正常および病的モルモットの耳管機能における表面活性物質の役割

札幌医科大学耳鼻咽喉科学教室(主任:形浦昭克教授)

児玉広幸, 朝倉光司

ROLE OF SURFACE TENSION LOWERING SUBSTANCES IN THE FUNCTION OF NORMAL AND DISEASED EUSTACHIAN TUBES OF GUINEA PIGS

HIROYUKI KODAMA, M.D. and KOHJI ASAKURA, M.D.

Department of Otolaryngology, Sapporo Medical College, Sapporo

To examine the role of surface tension lowering substances (STLSs), we measured changes in passive opening pressure (OP) and closing pressure (CP) in eustachian tubes of guinea pigs before and after washing the tubes with various solutions (saline solution, artificial pulmonary surfactant, synthetic phospholipids, and detergent)). The percent decreases in OP and CP in tubes washed with artificial surfactant were significantly higher than those washed with saline solution. Those washed with synthetic phospholipids or detergent (Triton X-100) did not differ from those washed with saline solution.

In guinea pigs with experimental otitis media produced by inoculation of formalin-killed *Haemophilus influenzae* into the middle ear cavity, the percent decreases in OP and CP in tubes washed with artificial pulmonary surfactant were significantly higher than in those washed with saline solution.

Artificial pulmonary surfactant was injected into the middle ear cavity of the guinea pigs with otitis media. At 5 days after inoculation, the inflammatory changes of the middle ear were much milder in animals with intratemporal application of artificial pulmonary surfactant than in those with saline application.

These results suggest the possible efficacy of treatment with artificial pulmonary surfactant for otitis media.

Key words: 耳管機能, 表面活性物質, 中耳炎, モルモット,
肺サーファクタント

A 96—0674—22125

はじめに

中耳および耳管粘膜表面には、肺サーファクタントに類似した表面活性物質の存在を示唆する報告がなされてきた。すなわち、耳管内腔の開閉に表面張力が関与していること¹⁾、耳管洗浄液が肺サーファクタントと同様な表面活性作用を持ち^{2)~6)}、生化学的にリン脂質組成が類似していること⁶⁾⁷⁾⁸⁾、組織学的には肺胞II型細胞に見られるのと同様なラメラ構造が耳管細胞にも見られること⁹⁾などである。また、耳管表面における表面活性物質の減少が滲出性中耳炎の発症に関連があることを示唆する報告もみられる¹⁰⁾¹¹⁾。

そこで我々は、モルモットの耳管機能の指標として受動的耳管開放圧および閉鎖圧を用い、これに対する各種表面活性物質の効果を調べた。さらに、モルモットに実験的中耳炎モデルを作製し、この耳管機能に対する表面活性物質の効果と、実際に表面活性物質を注入した場合の中耳炎治療過程に対する影響を検討した。この結果、新知見を得たので報告する。

方 法

(1) 使用動物

実験動物は、鼓膜所見及びプライエル反射が正常で

図1 耳管開放圧および閉鎖圧測定ならびに耳管洗浄方法

ある体重 300g 前後のハートレイ系モルモット（雄および雌）を用いた（ $n=100$ ）。

(2) 耳管開放圧および耳管閉鎖圧の測定方法(図1)

耳管開放圧 (opening pressure: 以下 OP と略す) および耳管閉鎖圧 (closing pressure: 以下 CP と略す) は Rapport ら¹²⁾ および下田ら⁶⁾ の方法に準じて測定した。すなわちモルモットを断頭後、耳後部を切開し、骨腔にドリルで小孔を開け、外径 2mm のポリエチレンチューブを差し込み、瞬間接着剤を用い空気漏れを防いだ。次にこのチューブに三方活栓を接着、一方はポンプ (Pharmasia 社製ペリスタルティックポンプ) に、もう一方は圧トランスデューサー (Siment 746) に接着し、レコーダー (Cardimax FD-35S, フクダ電子) に記録した。圧は最大 1100mmH₂O まで測定可能であった。このため、圧測定で 1100mmH₂O を越える場合は実験対象から除外した。ポンプより 0.3ml/min の空気をチューブ内に送り込み、同時にそのチューブ内圧を測定した。中耳腔内圧は徐々に上昇し、ある点に達すると閉鎖していた耳管は押し開かれ、耳管を通じて上咽頭へ空気が流出する。このピーク圧を OP とした。耳管開放後圧曲線は下降し、圧は急激に低下するが 0 にならず、一度平衡状態となる。この時の圧を CP とした。

(3) 生理的食塩水による耳管洗浄前後の耳管開放圧および耳管閉鎖圧の測定

耳管内腔に存在すると思われる表面活性物質を除くために、生理的食塩水（以下、生食）による洗浄を行った。室温に保温した生食 8ml を使用して耳管内腔を洗浄後、空気 2ml を通して、耳管内腔の生食を排除した。次に20分間室温保存の後、OP および CP を測定した。洗浄前の測定値を OP0 および CP0 とし、生食 8ml 洗浄後の測定値を OP1 および CP1 とした。

