

## ADHERENCE OF STREPTOCOCCUS PYOGENES TO MUCOSAL SURFACES

Yuichi Kurono, Tatsuya Fujiyoshi, Goro Mogi

Department of Otolaryngology, Medical College of Oita

The adherence of bacteria to the mucosal surface is the initial event in infection. This phenomenon is called bacterial adherence, which is understood to be taken place between the adhesive molecules on the bacterial surface and receptors of the host.

Fibronectin on epithelial cells has been shown to contain receptor sites for the adherence of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes* (*S.pyogenes*). We studied the ability of *S.pyogenes* to adhere to cells of buccal mucosa and nasal mucosa in vitro. The number of bacteria adhered to the mucosal cell was reduced by pretreat-

ment of buccal mucosal cells with trypsin. It is known that M protein, one of the cell wall antigens of *S.pyogenes*, participates in the adherence to mucosal surfaces. Strain Sv in the log phase adhered more than that in the lag phase to the buccal mucosal cells. Strain C 203 S, avirulent strain without M protein, adhered poorly to the mucosal cells. Adherence to the nasal mucosal cells of the patients with chronic sinusitis was significantly greater than that of normal subjects. However, this was reduced in the subjects possessing specific antibody activity of secretory IgA against M protein.

### 粘膜上皮細胞への細菌定着性に関する検討

大分医科大学耳鼻咽喉科学教室

黒野 祐一・藤吉 達也・茂木 五郎

#### はじめに

上気道細菌感染の成立には、まず細菌が局所粘膜上皮表面へ定着固定することが必要である。この現象はbacterial adherenceと呼ば

れ、細菌側のadhesinと粘膜上皮側のreceptorとの間で行なわれる。耳鼻咽喉科領域で検出されることの多い *Streptococcus pyogenes* (*S.pyogenes*) については、adhesin として

M-proteinやLipoteichoic acid, receptor としてFibronectin がそれぞれ重要な因子であると考えられている<sup>1)</sup>。そこで、頬粘膜上皮細胞や鼻粘膜上皮細胞への *S. pyogenes* の定着性を *in vitro* で観察し、Fibronectin やM-protein の関与、さらに外分泌液中の主要免疫グロブリンであり、感染防禦に重要な役割を担う分泌型IgA の関与について検討した。

### 対象および方法

#### 1, *in vitro* での細菌定着試験

実験方法はGibbonらの方法<sup>2)</sup>に準じた。*S. pyogenes* Sv株type 3 を動物通過により毒性を高めたのち、10%Fetal Calf Serum 加 Todd Hewitt brothに菌液を濃縮分注し、-80℃に保存した。実験に使用する細菌の活性を毎回一定にするために、保存菌株のovernight culture を10%の割合で培地に接種し、5時間培養したものをPBSで $3 \times 10^8$  個/mlに調節した。鼻粘膜上皮細胞または頬粘膜上皮細胞は綿棒で擦過採取し、PBSで洗浄後 $2 \sim 4 \times 10^4$  個/mlに調節した。両者を各々1mlとり、これを混和し、90分間振盪培養後、洗浄ろ過し、グラム染色後、鏡見した。20個の上皮細胞それぞれに定着した細菌数を数え、平均値を求めた。これと対照として同一症例の粘膜上皮細胞とPBSのみとを混和し、同様に処理したものととの平均値の差を細菌定着数とした。

#### 2, Fibronectin と細菌定着性の検討

健康成人6名から頬粘膜上皮細胞を擦採取し、無処理、Trypsin 処理、Fibronectin 処理の3群に分け *S. pyogenes* の定着性を検討した。無処理群は PBS, Trypsin 処理群は $5 \mu\text{g/ml}$ のTrypsin(Difco Labo), Fibronectin 処理群は $300 \mu\text{g/ml}$ のFibronectin (Sigma Chemical Co.) それぞれ2mlと $10^6$  個/mlの頬粘膜上皮細胞浮遊液2mlとを37℃で1時間振盪混和し、PBSで洗浄後 $4 \times 10^4$  個/mlに調節し、*S. pyogenes* の定着性試験を

