尿中分泌型 IgA に関する研究

Ⅱ. E. coli の尿路上皮細胞附着に対する分泌型 IgA の阻止作用について

西 尾 彰
札幌医科大学泌尿器科学教室
(主任: 熊本悦明教授)
熊 本 悦 明
広 瀬 嵩 興

STUDIES ON URINARY SECRETORY IgA (SIgA)

2. Studies on the Effect of SIgA on Adherence of E.coli to the Vesical Epithelial Cell

Akira Nishio, Takaoki Hirose and Yoshiaki Kumamoto

Department of Urology, Sapporo Medical College

(Director: Prof. Y. Kumamoto)

We studied the function of urinary SIgA on adherence of E. coli, isolated from acute simple cystitis, to the vesical epithelial cell and obtained the following results.

1) The number of E.coli, adhering to the vesical epithelial cells which were taken from healthy adult females, ranged from 4 to 33 per cell with a mean of 18. When SIgA was added to 200 μ g/dl, the number of adhered E.coli decreased from 2 to 25 with a mean of 14.

2) From 9 to 135 of E.coli adhered to the vesical epithelial cells, taken from patients with the history of lower urinary tract infection, and the bacteria easily adhered to cells taken from patients with recurrent episodes of lower urinary tract infection in the past. When SIgA was added, the number of E.coli adhering to the cells obviously decreased to 5 to 61 with a mean of 25.

3) The relation between the real urinary SIgA levels and the experimental levels on adhesion suggested that the effective level of SIgA in urine might be near the non-infected urinary SIgA levels.

4) These results suggest that urinary SIgA might have a function of inhibiting invading bacteria from adhering to the urinary tract mucosa.

要旨: 尿中分泌型 IgA (SIgA) の感染防禦機構における機能を検討する目的で細菌が粘膜の上皮細胞に附着する過程において SIgA がどのような作用を果たしているかを検討した。上皮細胞は膀胱洗滌で採取し、また細菌は急性単純性膀胱炎の患者尿から分離した E. coli を用いた。SIgA は健康成人女子尿から精製したものをを用いた。1) 健康成人女子例では1個の上皮細胞に平均18個の E. coli が附着し、SIgA 添加 (200 μ g/dl) により平均14個に減少した (減少率: 22%)。2) 下部尿路感染症の既往を有する女子例では平均44個の E. coli が附着し、既往頻度の高い例では E. coli 附着数が増加した。SIgA を添加した場合附着数は平均25個に減少した (減少率: 58%)。3) 尿中 SIgA 濃度に対応させた試験管内 SIgA 濃度を用いた E. coli の附着阻止作用の検討から、SIgA の E. coli 附着阻止作用の効果発現濃度は、非感染時の尿中 SIgA 濃度附近にあることが推測された。

結 言

1965年 Tomasi ら¹⁾による分泌型 SIgA (以下 SIgA と略す) の発見とその後の研究により局所免疫に関する知見は飛躍的な発展を遂げ、現在では SIgA が外来から

侵入する微生物に対して重要な機能を果たしていることは多くの研究者が認めるところである。尿路感染症においても SIgA が感染菌に対して、特に下部尿路感染症において著明に反応していることは第1編²⁾にも述べた如

くである。しかし感染の成立過程から発症、その後の過程において SIgA が如何なる様式でどのような機能をもっているのかという具体的な検討は特に細菌感染症において乏しい。

通常粘膜における感染症は感染菌の侵入→附着（および定着）→増殖→発症の過程を辿るが、感染症の第1歩は侵入せる感染菌の粘膜面への附着であり、近年この点に関する検討が種々の角度からなされている³⁾。

1972年 Williams ら⁴⁾は口腔内の常在菌である *Streptococcus* が buccal cell に附着する際に SIgA が著明な附着阻止作用を示すことを報告し SIgA が感染成立過程における最も初期の段階でも感染防禦に關与している可能性を指摘した。その後 Parsons ら⁵⁾⁶⁾は膀胱においても粘膜上の分泌性の物質が同様の機能を有していることを報告しているが、SIgA そのものについての具体的な検討成績は示していない。

そこで著者らは Williams らが示した SIgA の上皮細胞への細菌附着阻止作用が尿路においても認められるか否かを検討すべく膀胱粘膜の剝離上皮細胞と急性単純性膀胱炎患者尿から分離された *E. coli* を用いて実験を行ない、若干の知見を得たので報告する。

対 象

(1) 尿路感染症既往群：札幌医科大学附属病院泌尿器科外来（以下当科外来と略す）で急性単純性膀胱炎の治療を受け、治療後2週間以上経過した26歳から77歳の女子、30例を対象とした。

(2) 健康成人女子群：当科外来を受診した女子のうち異常が認められず、且つ尿路感染症の既往がない19歳から61歳の女子15例である。

方 法

Table 1 に示す如く Gibbons ら⁷⁾の方法に準じた、即ち急性単純性膀胱炎患者尿から分離した *E. coli* (0-148) を Tryptocase soy broth (BBL) で37°C、一昼夜培養後 pH 7.3 の磷酸緩衝液（以下 PBS と略す）で3回遠心洗滌し 10^6 CFU/ml になるように調整した。一方膀胱粘膜の上皮細胞はネラトン・カテーテル (Fr 8) を用いて生理食塩水 (50ml) で膀胱洗滌を行ない採取後 PBS (pH 7.3) で800回転/分、10分間の遠心洗滌を3～4回行ない、上皮細胞数を $10^4 \sim 10^6$ 個/ml になるように調整し、その一部を gram 染色して上皮細胞に細菌の附着がないことを確かめた。次いで上皮細胞浮遊液 0.5 ml に種々の濃度の SIgA を 0.1ml または PBS (pH 7.3) を 0.1ml および *E. coli* 浮遊液 0.4ml を加え総量

Table 1 Schematic procedure of experiment.

