

# 大腸菌性尿路感染症における大腸菌の諸抗原と臨床病型とくに vesicoureteral reflux との関係

小児腎疾患の進行阻止に関する研究

逆流性腎症と慢性腎盂腎炎の進行阻止に関する研究

牧 淳, 宮田 曠, 森口直彦, 片岡 知, 山本 隆, 道籬 巖,  
野上登志子

大腸菌の抗O-抗血清および抗K1-抗血清のポリクローナル抗体,ならびに pyelonephritis associated P-pili (PAP)に対するモノクローナル抗体を作成して大腸菌性尿路感染症患者分離菌の同定を行い,臨床病型との関連について検討した結果,上部尿路感染症の発症には特定のO, K1, PAPなどの抗原をもつ大腸菌が重要な役割をなしていることが推定された。しかし, vesicoureteral reflux (VUR)の有無と,分離大腸菌のこれら諸抗原の有無との間には有意な相関は認められなかった。

*Escherichia coli*, Pyelonephritis associated P-pili, Monoclonal antibody

## 【研究方法】

研究対象となった大腸菌は1984年5月から1988年3月までの間に近畿大学医学部附属病院小児科で加療を受けた尿路感染症患者77例の尿から検出されたものであり,対照としては現症にも既往にも腎疾患がみられず,検尿で大腸菌が contaminationとして検出された31例からの菌を用いた(表1)。尿路感染症の病型の診断基準は,表2のごとく, Kaijser<sup>1)</sup>のものを一部改変して用いた。大腸菌の検出・同定は既報<sup>2)</sup>のとおり行なった。大腸菌の抗O-, 抗K1-抗血清は,国立予防衛生研究所細菌第一部坂崎利一氏により血清型の同定を受けた患者分離菌<sup>3)</sup>を用い, Kaijser<sup>1)</sup>の方法にしたがって作成した。すなわち, 01, 02, 04, 06, 075に対する抗血清は,それぞれの抗原を有する大腸菌の加熱死菌で,抗K1-抗血清は075 K1(+)と075

K1(-)の大腸菌の生菌ならびにフォルマリン加熱死菌で家兔を免疫して作成した。このようにして作成した抗血清を用いた菌体凝集反応により大腸菌のO-, K1-抗原を検索した。pyelonephritis associated P-pili (PAP)<sup>4)</sup>に対する抗体は既報<sup>3)</sup>のPAP陽性の患者分離大腸菌06 H(-)K1(-)hemolysin(-)からPAPを精製し, PAIマウスミエロマ細胞を用いて作成したモノクローナル抗体(MoAb)<sup>2)</sup>を使用した。

## 【結果】

MoAb作成に使用したPAPの組成をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動分析した。結果は, MgCl<sub>2</sub>の粗抽出ではなお多数の蛋白バンドが認められたが, synsorb P1 affinity column chromatographyで精製したものは18 kDに単一バンドとして認められた(図1)。精製PAPを用いて作成した

近畿大学医学部小児科学教室

S. Maki, H. Miyata, N. Moriguchi, S. Kataoka, T. Yamamoto,  
I. Michihata, T. Nogami

Dept. of Pediatr. Kinki Univ. School of Medicine

MoAbは $\mu$ , K chain specific で、大腸菌のMgCl<sub>2</sub> 塩析法で得られた粗抽出 PAP とは Western blotting 法で 18 kD の部分で特異的に反応していた(図2)。

大腸菌の O 抗原では 01, 02, 04, 06, 075 をもつものの出現頻度は対照尿では 12.9% であったのに比べて、尿路感染症や無症候性菌尿では、これらの抗原をもった大腸菌が明らかに高率に認められた(表3)。大腸菌の K1 抗原は陽性を示した菌株数が少ないためにあまり明確な結果は得られなかったが、急性腎盂腎炎で対照に比べて有意の差 ( $P < 0.01$ ) で高い検出率が認められた(表4)。PAP 抗原を認めた大腸菌は急性腎盂腎炎で 62.5%, 慢性腎盂腎炎で 37.5% と明らかに対照群より高率に認められた(表5)。

したがって、小児の尿路感染症、とりわけ上部尿路感染症の発症には特定の O, K1 PAP などの抗原をもった大腸菌が重要な役割をなしていることが推察された。しかし、vesicoureteral reflux (VUR) の有無と、分離大腸菌のこれらの諸抗原の有無との関連を検討したが、両者には一定の関連は認められなかった。

