

尿路性器感染症における大腸菌の病原因子に関する検討

—線毛型と尿中剝離上皮細胞との付着能などを中心に—

藤田保健衛生大学泌尿器科 (主任: 名出頼男)

日比 秀夫, 石川 清仁, 泉谷 正伸

田中 利幸, 名出 頼男

STUDIES ON THE VIRULENT FACTOR OF ESCHERICHIA COLI ISOLATED FROM UROGENITAL INFECTION

—PILUS TYPE AND ADHERENCE TO HUMAN EXFOLIATED UROEPITHELIAL CELLS ETC—

Hideo Hibi, Kiyohito Ishikawa, Masanobu Izumitani,
Toshiyuki Tanaka and Yorio Naide*From the Department of Urology, Fujita Health University*

One hundred and twenty three strains of *Escherichia coli* isolated from the urine of patients with urogenital infections and 55 strains isolated from the fecal samples of healthy individuals were assayed for O antigen and hemolysin production as virulence factors, and for pilus type and in vitro tests of adhesion to human exfoliated uroepithelial cells as colonization factors. The incidence of MS pili in *Escherichia coli* isolated from patients with acute uncomplicated cystitis, chronic complicated cystitis, acute uncomplicated pyelonephritis and acute prostatitis was 60.9%, 22.7%, 87.5%, 68.2% and 30.9%, respectively. The incidence of P pili was 69.7%, 51.2%, 62.5%, 54.5% and 25.5%, respectively. The strains showing haemolysin production had MS pili and P pili, which show strong virulence. MS pili strains and P pili strains isolated from the patients with acute uncomplicated cystitis and acute uncomplicated pyelonephritis adhered to human exfoliated uroepithelial cells well.

Consequently, the pilus type might be the most significant colonization factor in uncomplicated urogenital infection which is shown by the normal defense mechanism in host side.

(Acta Urol. Jpn. 37: 1525-1529, 1991)

Key words: *Escherichia coli*, Adherence, Pilus type

緒 言

尿路上皮細胞と細菌の付着は感染成立における重要な step であり, 細菌が生体に付着し増殖する際に働く因子を定着因子と呼んでいる。本来, 尿路には病原体を排除する機能があるために, 単なる接着のみでは簡単に排除され感染には至らない。特に宿主の感染防御機構に異常を認めない単純性尿路感染症では定着因子が重要な役割を示す。

定着因子には, 多くのグラム陰性桿菌が保有する線毛やグラム陽性菌のリボタイコ酸 (LTA) や mycoplasma の膜蛋白などがある。尿路性器感染症の代表起炎菌である *Escherichia coli* は, MS 線毛 (type I

pili) や P 線毛 (type II pili) といった尿路上皮細胞に特異的な receptor を持つ線毛を有し, 近年北欧を中心に研究が進められ, 尿路感染症における意義の解明がなされてきている^{1,2)}。

今回, われわれは尿路性器感染症から分離された *E. coli* について MS 線毛や P 線毛の有無を調べ, これを糞便由来の *E. coli* と比較し, その尿路性器感染症における定着因子としての意義を検討した。

対 象 と 方 法

1) 被検菌株

本院外来を受診した急性単純性膀胱炎 (AUC) 46 例, 慢性複雑性膀胱炎 (CCC) 47 例, 急性単純性腎盂

腎炎 (AUP) 8 例, 急性前立腺炎 (AP) 22 例, 計 123 例の尿路性器感染症患者の尿より分離された *E. coli* 123 株と抗生剤による腸内細菌叢の変化を調べるために得た糞便由来の *E. coli* 55 株の計 178 株を用いた。

2) 検討項目およびその方法

①血清型別 (O 抗原)

O1, 6, 25, 26, 44, 55, 86 の 7 種類の抗血清 (デノンカ生研) を用いて O 抗原を判定した。

②線毛の同定

MS 線毛: 被検菌を Brain-Heart Infusion Broth (Difco) で 37°C, 24 時間培養し, ガラススライド上でその菌液 1 滴に, 5% モルモット赤血球 PBS 浮遊液 (v/v) 1 滴を加え, 室温で 10 分間放置し, その際に生じる赤血球凝集反応が, 5% D-mannose の添加により抑制される株を MS 線毛 (type I pili) 保有株とした。

P 線毛: ガラススライド上で被検菌の菌液 1 滴に, ヒト抗 P₁ 血清 (コスモバイオ社) 1 滴を加え, 4°C の保冷库で 5 分間インキュベートし, 凝集反応の認められる株を P 線毛 (type II pili) 保有株とした。

