

ROLE OF FIMBRIAE IN THE ADHERENCE OF *STREPTOCOCCUS PYOGENES* TO EPITHELIAL CELLS

Tetsuya Kasashima, Shunkichi Baba, Junichiro Shimada, Takehiro Kobayashi,
Haruo Ito, Shinji Kato and Hisato Motai

Department of Otorhinolaryngology, Nagoya City University Medical School

The adherence of bacteria to mucosal surfaces constitutes the initial, critical step in colonization and infection. In the adherence fimbriae of bacteria may play an important role.

The mode of adherence of *S. pyogenes* to human buccal epithelial cell and the morphology of *S. pyogenes* were observed with a scanning electron microscope and a transmission electron microscope.

The adherence was mediated by the fimbriae radiating from the surface of *S. pyogenes* to human buccal epithelial cell and strain that lack M antigen (M-) had smooth, bare cell walls, whereas M+ strain had exteriors covered by hair-like fimbriae. It was found that the presence of M antigen was associated with hair-like fimbriae.

Streptococcus pyogenes の上皮細胞への付着 における菌体線毛の役割

笠島 哲也 馬場 駿吉 島田 純一郎
小林 武弘 伊藤 晴夫 加藤 真二
甕 久人

名古屋市立大学耳鼻咽喉科教室

はじめに

細菌感染の成立機序の第1段階は、細菌と粘膜上皮細胞の接触である。生体、特に上気道においては粘液絨毛輸送機能、分泌型IgAやワルダイエル咽頭輪による特異的な免疫機能、粘液中のリゾチムやラクトフェリンによる非特異的な免疫機能、常在細菌叢などの生体防御機構¹⁾によって細菌との接触を阻止している。しかし細菌がこれら生体の第1線

の防御機構を突破すると、上皮細胞に付着し増殖を始める。この付着には菌体線毛が重要な役割を果たしていると考えられる。そこで今回、*Streptococcus pyogenes* の上皮細胞への付着の微細構造を走査型電子顕微鏡、透過型電子顕微鏡を用いて検討するとともに、*S. pyogenes* の菌体線毛の形態も併せて検討したので、若干の文献的考察を加え報告する。

材料と方法

1. 使用菌株

S. pyogenes C203 (M+株), C203S (M-株) 及び耳鼻咽喉科領域よりの臨床分離 *S. pyogenes* 株を Todd-Hewitt Broth で1夜培養し使用した。

2. 粘膜上皮細胞

健康成人の口腔頬粘膜を滅菌綿棒で擦過して採取した上皮細胞を使用した。

3. *S. pyogenes* の上皮細胞への付着の観察

1) 走査型電子顕微鏡法

ガラス繊維製濾紙を1cm角に切り、普通寒天培地を1~2滴滴下した。この上に *S. pyogenes* C203 浮遊液と頬粘膜上皮細胞浮遊液を37°C water bath の中で30分間 incubation し、上皮細胞に付着しなかった *S. pyogenes* を洗浄した浮遊液を載せた。濾紙片のまま、2%グルタルアルデヒド固定、アセトン脱水、酢酸イソアミル置換を行い、液化二酸化炭素で臨界的乾燥させた。濾紙片を超高分解能用試料台に接着し、白金パラジウム蒸着した²⁾ (Fig. 1)。

Fig. 1

Scanning electron microscopy

Placed on a glass microfibre filter covered with nutrient agar



Fixed in 2% glutaraldehyde



Dehydrated in acetone



Substituted by isoamyl acetate



Dried critical point in liquid CO₂



Coated with Pt+Pd



Examined in a scanning electron microscope

2) 透過型電子顕微鏡法

S. pyogenes C203 浮遊液と頬粘膜上皮細胞浮遊液を37°C water bath の中で30分間 incubation し、上皮細胞に付着しなかった *S. pyogenes* を洗浄後、遠心して pellet 状にした。これを5%グルタルアルデヒドにて前固定、1%オスニウム酸にて後固定、2%酸酢ウランでブロック染色を行った。洗浄・遠心後、2%寒天に包埋しナイフにて1mm角にしたものを、エタノール脱水、QY-1 置換、Quetol 653 包埋した。次いで超薄切片を作製し酢酸ウラン・鉛による二重染色を施した³⁾⁴⁾⁵⁾ (Fig. 2)。

