

中耳貯留液中SOD活性の測定

重見 英男 黒野 祐一 茂木 五郎

大分医科大学耳鼻咽喉科学教室

江頭 亨

大分医科大学薬理学教室

ROLE OF SUPEROXIDE DISMUTASE IN MIDDLE EAR EFFUSIONS FROM CHILDREN WITH OTITIS MEDIA WITH EFFUSION

Hideo Shigemi, Yuichi Kurono, Goro Mogi

Department of Otolaryngology Oita Medical University

Toru Egashira

Department of Pharmacology Oita Medical University

Oxygen radicals have a strong bactericidal activity in normal condition, however, excess of oxygen radicals cause tissue damage. Superoxide dismutase (SOD) constitutes an important enzymic defense against oxidative metabolic tissue damage. To clarify the role of SOD in otitis media with effusion(OME), the activity of SOD in middle ear effusion (MEE) was measured. Electron spin resonance method was applied to measure the SOD activity. The SOD activities in mucoid MEEs and serous MEEs were higher than those in plasma, while the activity in purulent MEEs was lower than that in plasma. In patients with OME lasting more than 3 months, the SOD activity was higher than that in patients without OME prolongation.

Many kinds of harmful factors, such as bacterial pathogens, bacterial endotoxin, immune-complex, and arachidonic acid metabolic products, are recognized in MEEs. These factors stimulate the activity of neutrophils. Activated neutrophils release the oxygen radicals and cause tissue damage.

These findings suggest that SOD is consumed by oxygen radicals in acute inflammation, however SOD is induced in chronic inflammation by the stimulation of harmful factors in MEEs. In conclusion, SOD in MEEs may play a defensive role against oxidative injury of middle ear.

Key words ; superoxide dismutase, oxygen radical, superoxide anion, otitis media with effusion

はじめに

滲出性中耳炎 (OME) の成因は多岐にわたり, 中耳貯留液 (MEE) には細菌やエンドトキシン, 免疫複合体や補体, あるいはアラキドン酸代謝産物など, 中耳粘膜の傷害や炎症の増悪, 遷延化に作用する物質が含まれていることが知られている. そして, 近年の生化学的分析により, エンドトキシン, 免疫複合体あるいはアラキドン酸の代謝による細胞膜の傷害には, 一連の活性酸素が関与していることが判明している. これに対して, 生体は活性酸素の最上位に位置するスーパーオキシド (O_2^-) を不均化するスカベンジャー酵素であるスーパーオキシド・ディスムターゼ (SOD) を備えており, 活性酸素による組織傷害を制御するとされている. OMEにおいても, 活性酸素による組織傷害ならびにSODによる制御が関与しているものと思われるが, その働きは十分には解明されていない. そこで今回の研究ではOME患者から採取したMEE中のSOD活性を測定し, 臨床経過と比較検討した.

対象と方法

対象は15歳以下の小児OME患者38名, そしてこれらの患者から採取したMEE 54検体である. MEEは鼓膜切開後Juhn-Tym-tapで吸引採取した. MEEは採取後直ちに生理食塩水で10倍に希釈し, 3000回転5分間の遠心により細胞成分を分離し, 上清をCu, Zn-SODの測定に供し, 沈査はサイトスピン後, HE染色を行ないMEE中の細胞成分の検討を行った. Cu, Zn-SODの活性測定は電子スピン共鳴 (ESR) 法を用いた. ESR法はヒポキサンチンとヒポキサンチンオキシダーゼの反応により活性酸素の1種である O_2^- を発生させ, 検体中に含まれるSODが O_2^- を消去する反応をみるものである. なお, Fe^{3+} によるヒドロキシラジカルの発生を防ぐためにキレート剤としてDTPA (Diethylenetriamine-

pentaacetic acid) を, またスピントラップ剤としてDMPO (5,5-Dimethyl-1-pyrroline N-oxide) を用いた.

