

## THE STUDY FOR ADHERENS OF *STREPTOCOCCUS PYOGENES* TO TONSILLAR EPITHELIAL CELLS USING OF FLOW CYTOMETRY TWO COLOR ANALYSIS

Naoya Miyamoto, Joh Nishimura, Shin-ichrou Yamamoto, Ippei Takagi,  
Takehiro Kobayasi, Shunkichi Baba

Department of Otolaryngology, Nagoya City University Medical School

- 1) The adherence of *Streptococcus pyogenes* to tonsillar cells was studied using Flow cytometry two color analysis.
- 2) FITC conjugated anti-fibronectin-antibody was employed to detect fibronectin, and adherence of bacterium was detected by adding avidin-PE to biotinized bacterium.
- 3) Following results were obtained ; the larger amount of fibronectin cell has, the more numerous *S. pyogenes* adhere

to epithelial cell, and, more numerous bacterium attach to fibronectin treated cells than untreated cells,

Coutraly, less numerous bacterium attach to pronase treated cells than to untreated cells.

- 4) More numerous bacterium attach to the cells from the patient with chronic tonsillitis than from normal individual tonsills.

## フローサイトメトリーを用いた*Streptococcus pyogenes*の扁桃上皮に対する付着性の検討

宮本 直哉 西村 穰 山本 真一郎  
高木 一平 小林 武弘 馬場 駿吉

名古屋市立大学医学部耳鼻咽喉科学教室

### はじめに

上気道感染の成立には、まず細菌が局所粘膜上皮に定着固定することが必要である。この現象はbacterial adherensと呼ばれ、細菌側のadhesinと粘膜上皮側のreceptorとの間で行われる。今回我々は耳鼻咽喉科領域の代表的感染症である扁桃炎において高率に検出される*S.pyogenes*の扁桃上皮に対する付着性を

receptorのひとつと考えられているフィブロネクチンについて検討を行った。

従来、付着量の測定には光学顕微鏡によるカウント法、または、ELISA法<sup>1)</sup>などが用いるが、今回我々は、フィブロネクチンと菌を同時に、しかも一つ一つの細胞毎に測定できるフローサイトメトリー2カラー分析を用いた。尚、1検体あたり5000個の細胞を測定し

た。フローサイトメトリーの機種はBecton Dickinson社のFACScanを使用した。

対象および方法

フローサイトメトリーは、あらかじめ細胞内または表面の目的物質に蛍光標識を結合させ、一つ一つの細胞を流し、レーザー光によりその蛍光物質が励起された後出てくる蛍光を測定する方法である。本実験においては、細胞表面のフィブロネクチンと、そこに付着している*S.pyogenes*をそれぞれ別の蛍光物質にて標識し、細胞毎の蛍光強度を測り、コンピューターにて解析検討を行った。Fig 1のように、フィブロネクチンの検出にはFITC (fluorescein) 標識抗フィブロネクチン抗体を、*S.pyogenes*の検出には、まず菌をビオチン化し、上皮に付着させた後PE (phycoerythrin) 標識ストレプト・アビジンを結合させることによって行った。そして、双方に488 nmのレーザー光を当て、FITCよりの525nmの蛍光強度をFL 1として、PEよりの575nmの蛍光強度をFL 2として測定し、それぞれフィブロネクチン、*S.pyogenes*の量とした。