#### 【考察】

近年、尿路感染症の起炎大腸菌の PAP と尿路粘膜細胞の receptor の関連が注目されつつある。しかし、PAP の検出に不可欠な人赤血球  $\bar{p}$  型は本邦では非常に稀な血液型に属する<sup>5)</sup> ために同定が困難である。著者らは PAP の精製をこころみ 18 kD の polypeptide を得たが、この値は Korhonen ら<sup>6)</sup>、Gander ら<sup>7)</sup>、Normark ら<sup>4)</sup> が報告した値、それぞれ 17 kD, 17.8 kD, 19.5 kD と近似していた。今回作成した抗 O-, 抗 K1-抗血清や PAP に対する MoAb を用いた大腸菌の抗原分析の結果では、尿路感染症患者では、これらの特定の抗原をもった菌が多く認められたが、この結果は従来からの nephropathogenic (あるいは pyelonephriti-

pathogenic) *E. coli* が存在するのではないかという報告<sup>8)</sup> とよく一致した結果であった。

一方、VUR は尿路感染症の慢性化との関連において重要な問題となっている。VUR の成因に関しては種々の機序が知られており<sup>9)</sup>、尿路感染症も VUR の成因の一つに挙げられている。しかし、今回の分離大腸菌の抗原検査からみると、尿路感染症が VUR の成因に占める割合はあまり大きなものではないと推察された。

#### 文献

- 1) Kaijser, B.: Immunology of *Escherichia coli*. *J. Inf. Dis.* 127: 670-677, 1973
- 2) 宮田 曠, 片岡 知, 森口直彦, 山本 隆, 道籬 巖, 野上登志子, 牧 淳: Pyelonephritis associated P-pili に対するモノクローナル抗体についての研究. *日児会誌* 93: in press, 1989
- 3) 宮田 曠, 片岡 知, 森口直彦, 山本 隆, 吉岡真由美, 宮崎裕美, 牧 淳: 尿路感染症から検出された *Escherichia coli* の諸抗原と臨床病型, *小児科臨床* 40: 257-262, 1989
- 4) Normark S., Lark D., Mull R., Morgren M., Båga M., O' Hanley P., Schoolnick G. and Falkow S.: Genetics of digalactoside-binding adhesin from uropathogenic *Escherichia coli* strain. *Inf. Immun.* 41: 942-949, 1983
- 5) 中島八郎: Rh 以外の主要な血液型の表現型, 遺伝子型, 反応および頻度: 症例を中心とした輸血検査. (伊藤忠一, 小島健一編) 金原出版, 東京, 1989, pp 231-235
- 6) Korhonen T. K., Nurmiaho E-L., Ranta H. and Edén C. S.: New

method for isolation of immunologically pure pili from Escherichia coli. Inf. Immun. 27:565-575, 1980

- 7) Gander R. M. and Thomas U. L. : Utilization of anion-exchange chromatography and monoclonal antibody to characterize multiple pilus types on a uropathogenic Escherichia coli O6 isolate. Inf.

Immun. 51:358-393, 1986

- 8) Neter E., Steinhart S., Calcagno P.L., Rubin M. I. : Urinary tract infection in children : Progress in Pyelonephritis (ed. Kass E.H.) F. A. Davis Company Philadelphia 1965, pp 129-134
- 9) 宮田 曠 : 小児尿路感染症の診断に関する臨床的, 血清学的研究. 日児学会誌 73:1685-1711, 1969

表 1. 研究対象ならびに対照例

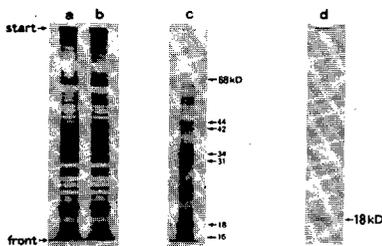
Acute Pyelonephritis	16
Chronic Pyelonephritis	16
Acute Cystitis	17
Probable Urinary Tract Infections	15
Asymptomatic Bacteriuria	13
Control	31

108

表 2. 尿路感染症の診断基準

UTIの臨床診断 (Kajserの基準一部改定)

