

## *Haemophilus influenzae* の HEp-2 細胞に対する付着性と付着菌に対する cefixime の殺菌作用

池本 晶子・寺谷 紀子・池田 文昭・横田 好子

藤沢薬品工業株式会社開発第一研究所\*

(平成 8 年 4 月 4 日受付・平成 8 年 7 月 3 日受理)

*Haemophilus influenzae* のヒト喉頭癌由来上皮細胞 (HEp-2) への付着性と、血清型 (serovar) および生物型 (biovar) との関連性を検討した。さらに HEp-2 細胞に付着した *H. influenzae* に対する経口セフェム薬の殺菌作用について検討した。

1) 1993 年から 1995 年に臨床材料より分離された *H. influenzae* 144 株は biovar II (43%) がもっとも多く、次いで biovar III (24%) および I (19%) であった。Cefixime, cefpodoxime および cefditoren に対する感受性の生物型による差異は認められなかった。

2) *H. influenzae* の well 当たりの HEp-2 細胞に対する付着率は serovar b の 0.5~3.3% に対し、血清型別不能株 (nontypable) は 12~100% で、nontypable の方が有意に高かった。また、serovar b には HEp-2 細胞内に侵入する株は存在しなかったが、nontypable では 9 株中 8 株において接種菌量に対し 0.00003~0.015% の割合で細胞内侵入が認められた。

3) HEp-2 付着菌に対する上記セフェム薬の殺菌は、6 時間までは浮遊菌の場合とほぼ同等で顕著な殺菌作用を示したが、その後 24 時間までの作用は浮遊菌に比べて著しく低下した。また、付着菌のうち細胞内に侵入した菌はほとんど殺菌されなかった。

これらの結果から、*H. influenzae* の nontypable の株は上皮細胞へ付着しやすく、低い割合ではあるが細胞内にも侵入しうる性質を持つことから、本菌に起因する呼吸器感染症の難治化や再発の温床となり慢性化へと進展する可能性が示唆された。

**Key words:** cefixime (CFIX), *H. influenzae*, HEp-2 cell, Bactericidal activity, Adhesion

*Haemophilus influenzae* は莢膜にもとづく血清型および生化学性状による生物型の 2 種類の型別法により分類される。分離株の血清型および生物型とその感染病態との間には密接な関連があり、小児の髄膜炎や敗血症などの侵襲性疾患では serovar b および biovar I が多く、呼吸器感染では血清型別不能株、nontypable の分離頻度が高い<sup>1-3)</sup>。近年開発された経口セフェム薬は *H. influenzae* に対する抗菌力が強く、本菌による感染症に優れた臨床効果を示し、first choice drug として広く使用されている。しかし、まれに十分な治療効果が得られない症例や再発を繰り返す症例が散見される。そこで、ヒト上皮細胞株に対する *H. influenzae* の付着性および付着菌に対するセフェム薬の殺菌作用を検討し、本菌感染症の難治化や再発と関連性について考察した。

### I. 材料および方法

#### 1. 使用菌株

1993 年から 1995 年に臨床材料より分離された *H. influenzae* 144 株を使用した。

#### 2. 使用薬剤

Cefixime (CFIX) および amoxicillin (AMPC) は、当社の標準品を使用した。Cefpodoxime (CPDX) およ

び cefditoren (CDTR) は当社の新薬研究所で合成し、力価の明らかなものを使用した。

#### 3. 感受性測定

日本化療学会標準法に従い寒天平板希釈法により MIC を測定した。すなわち、測定培地として Mueller Hinton agar を base とする 5% 馬血液加チョコレート寒天培地を用い、一夜培養した菌体を Mueller Hinton broth (MH) で McFarland 0.5 の濃度に懸濁したものを 100 倍希釈し、各希釈薬剤含有の測定培地にスタンブ接種した。5% 炭酸ガス下 37℃、18 時間培養後、菌の発育を阻止した最小の薬剤濃度を MIC とした。

