

実験的滲出性中耳炎に対するセファランチンの効果

大分医科大学耳鼻咽喉科学教室（主任：茂木五郎教授）

堀 文彦, 川内秀之, 茂木五郎

THERAPEUTIC EFFECTS OF CEPHARANTHINE ON THE EXPERIMENTAL OTITIS MEDIA WITH EFFUSION

FUMIHIKO HORI, M.D., HIDEYUKI KAWAUCHI, M.D. and GORO MOGI, M.D.

Department of Otolaryngology, Medical College of Oita, Oita

This study was designed to investigate the therapeutic efficacy of Cepharanthine for OME. Cepharanthine is a biscoclaurin type alkaloid, crude drug, and its main efficacy is to stabilize cell membranes. Experimental OME was induced in chinchillas by immunization with Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) into the right tympanic cavity following systemic sensitization. Forty-five chinchillas, weighing 350-600g, were used in this study. The animals were divided into 5 groups. Group A (N=5), Group B (N=5) and Group C (N=5) were intraperitoneally given 1mg/kg, 2mg/kg or 5mg/kg dose of cepharanthine respectively, daily, after the induction of OME; Group D (N=5) received no medicine as a control group; Group E (N=17) received intraperitoneal administration of 2mg/kg of cepharanthine daily, for 7 days before the local antigenic challenge. The presence of middle ear effusion (MEE) was monitored daily by tympanometry and fiberoptic observation of the eardrum. At four days after experimental OME occurred, MEEs were aspirated aseptically through the eardrum and processed to biochemical analysis. The animals were then killed for the observation with autoradiography used by ^3H -cepharanthine.

Results demonstrated that the dose of 2mg/kg cepharanthine is more effective, compared with that of 1mg/kg or 5mg/kg of cepharanthine. It was clear that this drug was immediately transferred to the middle ear following intraperitoneal administration and diffusely distributed in the middle ear mucosa.

Findings of this study suggest the efficacy of cepharanthine is prophylactic and restorative against experimental OME.

Key words: Experimental otitis media, Chinchilla
Cepharanthine, Therapeutic efficacy

A92—0936—22155

結 言

滲出性中耳炎の主要病態は、炎症物質である貯留液が中耳腔に停留することである。貯留液中には組織障害物質が多いので、中耳粘膜を傷害し、あらたに貯留液の産生を促す。したがって、滲出性中耳炎の治療において、中耳貯留液の排除がその基本となる。そのた

め、鼓膜切開やドレーンチューブの留置による外科的療法や、通気療法による保存的療法などが行われている。種々の薬剤による薬物療法も試みられているが、薬物のみでは的確かつ即効的な効果は得られておらず、依然本症に対する主要治療法と成り得ていない。しかし、外科的治療では、原因や病態を維持する要因

を取り除くことはできない。そこで、現在臨床で用いられている薬剤が、どの程度本症の発症を抑制し、あるいは貯留液の排除に効果があるかを、滲出性中耳炎の動物モデルで検討した。

今回実験に使用した薬剤は、セファランチンである。セファランチンはタマサキツツラフジの根茎から抽出された分子量606のビスコクラウリン型アルカロイドであり、滲出性中耳炎に臨床応用されている。しかし、滲出性中耳炎に対しては、どのような薬理作用のもとで治療効果をもたらすのか、詳細に検討されたものは少ない。そこで、我々は、セファランチンの治療効果を評価するため、チンチラにおける実験的滲出性中耳炎モデルで検討した。

材料および方法

実験動物として、大分医科大学実験動物舎にて繁殖した健康な雄チンチラ(体重 350g~600g)を使用した。チンチラは、形態的に中耳腔が広く、耳管の構造が人のそれに類似しており、中耳自然感染がほとんどなく、手術用顕微鏡による鼓膜観察が容易である。また、インピーダンスオージオメーターによって鼓膜の状態が正確に把握できるという利点があるので、本実験に使用した。実験に供したチンチラの総数は45匹である。

