

## 実験的滲出性中耳炎に及ぼすマクロライドの作用機序

榎本 冬樹 市川 銀一郎

順天堂大学医学部耳鼻咽喉科学教室

長岡 功 山下 辰久

順天堂大学医学部生化学教室

### EFFECT OF MACROLIDE ON THE EXPERIMENTAL OTITIS MEDIA WITH EFFUSION

Fuyuki Enomoto, Ginichiro Ichikawa

Department of Otorhinolaryngology, Juntendo University

Isao Nagaoka, Tatsuhisa Yamasita

Department of Biochemistry, Juntendo University

The clinical efficacy of erythromycin (EM) therapy has been demonstrated in diffuse panbronchiolitis (DPB) patients, chronic sinusitis, and otitis media with effusion (OME). However, the mechanism of this drug is not elucidated. The leukotrienes B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>) and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) are arachidonic acid metabolites which are considered as the inflammatory mediators, because PGE<sub>2</sub> and LTB<sub>4</sub> has the potent vascular permeability increasing activity and LTB<sub>4</sub> has a potent chemotactic activity.

In this study, to elucidate the possible mechanism of EM, we examined the ef-

fect of EM on the LTB<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> and PGE<sub>2</sub> production in the rat middle ear effusion (MEE) induced by the injection of lipopolysaccharide.

EM inhibited the accumulation of inflammatory cells such as neutrophils and macrophages in MEE at the subacute inflammatory stage. Furthermore, EM suppressed the exudation of plasma protein and the production of LTB<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> and PGE<sub>2</sub> in the MEE. These results suggest that EM may exert the antiinflammatory effect on MEE through the suppression of the production of inflammatory mediators such as LTB<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub>.

#### はじめに

近年、エリスロマイシンの少量長期投与が慢性副鼻腔炎や滲出性中耳炎に、用いられ有効であるとの報告<sup>1)2)</sup>がなされているが、その機序は明かにされていない。今回我々は滲

出性中耳炎におけるエリスロマイシンの作用機序を検討するためにケミカルメディエーターであるアラキドン酸代謝産物に対する影響をラットの実験的滲出性中耳炎モデルを作成し検討した。

## 実験方法

鼓膜が正常なSD系の雄のラット(体重200-300g)を実験動物として用いた。エリスロマイシンはエリスロマイシンラクトビオネート(ダイナボット社製)を生理食塩水で1mg/mlの濃度として用いた。その投与量は体重1kg当たり5mgとし、滲出性中耳炎を作成する2週間前より中耳浸出液の回収まで腹腔内に午前中に一日1回投与した。

実験的滲出性中耳炎の作成は、ラットをペントバルビタールナトリウムの麻酔下に、リポポリサッカライド(LPS)(E. coli 0111; B4. SIGMA)をラットの右鼓室内に注入して作成した。

LPSは50 $\mu$ g/mlの濃度になるようPBSに融解し、200 $\mu$ l注入した。対照として左鼓室にPBSを同量注入した。中耳浸出液(MEE)は1, 5, 7日目に鼓室を経鼓膜的に1mlのPBSで洗浄して回収した。回収した滲出液は遠心後に上清と沈渣に分け、上清中のPGE<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>の濃度をradioimmunoassay kit(NEN社製)を用いて測定した。沈渣は細胞数を算定後にライトーギムザ染色し、細胞の種類を同定した。EMを腹腔内に、LPSを鼓室内に投与した群と(EM群)、EMを投与せず、LPSのみを鼓室内に注入した群(LPS群)を比較検討した。

## 結果

### 1-1 中耳に浸出した細胞数の検討

LPSを注入した右鼓室には好中球やマクロファージといった炎症性細胞の浸潤が認められた。対照としてPBSを注入した左鼓室には、炎症細胞は認められなかった。炎症細胞の滲出は1日目に最大をとり、以後、5日目、7日目と減少した(LPS群)(Fig. 1)。

さらに、滲出した細胞の種類は、1日目では好中球が滲出細胞の主体をなしていたが、5日目、7日目になるとマクロファージの滲出が優位になった。

EM群の滲出細胞の総数はLPS群と比較して1日目では有意差はなかったが、5日目、7日目には著明に抑制された。(Fig. 1)

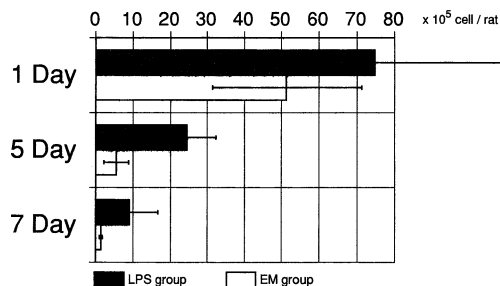


Fig. 1 Total cell number in MME. Accumulation of inflammatory cells (such as neutrophils and macrophages) were suppressed by EM treatment on 5 and 7 days after LPS administration.