1) *S.pyogenes*のビオチン化および菌量の調節 (Fig 2)<sup>2)</sup>

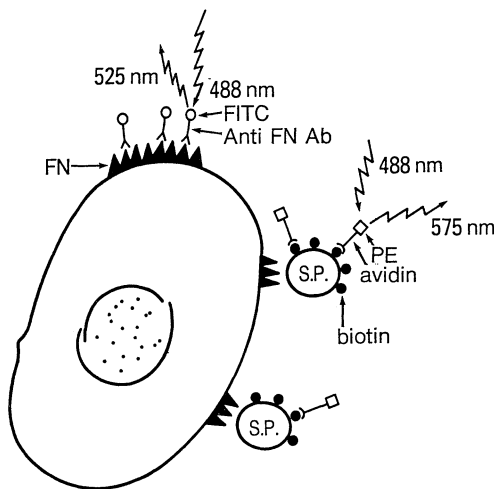


Fig 1 フィブロネクチン(FN)と*Streptococcus pyogenes*(SP)の検出モデル図

I.Ofekの方法を用いて菌のビオチン化を行った。本実験に用いた菌は*S.pyogenes* C203株であり、これは、adhesinとしてのM-proteinを有する株である。このC203株を血液寒天培地にて、一晚増殖培養させ浮遊液を作成し、PBS (0.05M PH7.4)にて洗浄後0.1M NaHCO<sub>3</sub> (PH8.2)に浮遊させ550nmに対する吸光度OD<sub>550</sub>が0.7になるように濃度を調節する。次に、N-ヒドロキシサクシミド・ビオチンをジメチルホルムアミドに溶解し10mg/mlとし、これを菌液1 mlにつき12.5 μl加え、温室にて2時間放置する。その後、PBSにて3回洗浄し3 × 10<sup>8</sup> CFU/mlに調節した。尚、ビオチン化しても菌の付着において変化がないことは、あらかじめグラム染色で顕微鏡にて確認しておいた。

2) 付着およびフローサイトメトリーによる測定 (Fig 3)

扁桃上皮細胞を綿棒にて擦過採取して、PBSにて900rpm15分間3回洗浄後、上清を取り除き1検体あたりの細胞数を5 × 10<sup>4</sup>個とする。フィブロネクチン処理群としてはフィブロネクチン (sigma社製) 500 μg/mlを1.5ml加え、また、プロナーゼ処理群はプロナーゼ10 μg/mlを1.5ml加え、それぞれ37°Cで100分間恒温振盪槽にてincubateし、PBSにて3回洗浄し上清を取り除き上皮細胞のみとする。それに上述のビオ

