尿路感染症分離菌の膀胱定着に関する研究

聖マリアンナ医科大学泌尿器科学教室 (主任: 岩本晃明教授)

柳 澤 直 子

ADHESIVE PROPERTIES OF BACTERIA ISOLATED FROM PATIENTS WITH URINARY TRACT INFECTION TO THE URINARY BLADDER

Naoko Yanagisawa

Department of Urology, St. Marianna University School of Medicine

(Director: Prof. T. Iwamoto)

(Background) Clinically isolated *Staphylococcus epidermidis* KK3-75, *Enterococcus faecalis* SMU-14, and *Escherichia coli* TF6-27 were subjected to test for bladder lodgments.

(Methods) Experimental cystitis on mice was investigated pathologically by light, confocal laser, and electron microscope after intravesical injection of cell suspensions of the strains. Bacterial affinities with bladder mucosal proteins and with extracellular components were detected by Western blot analysis.

(Results) Pathological findings of experimental cystitis revealed prominent infiltration of neutrophils except for those that were challenged with *Enterococcus faecalis* SMU-14. Capsule-like structures were demonstrated for the other two strains. Each strain showed histological tropism within the tissue sections, which correlated with the capability to bind the respective extracellular matrix components tested. Type I collagen bound only to cellular extracts of *Enterococcus faecalis* SMU-14 and *Escherichia coli* TF6-27, whereas fibronectin and type IV collagen bound only to those of *Staphylococcus epidermidis* KK3-75 and *Enterococcus faecalis* SMU-14. Bladder mucosal proteins had a variety of ability to bind cell surface proteins of each strain. Bacterial cell surface binding of all except for two of the bladder mucosal proteins detected was inhibited by extracellular matrix components.

(Conclusion) These experimental results suggest that the bacterial affinity of the bladder restricted by strain specific cell surface properties may be important for explanation in the difference of occurrence and progression of urinary tract infections caused by each strain.

Key words: experimental cystitis on mice, bacterial adherence, bladder proteins

要旨: (背景と目的) 臨床分離株である *Staphylococcus epidermidis* KK3-75株, *Enterococcus faecalis* SMU-14株, *Escherichia coli* TF6-27株を用い, 膀胱定着性の違いを検討した。

(対象と方法) マウス実験的膀胱炎は, 各菌液を経尿道的に接種して作製し, 病理組織像を光学顕微鏡, 共焦点レーザー顕微鏡および電子顕微鏡にて観察した。また, 菌体画分とマウス膀胱粘膜画分ならびに細胞外マトリックスの相互の結合性は Western blotting により検討した。

(結果) 実験的膀胱炎組織での炎症反応の程度は, *Enterococcus faecalis* SMU-14株の場合では他の2菌株の場合に比べて弱かった。*Staphylococcus epidermidis* KK3-75株, *Escherichia coli* TF6-27株には厚い英膜様構造が観察された。菌体のマウス膀胱組織における分布は, 各菌株で異なり, それぞれの菌体画分と細胞外マトリックスとの結合性の違いに相関した。すなわち, I型コラーゲンには *Enterococcus faecalis* SMU-14株, *Escherichia coli* TF6-27株, フィブロネクチン, IV型コラーゲンには *Staphylococcus epidermidis* KK3-75株, *Enterococcus faecalis* SMU-14株が結合性を示した。菌体の表層画分と膀胱粘膜画分との結合様式は, 各菌株により異なった。さらに各菌体表層画分の膀胱粘膜画分へ

の結合には、細胞外マトリックスにて阻害されるものを認めた。

(結論) これらの結果より、各菌株の膀胱組織への定着の差は、菌体表層の成分と膀胱粘膜面および細胞外マトリックスとの結合の違いに基づくことが示唆され、各菌株による尿路感染症の発症進展の違いに関与すると考えられる。

キーワード：マウス実験的膀胱炎、細菌の定着、膀胱蛋白

緒 言

細菌の臓器組織への定着は、感染の成立における重要な因子である。細菌の宿主臓器組織への定着は、細菌の菌体表層成分と宿主側レセプターとの関係で論じられている¹⁾。細菌の臓器組織への定着性を担う病原因子は、これまでにグラム陰性菌の線毛について多くの報告があり、宿主細胞の糖鎖を認識するといわれている²⁾。しかし、*Escherichia coli* (以下 *E. coli* と略) の P 線毛の宿主側レセプターである D-Gal α (1-4)-D-Gal を含む糖蛋白は腎に比して移行上皮では少ないことが知られており³⁾、疫学的に、急性膀胱炎で分離される *E. coli* の P 線毛保有率は急性腎盂腎炎の場合に比して低いことから、急性腎盂腎炎に対して、急性膀胱炎の成立には *E. coli* の P 線毛の関与は少ないのではないかと考えられている⁴⁾。

一方、尿路感染症の起因菌は多種にわたるが、急性単純性膀胱炎での菌種別分離頻度は *E. coli* が最も多く、グラム陽性菌では *Staphylococcus epidermidis* (以下 *S. epidermidis* と略) の分離頻度が高い⁵⁾。一方、複雑性尿路感染症の起因菌としてはグラム陽性菌とブドウ糖非発酵グラム陰性菌の分離頻度が高く、とくに *Enterococcus faecalis* (以下 *E. faecalis* と略) が検出されることが多い⁶⁾。しかしながら、尿路に対するグラム陽性菌菌体表層成分の定着因子について論じた報告は少ない。