1. 実験的滲出性中耳炎作製および薬物投与方法

Suzuki ら¹⁾の方法に従い、図1に示すごとく、チンチラを1mgのkeyhole lympet hemocyanine (KLH)をFreund's Complete Adjuvantに混じて全身免疫を行い、2週間後、0.6mgのKLHを0.8% hydroxy-

propyl cellulose 加リン酸緩衝液(PBS)に溶解して、その0.2mlをsuperior bullaより右中耳腔に注入した。また、対照として0.8% hydroxypropyl cellulose 加PBS 0.2mlを、左中耳腔に注入した。なお、本法による実験的滲出性中耳炎の再現性は極めて高い¹⁾。本法における実験的滲出性中耳炎は、中耳免疫後平均2日目で生じ、その持続期間は約14日である。

薬物投与上、チンチラを5群に分けた。A群(N=5)、B群(N=5)、C群(N=5)には、実験的滲出性中耳炎惹起後、それぞれ1mg/kg/体重、2mg/kg/体重および5mg/kg/体重のセファランチンを2週間連日腹腔内投与した。D群(N=5)は、薬物投与をしない対照群とした。E群(N=17)は、局所免疫7日前より、2mg/kg/体重のセファランチンを3週間連日腹腔内投与した。

2. 実験的滲出性中耳炎の経時的観察

中耳炎惹起後、投与終了までの毎日、ティンパノメトリーと顕微鏡にて鼓膜を観察し、セファランチンの投与効果を評価した。

3. 中耳貯留液中のhistamine, prostaglandin E₂ (PGE₂)の測定

中耳炎惹起後、セファランチン2mg/kg/体重または5mg/kg/体重を4日間連日腹腔内投与したチンチラ各々3匹ずつを、ネブタール麻酔下で心腔穿刺により採血致死させ、その後直ちに、中耳貯留液を採取した。ヒスタミンは大倉ら²⁾の方法に準じ、高速液体クロマトグラフィーにより励起波長450nm、蛍光波長350nmで測定し定量した。また、PGE₂は稲川³⁾の方法

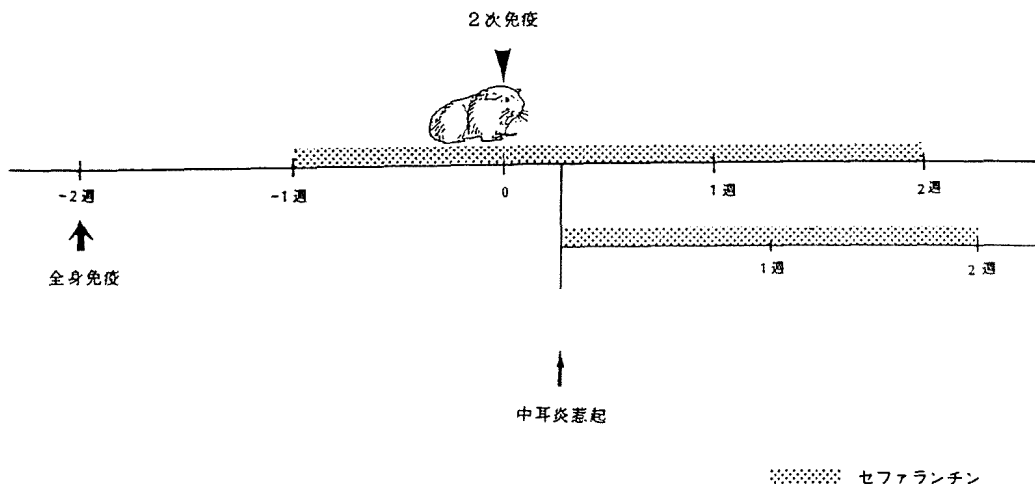


図1 実験方法

に準じて抽出を行い、PG E₂ [¹²⁵I] RIA kit (MEN Research Products)を用い、radioimmunoassay にて測定した。

4. 中耳粘膜の組織学的観察

中耳炎惹起後、セファランチン 1mg/kg/体重、2mg/kg/体重および 5mg/kg/体重を 4 日間連日腹腔内投与したチンチラ各々 3 匹ずつ、ならびに対照群 3 匹を、ネブタール麻酔下で心腔穿刺により採血致死させ、その後直ちに中耳骨包を採取。10%ホルマリンにて固定後リリーの脱灰液にて脱灰。パラフィン包埋後厚さ 6μm の組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色後顕微鏡観察した。

