

研究経過報告書

1. 研究課題名 RSウイルス感染後の細菌感染に対する中耳粘膜上皮細胞バリア機構の変化とマクロライド系抗生物質の予防効果の検討：TLRファミリーおよび細胞間接着分子の発現変化の解析
2. 研究代表者氏名 山口 航
3. 研究発表

4. 研究実績

・ヒト中耳粘膜上皮細胞培養の確立

ヒト中耳粘膜上皮細胞は I 型コラーゲンコート培養皿を用いて培養する。培地組成は Dulbecco's modified Eagle's medium、BEBM (Lonza) の 1:1 混成とし、10%FBS を加え、添加因子に penicillin (100 U/ml)、streptomycin (100 µg/ml)、gentamicin (50 µg/ml)、amphotericin B (2.5 µg/ml)、glutamine (4 mM)、adenine (0.18 mM)、insulin (5.0 µg/ml)、hydrocortisone (0.4 µg/ml)、cholera toxin (0.1 mM)、triiodothyronine (20pM) (Sigma-Aldrich)、epidermal growth factor (10 ng/ml) (Lonza)を用いた。環境設定は 37℃、5% CO₂ とし、培地交換は 1 日おきに行なった。上皮系のマーカーとして抗 pancytokeratin 抗体、間葉系のマーカーとして抗 vimentin 抗体を用い、細胞を検定し、上皮系の細胞であることが確認された。

・TLR 発現解析

a) 蛍光免疫染色

チャンバースライドにて培養した上述細胞を 4%パラホルムアルデヒドによる固定処理した。1 次抗体に抗 TLR 2 抗体、抗 TLR 4 抗体を用い、2 次抗体は抗マウス IgG 抗体 (Alexa Fluor 488) あるいは抗ラビット抗体 (Alexa Fluor 488) を用い、蛍光免疫染色で解析した。結果、TLR2、TLR4 いずれも発現が陽性であった。

・今後の展望

上皮細胞バリア機能について、ウイルス性上気道炎症での中耳粘膜上皮細胞の役割を明らかにするためには、まず、ウイルス感染で起こる中耳粘膜上皮細胞の反応について理解する必要がある。これまで、ヒト中耳粘膜上皮細胞を用いた研究は細胞ソースの入手が困難であることが問題となっていた。今回の研究では実験に用いる、ヒト中耳粘膜細胞の培養方法を確立することを目的とした。結果、上皮細胞マーカー陽性かつ間葉系細胞マーカー陰性であるヒト中耳粘膜上皮細胞の培養系が樹立できた。また、この細胞は TLR2、TLR4 いずれも発現が陽性であり、中耳粘膜上皮細胞へのウイルス侵入メカニズムの解析への応用が期待される。

今後、このヒト中耳粘膜細胞を用い、マクロライド系抗生物質投与下での RS ウイルス感染細胞への細菌の侵入の促進もしくは抑制に関わる上皮細胞間接着因子の発現変化を検討する予定である。この結果によっては、RS ウイルス感染により発症する難治性急性中耳炎や引き続き発症すると考えられている真珠腫性中耳炎の新しい治療戦略を模索することができる。更に、今回の実験系を応用し、将来的に新規ウイルス感染が流行した際に、難治性中耳炎の発症リスクとその治療戦略の検討が行えると考える。