EM群の滲出細胞数の内、1日目、5日目では好中球の滲出が主に抑制された。7日目になると、マクロファージの滲出が主に抑制された。

### 1-2 鼓室内への血漿タンパクの浸出

LPSを注入した鼓室の蛋白量は、1日目では最大を示し、5日目、7日目には減少した。EMを投与すると、滲出細胞数と同様に鼓室のタンパク量は、5日目、7日目に著明に抑制された(Fig. 2)

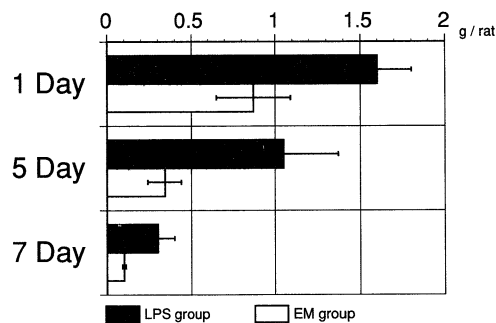


Fig. 2 The proteins levels in MME. Exudation of plasma proteins were suppressed by EM treatment on 1 day, 5 and 7 days after LPS injection.

また、滲出液中のタンパクを電気泳動で分析したところ血漿タンパクと同様のパターンが得られた。従って滲出液中のタンパクは血管透過性の亢進により、血漿タンパクが局所に滲出したものと考えられた。

1-3 浸出液中の PGE<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> の測定

PBS を注入した左鼓室や、血中の LTB<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> は検出感度以下だった。LPS を注入した鼓室の滲出液中には LTB<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> が認められた。LTB<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> の量は 5 日目に最大を示し、以後減少した。EM 群の滲出液中の LTB<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> の量は、1 日目、5 日目では EM 投与によっても抑制されなかったが、7 日目になると著明に抑制され、検出感度以下となった (Fig. 3, Fig. 4)。

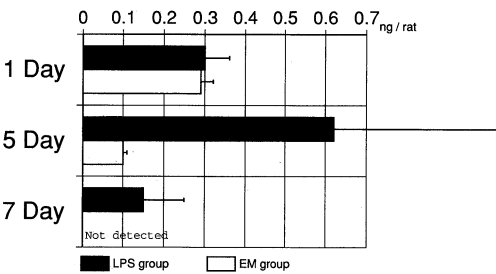


Fig. 3 The amounts of LT B<sub>4</sub> in MME. The LT B<sub>4</sub> levels in MEE were suppressed by EM treatment on 5 and 7 days after LPS injection.

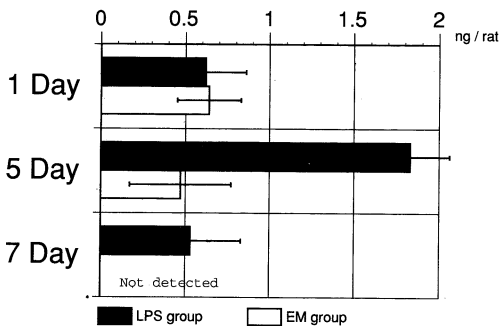


Fig. 4 The amounts of LT C<sub>4</sub> in MME. The LT C<sub>4</sub> levels in MME were suppressed by EM treatment on 5 and 7 days after LPS injection.

PBS を注入した左鼓室の PGE<sub>2</sub> 量は検出感度以下であった。血中の PGE<sub>2</sub> 量は 1 mg/ml であったが、LPS を注入した右鼓室の PGE<sub>2</sub> 量は血中レベルよりも有意に高く、1 日目で最大を示し 5 日目、7 日目で減少した。EM を投与した群では、LTB<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> の結果と同様に、PGE<sub>2</sub> の量は、7 日目に著明に抑制されていた (Fig. 5)。

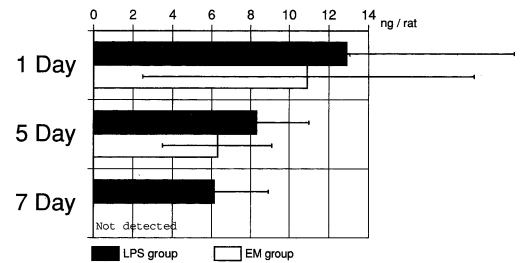


Fig. 5 The amounts of PG E<sub>2</sub> in MME. The PG E<sub>2</sub> levels in MME were suppressed by EM treatment on 5 and 7 days after LPS injection.

