

E. coli の尿路粘膜上皮細胞への付着能に対する抗生物質の影響

広瀬 崇興・岡山 悟・西尾 彰・熊本 悦明

札幌医科大学泌尿器科学教室

(主任：熊本悦明教授)

(昭和 56 年 3 月 12 日受付)

急性単純性膀胱炎尿から分離した *E. coli* と健康成人女子から採取した膀胱粘膜の上皮細胞を用いた付着実験において、抗生物質が、如何なる影響を及ぼすかについて検討した。抗生物質は、ABPC, CEX および GM を用いたが、いずれの抗生物質も明らかに *E. coli* の上皮細胞への付着能を低下させることを認めた。このような作用は、各抗生物質の *E. coli* に対する 1/2 MIC 濃度でも明らかに認められ、また、付着阻止作用は、抗生物質の濃度に比例して増強した。

尿路感染症の発症機序については、いろいろな立場から検討されているが、明確なことは、未だ解明されていないのが、現状である。基本的には、尿路に侵入した細菌が尿路粘膜に付着し、その後、colonization (定着)、組織内への invasion (侵入) を経て、発症に至ると考えられている。

その意味で、近年、尿路感染成立の初期段階として、細菌の粘膜細胞への付着が、盛んに検討されるとともに、一部では、その細菌の粘膜細胞への付着能力を、virulence factor の一つと考えているものもある^{1,2,3)}。

われわれは、すでに尿路へのカテーテル留置の有無や、尿中分泌型 IgA などの付着能への影響について検討してきたが^{4,5)}、今回、各種抗生物質が細菌の尿路粘膜上皮細胞への付着能に対して、いかなる影響を及ぼすかについて検討したので、報告する。

I. 実験材料

1. 試験菌

急性膀胱炎患者尿より分離された *E. coli* を Tryptose broth にて、37℃ 16 時間培養した後、5,000×g、20 分遠沈した。次いで 1/15 M の PBS (pH 7.3) にて遠沈洗浄した後、同液に再浮遊させ、10⁸ CFU/ml になるように調製した。ネガティブ染色による電子顕微鏡像では、pili が存在した (Fig. 1)。なお後に述べる抗生物質 (1/2, 1, 2 MIC) を 1 時間作用した後の観察でも、pili は、形態的に Control と比べ変化していなかった。

2. 尿路粘膜上皮細胞

尿路感染症の既応がなく薬剤を服用していない健康成人女子の中間尿を、50~100 ml 採取し、1,000×g、10 分間遠沈して、上皮細胞を採取し、次いで 1/15 M の PBS (pH 7.3) にて、3 回遠沈洗浄した後、付着実験に

供した。なお、事前にグラム染色を行ない、上皮細胞に細菌の付着がないことを確かめた。結局採取してから、3 時間以内に実験に供した。

3. 使用薬剤

Ampicillin (ABPC)

Cephalexin (CEX)

Gentamicin (GM)

II. 実験方法

上記、細菌液 (0.1 ml) と上皮細胞 (0.1 ml) とそれぞれの抗生物質 (0.1 ml) を混和し、pH 7.3 の PBS を加えて 1 ml とし、混和後の細菌数は、10⁸ CFU/ml、上皮細胞は 10⁵ 個/ml とし、抗生物質の濃度は、試験菌 *E. coli* に対し、それぞれ 0, 1/2 MIC, 1 MIC, 2 MIC (日本化学療法学会標準法 10⁸/ml 接種) になるように調製した。この混合液を 37℃、1 時間、静置培養した後、PBS にて 1,000×g 10 分間の遠沈洗浄を 4 回くり返し (free の細菌を除去した後)、この沈渣をグラム染色し、鏡検 (×1,000) した。Fig. 2 に走査電顕像、Fig. 3