Fig. 2 **Electron microscopy**

Prefixed in 5% glutaraldehyde



Postfixed in 1% OsO₄



Prestained with 2% uranyl acetate



Centrifugated and washed



Embedded in 2% agar block



Dehydrated in ethanol



Substituted by QY-1 (n-butyl glycidyl ether)



Embedded in low viscosity resin (Quetol 653)



Stained with uranyl acetate and lead citrate



Examined in an electron microscope

4. *S. pyogenes* の菌体線毛の観察

1) 走査型電子顕微鏡法

S. pyogenes C203, C203S の菌浮遊液を、薄い普通寒天培地の層でおおわれたガラス繊維製濾紙の上に1~2滴滴下し、その後の操作は Fig. 1 に準じて行った²⁾。

2) 透過型電子顕微鏡法

a. ネガティブ染色法

フォルムバル支持膜をはった銅メッシュに、*S. pyogenes* C203, 臨床分離株の菌浮遊液を1滴載せ、濾紙で水分を軽く吸い取ったのち、5%酢酸ウランを滴下し濾紙で余分な酢酸ウランを吸収、乾燥させた⁴⁾⁵⁾。

b. 超薄切片法

S. pyogenes C203を遠心してpellet状にした。その後の操作はFig. 2に準じて行った⁴⁾⁵⁾。

c. 凍結超薄切片法

S. pyogenes C203, C203Sを遠心してpellet状にした。これを単孔銅メッシュの間に挟み、液体チソで冷やした液体プロパンの中にすばやく投入した。次に1%オスニウム酸と少量の3Åモレキュラーシーブの入った無水アセトンの中に移し-80°C・3日間置き、徐々に-40°C・2日間、-20°C・1日間、4°C・半日間、室温へと戻した。Quetol 653包埋、超薄切片を作製し酢酸ウラン・鉛による二重染色を施した⁵⁾⁶⁾⁷⁾ (Fig. 3)。

Fig. 3

Transmission electron microscopy by the rapid freeze-substitution method

Spread between two thin copper grids



Dropped into liquid propane precooled in liquid nitrogen



Transferred into 1% OsO₄ and molecular sieves 3Å in 100% acetone at -80°C



Warmed stepwise at -40°C, -20°C, 4°C, and room temperature



Embedded in low viscosity resin (Quetol 653)



Stained with uranyl acetate and lead citrate



Examined in a transmission electron microscope

5. 使用した電子顕微鏡

日立 S-570 走査型電子顕微鏡（加速電圧 20 kV）及び日本電子 JEM-200CX 透過型電子顕微鏡（加速電圧 100kV）を使用した。

結 果

1. *S. pyogenes* の上皮細胞への付着の観察

走査型電顕においては、頬粘膜上皮細胞の表面は微小堤に覆われており、そこに *S. pyogenes* が付着しているのが観察された (Fig. 4)。しかし付着の微細構造は観察できなかった。

透過型電顕においては、微小堤に *S. pyogenes* が菌体線毛を介して付着しているのが観察された (Fig. 5)。

2. *S. pyogenes* の菌体線毛の観察

走査型電顕においては、M+株、M-株の菌体線毛は観察できなかった。M+株の一部に莢膜様物質が観察されたが、M-株の中にも同様な物質が観察されたものがあった (Fig. 6)。

透過型電顕においては、臨床分離株 > M+株 > M-株の順に太く、長く、密な菌体線毛が観察された (Fig. 7, 8)。また試料作製法によって菌体線毛の鮮明さが違っていた。すなわち凍結超薄切片法は超薄切片法、ネガティブ染色法に比べ、より鮮明に菌体線毛が観察された (Fig. 7B, 8A, 9)。