1ml として良く混和した。次いでこの混合液を37°C、60分間 incubate した。この後、PBS (pH 7.3) で5回遠心洗滌し、その沈査を 30ml の PBS (pH 7.3) に浮遊させて良く混和した後 10μm の milipore filter を通した後 gram 染色し鏡検 (1,500倍) した (Fig. 1)。

上皮細胞に附着した *E. coli* 数の算定は各プレハートにつき50個の上皮細胞に附着した *E. coli* 数を数え、その平均値をもつて1個の上皮細胞に対する *E. coli* 附着数とした。

尿 SIgA の精製：第1編²⁾に述べた方法に従い健康成人女子尿より精製した。

尿中 SIgA 濃度の測定：第1編²⁾に述べた方法で行なった。

血清 IgG の精製：尾山ら⁸⁾の方法に従った。即ち健康成人血清 20ml の硫酸35%飽和沈澱分画を Tris-磷酸緩衝液 (pH 8.5, 電導度 (C) = 1.0×10^{-3} mho) で透析した後同緩衝液で平衡化している DEAE-cellulose column (2.0×20cm) で溶出し、最初の分画を採取した。

E. coli のO抗原の作成

Ebersole ら⁹⁾の方法に従った。即ち *E. coli* を Tryptocase soy broth にて37°C、一昼夜培養後2.5時間煮沸し、これを 1,400g、15分間遠心した後その沈査を95% ethanol に溶解した。次いで37°C、4時間 incubate し

Fig. 1 *E. coli* adhered to an epithelial cell taken from the bladder

1) light micrograph ($\times 1500$)

2) scanning electron micrograph ($\times 6000$)

た後0.15N 食塩水で3回洗滌しO抗原とした。

E. coli のH抗原の作成

Ebersole ら⁹⁾の方法に従った。*E. coli* を Tryptocase soy broth にて37°C, 一昼夜培養後 1,400g, 15分間遠心し, その沈査を PBS (pH 7.2) で3回遠心洗滌し, 再び同液に溶解した。これを10%フォルマリン緩衝液にて0.5%フォルマリン濃度に調整し, 37°C, 18時間 incubate した後再び3回洗滌してH抗原とした。

細菌凝集反応

Ebersole ら⁹⁾の方法に従った。即ち健康成人尿より精製した SIgA の 2,000 μ g/dl から 0.95 μ g/dl まで倍数稀釈系列の各 0.05ml と O 抗原あるいは H 抗原 0.02ml を良く混和し, 37°C, 2時間 incubate した後 4°C にて

6~8時間静置し凝集の有無を判定した。

間接赤血球凝集反応

木村ら¹⁰⁾の方法に従った。即ちタンニン酸処理綿羊赤血球を *E. coli* の O 抗原および H 抗原を用いて感作し, また SIgA は綿羊赤血球で吸収したウサギ血清を用いて 2,000 μ g/dl から 0.95 μ g/dl まで倍数稀釈した。次いで抗原感作綿羊赤血球液 0.05ml と各濃度の SIgA 0.5ml を良く混和し, 室温にて12時間静置後凝集の有無を判定した。

結 果

(1) 予備実験

1) SIgA の *E. coli* (0—148) に対する特異性について

今回の実験に供した *E. coli* の H 抗原および O 抗原と SIgA の間には細菌凝集反応および間接赤血球凝集反応のいずれにおいても凝集は認められなかった。即ちこれらの成績でみる限りでは今回用いた SIgA は *E. coli* (O—148) に対して特異的抗体活性は有していないと判断される。

2) *E. coli* の上皮細胞への附着における条件について

a) PBS の pH 及び incubation time が上皮細胞に及ぼす影響について

上皮細胞は健康成人女子から採取したものを使用し, また上皮細胞の生死の判定は King ら¹¹⁾の方法に従い, 0.01% trypan blue 液の上皮細胞核内への浸透状態から判断した。pH 6.0 の PBS を使用した際の生上皮細胞の推移を Fig. 2—a に示した。調整時の生上皮細胞数を100%とすると60分間 incubate した際の生上皮細胞率は48~99% (Mean $\pm$ 2SD: 66 $\pm$ 21%, 以下 Mean $\pm$ 2SD は省略), 120分間では36~59% (47 $\pm$ 18%) であつた。

pH 6.5 の PBS を使用した場合は Fig. 2—b に示す如く, 60分間の incubation では49~103% (78 $\pm$ 22%), 120分間では36~81% (63 $\pm$ 17%) であつた。一方 pH 7.3 の PBS では Fig. 2—c に示す如く60分間の incubation では73~108% (93 $\pm$ 15%), 120分間では49~83% (72 $\pm$ 14%) であつた。以上の成績から上皮細胞の状態を良好に保つには pH 7.3 の PBS が良く, また pH が下がるに伴ない死上皮細胞率が上昇すると判断された。推計学的には pH 6.0 と pH 6.5 および pH 7.3 の間に有意の差が認められた。

また incubation についてはその時間が長くなるに伴ない生上皮細胞率の低下が認められた。

Fig. 2-a Effect of pH of phosphate buffered solution and incubation time on the number of bacteria adhered to an epithelial cell.

Fig. 2-b

pH 6.5

b) 細菌の前培養時間および incubation time が細菌附着に及ぼす影響について

対数増殖期にある *E. coli* (8時間培養) と静止期にある *E. coli* (18~20時間培養) の附着能を検討する目的で5例の健康成人女子から採取した上皮細胞を用いて行なった。

Fig. 3 に成績を示したが、両群間には有意の差を認

Fig. 2-c

pH 7.3

Fig. 3 Effect of cultured time of *E. coli* and incubation time on the number of bacteria adhered to an epithelial cell.

