研 究

ウイルスの培養耳管線毛運動に及ぼす影響

大野 義春・中井 義明・大橋 淑宏
杉浦 欣一・江崎 裕介・古谷 博之

Influence of Influenza A Virus on Ciliary Activity of Cultured Eustachian Tube Mucosa

Yoshiharu Ohno, Yoshiaki Nakai, Yoshihiro Ohashi,
Yoshikazu Sugiura, Yusuke Esaki and Hiroyuki Furuya
(Osaka City University)

Clinical investigation suggests that viral infection is involved in middle ear diseases including otitis media with effusion. We studied experimentally the direct effect of influenza A virus on the ciliary activity in the eustachian tube. Guinea pigs with normal otoscopic examination were used. Thin mucosal materials including epithelial layer of the midportion of the eustachian tube were obtained from each animal. Each material was immersed in RPMI 1640 medium. The most active ciliated cell of each culture was selected to be examined for ciliary activity (beats/min) at an ambient temperature of 30°C. Then each medium was replaced by RPMI 1640 containing a variety of influenza A viruses, and time-course changes of the ciliary activity of cells whose baseline activity was previously determined, up to 48 hours. Some materials cultured in the same fresh RPMI 1640 containing no virus served as controls. In the medium containing low concentrations of virus, ciliated cells did not demonstrate a dramatic decrease of ciliary activity. However, ciliary activity was decreased dramatically in the presence of higher concentrations (3.3×10^6 PFU/ml), and most cells stopped their beating activity. Cultures exposed to virus were perfused with fresh RPMI 1640 for 12 hours to remove the virus, but quick recovery of the ciliary activity was not observed during observation, up to 12 hours.

Key words: ciliary activity, eustachian tube, influenza A virus, tissue culture

緒 言

滲出性中耳炎は幼小児に好発し、中耳液貯留とこれに付随して難聴をきたす疾患である。その病因について、近年解明が試みられているが、不明な点も多い。

滲出性中耳炎は急性中耳炎にやや遅れて発症

のピークがあり、滲出性中耳炎患児の多くが急性中耳炎の既往を有することより、滲出性中耳炎は急性中耳炎と密接な関係にあることが知られている¹⁾²⁾。また、急性中耳炎に上気道感染の先行する頻度の高いことが知られている³⁾⁴⁾。したがって、上気道感染が滲出性中耳炎の発症に

何らかの形で関与している可能性は高い。

ところで、幼小児の上気道感染においてはウイルスによるものが高頻度であることが知られている。そこで、上気道炎を惹起するウイルスの代表の一つであるインフルエンザAウイルスの耳管粘膜に及ぼす影響を解明する目的で、インフルエンザAウイルスの耳管粘膜線毛運動に及ぼす影響を観察した。なお、本研究においては、耳管線毛運動に及ぼす直接的な影響を比較的長期的に観察するために培養耳管粘膜を用いた *in vitro* の実験系で観察した。

研究材料および方法

体重約 250 グラムのハートレー系モルモット 15匹を用いた。これら動物を断頭し両側耳管全長を採取し、直ちに培養液 RPMI 1640⁵⁾⁶⁾ 中に浸した。次いで耳管中央部を採取し、実体顕微鏡下に眼科用微細メスを用いて厚さ 60~70 μm の粘膜上皮薄片を採取した。各々の粘膜薄片を RPMI 1640 で充満したローズ・チェンバー(容積: 3 ml) 内に封入し、このようにして総計30個の耳管粘膜上皮の組織培養を作成した。

30個の培養組織を各群6個より成る5群(対照群および A-D 群)に無作為に分け、各培養組織中の最も運動性の活発な線毛細胞の線毛運動数(打/分)を大橋・中井の電気光学的方法⁷⁾を用いて、環境温度 30°C で測定し、基準線毛運動数とした。

次に、対照群の培養液は新鮮な PRMI 1640 に置換し、A,B,C,D 群はそれぞれ 3.3×10^2 , 3.3×10^4 , 3.3×10^6 , 3.3×10^8 PFU/ml の臨床分離インフルエンザAウイルスを含む RPMI 1640 に置換した。5群30個の組織培養片の基準線毛運動を測定した細胞の線毛運動数(打/分)を培養液置換後、1, 2, 3, 6, 12, 24, 36, 48時間後に、環境温度 30°C で同様の方法によって測定し、基準値に対する%値を算出した。

また、線毛運動の回復性を検討するために、各種濃度のインフルエンザウイルスを含む培養液中で48時間培養した直後に、ウイルスを含まない培養液 RPMI 1640 に置換し、その後12時

間後まで同様の方法によって線毛運動の回復性を観察した。

このようにして得られた個々の線毛運動数より平均値と標準偏差値を算出し、変化が有意であるか否かは t-test によって統計学的に処理し、本研究においては、 $p < 0.05$ をもって有意差ありと判定した。なお、培養液は同一濃度のインフルエンザAウイルスを含む培養液と12時間毎に交換した。