#### 4. 血清型および生物型の判定

血清型は Difco 社製の *H. influenzae* の莢膜にもとづく血清型別をスライド凝集法で決定した。生物型別は Killian の方法<sup>4)</sup> によってインドール産生能、ウレアーゼ活性、オルニチン・デカルボキシラーゼ活性、硫化水素産生性および溶血性により biovar I から VIII まで分類した。

#### 5. HEp-2 に対する付着率および侵入率

ヒト喉頭癌由来上皮細胞、HEp-2 細胞を用い、

Falkow らの方法に従い以下の検討を行った<sup>5,6)</sup>。すなわち、HEp-2 細胞は、Eagle's MEM (日水) にウシ胎児血清を 5 % 添加した培地を用い、24 well プレートに約  $1 \times 10^5$  cell/well を添加し、5 % 炭酸ガス下 37 °C、20 時間培養した。一方、*H. influenzae* は hemin および NAD の各 10  $\mu$ g/ml 含有 brain heart infusion agar (BHIA, Difco) で一夜培養した菌体を 5 % ウシ胎児血清加 MEM に懸濁し、上記の単層培養した HEp-2 に添加した。5 % 炭酸ガス下 37 °C、2 時間静置後に phosphate-buffered saline (PBS) を用いて洗浄操作を 3 回繰り返すことにより浮遊菌を除去し、ラバーポリスマンで細胞をかきとった後、細胞破碎して生菌数を測定し、well 当たりの接種菌量に対する付着率を求めた。なお、生菌数の測定は、hemin および NAD の各 10  $\mu$ g/ml 含有 BHIA を用い、適宜希釈した菌液を塗抹し、培養後発育したコロニーを測定した。また、細胞内への侵入性は、菌付着細胞に gentamicin 100  $\mu$ g/ml を 2 時間作用させて付着菌を殺菌、洗浄後に細胞破碎して上記のごとく生菌数を測定し、well 当たりの接種菌量に対する侵入率を求めた。

#### 6. HEp-2 付着菌に対する殺菌作用

24 well プレートに単層培養した HEp-2 に *H. influenzae* No. 13045 を付着させた後、非付着菌を洗浄除去後、各薬剤の 8 MIC を作用させた。5 % 炭酸ガス下で 37 °C で培養し、6 および 24 時間後の生菌数を 5. の方法に従い測定した。

## II. 実験結果

### 1. *H. influenzae* 144 株の生物型別分類および経口セフェム薬に対する感受性

臨床分離の *H. influenzae* 144 株の生物型別では biovar II がもっとも多く 43 % を占め、次いで III (24 %), I (19 %) であった (Table 1)。Biovar IV, V および VI に分類される株は少なく、また、VII および VIII は存在しなかった。またこれら 144 株に対する平均 MIC を比較すると、CDTR, CFIX, CPDX および AMPC の順に抗菌力が優れていた。生物型別に分類した菌株に対する平均 MIC の比較では、biovar II にお

Table 1. Biovars and susceptibility to oral cepheims of 144 *Haemophilus influenzae* strains

Biovar	No. of strains (%)		Mean MIC ( $\mu$ g/ml)			
			cefixime	cefpodoxime	cefditoren	amoxicillin
I	28	(19)	0.05	0.11	0.03	0.54
II	62	(43)	0.06	0.13	0.03	1.56
III	35	(24)	0.05	0.11	0.03	0.69
IV	9	(6)	0.05	0.11	0.03	0.53
V	9	(6)	0.05	0.10	0.03	0.57
VI	1	(1)	0.05	0.39	0.05	1.56
Total	144	(100)	0.05	0.12	0.03	0.92

Agar dilution method (inoculum;  $10^6$  CFU/ml, incubation: 37 °C, 5 %CO<sub>2</sub>, 20 h)

いて 62 株中 16 株 (26 %) が  $\beta$ -lactamase 産生株のため、AMPC に低い感受性を示す株が存在し、また、biovar VI に属する株は 1 株のみであったが、CPDX および AMPC に対し低い感受性を示したものの、いずれの薬剤においても生物型別による感受性の著しい変動は認められなかった。

