

## ADHERENCE OF *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* NONTYPABLE TO MIDDLE EAR MUCOSA OF GUINEA PIG

Yutaka Hanamura, Shyoji Matsune, Hiroshi Tsurumaru, Masaru Ohyama

Department of Otolaryngology Kagoshima University Faculty of Medicine

Recent studies have indicated that the adherence of bacteria to mucosal surface is the initial event in the pathogenesis of most infectious diseases due to bacteria. *Haemophilus influenzae* nontypable strain was tested for its adherence to middle ear mucosa of guinea pig. *H. influenzae* nontypable strain adhered in significantly greater numbers to ciliated epithelium area than to squamous epithelium area. Adherence of the strain

was inhibited by lysozyme at the ciliated epithelium area. Scanning electron microscopic study revealed that *H. influenzae* nontypable adhered to surface of goblet cells, mucus at the tip of cilia and denuded basement membrane of the ciliated epithelium area. Mucus elements of the ciliated epithelium area appear important in adherence of the *H. influenzae* strain to middle ear mucosa of the guinea pig.

## インフルエンザ菌のモルモット中耳粘膜への定着性について

鹿児島大学医学部耳鼻咽喉科学教室

花牟礼 豊・松根 彰志・鶴丸 浩士・大山 勝

### はじめに

細菌感染症の成立に当たっては、細菌の生体組織への定着が必要であり、細菌側の定着因子(Adhesin)と組織細胞側のレセプターとの特異的な結合によって、定着が成立することが、近年報告されている<sup>1)</sup>。例えば尿路感染症の主要起因菌である大腸菌の定着因子は、4群に大別されており、そのなかの一つType 1 fimbriaeは、糖蛋白のmannoside群をレセプターとしている。また、*Streptococcus pyogenes*は、LipoteichoicとM proteinの複合体が定着因子であり、組織に存在するFibron-

ectinがそのレセプターであるとされている。一方、抗生物質が、元来いわれている殺菌作用あるいは静菌作用以外に、細菌の組織への定着を低下させる抗定着作用を持つことが近年、報告されており<sup>2)</sup>、細菌感染症の治療を行ううえで、細菌の定着機序を知ることは、重要と考えられる。

今回、我々は、上気道感染症の起因菌として重要であり、また、その組織への定着機序が未だ解明されていないインフルエンザ菌を用いて、中耳粘膜への定着性を検討すると共に、抗生物質との協同作用が言われているリ

ゾチームの菌定着に与える影響について検討したので報告する。

### 対象および方法

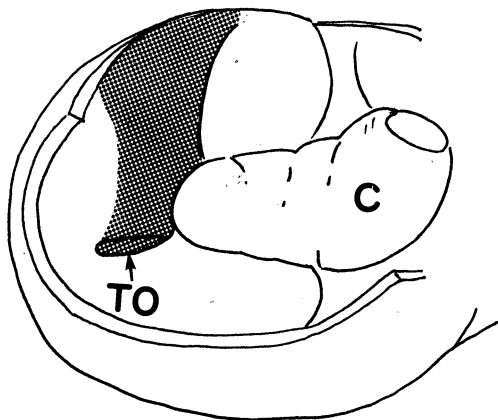
#### 1. インフルエンザ菌の分離同定培養

急性中耳炎小児の鼓室内貯留液より分離培養したインフルエンザ菌, nontypableを用いた。細菌の同定は, nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)とhematinを用いたdisk法により, また, 莢膜型分類は各莢膜型に対する抗血清を用いて行った。細菌を10%グリセリン加Brain Heart Infusion Brothにて $-70^{\circ}\text{C}$ で凍結保存し, 使用時に融解し, チョコレート寒天培地上でover night培養した後, PBSに懸濁し, 洗浄後, 菌数を $10^9\text{cfu/ml}$ に調整し, Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)に再懸濁して使用した。

#### 2. 細菌定着性の検討

組織は, 正常ハートレイ系モルモット (体重約300g)の中耳粘膜を用いた。中耳腔はほぼ扁平上皮で被われているが, 耳管開口部から鼓膜側の中耳粘膜には多数の繊毛細胞が存在している。中耳粘膜の部位による菌定着率を比較するため, この繊毛上皮部位と扁平上皮部位を用いて以下の実験を行った(Fig.1)。