成 績

1. 対照群

インフルエンザを含まない RPMI 1640 で培養した対照群の線毛運動数は48時間後まで有意の変化を示さなかった。

2. ウイルス群

A 群の線毛運動数は培養12時間後までは対照群と有意差を認めなかったが、24時間後以降は対照群よりも有意に低下することが観察された。B 群の線毛運動数は6時間後までは対照群と有意差を認めなかったが、12時間後以降は有意に低下を示し、48時間後の線毛運動数は対照群の約70%であった。また、C 群の線毛運動数は培養直後より低下傾向を示し、1時間後ですでに対照群よりも有意に低下していた。24時間後ではC 群の線毛運動数は対照群の50%で、36時間以降では線毛運動の停止した細胞も観察された。D 群の線毛運動も培養直後より低下傾向を示し、1時間後ですでに対照群よりも有意の低下が認められた。2時間後には対照群の約50%となり、6時間後以降では一部の線毛運動の停止が観察された。また、D 群の線毛運動は24時間以後では完全に停止していることが観察された(図1)。

A-D 群の培養液をウイルスを含まない培養液 RPMI 1640 に置換後には、AおよびB 群の線毛運動数は4時間後より徐々に回復したが、12時間後でもその回復性は有意ではなかった。また、CおよびD 群の線毛運動数は全く回復性を示さなかった(図2, 3)。

考 察

中耳・耳管粘膜は気道粘膜と類似の線毛上皮で構成されており、粘液線毛系を有している⁸⁾⁹⁾。したがって、種々の有害因子が侵入した場合には、粘液線毛運動による有害因子の排除機能が働いて、中耳・耳管の恒常性を保持する仕組みとなっている。ところが、何らかの原因で粘液線毛機能が障害されると、機械的な異物排除機能が低下して、滲出性中耳炎などの種々の中耳疾患が発生するものと考えられる¹⁰⁾¹¹⁾。

滲出性中耳炎の病態の本質は中耳腔で過剰産生された液排出障害と考えられ、実際、滲出性中耳炎患者における中耳・耳管の粘液線毛輸送速度の遅延ないしは廃絶がラジオアイソトープを用いた研究より報告されている¹²⁾。この粘液線毛輸送機能は線毛細胞による線毛運動とこれを被覆している粘液層の協調作用によって営まれる機械的な生体防御作用である。したがって、粘液線毛機能不全は線毛運動の低下、粘液層の質的・量的変化あるいは線毛と粘液層の協調性

図1 線毛運動数の経時的変化

対照群（ウイルスを含まない培養液中で培養した群[○]）の線毛運動数は48時間内には有意の変化を認めなかった。A群（ 3.3×10^2 PFU/ml 中で培養[X]）の線毛運動数は48時間後には有意の低下を示した。B群（ 3.3×10^4 PFU/ml[△]）、C群（ 3.3×10^6 PFU/ml [●]）およびD群（ 3.3×10^8 PFU/ml [■]）の線毛運動数はさらに早期より低下を示した。

図2 A群の線毛運動数の回復

12時間の観察中に有意の回復は観察されなかった。

図3 B群の線毛運動数の回復

12時間の観察中に有意の回復は観察されなかった。

の障害のいずれによっても引き起こされうる¹³⁾ 近年, 粘液線毛系の構成因子の一つである線毛機能の病態が滲出性中耳炎の転帰や予後に深く関与していることが報告されている¹⁴⁾. すなわち, 耳管鼓室口の線毛機能が良好に保持されている症例では非観血的な治療によって治癒していることが示されている.

そこで本研究においては, 耳管線毛機能にインフルエンザAウイルスがどのような影響を及ぼすかについて粘液層の影響を除外した実験系を用いて検討した. 本研究の成績より, インフルエンザAウイルスは耳管の線毛機能を低下させる作用を有することが示されたが, その線毛障害作用にはウイルスの濃度が大きく関与していた. また, インフルエンザAウイルスを含む培養液中で48時間培養した場合には, 洗浄によっても速やかな機能改善は認められず, 本ウイルスによる線毛機能障害は比較的長期にわたって持続することが示唆された. したがって, インフルエンザAウイルスは耳管線毛機能を障害することによって, 耳管粘液線毛輸送を障害しうる可能性が示された.

しかし, 本成績は粘液層の影響を除外した実験系でなされたものであり, 生体内においては線毛機能は異なった反応を生じる可能性も否定できない. すなわち, 粘液層には大きな緩衝作用のあることが知られており, この緩衝作用によって線毛機能の障害は本実験系で認められた障害よりもかなり軽微であることも考えられる. 逆に, インフルエンザAウイルスは実験動物の耳管粘膜に感染を惹起しうることが実験的に示されているので^{15) 16)}, 感染が引き金となり生体内では種々の生理活性物質が遊離され, より強く線毛障害の発現する可能性¹⁷⁾や粘液層の質的变化を惹起しうる可能性も考えられる.