### 2. HEp-2 細胞に対する付着性および侵入性

HEp-2 細胞に対する付着性および侵入性を serovar b および nontypable の株で比較検討した (Table 2)。Serovar b の検討に用いた 6 株は biovar I および II に分類され、nontypable の 9 株は biovar I から V に分類された。これらの菌株を HEp-2 細胞に付着させ、走査型電子顕微鏡で観察したところ、*H. influenzae* は単層培養した細胞にほぼ均等に付着している像が認められた。Serovar b の株の付着率は well 当たりの接種菌量に対し 0.5~3.3 % の範囲であったのに対し、nontypable の株では 12~100 % と有意に高い傾向を示した。さらに serovar b では細胞内に侵入する株は存在しなかったのに対し、nontypable では 9 株中 8 株において well 当たり  $10 \sim 5.9 \times 10^8$  の菌数が細胞内に侵入し、その割合は接種菌量に対し 0.00003~0.015 % であった。

### 3. HEp-2 付着菌に対する殺菌作用

Nontypable の株である No. 13045 を用い、浮遊菌、付着菌および細胞内侵入菌に対する CFIX, CPDX および CDTR の殺菌作用を検討した (Fig. 1)。浮遊菌に対してはいずれの薬剤も 8 MIC 作用で優れた殺菌作用を示した (Fig. 1-a)。しかし、付着菌に対しては、薬剤作用 6 時間後では、浮遊菌と同様に約 2 オーダの菌数減少がみられたものの、その後 24 時間までの殺菌作用はいずれの薬剤も著しく低下した (Fig. 1-b)。また、 $6.3 \times 10^7$  cfu/well の付着菌に対し、細胞内に侵入した菌は  $1.3 \times 10^8$  cfu/well で、6 時間後には細胞内で  $7.4 \times 10^4$  cfu/well まで増殖した。この侵入菌に対していずれの薬剤も増殖抑制効果は示すものの、もっとも抑制効果の高い CFIX でも殺菌作用は認められなかった。

## III. 考察

*H. influenzae* は *Streptococcus pneumoniae* や *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* とならんで呼吸器感染症の主要起因菌であり、本菌の分離頻度は全体の 30~40 % を占めている<sup>7)</sup>。*H. influenzae* の nontypable の株は健常人でも鼻腔などの上気道に常在することから<sup>1,9)</sup>、本菌の上皮細胞への付着は感染症との関連性に重要な意味を持つものと考えられる。*H. influenzae* の上皮細胞への付着性は莢膜保有の有無と密接に関連していることが知られている<sup>5,8)</sup>。Falkow<sup>5)</sup>らは serovar b の莢膜を欠損した変異株は親株に比較して結膜由来の上皮細胞に対する付着性および侵入性が著しく高く、トランスフォーメーションにより再び莢