③ヘモリジン産生能

被検菌株を 5% ヒツジ赤血球寒天培地に接種し, 24 時間培養後, コロニー周囲に形成される溶血帯の有無によりヘモリジン産生能を決定した。

④尿中剝離上皮細胞への付着能

同一健康女性の早朝中間尿を採取後 3 時間以内に 1,500 rpm で 5 分間遠心して, PBS (KH₂PO₄ 3.45 g, Na₂HPO₄ 4.45 g, NaCl 5.0 g, KCl 0.2 g, 蒸留水 1,000 ml, pH 6.8) を用いて 3 回洗浄し, 剝離上皮細胞に細菌の付着のないことを染色標本で確認したのち 10⁴ c.f.u./ml の細胞浮遊液を作成した。被検菌は Brain Heart Infusion Broth (Difco) で 37°C, 18

時間培養し, その菌液を 10⁷ c.f.u./ml になるように上記の細胞浮遊液に混和して, 37°C の恒温槽内で 1 時間振盪培養した。その後, 5 mμ のミルポアフィルターで加圧濾過し, 膜上の細胞を 1% ホウ砂加 0.25% Toluidine Blue (Merk) 水溶液で染色した。

細胞への付着の評価は, 光学顕微鏡で 400 倍で観察し, 菌の細胞表面を占める面積の割合で付着を (卅), (十), (+), (−) の 4 段階に分けた。なお, 電子顕微鏡による線毛の検索は施行しなかった。

解析の検定は, χ^2 検定を用い, 有意水準は両側 5% とした。

結 果

①血清型別

O 抗原分析結果は AUC, AUP 由来株で O1, O6 の頻度が高く, この型は糞便由来株では認められなかった (Table 1)。

②線毛の同定と各疾患別線毛保有率

Table 2 は尿路性器感染症由来の *E. coli* 123 株を対象に, MS 線毛および P 線毛の保有状況について, 疾患別内訳を示したものであり, Table 3 は糞便由来株のこれら線毛の保有状況を示したものである。尿路性器感染症由来の 123 株中 MS 線毛保有株は 63 株 (51.2%), P 線毛保有株は 73 株 (59.3%) であった。それに対して, 糞便由来の 55 株中 MS 線毛保有株は 17 株 (30.9%) P 線毛保有株は 14 株 (25.5%) であり, 両線毛の保有率は尿路性器感染症由来株に比べ低かった。疾患由来別にみると, MS 線毛の保有率は AUC 60.9%, CCC 27.7%, AUP 87.5%, AP 68.2% であり, P 線毛の保有率は AUC 69.7%, CCC 51.2%, AUP 62.5%, AP 54.5% であった。P 線毛については各疾患由来ともその保有率に有意差は認め

Table 1. Distribution of O antigen isolated from cases of urogenital infections and from fecal samples.

	AUC (45株%)	CCC (47株%)	AUP (8株%)	AP (22株%)	糞便株 (55株%)
O 1	13 (28.9)	1 (2.0)	4 (50.0)	5 (22.7)	0
6	10 (23.2)	4 (8.5)	1 (12.5)	0	0
25	1 (2.2)	4 (8.5)	0	0	5 (9.1)
26	2 (4.4)	4 (8.5)	0	1 (4.5)	1 (1.8)
44	9 (20.0)	1 (2.0)	0	1 (4.5)	7 (12.7)
55	1 (2.2)	0	0	0	2 (3.6)
86	1 (2.2)	0	0	0	0
Typable	37 (82.2)	14 (29.8)	5 (62.5)	7 (31.8)	15 (27.3)
Not typable	9 (17.8)	33 (70.2)	3 (37.5)	15 (68.2)	40 (62.7)

ないが, MS 線毛は AUC, AUP AP 由来株で有意に高かった。

③ヘモリジン産生能

ヘモリジン産生株の占める割合は AUC 95.7%, CCC 55.3%, AUP 100.0%, AP 90.9%で尿路性器感染症由来株で高く, 糞便由来株では23.6%と低かった (Table 4)。また, 線毛保有とヘモリジン産生との関係を見ると尿路性器感染症由来株, 糞便由来株ともに MS 線毛, P 線毛の少なくとも一方を有する株では, 両者とも有しない株に比し高率にヘモリジン産生を認めた (Table 5, 6)。

④尿中剥離上皮細胞への付着能

尿中剥離上皮細胞との付着の程度は, 尿路性器感染症由来株については Table 7 に, 糞便由来株については Table 8 に示した。剥離上皮細胞に対する成績であるため, 全体的に付着度は低いが, 尿路性器感染