(4) 表面活性物質による耳管洗浄後の耳管開放圧および耳管閉鎖圧の測定

上記のように生食 8ml で耳管洗浄後、生食または各種表面活性物質を含む溶液 1ml で耳管を洗浄、上記と同様に空気を通し20分間後に開放圧 OP2 および閉鎖圧 CP2 を測定した。

表面活性物質として使用したのは以下の 5 種である。

- ① Triton X-100 (Polyoxyethylene (10) Octylphenyl Ether) (キシダ化学)
- ② サーフアクテン (東京田辺製薬)
- ③ Phosphatidylethanolamine (PE) (Sigma P-4264)
- ④ Phosphatidylcholine (PC) (Sigma P-4139)
- ⑤ Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) (Sigma P-5911)
- ⑥ DPPC + Dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG) (Sigma P-9789) (重量比, DPPC:

DPPG=4:1)

⑦ DPPC+Phosphatidylglycerol (PG) (Sigma P-5531) (重量比, DPPC: PG=4:1)

以上を, 0.1mg/ml, 1mg/ml, 10mg/ml の3種類の濃度でそれぞれ室温下で生食中に溶解または懸濁した。各リン脂質は, 生食1mlを加えた後, 10分間の超音波処理を行い, emulsion としたものを使用した。これを耳管洗浄に用いた。

サーファクテンは, 新生児の呼吸窮迫症候群(RDS)に対する治療の目的で, 経気道的に投与されている人工サーファクタントで, 細切牛肺の生食抽出物から粗表面活性物質を分離, 有機溶媒で脂質を抽出後, 合成脂質(パルミチン酸とトリパルミチン)を添加して表面活性が均一になるようにした成分調整肺サーファクタントである。構成成分は, リン脂質が78~87%, 脂肪酸が4~11%, トリアシルグリセロールが2~7%, 蛋白質(肺サーファクタント・アポ蛋白質, SP-BとSP-C)が0.5~2%含まれている¹³⁾

生食および表面活性物質を含む溶液1mlで洗浄前後の耳管開放圧(OP1およびOP2)および耳管閉鎖圧(CP1およびCP2)を測定し, 洗浄前後の変化率を以下のように計算した。

$$\text{開放圧の変化率 (\%)} = \frac{\text{OP1} - \text{OP2}}{\text{OP1}} \times 100$$

$$\text{閉鎖圧の変化率 (\%)} = \frac{\text{CP1} - \text{CP2}}{\text{CP1}} \times 100$$

圧の減少は正, 圧の上昇は負の値として表される。

(5) 実験的中耳炎の作製方法

実験的中耳炎作製にはインフルエンザ死菌を用いた。Haemophilus influenzae non typable (ATCC33391)を液体培地(Brain Heart infusion (Difco社) 37g/lにウサギ脱線維素血清を加えて5%としたもの)で培養後に集菌し, ホルマリンにて不活化処理した後, リン酸緩衝液中に浮遊させた(死菌浮遊液: 菌体濃度: 1×10^9 /ml)。モルモットをネンブター腹腔内注射にて麻酔後, 26ゲージ針を用い耳後部より経皮的に骨腔を穿刺し, こより上記の死菌浮遊液約0.2mlを両側中耳腔に注入した。注入3日後に観察し, 膿性耳漏や穿孔がなく, 経鼓膜的に中耳腔内に貯留液が認められるものを対象とした。

(6) 実験的中耳炎モルモットの耳管開放圧および耳管閉鎖圧の測定

(2)と同様に, 洗浄前開放圧OP0および洗浄前閉鎖圧CP0を測定し, (3)と同様に, 生食8mlで耳管洗浄後内

部の貯留液を排除, 空気2mlを通した後のOP1およびCP1を測定した。次に, 生食またはサーファクテン(10mg/ml)のそれぞれ1mlで耳管洗浄後, OP2およびCP2を測定した。

(7) 実験的中耳炎形成モルモットに対するサーファクテンの効果

モルモット中耳腔内に, 鼓膜よりインフルエンザ死菌浮遊液(ATCC35056)を第1日および第3日目に注入した。第6日目に膿性耳漏や穿孔がなく, 経鼓膜的に貯留液が認められた動物を対象とし, 左中耳腔内にサーファクテン(30mg/ml)0.2ml, 右中耳腔内に生食0.2mlをそれぞれ注入し, 第9または第11日目に断頭屠殺した。各々の群の中耳腔内貯留液の有無を比較し, その組織像を検討した。

結 果

1) 正常耳管における開放圧および閉鎖圧測定の基礎的検討

基礎実験として, 死後における経時的変化, および圧測定間隔時間の検討を行った。

1-1) 死後における経時的変化の検討(図2)

モルモット断頭屠殺後30分では, OP 515 ± 96 mmH₂O および CP 371 ± 148 mmH₂O, 死後3時間経過後では OP 522 ± 167 mmH₂O および CP 319 ± 102 mmH₂O であり, 有意差は認められなかった。本研究では, 死後3時間以内にすべての実験が終了するようにした。

1-2) 圧測定間隔時間の検討(図3)