Fig. 1



ネブタール麻酔下にモルモットを断頭し, 側頭骨を摘出し, Bullaを開放して側頭骨をHanks液にて洗浄した。まず, 雑菌を除去す

るために, 中耳粘膜の付着したままの側頭骨を抗生物質を含んだDMEM中で $37^{\circ}\text{C}$ ,  $5\%\text{CO}_2$ 下4時間培養し, その後, インフルエンザ菌浮遊液中加入し,  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $5\%\text{CO}_2$ 下で, 4時間培養した。側頭骨をHanks液にて洗浄後, 実体顕微鏡下で, 扁平上皮部位よりほぼ同一面積の組織片を摘出し, rinse後, 1mlのHanks液中でTissue grinderを用いてhomogenizeすることにより菌を再浮遊させた。Homogenateの希釈液を作成し, チョコレート寒天培地にてover night培養後, コロニー数より, 粘膜への付着菌数を算出した。

また, インフルエンザ菌の定着に及ぼすリゾチームの影響を観察するために, 上記の方法にてインフルエンザ菌と中耳粘膜を培養する際, インフルエンザ菌浮遊液に,  $300\mu\text{g/ml}$ のリゾチームを加え, 以下同様の操作を行い粘膜に付着した菌数を算出した。

#### 3. 走査電顕による観察

上記2の方法にてインフルエンザ菌と中耳粘膜を培養後, PBSにて充分洗浄し,  $2.5\%\text{glutaraldehyde}$ ,  $0.1\text{M phosphate buffer}$ ,  $\text{pH}7.4$ で一晩固定した。1%オスミウム酸にて後固定し, 導電染色, 脱水, 臨界点乾燥を行ない, Ptのion sputter coating後, Hitachi S-570にて観察した。

### 結 果

正常モルモット中耳粘膜におけるインフルエンザ菌, nontypable, の定着を扁平上皮部位と繊毛上皮部位と比較すると, 扁平上皮部位( $4.2 \times 10^3 \pm 1.6 \times 10^3$ )に比較し, 繊毛上皮部位( $11.7 \times 10^3 \pm 4.98 \times 10^3$ )に多数のインフルエンザ菌が付着していた。すなわち, インフルエンザ菌は繊毛上皮に対して高い付着性を示すといえる(Fig.2)。

中耳粘膜とインフルエンザ菌の培養時, リゾチームを加えることにより, 扁平上皮部位( $3.9 \times 10^3 \pm 1.5 \times 10^3$ )にては差がみられなかったが, 繊毛上皮部位( $3.6 \times 10^3 \pm 0.8 \times 10^3$ )にて

インフルエンザ菌の定着率が低下した(Fig. 3)。

Fig. 2

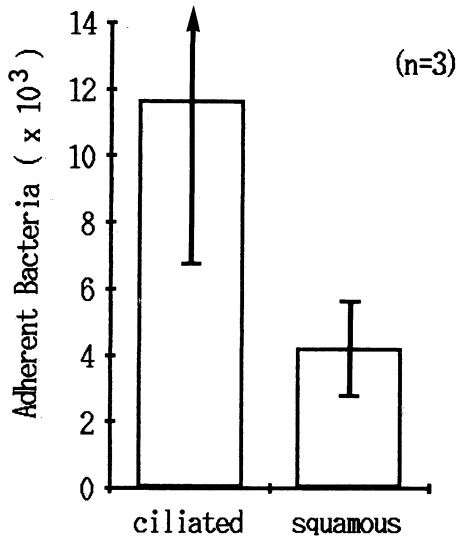
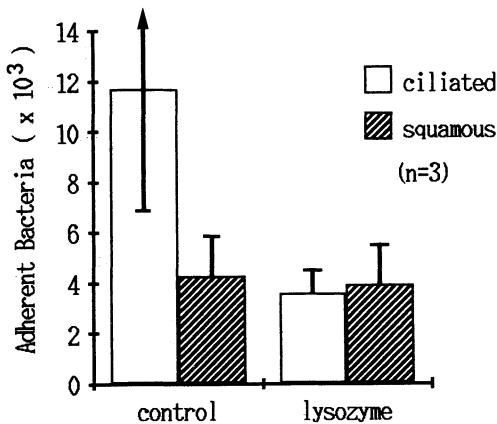


