

THE INFECTION OF ELDERLY INDIVIDUALS IN OTORHINOLARYNGOLOGY AS DETERMINED BY BACTERIAL ADHEREHCE

Naoya Miyamoto, Shin-ichiro Yamamoto
Takehiro Kobayashi, Shunkichi Baba

Department of Otorhinolaryngology, Nagoya City University

We researched the adherence of *S.pyogenes* and *H.influenzae* to tonsillar epithelial cells as determined by age, using a flow-cytometry two-color analysis. The results are as follows: with an increase in age the number of *S.pyogenes* adhering to epithelial cells decreased, as a result of

decreased fibronectin; also, there was a decreased number of *H.influenzae* with the increase in age. These results show that elderly individuals have a smaller probability of getting tonsillitis but a higher probability of getting infections of the larynx and lower airway.

耳鼻咽喉科領域の高齢者感染症 —細菌付着の立場から—

宮本 直哉 山本 真一郎
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細胞に定着固定することが必要である。この現象は bacterial adherence と呼ばれ、細菌側の adhesin と粘膜上皮細胞側の receptor との間で行われる。しかし上気道粘膜上皮細胞への細菌の付着性も加齢により変化すると思われる、それによって感染症の発症や病態も影響を受けることが推測される。そこで今回我々は扁桃炎において高率に検出される *Streptococcus pyogenes* (以下 *S.pyogenes* と略す) の扁桃上皮細胞に対する付着性と、上皮細胞側の receptor のひとつと考えられている

フィブロネクチンとの関係を加齢の面から把握するために、フローサイトメトリー 2 カラー分析を用い検討を行った。また *Haemophilus influenzae* (以下 *H. influenzae* と略す) についても同様の検討を行ったので併せて報告する。

対象および方法

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

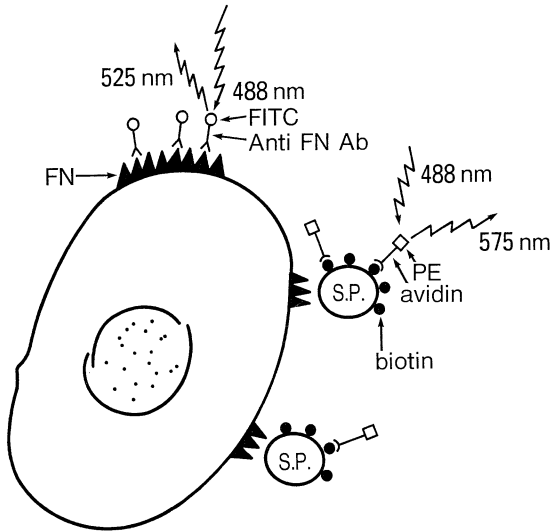


Fig. 1 フィブロネクチン (FN) と *S.pyogenes* (S.P.) の検出モデル図

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細胞に附着させた後 PE (phycoerythrin) 標識ストレプト・アビジンを、それぞれ結合させることによって行った。そして、双方に488nm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。また *H.influenzae* についても附着量のみ同様に FL 2 として測定した。ただし、*H.influenzae* においてはフィブロネクチンは receptor ではないのでフィブロネクチン量の測定は行わなかった。

1) 菌のビオチン化および菌量の調節 (Fig. 2)

I.Ofek の方法¹⁾を用いて菌のビオチン化を行った。本実験には *S.pyogenes* では C203 株を、*H.influenzae* では臨床分離株を用いた。これらの菌株を血液寒天培地にて、一晚培養増殖させ浮遊液を作成し、PBS (0.05M PH 7.4) にて洗浄後0.1M NaHCO₃ (PH8.2) に浮遊させ550nm に対する吸光度 OD₅₅₀が0.7になるように濃度を調節した。次に、N-ハイ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、室温にて2時間放置した。その後、PBS にて3回洗浄し 3 × 10⁸CFU/mlに調整した。なおビオチン化しても菌の附着において変化がないことは、あらかじめグラム染色にて顕微鏡で (direct microscopic count) 確認しておいた。

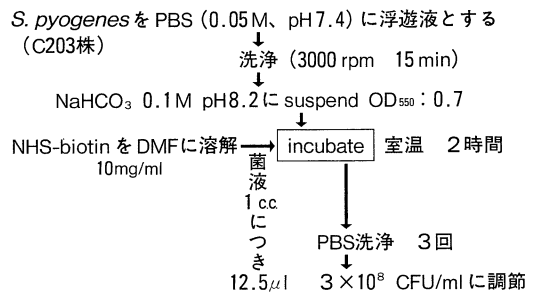


Fig. 2 菌のビオチン化

2) 附着およびフローサイトメトリーによる測定 (Fig. 3)