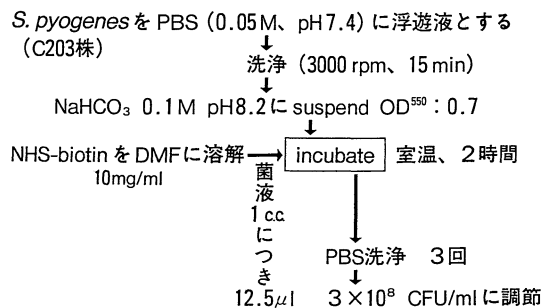


Fig 2 菌のビオチン化

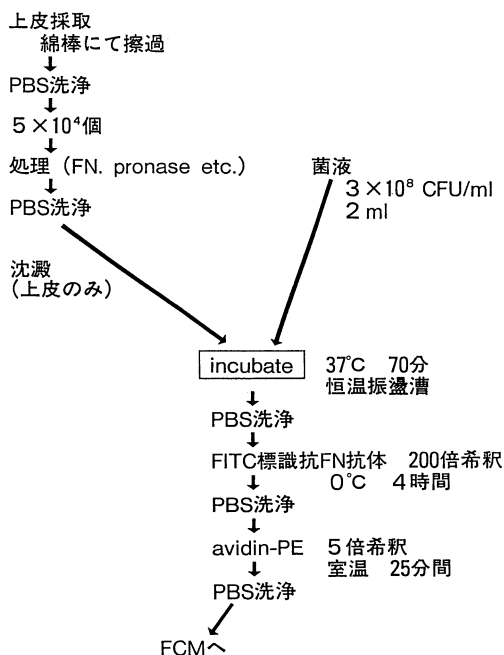


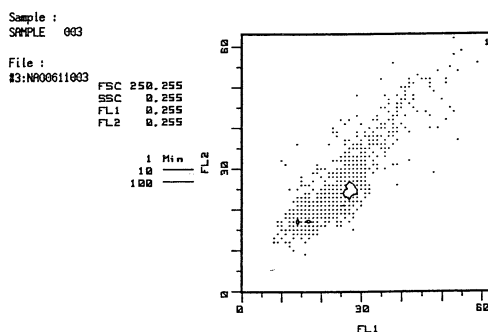
Fig 3 菌の付着及び菌とフィブロネクチンの標識

菌液 2 ml を加え、37°C 70 分間恒温振盪槽にて incubate し PBS 洗浄後、FITC 標識抗フィブロネクチン抗体 200 倍希釈を加え 0°C にて 4 時間反応させた後、更に洗浄後、ストレプト・アビジン-PE (Becton Dickinson 社製) 5 倍希釈を 125  $\mu$ l を加え温室にて 25 分間反応させ、洗浄後 PBS にて全量 1.5 ml として、フローサイトメトリーにて測定した。尚、フローサイトメトリーは流れて来る物質をすべて測定してしまうので、解析するときはあらかじめ“gating”をかけ、フリーな菌や不純物を除き目的とする上皮のみを対象とするようにセットしておいた。

## 結 果

### 1) 正常扁桃上皮細胞におけるフィブロネクチンと *S.pyogenes* 付着の関係 (Fig 4)

上皮細胞は扁平な形をしているため、細胞が流されてきて測定された時の向きにより蛍光量に変化してしまう、そのため、前述の gating を更に狭くし、限られた向きの

Fig 4 扁桃上皮におけるフィブロネクチン/*S.pyogenes* 付着の関係

み (上皮の面がレーザー光に対し垂直になっている細胞のみ) を解析した。その結果、フィブロネクチン (FL 1) の増加に伴い *S.pyogenes* 付着 (FL 2) が多くなるという linear な相関関係が得られた。

### 2) フィブロネクチン処理による付着性の変化 (Fig 5)

500  $\mu$ g/ml のフィブロネクチン処理を加えた群は無処理群に比べてグラフが右上方へシフトしている。平均値も FL 1 が 27.30 から 38.97 へ、FL 2 が 28.13 から 35.26 へ増加している。つまり、フィブロネクチン処理によって上皮のフィブロネクチンが増加したにつれて、*S.pyogenes* の付着も増加したことが解る。

### 3) プロナーゼ処理による付着性の変化 (Fig 6)

プロナーゼにて切断させたフィブロネクチンはそこに残っている限り抗原性は保たれるので本項目においては、FL 2 (*S.pyogenes* の付着) のみ測定した。結果は Fig 6 の如くである。横軸は FL 2 の強度、縦軸はその蛍光強度を示した細胞数である。10  $\mu$ g/ml のプロナーゼ処理を行った群は、無処理群に比べて有意ではないが、平均をみると若干付着量が低下している。