近年、各種細菌の菌体表層の非線毛性成分と細胞外マトリックスとの蛋白相互結合が注目されるようになった⁷⁾。そこで、今回尿路感染症患者の尿由来 *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *E. coli* を用いて、菌株による膀胱定着性の相違を菌学的、形態学的ならびに生化学的立場から検討した。

材料および方法

1. 使用菌株

聖マリアンナ医科大学病院における急性膀胱炎患者の尿より分離された *S. epidermidis* KK3-75株, *E. faecalis* SMU-14株, *E. coli* TF6-27株を用いた。各菌株は, api-STAPH, api-STREP, API 同定キット (Montalieu, Vercieu, France) を用いて菌種の同定

を行った。

2. 使用動物

4 週齢, 体重18~20g の雄の DD 系マウス (日本クレア) を使用し, 免疫血清の作製には, 体重1.62~1.88 kg の雌の日本白色ウサギ (日本クレア) を用いた。

3. マウス上行性膀胱炎の作製

各菌株を brain heart infusion (以下 BHI と略, Difco) 液体培地30ml にて37°C18時間培養後, 冷却遠心機にて8,000×g・15分間遠心し, その沈渣を0.01M PBS pH 7.4に再浮遊させ, 光電比色計 (Model ANA-7B, 東京光電) にて420nm の波長で1.0OD に調整した。この細菌浮遊液は平板法による計測で, 1.33~2.93×10⁸CFU/ml の生菌数を含有していた。Schaeffer ら⁸⁾の方法により, マウスをネブタール (大日本製薬) 麻酔下で, 上記の調整菌液0.05ml を24G プラスチックカテーテルを用い, 経尿道的にマウス膀胱内に接種した。

4. マウス上行性膀胱炎における膀胱内の生菌数の測定

牧角⁹⁾の方法により, マウスを屠殺し, 膀胱を無菌的に摘出後, 重量を測定し, 滅菌生理的食塩水 (以下生食水と略) 1.0ml を加えてホモジェナイザーを用いて攪拌し, 均等浮遊液を作製, 同液を生食水にて10倍段階希釈した。希釈液はそれぞれマニット食塩培地 (BBL), EF 培地 (ニッスイ) およびマッコンキー培地 (栄研) を用いて培養し, 単位重量当たりの生菌数を算出した。菌接種28日後まで膀胱内における生菌数の消長を経日的に算定した。

5. マウス上行性膀胱炎組織の観察

1) 光学顕微鏡による観察

膀胱内の生菌数の測定と同様の方法で1群5匹のマウスを用いて上行性膀胱炎を作製し, 各菌株に対するコントロールとしては0.01M PBS pH 7.4を用いた。細菌浮遊液およびPBS接種2, 4, 6, 24時間, 3, 7, 14日後にマウスを屠殺, 膀胱を摘出し, 10%ホルマリン液で固定した。薄切標本は May-Grünwald-Giemsa 染色した。

2) 電子顕微鏡による観察

同一検体を電子顕微鏡にて観察するため、それぞれの検体の一部を2%グルタルアルデヒド液、オスミウム液で固定し、2%寒天に包埋した。アルコールにて脱水、プロピレンオキシドに封入、エポキシ樹脂に置換し、常法に従って切片を調整、電子顕微鏡 (JEOL, Model 100-B 日本電子, 東京) にて観察した。

3) 間接蛍光抗体法による観察

① 免疫ウサギ血清の作製

Yoshida ら¹⁰⁾の方法により、各菌株の加熱死菌ワクチンを調整、免疫ウサギ血清を作製した。*S. epidermidis* KK3-75株、*E. faecalis* SMU-14株、*E. coli* TF6-27株の生菌に対する各免疫ウサギ血清の凝集価はマイクロタイター法で256倍、1,024倍、512倍、死菌に対する凝集価は1,024倍、2,048倍、1,024倍であった。

② ウサギ IgG 抗体の作製

免疫ウサギ血清を Protein A-Sepharose CL-4B (Pharmacia) を用いたカラムクロマトグラフィーにて分離、0.01M PBS pH 7.4にて透析し、IgG (subclass 1, 2, 4) を精製した。

③ 間接蛍光抗体法での共焦点レーザー顕微鏡による観察

光学顕微鏡による観察と同一の薄切標本を10%ヤギ全血清で60分間ブロック後、各 IgG 抗体希釈液を一夜反応させた。0.01M PBS pH 7.4で洗浄後、fluorescein-5-isothiocyanate 標識抗ウサギ免疫グロブリン (Cappel Research Products, Organon Teknika) の50倍希釈液を30分間反応させた。0.01M PBS pH 7.4で5回洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM-GB200, Olympus) にて観察した。

6. 使用菌株の菌体表層疎水性の検討

Rosenberg ら¹¹⁾の方法により、菌体表層の疎水性は、菌体の水層からキシレン層への移行率として測定し、各菌株ごとに2回算出、その平均値を求めた。

7. 菌体画分の細胞外マトリックス結合性の検討

1) 菌体画分の調整

菌体画分の調整は、以下の3通りの方法で行った¹²⁾。Sodium dodecyl sulfate (以下 SDS と略) —mercaptoethanol による可溶化は、菌株を BHI 液体培地にて37°C18時間培養後0.01M PBS pH 7.4で洗浄した全菌体を2%SDS、5%2β-mercaptoethanol に添加、3分間加熱し、可溶化したものを0.45μm フィルター (Corning) で濾過滅菌した。Lysostaphin による抽出は、SDS-mercaptoethanol 抽出と同様に収集した菌体 1g wet weight に lysostaphin solution A (50mM