小児、成人、高齢者の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

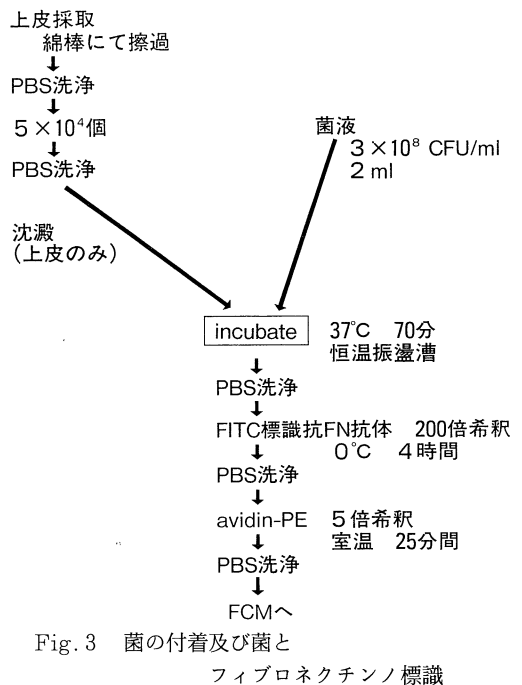


Fig. 3 菌の附着及び菌とフィブロネクチンノ標識

細胞数を 5×10^4 個とした。それに上述のビオチン化した菌液 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 (*S.pyogenes* を付着させた実験系のみ) 0°C にて 4 時間反応させた。さらに洗浄後、ストレプト・アビジン-PE (Becton Dickinson 社製) 5 倍希釈を $125 \mu\text{l}$ を加え室温にて 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。なお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、解析するときにはあらかじめ“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。またデータの解析プログラムは consort 30 を用いた。

結 果

S.pyogenes の扁桃上皮細胞に対する加齢に

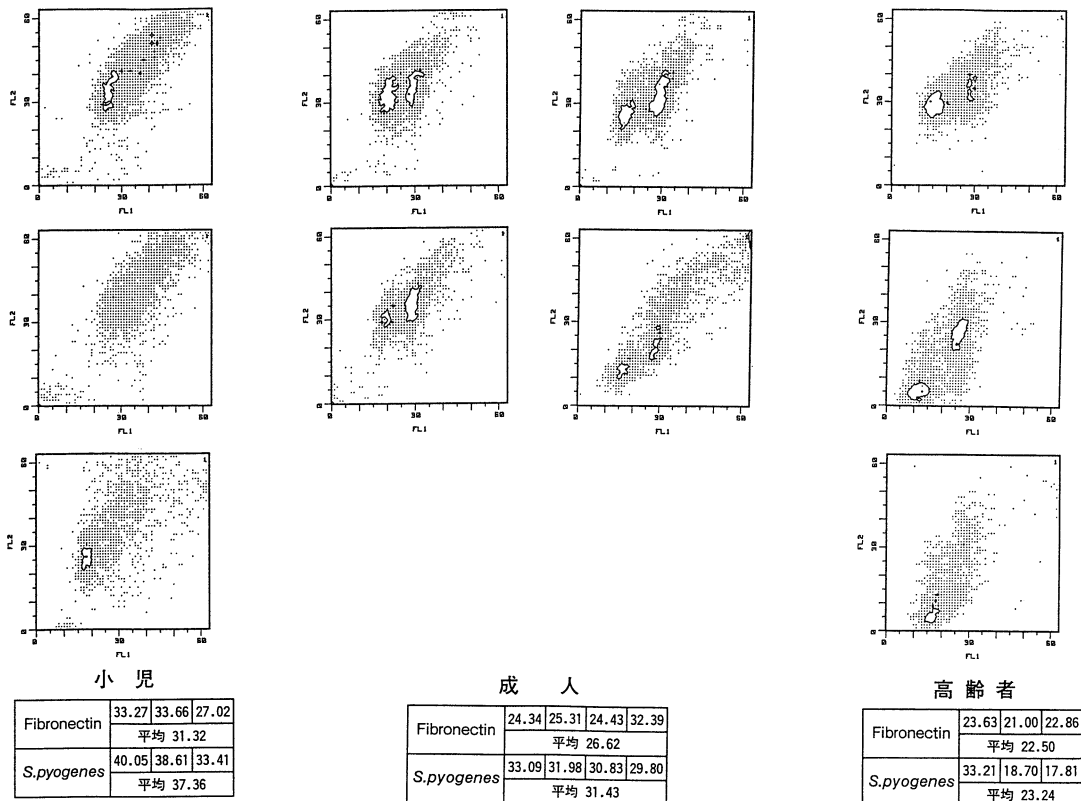


Fig. 4 *S.pyogenes* の加齢による付着性の変化 (正常者)

