

ADHERENCE OF HAEMOPHILUS INFLUENZAE TO NASOPHARYNGEAL MUCOSAL CELLS

Koichiro Shimamura, Yuichi Kurono Atsushi Kato, Goro Mogi

Department of Otolaryngology' Medical College of Oita

Bacterial adherence to the surface of epithelial cells is the initial step in the infection of the mucous membrane, and is known to take place between the adhesive molecules of bacteria and receptors of the host. However, few studies have been reported concerning the adherence of *Haemophilus influenzae* to nasopharyngeal mucosal cells despite the fact that *H. influenzae* is commonly considered as the pathogen of Otitis Media with Effusion (OME). In the present study, we investigated the adherence of *H. influenzae* to nasopharyngeal mucosal cells in vitro.

The mean number of adherent bacteria in children with OME was significantly greater than that in adults with OME, in *H. influenzae type b* ($p < 0.01$) and *non-typable H. influenzae* ($p < 0.01$). Adherences of both types of *H. influenzae* in children with OME were significantly greater than that in control children (type b: $p < 0.01$, non-typable: $p < 0.01$). In adults, both types of *H. influenzae* adhered to mucosal cells from patients with OME, and from normal subjects, in almost the same degree.

「インフルエンザ菌の鼻咽腔粘膜上皮 への定着性に関する検討」

大分医科大学耳鼻咽喉科学教室

島村 康一郎・黒野 祐一

加藤 宏司・茂木 五郎

I. はじめに

中耳を含め上気道細菌感染の発症には、まず細菌が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、in vitro での研究が1971年 Gibbon¹⁾らによって初めて報告されて以来種々の報告をみるが、多くは頬粘膜上皮に関するものであり、鼻咽腔粘膜上皮に関する報告は少ない。中耳炎の起炎菌としては、*S. pneumoniae*, *H. influenzae*

が重要で、これらは鼻咽腔からも同時に検出されることが多い。前者についてはその定着性について Andersson ら²⁾の多くの報告があるが、後者に関してはあまり研究が成されていない。今回我々は、*non-typable, type b* 2種の *H. influenzae* を用い、その鼻咽腔粘膜上皮細胞への定着性について検討した。

II. 対象・方法

3歳から15歳までの小児43名と18歳から73

歳までの成人15名を対象とし、鼻咽腔粘膜上皮細胞は、滅菌綿棒を口腔より入れ軟口蓋を可及的に押し上げ擦過採取した。なお、鼻粘膜および頬粘膜上皮細胞も同様に綿棒を用いて採取し予備実験に使用した。

H. influenzae は小児滲出性中耳炎患者の鼻咽腔より検出された *non-typable, type b* の2株を使用した。これら菌株を-80℃に保存し、実験に際しチョコレート寒天培地でover-night culture 後、5% Fildes enrichment (DIFCO, U.S.A) 加 Trypticase soy broth (DIFCO, U.S.A) に接種し、37℃で6時間培養したものを、Dulbecco's phosphate buffer saline (PBS) で 2×10^9 個/ml に調節した。鼻咽腔粘膜上皮細胞は、PBSで洗浄後 $2 \sim 4 \times 10^4$ 個/ml に調節した。両者を各々1mlずつ取りこれを混和し、90分間振盪培養したのち、PBS 100mlで洗浄濾過後、スライドガラス上に塗抹したものをエタノール固定し、間接蛍光抗体法にて鏡見した。20個の上皮細胞それぞれに生着した細菌数を数えてその平均値を求め、これを細菌定着数とした。

type b に対する抗血清はデンカ生研の抗 *type b H. influenzae* ウサギ血清を使用し、*non-typable* に対する抗血清は5%ホルマリン不活化菌を3ヶ月間ウサギに静注し作成した。

Ⅲ. 結 果

本実験に使用した *non-typable H. influenzae* は菌接種後4~8時間の間に log phase が存在し、最大濃度は約 10^9 CFU/ml であった。

log phase (6時間) の菌株と lag phase (12時間) のものを用いて、各々の鼻咽腔粘膜上皮細胞への定着性をみると、lag phase に比較し log phase の細菌の方が高い定着性を示した (Fig 1)。上皮細胞と混和する際の細菌の濃度による定着性を比較してみると、 10^9 CFU/ml で定着性が著しく増加した (Fig 2)。さらに、*H. influenzae* の定着性を鼻咽腔粘膜上皮、鼻粘膜上皮、頬粘膜上皮の3種の粘膜上皮細胞で