考 察

細菌の付着に線毛が関与することはすでに、*E. coli*, *N. gonorrhoeae*, *P. aeruginosa* などにおいて報告されている。また、*S. pyogenes* に関しては、Beachey らが M 蛋白とリポタイコ酸の複合体からなる線毛 fimbriae が付着に関与すると報告している³⁾⁹⁾。我々は酵素抗体法を用いて、耳鼻咽喉科領域各種上皮細胞に対する *S. pyogenes* の付着性を検討したところ、M 蛋白を有する株 (M+株) は M 蛋白を有さない株 (M-株) に較べて有意に付着しやすいとすでに報告した⁹⁾。また今回の実験において、M+株は M-株に較べ

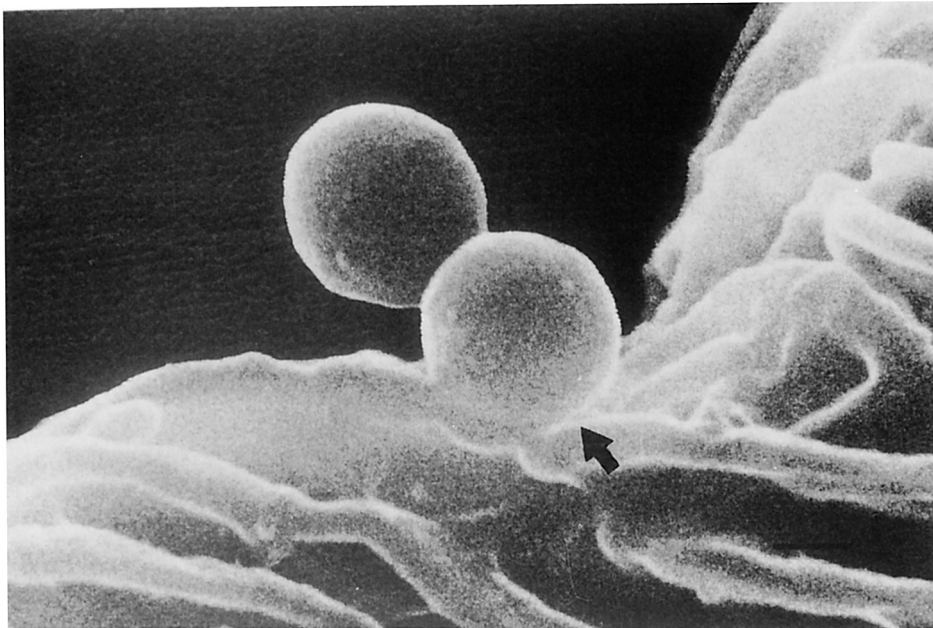


Fig. 4 Scanning electron micrograph of *S. pyogenes* adherent to the microfold of human buccal epithelial cell. (Bar represents $0.2 \mu\text{m}$ in this and following electron micrographs.)