Table 2. Each pilus type of strain isolated from cases of urogenital infections. (%)

MS線毛	P線毛	菌株数	AUC	CCC	AUP	AP
(-)	(-)	33 (26.8)	6 (13.0)	21 (44.7)	1 (12.5)	5 (22.7)
(+)	(-)	17 (13.8)	8 (17.4)	2 (4.3)	2 (25.0)	5 (22.7)
(-)	(+)	27 (22.0)	12 (26.1)	13 (27.7)	0 (0)	2 (9.1)
(+)	(+)	46 (37.4)	20 (43.5)	11 (23.3)	5 (62.5)	10 (45.5)
計		123	46	47	8	22

Table 3. Each pilus type of strain isolated from the fecal samples. (%)

MS線毛	P線毛	菌株数
(-)	(-)	31 (56.5)
(+)	(-)	10 (18.1)
(-)	(+)	7 (12.7)
(+)	(+)	7 (12.7)
計		55

Table 4. Comparison of the haemolysin production between urogenital and fecal strains. (%)

疾患	ヘモリジン 産生能	(+)	(-)	計
AUC		44 (95.7)	2 (4.3)	46
AUP		8 (100.0)	0 (0.0)	8
CCC		26 (55.3)	21 (44.7)	47
AP		20 (90.9)	2 (9.1)	22
計		98	25	123
糞便		13 (23.6)	42 (76.4)	55

Table 5. Relationship between pilus type and haemolysin production of urogenital strains. (%)

線毛型	ヘモリジン 産生能	(+)	(-)	計
MS (-) P (-)		25 (62.5)	15 (37.5)	40
MS (+) P (-)		12 (80.0)	3 (20.0)	15
MS (-) P (+)		25 (89.3)	3 (10.7)	28
MS (+) P (+)		36 (90.0)	4 (10.0)	40
計		98	25	123

Table 6. Relationship between pilus type and haemolysin production of fecal strains. (%)

線毛型	ヘモリジン 産生能	(+)	(-)	計
MS (-) P (-)		0 (0.0)	31 (100.0)	31
MS (+) P (-)		4 (40.0)	6 (60.0)	10
MS (-) P (+)		3 (42.9)	4 (57.1)	7
MS (+) P (+)		6 (85.7)	1 (14.3)	7
計		13	42	55

Table 7. Adhesion of strains isolated from cases of urogenital infection.

		付着の程度			
MS線毛	P線毛	菌株数	(#)	(#)	(+)
(-)	(-)	33	1.8%	6.5%	23.9%
(+)	(-)	17	2.3%	7.7%	20.8%
(-)	(+)	27	6.6%	12.5%	27.9%
(+)	(+)	46	20.9%	16.4%	24.3%
計		123	9.1%	11.2%	24.4%

Table 8. Adhesion of strains isolated from fecal samples.

		付着の程度			
MS線毛	P線毛	菌株数	(#)	(#)	(+)
(-)	(-)	31	0.4%	3.5%	16.6%
(+)	(-)	10	0.0%	2.1%	9.0%
(-)	(+)	7	4.5%	7.9%	10.7%
(+)	(+)	7	6.4%	17.0%	13.9%
計		55	3.3%	4.2%	14.1%

症由来株の付着率44.7%に比し、糞便由来株では21.6%とさらに低いのは、後者が線毛保有株が少ないためと考えられる。その中でも MS 線毛・P 線毛保有株の付着率は少なくとも一方を保有しない株よりも高く、特に MS 線毛・P 線毛の両者を保有する株は1個の細胞にまんべんなく付着する傾向があり、この両者が付着さらに感染成立に重要な役割をもつものと思われた。この事実は、宿主側生体防御機構異常のないところにおける単純性尿路感染症から MS 線毛・P 線毛保有株が多く分離されたことと一致するように思われた。

考 察

尿路感染症の成立には、第1段階として尿流に抵抗して尿路上皮に付着し、第2段階として付着した組織に障害を与えることが必要であり、尿路感染症の代表的起炎菌である *E. coli* の病原性因子には定着因子と組織障害性因子のふたつがあるといえる。定着因子には MS 線毛や P 線毛等があり、組織障害性因子には菌体表面の lipopolysaccharide やヘモリジン (exotoxin のひとつ) 産生能がある。今回われわれは、*E. coli* の病原因子について上記諸点を検討した。

