

中耳に於ける TNF- α 産生の耐性化機構について

植山 朋代 平野 隆 児玉 悟
前田 一彦 鈴木 正志 茂木 五郎

大分医科大学耳鼻咽喉科学教室

Down-Regulation of TNF- α Production by Lipooligosaccharides Tolerance in Murine Model of Otitis Media with Effusion

Tomoyo UYAMA, Takashi HIRANO, Satoru KODAMA, Kazuhiko MAEDA, Masashi SUZUKI, and Goro MOGI

Department of Otolaryngology, Oita Medical University

Many studies of cytokines in patients with otitis media with effusion (OME) have shown TNF- α to be present in a high percentage of middle ear effusions (MEEs), and that it may play an important role in the induction and prolongation of the disease. TNF- α is a polypeptide hormone secreted by macrophages in response to endotoxin stimulation. Although preexposure of macrophages to low-dose lipopolysaccharides inhibits expression of TNF- α *in vitro*, it is unknown whether gram-negative bacterial infection inhibits TNF- α secretion *in vivo*.

We studied the effect of overnight preexposure to viable gram-negative bacteria, *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*), which is commonly detected in middle ear infection, on the ability of the cells to respond to subsequent stimulation with lipooligosaccharides (LOSs) in terms of TNF- α production.

OME was induced in mice by injection of either viable *H. influenzae* or Zymosan A (Sigma, St. Louis) into the bullae. Eustachian tube blockage was established surgically, and MEEs were aspirated through the tympanic membrane. Monocytes and macrophages were collected and employed as cells preexposed to LOSs of *H. influenzae* or Zymosan A *in vivo*. Following overnight culture of murine macrophages with LOSs, TNF- α in the culture medium, intra-cellular TNF- α and TNF- α mRNA were measured by ELISA, flow-cytometry, and RT-PCR respectively. While down-regulation of TNF- α production by LOSs tolerance was shown in the cells from *H. influenzae*-induced OME, down regulation of TNF- α was not shown in the cells from Zymosan A-induced OME. Inhibition of TNF- α production was evident at the protein, intra-cellular, and mRNA levels.

During infection of *H. influenzae*, LOSs will activate cells of the monocyte system

monocytes to produce cytokines such as TNF- α , which is recognized as an important cause of induction and prolongation of OME. Control mechanisms are required to reduce this detrimental production, and desensitization to LOSs is one such mechanism. The OME is a useful model in which to elucidate the mechanism of desensitization *in vivo*, and further clarification may contribute to more effective treatments of OME.

はじめに

滲出性中耳炎の成因とその遷延化については様々な知見が報告されており、中耳貯留液中のサイトカインの関与についても解明されつつある。中でも、TNF- α は滲出性中耳炎を惹起する重要な因子として知られている¹⁾。エンドトキシンは、マクロファージを刺激してTNFの産生、分泌を促していると考えられているが、そのTNF産生には耐性化が生じることが *in vitro* で証明されている²⁾³⁾。しかし実際グラム陰性菌感染時に生体内で同様の耐性が成立しているかは不明である。そこで、マウスの中耳炎モデルを用いて、中耳炎経過中に於けるTNF産生とその耐性化について検討した。

材料並びに方法

1. 実験的滲出性中耳炎モデルの作製

SPF 雄性 BALB/c マウス (5~6 週令) を用いた。ケタラル麻酔下に下顎後方皮膚を切開し、右側の中耳骨胞を明視下に置き、その尖端部に位置する軟骨部耳管を切断後、スポンゼルを挿入し耳管閉塞を行った。その後、中耳骨胞に 27G 注射針を用いて 2 個の小孔を開け、一方より 1×10^9 CFU/ml に調整した *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) 生菌 $10 \mu\text{l}$ を注入した。コントロールとして同数のマウスに $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ に調整した Zymosan A $10 \mu\text{l}$ を同様に注入し、滲出性中耳炎を作製した。中耳炎作製後 3 日目に経鼓膜的に中耳貯留液を採取した。