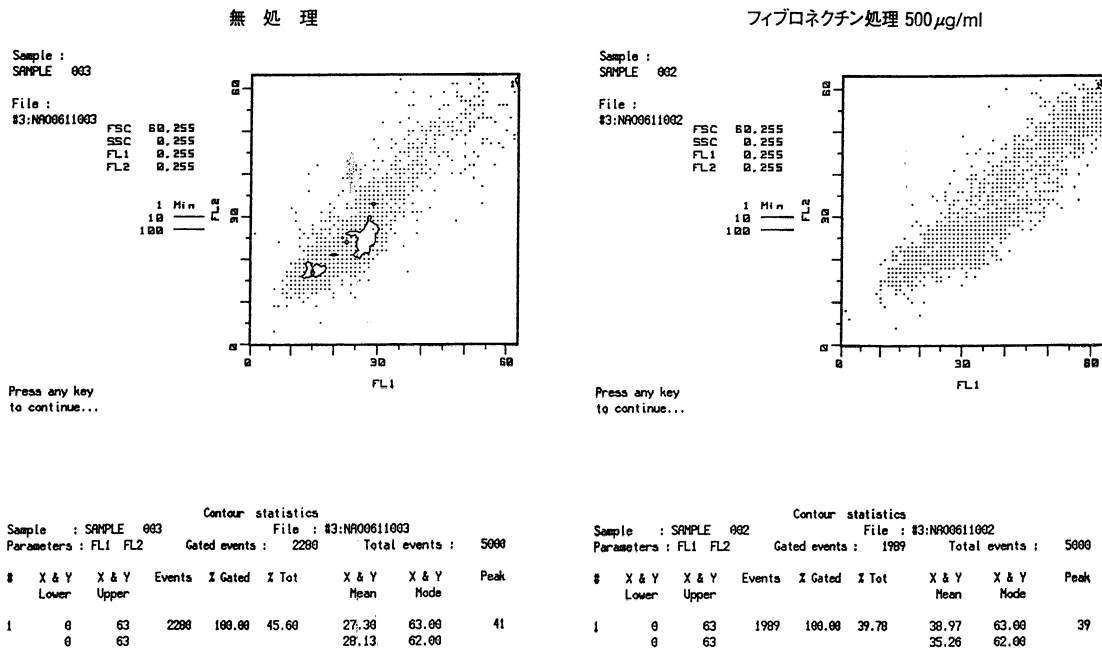


Fig 5 フィブロネクチン処理による付着性の変化

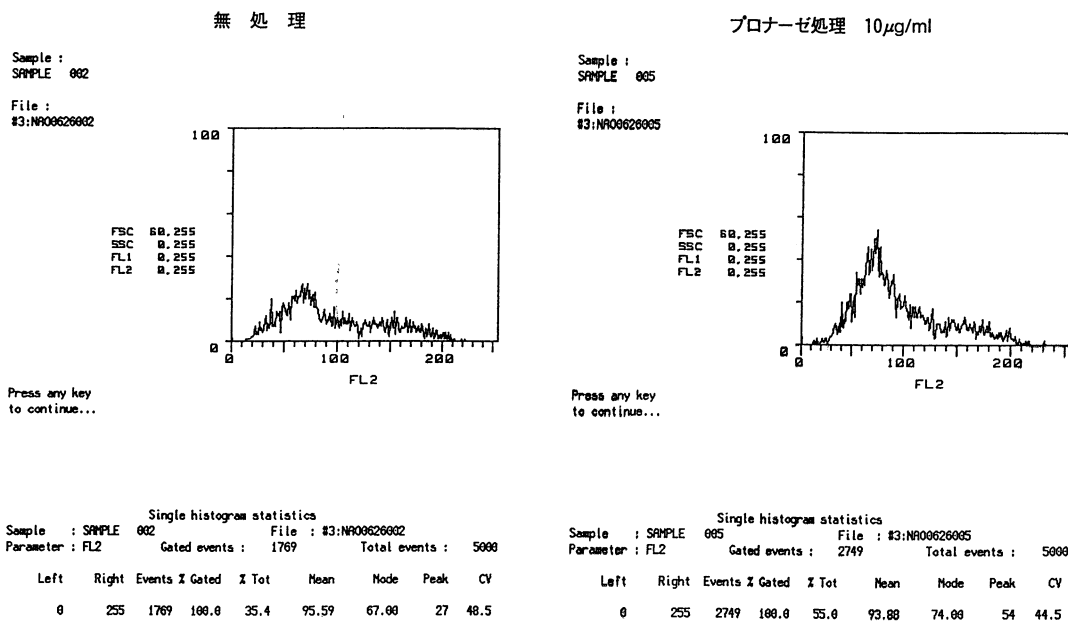


Fig 6 プロナーゼ処理による付着性の変化

あまり大きな差がみられないのは、プロナーゼ処理でフィブロネクチンの分子が切断されても、それが上皮に残っている限り接着能は残存するためであると思われる。

4) 健常者および慢性扁桃炎患者における付着性の違い (Fig 7)

