フローサイトメトリー 2 カラー分析法を用いた *Streptococcus pyogenes* の扁桃上皮に対する付着性の検討

宮本 直哉・山本真一郎・西村 稜
高木 一平・小林 武弘・馬場 駿吉

Examination of the Adherence of *Streptococcus Pyogenes* to Tonsillar Epithelial Cells Using a Flowcytometry Two Color Analysis

Naoya Miyamoto, Shin-ichiro Yamamoto, Jo Nishimura,
Ippei Takagi, Takehiro Kobayashi and Shunkichi Baba
(Nagoya City University Medical School)

We examined the adherence of *Streptococcus pyogenes* to tonsillar epithelial cells, based on age and the presence or absence of a chronic infection, using a flowcytometry two-color analysis.

To determine the fibronectin on the tonsillar epithelial cells, we used the FITC-conjugated anti-fibronectin antibody, and to determine the bacterium, added avidin-PE to the biotinylated bacterium.

The number of bacteria adhering to epithelial cells decreased as a result of decreased fibronectin with the advance in age, and tonsillar epithelial cells from the patients with chronic infection contained more bacteria than those from normal healthy individuals. However, the patients with chronic infection are in remission.

Key words: adherence, *Streptococcus pyogenes*, tonsillar epithelial cells, flowcytometry two color analysis

はじめに

上気道細菌感染の成立には、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。従来から付着量の測定には光学顕微鏡によるカウント、または ELISA¹⁾ などが用いられているが、今回我々は、フローサイトメトリー 2 カラー分析を用い、*Streptococcus*

pyogenes の扁桃上皮に対する付着性の加齢による変化、および正常者・慢性扁桃炎患者での付着性の違いについて検討するとともに、扁桃上皮細胞のフィブロネクチン量を測定した。

対象および方法

1) *S. pyogenes* のビオチン化および菌量の調節 (図 1)

I. Ofek の方法¹⁾ を用いて菌のビオチン化を行った。*S. pyogenes* として C203 株を用いた。

本株は 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、増殖培養させ浮遊液を作成し、PBS (0.05 M PH 7.4) にて洗浄後 0.1 M NaHCO_3 (PH 8.2) に浮遊させ 550 nm に対する吸光度 OD_{550} が 0.7 になるように濃度を調節した。次に、N-ヒドロキシサクシミド・ビオチン (Pierce 社製) をジメチルホルムアミドに 10 mg/ml の濃度で溶解し、これを菌液 1 ml につき 12.5 μl 加え、室温にて 2 時間静置した。その後、PBS にて 3 回洗浄し菌数を 3×10^8 CFU/ml に調節した。なおビオチン化後も菌の付着性において変化がないことは、あらかじめ光学顕微鏡下にカウントし確認した。

2) 扁桃上皮細胞の採取と細菌付着実験

(図 2)

正常の小児、成人、高齢者、および成人の慢性扁桃炎患者より扁桃上皮細胞を綿棒にて擦過採取して、PBS にて 3 回洗浄後、1 検体あたりの細胞数を 5×10^4 個とし上清を取り除いた。これに上述のビオチン化 *S. pyogenes* 菌液 2 ml を加え、37°C で 70 分間恒温振盪槽にて incubate した。PBS にて洗浄後、FITC 標識家兔抗ヒトフィブロネクチン抗体 200 倍希釈 (Cappel 社製) を 2 ml 加え 0°C にて 4 時間反応させた後、更に洗浄し、ストレプト・アビジン—phycoerythrin (PE) (Becton dickinson 社製) 5 倍希釈を 125 μl を加え室温にて 25 分間反応させ、洗浄後 PBS を加えて全量 1.5 ml として、

フローサイトメトリーにて測定した。

3) フローサイトメトリー

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。図 3 のように、488 nm のレーザー光を当て、FITC よりの 525 nm の蛍光強度を FL1 として、PE よりの 575 nm の蛍光強度を FL2 として測定し、それぞれフィブロネクチン、*S.*

図 2 菌の付着及び菌とフィブロネクチンの標識

図 1 菌のビオチン化

pyogenes の量とした．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，上皮に付着していない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．フローサイトメトリーの機種は Becton Dickinson 社の FACSscan を使用した．そして，データの解析プログラムは consort 30 を用いた．

図3 フィブロネクチン (FN) と *S. pyogenes* (S.P.) の検出モデル図

結 果

1) 正常者における検討 (図4)

正常者の扁桃上皮細胞を採取し，上述の方法で *S. pyogenes* の付着実験を行った．年齢別に典型的なフローサイトメトリーのパターンを図4に示す．小児は口蓋扁桃肥大症の3歳男児，成人は25歳男性，老人は76歳男性を被検者とした．横軸 FL1 がフィブロネクチン量，縦軸 FL2 が *S. pyogenes* 付着量をあらわしている．小児から成人，老人へと移行するにつれて FL1 つまりフィブロネクチンが減少し，FL2 つまり *S. pyogenes* の付着性も低下している．特に老人においては小児，成人と比べると急激に FL1，FL2 共に低下している．