Table 2. Adherence and invasion of *Haemophilus influenzae* to HEp-2 cells

Strain no.	Serovar	Biovar	Source	Inoculum (CFU <sup>1)</sup> /well)	Adherence		Invasion	
					no. of adherent bacteria (CFU/well)	rate <sup>2)</sup> (%)	no. of invasive bacteria (CFU/well)	rate <sup>3)</sup> (%)
15001	b	I	cerebrospiral fluid	$1.4 \times 10^7$	$1.0 \times 10^5$	0.7	$<1.0 \times 10$	$<0.0001$
15002	b	I	blood	$1.6 \times 10^7$	$7.6 \times 10^4$	0.5	$<1.0 \times 10$	$<0.0001$
15003	b	I	nasopharynx	$2.2 \times 10^7$	$1.5 \times 10^5$	0.7	$<1.0 \times 10$	$<0.0001$
14031	b	I	cerebrospiral fluid	$1.8 \times 10^7$	$6.0 \times 10^5$	3.3	$<1.0 \times 10$	$<0.0001$
15004	b	II	blood	$2.7 \times 10^7$	$5.9 \times 10^5$	2.2	$<1.0 \times 10$	$<0.0001$
15005	b	II	cerebrospiral fluid	$2.8 \times 10^7$	$9.2 \times 10^5$	3.3	$<1.0 \times 10$	$<0.0001$
13001	nontypable	I	pharynx	$4.7 \times 10^7$	$4.5 \times 10^7$	96	$1.0 \times 10^3$	0.002
14015	nontypable	I	pharynx	$2.0 \times 10^7$	$8.6 \times 10^6$	43	$3.0 \times 10$	0.0002
13045	nontypable	II	pharynx	$3.9 \times 10^7$	$4.8 \times 10^6$	12	$5.9 \times 10^3$	0.015
13049	nontypable	II	pharynx	$3.7 \times 10^7$	$3.7 \times 10^7$	100	$1.9 \times 10^2$	0.0005
14004	nontypable	III	sputum	$3.6 \times 10^7$	$2.2 \times 10^7$	61	$4.6 \times 10^3$	0.013
14005	nontypable	III	sputum	$2.6 \times 10^7$	$2.6 \times 10^7$	100	$1.5 \times 10^2$	0.0006
14020	nontypable	IV	ear	$3.0 \times 10^7$	$5.3 \times 10^6$	18	$1.0 \times 10$	0.00003
13023	nontypable	V	sputum	$6.5 \times 10^6$	$1.1 \times 10^6$	17	$<1.0 \times 10$	$<0.0002$
13024	nontypable	V	sputum	$3.0 \times 10^6$	$8.4 \times 10^5$	28	$1.0 \times 10$	0.0003

1) Colony-forming units

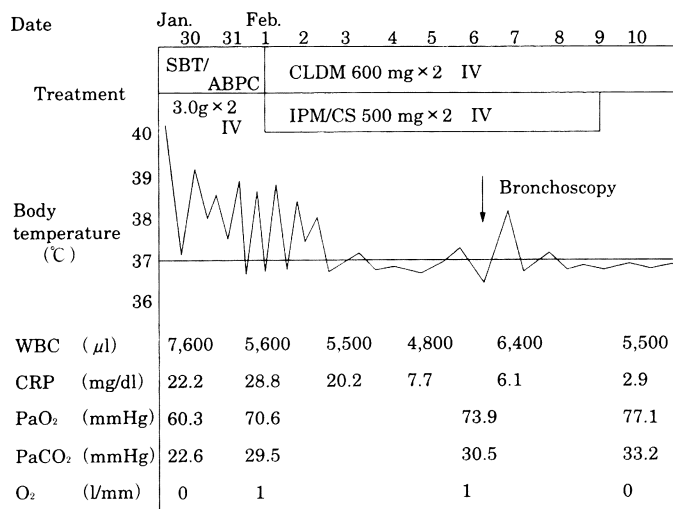
2) No. of adherent bacteria in well/inoculated bacteria in well  $\times 100$ 3) No. of invasive bacteria in well/inoculated bacteria in well  $\times 100$ 

Fig. 1. Bactericidal effects of cefixime, cefpodoxime and cefditoren at 8 MIC on *Haemophilus influenzae* strain 13045 adhering to HEp-2 cells. MIC: cefixime 0.031  $\mu\text{g/ml}$ , cefpodoxime 0.063  $\mu\text{g/ml}$ , cefditoren 0.016  $\mu\text{g/ml}$

膜保有株にもどすと付着性，侵入性がともに低下することを明らかにした。さらに Catlin<sup>10)</sup> らはその莢膜欠損変異株には 2 つのタイプがあり，ひとつは莢膜成分であるポリサッカライドを封埋した膜を少量産生し，もうひとつはポリサッカライドを細胞内に少量産生することを報告し，Doern<sup>11)</sup> らは透過型電子顕微鏡によりその存在を確認した。また，*H. influenzae* 以外で莢膜を保有する *S. pneumoniae* や *Neisseria meningitidis* についても，HEp-2 または咽頭由来上皮細胞への付着性が検討されており，莢膜のサイズやポリサッカライ