めなかつた。また incubation time と *E. coli* 附着数の関係についてみると30分と60分あるいは90分間に有意の差が認められた。

(Ⅱ) 本実験

(1) 健康成人女子群

1) SIgA 非添加時の *E. coli* 附着数について

a) 日差変動

4例について異なった日に上皮細胞を3回採取して *E. coli* の附着数の変動を検討した。

Fig. 4 に示す如く第1回目は6~27個 (17±10個), 第2回目は5~27個 (16±10個), また第3回目は6~24個 (15±7個) であり, 各例の変動の幅は6~21% (14±7%) であった。

Fig. 4 Changes in the number of bacteria adhered to an epithelial cell taken from the normal controls on a different day.

b) 健康成人女子群の附着数

15例の *E. coli* 附着数は4~33個 (平均18個), 5%の危険率で棄却限界を求めて正常範囲とすると7~29個であった。これを年代別にみると Fig. 5 の如く年代が高くなるに伴ない附着数もやや増加する傾向が認められた。

Fig. 5 Relation between age and the number of bacteria adhered to an epithelial cell in normal controls.

2) SIgA 添加時の附着数について

a) SIgA 濃度の附着に及ぼす影響について

7例から採取した上皮細胞の浮遊液に SIgA を添加し SIgA の影響について検討した。

上皮細胞, *E. coli* および SIgA 混合液の SIgA 濃度が100μg/dl, 200μg/dl および 2,000μg/dl における *E. coli* 附着数の変化を検討した成績を Fig. 6 に示した。SIgA 非添加時の附着数は6~37個 (22±11個) であるが, SIgA 濃度が100μg/dl の場合には附着数は6~37個 (19±11個) で平均値での減少率は14%であった。200 μg/dl の場合には6~27個 (14±10個) で非添加時の附着数に対する減少率は38%であった。一方 2,000μg/dl での附着数は5~29個 (14±9個) であり, 平均値では200μg/dl での附着数と同値であった。以上の成績を推計学的に処理すると100μg/dl と 200μg/dl あるいは, 2,000μg/dl の間で有意の差が認められたため, 以後は200μg/dl における成績をもつて SIgA 添加時の附着数とすることにした。

Fig. 6 Effect of SIgA concentration on the number of bacteria adhered to an epithelial cell in normal controls.

b) SIgA 添加 (200μg/dl) 時の *E. coli* 附着数

SIgA 添加時の附着数は2~25個 (平均14個), 5%の危険率で棄却限界を求めて正常範囲とすると5~23個であった。またその減少率は平均22.0%, 減少率の正常範囲は4.4~43.2%であった。年代別にみると Fig. 7 の如くいずれの年代においても SIgA 添加により附着数の減少が見られ, 年代間の減少率の幅は11.2~31.8%であった。

Fig. 7 Relation among age, SIgA and the number of bacteria adhered to an epithelial cell in normal controls.

(2) 尿路感染症（下部尿路感染症）既往群

1) SIgA 非添加時の E. coli 附着数

本群（急性単純性膀胱炎の治療後少なくとも2週間以上経過したもの）における附着数は9～132個（44±26個）で健康成人女子の場合より有意に高く，健康成人女子において求めた正常範囲の附着数（7～29個）を示したものは30例中10例（33.3%）のみであった。また年代別には Fig. 8 に示す如く50歳代の例の附着数がやや少ないものの年代と E. coli 附着数の間には特定の傾向はみられなかった。

一方急性単純性膀胱炎の既往頻度の明らかであった27例について既往頻度と附着数の関係についてみると Fig. 9 に示す如く既往頻度が0～<1回/年の群では23～52個（32±13個），1～<2回/年の群では27～60個（39±12個），また≥2回/年の群では9～132個（49±33個）となり，急性単純性膀胱炎の既往頻度が高くなるに伴い E. coli 附着数が増加する傾向が認められ，特に100個以上の極めて高い附着数を示した2例の既往頻度はいずれも≥2回/年であった。

Fig. 8 Relation between age and the number of bacteria adhered to an epithelial cell in patients with past histories of lower urinary tract infections.

2) SIgA 添加（200µg/dl）時の E. coli 附着数

SIgA 添加時の附着数は5～61個（25±11個）で SIgA 非添加時と比較すると著明な減少がみられたが，健康成人において求められた SIgA 添加時の正常範囲の附着数（5～23個）を示したものは9例（30.0%）であった。このうち SIgA 非添加時も正常範囲内であったものは6例で他の3例は SIgA 添加によりはじめて正常範囲の附着数を示したものである。

一方減少率は平均43.2%であったが，健康成人女子で同様の検討をした前項（Fig. 7）の成績（減少率：22.0%）より著明に高かった。なお正常範囲の減少率（4.4～43.2%）を示したものは30例中17例（56.7%），正常範囲をこえる減少率を示したものが11例（36.7%）みられたが，後者のうち7例は50%以上を示し最高減少率は75.0%であった。

SIgA 添加時の E. coli 附着数を年代別にみると Fig. 10 の如く40歳代（減少率：53.3%）および60歳代（減少率：40.7%）で著明な減少がみられた。

一方急性単純性膀胱炎の既往頻度との関連においてみ

Fig. 9 Relation between frequency of episode and the number of bacteria adhered to an epithelial cell on patients with past histories of lower urinary tract infections.

ると Fig. 11 の如く SIgA 添加時の E. coli 附着数は 0 ~ < 1 回/年の群で 13 ~ 41 個 (19 ± 5 個), 1 ~ < 2 回/年の群で 17 ~ 34 個 (26 ± 8 個), また ≥ 2 回/年の群では 5 ~ 61 個 (28 ± 14 個) であった。これを減少率でみると 0 ~ 1 回/年の群は 40.6%, 1 ~ < 2 回/年の群は 33.3%, また ≥ 2 回/年の群では 42.9% で 3 群間に著明な差はみられなかった。しかし正常範囲をこえる減少率を示したものは 0 ~ < 1 回/年の群で 6 例中 1 例 (16.7%), 1 ~ < 2 回/年の群で 6 例中 2 例 (33.3%), また ≥ 2 回/年の群では 16 例中 5 例 (31.3%) となり後 2 者でやや高い傾向がうかがわれた。

3) SIgA の E. coli 附着阻止作用の発現濃度に関する検討

下部尿路感染症にて当科外来通院中の 11 例について非感染時に膀胱粘膜の上皮細胞および尿を同時に採取して

Fig. 10 Relation between frequency of episode and the number of bacteria adhered to an epithelial cell in the patients with past histories of lower urinary tract infections.