Fig. 1

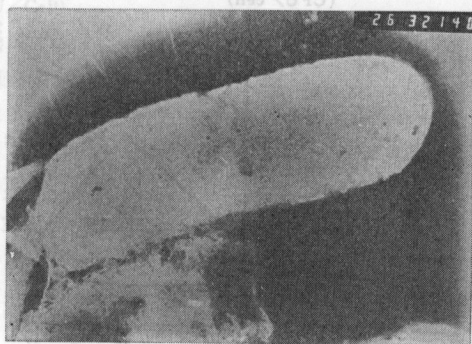
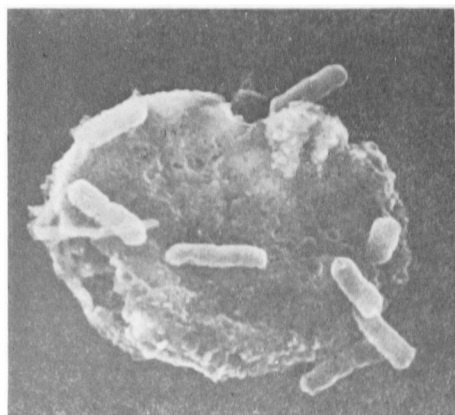


Fig. 2



に光顕像を示した。40個の上皮細胞に付着している細菌数を数え、その平均値をもって表わした。

III. 成 績

1. *E. coli* の上皮細胞付着条件の検討

本実験に入る前の予備検討として抗生物質非添加における *E. coli* の上皮細胞付着数に及ぼす影響について検討を行なった。

1) 菌数の差による付着数の変動

作用させる菌数を 10^6 , 10^7 , 10^8 CFU/ml とした場合の付着数の変化を Fig. 4 に示した。作用条件は 37°C , 1 時間である。3 検体で行なったがいずれの菌数でも、平均付着数には有意差がなく、この範囲の菌数では付着数への影響があまり大きくないことが、確かめられた。

Fig. 4 Relation between the number of viable *E. coli* and it's adhesion to the uroepithelial cells, these cells were obtained from three healthy subjects (37°C 1 hr.)

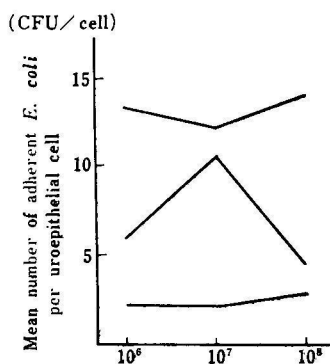
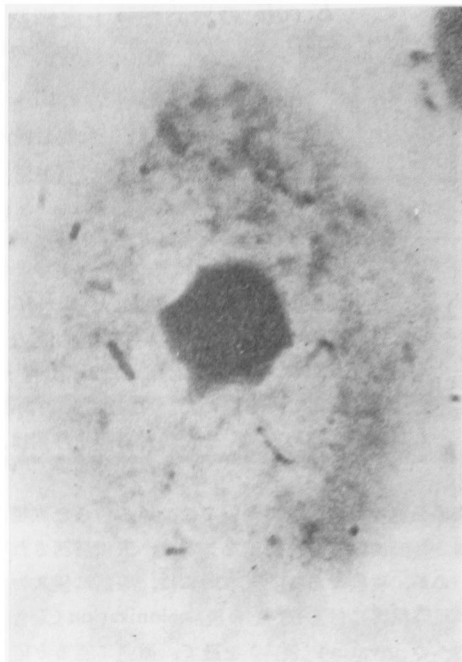


Fig. 3



2) 一定菌数における作用時間と薬剤濃度の検討

E. coli 数を一定 (10^8 CFU/ml) にして、ABPC を 0, 1/2 MIC, 1 MIC, 2 MIC の各濃度でそれぞれ 37°C , 1 時間作用させ、生菌数を測定した (Fig. 5)。いずれの場合でも、 10^8 CFU/ml レベルが保たれており、この作用時間内においては、各種薬剤濃度とも生菌数自体に著明な変動がないことが確認された。

Fig. 5 Relation between the number of viable *E. coli* and added ABPC concentration. *E. coli* was inoculated with ABPC for 1 hour