ドの量が密接に関連することが報告されている<sup>12,13)</sup>。これらのことから，莢膜は菌が保有する付着因子をマスクすることにより細胞上皮への付着を阻害する可能性が示唆された。*H. influenzae* の血清型は，莢膜多糖体抗原にもとづく分類法であり，nontypable はいずれのタイプにも属さない，いわゆる莢膜を保有しない株であるが<sup>12)</sup>，我々の検討においても nontypable の株は総じて serovar b の株に比べて HEp-2 に対する付着性が著しく高く，莢膜の有無により HEp-2 細胞への付着率が大きく影響されることが確認された。臨床分離株の

多くは中耳炎や副鼻腔炎を含む呼吸器感染症由来株で、そのほとんどが nontypable の株であることから、上皮細胞への付着性の高さや感染症とは無縁ではないと考えられる。

一方、*H. influenzae* の細胞内への侵入機構については不明な点が多いが、*H. influenzae* の付着によりダメージを受けた細胞に菌が侵入すると考えられ、細胞間隙や細胞内に存在する菌の存在を透過型電子顕微鏡を用いて証明されている<sup>5,14)</sup>。また、*N. meningitidis* では endocytosis により上皮細胞内に侵入することが報告されている<sup>15)</sup>。菌の侵入には莢膜の有無は影響しないという報告もあるが<sup>16)</sup>、我々の検討では serovar b では細胞内に侵入する株は存在しなかったのに対し、莢膜を保有しない nontypable では 89% (8/9) において HEp-2 細胞内への侵入が認められた。今回の検討では serovar b と nontypable の菌数をほぼ同量作用させた結果であり、serovar b をさらに高い菌量で作用させて nontypable と同等の菌量が付着した場合の侵入性は検討していないが、*H. influenzae* は付着を介して細胞内へ侵入していくものと考えられ、莢膜の有無は細胞内侵入にも密接に関与しているものと考えられる。nontypable の株は上気道に長期間定着するという事実<sup>19)</sup> からも、上皮細胞に付着および侵入することにより、宿主の免疫反応からの逃避を容易にし、長期の生存を可能にしているものと考えられる。

本実験によって明らかのように、HEp-2 付着菌はセフェム薬の殺菌作用に抵抗性を示した。HEp-2 付着菌は比較的短時間に上皮細胞上で増殖し、集塊を形成することを鏡顕下で観察しているが、集塊菌は抗菌剤により殺菌されにくく、抵抗性を示すことが菅野<sup>17)</sup> によっても報告されている。また、細胞内侵入菌は薬剤作用によりまったく殺菌されなかったことは、セフェム薬が細胞内に浸透しにくいと推察される。近年開発された経口セフェム薬は *H. influenzae* 感染症に対して、強い抗菌力を反映した優れた臨床効果を示すことから、first choice drug としての地位を確立している。しかし、まれに宿主の要因によって、あるいは治療の失敗によって本菌に起因する呼吸器感染症において、上皮細胞への付着・侵入が再発や難治化の温床となり、慢性感染症へと進展する可能性も考慮する必要があると考えられた。

本論文の要旨は、第 43 回日本化学療法学会総会にて発表した。

#### 文 献

- 1) Turk D C: Clinical importance of *Haemophilus influenzae*, in S. H. Cell and P. F. Wright (ed.), *H. influenzae* epidemiology, immunology, and prevention of disease. p. 3~9, Elsevier/North-Holland Publishing Co., New York, 1982
- 2) 中村 明: 病原細菌の群別と型別法, インフルエンザ

