

## IMMUNOELECTRON MICROSCOPIC STUDIES ON INTERACTION OF FIBRONECTIN WITH *STREPTOCOCCUS PYOGENES*

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

Department of Otorhinolaryngology, Nagoya City University Medical School

Fibronectin is a large glycoprotein of blood and tissue that occurs in both soluble (plasma) and insoluble (tissue associated) forms. Soluble fibronectin may interact with *Streptococcus pyogenes* to promote phagocytosis and reticuloendothelial clearance of invading organisms. Insoluble fibronectin may serve as a lipoteichoic acid sensitive receptor for

*S.pyogenes* to modulate mucosal surface colonization. In this study using immunoelectron microscopy we found that soluble fibronectin binded to *S.pyogenes*, and that there were receptors on human pharyngeal epithelial cells other than insoluble fibronectin to which *S.pyogenes* adhered.

### *Streptococcus pyogenes* に付着する フィブロネクチンの免疫電顕的検討

笠島 哲也 馬場 駿吉 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

細菌が局所に感染して病原性を発揮するためには、その最初の段階として局所の上皮細胞に付着・定着することが必須の条件である。種々の化膿性炎症や自己免疫疾患を引き起こすことで臨床的に重要視されている、*Streptococcus pyogenes* の付着に関しては、細菌側の adhesin としてリポタイコ酸、細胞側の receptor としてフィブロネクチンが関与すると考えられている<sup>1)2)3)</sup>。そこで今回、免疫電顕法を用いて *S.pyogenes* に付着するフィブロネクチンの局在、及び *S.pyogenes* を付着

させた咽頭上皮細胞におけるフィブロネクチンの局在を検討したので、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(Mtype3)を Todd-Hewitt Broth で 37°C 一夜培養し、リン酸緩衝食塩水 (PBS) にて 1 回洗浄後菌浮遊液を調製した。

##### 2. 咽頭上皮細胞の調製

健康成人の咽頭上皮細胞を滅菌綿棒で擦過

して採集し、PBSで3回洗浄後咽頭上皮細胞浮遊液を調製した。

### 3. 付着実験

*S.pyogenes* C203 浮遊液と咽頭上皮細胞浮遊液を同量づつ混ぜ、37°C water bath の中で30分間反応させた後、上皮細胞に付着しなかった *S.pyogenes* を洗浄した。

### 4. 免疫電子顕微鏡法

1) *S.pyogenes* に付着するフィブロネクチンの局所

フォルムバル膜でコートした銅グリッドに菌浮遊液を滴下、半乾燥させた。前処置として goat IgG と20分間反応させ PBS で1回洗浄した。次にヒト・フィブロネクチンと1時間反応させ PBS で1回洗浄後、金粒子標識ヤギ抗ヒト・フィブロネクチン抗体と30分間反応させた<sup>4)</sup>。PBS で洗浄を3回繰り返し最後に蒸留水で1回洗浄後、染色を行こなわずそのまま日本電子 JEM-200 CX 透過型電子顕微鏡にて観察した。

2) *S.pyogenes* を付着させた咽頭上皮細胞におけるフィブロネクチンの局在

*S.pyogenes* C203 を付着させた咽頭上皮細胞を、8%パラホルムアルデヒドにより固定し、エタノールにより脱水後、ロイクリルK 4 M 樹脂に包埋して、紫外線重合を行った<sup>5)</sup>。超薄切片に0.1μmリジン、2%ゼラチン、goat IgG の前処理を施した後、金粒子標識ヤギ抗ヒト・フィブロネクチン抗体を1時間反応させた。PBS で2時間洗浄を行い、最後に蒸留水で1回洗浄後、3%酢酸ウランで染色して日本電子 JEM-200CX 透過型電子顕微鏡にて観察した。

## 結 果

1. *S.pyogenes* に付着するフィブロネクチンの局在

*S.pyogenes* C203 にヒト・フィブロネクチンを反応させた群には、*S.pyogenes* C203 の菌体周囲に多くの金粒子が結合した (Fig. 1)。

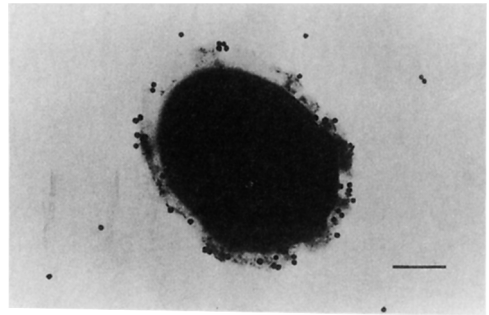


Fig. 1 Transmission electron micrograph of whole-mounted, immunostained *S.pyogenes*, which reacted with human fibronectin and then goat anti-human fibronectin-15 nm gold particles. The gold is bound to the cell periphery. (Bar represents 0.2 μm.)

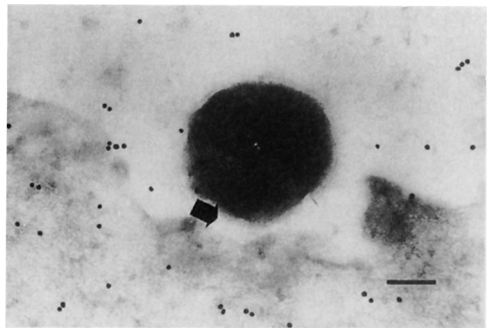


Fig. 2 Transmission electron micrograph of an ultrathin section of human pharyngeal epithelial cells incubated with *S.pyogenes* followed by treatment with goat anti-human fibronectin-15nm gold particles. The gold is not specifically bound to the surface (arrow) of human pharyngeal epithelial cells where *S.pyogenes* adheres. (Bar represents 0.2 μm.)