Tris-HCl pH 7.4, 0.14M NaCl, lysostaphin 1mg, DNase 2mg, 10mM *N*-ethylmaleimide, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (以下 PMSF と略)) 10ml を添加、37°C30分間インキュベーションし、さらに、lysostaphin 1mg を加え、2.5時間インキュベーションした。88°C20分間加熱にて酵素を非活化し、1,350×g・20分間冷却遠心、上清を0.45μm フィルターで濾過滅菌し、lysostaphin 抽出画分を得た。その沈渣は lysostaphin 非抽出画分として併せて実験に用いた。Lithium chloride (以下 LiCl と略) による抽出は、同様にして収集した菌体 1g wet weight を容量比10:1の1M LiCl pH 6.0に混合し、45°C 2時間インキュベーションした。3,600×g・15分間遠心、上清を0.45μm フィルターで濾過滅菌し、LiCl 抽出画分を得た。その沈渣は LiCl 非抽出画分として併せて実験に用いた。

2) Sulfo-*N*-hydroxysulfosuccinimide biotin 標識細胞外マトリックスの作製

細胞外マトリックスは、フィブロネクチン (fibronectin from human plasma, Sigma), IV型コラーゲン (type IV collagen from human placenta, コスモバイオ), ラミニン (laminin from Engelbreth-Holm-Swarm sarcoma, Sigma), I型コラーゲン (Vitrogen from bovine dermal collagen, Celtrix) を用いた。Gateman ら¹³⁾の方法により、各細胞外マトリックス100μg に1mM sulfo-*N*-hydroxysulfosuccinimide (以下 S-NHS と略)-biotin (BIO-RAD), modified PBS (10mM Na₂HPO₄·NaH₂PO₄, 130mM NaCl) pH 7.2 1.0ml を添加、室温で1時間インキュ

Fig. 1 Recovery of *S. epidermidis* KK3-75, *E. faecalis* SMU-14 and *E. coli* TF6-27 from bladders of mice after intravesical injection of 10⁷ CFU of the organisms.

Fig. 2 Ultra-thin sections of the bladder of mice 4 hours after intravesical injection of 10^7 CFU of the organisms. A, *S. epidermidis* KK3-75; B, *E. faecalis* SMU-14; C, *E. coli* TF6-27 (bar=1 μ m).

ーションした。その後、50mM Tris-HCl pH 7.5を加え、Sephadex G-25M (PD 10 column, Pharmacia)のカラムクロマトグラフィーに添加、modified PBSにて溶出し、ビオチン標識細胞外マトリックス (以下B-ECM と略) を得た。

3) 菌体画分とビオチン標識細胞外マトリックスの結合実験

菌体からの各種抽出画分は、Laemmli¹⁴⁾の方法によ

り7.5%polyacrylamide gelを用いてSDS-polyacrylamide gel electrophoresis (以下PAGEと略)を行い、Towbinら¹⁵⁾の方法によりpolyvinylidene difluoride membrane (以下PVDF-Mと略, Millipore)を用いてWestern blottingを行った。さらに、Gatemanら¹³⁾の方法により、PVDF-Mを1%bovine serum albumin (以下BSAと略)-PBSにて一夜4℃でブロックし、0.01M PBS pH 7.4で洗浄した。次に、PVDF-MをB-ECM 2mlに0.5%BSA-PBS 10mlを加えた溶液に入れ、室温で2時間インキュベーションした後、PBS-0.05%Tween 20で2時間洗浄、再度0.01M PBS pH 7.4で洗浄した。次いで、streptavidin-alkaline phosphatase conjugate (以下S-APaseと略, BIO-RAD) 2,000倍希釈液にて発色した菌体画分を観察した。また、同様にして各菌体画分のWestern blottingを行ったPVDF-MをCoomassie brilliant blue R-250 (以下CBBと略)にて染色した。また、分子量測定のためのマーカーとして、myosin (205kDa), β -galactosidase (140kDa), bovine serum albumin (83 kDa), carbonic anhydrase (45kDa), soybean trypsin inhibitor (32.6kDa), lysozyme (18kDa), aprotinin (7.5kDa) (Kaleidoscope prestained standards, BIO-RAD)を用いた。

8. 膀胱粘膜画分の菌体表層画分結合性の検討

1) 膀胱粘膜画分の調整

Fig. 3 Detection of strains by indirect immunofluorescence within bladders of mice 4 hours after intravesical injection of 10^7 CFU of the organisms. A, *S. epidermidis* KK3-75; B, *E. faecalis* SMU-14; C, *E. coli* TF6-27 (original magnification, $\times 200$).