行なった。

#### 3, M-protein と細菌定着性の検討

*S. pyogenes* Sv 株type3のgrowth curve は培養開始後4時間から6時間の間にlog phase があり、M-protein の合成はこのmid log phase に最大になることが知られている<sup>3)</sup>。そこで、log phase のSv 株、培養後24時間のlag phase のSv 株、M-protein を合成しないC203S 株の3者について頬粘膜上皮細胞への定着性を観察した。

#### 4, 鼻粘膜上皮細胞への *S. pyogenes* の定着性

正常者25例、慢性副鼻腔炎患者29例の計54例を対象に、鼻粘膜上皮細胞への *S. pyogenes* の定着性を比較した。鼻粘膜上皮細胞擦過採取時、同時に鼻分泌液をJuhn Tym Tap で吸引採取し、Borate Buffered Saline で4~10倍に希釈後4℃に保存した。分泌型IgAの定量はは佃ら<sup>4)</sup>の免疫電気拡散法を用い、分泌型IgAのM-protein に対する抗体活性の測定には、間接ELISA法を用いた。

### 結 果

頬粘膜上皮細胞表面のFibronectin をTrypsin で不活化した群の細菌定着数は29個/cell と、無処理群の39個/cell と比べ減少し、高濃度のFibronectin で処理したものでは51個/cell と増加した。(Fig. 1)

M-protein の合成が盛んなlog phase のSv 株、lag phase のSv 株ともに培養開始後90分まで直線的に細菌定着数が増加したが、log phase のSv 株のほうがより強い定着性を示した。M-protein を合成しないC203S 株はSv 株と比較して上皮細胞への定着性が著しく弱かった。(Fig. 2)

鼻粘膜上皮細胞への定着性は、正常者の細菌定着数16個/cell に対し、慢性副鼻腔炎は26個/cell と慢性副鼻腔炎が正常者と比べて有意 ( $P < 0.01$ ) に高い *S. pyogenes* の定着性をもつことが示された。(Fig. 3) 鼻分泌液中の

分泌型IgA 濃度を平均値より高い群と低い群で大別し比較したが、正常者、慢性副鼻腔炎ともにその細菌定着性に差を認めなかった。しかし、分泌型IgAのM-protein に対する抗体活性の有無で大別し比較すると、正常者、慢性副鼻腔炎ともに5%の危険率をもって有意に、M-protein に対する抗体活性をもたない群がより強い細菌の定着性をもつことが示された。(Fig. 4)