結 果

MEEの性状別のSOD活性の結果はTable 1に示すように, 粘液性21.2 U/ml (n=22),

sample	SODactivity(U/ml)	n
mucoid MEE	21.0±19.7	22
serous MEE	11.0±11.0	27
purulent MEE	3.3±3.3	5
plasma	6.1±5.7	
Mean±SD		*; p=0.016

Table 1 SOD activity in MEE

漿液性; 11.0 U/ml (n=27), 膿性; 3.3 U/ml (n=5) であり, 粘液性および漿液性MEE中のSOD活性には統計学的に有意差がみられた (P=0.015). また血清のSOD活性に比較して, 膿性MEEではSOD活性が低値を示し, 粘液性および漿液性MEEでは高値を示した. OMEの経過によりSOD活性を比較したところ, OMEが3カ月以上にわたり遷延化した群のMEE中のSOD活性は, 3カ月未満で治癒した群のMEE中のSOD活性に比べ高値を示した (P<0.05) (Table 2). サイトスピンによるMEE中の細胞成分

	prolongation of OME	
	≥3months	< 3months
SOD activity (U/ml)	23.1±19.5 n=11	12.2±14.2 n=37
Mean±SD P<0.05		

Table 2 period of OME and SOD activity

による比較, あるいは急性中耳炎の反復または既往の有無による比較ではSOD活性に有意差はみられなかった.

考 察

OMEの原因の1つとして感染が重要視されている。この感染に対する防御システムとして生体は分泌型IgAを主体とする粘膜免疫や他の液性免疫¹⁾、あるいは好中球、マクロファージの貪食等による細胞性免疫の両者を有している²⁾。しかし、急性期以外のMEEの培養では細菌を分離できず、起炎菌の同定にはPCR法をはじめとする分子生物学的手法を必要とする場合も多い。このことはOMEの初期においては病原菌の産生する毒素やプロテアーゼが直接組織傷害を引き起こすが、OMEが遷延化した病体においては宿主の様々な免疫反応に伴う組織傷害も関与しているものと考えられる。

ところで、OMEのMEE中には、感染増悪因子となるエンドトキシンや免疫複合体、さらにアラキドン酸代謝産物であるプロスタグランジンやロイコトリエンが認められる。エンドトキシンはグラム陰性菌の菌体外膜を形成するLPSと蛋白の複合体であり、生菌のみならず死菌からも遊離され、組織傷害を惹起する。DeMariaら³⁾はインフルエンザ死菌のエンドトキシンをモルモット中耳腔に投与して中耳粘膜の炎症を惹起し、MEEが出現することを明らかにした。免疫複合体は3型アレルギーによる組織傷害を生ずる。Palva⁴⁾はMEE中に肺炎球菌を抗原とした免疫複合体を検出し、Suzukiら⁵⁾は免疫複合体をチンチラ中耳骨胞に投与することで、実験的OMEを作成した。また、炎症に伴う化学伝達物質としてプロスタグランジンや5-および15-HETEなどのアラキドン酸代謝産物も中耳貯留液に存在する。Jungら⁶⁾は実験的OMEにプロスタグランジンE2を投与すると炎症は増悪し、骨吸収が増加することを明らかにした。

これらの炎症増悪因子は活性酸素と深く結びつき、その関与について次のような報告が

ある。エンドトキシンは、in vitroでペトリ皿上で好中球とエンドトキシンを反応させると、好中球の安静時に比べ約20倍の O_2^- の産生が惹起され、同時に好中球の粘着力も上昇する⁷⁾。免疫複合体はsoluble immune stimuliであり、Goldstein⁸⁾は、免疫複合体が好中球や単球と細胞結合することで、これらの炎症細胞を活性化し、活性酸素の遊離を促進すると報告している。組織に沈着した免疫複合体は炎症局所に集積した好中球を刺激し、活性酸素を遊離せしめ組織傷害を促進する。滲出性中耳炎における、中耳粘膜への免疫複合体の沈着には議論の分かれるところであるが、少なくとも免疫複合体の存在により炎症細胞から活性酸素が遊離されるものと思われる。また滲出性中耳炎の病体に深く関与するといわれているプロスタグランジンやロイコトリエン等のアラキドン酸の代謝は酸化反応が主体であり、細胞膜レベルでの活性酸素の関与が示唆される。以上のように、OMEにおける中耳粘膜局所では、病原菌の直接作用による組織傷害以外にも免疫反応あるいは生化学反応に伴う活性酸素による組織傷害が関与しているものと推察される。

今回の検討で、症例数は少ないものの比較的急性期と考えられる膿性MEEでSOD活性が低値であったのは、炎症初期に動員された炎症細胞から遊離される活性酸素を、MEE中のSODが不均化し消費されたためと思われる。これに対して、比較的慢性化したOMEで認められる漿液性あるいは粘液性MEEでSOD活性が高値であったのは、MEE中に含まれエンドトキシン、免疫複合体、あるいはアラキドン酸代謝産物などが活性酸素の誘導とともに、スカベンジャー酵素であるSODの産生をも亢進させたものと考えられる。このことは、ラットを用いた肺傷害の実験でエンドトキシンを投与することによりSODの合成が約50%増加するという報告⁹⁾からも