* SIgA (-): not added
(+): added to 200 µg/dl

尿中 SIgA 濃度を測定し、これと試験管に作成した尿中 SIgA 相当濃度における E. coli の阻着阻止効果の関連について検討した。11 例の年齢、尿中 SIgA 濃度、附着実験における SIgA 濃度および附着数は Table 2 に示した。また Fig. 12 には実測尿中 SIgA 濃度を 0 ~ < 100 µg/dl, 100 ~ < 200 µg/dl, および 200 ~ 300 µg/dl の 3 群に分けて附着数の推移を示した (Fig. 12 中の () 内数字は Table 2 の症例番号を示す)。0 ~ < 100 µg/dl 群では 4 例中 3 例は試験管内の 100 µg/dl 濃度で明らかに附着数の減少をみた。100 ~ < 200 µg/dl 群の 4 例では、症例 (8) は 100 µg/dl の濃度で附着数の減少がみられ、症例 (7) では 200 µg/dl で減少した。一方 200 ~ 300 µg/dl の 3 例では、症例 (11) は 200 µg/dl で、また症例 (10) は 300 µg/dl で各々附着数の減少傾向がみられた。

以上の如く 11 例中 7 例では試験管内での SIgA 濃度が症例の尿中 SIgA 相当濃度前後で E. coli 附着阻止効果が認められた。

以上の成績から判断すると、尿中 SIgA の細菌附着阻止作用の発現濃度は非感染時の尿中 SIgA 濃度附近にあ

Fig. 11 Relation between the frequency of episode and the number of bacteria adhered to an epithelial cell in patients with past histories of lower urinary tract infections.

ることが推測された。

考 案

SIgA の機能に関しては種々の点において検討されて来ているが未だ充分なる解明は得られていない。

South¹²⁾ は分泌性抗体に期待される性状として合目的論立場から次の 7 項目を挙げている。

- 1) 粘膜表面の病原体に対して抗体活性を有していること。
- 2) 病原体が侵入するのを阻止し、その増殖を抑制すること。しかし必ずしも殺菌的である必要はない。
- 3) 粘膜表面で速やかに産生され分泌されること。
- 4) その為の効率的な機構が存在すること。
- 5) 粘膜面に附着する性状を有すること。
- 6) 蛋白分解酵素に対して抵抗性を有し、また pH、温度、塩濃度の変化により、その活性が障害されないこと。

Table 2 Relation between urinary SIgA level and effect of experimental SIgA level on adherence

Case No.	Age	urinary SIgA level (µg/dl)	SIgA concentration in vitro (µg/dl)			
			0	100	200	300
1	22	73.3	51	29	27	26
2	41	72.0	32	22	20	21
3	18	96.0	17	19	17	14
4	27	60.0	36	12	10	11
5	55	195.3	53	46	49	40
6	19	161.2	31	27	27	22
7	48	170.0	34	31	18	20
8	49	103.5	42	16	12	9
9	58	272.3	44	38	39	38
10	37	227.3	38	41	33	28
11	23	241.5	26	24	15	16

と。

7) 補体系から独立していること。

確かに SIgA は上記のいくつかを満足させる性状を有しているが、感染症における SIgA の機能として明らかにされている点は少ない。各種ウイルスに対する中和抗体としての機能はその 1 つであり、既におびただしい数の報告が見られる¹³⁾¹⁴⁾。

一方細菌感染症における機能については未だ不明の点が多い。少なく共細菌に対する直接的な抗菌作用は全く見られない。しかし Burdon ら¹⁵⁾は補体以外のある種の血清成分との共存下では殺菌作用を認め、また Hill¹⁶⁾、Adenolfi ら¹⁷⁾は補体および lysozyme との共存下では殺菌作用が認められるとしている。

一方補体系との関連についてみると classical pathway を介した場合については、Ishizaka ら¹⁸⁾はこれを否定しているが、最近の Iida¹⁹⁾の報告によると SIgA は C₁q との結合が可能であるとしている。Alternate pathway については既に Götze ら²⁰⁾が SIgA は C₃ を活性化すると報告しているところであり、従つていずれの pathway を介しても complement-dependent bacteriolysis が機能する可能性は推測し得るところである。Opsonin 作用については Wilson²¹⁾、Zipursky ら²²⁾が、ヒト初乳 SIgA で検討した成績はこれを否定するものであり、また Steele²³⁾ がマウスの腸液で検討した場合にも殆んど認め

Fig. 12 Relation between urinary SIgA level and the effect of SIgA concentration in vitro corresponding to urinary SIgA level on the number of bacteria adhered to an epithelial cell.