膀胱粘膜層は、マウスを屠殺して膀胱を摘出し、0.01M PBS pH 7.4で洗浄後、倒立顕微鏡下に膀胱粘膜上皮層を可及的に切除、細切した。Paulson ら¹⁶⁾の方法に基づき、組織片を0.15M NaCl, 10mM EDTA, 0.05M Tris HCl pH 7.4, 0.5mM *N*-ethylmaleimide, 0.5mM PMSF に採取し、ホモジェナイズした。

2) ビオチン標識菌体表層画分の作製

López-Ribot ら¹⁷⁾の方法に基づき、SDS-

mercaptoethanol 抽出と同様に収集した菌体を100 mM phosphate buffer pH 8.0に接種し、その 10^8 CFU/ml と S-NHS-biotin 0.4mg/ml を室温で2時間インキュベーションした。8,000 $\times$ g・15分間遠心後、10mM *N*-ethylmaleimide, 1mM PMSF, 0.01M PBS pH 7.4 5ml を加え、氷槽冷却下で1分間超音波処理 (10kc) を行った後、3,000 $\times$ g・15分間遠心、上清を0.45 μ m フィルターで濾過滅菌し、ビオチン標識菌体表層画分 (以下 B-CCF と略) を得た。

3) 膀胱粘膜画分とビオチン標識菌体表層画分の結合実験

膀胱粘膜画分を、7.5%, 10%, 12.5% polyacrylamide gel を用いて SDS-PAGE を行い、PVDF-M に転写、1% BSA-PBS にて一夜4 $^{\circ}$ Cでブロックし、0.01M PBS pH 7.4で洗浄した。さらに、B-CCF 10 μ g, 0.5% BSA-PBS 5ml を添加し、室温で1時間インキュベーションした。PBS-0.05% Tween 20で2時間洗浄、再度0.01M PBS pH 7.4で洗浄した。S-APase 2,000倍希釈液にて発色した膀胱粘膜画分を観察した。また、同様にして膀胱粘膜画分の Western blotting を行った PVDF-M を CBB にて染色した。

4) 膀胱粘膜画分とビオチン標識菌体表層画分の結合に対する吸収実験

膀胱粘膜画分は、B-CCF 結合実験と同様にして、

Fig. 4 Distribution of cellular proteins of bacteria determined by Western blot analysis. A, *S. epidermidis* KK3-75; B, *E. faecalis* SMU-14; C, *E. coli* TF6-27. Lanes 1, Coomassie brilliant blue staining of bacterial protein extracts alone. Biotinylated extracellular matrix components with affinity between bacterial proteins: lanes 2, fibronectin; lanes 3, type IV collagen; lanes 4, laminin; lanes 5, type I collagen.

Western blotting 後ブロッキングを行った。B-CCF 10 μ g に非標識細胞外マトリックス50 μ g を添加し、37°C 1 時間インキュベーションした。さらに0.5%BSA-PBS 5ml を加えた溶液に PVDF-M を入れ、室温で1 時間インキュベーション、同様にして膀胱粘膜面分を発色した。

結 果

1. マウス上行性膀胱炎における膀胱内の生菌数の測定

S. epidermidis KK3-75株, *E. faecalis* SMU-14株, *E. coli* TF6-27株によるマウス実験的膀胱炎での膀胱内の生菌数は、菌接種21日後までの経過中、*E. coli* TF6-27株がもっとも多かった。*E. faecalis* SMU-14株は同様に21日後まで膀胱内に生菌が残存したが、*S. epidermidis* KK3-75株は21日後には消失していた (Fig. 1)。

2. 使用菌株の菌体表層疎水性の検討

菌体表層の疎水性の程度は、*S. epidermidis* KK3-75株は11%、*E. coli* TF6-27株は8%で親水性を示した。*E. faecalis* SMU-14株は89%で強い疎水性を示した。

3. 実験的膀胱炎の病理組織像の観察

1) 光学顕微鏡による観察

S. epidermidis KK3-75株, *E. faecalis* SMU-14株, *E. coli* TF6-27株の実験的膀胱炎を May-Grünwald-Giemsa 染色により観察すると、菌接種2時間後の膀

胱組織内に菌体は認めなかった。4時間後には、いずれの菌株の場合も、菌体は膀胱粘膜上皮層および粘膜下層にみられた。また、粘膜下層の菌体周囲に好中球浸潤を認めた。好中球浸潤の程度は、*S. epidermidis* KK3-75株, *E. coli* TF6-27株の場合に比べ、*E. faecalis* SMU-14株の場合は軽度であった。なお、コントロールとしてPBS を接種した膀胱組織には炎症所見は認めなかった。以後3日まで、3菌株ともに粘膜上皮層および粘膜下層の菌数は減少したが、7日後には、粘膜下層の菌数が再び増加した。いずれの菌株の場合も14日後には、組織内の菌数および炎症所見は減少し、粘膜下層に線維組織が増生した。

2) 電子顕微鏡による観察

膀胱組織内の菌体を、菌接種4時間後に観察した。各菌株の菌体外層には、電子密度のない莢膜多糖体様 halo が観察された (Fig. 2)。その厚さは、*S. epidermidis* KK3-75株は200~800nm、*E. coli* TF6-27株は約400nm であり、*E. faecalis* SMU-14株は約200nm で比較的薄い halo が認められた。

3) 間接蛍光抗体法での共焦点レーザー顕微鏡による観察

菌体の膀胱組織内分布を、菌接種4時間後に観察した (Fig. 3)。菌体は、3菌株ともに膀胱粘膜上皮層、粘膜下層の結合組織に沿って分布した。組織内の菌数は、3菌株ともに粘膜上皮層に比して粘膜下層に多

Fig. 5 Distribution of bladder mucosal proteins of mice separated by SDS-PAGE on 10% polyacrylamide gels and determined by Western blot analysis. Cont., Coomassie brilliant blue staining of bladder mucosal proteins as control to the following affinity experiments. Biotinylated bacterial cell surface extracts with affinity between bladder mucosal proteins: A, *S. epidermidis* KK3-75; B, *E. faecalis* SMU-14; C, *E. coli* TF6-27. Lanes 1, biotinylated bacterial cell surface extracts alone. Unlabelled extracellular matrix components subjected to absorb cell surface proteins of each strain: lanes 2, fibronectin; lanes 3, type IV collagen; lanes 4, laminin; lanes 5, type I collagen.

