

ADHERENCE OF *STREPTOCOCCUS PYOGENES* TO OROPHARYNGEAL EPITHELIAL CELLS.

Kenji Suzuki, Yoshito Mori, Junichiro Shimada, Mitsuaki Inagaki, Kaoru Soyano, Takehiro Kobayashi, Sumitaka Itaya, and Shunkichi Baba.

Department of Otorhinolaryngology, Nagoya City University.

Adherence to epithelial cells by pathogenic bacteria is now recognized as a critical step in colonization and subsequent invasion by these organisms. And it is known that many organisms in the normal pharynx are capable in vitro of preventing the growth of other bacteria species.

Streptococcus pyogenes has been thought to be important for one of the causal bacteria of tonsilitis.

We investigate adherence of *S. pyogenes* to oropharyngeal epithelial cells in vitro and number of gram positive nor-

mal flora from these epithelial cells.

We obtain the result that the epithelial cells from diseases group has less number of gram positive normal flora than that from healthy group. It should seem that normal flora participate in defence of infection.

It is shown that high adherence is found in C203 strain showing attribute of virulence (presence of M protein, lethality for mice). The data support that M protein participate in adherence of *S. pyogenes*.

S. pyogenes の耳鼻咽喉科領域粘膜上皮細胞への付着性に関する研究

名古屋市立大学耳鼻咽喉科学教室

鈴木 賢二・森 慶人・島田 純一郎

稲垣 光昭・征矢野 薫・小林 武弘

板谷 純孝・馬場 駿吉

はじめに

扁桃の感染症の起炎菌の検討に当っては、扁桃及び口腔内の α -streptococcus を中心とする常在菌叢という背景及び分泌型IgAや補

体、リゾチームなど各種の生体防禦作用を基盤として解析する必要があるといえよう。従来より扁桃感染症の起炎菌の一つとして *streptococcus pyogenes* が重要視されており、

その扁桃への定着性を明らかにするための糸口として、我々は *S. pyogenes* の耳鼻咽喉科領域各種粘膜上皮細胞への *in vitro* における付着性及びそれぞれの上皮細胞に付着する gram positive normal flora について検討しており、今回正常健康成人群と、疾患群とに於いて比較検討したので若干の文献的考察を加え報告する。

対象および方法

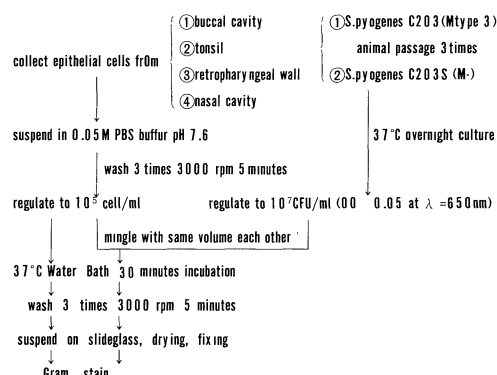
1. 対象: Gram positive normal flora の検討には、正常健康成人10例の頬部、扁桃、鼻腔それぞれより採取した粘膜上皮細胞及び、疾患群として扁桃より *S. pyogenes* を検出したもの・扁桃マッサージ陽性のもの・ASLO 高値のものなど臨床的に慢性扁桃炎を有すると考えられる成人10例の頬部、扁桃、咽頭後壁、鼻腔それぞれより採取した粘膜上皮細胞を用いて比較検討した。

S. pyogenes の付着性の検討には、M protein type 3 を有する C203 株と、M protein を有しない C203S 株を用いた。正常群では頬部、扁桃、鼻腔それぞれにおいて10例にて検討し、疾患群では頬部、扁桃、鼻腔では6例につき、咽頭後壁では5例につきそれぞれ検討した。

2. 実験方法 (Table 1): 使用菌種は前述の如く、animal passage を3回行い virulence を高めた *S. pyogenes* C203 及び *S. pyogenes* C203S を用いた。それぞれの菌を37°C 一夜培養し、 10^7 CFU/ml (OD0.05 at $\lambda=650$ nm) に調整した。粘膜上皮細胞は、いずれも無菌的に滅菌綿棒にてそれぞれより採取し、直ちに0.05 MPBS buffur PH 7.6 に浮遊させ、PBS buffur にて3回洗滌後 10^5 cell/ml に調整した。調整した上皮細胞は一部常在菌数検索用に菌液と混和せず、また一部は adherence 検討用に C203 及び C203S とそれぞれ同量ずつ混和してその後の操作を行った。グラム染色後、光顕的に1検体につき50個の粘膜上皮細胞そ