Fig. 13 Effect of IgG on adherence in normal controls

ていない。しかし Wernet ら²⁴⁾, Knop ら²⁵⁾が豚および家兎の初乳 SIgA を用いて検討した成績では opsonin 作用を認めている。

従来の免疫グロブリンの機能は多くの場合血管内あるいは組織内の環境が前提であろう。従つて外分泌液内で機能すると考えられる SIgA の場合には先の South¹²⁾の示した性状からもうかがえるようにその機能においても他の免疫グロブリンとは異なつたものを有していること

は充分推測されるところである。

1972年 Williams ら⁴⁾は口腔内に常在する5種の Streptococcus と buccal cell を in vitro で incubate した際 Parotid saliva から精製した SIgA が Streptococcus の buccal cell への附着を著明に阻止することを認めた。In vivo の実験では1969年 Freter²⁶⁾が家兎の Vibrio cholerae (以下 V. cholerae と略す)の実験腸管感染症において SIgA が主成分である coproantibody (糞便抗体)が、V. cholerae の腸管粘膜への附着を阻止する現象を認め、その後 Fubura ら²⁷⁾も V. cholerae でマウスを経口免疫した際の腸液中の SIgA が同様の作用を有する成績を示している。

一方尿路系については Parsons ら⁵⁾⁶⁾が家兎やヒト膀胱において粘膜表面に存在する mucin (mucopolysaccharide) が細菌の粘膜への附着に対して著明な附着阻止作用を有することを認め、同時にそれが分泌性のものであろうと推測している。現在までに得られている免疫組織学的所見では SIgA は内腔の粘膜表面にも認められており、従つてこの mucin 層内に SIgA が含まれていることも推測される。

今回著者らは先の Williams ら⁴⁾と同様の方法を用いて SIgA の機能について検討した。

Williams らの成績は *Streptococcus* と buccal cell という口腔内環境を前提としたものであるが、著者らは膀胱粘膜の上皮細胞と急性単純性膀胱炎患者尿から分離された *E. coli* (O-148) を用いる尿路系の条件下で検討を行なった。

また実験構成因子の中で Williams らと異なる点は彼らが口腔内常在菌である *Streptococcus* を用いたのに対して著者らは急性単純性膀胱炎の感染菌を用いた点である。

さて今回得られた成績についてみると尿路感染症の成立機作の観点から興味あるものが得られた。その1つは健康成人女子に比較して急性単純性膀胱炎の既往を有する女子の膀胱粘膜上皮細胞は今回用いた *E. coli* に対して易附着性であることである。健康成人女子の場合1個の上皮細胞に附着する *E. coli* は4~33個(平均18個, 正常範囲: 7~29個)であるが、急性単純性膀胱炎の既往を有する女子の場合には9~132個(44±26個)であり、明らかに附着数の増加が認められた。更にこれら症例の年齢あるいは急性単純性膀胱炎の既往頻度との強い関連傾向が認められた。

膀胱粘膜の上皮細胞を用いた成績は未だ少なく他の成績との比較は困難であるが、Källénus ら²⁸⁾, Fowler ら²⁹⁾は periurethral cell を用いて著者らと同様の実験を行ない、尿路感染症に罹患し易い女子では健康女子に比較してやはり細菌が著明に附着し易いことを認めている。また Parsons ら³⁰⁾も vaginal cell で同様の成績を得ている。

現在では多くの場合尿路感染症の感染菌が外尿道口から逆行性に尿路に侵入することは定説化されている。近年その bacterial source として periurethra および vagina の colonization が重視され、これらの部位における細菌の colonization と尿路感染症の発症は強い関連を有するとされている³¹⁾。従つて Källénus ら, Fowler ら, Parsons らの成績や著者らの得た成績から判断すると尿路感染症に罹患し易い女子の場合には健康成人女子に比較してより容易に感染成立へと進む環境が準備されていることが推測される。

一方 SIgA を添加した場合下部尿路感染症(急性単純性膀胱炎)既往群では附着数の減少が著明であつた。即ち SIgA 非添加時の附着数は9~132個(44±26個)であるが、200μg/dl の濃度では5~61個(25±11個)に減少し、健康成人女子における成績と比較するとその減少の程度にも有意に大きな差が認められた。しかし下部

尿路感染症既往群の 200μg/dl 添加時の附着数と健康成人女子の SIgA 非添加時のそれを比較すると、なお前者がやや多いことは注目すべきであろう。

一方 SIgA による細菌附着阻止作用の濃度依存性についてみると健康成人女子の上皮細胞の場合には Fig. 6 に見られる如く 100μg/dl の濃度ではその作用が発揮されるものとそうでないものが認められた。しかし 100μg/dl の濃度での *E. coli* 附着数と 200μg/dl でのそれを比較すると、附着数は後者の場合に有意に減少しているものの、200μg/dl と 2,000μg/dl の間には、ほとんど差を認めなかつた。一方下部尿路感染症群では 100μg/dl の濃度における附着数の検討は行なっていないが、200μg/dl と 2,000μg/dl の濃度間では附着数にはやはり大きな差を認めなかつた。このことは各例によつて異なることは十分に推測されるところであるが、SIgA による細菌附着阻止作用の発現にはある程度の高さの濃度(細菌附着阻止効果の発現濃度)の存在が必要であることを示唆しているものと考えられた。この点を検討するため患者から尿と膀胱粘膜の上皮細胞を同日時に採取し、尿中 SIgA 濃度を測定すると共に in vitro で作成した3段階の SIgA 濃度(100, 200, 300μg/dl)における附着阻止作用を検討した。

その結果は Fig. 12 に見られる如く 0~>100μg/dl の濃度であつた4例中3例では 100μg/dl の試験管内濃度で明らかな附着数の減少を認め、100~<200μg/dl の4例中2例は 200μg/dl の試験管内濃度で、また 200~300μg/dl の尿中 SIgA 濃度が得られた3例中2例は 300μg/dl の試験管内濃度で附着阻止作用が認められた。一方 0~>100μg/dl 群の1例(No. 3)は 300μg/dl の試験管内濃度でも附着数の減少は明らかでなかつたが、100~<200μg/dl 群の2例(No. 5, No. 6)は共に 300μg/dl の試験管内濃度では非添加時と比較すると附着数は減少しているものと判断される。以上の如く今回検討した11例中7例は尿中濃度に相当する試験管内 SIgA 濃度で明らかな附着阻止効果が認められ、更に他の2例でも試験管内の SIgA 濃度を上げることにより、*E. coli* の上皮細胞への附着数の減少がみられた。尿中 SIgA 濃度が採尿時間帯の尿量や SIgA 産生、分泌の日内変動や日差変動により大きく影響され得るものであることを考慮すると SIgA の細菌附着阻止作用の効果発現濃度は非感染時の尿中 SIgA 濃度附近にあることが示唆されているものと解釈される。