### 考 察

EM の少量長期投与が、びまん性汎細気管支炎 (DPB) をはじめとする慢性呼吸器疾患に対して有効であるとの報告<sup>3)</sup> がなされているが、その作用機序は現在のところ充分には解明されていない<sup>4)</sup>。EM が抗菌効果のない緑膿菌に対しても除菌効果が認められている<sup>5)</sup> ことから、EM が抗菌力以外に、生体に対して何らかの作用を及ぼすことが考えられる。そこで今回我々は、EM の作用機序調べるために、実験的滲出性中耳炎を作成しこれに EM を作用させ中耳滲出液中の滲出細胞や、血漿タンパクの浸潤、ケミカルメディエーターの産生について検討した。

浸潤した白血球数は EM 投与後、5 日目から有意に抑制され、7 日目の抑制効果は著しかった。滲出したタンパクの抑制は 5 日目、7 日目にみられた。EM は炎症の亜急性期に白血球の浸潤と血漿タンパクの滲出を抑制する効果があることが分かった。

滲出性中耳炎の病因にケミカルメディエーターが関与している<sup>7)8)</sup>との報告がなされている。LTB<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub>は、炎症のケミカルメディエーターとして知られており種々の生理作用を有している。LTB<sub>4</sub>は強力な好中球遊走因子<sup>9)</sup>であり、LTC<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub>は血管透過性の亢進作用を有している<sup>10)</sup>。これらの作用は好中球の遊走を促進し、血漿タンパクの漏出の増加を来すので、炎症を増悪せる方向に働く<sup>11)</sup>。

これらケミカルメディエーターのLTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub>の血中濃度は検出感度以下、ないしは鼓室内濃度に比べ低値であったので、MEEで認められたLTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub>は中耳炎局所で産生されることが考えられた。中耳腔内のLTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub>の量は、EMの投与によって7日目に著明に抑制されている。このことは亜急性期にケミカルメディエーターの産生がEMの投与によって抑制されることを示唆している。以上の実験結果からEMは、亜急性期中耳炎局所への白血球の浸潤を抑制し、局所での白血球からのLTB<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub>生成を抑制し、これらケミカルメディエーターによって引き起こされる亜急性期の白血球浸潤や血漿タンパクの滲出を抑制する作用があると考えられた。従ってEMはLTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub>の持つ炎症増幅効果を抑制することにより炎症の遷延化、反復のサイクルを断ち切る可能性が示唆された。

#### ま と め

1. EM投与によってLPS刺激による滲出性中耳炎滲出液中の白血球数、血漿タンパクの滲出が抑制された。
2. EMは滲出液中のLTB<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub>の量を抑制した。
3. EMは炎症の亜急性期において炎症の抑制効果を表した。
4. EMは滲出細胞数やケミカルメディエーターの産生を抑制することによって、炎症

の遷延化、反復のサイクルを絶ち切る作用を持つ可能性が示唆された。

#### 参 考 文 献

- 1) 菊地 茂, 洲崎春海, 青木彰彦, 伊東修, 野村恭也: 副鼻腔炎とエリスロマイシン少量長期投与. 耳鼻臨床 84: 41-47, 1991.
- 2) Iino Y, Sugita K, Toriyama M, Kudo K: Erythromycin Therapy for Otitis Media With Effusion in Sinobronchial syndrome. Arch otolaryngol Head and Neck Surg 119, 648-651, 1993.
- 3) 工藤翔二: DPBのエリスロマイシン少量長期投与. 呼吸 10: 932-938, 1991.
- 4) 滝沢 始, 伊藤孝治: エリスロマイシンの新しい治療応用. 医学のあゆみ 170: 127-130, 1994.
- 5) 迎 寛, 崎戸 修, 織田裕繁, 千住玲子, 平谷一人, 他: びまん性汎細気管支炎におけるBALF細胞所見の検討—エリスロマイシン投与前後の比較— 感染症学雑誌 65: 692-697, 1991.
- 6) DeMaria TF, Briggles BR, Lim DJ, Okazaki N: Experimental otitis media with effusion following middle ear inoculation of nonviable *Hinfluenzae*. Ann Otol Rhinol Laryngol 93: 52-56, 1984.
- 7) Jung TTK, Prostaglandins, leukotrienes, and other arachidonic acid metabolites in the pathogenesis of otitis media. Laryngoscope 98: 980-993, 1988.
- 8) Brodsky L, Faden H, Bernstein J, Stanievich J, et al: Arachidonic acid metabolism in middle ear effusions of children. Ann Otol Rhinol Laryngol 100: 589-592, 1991.
- 9) 河野茂勝, 大幡勝也: ロイコトリエンとその薬理活性. 代謝 20: 17-331, 1983.
- 10) 鹿取 信: 微小循環における血管反応と

白血球の反応, 鹿取 信 他編: 講座プロ  
スタグランジン3 炎症・免疫・がん. 東京  
化学同人, 東京: 13-29, 1988.

- 11) Jung TTK, Park YM, Schlund D, et al  
: Effect of prostaglandin, leukotoriene,  
and arachidonic acid on experimental  
otitis media with effusion in chinchillas.  
Ann Otol Rhinol Laryngol 99 : 28-32,  
1990.