

STUDY OF THE INFLUENCE OF NORMAL ORAL FLORA AGAINST THE ADHERENCE OF *STREPTOCOCCUS PYOGENES* TO THE TONSILLAR EPITHELIAL CELLS

Nagoya City University Medical School

Naoya Miyamoto, Takehiro Kobayasi, Shunkichi Baba

We examined the influence of normal oral flora against the adherence of *Streptococcus pyogenes* to the tonsillar epithelial cells. The results are as follows.

1. There was not a large differentiation between the number of *S.pyogenes* adhered to the epithelial cells treated with *Streptococcus salivarius* and that to the untreated ones.
2. On observing the tonsillar epithelial cells adhered with *S.saliverius* by an

enzymelabeled antibody method, there was a large amount of fibronectin that was not adhered by *S.saliverius*.

3. On simultaneously cultivating *S.pyogenes* and *S.salivarius* on the same medium, the growth of *S.pyogenes* was strongly suppressed by *S.salivarius*.

From these results, we believe that the existence of normal oral flora dose not influence the adherence of *S.pyogenes*, but impede the growth of them.

Streptococcus pyogenes の扁桃上皮細胞への付着に及ぼす口腔内常在菌の影響

宮本 直哉 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

口腔内常在 α -streptococcus の病原菌に与える影響としては、バクテリオシン様物質の産生または栄養分の競合による発育抑制や、上皮細胞の菌 receptor の占拠による付着抑制などが考えられている。今回我々は扁桃炎からしばしば検出される *Streptococcus pyogenes* の扁桃上皮細胞への付着に及ぼす口腔内常在菌 *Streptococcus salivarius* の影響について検討を行ったので報告する。

対象および方法

1. 使用菌種および菌のバイオチン化
付着実験における *S.pyogenes* としては、中外製薬株式会社応用研究所医科学センターより分与をうけた M 蛋白 type 3 を有する C203 株を用いた。 *S.pyogenes* C203 はマウスを 3 度通過させ virulence を高めた後¹⁾ ($LD_{50} = 5 \times 10^6$ CFU/mouse) 滅菌したスキムミルク内に分注浮遊し -80°C にて凍結保存し、実験に供する際の細菌の性状の均一化をはかっ

た。そして実験時には解凍し5%ヒツジ血液寒天培地に接種培養後、アビジン-ビオチン反応を利用して*S.pyogenes*を蛍光標識するために、Ofekらの方法²⁾を用いてあらかじめ*S.pyogenes*のビオチン化を行った。このC203株を0.15M NaClを含む0.05M 磷酸緩衝液、pH7.4 (以下PBSと称す)に溶解し3000rpm 15分間遠心し、上清を捨てる操作を2回繰り返して洗浄後、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-ヒドロキシスクシンイミド・ビオチン (Pierce社製)をジメチルホルムアミドに10mg/mlの濃度で溶解し、これを菌液1mlにつき12.5μl加え、室温にて2時間静置した。その後、PBSにて同様に3回洗浄し菌数をマクファランド標準菌濁度液 (栄研化学製)を用い3×10⁸CFU/mlに調節し、以下の付着実験に用いた。

2. 扁桃上皮細胞の採取

扁桃上皮細胞を綿棒にて擦過採取して、PBSにて900rpm15分間3回洗浄を行った。この間に大きな上皮の塊や上皮細胞以外の肉眼的に見える不純物は可及的にピペットにて除去した。そして1検体あたりの細胞数を5×10⁴個とし、遠心後上清を取り除き以下の付着実験に用いた。

3. 付着実験、蛍光標識およびフローサイトメーターによる測定

正常者11人より上述の方法で採取した扁桃上皮細胞をそれぞれ3群に分け、対照としてのPBS、および3×10⁸CFU/ml、3×10⁸CFU/mlの*S.salivarius*の浮遊液 (各2ml)とともに37°C70分間、恒温振盪槽にてインキュベートした。そして上皮細胞に付着しなかった*S.salivarius*を取り除くためにPBSにて900rpm15分間3回洗浄後上清を取り除き、上述のビオチン化した3×10⁸CFU/mlの*S.pyogenes* (2ml)を加え、37°Cで70分間恒温振盪