尿路感染症のみならず他の感染症においても侵入微生物

物が粘膜に附着することは感染成立過程において最も重要な step であることは明らかである。近年細菌の細胞への附着能を virulence の尺度として捉えようとする考えかたも試みられ、またその機作についても検討されて来ている。M-protein^{32) 33)} や Lipoteichoic acid⁴⁴⁾ (Streptococcus), K-antigen^{35) 36)} (E. coli) 等は比較的早くから附着との関連が報告されて来たが、最近 Ofek³⁷⁾ は mannose-specific antigen を、また Evans ら³⁸⁾ は surface-associated colonization antigen を報告している。また細菌の表面構造としては pili^{39) ~41)}, glycocalyx⁴²⁾ 等が報告され、特に pili については附着との関連が強調されているところである。一方上皮細胞については、その表面に mannose-receptor が存在することはほぼ確実視されているが^{37) 43)}、他に Mycoplasma に対しては neuramic acid-receptor⁴⁴⁾, V. cholerae に対しては fucose receptor⁴⁵⁾ 等が存在するとする報告も見られる。一方これら細菌と上皮細胞間の interaction についてみると Heckel ら⁴⁶⁾ は両者の各々の表面は共に negative charged の状態で electrostatic barrier を形成しており、この状態が崩壊した時に細菌は上皮細胞に附着するとし、その要因として pili を挙げている。また Eden³⁹⁾ は細菌の上皮細胞への附着には2段階あり、その第1段階は pili による可逆的な recognition phase であり、次いで細菌および上皮細胞の specific な adhesive factor の cooperation により強固な static binding へと進み附着の過程が完了するとしている。

現在までに明らかにされて来ているこのような機作の中で SIgA がどのような部位に、どのような作用をおよぼしているかは未だ明らかではない。先の Williams ら⁴⁾ は Streptococcus と buccal cell の interaction を検討した際 SIgA により凝集する Streptococcus に対する SIgA の附着阻止作用は著明であるが、そうでないものに対しては附着阻止作用も明らかでなかつたとしている。また Gibbons⁴⁷⁾ は彼の一連の実験成績から SIgA は細菌の surface antigen と特異的に反応して凝集させることにより附着阻止作用を示すのであろうとしている。一方 Eden ら⁴⁸⁾ は、腎盂腎炎尿中の specific SIgA を同一患者の感染菌から抽出したO抗原で吸収すると SIgA の細菌附着阻止能が著明に低下することから SIgA は感染菌のO抗原と特異的に反応して附着を阻止するのであろうとしている。これらはいずれも SIgA と細菌の間には免疫学的に特異な関係が存在することを指摘するものであるが Parsons ら⁵⁾ は細菌の上皮細胞への附着は

細菌の surface protein が上皮細胞表面の reciprocally charged protein と反応(結合)することにより生ずるとし、SIgA はその際の細菌側の binding site を neutralize することにより附着を阻止すると推測している。

今回著者が用いた SIgA は健康成人女子尿から精製したもので実験に供した E. coli (0-148) に対して非特異的であることは予備実験が示す通りである。しかし今回得られた著者らの成績では附着阻止作用が認められた。このことは SIgA の細菌附着阻止作用は必ずしも細菌に対して SIgA が特異的である必要はないことを示唆しているものと判断される。先にも述べた如く Parsons ら⁵⁾ は SIgA の細菌附着作用は細菌側の binding site を neutralize することにより発揮されるであろうと指摘しているが、同時に SIgA の感染菌に対する特異性は低く非感染時にその機能が発揮される性格であろうとしている。この見解は今回得られた著者らの成績を解釈するには、好都合であると共に、またもし SIgA が尿路における感染防禦機構の中で機能するとなれば極めて合目的的であるといえる。更に膀胱における感染防禦機構を理解する際にも興味のもたれるところである。即ち従来考えられて来た排尿による機械的な細菌排除機構も感染防禦面ではあくまで第2義的なものであり、第1義的には SIgA 等による侵入細菌の粘膜への附着阻止であらうと考えられる。

一方このような細菌附着阻止作用が SIgA のみに特異的なのか否かについてみると、Eden ら⁴⁷⁾ は腎盂腎炎患者尿中の IgG にも同様の作用が認められたとし、また Tramont⁴⁹⁾ らも vaginal secretion 中の SIgA について同様の報告をしている。更に Steele ら²⁰⁾ は V. cholerae のマウスにおける実験的腸管感染症において IgA, IgG および IgM のいずれもが細菌附着阻止能を有する可能性を示している。しかしこれらの IgG および IgM はいずれも感染菌に対して反応した特異的なものであり、今回の実験における SIgA (非特異的) とは性格が異なる。そこで著者らは SIgA を分離した同一人の血清から IgG を分離し SIgA の場合と同様の方法で IgA の細菌附着阻止能について検討した。その成績は Fig. 13 に見られる如く細菌附着阻止効果は明らかではなかつた。Parsons ら⁵⁾ は IgG は非感染時(即ち非特異的 IgG)には細菌附着阻止作用を示さないとしているが、著者らの成績もその推測を裏付けるものと云えよう。

結 語

健康成人女子(15例)および下部尿路感染症の既往を

有する成人女子(30例)の膀胱粘膜の上皮細胞を採取し、これで急性単純性膀胱炎患者尿から分離した *E. coli* (0—148)を用いて附着実験を行ない、*E. coli* の上皮細胞への附着におよぼす分泌型 IgA (SIgA) の作用を検討し以下の成績を得た。

1) 健康成人女子から採取した上皮細胞では1個の上皮細胞につき4—33個(平均18個, 正常範囲: 7—29個)の *E. coli* が附着し、SIgA を添加して200 μ g/dl の濃度にした場合には *E. coli* 附着数は2—25個(平均14個, 正常範囲: 5—23個)に減少した。(減少率: 22%)

