肺炎球菌臨床分離株の培養2型肺胞上皮細胞（A 549 cell）への付着・侵入能に関する検討

渡邉　信介

Streptococcus pneumoniae（*S. pneumoniae*）は市中肺炎，急性中耳炎，髄膜炎，敗血症の最も代表的な原因菌であり，1980年代以降ペニシリン耐性肺炎球菌（penicillin-resistant *S. pneumoniae*, PRSP）の分離率は世界的に増加している．しかしながら感受性株と耐性株の病原性にどのような違いがあるかについては良く知られていない．そこで今回，感受性の異なる臨床分離血液由来 *S. pneumoniae* 4株のヒト肺胞2型上皮細胞癌由来であるA 549細胞への付着，侵入能について検討した．付着菌数はいずれの菌株でも接触時間，接種菌量に依存して増加した．侵入能は検討4株中2株に認め，接種菌量による差は認めなかった．今回検討した4株では，薬剤感受性の違いによる付着・侵入能の差は認めなかった．また侵入能を有していた2株の血清型は3型と6型で，臨床上血液から分離頻度の高い血清型であった．

The Ability of Adherence and Penetration to A 549 Cells in Clinically Isolated *Streptococcus Pneumoniae*

Shinsuke WATANABE

Streptococcus pneumoniae (*S. pneumoniae*) is the most common pathogen of community-acquired pneumonia, acute otitis media, meningitis, and bacteremia. In the last two decades, there has been a worldwide increase in the incidence rate of penicillin-resistant *S. pneumoniae* (PRSP). The difference of pathogenicity between penicillin-susceptible *S. pneumoniae* (PSSP) and PRSP, however, is not well known. In the present study, the ability of adherence and penetration to A 549 cells, a human lung alveolar carcinoma (type 2 pneumocyte) cell in the 4 strains of *S. pneumoniae* clinically isolated from blood were examined in vitro. The ability of adherence depended on the contact time and inoculum size in all strains. Results showed that two of the four strains (one is susceptible and the other is intermediately resistant to penicillin) were found to penetrate into A 549 cells, but were not dependent on inoculum size. The ability of adherence and penetration in the 4 strains was not related to their susceptibility to penicillin. The serotypes of invasive strains were 3 and 6, and were frequently isolated from blood in Japan. These results confirm previous clinical study. (Accepted on October 21, 2000) *Kawasaki Igakkaishi 27(1): 23-30, 2001*

Key Words ① **Penicillin-resistant *Streptococcus Pneumoniae*** ② **Epithelial cells** ③ **Penetration** ④ **Serotype**

川崎医科大学　内科呼吸器部門
〒701-0192　倉敷市松島577

Division of Respiratory Diseases, Department of Medicine, Kawasaki Medical School: 577 Matsushima, Kurashiki, Okayama, 701-0192 Japan