れぞれに付着するグラム陽性菌数を算定し、その平均を検体のグラム陽性菌数とした。

Table 1. Experimental method



結 果

1. Gram positive normal flora (Fig 1)

頬部粘膜上皮細胞においては、正常群は平均21.3個であった。扁桃上皮細胞においては、正常群は平均25.4個、疾患群は平均13.0個であった。咽頭後壁粘膜上皮細胞においては、疾患群で平均15.1個であった。鼻腔粘膜上皮細胞では、正常群は平均5.3個、疾患群は平均2.4個と他の部位に比べ常在菌数が少ないことが示された。また頬部、扁桃、鼻腔のいずれにおいても正常群は疾患群より有意に多くのグラム陽性常在菌数の付着を示した。

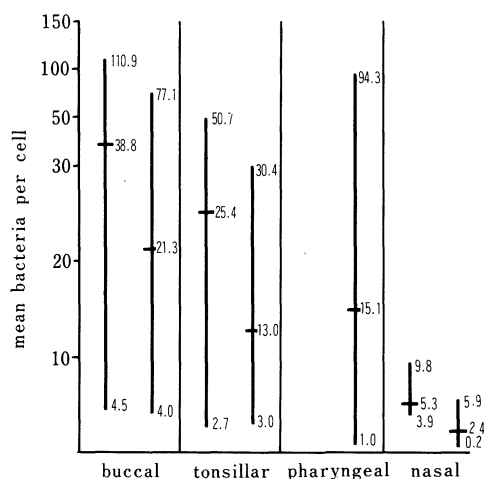


Fig. 1 Mean No. of gram (+) normal flora from buccal, tonsillar, pharyngeal and nasal epithelial cell (n=10) (lt: healthy group, rt: disease's group)

2. *Streptococcus pyogenes* の付着性(Table 2)

M proteinを有する C203は M proteinを有しないC203Sより有意に多く、それぞれの部位、群において付着した。頬部、扁桃において、正常群と疾患群の間でC203の付着性に差がないことが示され、C203Sでは正常群が疾患群に比較し有意に多く付着したと考えられた。咽頭後壁では、C203、C203Sともあまり多くは付着しなかった。鼻腔においては、C203、C203Sいずれの菌株も、疾患群において正常群より有意に多く付着した。

Table 2. Adherence of *S.pyogenes* to buccal, tonsillar, pharyngeal and nasal epithelial cell

site	C203		C203S	
	healthy	disease	healthy	disease
buccal	12.7	12.5	9.5	6.0
tonsillar	9.2	8.9	7.4	3.5
pharyngeal		3.1		0.8
nasal	4.3	8.3	1.7	4.7

考 案

1968年 Sprunt¹⁾はα溶連菌が抗菌作用のある bocteriocin 様物質を産生することを報告し、その後 Sanders,²⁾ christine³⁾らによりα-streptococcusは *S. pyogenes* の増殖抑制効果を発揮することが示され、1976年 Dajani⁴⁾は *S. sanguis*, *S. mitis*の産生する bacteriocin 様物質 (Viridins)は *S. pyogenes* の感染防御に重要に関連していると報告した。これらの報告を踏まえ我々は、頬部、扁桃、咽頭後壁、鼻腔それぞれの粘膜上皮細胞に付着する gram positive normal flora を健康成人10例と慢性扁桃炎を有する疾患群10例において検索した。その結果鼻腔では、mucous blanket, 繊毛運動を有するためと考えられるが、他の部位に比較し gram positive cocci がきわめて少ないことが示された。また正常群に比較し疾患群に於いて、gram positive

cocci が有意に少ないこと、疾患群に於いて口腔内では扁桃に gram positive cocci が少ないことなどが示された。小澤⁵⁾らが述べているように健康者、慢性扁桃炎患者いずれに於いても、扁桃の gram positive normal flora の大半が α-streptococcus にて占められ、健康者群では *S. mitis* を多く検出し、疾患群では *S. sanguis* を多く検出したことを考えると、さきに述べた bacteriocin 様物質の存在を鑑み、非常に興味ある知見が得られたと思われる。