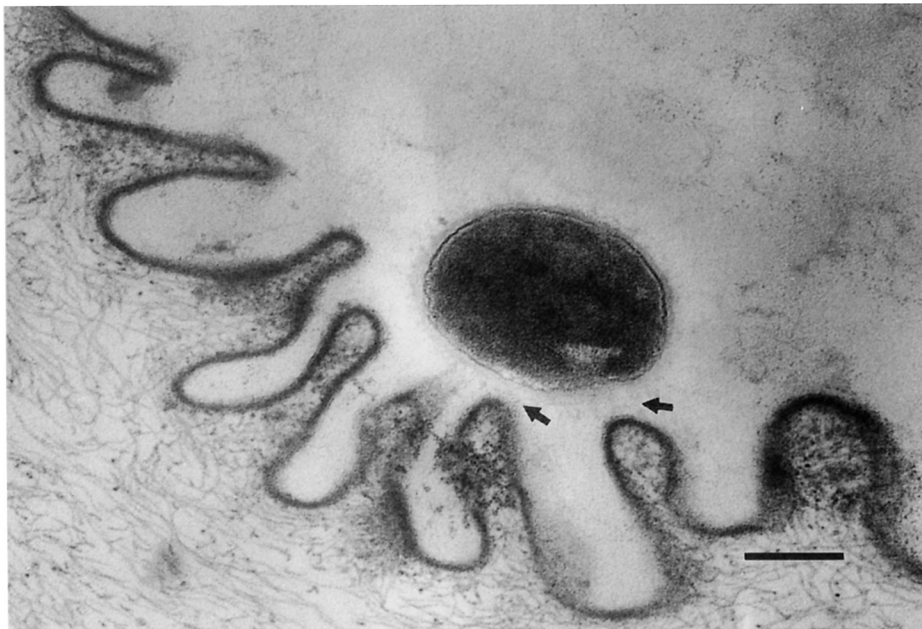


Fig. 5 Transmission electron micrograph of *S. pyogenes* adherent to the membrane of human buccal epithelial cell via its fimbriae.

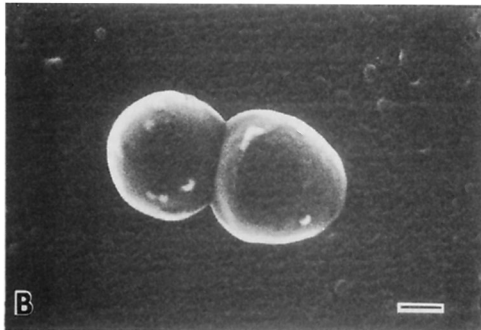
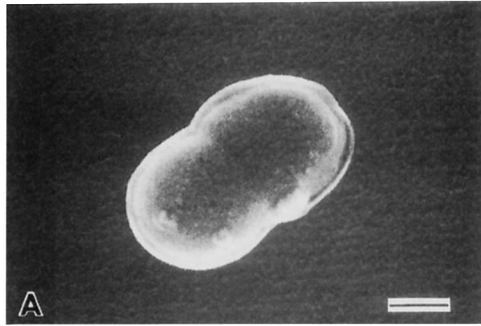


Fig. 6 Scanning electron micrographs of *S. pyogenes* C203 with M protein(A), and C203S without M protein(B). Parts of strain C203 and C203S were covered with capsule.

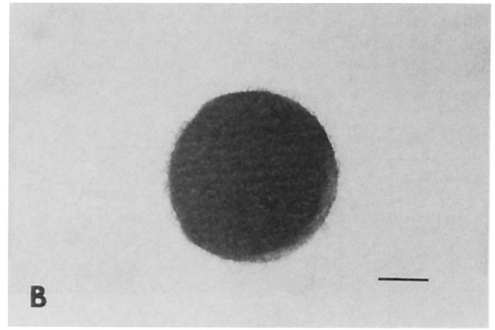
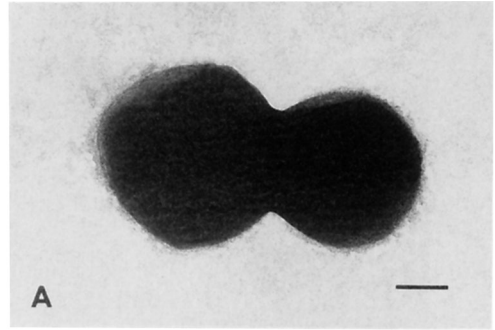


Fig. 7 Negatively stained cells of *S. pyogenes* cultured from a patient who was affected with acute tonsillitis(A), and C203 (B).

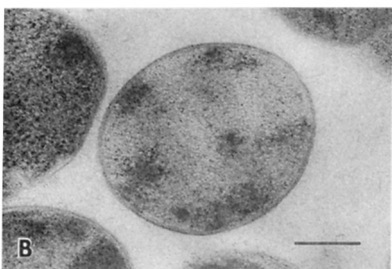
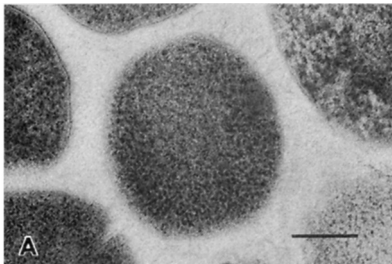


Fig. 8 Sections of *S. pyogenes* C203 (A), and C203S (B) by the freeze-substitution method. Strain C203 had exteriors covered by hair-like fimbriae, whereas strain C203S had smooth, bare cell walls.