は じ め に

Streptococcus pneumoniae（*S. pneumoniae*）は呼吸器感染症の病原菌として極めて重要な位置を占める．肺炎，特に高齢者の市中肺炎では70～80%が本菌によると言われており，また乳幼児の化膿性髄膜炎，急性中耳炎の原因菌として小児科，耳鼻科領域でも，最も重要なものの一つである．呼吸器内科領域で遭遇する肺炎球菌性肺炎においては5～30%の症例で敗血症を合併し[1),2)]，その場合の死亡率は高いとされる．即ち敗血症の発症は患者予後を左右する重要な因子とされている．ところで，*S. pneumoniae* は従来ペニシリン系抗菌薬に高感受性を示しており，臨床的にはこれら薬剤が高い治療効果をあげていた．しかし1967年にペニシリン耐性肺炎球菌（penicillin-resistant *S. pneumoniae*, PRSP）が初めて報告されて以降[3)]全世界で驚異的な拡がりを見せており，その耐性化率は15～56%と報告されている[4)~8)]．本邦においても1986年の小栗らの報告[9)]を皮切りにその増加傾向が指摘され，1994年の紺野らによる全国規模の調査では41.8%が耐性菌であったが[10)]，現在では中等度耐性菌（penicillin-intermediately-resistant *S.pneumoniae*, PISP），PRSP 両者を合わせた耐性化率は約65%にまで増加している[11)]．当院でも1993～95年，1995～96年に2度の調査を実施しているが耐性化率は各々47.4%，43.7%であった[12),13)]．その耐性機序は PCG などのβ-ラクタム系抗菌薬の標的酵素であるペニシリン結合蛋白（penicillin-binding proteins, PBPs）の構造的変異，特に PBP 1A，2A，2B，また耐性菌において出現してくる2Xの変異による薬剤親和性の低下であると言われている[14)~18)]．そしてこれら PBPs の構造的変異は，PBPs をコードする遺伝子 pbp 1a，2a，2b，2x そのものの部分的な変異の結果生じている[19)~22)]．生方ら[23)]はこれら変異遺伝子の数や組み合わせにより，MIC の推測も可能であると言及しており，さらに本邦で1998年11月から1999年5月に分離された *S. pneumoniae* 745株中，遺伝子変異をまったく伴わない菌はわずか17%に過ぎなかったと報告している[11)]．PISP，PRSP の増加に伴い髄膜炎，敗血症などの侵襲性肺炎球菌感染症（invasive pneumococcal disease, IPD）での治療抵抗性は臨床的問題として顕著になりつつある[12)]．これ程までに増加している PISP，PRSP であるのにその病原性，特に血管侵襲性（組織侵襲性）等に関しては未だ明らかとは言い難い．また敗血症患者血液から分離される *S. pneumoniae* の耐性率にも一定の見解はないが，臨床的には耐性菌が敗血症を発症する頻度は感受性菌に比べ低いと考えられている[24)]．そこで敗血症を発症する過程において重要と考えられる，菌の肺胞上皮細胞への付着，侵入能について Penicillin G（PCG）に対する感受性の異なる患者血液由来 *S. pneumoniae* を用いて比較検討した．

材 料 と 方 法

＜使用菌株＞

1996年から1997年に川崎医科大学附属病院中央検査部で，敗血症患者血液から分離された *S. pneumoniae* 4株（penicillin-susceptible *S. pneumoniae*, PSSP 1株，PISP 3株）を使用した．PCG に対する感受性測定は日本化学療法学会標準法[25)]に準じ微量液体希釈法で測定した．また感受性分類は National Committee for Clinical Laboratory Standards（NCCLS）の基準[26)]に基づき PCG に対する MIC が 0.063 μg/ml 以下のものを感受性（PSSP），同 0.125～1.0 μg/ml のものを中等度耐性（PISP）とした．血清型は型別用血清（Statens seruminstitute, Copenhagen）を用いて莢膜膨化試験により判定した．

＜使用細胞＞

ヒト肺胞2型上皮細胞癌由来である A 549細胞（ATCC　CCL-185）[27),28)]を使用した（Dainippon Pharmaceutical company, Osaka, Japan）．A 549細胞は非働化した10% fetal bovine serum（FBS），60 μg/ml の kanamycin（KM）を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium（DMEM）

内で37℃にて炭酸ガス培養後，細胞数をカウントし，1×10^6 cells/ml となるように10% FBS 添加 DMEM で希釈し基本細胞浮遊液を作製した．この基本液を10% FBS 添加 DMEM 1 ml を加えた24穴プレートの各 well に 100 μl ずつ分注し（1×10^5 cells/well）72時間培養後，phosphate-buffered saline（PBS）にて5回洗浄し以下の実験に使用した．尚，実験に使用する細胞は97継代から109継代までとした．

＜付着・侵入能＞

Talbot ら[29]の方法を一部改変して行った．各 *S. pneumoniae* は血液寒天培地上で 37℃，20時間炭酸ガス培養後，5コロニーを5% yeast extract（Oxoid Ltd., Basingstoke, England）添加 Mueller Hinton Broth（Difco laboratories, Detroit, USA）に接種．その後，予め作製した菌増殖曲線を基に吸光度を測定しながら菌量が約1×10^8 CFU/ml に到達するまで37℃で約18～24時間，炭酸ガス培養した．PBS にて3回洗浄後，1% FBS 添加 DMEM に再懸濁し基本菌液（1×10^8 CFU/ml）を作製し，同 medium による2倍希釈菌液（5×10^7 CFU/ml），10倍希釈菌液（1×10^7 CFU/ml），20倍希釈菌液（5×10^6 CFU/ml）を各実験に使用した．