まず、O 抗原と病原性との関係については、O 抗原は菌体表面の lipopolysaccharide の糖鎖抗原であり、その型は尿路感染症、特に AUC では O1, 4, 6, 16, 18, 22, 75 に高く分離されると報告されている³⁻⁷⁾。われわれの検討でも O1, 6 に多く、糞便由来株では O1, 6 は認められなかった。

また、ヘモリジンは菌体毒素の exotoxin の一種であり、局所の組織障害性に関与するとされている。尿路感染症由来株では陽性株が高頻度にとめられている。また、ヘモリジン産生株が菌体表面の lipopolysaccharide の糖鎖抗原である O 抗原の一部に偏る傾向があり、尿路病原性としてこの両者の関連性が重要視されている。

MS 線毛は腎盂、尿管、膀胱に存在する α -D-Manp-(1-2) α -D-Manp をレセプターとする線毛であり、1955年に Duguid がヒトからの線毛保有の *E. coli* による赤血球凝集反応が D-mannose により阻止されることを発見し、mannose sensitive pili とされている⁸⁾。さらにその後の調査では、尿路感染症由来株の MS 線毛の保有率は90%以上と報告され⁹⁾、定着因子として重要な位置を占めると考えられている。しかし、Jackson らが述べているように、尿中 Tamm-Horsfall glycoprotein の carbohydrate 鎖に含まれる mannose と MS 線毛との結合により、尿路上皮

への付着が阻止されたり¹⁰⁾、白血球やマクロファージが MS 線毛に対するレセプターを有し、これに付着した *E. coli* を貪食・殺菌してしまうなど、この線毛の存在が菌にとって不利に働く面も持っている¹¹⁻¹³⁾。

P 線毛は D-mannose により阻止されない赤血球凝集反応を示す mannose resistant pili のひとつであり、1981年に Källénius ら¹¹⁾ や Leffler ら¹²⁾ によりヒト P₁ 血球表面に存在するグロボシド系糖脂質の α -D-Gal-(1-4)- β -Gal と結合する性質をもつために P 線毛と命名された。MS 線毛のレセプターが尿路全体に分布するのに対し¹⁵⁾、P 線毛のレセプターである α -D-Gal-(1-4)- β -Gal は腎盂粘膜や膀胱三角部では密に存在するが、他の部位ではほとんど認められず、病原性因子としては腎盂粘膜との親和性にあるのではないかと考えられる¹⁶⁾。Fredy は *E. coli* の25%が P 線毛を保有していると述べたが¹⁶⁾、Källénius らは小児の急性腎盂腎炎より分離される *E. coli* の90%以上が、P 線毛保有株であることを報告し¹⁷⁾、Gary は腎盂腎炎の患者から得られた *E. coli* の100%、単純性膀胱炎の患者から得られた *E. coli* の65%が P 線毛を産生すると報告している¹⁸⁾。

今回検討した尿路性器感染症由来 *E. coli* の線毛保有率は MS 線毛49.6%、P 線毛59.3%であり、P 線毛の方が多く保有されていたが、疾患別にみると、MS 線毛は AUC、AUP、AP 由来株に多くみられ、P 線毛は AUC、AUP、CCC、AP 由来株に共通してみられた。つまり、菌の付着に際し、宿主側の防御機構に障害のない AUC、AUP では線毛が重要な役割を示すと思われた。尿中剝離上皮を用いた *in vitro* の実験でも MS 線毛、P 線毛を有する *E. coli* の付着率が有意に高かった。一方、糞便由来株では MS 線毛、P 線毛の保有率は低く、尿中剝離上皮への吸着率も低かった。AUC、AUP の尿路感染菌の由来については一般に腸内細菌叢を源とする説が有力であり¹⁹⁾、腸内細菌が尿路感染症を起こす際になんらかの selection が行なわれ尿路内へ侵入するものと考えられている^{20,21)}。すなわち腸内細菌叢のなかで、線毛や組織障害性を有する菌が尿路に入り増殖し感染を成立させるものと考えられる。このことに関連して Smith らは毒素産生性のあるつまり、病因因子を有する株であっても標的臓器への定着性がない場合は病原性が認められないことを示している²²⁾。

今回の成績からも線毛は病原性を発揮するための第一段階である定着因子といえ、これを阻害することで尿路感染の予防が可能となるのではないかという観点から、臨床応用への各種研究が進められている²³⁾。