5. 中耳貯留液中、血中および胆汁中への ³H-cepharantine の移行

中耳炎惹起後 4 日目に、横島ら⁴⁾の方法に準じ、5mg/50μCi/ml/kg/体重の ³H-cepharantine を単回腹腔内投与した。投与後、30分、1時間、6時間、12時間後に各 3 匹ずつより中耳貯留液・血液・胆汁を採取し、各検体中の放射活性を溶解法により BECKMAN 工業社製 LS9000 型 scintillation counter で測定した。得られた値よりそれぞれの薬物濃度に換算して、各検体中濃度の時間的推移を求めた。なお、³H-cepharantine は Bromocepharantine に ³H₂ を作用させて得られたもので、化研生薬株式会社より供与された。

6. ミクロオートラジオグラフィー

中耳炎惹起後 4 日目に、5mg/50μCi/ml/kg/体重の ³H-cepharantine を単回腹腔内投与し、投与 1 時間後の中耳骨包を採取した。採取した中耳骨包を、ホルマリン固定後リリーの脱灰液にて脱灰した。パラフィン包埋後、厚さ 6μm の組織切片を作製した。乳剤としてサクラ NR-M2 を使用し、dipping 法にて浸漬したのち乾燥させた。その後 8 週間冷暗所で露出を行い、現像・定着してミクロオートラジオグラムを作製した。本法は、永田ら⁵⁾の方法に準じた。

結 果

1. 実験的滲出性中耳炎の経時的変化

ティンパノメトリーと顕微鏡による鼓膜観察の結果、D 群（薬物非投与群）では、中耳への二次局所免疫後 2 日または 3 日目に貯留液が生じ、およそ 14 日間持続した。次に、中耳炎惹起後にセファランチンを投与した群では、図 2 に示すように、中耳免疫後 10 日以内に滲出性中耳炎が治癒するものは、A 群 (1mg/kg/

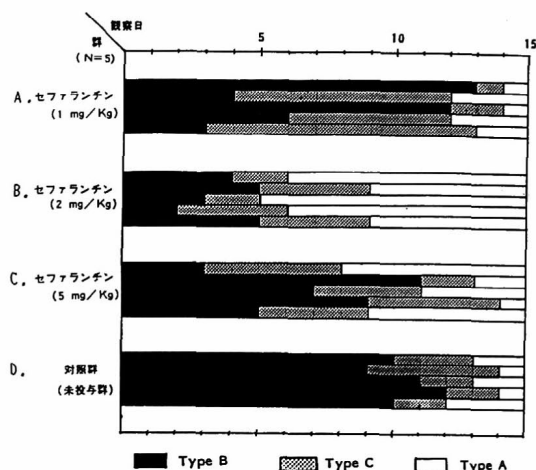


図 2 セファランチン投与後のティンパノグラムの変動（滲出性中耳炎惹起後）

表 1 セファランチンの予防的投与による実験的滲出性中耳炎発症の抑制

チンチラ (N=17)	滲出性中耳炎抑制率
対 照 群	0 / 17 (0%)
セファランチン 2mg/kg 投与群	9 / 17 (53%)

体重投与群) では 0 匹、B 群 (2mg/kg/体重投与群) では 5 匹すべて、C 群 (5mg/kg/体重投与群) では 5 匹中 2 匹であった。さらに、抗原投与後 14 日目までに滲出性中耳炎が治癒するものは、A 群では 5 匹中 3 匹、C 群では 5 匹中 4 匹、D 群では 5 匹中 3 匹であった。このことより実験的滲出性中耳炎に対してセファランチンは、2mg/kg/体重投与群で貯留液消失が最も早く、効果的であった。中耳炎惹起前にセファランチン 2mg/kg/体重を投与した E 群では、表 1 に示すように 17 匹中 9 匹 (53%) では、中耳への二次局所免疫後もティンパノグラムは A タイプを示し、中耳炎の発症が抑制された。組織学的にも滲出性中耳炎の発症が抑制された中耳粘膜 (中耳への二次免疫後 4 日目) は正常であった。滲出性中耳炎が惹起された残り 8 匹も 10 日以内に治癒した。以上よりセファランチンは、実験的滲出性中耳炎に対して予防的に作用することも判明した。

2. 中耳貯留液中の histamine および PGE₂ 濃度

中耳貯留液中の histamine 濃度は、2mg/kg/体重および 5mg/kg/体重投与群各 3 匹のチンチラにおける平均値 ± 標準偏差は、それぞれ 41.3 ± 2.1 ng/ml およ