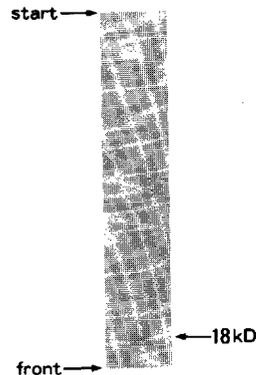
(A) acute pyelonephritis (APN)	(D) probable UTI (P-UTI)
菌量 ( $\geq 10^8$ CFU/ml)	(d-1) 腎生検で菌質に陽性検出
and	or
体温 ( $\geq 38.5^\circ\text{C}$ )	(d-2) 2週以上連続して $10^5$ CFU/ml
and	以下の菌量と膿尿
UTI既往 (-)	or
	(d-3) 抗生剤の投与で菌量, 膿尿が消失
(B) chronic pyelonephritis (CPN)	(E) asymptomatic bacteriuria (ABU)
菌量 ( $\geq 10^8$ CFU/ml)	菌量 ( $\geq 10^5$ CFU/ml) + (A), (B), (C), (D) に
and	あてはまらない
腎梗死	
and	
腎機能低下	
(C) acute cystitis (AC)	
菌量 ( $\geq 10^8$ CFU/ml)	
and	
菌量 ( $\geq 25$ WBC/HPE)	
(c-1) 体温 ( $< 38.5^\circ\text{C}$ )	
or	
(c-2) 赤血球 ( $< 25$ mm <sup>3</sup> /n)	
or	
(c-3) 膀胱刺激症状 (+)	
膿尿, 腎部痛 (-)	



SDS-PAGE analysis of the homogenate of the E. coli O6, H (-), K1 (-), hemolysin (-), and of the purified pilus preparations.

- (a) (b) the homogenate of the E. coli  $5 \times 10^8$  CFU.  
 (c) the crystallized fraction by exposure to 0.1M  $\text{MgCl}_2$ -buffer (120  $\mu\text{g}$  of proteins)  
 (d) the purified PAP fraction by column chromatography with Synsorb P<sub>1</sub> (20  $\mu\text{g}$  of proteins)  
 (a) (b) (c) (d) were stained with silver stain technique.

図 1. 精製 PAP の SDS-PAGE 像



Western blotting of the crystallized fraction by exposure to 0.1M  $\text{MgCl}_2$ -buffer stained with the MoAb and Anti-Mouse IgM Peroxydase

図 2. PAP に対する MoAb

表 3. 特異 O - 抗原の検出率

The relationship between the O-serotypes of Escherichia coli and the clinical diagnosis

Diagnosis	O-serotypes of E.coli		Not examined	Positive rate(%) of O-1,0-2,0-4,0-6,0-75 antigens of E.coli
	0-1,0-2,0-4,0-6,0-75	others		
Acute Pyelonephritis	8	7	1	50.0
Chronic Pyelonephritis	7	5	4	43.8
Acute Cystitis	4	7	6	23.5
Probable Urinary Tract Infections	11	4	0	73.3
Asymptomatic Bacteriuria	6	6	1	46.2
Control	4	25	2	12.9

\*1 p<0.01  
\*2 p<0.05

表 4. K 1 - 抗原の検出率

The relationship between the K<sub>1</sub>-antigen of Escherichia coli and the clinical diagnosis

Diagnosis	K <sub>1</sub> -antigen of E.coli		Not examined	Positive rate(%) of K <sub>1</sub> -antigen of E.coli
	positive	negative		
Acute Pyelonephritis	4	12	0	25.0
Chronic Pyelonephritis	2	13	1	12.5
Acute Cystitis	3	12	2	17.6
Probable Urinary Tract Infections	0	15	0	0
Asymptomatic Bacteriuria	0	15	0	0
Control	1	29	1	3.2

\* p<0.05

表 5. PAP 抗原の検出率

The relationship between the pyelonephritis associated P-antigen (PAP) of Escherichia coli and the clinical diagnosis

Diagnosis	PAP of E.coli		Positive rate(%) of the PAP of E.coli
	positive	negative	
Acute Pyelonephritis	10	6	62.5
Chronic Pyelonephritis	6	10	37.5
Acute Cystitis	3	14	17.6
Probable Urinary Tract Infections	1	14	6.7
Asymptomatic Bacteriuria	3	10	23.1
Control	3	28	9.7

\*1 p<0.01  
\*2 p<0.05



## 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



大腸菌の抗 O-抗血清および抗 K1-抗血清のポリクローナル抗体,ならびに pyelonephritis associated P-pili(PAP)に対するモノクローナル抗体を作成して大腸菌性尿路感染症患者分離菌の同定を行い臨床病型との関連について検討した結果,上部尿路感染症の発症には特定の O,K1,PAP などの抗原をもつ大腸菌が重要な役割をなしていることが推定された。しかし,vesicoureteral reflux(VUR)の有無と,分離大腸菌のこれら諸抗原の有無との間には有意な相関は認められなかった。