慢性扁桃炎患者は健常者に比べ、フィブロネクチン (FL1) が平均で32.39に対し37.51と多く、されに合わせ、*S.pyogenes* の付着 (FL2) も平均で29.80に対し35.83と多い、グラフでみれば右上方にシフトしており、更に、慢性扁桃炎患者のクラブは健常者のグラフに対し、かなりばらつきが多くなっている。つまり、フィブロネクチンが少ないにもかかわらず*S.pyogenes*の付着が多い細胞や、逆に、フィブロネクチンが多いにもかかわらず*S.pyogenes*の付着が少ない細胞がみられる。このことは、慢性扁桃炎患者の扁桃上皮には、フィブロネクチン

ン以外に*S.pyogenes*の付着を促す物質があることを示唆するものである。

考 察

フローサイトメトリーは元来、血球成分、特にリンパ球の表面マーカー検出、または、癌細胞における染色体の分析などに使われている。今回我々は、フローサイトメトリーを上皮細胞に対する菌の付着に研究に応用してみた。本法の最大の特徴は、一つ一つの細胞について2つのfactor (フィブロネクチンと*S.pyogenes*)を同時にしかも短時間に測定できるという点である。周知の如く、顕微鏡によるカウント法は主観の介入を免れえないし、またELISA法<sup>1)</sup>も優れた方法であるが、同一細胞に於て2つのfactorを測定できない欠点を持っている。本法はそれらの欠点を解消したものであり、今後更に改良を重ね発展させていくつもりである。