各菌液 1 ml を24穴プレート上の A 549細胞（1×10^5 cells/well）に接種し培養した．接触時間は2時間，3時間，4時間とした．尚，A 549細胞に 1 ml の 1% FBS 添加 medium のみを加え2，3，4時間培養したものをコントロールとした．菌接種後，各 well から菌液を除去し（コントロールは medium），A 549細胞表面に付着せず medium 内に浮遊している *S.pneumoniae* を取り除くために PBS で5回洗浄した．最終洗浄液（PBS）は血液寒天培地上に100 μl 接種，24時間培養し洗浄液中に *S.pneumoniae* が含まれていない事を確認した．Trypsin（0.25%）100 μl，EDTA（0.02%）100 μl，Triton X-100（0.03%）400 μl を加えた後に A 549細胞表面に付着した *S. pneumoniae*（adherent bacteria）と細胞内に侵入した *S. pneumoniae*（invasive bacteria）の合計菌数を定量培養にて測定した．*S. pneumoniae* の侵入能を調べるために同様に菌を接種，PBS による洗浄を行った後，adherent bacteria を殺菌するために各 well に 20 μg/ml の meropenem（MEPM）と 200 μg/ml の gentamycin（GM）を含有した1% FBS 添加 DMEM を1 ml 加え2時間培養した．培養後の抗菌薬添加 medium は血液寒天培地上に 100 μl 接種，24時間培養し *S.pneumoniae* が全て殺菌されている事を確認した．その後各 well から抗菌薬添加 medium を除去し PBS で5回洗浄後，trypsin，EDTA，Triton X-100を加え A 549細胞内に侵入した invasive bacteria のみを定量培養した．尚，抗菌薬処理後の最終洗浄液（PBS）30 μl を，実験に使用していない臨床分離 PSSP（PCG の MIC：0.016 μg/ml）の菌液を塗布した血液寒天培地上に滴下し，24時間培養後に抗菌薬残存による菌の発育抑制が生じていない事を確認した．また Triton 処理後の定量培養液 30 μl も細胞内に抗菌薬が存在しない事を同様の方法で確認した．侵入能を認めた菌については追加実験として，同様に菌を接種，抗菌薬処理，洗浄を行った後に再度1% FBS 添加 DMEM を 1 ml 加え1時間から4時間まで経時的に medium を血液寒天培地上で培養し，細胞内から再び細胞外（medium 内）に出現する菌が存在するかを調べた．

各実験ではそのつど接種菌液の定量培養を行い，接種菌量が一定である事を確認した．また，実験開始時と終了時に Trypan blue 染色で A549細胞の viability を調べた．全ての実験は独立して6回行い，結果はそれらの平均値±標準偏差で示した．

＜統計学的解析＞

統計解析用ソフト StatView J-5.0（SAS Institute Inc. NC, USA）を用いて，Student's *t* test で有意差検定を行い危険率0.01未満（$P<0.01$）を有意差有りと判断した．

Table 1. Characteristics of 4 *Streptococcus pneumoniae* for experiments

Strain	Specimen	MIC of Penicillin G [a] (μ g/ml)	Susceptibility to [b] Penicillin G	Serotype
SP7055	Blood	0.016	S	6
SP6016	Blood	0.5	I	23
SP6022	Blood	0.5	I	3
SP7067	Blood	0.5	I	14

a MIC, minimum inhibitory concentration
b S, susceptible ; I, intermediately resistant