一度圧測定した後, 30秒後に再び測定すると OP は 577 ± 170 mmH₂O から 313 ± 58 mmH₂O へ, CP は 300 ± 130 mmH₂O から 148 ± 61 mmH₂O へ著明に低下したが, 10分後(OPが 531 ± 83 mmH₂O, CPが 221 ± 144 mmH₂O) および20分後(OPが 564 ± 126 mmH₂O, CPが 217 ± 129 mmH₂O)では圧測定値の回復が認められた。このため, 本研究の圧測定間隔は20分とした。

1-3) 生食による耳管洗浄前後の圧変化の検討(図4)

OP0およびCP0を測定後生食8mlで洗浄し, OP1およびCP1を測定, さらに生食1mlで洗浄し, OP2およびCP2を測定した。OP0に比べOP1は上昇し, それよりOP2は低下する傾向がみられたが有意差はみられなかった。また, 耳管閉鎖圧の著明な変化はみられなかった。

2) 正常モルモット耳管の表面活性物質の洗浄による開放圧および閉鎖圧への影響(図5, 6)

図2 耳管開放圧および閉鎖圧の死後における経時的変化 (n = 4)

図3 耳管開放圧および閉鎖圧の測定間隔による変化 (n = 3)

生食及び各種表面活性物質の耳管洗浄による耳管開放圧および閉鎖圧の変化率を検討した。サーファクテン (10mg/ml) 洗浄後の耳管開放圧および閉鎖圧の変化率は生食洗浄後に比べ、有意に大きかった。トリトンX-100 (1mg/ml) 洗浄後の両圧の変化率も生食洗浄後の両圧の変化率より大きい傾向がみられたが、有意差はなかった。各種合成リン脂質を用いた場合、その変化率に生食との有意差はみられなかった。

3) 実験的中耳炎形成モルモット耳管における開放圧および閉鎖圧の測定

3-1) 実験的中耳炎の作製とその中耳腔粘膜組織像 (図7)

インフルエンザ死菌注入3日後、死亡したり化膿し

図4 生理的食塩水による耳管洗浄前後の耳管開放圧および閉鎖圧の変化 (n = 8)

た例を除き、両側中耳炎を形成したのは約9割であった。中耳炎形成群 (図7-2) の中耳腔粘膜組織像を対象群 (生食注入3日後) (図7-1) と比較すると、粘膜の浮腫、粘膜下組織の浮腫および炎症細胞浸潤、毛細血管の拡張等の炎症所見がみられた。

3-2) 実験的中耳炎形成モルモット耳管と正常耳管の耳管開放圧および閉鎖圧の比較 (表1, 2)

対照群に対し中耳炎形成群では、OP0 および CP0 はわずかに高いが有意差はなかった。生食8ml 洗浄後では、中耳炎群の OP1 および CP1 は対照群に比べて、低い傾向がみられた。しかし、各々の圧変化率に有意差は見られなかった。

4) 実験的中耳炎形成モルモット耳管の表面活性物質洗浄による開放圧および閉鎖圧への影響 (表3, 4)

サーファクテン (10mg/ml) 洗浄後の耳管開放圧の圧変化および圧変化率、耳管閉鎖圧の圧変化は生食洗浄後の値に比べ、有意に高かった。

5) 実験的中耳炎に対する表面活性物質注入の影響 (図8)

実験的中耳炎形成モルモットの中耳腔内に、生食あるいはサーファクテンを注入後3日目では、全例の両側に中耳貯留液がみられた。注入5日後の7例14耳を比較した。

肉眼的に貯留液が認められたのは、生食注入側で7耳中5耳で、サーファクテン注入側では7耳中1耳であった。

その中耳腔粘膜組織像を、以下の項目で比較した。

図5 各種表面活性物質による洗浄前後の耳管開放圧の変化

Sa: 生理的食塩水 (対照群) Su: サーフアクテン Tr: Triton X-100
 PE: Phosphatidylethanolamine PC: Phosphatidylcholine DP: Dipalmitoylphosphatidylcholine D+D: Dipalmitoylphosphatidylcholine+Dipalmitoylphosphatidylglycerol D+P: Dipalmitoylphosphatidylcholine+Dipalmytoylphosphatidylglycerol 01: 0.1mg/ml 1: 1mg/ml 10:210mg/ml () 内は例数

すなわち①粘膜肥厚 (肥厚のないもの: -、わずかに肥厚があるもの: ±, 対照群に比べて2倍以上の肥厚があるもの: +), ②炎症細胞浸潤 (みられないもの: -, 全視野を通してわずかにみられるもの: ±, 1視野に必ず見られるもの: +, 多数見られるもの: ++, 粘膜および粘膜下組織が炎症細胞で充満したもの: +++), ③粘膜下浮腫 (みられないもの: -, わずかにみられるもの: ±, 明らかにみられるもの: +, 粘膜下浮腫が+群の2倍以上の厚さあるもの: ++), ④毛細血管拡張 (見られないもの: -, わずかにみられるもの: ±, 1視野に1個以上見られるもの: +), および⑤貯留液中細胞 (これは, おもに多核球や単核球など白血球である, みられないもの: -, わずかにみられるもの: ±, 多数見られるもの: +, 中耳腔内にほぼ充満してみられるもの: ++)である。