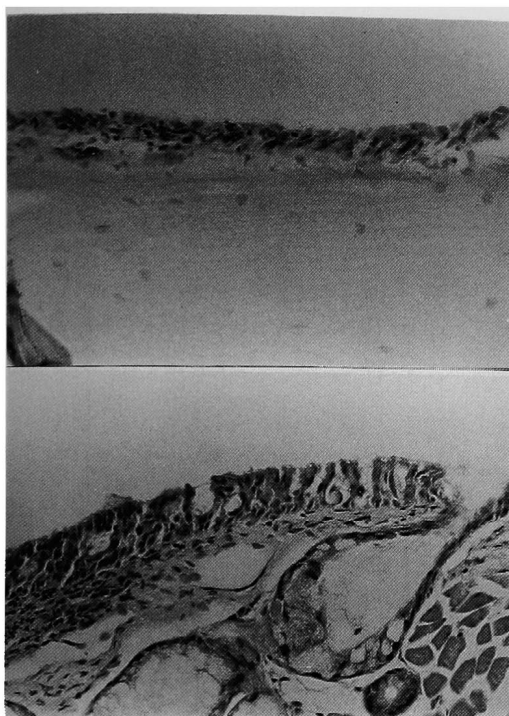


図3 チンチラ中耳粘膜（対照群）（ $\times 100$ ）
（上段）細胞増生による粘膜肥厚を示す鼓室
非繊毛部
（下段）分泌細胞の増加，繊毛細胞の核の配
列の不規則さ，粘膜下の細胞浸潤，
末梢血管の拡張を示す耳管

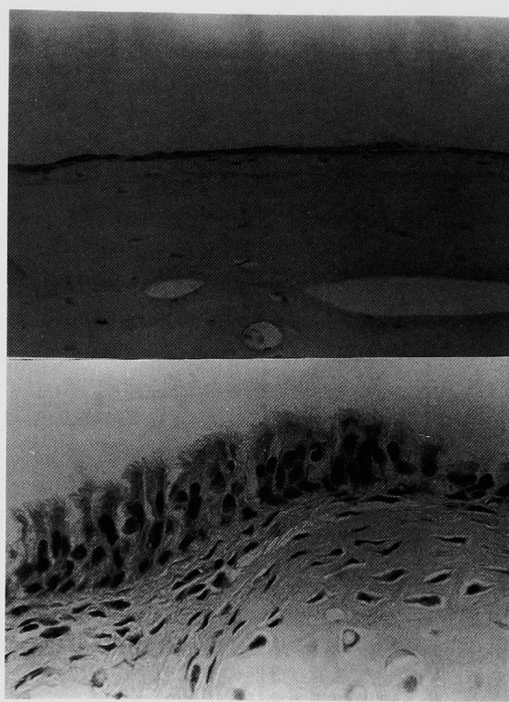


図4 チンチラ中耳粘膜（ $\times 100$ ）
（セファランチン2mg/kg投与による
OME抑制群）
（上段）正常な形態を示す鼓室粘膜
（下段）正常な形態を示す耳管粘膜

び $34.3 \pm 3.2 \text{ ng/ml}$ であり，対照群の $38.3 \pm 2.4 \text{ ng/ml}$ と比べ有意差はなかった。また， PGE_2 濃度は， 2 mg/kg/体重 および 5 mg/kg/体重 投与群各々 $4.21 \pm 0.6 \text{ ng/ml}$ ， $3.31 \pm 0.7 \text{ ng/ml}$ であり，対照群の $3.54 \pm 0.5 \text{ ng/ml}$ と比べ有意差はなかった。

3. 中耳粘膜および耳管粘膜の観察

対照群の中耳炎惹起後4日目の組織学的変化は，図3に示すごとく，鼓室扁平上皮部（非繊毛部）は，細胞の増生がみられ粘膜の肥厚が観察され，耳管，特に耳管鼓室口付近では分泌細胞の増加，繊毛細胞の核の配列の不規則さ，粘膜下の細胞浸潤，末梢血管の拡張などがみられた。また，中耳炎惹起後4日目の組織学的変化については， 1 mg/kg/体重 ， 2 mg/kg/体重 及び 5 mg/kg/体重 投与群で対照群と同様であった。一方， 2 mg/kg/体重 予防的投与により中耳炎の発症が抑制された中耳粘膜は，図4に示すごとく非繊毛部および繊毛部とも正常中耳粘膜と比べて差はなかった。