2. 貯留液中マクロファージの培養

中耳貯留液より得たマクロファージを 1 検体

あたり 1×10^6 個/ml となるように調整した。エンドトキシン刺激群として、同一株の *H. Influenzae* より抽出した Lipooligosaccharide (LOS) $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ と共に 24 時間、 37°C の CO_2 incubater で培養した。また、コントロール群として、Zymosan A $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ と共に同様に培養した。

3. TNF- α の測定

(1) サイトカイン ELISA

培養上清中の TNF- α を、QUANTIKINE[®] M (R&D 社) を用いて測定した。

(2) フローサイトメトリー法

予め Brefeldin-A 処理を行っておいたマクロファージを、培養終了後遠心分離して回収し、抗 CD14 抗体を用いて細胞表面抗原染色した。次に FACS Lysing Solution、及び FACS Permiabilization Solution (Becton Dickinson Immunocytometry System 社) を加え、細胞内染色用抗 TNF- α モノクローナル抗体で染色し、フローサイトメーターで測定した。

(3) RT-PCR 法

培養終了後遠心分離したマクロファージより GITC 法にて mRNA を抽出し、逆転写を行った後、cDNA サンプルに Pre-Developed TaqMan[®] Assay Reagents (PE Applied Biosystems 社) を加え、ABI PRISM 7700 System (PE Applied Biosystems 社) を用いて定量 PCR を行った。

結 果

(1) サイトカイン ELISA

培養上清中の TNF- α を ELISA 法で測定した結果を Fig.1 に示す. *H. Influenzae* の中耳炎から回収したマクロファージから LOS 刺激後により産生された TNF- α は, Zymosan A の中耳炎のものと比較すると, 明らかに低値で

あった.

(2) フローサイトメトリー法

細胞内 TNF- α についてフローサイトメトリー法で測定した結果, *H. Influenzae* による中耳炎では TNF- α の発現強度が, LOS 刺激群より Zymosan A 刺激群の方が高値であるのに対し, Zymosan A による中耳炎では TNF- α の発現