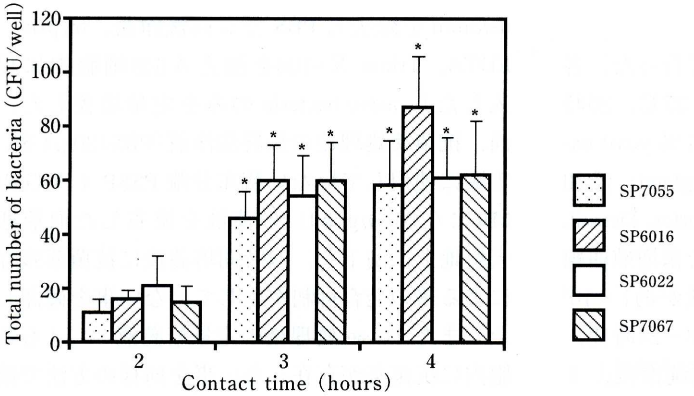

Fig. 1. Effect of contact time on total number of adherent and invasive *Streptococcus pneumoniae*

Inoculum size was 1×10^7 CFU/ml. Total number of bacteria were determined as the number of adherent and invasive bacteria per 1×10^5 A 549 cells. Results shown are the means ± standard deviations for triplicate wells in six independent experiments.
*, $P<0.01$ compared with contact time 2 hours in each strains.

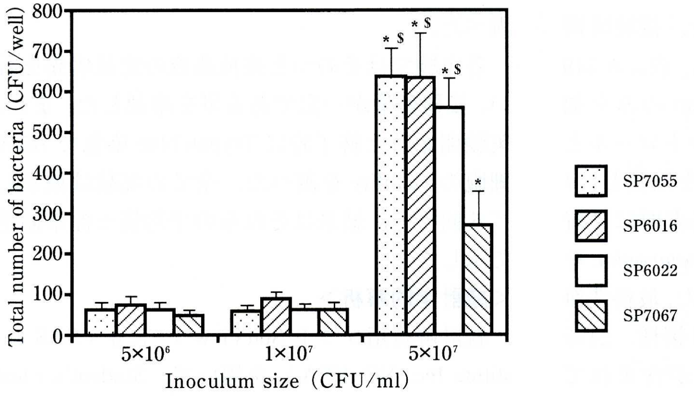

Fig. 2. Effect of inoculum size on total number of adherent and invasive *Streptococcus pneumoniae*

Contact time was four hours. Total number of bacteria were determined as the number of adherent and invasive bacteria per 1×10^5 A 549 cells. Results shown are the means ± standard deviations for triplicate wells in six independent experiments.
*, $P<0.01$ compared with two lower inoculum size in each strains.
$, $P<0.01$ compared with SP7067.

結　　果

＜使用菌株の血清型別＞

今回実験に使用した*S. pneumoniae* 4株の薬剤感受性，血清型別を**Table 1**に示した．4株中1株（SP 7055）は血清型6型のPSSP，3株は血清型23型(SP6016)，3型(SP 6022)，14型(SP 7067)のPISPであった．

＜付着・侵入能＞

これら4株のA 549細胞への接触時間の違いによる付着・侵入能の結果を示した(**Fig. 1**)．本実験での接種菌量は1×10^7 CFU/mlとした．各菌株とも接種3時間，4時間後の付着・侵入菌数は接種2時間後と比べ有意に増加していた（$P<0.01$）．また各接触時間における4株間での付着・侵入菌数に有意差は認めなかった．

次に接種菌量の違いによる付着・侵入能の結果を示した（**Fig. 2**）．本実験での接触時間は4時間とした．各菌株とも接種菌量5×10^6 CFU/mlと1×10^7 CFU/ml間での付着・侵入菌数は有意差を認めなかったが，5×10^7 CFU/mlの菌量では他の菌量と比し有意に付着・侵入菌数が増加していた（$P<0.01$）．

＜侵入能＞

検討した4株中A 549細胞への侵入能を有していたのは2株（SP 7055，SP 6022）であった．菌接種4時間後の各接種菌量での侵入菌数の結果を**Table 2**に示した．各接種菌量での両菌株間の侵入菌数に有意差は認めなかった．また，それぞれの菌において接種菌量に

Table 2. Number of invasive *Streptococcus pneumoniae* into A 549 cells

Strain	Inoculum size (CFU/ml)		
	5×10^6	1×10^7	5×10^7
SP7055	7 ± 2	8 ± 3	8 ± 3
SP6016	0	0	0
SP6022	6 ± 3	6 ± 2	7 ± 2
SP7067	0	0	0

Contact time was four hours. Values are means ± standard deviations (CFU / well) for triplicate wells in six independent experiments. There is no significant difference between SP 7055 and SP 6022 in each inoculum size. Also, there is no significant difference among three inoculum size in each strain.