比較した結果、鼻咽腔粘膜上皮細胞への定着性が最も強かった (Fig 3)。

Table 1 は *non-typable* 及び *type b* 両者の鼻咽腔粘膜上皮細胞への平均定着細菌数を示す。

non-typable, type b の定着数はともに1%の危険率をもって有意に小児滲出性中耳炎患者の方が成人滲出性中耳炎患者より大きかった。また、小児においては *non-typable, type b* ともにその定着数は1%の危険率をもって有意に対照群と比較して滲出性中耳炎群の方が大きかった。成人においては滲出性中耳炎群と対照群との間に有意差は見られなかった。

non-typable H. influenzae は、全ての群で *type b H. influenzae* よりも鼻咽腔粘膜上皮細胞への定着性が高かった。

Fig. 1 Influence of Bacterial Growth Phase on Adherence

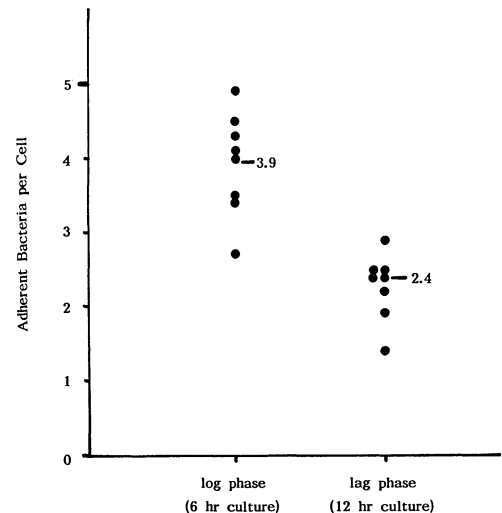


Fig. 2 Influence of Bacterial Concentration on Adherence

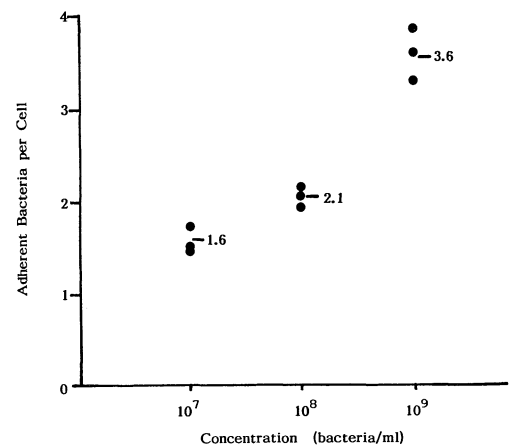


Fig. 3 Influence of Mucosal Cell Site on Adhesion

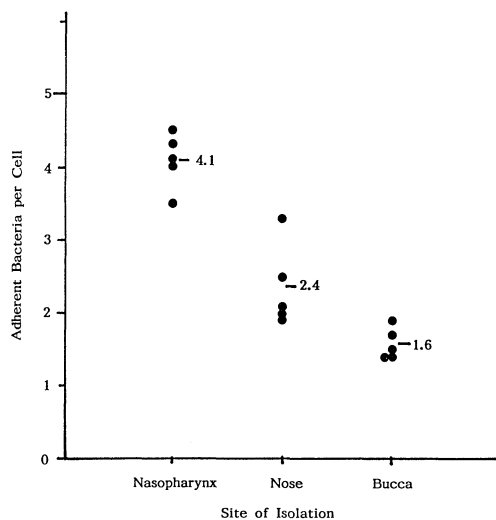


Table 1.

Donor of mucosal cell		Number of adherent bacteria per cell	
		Type b	Non-typable
Children	OME (N=28)	4.0 ± 2.6	5.5 ± 2.3
	Control (N=15)	2.1 ± 1.1	3.7 ± 1.6
Adults	OME (N=10)	1.6 ± 0.4	3.3 ± 1.6
	Control (N=5)	1.5 ± 0.3	3.0 ± 1.3

Mean ± S.D.

IV. 考 察

In vitroでの細菌の定着性の研究は1971年、Gibbonら¹⁾によって初めて報告され、最近ではその機構の解明に receptor や adhesin の生化学的解析も行なわれている。*S.pyogenes*については Beacheyら²⁾が詳細な研究を行ない、receptorとして Fibronectine, adhesinとして M-protein と Lipoteichoic acid の複合物が重要な因子であると報告している。*S.pyogenes*については Anderssonら²⁾がその receptorとして oligosaccharideの重要性を指摘している。しかし、*H.influenzae*については、*S.pneumoniae*と同様中耳炎の起炎菌として検出されることが多いにもかかわらずその上皮への定着性に関する報告は少ない。Lampeら⁴⁾は *non-typable, type b* 2種の *H.influenzae* について頬粘膜上皮細胞への定着性を蛍光抗体法及び RI を用いた方法の2種の方法で検討し、両者の結果はよく相関したと報告している。

Porrasら⁵⁾は位相差顕微鏡を用いて *H.influenzae* の頬粘膜上皮細胞への定着性を観察しているが、Lampeら⁴⁾の値の約10倍の定着数となっている。今回我々は間接蛍光抗体法を用いて定着性をみたところ、その結果は Lampeら⁴⁾の報告に近似していた。