4. 中耳貯留液中，血液中ならびに胆汁中の ^3H -ce-

pharanthine 濃度

中耳貯留液中，血液中ならびに胆汁中の ^3H -cepharanthine 濃度は，図5に示すごとく，中耳貯留液中では，投与後0.5時間ですでに放射活性が認められ，6時間で最高濃度に達し，血液中の約10倍の濃度を示した。

5. ミクロオートラジオグラフィー

^3H -cepharanthine を用いた中耳のミクロオートラジオグラフィーでは，図6（上段）に示すごとく，鼓室扁平上皮部（非繊毛部）では，扁平細胞内や細胞間隙に散在的に放射活性が認められるのに対して，基部には比較的多く放射活性が認められた。一方，図6（下段）に示すごとく，耳管，特に耳管鼓室口付近では，耳管の繊毛細胞やこれらの細胞間隙に多く放射活性が認められ，繊毛細胞内では繊毛直下の細胞質に集中して放射活性が認められた。しかし，粘液層での分布は著明ではなかった。粘膜層に比べ粘膜下組織の浸潤細胞内や分泌細胞にも散在的ではあるが放射活性が認められ，その分布は非特異的であった。しかし，鼓室扁

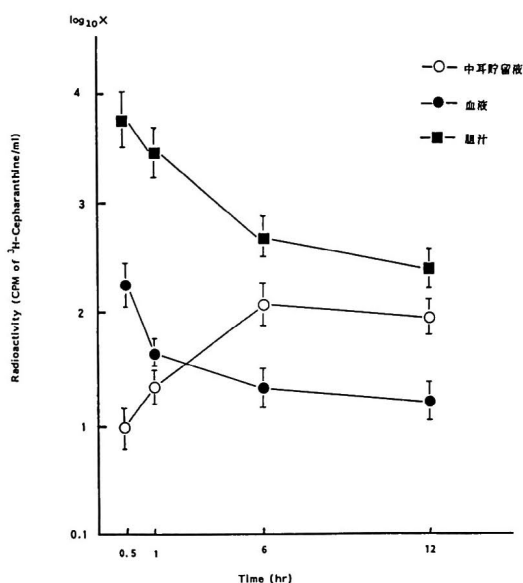


図5 ^3H -Cepharanthin (5mg/50 $\mu\text{Ci/ml/kg}$) 単回腹腔投与後の中耳貯留液血液および胆汁中の組織濃度 (3匹のチンチラにおける平均と標準偏差で表示)

平上皮部と比較した場合、耳管により多く放射活性が認められた。以上より、セファランチンは、鼓室粘膜の基底部や耳管繊毛細胞内、特に繊毛直下の細胞質内に多く分布することより、鼓室部の粘膜細胞や耳管の繊毛細胞の膜安定化に関与していると推察された。

考 察

セファランチンは抗結核剤として開発された生薬である。しかし、その後の研究により、本剤は多彩な薬理学的効果を有することが判明した。それは、抗毒素作用⁶⁾⁷⁾、抗アレルギー作用⁸⁾⁹⁾ならびに抗炎症作用^{10)~13)}などであるが、共通点は膜安定化作用である。滲出性中耳炎に対して、その抗アレルギー作用ならびに抗炎症作用に期待し、黒田¹⁴⁾、小田切ら¹⁵⁾、中山ら¹⁶⁾、津田ら¹⁷⁾、原ら¹⁸⁾により臨床的検討が行われてきたが、基礎的検討は十分にはなされていなかった。しかし、本実験の結果、実験的滲出性中耳炎に対して、中耳炎発症前からセファランチンを2mg/kg/体重投与した群で、明らかに発症を抑制することが示された。組織学的に、セファランチン2mg/kg/体重投与により滲出性中耳炎の発症が抑制された中耳粘膜は、正常であり、また、滲出性中耳炎惹起後セファランチンを投与した群では、対照群の中耳粘膜変化とほぼ同じ粘膜