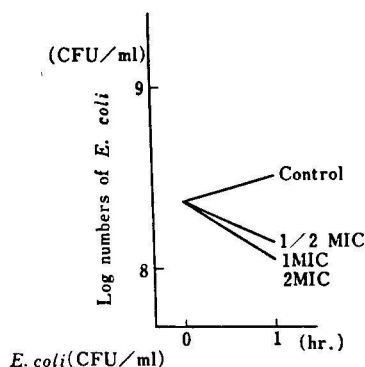
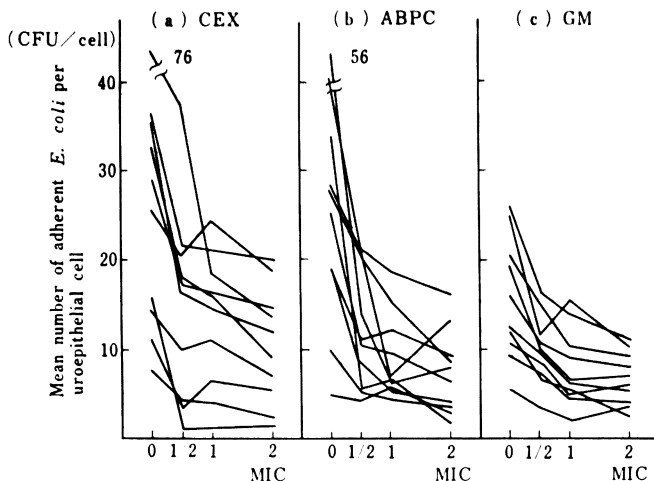


Fig.6 Effect of antibiotics on the adhesion of *E. coli* to epithelial cells obtained from urinary tract in ten healthy subjects (37°C, 1 hr.) MIC : 6.25 μ g/ml



2. *E. coli* の上皮細胞への付着における各種抗生物質の影響

“実験方法”の項で述べた手順にしたがい、ABPC, CEX, GM を用いて実験した。

1) CEX 作用時の *E. coli* 付着数の変化 (Fig. 6-a)
健康成人女子 10 人から採取した上皮細胞を使用し、10 検体で実験した。抗生物質非添加 (Control) には、10 検体平均で、一上皮細胞に 28 個の *E. coli* が付着した。1/2 MIC 作用では平均 15 個/cell, 1 MIC 作用では平均 13 個/cell, 2 MIC 作用では平均 11 個/cell となり、Control に比べ、明らかに付着数の減少が見られた。

2) ABPC 作用時の *E. coli* 付着数の変化 (Fig. 6-b)
Control では、平均 21 個/cell, 1/2 MIC 作用では平均 21 個/cell, 1 MIC 作用では平均 9 個/cell, 2 MIC 作用では平均 7 個/cell であり、やはり付着数減少が見られた。

3) GM 作用時の *E. coli* 付着数の変化 (Fig. 6-c)
Control では平均 16 個/cell, 1/2 MIC 作用では平均 10 個/cell, 1 MIC 作用では平均 8 個/cell, 2 MIC 作用では平均 7 個/cell であり、この場合も ABPC, CEX と同様に薬剤を作用させることによって、菌の付着数は著明に減少した。なお、はじめ上皮細胞と抗生物質 1/2 MIC を 1 時間作用させ、その後洗浄した上皮細胞を実験に供したが、*E. coli* の付着数は Control の上皮細胞への付着数と有意な差はみられなかった。

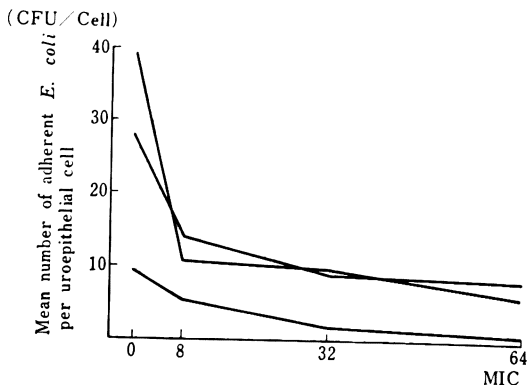
以上の成績から、抗生物質を作用させた場合の付着数減少は、上皮細胞に対する細菌 (*E. coli*) の付着機序