S. pyogenes の付着性に関しては1972年 Ellen⁶⁾らが、初めて *streptococcus pyogenes* の cell wallの M proteinが付着に重要であると述べて以来、Beachey^{5) 8) 9) 10) 11) 12) 13)} Simpson^{14) 15)}らの詳細な研究により、adhesin として lipoteichoic acid (LTA)あるいは LTA-Mprotein complexesが重要であり、receptor として fibronectinが重要であることが判明してきた。我々は同一菌種で Mprotein type3 を有する C203株及び Mprotein を有しない C203S株を用いて、正常群と慢性扁桃炎を有する疾患群において耳鼻咽喉科領域各種粘膜上皮細胞への adherence を検討した。その結果 Table2 に示した如く、Mprotein を有する C203株は Mprotein を有しない C203S株より、正常群疾患群を問わずすべての部位において有意に多く付着した。この結果は *S. pyogenes* の adherence に Mproteinが関与していることを強く支持するものと考えている。また頬部、扁桃において、正常群と疾患群の間でC203の付着数に差を認めなかったが、これは *S. pyogenes* の receptor として粘膜上皮表面の fibronectin は疾患の有無に影響されないことを示唆しているのであろうか、真偽についてはさらに詳細な検討を加えたいと考えている。

ま と め

慢性扁桃炎を有する疾患群と正常群との比

較にて、それぞれの群及び部位に於いて、gram positive normal flora の数に差のあることが判明し、感染防禦に関して常在菌の関与が示唆されたが、さらに詳細なる検討をすすめたいと考えている。また *S. pyogenes* の adherence に関する検討では、Mprotein が adheren に関与していることを示す結果が得られた。

参 考 文 献

- 1) Sprunt, k., and Redman, W.: Evidence suggesting importance of role of interbacterial inhibition in maintaining balance of normal flora. *AnnInt Med* 68:579~590, 1968
- 2) Sanders, E.: Bacterial interference. I. Its occurrence among the respiratory tract flora and characterization of inhibition of Group A streptococci by viridans streptococci. *J. Infect. Dis* 120: 698~707, 1969
- 3) Christine, C. et al: Bacterial interference. II. Role of the normal throat flora in prevention of colonization by Group A streptococcus. *J. Infect. Dis* 128: 527~532, 1973
- 4) Dajani, A. S. et al: Viridins, Bacteriocins of alpha-hemolytic streptococci: Isolation, characterization, and partial purification. *Antimicrob. Agents, chemotherapy*. 9: 81~88, 1976
- 5) 小澤 敦, 沢村貞昭: 扁桃感染症の生態と化学療法, *日扁桃誌*, 24: 275~279, 1985
- 6) Ellen, R. P., and Gbbons, R.J.: Mprotein associated adherence of *Streptococcus pyogenes* to epithelial surface prerequisite for virulence. *Infect. Immun*, 5: 826~830, 1972
- 7) Beachey, E. H.: Binding of group A streptococci to human oral mucosal cells by lipoteichoic acid. *Trans. Assoc. Am. Physicians* 88: 285~292, 1975
- 8) Beachey, E. H., Ofek, I.: Epithelial cell binding of group A streptococci by lipoteichoic acid on fimbriae denuded of Mprotein. *J. Exp. Med.* 143: 759~771, 1976
- 9) Beachey, E. H., Seyer, J. M., Kang, A. H.: Repeating covalent structure of streptococcal Mprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75: 3163~3167, 1978
- 10) Beachey, E. H., Seyer, J. M., Kang, A. H.: Primary structure of protective antigens of type 24 streptococcal Mprotein. *J. Biol. chem.* 255: 6284~6289, 1980
- 11) Beachey, E. H.: Bacterial Adherence: Adhesin - Receptor Interactions Mediating the Attachment of Bacteria to Mucosal Surfaces. *J. Infect. Dis.* 143: 325~345, 1981
- 12) Beachey, E. H., Simpson, W. A.: The adherence of group A streptococci to oropharyngeal cells: The lipoteichoic acid adhesin and fibronectin receptor. *Infection*. 10: 107~111, 1982
- 13) Beachey, E. H., et al: Attachment of streptococcus pyogenes to Mammalian cells. *Review. Infect. Dis.* 5: S670~S677, 1983
- 14) Simpson, W. A., et al: Characteristics of the binding of streptococcal lipoteichoic acid to human oral epithelial cells. *J. Infect. Dis.* 141: 457~462, 1980
- 15) Simpson, W. A., et al: Adherence of group A streptococcus to fibronectin on oral epithelial cells. *Infect. Immun.* 39: 275~279, 1983

質 疑 応 答

質問 藤原久郎（国立長崎中央病院）

Controlは、非常に難しいと考えるがControl study はどうやっていますか。

応答 鈴木賢二（名市大）

Wash outを十分行うことと、gram染色の染まり方で、Viable epithelial cell かどうかはある程度予想できると考えます。

質問 黒野祐一（大分医大）

扁桃、頬部に付着する菌数が、正常者と疾患群で差がなかったのはなぜでしょうか。

応答 鈴木賢二（名市大）

S. pyogenes の付着性は、疾患の有無には関係ないことが示唆されたと考えます。