図8に示すようにサーファクテン注入群では生食注入群に比べて, 炎症細胞浸潤, 粘膜下浮腫が少ないことが認められた。

考 察

Flisberg ら¹⁾は, 耳管内腔中を空気が通過するのに要した圧力よりも生食が通過するのに要した圧力の方が高いことを報告し, 空気と耳管粘膜の界面に表面張力が関与していることを初めて推論した。このように, 耳管を開放させるのに必要な圧を決定する主たる要素の一つとして耳管内腔の表面張力が考えられている。

耳管内腔など空気相が液体相に接する界面には, 通常表面張力が存在する。彎曲した耳管内腔でこの表面張力は, 内腔を虚脱させるように作用する。中耳を十分換気するのに必要な耳管開放圧は, 耳管内腔の表面張力による耳管の収縮力より大きいことが必要である。耳管内腔に働く圧Pは, LaPlaceの式($P=2T/r$, T: 表面張力 r: 耳管の半径)で計算される⁴⁾。これによれば, 耳管の半径が減少し表面張力が増加するにつれて, 耳管を虚脱させる圧力が増加する。耳管にも, 肺と同様なサーファクタントが存在し, これにより耳管内腔の表面張力が低下すると, 耳管開放圧が低下する。

図6 各種表面活性物質による洗浄前後の耳管閉鎖圧の変化
 Sa: 生理的食塩水 (対照群) Su: サーフアクテン Tr: Triton X-100
 PE: Phosphatidylethanolamine PC: Phosphatidylcholine DP: Dipalmitoylphosphatidylcholine D+D: Dipalmitoylphosphatidylcholine + Dipalmitoylphosphatidylglycerol D+P: Dipalmitoylphosphatidylcholine + Dipalmitoylphosphatidylglycerol
 01: 0.1mg/ml 1: 1mg/ml 10: 10mg/ml () 内は例数

図7-1 中耳腔粘膜組織像 (対照群; 生理的食塩水注入3日後)

図 7-2 中耳腔粘膜組織像（インフルエンザ死菌注入 3 日後）

表 1 実験的中耳炎耳管と正常耳管の開放圧の比較

洗浄物質		耳 管 開 放 圧			
		洗浄前 OP0 (mm H ₂ O)	生食洗浄後 OP1 (mm H ₂ O)	圧変化 OP0-OP1	変化率 PD (%)
対照群	生食 8ml (n = 8)	498 ± 187	603 ± 215	-105 ± 201	-25.7 ± 61.1
中耳炎形成群	生食 8ml (n = 13)	541 ± 145	455 ± 187	86 ± 247	2.9 ± 48.7

表 2 実験的中耳炎耳管と正常耳管の閉鎖圧の比較

洗浄物質		耳 管 閉 鎖 圧			
		洗浄前 CP0 (mm H ₂ O)	生食洗浄後 CP1 (mm H ₂ O)	圧変化 CP0-CP1	変化率 PD (%)
対照群	生食 8ml (n = 8)	308 ± 145	322 ± 130	-23 ± 101	-17.1 ± 41.0
中耳炎形成群	生食 8ml (n = 13)	357 ± 226	264 ± 120	93 ± 223	9.7 ± 39.9

表 3 実験的中耳炎耳管開放圧に対するサーファクテンの影響

洗浄物質		耳 管 開 放 圧			
		生食 8 ml 洗浄後 OP1 (mm H ₂ O)	サーファクテン 洗浄後 OP2 (mm H ₂ O)	圧変化 OP1-OP2	変化率 PD (%)
中耳炎形成群	生 食 (n = 7)	460 ± 249	389 ± 206	71 ± 86	14.1 ± 10.7
中耳炎形成群	サーファクテン (n = 7)	473 ± 97	280 ± 80	195 ± 111*	39.8 ± 19.4**

* : P < 0.05 ** : P < 0.01

表 4 実験的中耳炎耳管閉鎖圧に対するサーファクテンの影響

洗浄物質		耳 管 閉 鎖 圧			
		生食 8 ml 洗浄後 OP1(mm H ₂ O)	サーファクテン 洗浄後 OP2(mm H ₂ O)	圧変化 OP1-OP2	変化率 PD(%)
中耳炎形成群	生食 (n=7)	245±123	239±141	6±60	2.9±20.9
中耳炎形成群	サーファクテン(n=7)	277±117	167±73	110±99*	34.1±31.9

* : P<0.05

	NO	肉眼的貯留 液の有無	粘 膜 肥 厚	炎 症 細 胞 浸 潤	粘膜炎浮腫	毛 細 血 管 拡 張	貯 留 液 中 細 胞
生 食 注 入 群	1	+	+	+++	+	+	++
	2	+	±	++	++	±	++
	3	+	—	—	+	—	+
	4	—	±	—	++	±	—
	5	+	±	+	±	—	++
	6	+	—	±	+	—	—
	7	—	—	—	++	—	—
サーファクテン 注 入 群	1	—	±	++	—	—	±
	2	—	—	—	±	—	±
	3	+	—	—	+	+	—
	4	—	±	—	—	—	—
	5	—	—	—	++	+	+
	6	—	—	—	+	—	—
	7	—	—	+	±	—	—

