

ADHERENCE OF *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* AND *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* TO NASOPHARYNGEAL MUCOSAL CELLS AND SECRETORY IMMUNOGLOBULIN A

Hideo Shigemi, Yuichi Kurono, Koichiro Shimamura, Goro Mogi

Department of Otolaryngology, Medical college of Oita

Bacterial adherence to the surface of epithelial cells is the initial step in mucosal infections. It is known to take place between bacterial adhesins and epithelial receptors. Secretory immunoglobulin A plays an important role in mucosal immunity, such as protecting the host from bacterial or viral infections and antigenic invasion.

In the present study, we investigated the bacterial adherence of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* to nasopharyngeal cells, and the role of secretory immunoglobulin A contained in the nasopharyngeal secretions in vitro.

The number of bacteria adhering to epithelial cells was greater in children than in adults and was much greater in children with otitis media with effusion than in control children. Secretory immunoglobulin A specific for the bacteria was detected in half of the nasopharyngeal secretions from both control children and children with otitis media with effusion.

The adherence was significantly lower in the group of subjects having the antibody activity than in those having no activity.

In order to investigate the effect of secretory immunoglobulin A in nasopharyngeal secretions on bacterial adherence, ELISA technique elaborated by Ofek et al. was used. After the treatment of epithelial cells with nasopharyngeal secretions, the ELISA value was reduced. The inhibitory effect was greater in the group treated with nasopharyngeal secretions having secretory immunoglobulin A activity than in the group treated with nasopharyngeal secretions having no activity.

These findings suggest that the adherence of bacteria is an important factor in the pathogenesis of otitis media with effusion in children. Antigen specific secretory immunoglobulin A in nasopharyngeal secretion inhibits the adherence of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* to nasopharyngeal epithelial cells.

Haemophilus influenzae, *Streptococcus pneumoniae* の鼻咽腔粘膜上皮細胞への定着性と分泌型 IgA の役割

○重見 英男 黒野 祐一 島村 康一郎 茂木 五郎

大分医科大学耳鼻咽喉科学教室

I はじめに

上気道感染症の発症には、先ず細菌が局所粘膜上皮表面に定着し増殖することが必要である。この細菌定着性については、1971年に Gibbons¹⁾らが、in vitro での研究を報告して以来、多くの報告がなされており、最近では細菌側の定着因子と上皮細胞側の受容体の生化学的解析も行なわれている。しかし、頬粘膜上皮に関するものが多く、中耳炎発症の重要な因子となる鼻咽腔粘膜上皮に関する研究は少ない。

外分泌液中の主要免疫グロブリンである分泌型IgAは細菌の定着を阻止することがヒト初乳や耳下腺分泌液中の分泌型IgAを用いた研究²⁾で明らかにされているが、鼻咽腔粘液中の分泌型IgAについての報告は少ない。

今回我々は、中耳炎の重要な起炎菌と考えられ、中耳貯留液や鼻咽腔から高頻度に検出されている *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* の鼻咽腔粘膜上皮への定着性を in vitro で観察し、滲出性中耳炎との関わりについて検討した。さらに、鼻咽腔粘液中の分泌型IgAの関与についても検討を行った。

II 対象・方法

1. 鼻咽腔粘膜上皮細胞

口腔より綿棒を挿入し軟口蓋を上方に押し

上げ鼻咽腔粘膜表面を擦過することにより上皮細胞を採取した。採取された上皮細胞はPBS(PH7.2)で2回洗浄したのち 2×10^4 / ml に調整した。同時に鼻咽腔粘液を経鼻的に吸引採取した。

2. 細菌

H. influenzae (nontypable), *S. pneumoniae* (Biotype III) は、小児滲出性中耳炎患者の鼻咽腔より検出された菌を使用した。-80°Cに保存し、実験に際してチョコレート寒天培地あるいは血液寒天培地で37°Cで12時間培養した後、Tryptic soy bross (TSB) で6時間培養しPBSで洗浄し 2×10^9 CFU / ml に調整した。

3. 定着の観察

上皮細胞、細菌それぞれの浮遊液を1ml混和し37°Cで60分間振盪培養したのち濾過洗浄し、上皮細胞表面に定着した細菌を間接蛍光抗体法により観察した。細菌に対する一次抗対はウサギを0.5%ホルマリン処理した細菌で免疫した抗血清を用い、FITC標識抗ウサギIgG抗体を二次抗体として使用した。20個の上皮細胞それぞれに定着した細菌数を数え、その平均を定着細菌数とした。