Fig. 1 Adherence and Pretreatment with Trypsin and Fibronectin

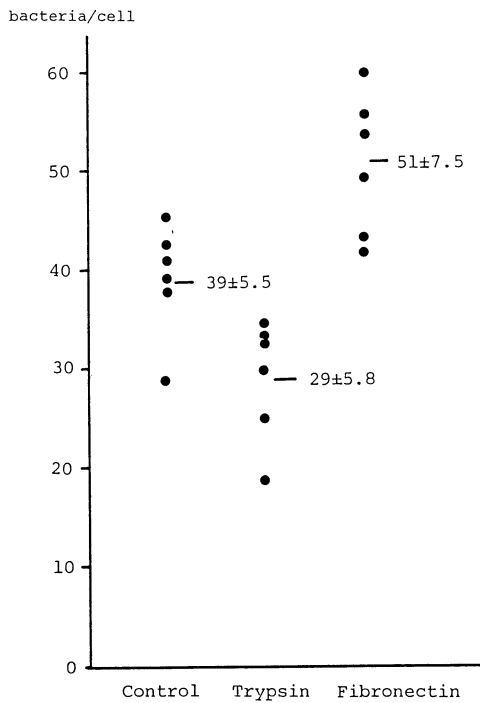


Fig. 2 Adherence of *S. pyogenes* to Buccal Mucosal Cells

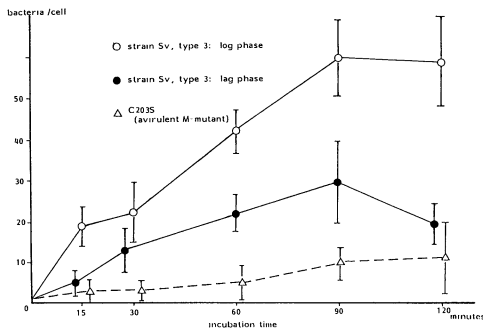


Fig. 3 Adherence of *S. pyogenes* to Nasal Mucosal Cells

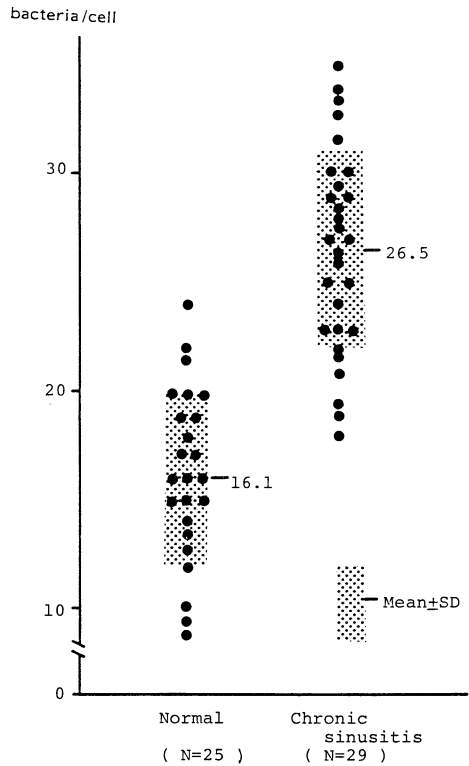
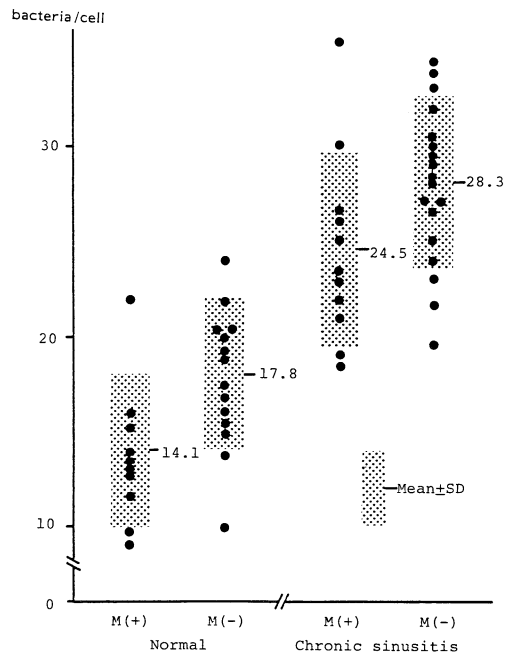


Fig. 4 Specific Activity of SIgA to M-protein and Bacterial Adherence



## 考 察

In vitro での細菌の定着性の研究は1971年にGibbonら<sup>2)</sup>によって初めて報告され、最近では、その機構を解明するためにreceptorやadhesinの生化学的な解析も行なわれている。*S. pyogenes* についてはBeacheyら<sup>1)</sup>が詳細な研究を行ないreceptorとしてFibronectin, adhesinとしてM-protein とLipoteichoic acidの複合物が重要な因子であると推察している。Simpsonら<sup>5)</sup>は、頬粘膜上皮細胞表面のFibronectinを $\beta$ -mercaptoethanol や熱処理で不活化し、*S. pyogenes* の定着性が低下したと報告している。我々はTrypsin を用いFibronectin を不活化したところ同様の結果が得られた。また、高濃度のFibronectin による処理で定着性が増加し、Fibronectinの細菌定着性への関与が示唆された。

