

〈原著〉

反復性尿路感染症由来大腸菌における反復メカニズムの解析

長谷川 洋¹⁾、眞野 容子²⁾、古谷 信彦^{1),2)}

Analysis of repetitive mechanism in *Escherichia coli* derived from repetitive urinary tract infection

Hiroshi Hasegawa¹⁾, Yoko Mano²⁾ and Nobuhiko Furuya^{1),2)}

Summary Urinary tract infections are caused by Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC), and mainly treated with new quinolone antibacterial drugs. However, half of contracted women experience relapse within a year. Approximately 80% of *E. coli* isolated from recurrent patients is caused by the same strain as *E. coli* which caused primary infection despite appropriate antibiotic treatment. However, since its mechanism is still unknown, we investigated drug susceptibility test and cell adhesion / invasion using human bladder epithelial cells (HTB-9) in order to explore factors of recurrence did. Three *E. coli* strains (BK1, BK2, BK3) derived from recurrent urinary tract infection and one *E. coli* K-12 (ATCC 10538) strain were used. In the drug susceptibility test, BK1 and BK3 showed resistance to new quinolone antibiotics. In addition, BK2 and K-12 showed sensitivity to all the drugs used. We investigated BK1, which had high drug resistance rate with *in vitro* bactericidal effect. In GM and CAZ it was sterilized by 24 hours, while CPFY showed no bactericidal effect. In the investigation of cell adhesion and invasion, it was revealed that K-12 had adhesion but no invasion. On the other hand, three *E. coli* strains derived from recurrent urinary tract infection had higher adhesiveness and more intracellular invasiveness than K-12. Therefore, it was suggested that UPEC invaded and latent in the cell, and the remaining bacteria were one of the factors of recurrence of urinary tract infection.

Key words: Urinary tract infection, UPEC, Cell adhesion, Cell invasion, Drug susceptibility test

¹⁾ 文京学院大学大学院 保健医療科学研究科

〒113-8668 東京都文京区向丘1-19-1

電話：03-3811-0441

E-mail：h.hasegawa1021@gmail.com

²⁾ 文京学院大学 保健医療技術学部 臨床検査学科

〒113-0023 東京都文京区向丘2-4-1

¹⁾ Graduate School of Health Care Science, Bunkyo

Gakuin University

19-1, Mukogaoka 1-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8668, Japan

²⁾ Department of Clinical Laboratory Medicine, Faculty of Health Science Technology, Bunkyo Gakuin University

4-1, Mukogaoka 2-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0023, Japan

受付日：2017年11月15日

採択日：2018年1月9日

I. 緒言

尿路感染症とは、腎臓、膀胱、尿管、尿道などの尿の排出経路に細菌が感染し炎症を起こす疾患であり、複雑性尿路感染症と単純性尿路感染症に分類される¹⁾。単純性尿路感染症は健常な女性が最も罹患し易い感染症で約50%の女性が一生の間に少なくとも1回は罹患するとされている²⁾。単純性尿路感染症の80%以上は大腸菌によって引き起こされる。治療の第一選択薬はニューキノロン系抗菌薬の投与であり、有効な治療がなされているにも関わらず、罹患した女性の25%が半年以内に、50%が1年以内に再発する³⁾。さらに再発患者から分離された約半数が初感染時に検出された菌と同一の大腸菌であることが報告されている^{4),5)}。近年では、世界中でニューキノロン系抗菌薬に耐性を示す大腸菌の増加が報告されている⁶⁾。単純性尿路感染症の患者から分離された大腸菌のうちニューキノロン系抗菌薬耐性率が20%以上である場合、または6か月以内にニューキノロン系抗菌薬の投与歴がある場合は第二選択薬の第三世代セフェム系抗菌薬の経口投与が推奨されている⁷⁾。また、欧米では尿路感染症の再発を予防するためにST合剤やニューキノロン系抗菌薬または、経口第三世代セフェム系抗菌薬の低用量での長期投与が行われている⁸⁾⁻¹⁰⁾。しかしながら我が国では口腔や膣などのカンジダ症や偽膜性大腸炎といった副作用や抗菌薬への耐性化が懸念されるため欧米での治療法が敬遠されている¹¹⁾。

大腸菌はヒトの正常腸内細菌叢を構成する菌の一種であるが、大腸菌の中でも尿路病原性大腸菌 (Uropathogenic *Escherichia coli*; UPEC) と呼ばれる一部の菌が、糞便より尿道および膣周辺組織に定着し、尿路を上行することで膀胱炎や腎盂腎炎などの尿路感染症を引き起こすとされている¹²⁾。従来、大腸菌には組織侵入性がないが、UPECには組織侵入性があり、抗菌薬の効果から逃れられているのではないかと推測されている¹³⁾。UPECは尿路に対する病原因子を持っており、それらは付着、侵入に関与するtype-1線毛や細胞毒性を持つ α -hemolysinの産生などがあげられる¹⁴⁾。また、type-1線毛はヒト膀胱上皮細胞のもつ構造を認識して付着する¹⁵⁾