図 8 実験的中耳炎における中耳腔粘液と中耳腔組織所見に及ぼすサーファクテン
中耳耳管注入の影響（注入日後）

しかし、耳管は通常閉鎖していて一時的に開口するのに対し、肺胞は常時開口し、内腔には空気が存在する。また、耳管粘膜表面を覆っている粘膜には多量の蛋白質が存在し、この蛋白質が閉鎖している両耳管壁を離れにくくする癒着物質であるといわれている。このため耳管壁表面に存在するリン脂質は、脂肪酸の疏水性部分が内側壁に配列して耳管表面を疏水性とし、粘液などの水溶液が付着しにくくなるように作用すると思われる。このように蛋白質などによる粘着を防ぎ、耳管を開口し易くする作用を持つことが考えられるので、耳管表面に存在するリン脂質は release agent と呼ばれる⁸⁾。

耳管開放圧に影響する因子としては、耳管内腔の表

面張力のほかに、耳管およびその周囲組織の弾性などが考えられる。特に圧測定間隔、死後硬直などによる測定結果への影響が考えられる。本研究としては、第一に、これらの基礎的検討を行った結果、圧測定間隔を20分、死後3時間以内に実験を終了することにし、表面張力以外の因子を可及的に除外しようとした。

耳管を生食 8ml で洗浄すると、耳管開放圧の明らかな上昇が観察された。これは、耳管内腔に存在すると報告されている^{2)~8)} リン脂質などの表面活性物質が生食による洗浄で失われたためと思われる。この結果は、耳管内腔に表面活性物質が存在するという報告^{2)~8)} を支持する結果である。Rapport ら¹²⁾ は、モルモット耳管を生食で洗浄前後の耳管開放圧および閉鎖圧を測定

し、洗浄後は両者ともに上昇することを報告した。また、下田ら⁶⁾は耳管洗浄液中のリン脂質の分析を行って、それが肺組織の組成と類似していることを報告し、耳管洗浄中にも肺サーファクタントと同様の物質が含まれていることを示唆した。すなわち耳管洗浄により release agent であるリン脂質が失われ、粘膜表面の疎水性が減少し、耳管内腔壁が癒着しやすくなったと考えられる。surface film や mucous blanket が洗浄により流されるために圧が上昇するという報告もある⁴⁾。

生食 8ml で洗浄後再び生食 1ml で洗浄した場合は、8ml 洗浄後の耳管開放圧と 1ml 洗浄後の耳管開放圧との間に有意な上昇はなく、逆にわずかに低下した。これは、8ml 洗浄で表面活性物質は十分洗い流され、さらに 1ml で洗浄しても結果は変わらないことを示している。この結果から、耳管内腔の表面活性物質洗浄による効果を検討する場合には、生食 8ml で洗浄した後の耳管を用いて行った。

生食洗浄前後における耳管閉鎖圧の間に有意差はなかった。

次にそれ自体で表面張力低下作用のある PC, PE, DPPC のリポームで耳管を洗浄したが、洗浄前後で耳管開放圧および閉鎖圧の有意な変化は見られなかった。

肺サーファクタント中には、DPPC を主とするリン脂質膜の拡散を惹起させ、表面張力をすばやく低下させる作用を制御している成分が存在すると推定されている。その成分として、不飽和型 PC¹⁵⁾¹⁶⁾、酸性リン脂質である PG¹⁷⁾¹⁸⁾ や、疎水性アポ蛋白質 (SP-B, SP-C)¹⁵⁾¹⁹⁾²⁰⁾ などが示されている。肺サーファクタントでは、subphase が酸性に傾くほどリン脂質、リポソームの界面への吸着速度が早くなると報告されている²¹⁾。従って、肺サーファクタント成分で、負の荷電を与える酸性リン脂質の PG の役割が注目されている。本研究では、DPPC に DPPG, PG を加えて耳管開放圧および閉鎖圧を測定したが、PG 添加による有意な差は見られなかった。一方サーファクテンでは、耳管開放圧および閉鎖圧に対し有意な減少がみられた。合成リン脂質とサーファクテンの耳管開放圧および閉鎖圧に対する効果の違いの理由として、サーファクテンにアポ蛋白質が含まれていることが考えられる。Yu ら²⁰⁾ は、単分子膜の表面張力を測定した基礎的実験において、DPPC/PG 混合物に SP-B を加えると、表面張力が低下することを報告し、その理由として SP-B が PG の単分子膜からの移動を促進することを推定している。

このように、DPPC に DPPG, PG を加えるだけでは耳管サーファクタントとしては不十分であり、疎水性アポ蛋白質が必要であると考えられる。

リン脂質以外の界面活性剤として、非イオン性界面活性剤であるトリトン X-100 を用いて耳管開放圧および閉鎖圧を測定したが、有意な変化は見られなかった。

本研究で利用した表面活性物質のうち、サーファクテンのみが耳管開放圧および閉鎖圧に対して有意な効果が認められた。今回の実験は死後の状態で、室温下に行ったが、サーファクテンの表面吸着速度は、12 から 37°C の範囲では温度が上昇するにつれて速くなると報告されている²²⁾ ので、37°C の条件下では耳管開放圧低下作用がさらに大きい可能性がある。利用したサーファクテン濃度の妥当性については、0.1, 1, および 10mg/ml で検討したが、10mg/ml で、有意な効果が見られた。これ以上の高濃度での検討は行わなかったが、高濃度の場合狭い耳管内腔への粘着効果の発現を恐れたからである。10mg/ml で有効な結果が得られたが、以下の実験はこの濃度を用いて行った。