成長曲線上 log phase のものと lag phase のものとでその定着性を比較したところ log phase のものがより定着性が強く細菌側の因子が定着性に関与することが示された。黒野⁶⁾は *S.pyogenes* の定着性は今回と同様に log phase の菌株が lag phase のものより高いことを報告している。*H.influenzae* に関しては Guerinaら⁴⁾が *H.influenzae type b* の中咽頭粘膜上皮細胞への定着性は Pili を有するものが、pili のないものより著明に高いことを報告している。porrasらも我々の結果と同様に early log phase の菌株が最も高い上皮細胞への定着性を示したと述べており、pili の存在や細菌の活性が定着性に関与していると思われる。

Lampeら は小児咽頭から検出された *H.influenzae type b* の定着性を頬粘膜、中咽頭粘膜、鼻粘膜上皮細胞について検討し、ほぼ同様の定着性を示したと報告している。我々は鼻咽腔から検出された *non-typable H.influenzae* を用いて、同様の観察を行ったところ、鼻咽腔粘膜上皮細胞で最も高い定着性が認められた。*non-typable H.influenzae* は鼻咽腔から検出されることが多く、また、鼻咽腔から検出された本菌は高い定着性をもつことが知られており⁵⁾、*non-typable H.influenzae* の鼻咽腔粘膜上皮への親和性が高いことが推察される。

本菌の鼻咽腔粘膜上皮細胞への定着性を滲出性中耳炎患者と正常者とで比較したところ前者が有意に高い定着性を示した。黒野⁶⁾は *S.pyogenes* の鼻粘膜上皮細胞への定着性が正常者と比較して慢性副鼻腔炎で高値である

ことを、Anderssonら²⁾は *S.pneumoniae* の鼻咽腔粘膜上皮細胞への定着性が、反復性滲出性中耳炎患者で著しく高いことを報告している。これらの報告から、感染を発症した粘膜上皮では、細菌に対する receptor の増加や、receptor の blockerの減少など細菌定着に関する様々な変化が生じていることが推察される。

H. influenzae は、小児の鼻咽腔からは度々検出されるが、成人では稀である⁸⁾。そこで本菌の定着性を成人と小児とで比較してみると、小児での定着性が有意に高値であった。この結果も成人と小児とで鼻咽腔粘膜上皮表面の細菌定着性に関する種々の因子に相違があることを示唆しているものと思われる。

V. ま と め

H. influenzae の粘膜上皮細胞への定着性について検討した。本菌は他の粘膜上皮細胞と比較して鼻咽腔粘膜上皮細胞への定着性が強く、成人よりも小児により高い定着性を認め、かつ小児においては対照群に比し滲出性中耳炎群により高い細菌の定着性が認められた。これらの結果から、小児滲出性中耳炎の発症に *H. influenzae* の鼻咽腔粘膜上皮への定着性が関与していることが示された。

文 献

- 1) Gibbons, R.J. and Van Houre, J.: Selective-bacterial adherence to oral epithelial surfaces and its role as an ecological determinant. *Infect Immun* 3:568-573, 1971.
- 2) Andersson B., Fogh A., Jrgensen F., Larsson S., Leffler H., Magnusson G., Nylén O., Södow C.V., Svanborg Edén C.: Attachment of *Streptococcus pneumoniae* to human pharyngeal epithelial cells in vitro-mechanism of binding. *Otolaryngol Head & Neck Surg* 92:266-269, 1984.
- 3) Beachey E.H.: Bacterial adherence;

adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J Infect Dis* 143:325-345, 1981.

- 4) Lampe R.M., Mason E.O., Kaplan S.L., Umstead C.L., Yow M.D., Feigin R.D.: Adherence of *Haemophilus influenzae* to buccal epithelial cells. *Infect Immun* 35:166-172, 1982.
- 5) Porras O., Svanborg-Edén C., Lagergard T., Hanson L.A.: Method for testing adherence of *Haemophilus influenzae* to human buccal epithelial cells. *Eur J Clin Microbiol* June 1985, p.310-315.
- 6) 黒野祐一：抗体と補体. 日本鼻科学会誌, 24:258-266, 1984. 85.
- 7) Guerina N.G., Lancermann S., Clegg H.W., Kessler T.W., Goldmann D.A.: Adherence of piliated *Haemophilus influenzae type b* to human oropharyngeal cells. *Infect Diseases* 146, 4, OCT: 564, 1982.
- 8) 友永和宏、黒野祐一、吉村弘之、茂木五郎：滲出性中耳炎の細菌学的検討。日耳鼻感染症研究会誌, 5:10-15, 1987.

質 疑 応 答

質問 高坂知節（東北大）

1)成人の滲出性中耳炎では小児に比して粘着性が低いとのことだが、成人SOMと正常者との比較ではどうなっているか。

応答 島村（大分医大）

成人の滲出性中耳炎群と正常群との間には特に差は認められなかった。

質問 田中久夫（新潟大学）

有意という言葉を使っているが、統計的な処理方法に問題がないか。

応答 島村（大分医大）

②統計処理については、検討し直したいと存じます。

質問 馬場駿吉（名市大）

菌数が10 以下の場合の付着性を検討されていたらお教え下さい。

応答 島村（大分医大）

今回の実験に際しては行なっておりません。