Fig. 3



走査電顕による観察では、扁平上皮部位におけるインフルエンザ菌はごく稀であったが、繊毛上皮部位では、一部の無繊毛細胞、即ち、杯細胞表面に多数の菌の付着が観察された。高倍による観察では、無繊毛細胞のmicrovilliに菌が付着している像が観察された(Fig. 4A)。まさに分泌されようとしている杯細胞

表面にも付着した菌が観察された。繊毛細胞自体への菌の付着は殆ど認められないが、繊毛先端に粘液が残存している場合、この粘液に多数のインフルエンザ菌が付着している像が観察された(Fig. 4B)。また、上皮細胞の脱落がみられる部位では、細胞脱落後の基底膜および、上皮下結合織にインフルエンザ菌が観察された(Fig. 4C)。

考 察

インフルエンザ菌の上皮粘膜への定着に関する研究は、主に、頬粘膜について行なわれており、一般に、Type b等の莢膜を持つ型より莢膜を持たないnontypableが、頬粘膜への定着性が高いことが指摘されている。しかし、インフルエンザ菌の定着に係わるAdhesinおよびreceptorは未だ解明されておらず、様々の面より定着に係わる諸因子について検索が進められているのが現状である。今回、我々は、モルモットの中耳粘膜において、インフルエンザ菌、nontypableが、扁平上皮部位より繊毛上皮部位に定着しやすく、SEMによる観察で、杯細胞表面および繊毛上皮表面に残存する粘液に定着しやすい傾向を認め、これらの物質にReceptorが存在し得る可能性を指摘した。また、粘膜上に定着した細菌は、組織内に侵入してゆき、組織破壊を生じるが、SEMによる観察で、上皮細胞脱落、基底膜および結合織への菌の定着が観察されたのは、これらの状態を反映したものと思われる。他の細菌については、複数のAdhesinおよびreceptorが報告されているものもあり、インフルエンザ菌についても同様の可能性が考えられる。以上の様に、インフルエンザ菌の粘膜への定着は、感染症成立のための必要条件と考えられるが、一方、感染防御の面から考えると、インフルエンザ菌が杯細胞および粘液に定着することにより、粘液繊毛輸送系により菌の排除を容易にする可能性もある。

リゾチームは、扁平上皮部位においては、

菌の定着に影響を及ぼさなかったが、繊毛上皮部位において、有意に菌の定着抑制が認められた。インフルエンザ菌浮遊液にリゾチームを加えることにより、菌数自体に影響を与える可能性もあるが、予備実験にて、リゾチームを加えた群とリゾチームを加えない群の4時間培養後の菌遊液中菌数を比較し、両者に有意の差を認めないことを確認している。このことより、リゾチームが、インフルエンザ菌nontypableの中耳粘膜繊毛上皮への定着を抑制することが示唆される。リゾチームのインフルエンザ菌定着を抑制する機序は不明だが、菌にあたる直接作用あるいは、宿主即ち、粘膜側への作用を介する間接作用が考えられる。これらについては、今後の課題と思われる。