実際の中耳炎に対する表面活性物質の臨床応用を考えると表面活性物質の投与方法としては、次の方法が考えられる。①鼓膜切開後および鼓膜チューブ留置後の貯留液のない状態における中耳腔に注入し、耳管機能を改善する。②滲出性中耳炎の貯留液のある中耳腔に注入し、耳管機能を改善する。この考えに基づいて、本研究の実験モデルを作製した。①のモデルとして、実験的中耳炎形成モルモットを作製した。このモルモットの耳管において、表面活性物質で洗浄した前後の耳管開放圧と閉鎖圧を測定し、生食対照群と比較検討した。②のモデルとしては、実験的中耳炎形成モルモットの中耳腔内に、経鼓膜的にサーファクテンを注入した。実験的中耳炎の作成方法としてはインフルエンザ死菌を注入する方法²³⁾を用いた。

生食洗浄前における実験的中耳炎の耳管開放圧および閉鎖圧は、正常対照群に比べ有意差はなかったが、わずかに高い傾向が見られた。生食 8ml 洗浄後に、対照群は耳管開放圧および閉鎖圧が高くなる傾向があるのに対し、中耳炎形成群では低くなる傾向が見られた。実験的中耳炎形成モルモットでは、中耳および耳管内に粘性液が貯留し、これが癒着物質として作用するために、耳管開放圧および閉鎖圧が上昇した状態にある。生食洗浄によって、この粘性貯留液が洗い流されたために開放圧および閉鎖圧が低下したと考えられる。これに対し、対照群では生食洗浄により表面活性物質が

失われるために耳管開放圧および閉鎖圧は上昇したと考えられる。中耳炎時における耳管開放圧については過去に幾つかの報告²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾がみられる。人の滲出性中耳炎の通気圧は正常範囲が大多数とされている²⁴⁾²⁵⁾。動物実験では、Shimoda ら²⁶⁾はインフルエンザ死菌による滲出性中耳炎モデルを作製し、正常耳管では生食洗浄後耳管開放圧が上昇したのに対し、中耳炎耳管では耳管開放圧は変化しなかったと報告している。化膿性中耳炎による実験で、White ら²⁷⁾は肺炎球菌により中耳炎を作製し、洗浄前の耳管開放圧は対象群よりも低値であったと報告した。この理由として彼らは、中耳炎急性期においては、膿性貯留液が耳管からの排泄されることにより、耳管が開放されているためと推測している。本実験モデルでは、化膿性中耳炎は除外しており、鼓室内に滲出性貯留液が認められた動物を選んだため、このような現象は見られなかったものと考えられる。

サーファクテンで耳管洗浄を行うと、耳管開放圧および閉鎖圧は有意に低下することが認められた。実験的中耳炎形成モルモットの耳管においても、サーファクテンを補充することによる効果が認められた。White ら²⁷⁾は化膿性中耳炎形成モルモットにおいて、肺サーファクタント（ブタ肺洗浄液のリン脂質分画を調製したもので、99%のリン脂質と1%の蛋白質が含まれる）洗浄液に、対象群に見られたのと同等の耳管開放圧低下が見られたと報告している。今回の実験では、中耳炎形成群の耳管開放圧および閉鎖圧は、正常対照群よりやや高い圧であったが、生食洗浄によってやや低下し、サーファクテン洗浄によりさらに低下した。この結果から、鼓膜切開後生食等で鼓室内を洗浄し、貯留液を十分除去した後にサーファクテンを注入する方法が耳管機能回復による中耳炎治療法として示唆される。

インフルエンザ死菌注入による実験的中耳炎形成モルモットのサーファクテン注入群において、中耳貯留液はほとんど見られなかった。また対照群（生食注入群）に比べて、サーファクテン注入群では中耳粘膜における炎症所見は少ない傾向であった。サーファクテン注入により、中耳腔内の炎症性物質が中耳腔から耳管へ排泄されたためと考えられる。肉眼的に中耳貯留液が消失し、中耳腔内に炎症細胞が見られなくなった後も、粘膜の炎症所見が残存している例が認められた。この結果から、中耳貯留液が排泄された後、粘膜の炎症が消退すると考えられる。すなわち、サーファクテ

ン注入によって、中耳腔内の炎症性物質が排泄され易くなったと考えられる。耳管開放圧および閉鎖圧の実験系では、圧平衡作用について主に見たものであった。耳管には、圧平衡作用と並んで粘液纖毛輸送系があるといわれているが、中耳腔へのサーファクテン注入によるこの輸送系に対する影響の検討も必要であろう。