Table 3. Percent cell viability of A549 cells after four hours inoculation

Strain	Inoculum size (CFU/ml)		
	5×10^6	1×10^7	5×10^7
SP7055	100	64#	40#
SP6016	100	100	100
SP6022	100	57#	31#
SP7067	100	100	100

Contact time was four hours. Values are expressed as percent cell viability of mean viable cell count after inoculation per before inoculation in six independent experiments.
#, $P<0.01$ compared with before inoculation in each strain

よる侵入菌数にも有意差は認めなかった．

侵入能を有していた２株（SP 7055, SP 6022）において，細胞内から再び medium 内に出現する菌は認めなかった．

＜A 549細胞の生存率＞

各実験における菌接種前後の A549細胞の viability は，コントロールおよび SP 6016, SP 7067では各接種菌量，接触時間での変化はなかった．しかし SP 7055, SP 6022では接種菌量1×10^7 CFU/ml, 5×10^7 CFU/ml で菌接種４時間後の viability が有意に低下していた（**Table 3**）．

考　　察

S. pneumoniae 呼吸器感染症発症の過程での感染，発症の最初の段階は鼻咽腔粘膜上皮細胞への定着（colonization）である．定着し得た菌はその後気道を経由して肺内，２型肺胞上皮細胞の platelet－activating factor（PAF）receptor と結合する[30)～33)]．この PAF receptor への結合には先行するウイルス感染による上皮細胞の障害[34)～36)]や interleukin－1（IL－1），tumour－necrosis factor（TNF－α）等の炎症性サイトカインによる PAF receptor の up－regulate が必要と言われている[32),33)]．この receptor との結合により初めて感染が成立する．今回，これらの過程における最初の重要な段階である肺胞上皮細胞への付着・侵入についての検討を行った．

今回の検討では臨床分離血液由来株４株を使用した（**Table 1**）．*S. pneumoniae* の莢膜血清型は現在84種類に分類されており PISP, PRSP での血清型分布には一定の傾向が見られると言われている[37)]．即ち PISP では３型，６型，14型，23型が多く，PRSP では６型，19型，23型が全体の90％を占めている．また国による違いはあるが分離部位別の血清型にも一定の傾向が見られ，我が国の血液由来株では３型，６型，19型，23型がほぼ同率に分離され，次いで14型の分離頻度が高い．そこで今回の使用菌株は，血液から一般的に分離される菌型である６型（PSSP），３型，14型，23型（PISP）を選択した．

同一菌量（1×10^7 CFU/ml）での接触時間による付着・侵入能の比較（**Fig. 1**）では，４株全てに時間依存性を認めた．また各接触時間における株毎の付着・侵入能に差は認めなかった．４時間接触後の接種菌量による付着・侵入能の比較（**Fig. 2**）では，４株全てに菌量依存性を認めた．5×10^6 CFU/ml および1×10^7 CFU/ml の接種菌量では４株間の付着・侵入能に差はなかったが，5×10^7 CFU/ml の菌量では１株（SP 7067，血清型14）のみ，他の３株に比較して付着・侵入菌数が少なかった．この株の PCG に対する MIC は他の２株の PISP と同様0.5 μg/