結 語

尿路性器感染症の代表的起炎菌である大腸菌の病原因子として、主として線毛の保有と付着との関係について検討し、その臨床的意義につき考察した。

なお、本論文の要旨は第40回日本泌尿器科中部連合総会にて発表した。

文 献

- 1) Källén G, Möllby R, Svenson SB, et al.: The Pk antigen as receptor for the haemagglutinin of pyelonephritic *E. coli*, FEMS Microbiol Lett 7: 297-302, 1980
- 2) Svanborg Eden C, Eriksson B and Hanson LA: Adhesion of *Escherichia coli* to human uroepithelial cells in vitro. Infect Immun 18: 767-774, 1977
- 3) 那須良次: 尿路性器感染症における *E. coli* の病原因子について、その 1. 急性単純性膀胱炎由来株の性状. 日泌尿会誌 79: 1162-1168, 1988
- 4) Czirok E.: Virulence factors *Escherichia coli*. Acta Microbiol Hung 32: 183-192, 1985
- 5) Cooke EM and Ewins SP: Properties of strains of *Escherichia coli* isolated from a variety of sources. J Med Microbiol 8: 107-111, 1975
- 6) Hughes C, Hacker J, Roberts A, et al.: Hemolysin production as a virulence marker in symptomatic and asymptomatic urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. Infect Immun 39: 546-551, 1983
- 7) Welch RA, Dellinger EP, Minshew B, et al.: Haemolysin contributes to virulence of extra-intestinal *E. coli* infections. Nature (London) 294: 665-667, 1981
- 8) Duguid JP, Smith IW, Dempster G, et al.: Non-flagellar filamentous appendages ("fimbriae") and haemagglutinating activity in *Bacterium coli*. J Pathol Bacteriol 70: 335-348, 1955
- 9) 後藤俊弘: 尿路性器感染症由来大腸菌の線毛型, 赤血球凝集素価, 溶血能の検討. 日泌尿会誌 79: 1582-1586, 1988
- 10) Jackson E, Fowler JR., Michele Mariano and James LT Lau: Interaction of urinary Tamm-Horsfall protein with transitional cells and transitional epithelium. J Uro 138: 446-448, 1987
- 11) Bar-Shavit Z, Goldman R, Ofek I, et al.: Mannose-binding activity of *Escherichia coli*: a determinant of attachment and ingestion of the bacteria by macrophages. Infect Immun 29: 417-424, 1980
- 12) Bjorksten B and Wadstrom T: Interaction of *Escherichia coli* with different fimbriae and polymorphonuclear leukocytes. Infect Immun 38: 298-305, 1982
- 13) Courtney H, Ofek I, Simpson WA, et al.: Characterization of lipoteichoic acid binding to polymorphonuclear leukocytes of human blood. Infect Immun 22: 625-631, 1981
- 14) Leffler H and Svanborg-Eden C: Chemical identification of a glycosingolipid receptor for *Escherichia coli* attaching to human urinary epithelial cells and agglutinating human erythrocytes. FEMS Microbiol Lett 8: 127-134, 1980
- 15) Shortliffe LD and Stamey TA: Urinary infections in adult women. Urology, Campbell MF, 5th. ed. p. 814-818, Saunders Co., Philadelphia, 1986
- 16) Roland F: Presence of the human blood group substance P₁ in gram negative bacilli. Ann Microbiol 124A: 375-380, 1973
- 17) Källén G, Möllby R, Svenson SB, et al.: Occurrence of P-fimbriae *Escherichia coli* in urinary tract infections. Lancet ii: 1369-1372, 1981
- 18) Schoolnik GK: How *Escherichia coli* infects the urinary tract. N Engl J Med 320: 804-805, 1989
- 19) Schwarz H, Schirmer HKA, Ehlers B, et al.: Urinary tract infections: Correlation between organisms obtained simultaneously from the urine and feces of patients with bacteriuria and pyuria. J Urol 101: 765-767, 1969
- 20) 河田幸道: 尿由来大腸菌の病原性に関する研究. 日泌尿会誌 62: 308-324, 1971
- 21) Stamey TA: Urinary infections. p. 87-122, Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1972
- 22) Smith HW and Linggood MA: Observations on the pathogenic properties of the K88, Hly and Ent plasmids of *Escherichia coli* with particular reference to porcine diarrhea. J Med Microbiol 4: 467-485, 1971
- 23) O' Hanley P, Lark D, Falkow S, et al.: Molecular basis of *Escherichia coli* colonization of the upper urinary tract in BALB/c mice. J Clin Invest 75: 347-360, 1985

(Received on November 16, 1990)
(Accepted on July 2, 1991)