4. 分泌型IgAの役割

鼻咽腔粘液中の分泌型IgAの役割を検討するために鼻咽腔粘液の *H. influenzae*, *S. pneu-*

moniae に対する抗体活性の有無を Yamaguchi³⁾らの間接ELISA法で検討した。プレートにホルマリン処理した*H.influenzae*、*S.pneumoniae*を吸着させ、これに鼻咽腔粘液を添加し、HRP標識抗ヒトSC抗体、および抗ヒトIgA抗体を反応させることより比色定量した。その抗体活性の有無により定着細菌数を比較した。

分泌型IgAの直接的な役割は、Ofekら⁴⁾のELISA法を用いて検討した。リジン、グルタルアルデヒドで活性化したプレートに鼻咽腔粘膜上皮細胞を固着させ、5%牛血清アルブミンで細菌が非特異的にプレートに固着することを阻止した後、鼻咽腔粘液希釈液と細菌浮遊液を入れ1時間培養した。プレートを洗浄後上皮細胞表面に定着した細菌に対してウサギより得られた抗血清、HRP標識抗ウサギIgG抗体を反応させ、比色定量した。

III 結 果

*H.influenzae*の鼻咽腔粘膜上皮細胞への定着細菌数は成人に比べ小児において高値を示した。また、小児においては健常者群に比べて滲出性中耳炎患者群で定着細菌数が有意に高値を示した。*S.pneumoniae*の鼻咽腔粘膜上皮細胞への定着細菌数も*H.influenzae*と同様に、成人よりも小児で、また小児滲出性中耳炎患者群では、健常者群よりも定着細菌数が高値を示した。(table 1)

TABLE1. Bacterial Adherence to Nasopharyngeal Epithelial Cell

	OME	Normal	
<i>S.pneumoniae</i>			
Child	8.34±2.75	6.29±2.49	p<0.01
Adult	4.42±2.20	3.48±2.35	n.s.
<i>H.influenzae</i>			
Child	6.75±3.20	4.88±2.80	p<0.05
Adult	2.98±1.08	2.63±1.18	n.s.

Number of adherent bacteria per cell: Mean±S.D.

細菌に対する分泌型IgAの抗体活性陽性率は、滲出性中耳炎群、健常者群ともにほとんど差は認められなかった。分泌型IgAの抗体

活性の有無で定着細菌数を比較してみると、*H.influenzae*、*S.pneumoniae*ともに抗体活性を有する群が、これを有しない群よりも低値であった。(table 2)

TABLE2. SigA in Nasopharyngeal Secretion and Bacterial Adherence

	SigA activity to bacteria		p<0.01
	(+)	(-)	
<i>S.pneumoniae</i>	5.82±2.77	8.80±3.19	
<i>H.influenzae</i>	5.12±2.26	6.97±3.65	p<0.05

Number of adherent bacteria per cell: Mean±S.D.

H.influenzae、*S.pneumoniae*のいずれも、分泌型IgA抗体活性をもつ鼻咽腔粘液を加えたものは、抗体活性陰性の鼻咽腔粘液あるいはPBSを加えたものよりもELISA値が低値であった。(table 3)

TABLE3. Inhibition of Bacterial Adherence by SigA in Nasopharyngeal Secretion

	antibody activity		PBS
	(+)	(-)	
<i>S.pneumoniae</i>	0.465 ±0.248	0.523 ±0.235	0.749 ±0.271
<i>H.influenzae</i>	0.336 ±0.188	0.393 ±0.185	0.442 ±0.187

ELISA value ; Mean±S.D.
*:p<0.05 **:p<0.01 ***:p<0.001

IV 考 察

細菌定着性には、細菌側の因子、上皮細胞側の因子、さらに両者を取り巻く外分泌液の因子がそれぞれ関与している。

細菌側因子に関する報告では、Andersson⁵⁾らが反復性中耳炎患者から分離された*S.pneumoniae*は、敗血症や髄膜炎患者から分離された菌株より定着性が高いことを報告している。また、*H.influenzae*についてGuerina⁶⁾らは、上皮細胞への定着性はpiliの数と相関すると報告している。これに対して、Porras⁷⁾らは、*H.influenzae*について分離疾患や生物活性型によっても細菌の定着性には有意な差がなく生体側の因子の関与が大きいと述べている。

上皮細胞側の因子として、Andersson⁵⁾ら

は*S.pneumoniae*の咽頭上皮細胞への定着性が、健常者と比較して反復性中耳炎患者で有意に高いことを証明し、Kurono⁸⁾らは*S.pyogenes*の鼻粘膜上皮細胞への定着性が慢性副鼻腔炎患者で高いことを報告している。

今回の研究では、細菌側の因子についての検討は行っていないが、臨床的研究で、小児鼻咽腔からの*H.influenzae*、*S.pneumoniae*の検出率が高い⁹⁾ことを併せ考えると、滲出性中耳炎患者において細菌定着性が亢進しているのは細菌よりもむしろ上皮細胞にその原因があると推察される。