ま と め

1) 今回我々はモルモット耳管を用い耳管開放圧および閉鎖圧を測定した。死後3時間以内および測定間隔を20分以上とした場合、前値との有意差はみられなかった。

2) 耳管を生食8mlで洗浄すると、耳管開放圧は上昇する傾向がみられた。耳管閉鎖圧に変化は見られなかった。

3) 表面活性物質として、合成リン脂質、蛋白質を含む人工肺サーファクタント（サーファクテン）。合成表面活性物質で耳管を洗浄し、その効果を検討した。サーファクテンで耳管を洗浄した後、耳管開放圧および閉鎖圧は有意に低下したが他の表面活性物質で耳管洗浄した時、有意差はみられなかった。

4) インフルエンザ死菌をモルモット中耳腔内に注入し、実験的中耳炎を作成した。

5) 中耳炎耳管を生食の食塩水8mlで洗浄すると耳管開放圧及び閉鎖圧は低下する傾向がみられた。

6) 中耳炎耳管をサーファクテンで洗浄すると、耳管開放圧および閉鎖圧の有意な低下が見られた。

7) 実験的中耳炎形成モルモットの中耳腔内にサーファクテンを注入後5日目の組織像を検討した。対照群に比べて、中耳貯留液はほとんど認められず、組織像では炎症所見が少なかった。

以上の結果、サーファクタントの中耳腔内注入が耳管機能を好転し、中耳の炎症を消退せしめると考えられるので、滲出性中耳炎の治療方法として有用であることが示唆された。

参 考 文 献

- 1) Flisberg K, Ingelstedt S, Ortegren U: The valve and "locking" mechanisms of the eustachian tube. *Acta Otolaryngol Suppl* 182: 57-68, 1963.
- 2) Brookler KH, Birken EA: Surface tension lowering substance of the eustachian tube. *Laryngoscope* 81: 1671-1673, 1971.
- 3) Birken EA, Brookler KH: Surface tension lowering

- substance of the canine eustachian tube. *Ann Otol* 81: 268-271, 1972.
- 4) Hagan WE: The mucous blanket of the eustachian tube: a morphologic and surface property demonstration. *ORL* 84: 242-268, 1977.
 - 5) Hagan WE: Surface tension lowering substance in eustachian tube function. *Laryngoscope* 87: 1033-1045, 1977.
 - 6) 下田和夫, 森本賢治: プタ耳管における Surface Tension Lowering Substance の検討. *札幌医誌* 53: 353-365, 1986.
 - 7) Wheeler SL, Pool GL, Lumb RH: Rat eustachian tube synthesizes disaturated phosphatidylcholine. *BBA* 794: 348-349, 1984.
 - 8) Hills BA: Analysis of eustachian surfactant and its function as a release agent. *Arch Otolaryngol* 110: 3-9, 1984.
 - 9) Tsuruhara K, Morii S, Kumazawa T: Ultracytochemical demonstration of phospholipids in the surface layer of the guinea pig eustachian tube. *Acta Otolaryngol* 108: 434-441, 1989.
 - 10) Grace A, Kwok P, Hawke M: Surfactant in middle ear effusions. *Otolaryngol Head Neck Surg* 96: 336-340, 1987.
 - 11) Svane-Knudsen V, Larsen HF, Brask T: Secretory otitis media-A question of surface activity in the eustachian tube? *Acta Otolaryngol* 105: 114-119, 1988.
 - 12) Rapport PN, Lim DJ, Weiss HS: Surface-active agent in eustachian tube function. *Arch Otolaryngol* 101: 305-311, 1975.
 - 13) 小川雄之亮, 金子広司, 板倉敬乃, 中村利彦, 大浜洋一 他: 呼吸窮迫症候群の肺サーファクタント療法. *小児科臨床* 42: 733-741, 1989.
 - 14) 矢部利江: 小児と成人中耳貯留液の生化学的特徴 第一報 脂質成分. *日耳鼻* 94: 516-524, 1991.
 - 15) 秋野豊明: 肺の脂質代謝と surfactant, 望月正司 他編: 臨床生理学シリーズ② 肺. 南江堂, 東京, 1989, 2-16頁.
 - 16) Egberts J, Sloot H, Mazure A: Minimal surface tension, squeeze-out and transition temperatures of binary mixtures of dipalmitoylphosphatidylcholine and unsaturated phospholipids. *BBA* 1002: 109-113, 1989.
 - 17) Hallman M, Gluck L: Phosphatidylglycerol in lung surfactant. III. Possible modifier of surfactant function. *J Lipid Res* 17: 257-262, 1976.
 - 18) Cernansky G, Liao DF, Hashim SA et al: Estimation of phosphatidylglycerol in fluids containing pulmonary surfactant. *J Lipid Res* 21: 1128-1131, 1980.
 - 19) King RJ, Macbeth MC: Physicochemical properties of dipalmitoyl phosphatidylcholine after interaction with an apolipoprotein of pulmonary surfactant. *BBA* 557: 86-101, 1976.
 - 20) Yu SH, Possmayer F: Role of bovine pulmonary surfactant-associated proteins in the surface-active property of phospholipid mixtures. *BBA* 1046: 233-241, 1990.
 - 21) 田中勇次, 武井恒知, 金沢洋作, 木内 詮, 藤原哲郎: 人工肺 surfactant の物理化学的ならびに生理学的性質. *日界面医学会誌* 13: 111-120, 1982.
 - 22) 小林 勉: Subphase の影響, 吉田清一 他編: 肺表面活性物質の現在. 真興交易医書出版部, 東京, 1990, 7-15頁.
 - 23) DeMaria TF, Briggs BR, Lim DJ et al: Experimental otitis media with effusion following middle ear inoculation of nonviable H influenzae. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 93: 52-56, 1984.
 - 24) 高橋晴雄, 林 正彦, 倉田響介, 本庄 巖: 滲出性中耳炎の耳管機能. *耳鼻臨床* 79: 1589-1597, 1986.
 - 25) 湯浅 涼, 高倉 稔: 耳管の物理的性質の解析. *日耳鼻* 74: 749-754, 1971.
 - 26) Shimoda K, Shido F, Morimoto K et al: A role of surface tension lowering substance in eustachian tube function. *Auris Nasus Larynx* 12 (Suppl 1): 132-134, 1985.
 - 27) White P, Hermansson A, Svinhufvud M: Surfactant and isoprenaline effect on eustachian tube opening in rats with acute otitis media. *Am J Otolaryngol* 11: 389-392, 1990.