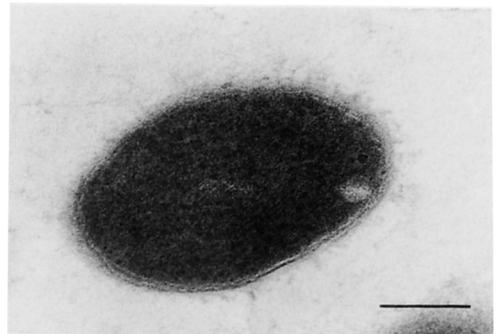


Fig. 9 Section of *S. pyogenes* C203 showing fimbriae by the conventional fixation method.

太く、長く、密な菌体線毛を有していることが認められた。つまりM蛋白はリポタイコ酸をつなぎあわせより太く長い線毛を形成し、付着能を高めていると考えられる。このような現象は陰イオンのリポタイコ酸（またはタイコ酸）とM蛋白分子内の陽イオンアミノ酸（lysine）がイオン結合することによって生ずると考えられている⁹⁾。従って太く、長く、密な菌体線毛をもつ臨床分離株は、おそらく上皮細胞に対する付着能が高く、感染を成立させる可能性が高いと推測される。

ま と め

S. pyogenes の上皮細胞への付着における菌体線毛の役割について検討した。

1. *S. pyogenes* の上皮細胞への付着は菌体線毛を介したものであった。

2. 臨床分離株> M+株> M-株の順に、太く、長く、密な菌体線毛を有していた。

3. 凍結超薄切片法>超薄切片法>ネガティブ染色法の順に、鮮明に菌体線毛が観察された。

文 献

- 1) 小林武弘, 馬場駿吉: 耳鼻咽喉科領域における感染防御. 化学療法の領域, 4: 170-171, 1988.
- 2) 日本電子顕微鏡学会関東支部, 編: 医学・生物学 電子顕微鏡観察法. 丸善株式会社, 1982.
- 3) Beachey, E. H. & Ofek, I. : Epithelial cell binding of group A streptococci by lipoteichoic acid on fimbriae denuded of M protein. J. Exp. Med., 143: 759-771, 1976.
- 4) 日本電子顕微鏡学会関東支部, 編: 電子顕微鏡生物試料作製法. 丸善株式会社, 1975.
- 5) 日本電子顕微鏡学会関東支部, 編: 電子顕微鏡生物試料作製法. 丸善株式会社, 1986.

- 6) Tochikubo, K., Kozuka, S. & Yasuda, Y. : Permeability of gentamicin into the inside of *Bacillus subtilis* spores. FEMS Microbiology Letters, 50: 137-140, 1988.
- 7) Umeda, A., Ueki, Y. & Amako, K. : Structure of the *Staphylococcus aureus* cell wall determined by the freeze-substitution method. J. Bacteriol., 169: 2482-2487, 1987.
- 8) Beachey, E. H., et al. : Attachment of streptococcus pyogenes to mammalian cells. Review Infect. Dis., 5: 670-677, 1983.
- 9) 笠島哲也, ほか: 耳鼻咽喉科領域各種上皮細胞に対する *S. pyogenes* の付着性の検討—酵素抗体法を用いて—. 日扁研誌, 27: 159-164, 1988.

質 疑 応 答

質問 関谷 透（山口大学）

電顕写真にて示された菌体線毛と頬粘膜上皮細胞の所見にて付着の機構についてのお考えを。

応答 笠島哲也（名市大）

M 蛋白とリポタイコ酸の複合体からなる線毛が頬粘膜上皮細胞のレセプターと結合すると考えている。

質問 黒野裕一（大分医大）

- 1) 上皮細胞表面で細菌の定着性が高い部分（偏在部分）はみられなかったでしょうか。
- 2) 細菌増殖の Phase で線毛の形態，密度に差はみられなかったでしょうか。

応答 笠島哲也（名市大）

- 1) 検討していません。
- 2) lag phase から log phase に移行するにつれ，線毛が太く，長く，密になることが予想される。phase ごとの線毛の状態を電顕で観察してみたい。