菌. 臨床と微生物 15: 39~42, 1988

- 3) Long S S, Teter M J, Gilligan P H: Biotyping of *Haemophilus influenzae*; Correlation with virulence and ampicillin resistance. *J Infect Dis* 147: 800~806, 1983
- 4) Killian M: A taxonomic study of the genus *Haemophilus* with the proposal of a new species. *J Gen Microbiol* 93: 9~62, 1976
- 5) Geme III J W, Falkow S: Loss of capsule expression by *Haemophilus influenzae* type b results in enhanced adherence to and invasion of human cells. *Infect Immun* 59: 1325~1333, 1991
- 6) Megraud F, Trimoulet P, Lamouliatte H, Boyanova L: Bactericidal effect of amoxicillin on *Helicobacter pylori* in an in vitro model using epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 869~872, 1991
- 7) 西岡さよ, 荻原央子, 丹野恭夫, 滝島 任: 近年の呼吸器感染症の原因菌の動向と *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* および *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* の抗生剤感受性. *Chemotherapy* 39: 443~451, 1991
- 8) LiPuma J J, Gilsdorf J R: Role of capsule in adherence of *Haemophilus influenzae* type b to human buccal epithelial cells. *Infect Immun* 55: 2308~2310, 1987
- 9) Faden H, Duffy L, Williams A, Pwdiatrics T W, Krystotik D, Wolf J: Epidemiology of nasopharyngeal colonization with nontypeable *Haemophilus influenzae* in the first 2 years of life. *J Infect Dis* 172: 132~135, 1995
- 10) Catlin B W: *Haemophilus influenzae* in culture of cerebrospinal fluid. Noncapsulated variants typable by immunofluorescence. *Am J Dis Child* 120: 203~210, 1970
- 11) Doern G V, Buckmire F L A: Ultrastructural characterization of capsulated *Haemophilus influenzae* type b and two spontaneous nontypable mutants. *J Bacteriol* 127: 523~535, 1976
- 12) Craven D E, Peppler M S, Frasch C E, Mocca L F, McGrath P P, Washington G: Adherence of isolates of *Neisseria meningitidis* from patients and carriers to human buccal epithelial cells. *J Infect Dis* 142: 556~568, 1980
- 13) Selinger D S, Reed W P: Pneumococcal adherence to human epithelial cells. *Infect Immun* 23: 545~548, 1979
- 14) Farley M M, Stephens D S, Mulks M H, Cooper M D, Bricker J V, Mirra S S, Wright A: Pathogenesis of IgA1 protease-producing and -non-producing *Haemophilus influenzae* in human nasopharyngeal organ cultures. *J Infect Dis* 154: 752~759, 1990
- 15) Stephens D S, Farley M M: Pathogenic events during infection of the human nasopharynx with *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae*. *Rev Infect Dis* 13: 22~33, 1991
- 16) Read R C, Wilson R, Rutman A, Lund V, Todd H C, Brain A P R, Jeffery P K, Cole P J: Interaction of nontypable *Haemophilus influenzae*

with human respiratory mucosa in vitro. *J Infect Dis* 163: 549~558, 1991

17) 菅野治重: 集塊菌に対する抗菌剤の殺菌効果。  
*Chemotherapy* 36: 691~705, 1988

## Adhesion of *Haemophilus influenzae* to HEp-2 cells and the bactericidal effect of cefixime on the adherent bacteria

Akiko Ikemoto, Noriko Teratani, Fumiaki Ikeda  
and Yoshiko Yokota

Pharmacological Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.,  
1-6, 2-chome, Kashima, Yodogawa-ku, Osaka 532, Japan

The adherence to the human larynx carcinoma cell line, HEp-2 cells, of serovars of biovars of *Haemophilus influenzae*, and the bactericidal effect of oral cepheims on *H. influenzae* adhering to HEp-2 cells was investigated.

1) The biotypes of 144 strains of *H. influenzae* isolated from 1993 to 1995 were in the order biovar II (43%), III (24%), and I (19%). There was no difference in their susceptibilities to cefixime (CFIX), cefpodoxime (CPDX) and cefditoren (CDTR) among the biotypes.

2) The ability of nontypable *H. influenzae* to adhere to HEp-2 cells was significantly greater than that of serovar b strains (12~100% versus 0.5~3.3%). Invasion of the bacteria into the cells was observed at a frequency of 0.00003 to 0.015% in nontypable strains, but was not observed in serovar b strains.

3) The bactericidal activity of these cepheims against the adherent bacteria, as well as the floating bacteria was strong until 6 h. But from then until 24 h. the activity against the adherent bacteria was lower than that against the floating bacteria. These cepheims had only slight bactericidal activity against the invasive bacteria.

These observations suggest that nontypable *H. influenzae* strains have a tendency to adhere easily to epithelial cells and to invade the cells, and therefore may cause chronic respiratory tract diseases.