に、何らかの形で障害を及ぼしているためと推測することができる。

4) 高濃度の ABPC 存在下における菌付着数の変化
高濃度の薬剤下で上皮細胞への菌付着がどの程度まで減少するかを確かめるため、3 検体について ABPC を 64 MIC 濃度まで作用させてしらべた (Fig. 7)。

8 MIC 付近までは付着菌数の減少が増強され、それ以上の濃度では、ゆるやかなカーブで減少しており、ABPC の量と付着菌数減少との間には dose response が認められた。しかし、64 MIC の高濃度でも付着数は 0 にならず、わずかながら上皮細胞に付着した *E. coli* が認められた。

Fig. 7 Effect of high concentration (8, 32, 64 MIC) of ABPC on the adhesion of *E. coli* to epithelial cells obtained urinary tract three healthy subjects (37°C, 1 hr.)



IV. 考 察

上皮細胞への細菌付着実験に関しては、近年、いくつかの報告がみられる。

1970年代前半に GIBBONS ら⁹⁾が口腔粘膜細胞を使い、口腔内菌叢について検討したことから始まり、最近では、腸管粘膜細胞⁷⁾あるいは、尿路上皮細胞を用いて、腸炎あるいは尿路感染について種々の検討が行なわれるようになった。その目的は、多くの場合、細菌と生体から採取した粘膜上皮細胞の interaction を見るものであるが、感染症発症の機序を解析するために、頻用されるようになってきている。従来、抗菌剤の細胞に対する作用を検討する *in vitro* の方法としては、抗菌剤が細菌の増殖に及ぼす影響を観察し、一定の判定規準により表現する方法が用いられ、それらには、MIC, MBC などが頻用されている。また、*in vivo* では、各種の感染実験動物を用いた感染防御効果を ED₅₀ で表わすことが多い。

しかしながら、実験動物を用いた *in vivo* の方法は、その実験系の組み立てと施行が必ずしも簡単とはいえない。また、MIC, MBC 測定法は、抗菌剤が細菌の増殖自体に影響を及ぼした結果を表現したものである。また抗菌剤と細菌の interaction を顕微鏡的に観察することは、抗菌剤の抗菌作用を検討するうえでも重要であり、効果的であると考えられるが、その場合の目的は、多くの場合、形態的变化の観察とそれによる作用機作の推測にあると考えられる。

今回、著者が用いた本実験系は、抗菌剤の抗菌作用を細菌の機能的側面から検討することを目的としたもので、その特色は、第一に、その実験的な条件が生体から採取した粘膜の上皮細胞を直接用いることが可能であること、第二に、その抗菌剤の抗菌作用を増殖阻止に至らない時点でとらえることが可能であること、を実証し得たことである。さらに、この実験系の利点としては、簡便で特殊な器具や高度な技術を必要としないことなどが挙げられよう。

さて、本実験系において、影響を及ぼすと考えられる因子について、従来の報告から考察すると、上皮細胞については、個体差、種類、新鮮度(上皮細胞の viability)などが挙げられ、また、細菌に関するものとしては、細菌の種類、分離疾患、growth phase あるいは、細菌表面の pili の有無などが指摘され、さらに、実験に供する細菌の前培養に用いる培地も、少なからず影響するといわれている。一方、実験操作上の問題点としては、上皮細胞と細菌数の比、medium の種類、pH, incubation の条件(時間、温度)なども、考慮しなければならない。したがって、これらの諸条件についての検討も

慎重に扱う必要があるが、これらの点については、すでに報告⁹⁾している。今回の実験においては、すでに“実験方法”の項に述べたような条件を設定したが、本実験に供する上皮細胞は、同一人から頻回に採取することができなかった。したがって、抗生物質非添加時の Control での *E. coli* 付着数も、CEX の場合は平均 28 個/cell, ABPC の場合は 21 個/cell, GM の場合は 16 個/cell と変動することとなった。なお、健康成人女子の上皮細胞における付着数の日差変動について、われわれの既報告では、6~21% (14±7%) の成績を得ている。