よる付着性の変化を Fig. 4 に示す。左 1 列が小児、中央 2 列が成人、右 1 列が高齢者である。横軸 FL1 がフィブロネクチン量、縦軸 FL2 が *S.pyogenes* 付着量を示す。下に示すフィブロネクチンの平均は小児 31.32、成人 26.62、高齢者 22.50 であり、*S.pyogenes* の付着量の平均は小児 37.36、成人 31.43、高齢者 23.24 であり、加齢にともないフィブロネクチン量、*S.pyogenes* 付着量共に減少する傾向があった。

次に *H.influenzae* の加齢による付着性の変化を Fig. 5 に示す。横軸 FL2 が *H.influenzae* の付着量で縦軸がその付着量を示した上皮細胞の数である。成人の *H.influenzae* の付着量は平均 92.21 に対し高齢者 56.22 と、*S.pyogenes* 同様加齢にともない付着量が減少する傾向があった。

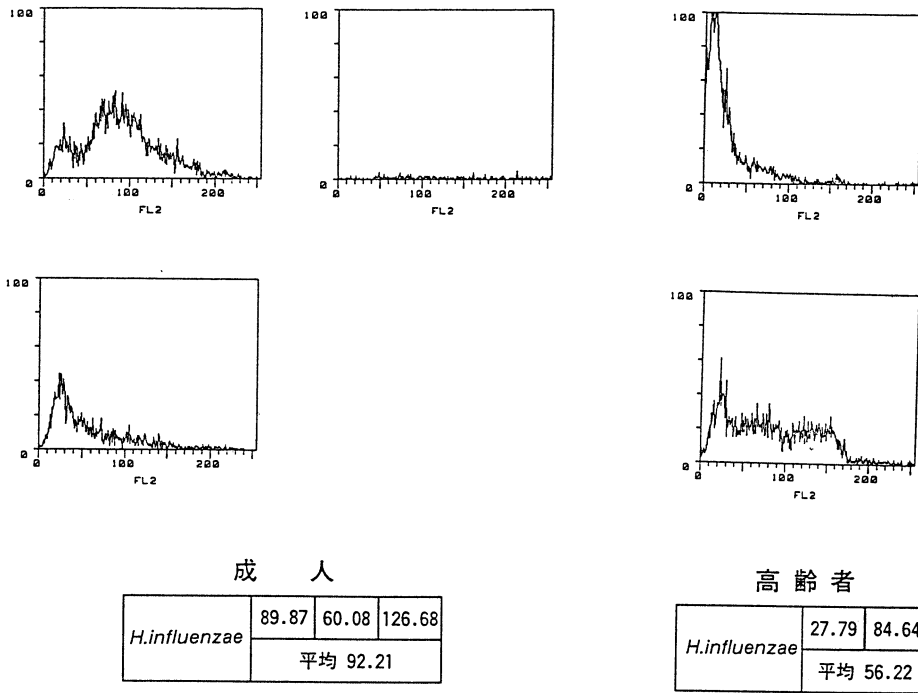


Fig. 5 *H.influenzae* の加齢による付着性の変化 (正常者)

考 察

今回の実験において、*S.pyogenes*, *H.influenzae* 共に小児期ほど扁桃上皮細胞に対する付着性が高く、加齢にともない付着性は低下する傾向があった。このことは臨床的にも急性扁桃炎は小児期ほど多く、加齢にともないその発症率は減少し、本誌で既に杉田らが述べているように、喉頭さらに下気道に向かうにつれ感染症の発症年齢が高くなっていくことにつながるものと思われる。加齢とともに口蓋扁桃への細菌の付着量が減少するという現象は高齢者における急性扁桃炎の減少をもたらすが、その一方ではワルダイエル咽頭輪を容易に病原菌が通過し、喉頭や下気道に感染が起こり易くなるとも考えられる。一般に扁桃炎そのものは急性感染症として望ましくないことと考えられる。しかし口蓋扁桃への細菌付着を感染防御機構の一環と解釈すると、扁桃における細菌の付着低下は、そこを素通りした病原菌による下気道の易感染性を招き、

特に高齢者にとっては免疫力の低下も加わり深刻な問題になると思われる。

ま と め

1. フローサイトメトリー2カラー分析を用い、加齢による扁桃上皮細胞に対する *S.pyogenes* 及び *H.influenzae* の付着性の変化について検討した。
2. 加齢に伴い、フィブロネクチンの減少とともに *S.pyogenes* の付着性も低下する傾向があった。
3. *H.influenzae* も同様に加齢に伴い付着性が低下する傾向があった。
4. 以上のことより、高齢者では扁桃炎が少なくなるものの、逆に喉頭や下気道の易感染性を招き易いことが示唆された。

文 献

1) Ofek I., Courtney H. S., Schifferli D. M., et al : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Adherence of Bacteria to Animal Cells. Journal of Clinical Microbiology, Vo 1 24 512-516, 1986.