2) 下部尿路感染症の既往を有する女子から採取した上皮細胞には、SIgA 非添加時9—132個(Mean $\pm$ 2SD: 44 $\pm$ 26個)の *E. coli* が附着し、健康成人女子に比較して著明に多く、正常範囲の附着数を示したものは10例(33.3%)であつた。また附着数と下部尿路感染症(急性単純膀胱炎)の既往頻度との関連についてみると、既往頻度が高くなるに伴ない附着数も増加する傾向が認められた。

一方 SIgA を添加して200 μ g/dl の濃度にした場合の附着数は5—61個(Mean $\pm$ 2SD: 25 $\pm$ 11個)に減少したが、SIgA 添加時の正常範囲の附着数を示したものは9例(30.0%)であつた。

3) 11例について尿中 SIgA 濃度を測定し、これに相当する試験管内 SIgA 濃度での *E. coli* の細菌附着阻止作用を検討した。その結果 SIgA の細菌附着阻止作用の発現頻度は非感染時の尿中 SIgA 濃度附近にあることが推測された。

4) 以上の成績から SIgA は少なくとも膀胱においては侵入細菌の粘膜への附着を阻止する作用を有することが推測され、またその作用は非特異的であつても発揮される可能性が推測された。

稿を終えるにあたり実験成績の推計学的処理について多大の御教示をいただいた市立砂川病院泌尿器科医長、田宮高宏博士に深く感謝いたします。また種々の御協力をいただいた教室員各位に深く感謝いたします。

本論文の要旨は第66回日本泌尿器科学会総会(昭和53年)において発表した。

文 献

- 1) Tomasi, T.B. Jr. Tan, E.M., Solomon, A. and Prendergast, R.A.: Characteristics of an immune system common to certain external secretions. *J. Exp. Med.*, **121**, 101—125, 1965.
- 2) 西尾 彰, 熊本悦明: 分泌 IgA 型に関する研究 I. 各種尿路感染症における分泌型 IgA の検討. 日泌尿会誌, 投稿中.
- 3) Arbuthnott, J.P. and Smyth, C.J.: Bacterial adhesion in host/Pathogen interactions in animals. in *Adhesion of microorganisms to surfaces*. Ellwood, D.C., Melling, J. and Putter, P., p. 165, Academic Press, New York, 1979.
- 4) Williams, R.C. and Gibbons, R.J.: Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A: a mechanism of antigen disposal. *Science*, **177**, 697—699, 1972.
- 5) Parsons, C.L., Greenspan, C. and Mulholland, S.G.: The primary antibacterial defense mechanism of the bladder. *Invest. Urol.*, **13**, 72—76, 1975.
- 6) Parsons, C.L., Greenspan, C., Moore, S.W. and Mulholland, S.G.: Role of surface mucin in primary antibacterial defense of bladder. *Urology*, **9**, 48—52, 1977.
- 7) Gibbons, R.J. and Houde, J.: Selective bacterial adherence to oral epithelial surfaces and its role as an ecological determinant. *Infect. Immun.*, **3**, 567—573, 1971.
- 8) 尾上 薫: DEAE-セルロースによるカラムクロマトグラフィー: IgG の精製法. 免疫実験操作法 A. p. 129, 日本免疫学会編, 1975.
- 9) Ebersole, J.L. and Molinari, J.A.: Specificity of secretory antibodies to bacterial immunogens. *Infect. Immun.*, **13**, 53—62, 1976.
- 10) 木村義民: 間接赤血球凝集反応. 臨免, **4**, 875—883, 1972.
- 11) King, D.W., Paulson, S.R., Puckett, N.L. and Krebs, A.T.: Cell death. IV. The effect of injury on the entrance of vital dye in Ehrlich tumor cells. *Am. J. Path.*, **35**, 1067—1079, 1959.
- 12) South, M.A., Cooper, M.D., Hong, R. and Good, R.A.: The IgA antibody system. *Topic in developmental biology*, **2**, 191—222, 1967.
- 13) 中尾 亨: ウイルス感染と局所免疫. 臨小児医学, **23**, 231—240, 1975.
- 14) Ganguly, R. and Waldman, R.H.: Local immunity and local immune responses. *Prog. Allergy*, **27**, 1—68, 1980.
- 15) Burdon, D.W.: The bactericidal action of immunoglobulin A. *J. Med. Microbiol.*, **6**, 131—139, 1973.
- 16) Hill, I.R. and Porter, P.: Studies of bactericidal activity to *Escherichia coli* of porcine serum and colostral immunoglobulins and the role of lysozyme with secretory IgA. *Immunology*,