mlであり，薬剤感受性によって生じた差ではないと考えるが詳細は不明である．

次にA 549細胞への侵入能の比較であるが，検討4株中侵入能を有していたのは2株であった（**Table 2**）．SP 7055（PSSP，血清型6）とSP 6022（PISP，血清型3）であり，侵入菌量は接種菌量の0.0001%未満と極めて少ないものであった．また接種菌量の違いによる侵入菌量の差も認めなかった．*S. pneumoniae*（PSSP）あるいはGBSによる培養細胞への付着・侵入能に関する報告では，付着能，侵入能ともに時間依存性，菌量依存性を認めている[29),38)~41)]．今回の結果は付着能に関しては同様の結果であったが侵入能に関して菌量依存性は認めなかった．先の報告では菌接種後のviabilityは99%以上であったとしている[29)]．しかしながら今回の私共の結果では，侵入能を有した2株で4時間接触後のviabilityが菌量依存的に低下していた（**Table 3**）．本実験におけるA 549細胞のviabilityに影響を及ぼす因子としてmedium内のFBS濃度，使用した抗菌薬（MEPM，GM）濃度，作用時間等も考えられるが予備実験においてこれらがA 549細胞のviabilityに影響を及ぼさない事を確認している（データ未掲載）．また他の2株では4時間接触後もviabilityに変化がない事からこれらの影響は否定的である．しかし細胞表面への菌の付着時あるいは細胞内への菌の侵入後に何らかの原因で，例えば*S. pneumoniae*の自己融解によるpneumolysinの放出による細胞融解作用[42)]等によりA 549細胞のviabilityが低下した可能性は否定できない．そしてこれらの変化は付着菌量の多い高接種菌量（5×10^7 CFU/ml）でより顕著に現れたために，高接種菌量では仮に菌が侵入していてもA 549細胞の死滅により菌が細胞外，即ち抗菌薬（MEPM，GM）含有medium中に放出され殺菌された可能性が考えられる．

今回，臨床的に病原性を有していた*S. pneumoniae* 4株のA 549細胞への付着・侵入能について検討した．これらの付着・侵入能はSP7055（PSSP，血清型6）= SP 6022（PISP，血清型3）≧ SP 6016（PISP，血清型23）＞ SP 7067（PISP，血清型14）の順位であった（SP7055，SP 6022とSP 6016は付着能に差はないが前2株は侵入能を有していたためこの順位とした）．4株の血清型に注目するとこの順位は臨床上血液から分離される血清型の頻度と同様の結果であり，*S. pneumoniae*のA 549細胞への付着・侵入能の差は薬剤感受性の違いによる差ではなく，むしろ血清型の違いによる付着・侵入能の差であるように考えられる．即ち，血清型は*S. pneumoniae*呼吸器感染症から敗血症発症を規定する重要な因子の一つであると考えられる．しかし各血清型とも1株ずつの検討であり十分とは言えない．今後，感受性菌，耐性菌とも株数を増やして更に検討する必要がある．

謝　　辞

稿を終えるにあたり，直接の御指導，御校閲を賜りました川崎医科大学呼吸器内科学教室　松島敏春教授に深甚なる謝意を捧げます．また，実験についての適切な御助言，多大な御協力をいただいた二木芳人講師をはじめとする教室員の皆様方，組織培養・免疫センターならびに医用生物センターの皆様方に厚く御礼申し上げます．

なお本研究の一部は川崎医科大学（岡山県倉敷市）プロジェクト研究8-405，11-501から補助を受けて行われたものである．

文　　献

1）Hughes JR, Sinha DP, Cooper MR, Shah KV, Bose SK : Lung taps in childhood : bacteria, viruses and mycoplasmas in acute lower respiratory tract infections. Pediatrics 44 : 477－485, 1969

2）Silverman M, Stratton D, Diallo A, Egler LJ : Diagnosis of acute bacterial pneumonia in Nigerian children. Arch Dis Child 52 : 925－931, 1977

3) Hansman D, Bullen MM：A resistant pneumococcus. Lancet ii ：264－265, 1967

4) Simor AE, Louie M, The Canadian bacterial surveillance network, Low DE：Canadian national survey of prevalence of antimicrobial resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae.* Antimicrob Agents Chemother 40：2190－2193, 1996

5) Castaneda E, Penuela I, Vela MC, Tomasz A：Penicillin－resistant *Streptococcus pneumoniae* in Colombia：presence of international epidemic clones. Colombian pneumococcal study group. Microb Drug Resist 4：233－239, 1998

6) Baquero F, Garcia RJA, Garcia LJ, Aguilar L：Antimicrobial resistance of 1113 *Streptococcus pneumoniae* isolates from patients with respiratory tract infections in Spain：results of a1－year (1996-1997) multicenter surveillance study. The spanish surveillance group for respiratory pathogens. Antimicrob Agents Chemother 43：357－359, 1999