かった。さらに、3菌株では、膀胱定着の様式が異なっていた。*S. epidermidis* KK3-75株は粘膜下層の結合組織にびまん性に分布したが、*E. faecalis* SMU-14株、*E. coli* TF6-27株は粘膜下層の浅層では密に、深層では疎で網目様に分布した。さらに、*E. faecalis* SMU-14株では粘膜上皮層直下の結合組織に濃密に定着した。なお、強拡大による粘膜上皮層の観察では、3菌株ともに、菌体は粘膜上皮内腔面、粘膜上皮細胞間隙および粘膜の基底膜に分布した。

4. 菌体画分とビオチン標識細胞外マトリックスの結合実験

各菌株が結合組織へ定着することに注目し、その構成成分である各種細胞外マトリックスと菌体画分の結合実験を行った。各菌株の菌体画分は、Western blottingのCBB染色により観察すると、菌株により異なる複数の蛋白から構成されていた (Fig. 4, lanes 1)。これらの菌体画分の細胞外マトリックスの結合性は、3菌株で異なった (Fig. 4, lanes 2, 3, 4, 5)。すなわち、*S. epidermidis* KK3-75株はフィブロネクチン、IV型コラーゲン、ラミニン、*E. faecalis* SMU-14株はフィブロネクチン、IV型コラーゲン、ラミニン、I型コラーゲン、*E. coli* TF6-27株はラミニン、I型コラーゲンと結合した。各菌株の菌体画分で、細胞外マトリックスと結合した主な菌体蛋白の分子量は、*S. epidermidis* KK3-75株では135kDa、*E. faecalis* SMU-14株

では130kDa、*E. coli* TF6-27株では38kDaであった。なお、これらの蛋白は、*S. epidermidis* KK3-75株と *E. faecalis* SMU-14株では、SDS-mercaptoethanol および LiCl により抽出されたが、lysostaphin にて抽出されず、*E. coli* TF6-27株では、いずれもの方法で抽出された。

5. 膀胱粘膜画分とビオチン標識菌体表層画分の結合実験および結合に対する吸収実験

膀胱粘膜画分は、コントロールとして Western blotting を CBB 染色にて観察すると、複数の蛋白から構成されていた (Fig. 5, cont.)。この膀胱粘膜画分に、ビオチン標識した菌体表層画分を結合した。膀胱粘膜を10%polyacrylamide gelを用いて分離すると (Fig. 5, lanes 1)、3菌株は、膀胱粘膜の115, 72, 40, 38, 36, 30kDa蛋白に、共通して結合した。さらに、*E. coli* TF6-27株は、膀胱粘膜の130, 95, 83kDa蛋白と結合した。なお、膀胱粘膜画分を12.5%polyacrylamide gelを用いて分離した場合には、3菌株は膀胱粘膜の24 kDa蛋白にも結合し、*E. faecalis* SMU-14株と *E. coli* TF6-27株はさらに膀胱粘膜の20, 16, 11kDa蛋白と結合した。

各菌株を非標識細胞外マトリックスにて前処理し、菌体表層の細胞外マトリックス結合蛋白を吸収した (Fig. 5)。なお、菌体画分とビオチン標識細胞外マトリックスの結合実験 (Fig. 4) にて、I型コラーゲンは

S. epidermidis KK3-75株に結合せず、フィブロネクチン、IV型コラーゲンは *E. coli* TF6-27株に結合しなかった。この結果に基づき、*S. epidermidis* KK3-75株の菌体表層の吸収にはフィブロネクチン、IV型コラーゲン、ラミニン (Fig. 5.A, lanes 2, 3, 4), *E. faecalis* SMU-14株にはフィブロネクチン、IV型コラーゲン、ラミニン、I型コラーゲン (Fig. 5.B, lanes 2, 3, 4, 5), *E. coli* TF6-27株にはラミニン、I型コラーゲン (Fig. 5.C, lanes 4, 5) を使用した。これらの非標識細胞外マトリックスにて吸収した3菌株の菌体表層画分は、膀胱粘膜の115, 72kDa 蛋白に結合した。その他の膀胱粘膜画分への菌体表層の結合は阻害された。

