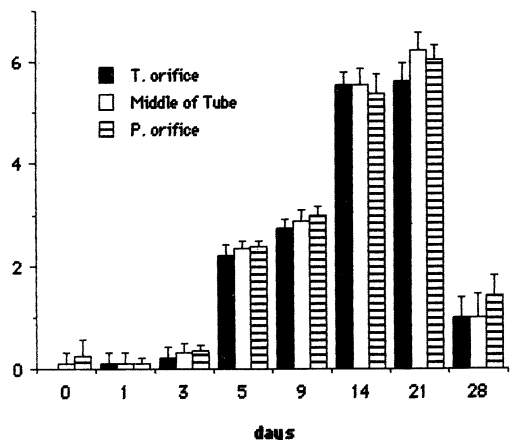


有意に減少していることがすべての部位で認められた。28日後では鼓室口及び中央部での線毛細胞数は対照群と有意差のないレベルまで回復していたが、咽頭口部の線毛細胞数は依然として対照よりも減少していた。

(3) 粘液線毛系の修復

粘液線毛系の修復が障害に引き続いて観察された。この際の修復様式には、1) 基底細胞の分裂増殖を介する様式と、2) 残存する上皮細胞における線毛新生による様式、の2種が認められた。

Fig. 4 Number of Cells with Ciliogenesis following Viral Infection



1)の様式は3日後より観察され、最も有意の基底細胞数の増加は14-21日後に認められた。その後28日後には基底細胞数は減少して、対照レベルに達した。また、ウイルスによる障害後には残存する上皮細胞内に新性中心子やその前駆小体の増殖がみられ、このような像は5-28日後に高頻度であった(図4)28日後ではこのような像はほとんど観察されなかった。

### 考 察

本研究成績よりインフルエンザウイルスによって、耳管粘膜の粘液線毛系の障害されることが認められた。また、粘液線毛系には活発な修復作用の有ることが知られている<sup>1-3</sup>が、ウイルスによる障害の修復には28日以上を要することが認められた。したがって、機能的回復にはより長期な修復期間を要するものと示唆される。このような点より考えると、ウイルス感染は細菌、エンドトキシンなどよりもかなり長期に及ぶ粘液線毛機能の障害を保持し<sup>1,4</sup>、滲出性中耳炎の遷延化に関与している可能性が示唆された。

### 参 考 文 献

1. Ohashi Y et al: Functional disorder of eustachian tube in experimental otitis media with effusion following inoculation of bacterial endotoxin. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 97: 422-426, 1988
2. Ohashi Y et al: Reversibility of reduced ciliary activity on adenoids of patients with otitis media with effusion following culture. *Clin Otolaryngol* 13: 179-184, 1988
3. Ohashi Y et al: An experimental study on the acute effects of isopropyl alcohol on the middle ear mucosa. *J. Appl. Toxicol.* 7: 205-212, 1987
4. Ohashi Y et al: Effects of *Staphylococcus aureus* on the ciliary activity of the middle ear lining. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 96: 225-228, 1987

---

### 質 疑 応 答

質問 馬場駿吉(名市大)

線毛運動の障害は今回示された形態学的変化と平行的なものと考えてよいか。

応答 大橋淑宏(大阪市大)

モルモットで同様の実験系を作製し、線毛機能を観察した場合、長期におよぶ低下が観察された。