細菌の上皮細胞に対する付着機序については、以前から pili が重要な役割を果たしているであろうことは推測されていたが、最近では、細菌側の表面抗原である、binding factor (ligand) と細胞側表面の receptor が分子的レベルで結合するといわれ、その ligand と receptor は、細菌の種類で異なるとされている。例えば、*Streptococcus*^{8,9)} の ligand は、lipoteichoic acid であり、receptor は明らかではない。*Vibrio*^{10,11)} の ligand ははっきりしないが、receptor は fucose といわれ、*Mycoplasma*^{12,13)} では ligand は不明だが、receptor は sialic acid といわれている。また、多くの *E. coli*^{14,15)} では ligand が lectin like substance であり、receptor は mannose であるとする報告が多い。しかし、Enterotoxigenic *E. coli*^{16,17,18)} についての最近の報告をみると、その ligand は、colonizing factor antigen (CFA) としているものもみられる。

このような ligand と receptor の結合機序において、抗生物質がどのような mechanism で、どこに作用を及ぼしているのかは、未だ明確にはされていない。例えば、EDEN ら¹⁹⁾は、ABPC の 1/4 MIC を *E. coli* に作用させたところ、付着能の低下を認めたが、その機序として、ABPC による *E. coli* の表面構造の変化にその原因を求めている。また、OFEK^{20,21)} は resting phase と logarithmic phase の *E. coli* に PC-G を作用させ、後者を用いた場合にのみ付着能の低下があったと報告し、その作用は、ligand の産生障害によるものだと述べている。しかし、aminoglycoside 系である SM の付着能低下作用の機序については、 β -lactam 系薬剤とは異なり、mRNA の misreading をひきおこすことによって、surface protein が aberrant protein に変化するためと説明している。

今回、われわれが用いた、 β -lactam 系抗生物質、ABPC, CEX および aminoglycoside 系抗生物質 GM の抗菌作用機序はそれぞれ異なるが、3 薬剤ともにほぼ同様の上皮細胞への付着能低下作用がみられ、またその

程度も、同じ MIC 間では差がみられなかったことは、興味ある結果であった。先に述べているように、*E. coli* に対するこの抗付着作用の発現濃度は MIC に比べ、かなり低いレベルにあると推測されているが、抗菌剤の抗菌作用の mechanism と関連して、さらに詳細な検討が必要であると考えられる。