考 察

細菌の臓器組織への定着性は、細菌側の定着因子と、宿主側のレセプターの相互作用により決まると考えられている。最初に、マウス実験的膀胱炎における膀胱内の生菌数の動きから各種細菌の定着性をみた結果、Fig. 1に示すように各菌株によって異なり、*S. epidermidis* KK3-75株は、3菌株中もっとも早期に膀胱内より消退し、本菌種による急性単純性膀胱炎の臨床像は遷延するものが少ないとの黒坂ら¹⁸⁾の報告を裏付けられる。一方、マウス実験的膀胱炎の病理組織像を観察すると、各菌株により惹起される炎症反応の程度に差がみられた。すなわち、*S. epidermidis* KK3-75株、*E. coli* TF6-27株に比べ、*E. faecalis* SMU-14株の場合は好中球浸潤が軽度であった。これは、*E. faecalis* と *E. coli* によるマウス実験的腎盂腎炎で腎組織像を比較した尾花ら¹⁹⁾の報告と同様である。これらの結果は、*E. faecalis* による尿路感染症では、臨床症状が *E. coli* による場合よりも軽度であるという Felmingham ら²⁰⁾の報告と関連するものと思われる。

電子顕微鏡による観察では、3菌株の菌体外層には、莢膜多糖体様の電子密度のない halo が観察され、その大きさは、*S. epidermidis* KK3-75株、*E. coli* TF6-27株で厚かった。一方 *E. faecalis* SMU-14株では、莢膜様構造は薄く、さらに、膀胱への定着は長期間にみられたことから、この菌株の抗食菌作用は莢膜様構造の産生性のみによらないことが推測される²¹⁾。一方、Svanborg-Edén ら²²⁾は、*E. coli* において親水性株は莢膜抗原を有し、親水性株の病原性は抗食菌作用に起因すると報告している。Reifsteck ら²³⁾は *Staphylococcus* 属において親水性株の多くが莢膜を保有することを認めており、菌体の親水性による定着病原性は菌体表層成分に依存するものと考えられている。菌体表層の疎

水性を観察すると、*S. epidermidis* KK3-75株、*E. coli* TF6-27株は親水性を示し、*E. faecalis* SMU-14株は強い疎水性を示し、菌体表層の親水性は莢膜様構造の大小と関連した。

細菌の尿路への定着因子として、*E. coli* では線毛が急性腎盂腎炎の成立に関与することが知られている。数ある線毛のうち、P線毛とI型線毛はヒト腎尿管上皮に定着する。しかし、これらの線毛の膀胱上皮への定着は腎尿管上皮への定着と比べて少ないことが報告されている²⁴⁾。この組織特異的な定着は、2種類の線毛に対するレセプターの組織内における局在の相違に基づくものと考えられ、宿主組織内のレセプターの同定は、細菌の組織病原性の理解に不可欠であることを示唆している。そこで、細菌を結合する膀胱内のレセプターについて、菌株による比較を行った。細菌に対する定着因子の組織内局在を明らかにする手法として、Korhonen ら²⁴⁾は、菌株に対する抗体を用いた間接蛍光抗体法がもっとも適しているとしているが、今回は各菌株に対して免疫ウサギ血清からIgG抗体を精製し、間接蛍光抗体法により共焦点レーザー顕微鏡で実験的膀胱炎組織を観察することにより、菌体の組織内における定着の部位が鮮明となった (Fig. 3)。菌体は膀胱内接種4時間後に、膀胱粘膜上皮層、粘膜下層の結合組織および粘膜の基底膜に定着した。菌体が膀胱との接触後、早期に基底膜より下層まで侵入する現象は、*E. coli* によるマウス実験的膀胱炎で報告されているが²⁵⁾、同様の所見が3菌株においてみられた。この事実、細菌に対する膀胱組織側レセプターは、膀胱粘膜上皮、および結合組織の成分であることを示唆している。さらに、膀胱組織内における菌体の定着分布が3菌株で異なったことは、菌体と組織内成分との間に特異的なリガンドレセプター結合が存在し、レセプターの局在が菌株により異なることに基づくものと考えられる。

膀胱の細胞外マトリックスと各菌株との結合性を検討した。膀胱粘膜には、複数の細胞外マトリックスの存在が確認されており、膀胱粘膜の基底膜、粘膜下層の血管内皮の基底膜にはラミニン、IV型コラーゲンが線状に分布する²⁶⁾。フィブロネクチンは膀胱粘膜の基底膜と粘膜下層に分布し、基底膜と粘膜下層との間にネットワーク様構造を形成し²⁷⁾、I型コラーゲンは膀胱粘膜下層に存在する²⁸⁾。膀胱粘膜下層の浅層では、コラーゲン線維は緻密層を形成し、その深層では、疎で網目様に分布する²⁹⁾。Western blotting による細胞外

マトリックスと菌体画分の結合実験の結果 (Fig. 4), フィブロネクチンは, *S. epidermidis* KK3-75株と *E. faecalis* SMU-14株に結合した。菌体画分のフィブロネクチン結合性は, これらの菌株が膀胱粘膜の基底膜および粘膜下層に定着した組織所見と一致した。ラミニンは 3 菌株, IV 型コラーゲンは *S. epidermidis* KK3-75株と *E. faecalis* SMU-14株に結合し, 3 菌株ともに膀胱粘膜基底膜への定着性を有することを確認し得た。I 型コラーゲンは, *E. faecalis* SMU-14株と *E. coli* TF6-27株に結合し, 両菌株の実験的膀胱炎組織における粘膜下層浅層の密な定着の部位は, 膀胱粘膜のコラーゲン線維の分布と一致した。膀胱粘膜内の細胞外マトリックスが細菌の特異的なレセプターであることは, 細胞外マトリックスと各菌株の結合性と組織所見が一致したことから明らかである。