M-protein と *S. pyogenes* の定着性との関関についてはEllenら<sup>6)</sup>の報告があり、最近ではLipoteichoic acid をadhesin とする報告も散見される。<sup>7) 8)</sup>我々はSv株のlog phase とlag phase とで定着性を比較したところ、M-protein の合成が盛んなlog phase のSv株の方が定着性が強く、M-protein の細菌定着性への関与が示唆された。

分泌型IgAには殺菌作用や補体活性作用がなく、細菌感染防禦における役割は、いまだ明らかではないが、細菌表面に付着し粘膜上皮への細菌の定着を阻止すると考えられている。Williamsら<sup>9)</sup>は *Streptococcus salivarius* に対する抗体活性をもつ分泌型IgAを耳下腺分泌液から分離抽出し、これが本菌の頬粘膜上皮細胞への定着を特異的に抑制すると報告している。我々の結果は、特異抗体活性をもつ分泌型IgAの細菌に対する直接的な作用を示すものではないが、鼻粘膜上皮細胞表面に特異抗体活性をもつ分泌型IgAが付着残存し、これが細菌の定着を抑制している可能性がある。また、分泌型IgAの特異抗体活性の有無

と粘膜上皮表面のreceptorとの間に何らかの関係があることも推測される。

## ま と め

*S. pyogenes* の定着性には、その virulence factor であるM-protein や上皮細胞表面のFibronectin, さらに外分泌液中の分泌型IgAが関与し、これらの因子の恒常性の破綻により上気道細菌感染の成立や遷延化が生じると考えられる。

## 参 考 文 献

- 1) Beachey, E.H.: Bacterial adherence ; adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. J. Infect. Dis. 143 : 325 -345, 1981
- 2) Gibbons, R.J., and Van Houte, J. : Selective bacterial adherence to oral epithelial surfaces and its role as an ecological determinant. Infect Immun 3 : 568 - 573, 1971
- 3) Cohen, J.O.: Effect of culture medium composition and pH on the production of M-protein and proteinase by group A streptococci. J. Bacteriol. 99 : 743 - 744, 1969
- 4) 佃 富夫: Secretory IgA, IgA, free secretory component の新分別定量法と各種口腔疾患での定量に関する研究, 四国医誌 37 : 253 - 265, 1981
- 5) Simpson, W.A., and Beachey, E.H. : Adherence of group A streptococci to fibronectin on oral epithelial cells. Infect Immun 39 : 275 - 279, 1983
- 6) Ellen, R.P., and Gibbons, R.J.: M-protein associated adherence of Streptococcus pyogenes to epithelial surfaces: prerequisite for virulence. Infect Immun 5 : 826 - 830, 1972
- 7) Beachey, E.H., and Ofek, J.: Epit-

- helial cell binding of group A streptococci by lipoteichoic acid on fimbriae denuded of M-protein. J. Exp. Med. 143 : 759 - 771, 1976
- 8) Miörner, H., Havlicek, J., and Kronvall, G.: Surface characteristics of group A streptococci with and without M-protein. Acta path. microbiol. immunol. scand. Sect. B, 92 : 23 - 30, 1984
- 9) Williams, R.C., and Gibbons, R.J.: Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A : A mechanism of antigen disposal. Science 77 : 679 - 699, 1972

---

### 質 疑 応 答

**質問** 松永 亨 (阪大)

S. pyogenes の付着性に関し、17番の鈴木先生の発表と少し異なるように思うが、その理由について考えられる所を問う。

**応答** 黒野祐一 (大分医大)

気道と消化管で病原菌が異なるように、上気道でも、鼻腔、咽頭、気管で細菌の定着性には差があると考えます。これは主として宿主側のレセプターに起因すると推測する。

**質問** 原田康夫 (広大)

トリプシンで処置した場合細菌の定着性が少ないようだが、糖蛋白を処理した場合、菌の数は少なくとも糖蛋白のバリアーをこわすために感染が起るといふことはないか。

**応答** 黒野祐一 (大分医大)

トリプシン処理はフィブロネクチンの不活化のために行なった。レセプターであるフィブロネクチンの不活化によって細菌定着性が低下したと推察している。