7) Felmingham D, Gruneberg RN：The Alexander Project 1996－1997：latest susceptibility data from this international study of baterial pathogens from community-acquired lower respiratory tract infections. J Antimicrob Chemother 45：191－203, 2000

8) Thornsberry C, Jones ME, Hickey ML, Mauriz Y, Kahn J, Sahm DF：Resistance surveillance of *Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae* and *Molaxella catarrhalis* isolated in the United States, 1997－1998. J Antimicrob Chemother 44：749－759, 1999

9) 小栗豊子：肺炎球菌の臨床細菌学的研究．臨床材料からの検出状況，菌型分布，薬剤感受性の推移，特にβラクタム剤耐性菌について．Jap J Antibiotics 39：783－805, 1986

10) 「ペニシリン耐性肺炎球菌研究会」(代表者　紺野昌俊)：全国各地で分離された肺炎球菌の疫学的研究．感染症誌 68：1338－1351, 1994

11) 生方公子：肺炎球菌，インフルエンザ菌の疫学的考察.「第三回肺炎球菌等による市中感染症研究会議事録」(紺野昌俊 編)．東京，国際医学出版株式会社．1999, pp 3－9

12) 渡邉信介，二木芳人，吉田耕一郎，玉田貞雄，橋口浩二，中島正光，松島敏春：肺炎球菌感染症の臨床的検討．日本化学療法学会雑誌 47：23－29, 1999

13) 二木芳人，玉田貞雄，中島正光，松島敏春，藤井千穂：成人における多剤耐性肺炎球菌呼吸器感染症の臨床的検討．日本化学療法学会雑誌 44：19－24, 1996

14) Hakenbeck R, Tarpay M, Tomasz A：Multiple changes of penicillin-binding proteins in penicillin-resistant clinical solates of *Streptococcus pneumoniae.* Antimicrob Agents Chemother 17：364－371, 1980

15) Percheson PB, Bryan LE：Penicillin－binding components of penicillin－susceptible and－resistant strains of *Streptococcus pneumoniae.* Antimicrob Agents Chemother 18：390－396, 1980

16) Hakenbeck R, Ellerbrok H, Briese T, Handwerger S, Tomasz A：Penicillin－binding proteins of penicillin－susceptible and－resistant pneumococci：immunological relatedness of altered proteins and changes in peptides carrying the beta－lactam binding site. Antimicrob Agents Chemother 30：553－558, 1986

17) Jabes D, Nachman S, Tomasz A：Penicillin-binding protein families：evidence for the clonal nature of penicillin resistance in clinical isolates of pneumococci. J Infect Dis 159：16－25, 1989

18) Markiewicz Z, Tomasz A：Variation in penicillin－binding protein patterns of penicillin－resistant clinical isolates of pneumococci. J Clin Microbiol 27：405－410, 1989

19) Martin C, Sibold C, Hakenbeck R：Relatendness of penicillin－binding protein 1a genes from different clone of penicillin－resistant *Streptococcus pneumoniae* isolated in South Africa and Spain. Embo J 11：3831－3836, 1988

20) Hakenbeck R, Konig A, Kern I, Linden M, Keck W, Legrandd R, Schoot B, Gutmann L：Acquisition of five high－Mr penicillin－binding protein variants during transfer of high－level beta－lactam resistance from *Streptococcus mitis* to *Streptococcus pneumoniae.* J Bacteriol 180：1831－1840, 1998

21) Dowson CG, Hutchison A, Brannigan JA, George RC, Hansman D, Linares J, Tomasz A, Smith JM, Spratt BG：Horizontal transfer of penicillin－binding protein genes in penicillin－resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae.* Proc Natl Acad Sci USA 86：8842－8846, 1989

22) Laible G, Keck W, Lurz R, Mottl H, Frere JM, Jamin M, Hakenbeck R：penicillin－binding protein 2x of

Streptococcus pneumoniae. Expression in *Escherichia coli* and purification of a soluble enzymatically active derivative. Eur J Biochem 207：943－949, 1992