膀胱粘膜への各菌株の結合性を膀胱粘膜画分と菌体表層画分の結合実験により検討した (Fig. 5)。膀胱粘膜中に存在する複数の蛋白が細菌に対してレセプター活性を提供したが, 細菌の標的蛋白は菌株により相違があったことから, 菌体表層画分と膀胱粘膜画分の間に特異的な結合性が存在するものと考えられる。

次に, 菌体側の定着因子について検討した。細胞外マトリックスに結合した菌体蛋白は, LiCl にて抽出された。このことは, これらの蛋白が細胞表層に位置し, 細胞壁に強固に存在しているものではないことを示唆している¹²⁾。細胞外マトリックスに結合した *E. coli* TF6-27株の38kDa 蛋白は, LiCl および lysostaphin により抽出された。*S. epidermidis* KK3-75株の135 kDa 蛋白および *E. faecalis* SMU-14株の130kDa 蛋白は, lysostaphin にて抽出されなかったことから, *E. coli* TF6-27株と他の 2 菌株では, 細胞表層中の細胞外マトリックス結合蛋白の構造が異なるものと考えられる。

Fig. 4 に示したように, 各使用菌株とも複数の細胞外マトリックスに結合した。菌体の 1 つの蛋白が複数の細胞外マトリックスと細胞外マトリックス以外の宿主蛋白とも結合することはこれまでに知られており, 多機能性定着因子であると考えられている¹²⁾。そこで, 各菌株の細胞外マトリックス結合蛋白が, 膀胱粘膜画分とも結合する可能性を, 非標識細胞外マトリックスによる吸収実験にて検討した。その結果 (Fig. 5), 各菌株は, 非標識細胞外マトリックスにより菌体表層の結合蛋白を吸収すると, 膀胱粘膜の115, 72kDa 蛋白に結合し, この他の膀胱粘膜の蛋白との結合は阻害さ

れた。この阻害作用は, 菌体表層の細胞外マトリックスを結合する蛋白と, 膀胱粘膜画分を結合する蛋白が同一であり, 菌体表層蛋白に対する細胞外マトリックスとこの実験で吸収された膀胱粘膜画分との競合作用が考えられる。さらに, 菌体表層の細胞外マトリックスを結合する蛋白と, 膀胱粘膜画分を結合する蛋白が近接に位置するために生じた立体障害であったとも考えられる³⁰⁾。一方, 菌体の膀胱粘膜画分への結合には非標細胞外マトリックス処理により阻害されないものを認めたことから, 菌体表層の膀胱粘膜と結合する蛋白には, 細胞外マトリックスを認識する蛋白と同一ないしは近接した位置にあるものと, 細胞外マトリックス結合蛋白とは立体構造的に関連のない, 2 種類の膀胱粘膜結合蛋白があるのではないかと推測される。

以上の事実から, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *E. coli* の各菌株の膀胱定着には, 細菌側の細胞表層蛋白と膀胱内の細胞外マトリックスおよび膀胱粘膜蛋白との相互結合による機構が存在した。また, 各菌株により膀胱内の蛋白との結合性が異なったことは, 各菌株の細胞表層成分の相違に基づくものと示唆される。これらの成績から, 細菌と膀胱内の蛋白の特異的な結合は, 起因菌の違いによる膀胱炎の臨床像の相違を解明する上で重要であると考えられる。

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を賜りました岩本晃明主任教授ならびに長田尚夫客員教授に深謝いたします。また直接の御指導を賜りました本学微生物学教室嶋田甚五郎主任教授, 大友俊允助教授に感謝いたします。さらに, 本研究に御協力いただきました微生物学教室員の皆様に御礼申し上げます。

本論文の要旨は第84回日本泌尿器科学会総会, 第70回日本感染症学会総会, 第6回尿路感染症研究会において発表した。

文 献

- 1) Beachy, E.H.: Bacterial adherence: Adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J. Infect. Dis.*, **143**, 325—345, 1981.
- 2) Leffler, H. and Svanborg-Edén, C.: Glycolipid receptors for uropathogenic *Escherichia coli* on human erythrocytes and uroepithelial cells. *Infect. Immun.*, **34**, 920—929, 1981.
- 3) Breimer, M.E., Hansson, G.C. and Leffler, H.: The specific glycosphingolipid composition of human ureteral epithelial cells. *J. Biochem.*, **98**, 1169—1180, 1985.
- 4) Källenius, G., Möllby, R., Svensson, S.B., Helin,