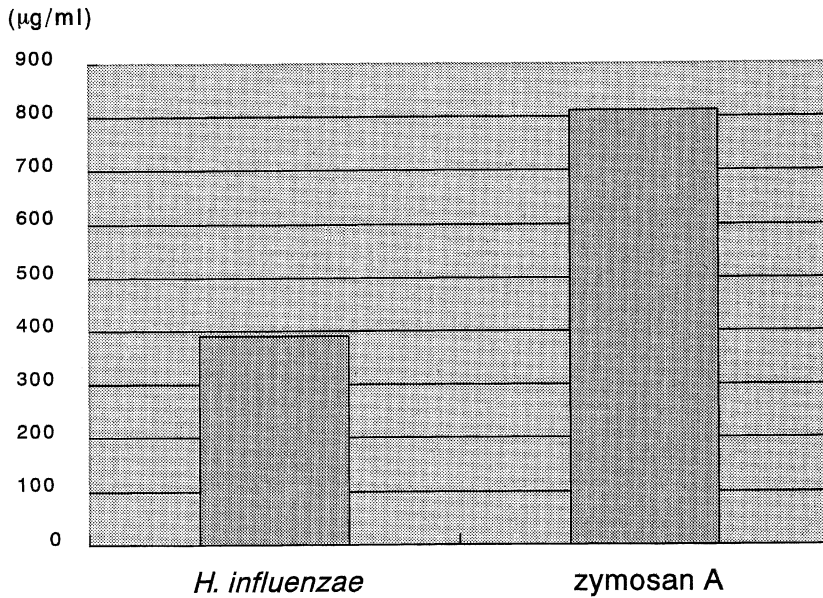


Fig.1 Concentration of TNF-a by cytokine ELISA

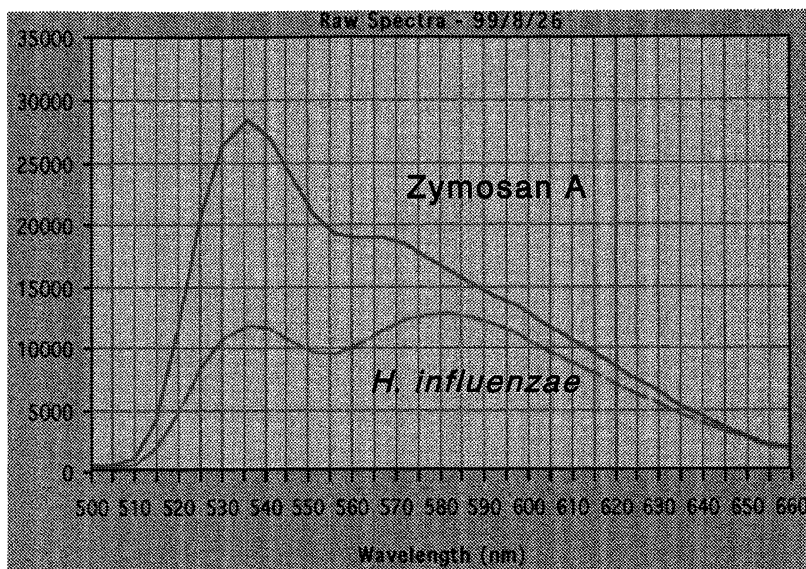


Fig.2 Fluorescent intensity of RT-PCR

強度は LOS 刺激群の方が Zymosan A で刺激したものより高値に認められた。

(3) RT-PCR 法

Fig.2 のグラフの横軸は波長を、縦軸は蛍光色素の intensity を示しているが、DNA 量は 535nm のシグナルと比例している。

H. influenzae による中耳炎と Zymosan A による中耳炎との LOS 刺激時の DNA 量を比較してみると、Zymosan A 中耳炎の方が明らかに高い intensity を示した。

ま と め

本実験により、*H. influenzae* 感染という形での LOS 一次刺激によって、中耳貯留液中の細胞に TNF- α 産生の耐性化が生じていることがタンパクレベル、細胞レベル、及び mRNA レベルで証明された。

TNF- α は一般的に炎症の急性期に関与しているが、中耳炎においては、炎症を遷延させる原因の一つとなっていることが予測される。そこで、TNF- α 産生の耐性化機構が明らかになれば TNF- α 産生をコントロールする事により、中耳炎の遷延化を予防出来る可能性がある。今後この耐性化のメカニズムについて更なる検討を行いたい。

なお、本研究は文部省科学研究費・奨励研究 (A) 「中耳に於ける TNF 産生の耐性化機構の解明」(課題番号 40295184) の援助を受けた。

参 考 文 献

- 1) Thomas F. Demaria, Debra M Murwin: Tumor necrosis factor during experimental lipopolysaccharide-induced otitis media, *The Laryngoscope*, 107: 369-372, 1997
- 2) Naomi Takasuka, Tohru Tokunaga, Kiyoko Akagawa: Preexposure of macrophages to low doses of lipopolysaccharide inhibits the expression of tumor necrosis factor- α mRNA but not of IL-1 β mRNA, *The Journal of Immunology*, 146: 3824-3830, 1991

- 3) Manuela Mengozzi, Giamila Fantuzzi, Marina Bianchi, et al: Early down-regulation by LPS tolerance in human monocytes: Comparison with IL-1 β , IL-6, and IL-8, *Lymphokine and Cytokine Research*, 12: 231-236, 1993

連絡先：植山朋代

〒879-0973 大分県大分郡挾間町

医大ヶ丘 1-1

大分医科大学耳鼻咽喉科学教室

TEL 097-586-5913