フィブロネクチンは動物細胞表面やよび血

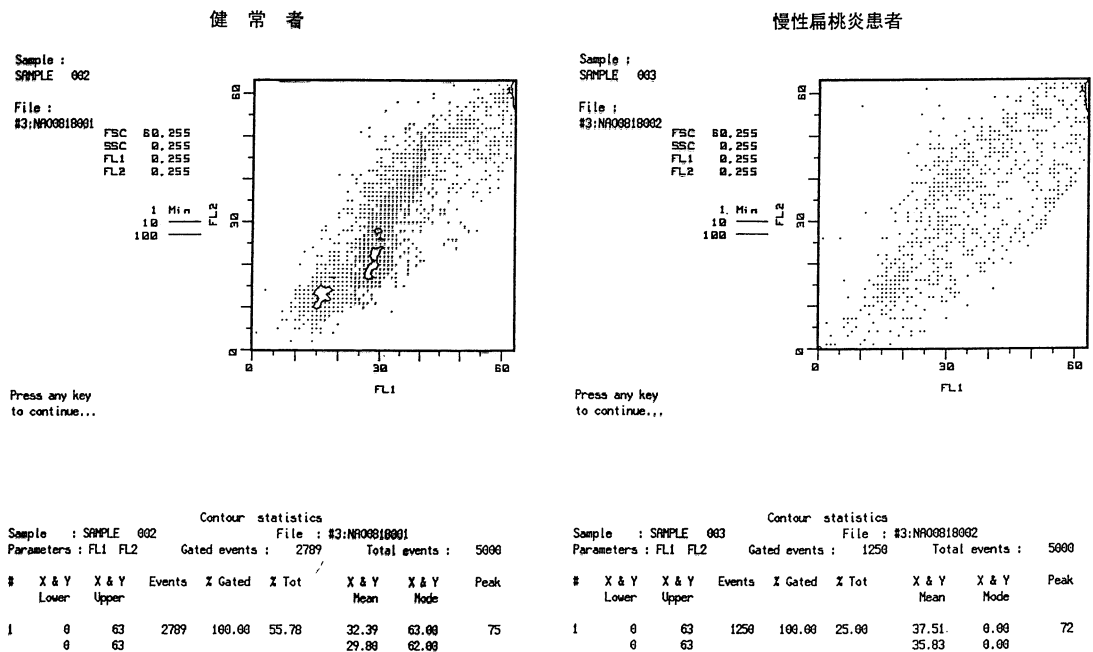


Fig 7 健常者及び慢性扁桃炎患者における付着性の違い

液中にある糖タンパク質であり、その機能は細胞の接着、走化性、創傷の修復、癌の転移など様々で、近年、各方面で研究が進められている<sup>3)</sup>。*S.pyogenes*の粘膜上皮への付着におけるreceptorの一つとしてフィブロネクチンがあるということは、W. A. Simpson<sup>4)</sup>、S. A. Abraham<sup>5)</sup>、H. S. Courtney<sup>6)</sup>によって、また国内では黒野ら<sup>7)</sup>によって報告されている。扁桃は咽頭でも、重要な感染症部位であるにもかかわらず、*S.pyogenes*の付着性についてはあまり研究されていない。他の部位と同様に、扁桃上皮においてもフィブロネクチンが*S.pyogenes*のreceptorの一つであり、また、慢性扁桃炎においては正常者に比べてフィブロネクチンが多くそれにより*S.pyogenes*の付着も多いと言う結果がフローサイトメトリー2カラー分析を用いて得られた。慢性扁桃炎の治癒の遷延にフィブロネクチンの多いことが関与していることが示唆される。また今後症例を増やし、この慢性扁桃炎の機序に付いて更に検討を続けていくつもりである。

#### ま と め

- 1, フローサイトメトリー2カラー分析を用い、扁桃上皮細胞に対する、*S.pyogenes*の付着性について検討した。
- 2, フィブロネクチンの検出にはFITC標識抗フィブロネクチン抗体を用い、また、*S.pyogenes*の検出にはあらかじめ菌をビオチン化し、付着後にアビジンPEを結合させることによって行った。
- 3, その結果、フィブロネクチンの多い細胞には*S.pyogenes*の付着が高いという相関関

係がみられ、また、あらかじめ上皮をフィブロネクチン処理すると、付着性が高まり、逆にプロナーゼ処理すると、僅かだが付着性が低下した。

- 4, 慢性扁桃炎患者は健常者に比べ、フィブロネクチンが多く付着性も高かった。

#### 文 献

- 1) 2) Itzhak Ofek: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Adherence of Bacteria to Animal Cells. Journal of Clinical Microbiology, Oct. 1989, P.512-516
- 3) 林 正男: フィブロネクチンの構造と機能. 蛋白質核酸酵素, 1983. Vol.28, No.2, p.169-181
- 4) W. Andrew Simpson: Adherence of Groupe A *Streptococci* to Fibronectin on Oral Epithelial Cells. Infection and Immunity, Jan. 1983, p.275-279
- 5) Soman n. Abraham: Adherence of *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, and *O.seudomonas aeruginosa* to Fibronectin-Corted and Uncouted Epithelial Cells, Infestation and Immunity, Sept. 1983, p.1261-1268
- 6) Harry S. Coutney; Binding of *Streptococcus pyogenes* to Soluble and Insoluble Fibronectin, Infection and Immunity, Sept. 1986, p.454-459
- 7) 黒野裕一: 粘膜上皮細胞への細菌付着性に関する検討. 日本耳鼻咽喉科感染症研究会誌, 1987, 第5巻, 第1号, p.87-91

#### 質 疑 応 答

質問 鶴田至宏 (奈良医大)

- ① 測定検体でdoublet形成は生じていないのか。

応答 宮本直哉 (名市大)

- ① 流したサンプルを後に鏡検したところdoubletはほとんどなかった。

- ② 蛍光量はFSCつまり細胞径に相関しているのではないのか。
- ③ 細胞外マトリックスであるフィブロネクチンを細胞浮遊液に加える意味は何か。
- ② gatingを狭い範囲でかけてあるので、細胞径のfactorはあまり入っていない。
- ③ 細胞外マトリックスではあるが、また、それがreceptorと思われるためそのreceptrをモデルとして増してみた。