- I., Hultberg, H., Cedergren, B. and Winberg, J.: Occurrence of P-fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infections. *Lancet*, **ii**, 1369—1372, 1981.
- 5) 川村研二, 森山 学, 中島千聰, 芝 延行, 喜久山明, 宮澤克人, 田中達朗, 池田龍介, 鈴木孝治, 津川龍三: 尿路感染症分離菌について—金沢医科大学病院泌尿器科における4年間の推移—。西日泌尿, **55**, 46—52, 1993.
 - 6) 石原 哲, 安田 満, 多田晃司, 米田尚生, 伊藤康久, 斉藤昭弘, 出口 隆, 栗山 学, 坂 義人, 河田幸道: 複雑性尿路感染症由来 *Enterococcus faecalis* の臨床的検討と薬剤感受性について。日治療誌, **43**, 451—456, 1995.
 - 7) Höök, M., Switalski, L.M., Wadström, T. and Lindberg, M.: Interactions of pathogenic microorganisms with fibronectin. in Fibronectin, Mosher, D. ed., p295—308, Academic Press, Inc., New York, 1989.
 - 8) Schaeffer, A.J., Schwan, W.R., Hultgren, S.J. and Duncan, J.L.: Relationship of type 1 pilus expression in *Escherichia coli* to ascending urinary tract infections in mice. *Infect. Immun.*, **55**, 373—380, 1987.
 - 9) 牧角和彦: 実験的尿路感染症に関する研究—*Staphylococcus epidermidis* によるマウス腎・膀胱内定着について—。日泌尿会誌, **84**, 1602—1610, 1993.
 - 10) Yoshida, K. and Ekstedt, R.D.: Antibody response to *Staphylococcus aureus* in rabbits: Sequence of immunoglobulin synthesis and its correlation with passive protection in mice. *J. Bacteriol.*, **96**, 1540—1545, 1968.
 - 11) Rosenberg, M., Gutnick, D. and Rosenberg, E.: Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.*, **9**, 29—33, 1980.
 - 12) McGavin, M.H., Krajewska-Pietrasik, D., Rydén, C. and Höök, M.: Identification of a *Staphylococcus aureus* extracellular matrix-binding protein with broad specificity. *Infect. Immun.*, **61**, 2479—2485, 1993.
 - 13) Gaterman, S. and Meyer, H.-G.W.: *Staphylococcus saprophyticus* hemagglutinin binds fibronectin. *Infect. Immun.*, **62**, 4556—4563, 1994.
 - 14) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, **227**, 680—685, 1970.
 - 15) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Produce and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.*, **76**, 4350—4354, 1979.
 - 16) Paulson, M., Aumailley, M., Deutzmann, R., Timpl, R., Beck, K. and Engel, J.: Laminin-nidogen complex. Extraction with chelating agents and structural characterization. *Eur. J. Biochem.*, **166**, 11—19, 1987.
 - 17) López-Ribot, J.-L. and Chaffin, W.L.: Binding of the extracellular matrix component entactin to *Candida albicans*. *Infect. Immun.*, **62**, 4564—4571, 1994.
 - 18) 黒坂公生: コアグラウゼ陰性ブドウ球菌(CNS)尿路感染症。日本臨牀, **44**, 2638—2643, 1986.
 - 19) 尾花芳樹, 西野武志: マウスを用いた *Enterococcus faecalis* の尿路感染性に関する研究。第2報。感染症誌, **65**, 442—446, 1991.
 - 20) Felmingham, D., Wilson, A.P.R., Quintana, A.I. and Grüneberg, R.N.: *Enterococcus* species in urinary tract infection. *Clin. Infect. Dis.*, **15**, 295—301, 1992.
 - 21) Jett, B.D., Huycke, M.M. and Gilmore, M.S.: Virulence of Enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.*, **7**, 462—478, 1994.
 - 22) Svanborg-Edén, C., Hagberg, L., Hull, R., Hull, S., Magnusson, K.-E. and Öhman, L.: Bacterial virulence versus host resistance in the urinary tracts of mice. *Infect. Immun.*, **55**, 1224—1232, 1987.
 - 23) Reifsteck, F., Wee, S. and Wilkinson, B.J.: Hydrophobicity — hydrophilicity of staphylococci. *J. Med. Microbiol.*, **24**, 65—73, 1987.
 - 24) Korhonen, T.K., Virkola, R., Westerlund, B., Holthöfer, H. and Parkkinen, J.: Tissue tropism of *Escherichia coli* adhesins in human extraintestinal infections. *Curr. Top. Microbiol. Immun.*, **151**, 115—127, 1990.
 - 25) 岡山 悟, 熊本悦明, 西尾 彰: 実験的膀胱炎の感染発症機序に関する研究。第1報。細菌侵入経過の分析。日泌尿会誌, **75**, 1380—1390, 1984.
 - 26) Wilson, C.B., Leopard, J., Nakamura, R.M., Cheresch, D.A., Stein, P.C. and Parsons, C.L.: Selective type IV collagen defects in the urothelial basement membrane in interstitial cystitis. *J. Urol.*, **154**, 1222—1226, 1995.
 - 27) Pode, D., Alon, Y., Horowitz, A.T., Vlodavsky, I. and Biran, S.: The mechanism of human bladder tumor implantation in an in vitro model. *J. Urol.*, **136**, 482—486, 1986.
 - 28) Ewalt, D.H., Howard, P.S., Blyth, B., Snyder, H. M. III, Duckett, J.W., Levin, R.M. and Macarak,

- E.J.: Is lamina propria matrix responsible for normal bladder compliance? J. Urol., **148**, 544—549, 1992.
- 29) Murakumo, M., Ushiki, T., Abe, K., Matsumura, K., Shinno, Y. and Koyanagi, T.: Three-dimensional arrangement of collagen and elastin fibers in the human urinary bladder: A scanning electron microscopic study. J. Urol., **154**, 251—256, 1995.
- 30) Sokurenko, E.V., Courtney, H.S., Abraham, S. N., Klemm, P. and Hasty, D.L.: Functional heterogeneity of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. Infect. Immun., **60**, 4709—4719, 1992.
(1995年5月1日受付, 10月7日受理)
-