(1992年11月30日受稿 1993年2月4日受理 急載)

別刷請求先 〒060 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学耳鼻咽喉科学教室 児玉宏幸

<p>A 96—0674—22125</p> <p>正常および病的モルモット耳管機能における 表面活性物質の役割 児玉広幸・朝倉光司（札幌大）</p> <p>モルモットの受動的耳管開放圧および閉鎖圧を指標とし、生理的食塩水を対照として、表面活性物質による耳管洗浄後の変化を調べた。人工肺サーファクタントによる耳管洗浄後、耳管開放圧および耳管閉鎖圧は有意に低下したが、合成リン脂質、および界面活性剤洗浄後には有意差はみられなかった。次に、インフルエンザ死菌を鼓室内に注入して実験的中耳炎を作り、この耳管を人工肺サーファクタントで洗浄したところ、生食洗浄後に比べて有意に耳管開放圧および閉鎖圧が減少した。実験的中耳炎鼓室内に人工肺サーファクタントを注入したところ、5日後に生食を注入した対照群と比較して、炎症所見の改善がみられた。</p>	<p>A 96—0659—61593</p> <p>内転型けいれん性発声障害の3例に認められた 声帯運動調節異常 —(/ke/の場合)— 波沢三伸（東医歯大・難治研）</p> <p>/ke/の、1回ごとに吸気をはさんだ反復発声を行ったときの声帯運動をファイバースコープを用いてビデオ録画し、両側声帯が発声を意図して内転運動を始めてから破裂を完了して接するまでの声門開閉度の変化を観察したところ以下のことが分かった。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 正常では両側声帯の膜様部が接触する前に破裂が完了していた。 2. SD では破裂の前にいったん声門が閉鎖（破裂前閉鎖）し、破裂のために改めて声門間隙を形成するパターンを示した。 3. 破裂前閉鎖時間の持続が長いほど声のつまりが強いと考えられた。 4. SD の3例とも VOT が短かった。 5. 以上により、SD のある例では構音器官の協調運動をつかさどる中枢に問題がある可能性が示唆された。
<p>A 96—0685—91131</p> <p>単純ヘルペスウイルスによる実験的顔面神経麻痺に関する研究 杉田俊明（愛媛大）</p> <p>HSV1 型 (KOS 株 4.5×10^6 pfu/ml) をマウス耳介後面に接種した。104 匹中56匹 (56.7%) に接種後6から9日目に接種側のみに顔面神経麻痺が発症した。麻痺は3から7日間で完治したが、眼輪筋が障害され易い傾向があった。麻痺が発症した動物では間接蛍光抗体法により36.8%に HSV 抗原が麻痺側の膝神経節、衛星細胞、シュワン細胞、神経線維より検出され、病理組織学的には膝神経節から中枢側にリンパ球浸潤、空胞変性などの炎症所見が認められたが、対側および麻痺の認められなかった動物には異常所見は認められなかった。炎症所見は麻痺治癒後約1カ月で消失した。臨床経過、病理所見ともにペル麻痺の軽度麻痺の報告と酷似していた。</p>	<p>A 96—0665—20010</p> <p>全胚培養法によるマウス聴器の発生学的研究 杉浦友昭（神戸西市民）</p> <p>胎齢11.5日目のマウス胎仔を6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48時間全胚培養した。培養胎仔は、各培養時間の終了時点で主として聴器（特に中耳）に関して形態学的・組織学的に検討を加えた。全身の発育は36時間後頃より抑制され、分化は培養時間が長引くにつれ遅延した。聴器では、12-30時間後に耳胞は前庭・蝸牛・半規管へと発達し、18-36時間後に外耳道と耳介が頭部表面に観察され、12時間後間までにアブミ骨原基の出現と環状形成がみられ、以後発達しつつある内耳骨包とともに底部の形成が始まった。18時間後にはツチ・キヌタ骨原基、顔面神経水平部も識別された。発達は42-48時間後停止したが、本培養下で胎生11.5-13日の発達過程を再現し得ることが分かった。</p>