文 献

- 1) CHABANON, G.; C. L. HARTLEY & M. H. RICHMOND: Adhesion to a human cell line by *Escherichia coli* strains isolated during urinary tract infections. *J. Clin. Microbiol.* 10: 563~566, 1979
- 2) FOWLER, J. E. JR. & T. A. STAMEY: Studies of introital colonization in women with recurrent urinary infections. VII. The role of bacterial adherence. *J. Urol.* 117: 472~476, 1977
- 3) SVANBORG-EDEN, C.; L. A. HANSON, U. JODAL, U. LINDBERG & A. SHOL AKERLUND: Variable adherence to normal human urinary-tract epithelial cells of *Escherichia coli* strains associated with various forms of urinary-tract infection. *Lancet* 2: 490~492, 1976
- 4) 熊本悦明: 第 67 回日本泌尿器科学会総会, シンポジウム. 留置カテーテルによる感染について. 東京, 1979
- 5) 西尾 彰, 広瀬崇興, 熊本悦明: 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. *日泌尿会誌*, 72: 4 号 1981 (掲載予定)
- 6) GIBBONS, R. J. & J. VAN HOUTE: Selective bacterial adherence to oral epithelial surface and its role as ecological determinant. *Infect. Immun.* 3: 567~573, 1971
- 7) ISAACSON, R. E.; P. C. FUSCO, C. C. BRINTON & H. W. MOON: *In vitro* adhesion of *Escherichia coli* to porcine small intestinal epithelial cells: Pili as adhesive factors. *Infect. Immun.* 21: 392~397, 1978
- 8) OFEK, I.; E. H. BEACHEY, W. JEFFERSON & G. L. CAMPBELL: Cell membrane-binding properties of group A streptococcal lipoteichoic acid. *J. Exp. Med.* 141: 990~1003, 1975
- 9) BEACHEY, E. H. & I. OFEK: Epithelial cell binding of group A *Streptococci* by lipoteichoic acid on fimbriae denuded of M protein. *J. Exp. Med.* 143: 759~771, 1976
- 10) JONES, G. W. & R. FRETER: Adhesive properties of *Vibrio cholerae*: Nature of the interaction with isolated rabbit brush border membranes and human erythrocytes. *Infect. Immun.* 14: 240~245, 1976
- 11) FINKELSTEIN, R. A.; M. ARITA, J. D. CLEMENTS, & E. T. NELSON: "Cholera Lectin": A hemagglutinative adhesive factor from *Vibrio cholerae* (abstra. B3), Annual meeting of the American Society of Microbiology May 14~19, 1978
- 12) BANAI, M.; I. KAHANE, S. RAZIN & W. BREDT: Adherence of *Mycoplasma gallisepticum* to human erythrocytes. *Infect. Immun.* 21: 365~372, 1978
- 13) GABRIDGE, M. G.; H. GUNDERSON, S. L. SCHAEFFER, & Y. D. BARDEN-STAHLL: Ciliated respiratory epithelial monolayers: new model for *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Infect. Immun.* 21: 333~336, 1978
- 14) OFEK, I.; D. MIRELMAN, & N. SHARON: Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. *Nature* 265: 623~625, 1977
- 15) OFEK, I. & E. H. BEACHEY: Mannose binding and epithelial cell adherence of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 22: 247~254, 1978
- 16) EVANS, D. G. & D. J. EVANS, JR.: New surface-associated heat-labile colonization factor antigen (CFA/II) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups 06 and 08. *Infect. Immun.* 21: 638~647, 1978
- 17) EVANS, D. G.; D. J. EVANS, JR., W. S. TJOA & H. L. DUPONT: Detection and characterization of colonization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea. *Infect. Immun.* 19: 727~736, 1977
- 18) EVANS, D. J. JR.; D. G. EVANS, L. S. YOUNG & J. PITT: Hemagglutination typing of *Escherichia coli*: definition of seven hemagglutination types. *J. Clin. Microbiol.* 12: 235~242, 1980
- 19) SVANBORG-EDEN, C.; T. SANDBERG, K. STENQVIST, & S. AHLSTEDT: Decrease in adhesion of *Escherichia coli* to human urinary tract epithelial cells *in vitro* by subinhibitory concentrations of ampicillin. *Infection* 6(Suppl. 1) 121~124, 1978
- 20) OFEK, I.; E. H. BEACHEY, B. I. EISENSTEIN, M. L. ALKAN, & N. SHARON: Suppression of bacterial adherence by subminimal inhibitory concentrations of β -lactam and aminoglycoside antibiotics. *Rev. Infect. Dis.* 832~837, 1979
- 21) EISENSTEIN, B. I.; I. OFEK, & E. H. BEACHEY: Interference with the mannose binding and epithelial cell adherence of *Escherichia coli* by sublethal concentrations of streptomycin. *J. Clin. Invest.* 63: 1219~1228, 1979

EFFECT OF ANTIBIOTIC CONCENTRATION ON ADHESION OF *E. COLI* TO UROEPITHELIAL CELLS

TAKAOKI HIROSE, SATORU OKAYAMA, AKIRA NISHIO and YOSHIAKI KUMAMOTO

Department of Urology, Sapporo Medical College

(Director : Prof. Y. KUMAMOTO)

An *in vitro* system with epithelial cells of the healthy female urinary tract and *E. coli* isolated from acute simple cystitis was used for the tests of the effect of antibiotics on bacterial adhesion.

By addition of 1/2, 1 and 2 MICs of ABPC, CEX and GM, the number of adhered *E. coli* per cell decreased and its effect was accelerated with antibiotic concentration. Its mechanism was unknown, but we suppose that antibiotics (β -lactam antibiotics and aminoglycoside antibiotic) affect the function of the surface protein which might be needed in adhesion.

Addition of a low concentration (1/2 MIC) of antibiotics to the medium resulted in a significant decrease of *E. coli* adhering to epithelial cells.

Each of the antibiotics (β -lactam and aminoglycoside), which has its own antibacterial mechanism, showed a similar tendency of decreasing the number of *E. coli* adhered to the epithelial cells.