槽にてインキュベートした。そして上皮細胞に付着しなかった*S.pyogenes*を取り除くために同様に洗浄後、*S.pyogenes*検出のためにピコエリスリン (PE) 標識ストレプトアビジン (Becton Dickinson社製) 5倍希釈を125μl加え暗所にて室温で25分間反応させ、洗浄後速やかにフローサイトメーターにて上皮細胞ひとつひとつのPEよりの575nmの蛍光強度を上皮細胞5000個につき測定した。

なお本論文における*S.pyogenes*付着量はフローサイトメーターで測定した蛍光量を解析プログラム *consort 30*で算出した平均値とした。フローサイトメトリー装置としてはBecton-Dickinson社製のFACScanを用いた。

4. *S.salivarius*処理後の酵素抗体法による扁桃上皮細胞の観察

扁桃上皮細胞に付着した*S.salivarius*と、連鎖球菌属の粘膜上皮側のreceptorとされているフィブロネクチンの関係を検討した。正常者より擦過採取した扁桃上皮細胞をPBSにて洗浄後、*S.pyogenes*の場合と同じ方法でビオチン化した3×10⁸CFU/mlの*S.salivarius*浮遊液とともに37°C、70分間恒温振盪槽にてインキュベートした。そして洗浄後アルブミンスライドガラスにアルコール脱水固定し、酵素抗体法 (間接法)にて染色し、フィブロネクチンと*S.salivarius*を光学顕微鏡にて観察した。

5. *S.salivarius*の*S.pyogenes*発育増殖に及ぼす影響

口腔内常在菌である*S.salivarius*の*S.pyogenes*発育増殖に及ぼす影響を検討するために、スキムミルク内に凍結保存しておいた*S.salivarius* (ATCC7073株)と*S.pyogenes* (C203株)をともに解凍後、5%ヒツジ血液寒天培地に互いに直交するように採取し37°Cにて一晚培養した。そしてそれぞれの菌のコロニー形成状態と*S.pyogenes*による溶血環の状態を観察した。

結 果

1. *S.salivarius* 処理による *S.pyogenes* の付着性の変化

各濃度の *S.salivarius* 前処理による *S.pyogenes* 付着量の変化を Fig. 1 に示す. 横軸が *S.salivarius* 前処理濃度, 縦軸が *S.pyogenes* 付着量を示す. PBS のみ, 3×10^6 CFU/ml, 3×10^8 CFU/ml と *S.salivarius* 濃度を変えても *S.pyogenes* の付着量に有意な変化はみられなかった.