しかしヒト・フィブロネクチンを反応させなかったコントロール群には金粒子はほとんど結合しなかった。このことから *S.pyogenes* にフィブロネクチンが付着することがわかった。

2. *S.pyogenes* を付着させた咽頭上皮細胞におけるフィブロネクチンの局在

*S.pyogenes* を付着させた咽頭上皮細胞において、金粒子の *S.pyogenes* と上皮細胞の付着部への特異的結合はみられなかった (Fig. 2)。

すなわちフィブロネクチンは付着部に局在していなかった。

### 考 察

フィブロネクチン<sup>6,7)</sup>は、1948年にMorrison<sup>8)</sup>がヒトの血漿フィブリノーゲン精製過程で見いだした血液及び細胞に存在する高分子の糖蛋白である。フィブロネクチンの生物活性<sup>7)</sup>には、①細胞の接着の促進②遊走細胞の走化性の促進③食作用とオプソニン活性の促進④癌細胞を正常細胞へ還元⑤細胞の分化の調節⑥組織の修復等があげられる。フィブロネクチンは*S.pyogenes*を初め多くの細菌に付着する<sup>9)</sup>。我々は免疫電顕法を用いてこのことを明らかにしたが、その意義については血液中のフィブロネクチンが*S.pyogenes*に付着することで食作用及びオプソニン活性が促進され、上皮細胞に存在するフィブロネクチンに*S.pyogenes*が付着することで種々の生体防御因子が菌体に作用を及ぼす機会を与えている。このようにフィブロネクチンは体液性防御因子としての役割の一端を担っていると考えられる。しかし時としてフィブロネクチンに付着した*S.pyogenes*が定着・増殖し、感染が成立することもあり、この機序は今後検討しなければならない。

Beachey<sup>2)</sup>, Simpson<sup>3)</sup>らの報告にみられるように、*S.pyogenes*の付着に細胞側の receptor としてフィブロネクチンが関与するとされてきた。しかし今回免疫電顕法を用いて*S.pyogenes*を付着させた咽頭上皮細胞におけるフィブロネクチンの局在を検討したところ、*S.pyogenes*はフィブロネクチンの存在にかかわらず咽頭上皮細胞に付着していた。このことはフィブロネクチン以外にも receptor が存在することを示唆している。他の細菌の receptor<sup>10)</sup>に関しては、たとえば*E.coli*では D-mannose, *N.gonorrhoeae*では Gal  $\beta$  1 - 3 GalNac  $\beta$  1 - 4 Gal, *M.pneumoniae*では Sialyl glycoconjugates が関与すると報告さ

れている。*S.pyogenes*においても、フィブロネクチン以外の複合糖質、そのほか細胞表面の疎水性物質が receptor として働いている可能性があり、さらに詳細な検討が必要である。

\* Gal=galactose

GalNac=N-acetyl galactosamine

### ま と め

1. フィブロネクチンは*S.pyogenes*に付着することを免疫電顕法を用いて明らかにした。
2. *S.pyogenes*の付着に関与する細胞側の receptor は、フィブロネクチン以外にも存在することが示唆された。

### 文 献

- 1) 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
- 2) Beachey, E.H., Simpson, W.A., Ofek, I., Hasty, D.L., Data, J.B. & Whitnack, E. : Attachment of Streptococcus pyogenes to Mammalian Cells. Review Infect. Dis., 5 : 670-677, 1983.
- 3) Simpson, W. A. & Beachey, E. H. : Adherence of Group A Streptococci to Fibronectin on Oral Epithelial Cells. Infect. Immun., 39 : 275-279, 1983.
- 4) Ericson, D., Ellen, R.P. & Buivids, I. : Labeling of Binding Sites for  $\beta_2$ -Microglobulin ( $\beta_2m$ ) on Nonfibrillar Surface Structures of Mutans Streptococci by Immunogold and  $\beta_2m$ -Gold Electron Microscopy. J. Bacteriol., 169 : 2507-2515, 1987.
- 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) 熊谷勝男, 日沼州司 : Fibronectin の生物

- 学的意義, 感染・炎症・免疫, 11 : 91-99, 1981.
- 7) 木谷孔保ほか : 免疫療法の前後における血中 Fibronectin の変動について. 日本耳鼻咽喉科感染症研究会会誌 2 ( 1 ) : 55-58, 1984.
- 8) Morrison, P.R., Edsall, J.T.& Miller, S.G. : Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. XVIII. The Separation of Purified Fibrinogen from Fraction I of Human Plasma. J. Amer. Chem. Soc., 70 : 3103-3108, 1948.
- 9) Butler, K.M., Baker, C.J.& Edwards, M.S. : Interaction of Soluble Fibronectin with Group B Streptococci. Infect. Immun., 55 : 2404-2408, 1987.
- 10) Beachey, E.H. : Bacterial Adherence : Adhesin-Receptor Interactions Mediating the Attachment of Bacteria to Mucosal Surfaces. J. Infect. Dis., 143:325-345, 1981.