Fig. 4B



Fig. 4A

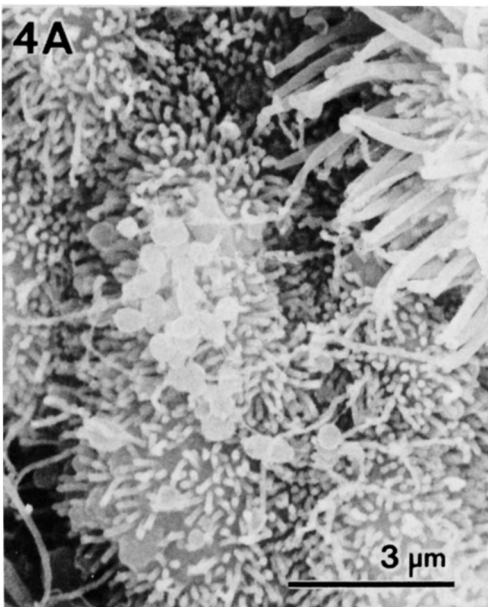
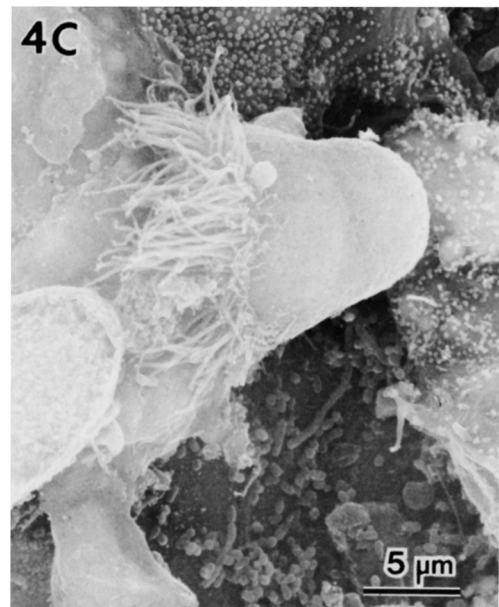


Fig. 4C



## ま と め

モルモット中耳粘膜を用いてインフルエンザ菌(nontypable)の定着性を観察した。扁平上皮部位に比較し絨毛上皮部位に高い定着性が認められた。特に粘液及び杯細胞表面に多数の菌定着が認められた。上皮細胞脱落後の基底膜および上皮下結合織にも高い定着性を示した。リゾチームがインフルエンザ菌の定着性を抑制する作用が認められた。

## 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) Eisenstein, B.I., Beachey E.H., Ofek I.: Influence of sublethal concentrations of antibiotics on the expression of the man nose-specific ligand of *Escherichia coli*, *Infect Immun*, 28:154-159, 1980
- 3) Gilsdorf J.R., Ferrieri P.: Adherence of *Haemophilus influenzae* to human epithelial cells, *Scand J Infect Dis*, 16:271-278, 1984
- 4) Pichichero M.E.: Adherence of *Haemophilus influenzae* to human buccal and pharyngeal epithelial cells: Relationships to pilation, *J Med Microbiol*, 18:107-116, 1984
- 5) Roberts M., Jacobs, R.F., Haas, J.E., Smith A.L.: Adherence of *Haemophilus influenzae* to monkey respiratory tissue in organ culture, *J General Microbiol*, 1130:1437-1447, 1984
- 6) Sable N.S., Connor E.M., Hall C.B., Loeb M.R.: Variable adherence of fimbriated *Haemophilus influenzae* type b to human cells, *Infect Immun*, 48:119-123, 1985
- 7) Porras O., Svanborg-Eden, C., Lagergard T., Hanson L.A.: Method for testing adherence of *Haemophilus influenzae* to human buccal epithelial cells, *Eur J Clin Microbiol*, 4:310-315, 1985
- 8) Farley M.M., Stephens D.S., Mulks M. H. et al: Pathogenesis of IgA1 protease-producing and -nonproducing *Haemophilus influenzae* in human nasopharyngeal organ cultures, *J Infect Dis*, 154:752-759, 1986

## Figure Legends

**Fig. 1.** Schematic drawing of left tympanic bulla of the guinea pig, showing tympanic orifice of eustachian tube (TO), cochlea (C) and ciliated epithelium area (shaded region).

**Fig. 2.** Adherence of *Haemophilus influenzae* nontypable to middle ear mucosa of guinea pig. Data are expressed as mean  $\pm$  SD. "Ciliated" indicates ciliated epithelium area, and "squamous" indicates squamous epithelium area.

**Fig. 3.** Effect of lysozyme on adherence of *H. influenzae* nontypable to middle ear mucosa of guinea pig. Data are expressed as mean  $\pm$  SD.

**Fig. 4.** Scanning electron micrograph of middle ear mucosa infected with *H. influenzae* nontypable.  
A. Bacteria attached to nonciliated cells. B. Bacteria were present in mucus at the tip of cilia. C. Mucosal epithelium were damaged. Sloughing of ciliated cells are observed. Bacteria attached to basement membrane.