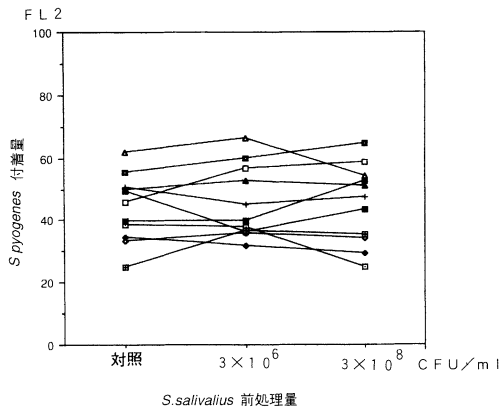


Fig. 1 *S.salivarius* 前処理による *S.pyogenes* 付着量の変化

2. *S.salivarius* 処理後の酵素抗体法による扁桃上皮細胞の観察

扁桃上皮細胞に *S.salivarius* が付着した状態を酵素抗体法 (間接法) にて染色し, 光学

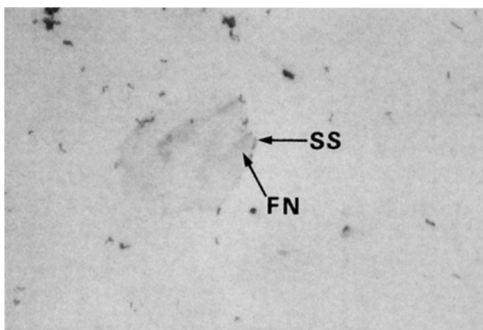


Fig. 2 *S.salivarius* 付着後の扁桃上皮細胞の酵素抗体法による観察 (1000倍) (FN : フィブロネクチン, SS : *S.salivarius*)

顕微鏡にて観察した写真を Fig. 2 に示す. フィブロネクチンの多いところに *S.salivarius* が多く付着しているが, フィブロネクチンは細胞表面に広く存在しており, *S.salivarius* が付着していないフィブロネクチンもかなり存在していた.

3. *S.salivarius* の *S.pyogenes* 発育増殖に及ぼす影響

5%ヒツジ血液寒天培地上に縦に *S.salivarius*, 横に *S.pyogenes* を接種し相互の発育増殖に及ぼす影響をみた (Fig. 3). 両者が交差している部分には β 溶血がみられず, さらに *S.pyogenes* の発育増殖も強く抑制されていることが示された.

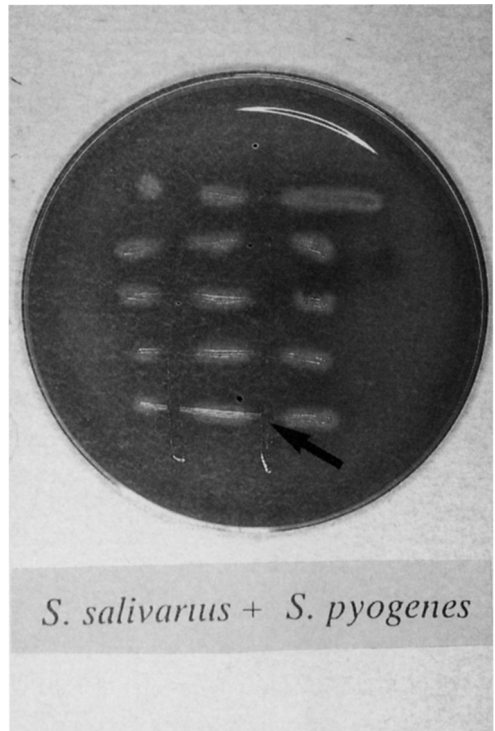


Fig. 3 *S.pyogenes* と *S.salivarius* の2菌種同時接種培養 (矢印 : *S.pyogenes* が *S.salivarius* により発育抑制されている部分)

考 案

口腔内常在菌の病原菌付着に及ぼす影響についての報告は、著者が渉猟した限りにおいては、この口腔内常在菌の病原菌に対する発育抑制についての研究は種々報告されている。Sanders³⁾は扁桃、咽頭には健全な状態では α 連鎖球菌などの非病原性の細菌が常在しており、この存在が感染防御に重要な役割を担っていると述べている。また藤森⁴⁾⁵⁾⁶⁾や後藤⁷⁾も α 溶連菌とA群溶連菌の相互作用について、同様のことを報告している。さらにSprunt⁸⁾も α 溶連菌の産生するバクテリオシン様物質が感染防御機構の一環をなしている可能性を述べている。増田らの報告⁹⁾では咽頭ぬぐい液中の病原細菌と、それらの発育を抑制するといわれている常在菌について検討を行った結果、*Streptococcus sanguis*や*Streptococcus mitis*は*Staphylococcus aureus*に対して、また*S.salivarius*は*S.pyogenes*や*Streptococcus pneumoniae*に対して発育抑制作用が認められたと述べている。また特に新生児、小児の歯肉溝における経時的な細菌叢の変化には興味深いものがある。歯の萌出前の口腔では*S.salivarius*が生後1日以内に50~75%認められる¹⁾⁰⁾¹¹⁾。ついで乳歯の萌出後に出現してくるのは*S.sanguis*で¹²⁾、以後本菌が健全な歯面の歯垢中で連鎖球菌の大部分を占めるようになる¹³⁾¹⁴⁾。しかしながらう蝕が発病する前の歯面の歯垢において、*S.sanguis*に変わって*Streptococcus mutans*が優勢になってくる¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾。この事実は、う蝕の発病に伴って歯垢中の連鎖球菌種に変動が生じたことを意味している、このような歯垢中の連鎖球菌種の変動にかかわる要因としては、*S.mutans*の産生するバクテリオシン様物質が関係しているといわれている¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾。またさらに歯垢中の酸化還元電位の低下²²⁾²³⁾や酸性PHに対する耐性の違い²⁴⁾²⁵⁾、連鎖球菌種の増殖に関係すること