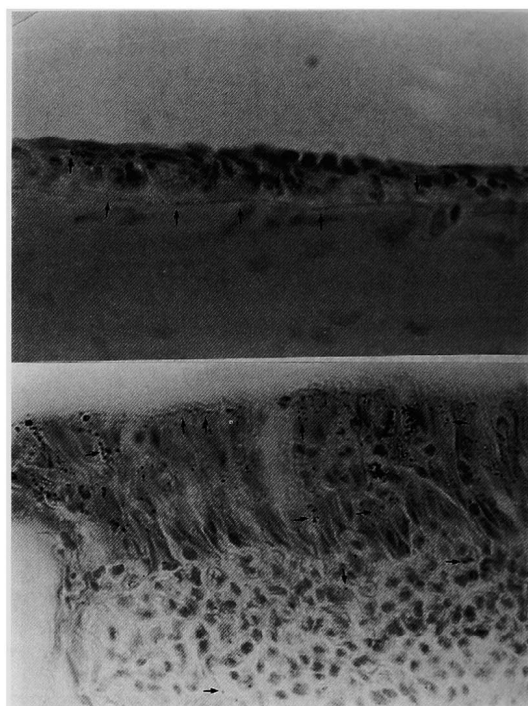


図6 ミクロオートラジオグラフィー (×100)

- (1) 鼓室粘膜の扁平細胞内、基底細胞内および粘膜下組織に放射活性が認められる (↑)
- (2) 耳管の繊毛細胞、分泌細胞および粘膜下組織にまで広く放射活性が認められる (↑)

変化であったこと、さらに中耳貯留液中の histamine および PGE_2 濃度が対照群のそれと違いがなかったことから、セファランチンは滲出性中耳炎の成立過程に作用するものと考えられるが、いったん発症した場合には、抑制効果が必ずしも十分ではなかった。しかし、いったん発症したものでも予防的に投与されていたものでは、対照群に比し滲出性中耳炎の治癒までの期間が短縮しており、セファランチンの効果が持続しているものと推察される。このことは、鈴木ら¹⁹⁾の報告と一致する。さらに、滲出性中耳炎の成因ならびに病態の維持に、肥満細胞からの histamine の遊離や、好中球からの lysozomal enzyme の放出が大きく関与していると考えられていること²⁰⁾や、セファランチンの作用として、肥満細胞からの histamine の遊離抑制が知られ、好中球からの lysozomal enzyme の放出抑制も考えられていることから考えあわせて、これらの作用により、予防的投与で滲出性中耳炎の発症が抑制

されたとも推察される。

一方、発症群においても効果がみられ、発症群では、その投与量には至適濃度があり、2mg/kg/体重で貯留液消失の促進効果がみられた。このことは、浅野ら²¹⁾が行った、微小循環血行動態に対するセファランチンの急性作用に対する実験において、その血管拡張作用と血流増加効果は10mg/kg 静注投与よりも5mg/kg 静注射投与の方がより効果的であり、セファランチンの作用に至適濃度が存在するという報告と合わせ、興味深い点である。

また、中耳貯留液中の放射活性ならびに中耳マイクロラジオグラフィーより、セファランチンは速やかに中耳に移行し、非特異的に鼓室ならびに耳管の各細胞に移行することが示され、なかでも、鼓室粘膜の基底部や耳管繊毛細胞内、特に繊毛直下の細胞質内や細胞間隙に多く分布することが明示された。このことは、セファランチンは鼓室部の基底細胞や耳管の繊毛細胞の細胞膜付近に分布することにより、膜安定化作用を発揮するのではないかということを推察させる。

以上より、セファランチンは膜安定化作用を中心とした薬理学的効果により、中耳腔内での炎症反応を抑制し、滲出性中耳炎の予防ならびに早期治療に効果あるものと推察され、臨床における有用性を支持する結果を得た。

結 語

チンチラに実験的滲出性中耳炎を惹起し、セファランチン1mg/kg/体重、2mg/kg/体重および5mg/kg/体重を腹腔内投与することにより、その薬理学的効果を検討し、以下のような結果を得た。

1. セファランチン2mg/kg/体重の予防的投与により中耳炎の発症を抑制し得た。

2. 中耳炎惹起後のセファランチン投与では、効果発現には至適濃度が存在し、チンチラでは2mg/kg/体重であった。

3. ³H-cepharanthine 投与により、セファランチンは、早期に中耳腔に移行し、非特異的に広く中耳腔粘膜に分布し、その効果を発揮するものと推察された。