外分泌液中の因子として、Williams²⁾らは耳下腺分泌液から分泌型IgAを精製し、口腔内連鎖球菌の定着性への関与を検討し、抗体活性陽性の分泌型IgAによりその定着性が抑制されることを報告している。今回の鼻咽腔粘液を用いた研究でも、細菌に対する抗体活性陽性の鼻咽腔粘液は、抗体活性陰性の鼻咽腔粘液やPBSと比較して著明に細菌の定着を抑制し、鼻咽腔粘液中の分泌型IgAがこれら細菌の鼻咽腔粘膜上皮への定着に関わっていることが示された。

細菌定着性には外分泌液中の分泌型IgAのみならず糖質や糖タンパク質なども関与することが知られている¹⁰⁾。今回の研究でも鼻咽腔粘液中の分泌型IgAが抗体活性を持たないものでもPBSと比較してELISA値が低値であり、分泌型IgA以外の鼻咽腔粘液中の因子の細菌定着性への関与も示唆された。

V ま と め

H.influenzae、*S.pneumoniae*の鼻咽腔粘膜上皮細胞への定着性は、両者ともに成人よりも小児で、さらに小児では健常者よりも滲出性中耳炎患者において有意に高く、この細菌定着性の亢進が本症の発症あるいは遷延化の重要な因子の一つと考えられた。

鼻咽腔粘液中の*H.influenzae*、*S.pneumoniae*に対する抗体活性を有する分泌型IgAによ

り細菌定着性が抑制され、鼻咽腔においても分泌型IgAが粘膜局所免疫において重要な役割を演じていることが示唆された。

参 考 文 献

- 1) Gibbons RJ, Van Houte J: Selective bacterial adherence to oral epithelial surfaces and its role as an ecological determinant, *Infect Immun*, 3: 567-573, 1971
- 2) Williams RC, Gibbons RJ: Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A: a mechanism of antigen disposal, *Science*, 77: 697-699, 1972
- 3) Yamaguchi T, DeMaria TF, Lim DJ: Antibody response in experimental *Haemophilus influenzae* otitis media, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 112: 554-557, 1986
- 4) Ofek I, Courtney HS, Schifferli DM, Beachey EH: Enzyme-linked immunosorbent assay for adherence of bacteria to animal cells, *J clin Microbiol*, 24: 512-516, 1986
- 5) Andersson B, Eriksson B, Falsen E, Fogh A, Hanson La, Nylén O, Peterson H, Svanborg-Eden C: Adhesion of streptococcus pneumoniae to human pharyngeal epithelial cells in vitro: differences in adhesive capacity among strains isolated from subjects with otitis media, septicemia, or meningitis or healthy carriers, *Infect Immun*, 32: 311-317, 1981
- 6) Guerina NG, Lancermann S, Clegg HW, Kessler TW, Goldmann DA: Adherence of pilated *Haemophilus influenzae* type b to human oropharyngeal cells, *Infect Disease*, 146: 564, 1982
- 7) Porras O, Svanborg-Eden C, Lagergard

T, Hanson LA : Method for testing adherence of Haemophilus influenzae to human buccal epithelial cells, Eur J Clin Microbiol, June: 310-315, 1985
8) Kurono Y, Fujiyoshi T, Mogi G : Secretory IgA and bacterial adherence to nasal mucosal cells, Ann Otol Rhinol Laryngol, 98 : 273-278, 1989
9) Kurono Y, Tomonaga K, Mogi G : Staphyrococcus epidermidis and Staphy-

rococcus aureus in otitis media with effusion Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 114 : 1262-1265, 1988
10) Andersson B, Porras O, Hanson LA, Lagergard T, Svanborg-Eden C : Inhibition of attachment of Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae by human milk and receptor oligosaccharides, J Infect Dis, 153 : 232-237, 1986

質 疑 応 答

質問 松永 亨 (阪大)

用いた細菌の毒力の強さと定着性との間の関係について如何

質問 中井義明 (大阪市大)

アデノイドの大小との関係は如何でしょうか。

質問 岩野 正 (関西医大)

- ①成人、小児で細菌定着性に差がでたのは上皮細胞のレセプターの変化によるものか。
- ②成人群で滲出性中耳炎患者と対照群で定着性に大きな差がなかった理由について。

応答 重見英男 (大分医大)

vilurence の差による細菌定着の検討は今回の実験では行っていない。

応答 重見英男 (大分医大)

アデノイドの大きさとの関係については、未だ検討を行っていません。

応答 重見英男 (大分医大)

加齢によるreceptorの変化が考えられるが検討は行っていない。

成人の場合は対象が少なく有意差を得るにいたらないが、症例を増せば差が出ると思われる。