したがって, 滲出性中耳炎などの中耳疾患におけるインフルエンザウイルスの関与を解明するためには, 生体内にインフルエンザAウイルスが侵入した際の粘液線毛系に対する影響を検討する必要があるものと考えられる.

結 語

臨床疫学的研究より, インフルエンザウイルスなどのウイルスが滲出性中耳炎などの中耳疾患に関与していることが想像される. そこで, インフルエンザAウイルスの耳管線毛運動に対する直線的な影響を実験的に観察した. 実験には健常なモルモットより耳管中央部の粘膜上皮の薄片を採取し, 培養液 RPMI 1640 中で培養した. それぞれの培養粘膜炎の最も運動性の高い線毛運動を基準細胞とし, 環境温度 30°C で線毛運動数 (打/分) を測定した. 次いで, 培養液を各種濃度のインフルエンザAウイルスを含む培養液に置換し, 基準細胞の経時的な線毛運動数の時間的推移を48時間後まで観察した. また, 対照としてインフルエンザAウイルスを含まない培養液中で耳管線毛上皮を培養した. 比較的低濃度のウイルス中では線毛運動の低下は軽度であったが, 3.3×10^6 PFU/ml 以上の培養液中では数時間以内に線毛運動は著明に減少し, 36時間以上で線毛運動の停止も観察された. また, ウイルスを含む培養液中で48時間培養した後に, ウイルスを洗浄して線毛運動の回復を観察したが, 12時間の観察中に運動性の回復は観察されなかった.

文 献

- 1) Lim DJ and DeMaria TF: Pathogenesis of otitis media; bacteriology and immunology. *Laryngoscope* 92: 278~286, 1982.
- 2) 茂木五郎: 滲出性中耳炎の成因. *JOHNS* 1: 617~623, 1985.
- 3) Van Cauwenberge PB: Relevant and irrelevant predisposing factors in secretory otitis media. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 414: 147~153, 1984.
- 4) Henderson FW, Collier AM, Sanyal MA, et al: A longitudinal study of respiratory viruses and bacteria in the etiology of acute otitis media with effusion. *N Engl Med* 306: 1377~1383, 1983.
- 5) Moore GE, Gerner RE and Franklin HA: Culture of normal human leukocytes. *JAMA* 199: 519~524, 1967.

- 6) Ohashi Y, Nakai Y, Koshimo H, et al : Ciliary activity in the in vitro tubotympanum. Arch Otorhinolaryngol **243** : 317~319, 1986.
- 7) Ohashi Y and Nakai Y : Functional and morphological studies on chronic sinusitis mucous membrane I ; decline of ciliary action in chronic sinusitis. Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl 397 : 3~9, 1983.
- 8) Lim DJ, Paparella MM and Kimura RS : Ultrastructure of the eustachian tube and middle ear in the guinea pig. Acta Otolaryngol (Stockh) **63** : 425~444, 1967.
- 9) Ohashi Y, Nakai Y and Kihara S : Ciliary activity of the middle ear lining in guinea pigs. Ann Otol Rhinol Laryngol **94** : 419~423, 1985.
- 10) 大橋淑宏, 中井義明, 古下博之, 他 : 二酸化窒素暴露による実験的滲出性中耳炎の粘膜病態とそれに及ぼすカルボシステインの効果に関する研究. 日耳鼻 **91** : 71~87, 1988.
- 11) Ohashi Y, Nakai Y, Ikeoka H, 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.
- 12) Kärja J, Nuutinen J and Karjalainen P : Mucociliary function in children with secretory otitis media. Acta Otolaryngol (Stockh) **95** : 544~546, 1983.
- 13) Wanner A : Clinical aspects of mucociliary transport. Am Rev Respir Dis **116** : 73~125, 1977.
- 14) Wacker DF and Howe ML : Middle ear ciliary activity as a determinant tympanostomy tube placement. Otolaryngol Head Neck Surg **95** : 434~437, 1986.
- 15) Giebink GS, Ripley ML and Wright PF : Eustachian tube histopathology during experimental influenza A virus infection in the chinchilla. Ann Otol Rhinol Laryngol **96** : 199~206, 1987.
- 16) Lim DJ, Bluestone CD, Klein JO, et al : Ultrastructural pathology of the tubotympanum following experimental influenza A virus induced otitis media. Recent Advance in Otitis Media. pp 436~438, BC Decker Inc, Toronto, Philadelphia, 1987.
- 17) 杉浦欣一, 中井義明, 大橋淑宏, 他 : ヒスタミンの中耳・耳管粘液線毛機能に及ぼす影響. Ear Res Jpn **20** : 369~370, 1989.

原稿受付 : 平成 2 年 2 月 5 日
原稿採択 : 平成 2 年 2 月 20 日
別刷請求先 : 大橋淑宏
〒545 大阪市阿倍野区旭町1-5-7
大阪市立大学医学部耳鼻咽喉科学教室