以上より、セファランチンは実験的滲出性中耳炎に対して予防的効果をもち、さらに滲出性中耳炎を早期に改善し、本薬剤が滲出性中耳炎に有効であることが実験的に示された。

参 考 文 献

- 1) Suzuki M, Kawauchi H, Ueyama S et al: Immune-mediated otitis media with effusion. *Am J Otolaryngol* 9(5): 199-209, 1988.
- 2) 大倉洋甫, 小橋一弥, 鶴田泰人: 高速液体クロマトグラフィー・蛍光検出による血漿ヒスタミンの高感度測定. *The Hitachi Scientific Instrument News* 22(3): 1924-1926, 1976.
- 3) 稲川嘉夫: プロスタグランディンの定量. *臨床検査* 26(2): 135-147, 1982.
- 4) 横島徹熹, 堤 修一郎, 大槻俊治: Cepharranthine の生体内動態に関する研究. *医薬品研究* 17(3): 458-479, 1986.
- 5) 永田哲士, 柴田 治, 名和橙黄雄: ラジオオートグラフ多量作製のための簡便法. *解剖雑誌* 42: 162-166, 1967.
- 6) Utsumi K, Miyahara M, Sugiyama K et al: Effect of biscoclaurine alkaloid on the cell membrane fluidizing. *Arch Histochem & Cytochem* 9: 59-69, 1978.
- 7) Utsumi K, Miyahara M, Inoue M et al: Inhibition by cepharanthine on red blood cell potassium release induced by lead acetate and lysolecithin. *Cell Struc & Func* 1: 133-136, 1975.
- 8) 杉山勝三, 佐々木順三, 内海耕健 他: ラット肥満細胞からのヒスタミン遊離の Cepharranthine による抑制作用. *アレルギー* 25: 685-690, 1976.
- 9) 杉山勝三, 吉田裕昭: ハチ毒による肥満細胞からのヒスタミン遊離とセファランチンによる抑制作用. *基礎と臨床* 18: 33-36, 1984.
- 10) 内海耕健, 白石則之: 生体膜と過酸化脂質, 未熟児, 新生児の酸素障害. *医歯薬出版*: 128-139, 1981.
- 11) Sato E, Takehara Y, Sasaki J et al: Selective inhibition of stimulation responses of neutrophils by membrane modulators. *Cell Struc & Funct* 11: 125-134, 1986.
- 12) Matsuno T, Orita K, Inoue B et al: Inhibition of metabolic response of polymorphonuclear leukocytes by biscoclaurine alkaloids. *Biochem Pharmacol* 36(10): 1613-1616, 1987.
- 13) 池田忠世, 田中玄明: ペーチェット病の治療, 耳鼻臨床 68: 1037-1040, 1975.
- 14) 黒田光一: 滲出性中耳炎に対するセファランチンの高単位療法について. *耳展* 13: 279-282, 1970.
- 15) 小田切 醇, 大鹿徳洋: 中耳カタル, 滲出性中耳炎に対するセファランチンの高単位静注療法. *臨床と研究* 47: 506-508, 1970.
- 16) 中山亮之 他: 滲出性中耳炎における経口用セファラ

- ンチン (30mg/日) の使用経験. 耳展 27: 323-331, 1984.
- 17) 津田 守, 土井勝美, 古川喜英 他: 滲出性中耳炎に対するセファランチン内服療法 (30mg/日) の臨床的效果の検討. 基礎と臨床 19: 1849-1854, 1985.
- 18) 原 晃, 池田勝久, 鈴木 茂 他: 滲出性中耳炎におけるセファランチン大量内服療法とその効果. 耳展 28: 291-295, 1985.
- 19) 鈴木正志, 川内秀之, 藤吉達也 他: 実験的滲出性中耳炎におけるセファランチンの効果. アレルギー 36(5): 268-276, 1987.
- 20) Mogi G: Immunology of the Ear. edited by J. Bernstein and P. Ogra. Paven Press, NewYork, 1987, pp 289-290.
- 21) 浅野牧茂, 大久保千代次: ビスコクラウリン型アルカロイドの微小循環系血行動態に及ぼす急性作用について. 第11回アルカロイド研究会報告集. pp 48-49, 1985.
-

(原稿受付 1989年 2 月 6 日急載)

別刷請求先 〒879-56 大分郡挾間町医大ヶ丘1-1506
大分医科大学耳鼻咽喉科学教室 堀 文彦