- 26**, 1239—1250, 1974.
- 17) Adinolfi, M., Glynn, A.A., Lindsay, M. and Milne, C.M.: Serological properties of γ A antibodies to *Escherichia coli* present in human colostrum. *Immunology*, **10**, 517—520, 1966.
 - 18) Ishizaka, T., Ishizaka, K., Borsos, T. and Rapp, H.: C'I fixation by human isoagglutinins: Fixation of C'I by γ G and γ M but not by γ A antibody. *J. Immunol.*, **97**, 716—726, 1966.
 - 19) Iida, K., Fujita, T., Inai, S., Sasaki, M., Kato, T. and Kobayashi, K.: Complement fixing abilities of IgA myeloma proteins and their fragments: The activation of complement through the classical pathway. *Immunochimistry*, **13**, 747—752, 1976.
 - 20) Götze, O. and Müller-Eberhard, H.J.: The C3-activator system: An alternate pathway of complement activation. *J. Exp. Med.*, **134**, Suppl., 90s—180s, 1971.
 - 21) Wilson, I.D.: Studies on the opsonic activity of human secretory IgA using an in vitro phagocytosis system. *J. Immunol.*, **108**, 726—730, 1972.
 - 22) Zipursky, A., Brown, E.J. and Bienenstock, J.: Lack of opsonization potential of 11S human secretory γ A. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **142**, 181—184, 1973.
 - 23) Steele, E.J., Chaicumpa, W. and Rowley, D.: Isolation and biological properties of three classes of rabbit antibody to *Vibrio cholerae*. *J. Infect. Dis.*, **130**, 93—103, 1974.
 - 24) Wernet, P., Breu, H., Knop, J. and Rowley, D.: Antibacterial action of specific IgA and transport of IgM, IgA and IgG from serum into the small intestine. *J. Infect. Dis.*, **124**, 223—226, 1971.
 - 25) Knop, J., Breu, H., Wernet, P. and Rowley, D.: The relative antibacterial efficiency of IgM, IgG and IgA from pig colostrum. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **49**, 405—413, 1971.
 - 26) Freter, R.: Studies of the mechanism of action of intestinal antibody in experimental cholera. *Texas Reports on Biol. Med.*, **27**, Suppl., **1**, 299—316, 1969.
 - 27) Fubara, E.S. and Freter, R.: Protection against enteric bacterial infection by secretory IgA antibodies. *J. Immunol.*, **111**, 395—403, 1973.
 - 28) Källénius, G. and Winberg, J.: Bacterial adherence to periurethral epithelial cells in girls prone to urinary-tract infections. *Lancet*, **1**, 540—543, 1978.
 - 29) Fowler, J.E. Jr. Stamey, T.A.: Studies of introital colonization in women with recurrent urinary infections. VII. The role of bacterial adherence. *J. Urol.*, **117**, 472—476, 1977.
 - 30) Parsons, C.L. and Schmidt, J.D.: In vitro bacterial adherence to vaginal cells of normal and cystitis-prone women. *J. Urol.*, **123**, 184—187, 1980.
 - 31) Stamey, T.A.: The portal of bacterial entry. in *Urinary infections*. Stamey, T.A., pp. 87—123, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1974.
 - 32) Ellen, R.P. and Gibbons, R.J.: M protein-associated adherence of *Streptococcus pyogenes* to epithelial surfaces: Prerequisite for virulence. *Infect. Immun.*, **5**, 826—830, 1972.
 - 33) Ellen, R.P. and Gibbons, R.J.: Parameters affecting the adherence and tissue tropisms of *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.*, **9**, 85—91, 1974.
 - 34) Ofek, I., Beachey, E.H., Jefferson, W. and Campbell, G.L.: Cell membrane-binding properties of group A *Streptococcal* lipoteichoic acid. *J. Exp. Med.*, **141**, 990—1003, 1975.
 - 35) Wilson, M.R. and Hohmann, A.W.: Immunity to *Escherichia coli* in pigs: Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to isolated intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.*, **10**, 776—782, 1974.
 - 36) Uehling, D.T. and Balish, E.: Bacterial adherence to rat urothelium and K-antigen content. in *Infections of the Urinary Tract*. Kass, D.H. and Brumfitt, W., p. 81, The University of Chicago Press, Chicago & London, 1978.
 - 37) Ofek, I., Beachey, E.H. and Sharon, N.: Surface sugars of animal cells as determinants of recognition in bacterial adherence. *Trends Biochem. Sci.*, **3**, 159—160, 1978.
 - 38) Evans, D.G., Silver, R.P., Evans, D.J., Jr., Chase, D.G. and Gorbach, S.L.: Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans. *Infect. Immun.*, **12**, 656—667, 1975.
 - 39) Eden, C.S. and Hansson, H.A.: *Escherichia coli* pili as possible mediators of attachment to human urinary tract epithelial cells. *Infect. Immun.*, **21**, 229—237, 1978.
 - 40) Silverblatt, F.J. and Ofek, I.: Effects of pili on susceptibility of *Proteus mirabilis* to phagocytosis and on adherence to bladder cells. in *Infections of the Urinary Tract*, Kass, E.H. and Brumfitt, W., p. 49, The University of Chicago Press, Chicago & London, 1978.

- 41) Fader, R.C., Avots-Avotins, A.E. and Davis, C.P.: Evidence for pili-mediated adherence of *Klebsiella pneumoniae* to rat bladder epithelial cells in vitro. *Infect. Immun.*, **25**, 729—737, 1979.
- 42) Costerton, J.W., Geesey, G.G. and Cheng, K.J.: How bacteria stick. *Scientific American*, **238**, 86—95, 1978.
- 43) Ofek, I., Mirelman, D. and Sharon, N.: Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. *Nature*, **265**, 623—625, 1977.
- 44) Soberslavsky, P., Prescott, B. and Chanock, R.M.: Adsorption of mycoplasma pneumoniae to neuraminic acid receptors of various cells and possible role in virulence. *J. Bact.*, **96**, 695—705, 1968.
- 45) Jones, G.W. and Freter, R.: Adhesive properties of *Vibrio cholerae*: Nature of the interaction with isolated rabbit brush border membranes and human erythrocytes. *Infect. Immun.*, **14**, 240—245, 1976.
- 46) Heckels, J.E., Blackett, B., Everson, J.S. and Ward, M.E.: The influence of surface charge on the attachment of *Neisseria gonorrhoeae* to human cells. *J. Gen. Microbiol.*, **96**, 359—364, 1976.
- 47) Gibbons, R.J.: Bacterial adherence to mucosal surfaces and its inhibition by secretory antibodies. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **45**, 315—325, 1974.
- 48) Eden, C.S. and Svennerholm, A.M.: Secretory immunoglobulin A and G antibodies prevent adhesion of *Escherichia coli* to human urinary tract epithelial cells. *Infect. Immun.*, **22**, 790—797, 1978.
- 49) Tramont, E.C.: Inhibition of adherence of *Neisseria gonorrhoeae* by human genital secretions. *J. Clin. Invest.*, **59**, 117—124, 1977.

(1980年11月13日受付, 特別掲載)