23）生方公子：β－ラクタム系薬とマクロライド系薬耐性機構．「改訂ペニシリン耐性肺炎球菌」（紺野昌俊，生方公子，ペニシリン耐性肺炎球菌研究会編著）．東京，㈱協和企画通信．1999，pp 97－113

24）高平健一郎，片岡英樹，増田義重，深山牧子，畠山　勤，石濱裕美子，稲松孝思：高齢者呼吸器感染症におけるペニシリン耐性肺炎球菌の意義．感染症誌 71：313－317，1997

25）日本化学療法学会抗菌薬感受性測定委員会報告（委員長 斎藤　厚）：微量液体希釈法による MIC 測定法（日本化学療法学会標準法）の一部修正．栄養要求の厳しい菌種を対象とした培地の調整および感受性測定法．日本化学療法学会雑誌 41：183－189，1993

26）National Committee for Clinical Laboratory Standards : Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (M100-S6). 6 th informational supplement. NCCLS Vol. 15 . No. 14 , December, 1995

27）Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP：In vitro cultivation of human tumors：establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. J Natl Cancer Inst 51 : 1417－1423, 1973

28）Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson RW, Todaro GJ：A continuous tumor－cell line from a human lung carcinoma with properties of type alveolar epithelial cells. Int J cancer 17：62－70, 1976

29）Talbot UM, Paton AW, Paton JC：Uptake of *Streptococcus pneumoniae* by respiratoty epithelial cells. Infect Immun 64：3772－3777, 1996

30）Weiser JN, Austrian R, Sreenivasan PK, Masure HR：Phase variation in pneumococcal opacity：Relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. Infect Immun 62：2582－2589, 1994

31）Cundell DR, Tuomanen EI：Receptor specificity of adherence *Streptococcus pneumoniae* to human type－2 pneumocytes and vascular endothelial cells in vitro. Microbial Pathogenesis 17：361－374, 1994

32）Cundell DR, Gerard NP, Gerard C, Heikkila I, Tuomanen EI：*Streptococcus pneumoniae* anchor to activates human cells by the receptor for platelet－activating factor. Nature 377：435－438, 1995

33）Cundell DR, Gerard C, Idanpaan HI, Tuomanen EI, Gerard NP：PAF receptor anchors *Streptococcus pneumoniae* to activated human endothelial cells. Adv Exp Med Biol 416：89－94, 1996

34）Plotkowski MC, Puchelle E, Beck G, Jacquot J, Hannoun C：Adherence of type 1 *Streptococcus pneumoniae* to tracheal epithelium of mice infected with influenza A / PR8 virus. Am Rev Respir Dis 134：1040－1044, 1986

35）Hakansson A, Kidd A, Wadell G, Sabharwal H, Svanborg C：Adenovirus infection enhances in vitro adherence of *Streptococcus pneumoniae.* Infect Immun 62：2707－2714, 1994

36）Takase H, Nitanai H, Yamamura E, Otani T：Facilitated expansion of pneumococcal colonization from the nose to the lower respiratory tract in mice preinfected with influenza virus. Microbiol Immunol 43：905－907, 1999

37）生方公子：肺炎球菌の血清型と病原性．「改訂ペニシリン耐性肺炎球菌」（紺野昌俊，生方公子，ペニシリン耐性肺炎球菌研究会編著）．東京，㈱協和企画通信．1999，pp 65－77

38）Valentin－Weigard P, Chhatwal GS：Correlation of epithelial cell invasiveness of group B streptococcus with clinical source of isolation. Microbial Pathogenesis 19：83－91, 1995

39）Rubens CE, Smith S, Hulse M, Chi EY, Belle GV：Respiratory epithelial cell invasion by group B streptococci. Infect Immun 60：5157－5163, 1992

40）Cundell DR, Weiser JN, Shen J, Young A, Tuomanen EI：Relationship between colonial morphology and adherence of *Streptococcus pneumoniae.* Infect Immun 63：757－761, 1995

41）Adamou J, Wizemann TM, Barren P, Langermann S：Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to human bronchial epithelial cells (BEAS－2B). Infect Immun 66：820－822, 1998

42）Boulnois GJ：Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by *S. pneumoniae.* J Gen Microbiol 138：249－259, 1992