2) 正常者および慢性扁桃炎患者の急性感染時，非急性感染時における付着性の違い (図5)

扁桃炎の急性増悪を年に5～6回繰り返しそれ以外の時も常に咽頭違和感を訴える患者を慢性扁桃炎患者とした．図5のごとく両者とも感染時または急性期には，正常者の非感染時に比べるとフィブロネクチンが多く *S. pyogenes* の付着性も高いことが認められた．しかし正常者の非感染時，および慢性扁桃炎患者の寛解期で比べると慢性扁桃炎患者はこの寛解期でもフィブロネクチンが多く *S. pyogenes* の高い付着性を示した．

図4 加齢による付着性の変化 (正常者)

考 察

フローサイトメトリーはこれまで主に、血球成分、特にリンパ球の表面マーカー検出、あるいは、癌細胞における染色体の分析などに使われてきた。今回我々は、フローサイトメトリーを上皮細胞に対する細菌の付着性の研究に応用した。光学顕微鏡によるカウントは煩雑で主観の介入を招く恐れがあり信頼性の高い検査法とはいえない。また ELISA¹⁾ 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。本法は菌の付着量に加え receptor の量も同時測定可能であり、しかも ELISA のように細胞群を一つの mass としてではなく、1細胞毎に測定できるという

利点を持つ。このため菌の付着数と receptor の関係を検討する場合にもあらかじめ上皮細胞に receptor を増減させる処理を行うことなく即座に2次元グラフにて解析が行える。

フィブロネクチンは動物細胞表面および血液中に存在す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、癌の転移に関与するなど様々で、近年、各方面でその生物活性について研究が進められている²⁾。S. pyogenes の粘膜上皮への付着における上皮側 receptor の一つとしてフィブロネクチンがあるということは、Simpson³⁾、Abraham⁴⁾、Courtney⁵⁾によって、また国内では黒野ら⁶⁾によって報告されている。本研究から得られた結果を臨床像

図5 正常者及び慢性扁桃炎患者における付着性の違い

に重ね合わせて考えると、小児期の扁桃上皮細胞にはフィブロネクチンが多く、また細菌の付着性が高いという事実は、扁桃が下気道に対して保護的に働いていると考えられる一方、臨床的に急性扁桃炎が小児に好発する原因の一つにもなっていると思われる。また、加齢とともにフィブロネクチン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、一方ではワルダイエルの咽頭輪を容易に病原菌が通過し、喉頭や下気道に感染を起こし易くするとも考えられよう。また、正常者及び慢性扁桃炎患者の付着性の違いでは、慢性扁桃炎患者では寛解期においてもフィブロネクチンが多く潜在的に細菌付着性が高いという傾向が得られた。これは慢性扁桃炎患者の扁桃では血漿中より常にフィブロネクチンが漏出して扁桃上皮を被覆し S. pyogenes が付着し易い状況にしていると考えられる。そのため、急性増悪を反復し易いと思われる。

ま と め

1. フローサイトメトリー 2 カラー分析を用い、扁桃上皮細胞に対する S. pyogenes の付着性の違いを、加齢および炎症の有無の観点から検討した。

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 phycoerythrin (PE) を結合させることによって行った。

3. その結果、加齢に伴い、フィブロネクチ

ンの減少とともに S. pyogenes の付着も低下する傾向があった。

4. 慢性扁桃炎患者から得られた上皮細胞は正常者のものに比べ、寛解期であっても S. pyogenes の付着性が高かった。

文 献

- 1) Ofek I, Courtney HS, Schifferli DM, et al : Enzyme-linked immunosorbent assay for adherence of bacteria to animal cells. J Clin Microbiol 24 : 512~516, 1986.
- 2) 林 正男, 平野英保 : フィブロネクチンの構造と機能. 蛋白質核酸酵素 28 : 2 ; 169~181, 1983.
- 3) Simpson WA and Beachey WA : Adherence of group A Streptococci to fibronectin on oral epithelial cells. Infect Immun 39 : 275~279, 1983.
- 4) Abraham SN, Beachey SN and Simpson WA : Adherence of Streptococcus pyogenes, Escherichia coli, and Pseudomonas aeruginosa to fibronectin-coated and uncoated epithelial cells. Infect Immun 41 : 1261~1268, 1983.
- 5) Courtney HS, Ofek I, Simpson WA, et al : Binding of Streptococcus pyogenes to soluble and insoluble fibronectin. Infect Immun 53 : 454~459, 1986.
- 6) 黒野 裕一, 藤吉達也, 茂木五郎 : 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会誌 5 : 1 ; 87~91, 1987.

(別刷請求先 : 宮本直哉
〒467 名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄 1
名古屋市立大学医学部耳鼻咽喉科学教室)