が報告されている。

本研究において、扁桃上皮細胞を口腔内常在菌である*S.salivarius*で前処理しても、その後の*S.pyogenes*付着にはほとんど影響をおよぼさなかった。その理由としては、酵素抗体法にて*S.salivarius*とフィブロネクチンを染色してみた結果から示されたように、フィブロネクチンの多いところに*S.salivarius*も多く付着しているが、フィブロネクチンは細胞表面に広く存在しており、*S.salivarius*がそこに付着しても、まだ*S.pyogenes*が付着する余裕が十分あるためではないかと推測された。また血液寒天培地に*S.salivarius*と*S.pyogenes*の2菌種を同時に接種培養したところ、諸家の報告と同様に*S.salivarius*が産生するバクテリオシン様物質の存在などにより、*S.pyogenes*の発育増殖が強く抑制された。

以上より、口腔内常在菌の存在は扁桃上皮細胞において*S.pyogenes*の付着という現象そのものにはあまり影響は与えず、むしろ付着後の発育増殖に与える影響が大きいのではないかということが推測された。

結 語

口腔内常在菌の*S.pyogenes*の扁桃上皮細胞への付着に及ぼす影響について検討した。

その結果次の結論を得た。

- 1) 扁桃上皮細胞を口腔内常在菌である*S.salivarius*で前処理しても*S.pyogenes*付着量に大きな変化はみられなかった。
- 2) *S.salivarius*の付着した扁桃上皮細胞を酵素抗体法で観察したところ、*S.salivarius*が付着していないフィブロネクチンもかなり存在していた。
- 3) 血液寒天培地に*S.pyogenes*と*S.salivarius*を同時に接種培養したところ、両者が交差している部分において、*S.pyogenes*の発育増殖が強く抑制された。