支持される。

通常の細菌感染症では、好中球が組織内の酸素を激しく取り込んで O_2^- を産生し、食胞内および細胞外に O_2^- を放出し殺菌作用を行うものの、関節腔をはじめとする閉鎖腔では組織内酸素濃度が低く、好中球は細胞内に合成された殺菌剤である次亜塩素酸により自己崩壊し、多量の活性酸素を細胞外に放出する¹⁰⁾。OMEでは耳管機能不全に伴う換気障害のため、中耳腔は低酸素状態にあると考えられる。Ovensenら¹¹⁾は、ルミノール化学発光により小児OME患者のMEE中のSOD活性を測定し、SOD活性が低い患者では酸素毒性に対する抵抗性が未熟であるため、鼓膜切開あるいは鼓室換気チューブの留置には慎重であるべきと述べている。しかしながら、OMEの治療においては、低酸素状態にある好中球から放出される活性酸素による組織傷害、ならびにMEE中に存在するエンドトキシン、免疫複合体、あるいはアラキドン酸代謝産物など活性酸素を介して炎症を増悪させる因子を、中耳腔から速やかに取り除く必要があると思われる。また中耳腔に動員された活性酸素を不均化するために、SODを投与することは、OMEの治療の新しい手段になりうると考えられる。

参 考 文 献

- 1) G. Mogi, S. Honjo, S. Maeda, et al. Secretory immunoglobulin A (SIgA) in middle ear effusion. A further report. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 83 : 92-101, 1974,
- 2) N. Kaneda, H. Kawauchi, G. Mogi. Role of phagocytes in antimicrobial defence of the middle ear. *Auris Nasus Larynx (Tokyou)* 18 : 331-342, 1991.
- 3) DeMaria TF, Briggs BR, Lim DJ, Okazaki N, : Experimental otitis media with effusion following middle ear inoculation of nonviable H.influenzae. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 93 : 52-56, 1984.
- 4) Palva T, Lehtinen T, Rinne J. : Immune complexes in middle ear fluid in chronic secretory otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 92 : 42-44, 1983.
- 5) Suzuki M, Kawauchi H, Mogi G. : Immune-mediated otitis media with effusion. *Am J Otolaryngol* 9 : 199-209, 1988.
- 6) Jung TTK, Smith DM, Juhn SK, Gerrard JM. : Effect of prostaglandin on the composition of chinchilla middle ear effusion. *Ann Otol Laryngol* 89 (suppl 68) ; 153-160, 1980.
- 7) Dahinden C, Fehr J. : Granulocyte activation by endotoxin. Role of granulocyte adherence, aggregation, and effect of cytochalasin B, and comparison with folmylated chemotactic peptide-induced stimulation. *J. Immunol* 130 : 863-868, 1983.
- 8) Goldstein IM, Roos D, Kaplan HBK, Weissmann G. : Complement and immunoglobulins stimulate superoxide production by human leukocyte independently of phagocytosis. *J. Clin Invest* 56 ; 1155-1163, 1975.
- 9) Frank L, Summerville J, Massaro D. : Protection from oxygen toxicity with endotoxin. Role of the endogenous antioxidant enzymes of the lung. *J Clin Invest.* 65 : 1104-1110, 1980.
- 10) 中野 稔 ; 酸素と活性酸素. *Medical Immunology* 26 : 385-393, 1993.
- 11) Ovensen T, Borglum JD. : Superoxide dismutase in middle ear fluid from children with secretory otitis media. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 112 ; 1017-1024,

1992.

質 疑 応 答

質問 川口隆明 (和歌山労災病院)

SODの投与による治療として、具体的にどのようなものを考えているか。

質問 金子 豊 (仙台市)

SOD活性が高いことは活性酸素の活性度が高いことを意味するのか。更に急性期と慢性期で活性酸素の発生原因は異ると考えられるのか。(急性中耳炎と滲中との差異)。

応答 重見英男 (大分医大)

実験モデルでは、SODを腹腔内投与している。

応答 重見英男 (大分医大)

慢性化症例では、活性酸素が多量にあるため、SODも多量に動員されている。