以上より、口腔内常在菌の存在は扁桃上皮細胞において*S.pyogenes*の付着という現象

そのものにはあまり影響は与えず、むしろ付着後の発育増殖に与える影響が大きいのではないかということが推測された。

文 献

- 1) Lancefield RC : Current knowledge of typespecific M antigens of group A streptococci. J.Immunol., 89 : 307-313, 1962.
- 2) Ofek I, Courtney HS, Schifferli DM, et al. : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for adherence of bacteria to animal cells. Journal of Clinical Microbiology. 24 : 512-516, 1986.
- 3) Sanders E : Bacterial interference. Its occurrence among the respiratory tract flora and characterization of inhibition of group A streptococci by viridance streptococci. J. Infect. Dis., 120 : 698-707, 1969.
- 4) 藤森 功, 山田俊彦, 内田 實 他 : 扁桃摘出術前後における咽頭細菌叢の推移に関する細菌学的評価. 山梨医大雑誌, 3 : 21-27, 1988.
- 5) 藤森 功, 山田俊彦, 内田 實 他 : 慢性扁桃炎における術前, 術後の細菌学的検討. 日扁桃誌, 27 : 152-157, 1988.
- 6) 藤森 功, 山田俊彦, 後藤 領 他 : 扁桃摘出前後における咽頭細菌叢の推移に関する細菌学的詳細. 日耳鼻誌, 92 : 704-708, 1989.
- 7) 後藤 領, 山田俊彦, 藤森 功 他 : ムコイド型A群レンサ球菌の口腔内定着に関する基礎的研究(第一報). 日扁桃誌, 28 : 98-101, 1989.
- 8) Sprunt K, Redman W : Evidence suggesting importance of role of interbacterial inhibition in maintaining balance of normal flora. Ann. Int. Med., 68 : 579-590, 1968.
- 9) 増田真理子 : 口腔内連鎖球菌の病原細菌に対する発育阻止作用-急性上気道感染患児の咽頭における成績. 感染症誌, 59 : 559-569, 1985.
- 10) McCarthy C, Snyder ML, Parker RB : The indigenous oral flora of man-I The newborn to the 1-year-old infant. Arch. Oral Biol., 10 : 61-70, 1965.
- 11) Jores S, Cohen NM, Kreidberg MB : Oral flora in the newborn. J. Dent. Res., 39 : 653, 1960.
- 12) Carlsson J, Grahnen H, Jansson G, et al. : Establishment of *Streptococcus sanguis* in the mouths of infants. Arch. Oral Biol., 15 : 1143-1148, 1970.
- 13) Carlsson J : Zooglea-forming streptococci, resembling *Streptococcus sanguis*, isolated from dental caries in man. Odont. Revy., 16 : 345-358, 1965.
- 14) Carlsson J : Presence of various types of non-haemolytic streptococci in dental plaque and in other sites of oral cavity in man. Odont. Revy., 18 : 55-88, 1967.
- 15) deStoppelaar JD, van Houte J, Dirks OB : The relationship between extracellular polysaccharide-producing streptococci and smooth surface caries in 13-year-old children. Caries Res., 3 : 190-199, 1969.
- 16) Littleton NW, Kakehashi S, Fitzgerald R : Recovery of specific "caries inducing" streptococci from caries lesions in the teeth of children. Arch. Oral Biol., 15 : 461-463, 1970.
- 17) Shklair IL, Keene HJ, Simoson LG : Distribution and frequency of *Streptococcus mutans* in caries active individuals. J. Dent. Res., 51 : 882, 1972.

- 18) Loesche WJ, Walenga A, Loos P : Recovery of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* from a dental explorer after clinical examination of single human teeth. Arch. Oral Biol., 18 : 571-575, 1973.
- 19) Hamada S, Ooshima T : Production and properties of bacteriocin (mutacin) from *Streptococcus mutans*. Arch. Oral Biol., 20 : 641-648, 1975.
- 20) Weerkamp A, Bongaerts-Laril L, Vogels GD : Bacteriocins as factors *in vitro* infection between oral streptococci in plaque. Infect. Immun., 16 : 773-780. 1977.
- 21) 小野喜美子, 岸本悦史, 森岡俊夫 : バクテリオシン産生能および平滑面付着能を持つ *Streptococcus mutans* のスクリーニング. 口腔衛生学会雑誌, 34 : 151-156, 1984.
- 22) Yamada T, Takahashi S, Abe K : Effect of oxygen on sugar metabolism of oral streptococci. J. Dent. Res.: 62 : 472, 1983.
- 23) Yamada T, Takahashi S, Abe K : Effects of oxygen on pyruvate formate lyase *in situ* and sugar metabolism on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. Infect. Immun. 47 : 129-134, 1985.
- 24) Iwami Y, Yamada T : Rate-limiting steps of the glycolytic pathway in the oral bacteria *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* and influence of acidic pH on the glucose metabolism. Arch. Oral Biol., 25 : 163-169, 1980.
- 25) Harper DS, Loesche WJ : Growth and acid tolerance of human dental plaque bacteria. Arch. Oral Biol., 29 : 843-848. 1984.