との報告もあるが、細胞侵入性についての報告はほとんどない。

そこで我々は、尿路感染症再発の要因を探索するため、薬剤感受性試験とヒト膀胱上皮細胞株 (HTB-9) を用いた大腸菌の細胞付着性と侵入性について検討を実施した。

II. 方法と材料

1) 使用菌株と細胞

被検菌として6か月以内に2回以上、あるいは1年以内に3回以上尿路感染症の再発がみられた70～80歳代の健常女性から分離された反復性尿路感染症由来株*Escherichia coli* BK1、*E. coli* BK2、*E. coli* BK3、便由来で非病原性の*E. coli* K-12 (ATCC10538) を用いた。また、コントロールには標準株である*E. coli* ATCC25922を用いた。

細胞はヒト膀胱上皮細胞由来のATCC HTB-9を用いた。

2) 使用薬剤

Piperacillin (PIPC、東京化成工業、東京)、Ceftazidime (CAZ、東京化成工業、東京)、Cefazolin (CEZ、東京化成工業、東京)、Ceftriaxone (CTRX、Sigma、USA)、Gentamicin (GM、和光純薬工業株式会社、大阪)、Ciprofloxacin (CPFX、和光純薬工業株式会社、大阪)、Levofloxacin (LVFX、LKT Laboratories、USA) の7薬剤を用いた。

3) 薬剤感受性試験

米国の Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) のM100S-25¹⁶⁾ に準じた微量液体希釈法にて最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) を測定した。抗菌薬を調整したMueller Hinton Broth (日本ベクトンディッキンソン株式会社、東京) へMcFarland0.5 (1.5×10^8 CFU/mL) に調整した菌液をさらに100倍希釈 (1.5×10^6 CFU/mL) し、接種後35℃の好氣的条件下で18時間培養しMIC値を決定した。

4) *in vitro*での殺菌効果の検討

CAZとCTRXを除く他の薬剤に対して耐性を示したBK1を対象とし*in vitro*での殺菌効果の検討を実施した。使用細胞培養液は10%非動化済みウシ胎児血清 (10% FCS、Invitrogen Corporation、USA) 添加、4500 mg/Lグルコー

ス含有のRPMI-1640 (High-Glu) (和光純薬工業株式会社、大阪) を使用した。MIC以上に調整したGM (500 μ g/mL・250 μ g/mL)、CAZ (50 μ g/mL・25 μ g/mL)、CPFX (100 μ g/mL・50 μ g/mL) を加えた各細胞培養液4.5 mLに 1.5×10^8 CFU/mLに調整した菌液を0.5 mL接種し殺菌効果の検討を行った。培養3時間、6時間、24時間後に普通寒天培地を用いて生存菌数の測定を行った。

5) ヒト膀胱上皮細胞への付着性、侵入性の検討^{17) - 19)}

10% FCS添加RPMI-1640 (High-Glu) とHTB-9を24wellプレートに分注し、37°C、CO₂培養した。細胞数は約 4×10^4 /mLになるように調整した。約 4×10^4 /mL に調整したHTB-9を24wellプレートに1 mL接種し、37°C、48時間CO₂培養した。10% FCS入りRPMI-1640を捨て、FCS free RPMI-1640で3回洗浄、最後にFCS free RPMI-1640を900 μ L添加した。各wellに 1.5×10^8 CFU/mLに調整した菌液を100 μ L添加で、5時間反応させた。反応後の全菌数を確認するためLB agar を用いて算定を行った。リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline : PBS) を用いwell内を3回洗浄し、洗浄液中の菌数算定はLB agarを用いて行いHTB-9から剥離した菌数を算出し、細胞に付着、細胞に侵入した菌の残存率を求めた。

次に、*in vitro*での殺菌効果の検討からFCS free RPMI-1640で300 μ g/mLに調整したGMを洗浄したwellにそれぞれ1 mL添加後、24時間反応させ、HTB-9細胞周囲の菌を殺菌させた。反応後の上清中にすべての菌が殺菌されたことを

LB agarを用いて確認した。well内をPBS 1 mLで3回洗浄し、0.5%に調整したTriton X-100 (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社、東京) を添加、室温で20分間反応させ、HTB-9を破壊した後、LB agarを用いてHTB-9内に侵入した菌数の算定を行った。

6) ヒメネス染色による細胞内侵入性の検討

ヒト膀胱上皮細胞 (HTB-9) への付着性、侵入性の検討と同様の条件でBK1株と300 μ g/mLのGM含有FCS free RPMI-1640を添加し24時間培養した。培養液を除去しPBSで洗浄、メタノール固定後、染色を行った。染色方法は前染色として石炭酸フクシン緩衝液、対比染色として0.8%マラカイト緑液を用いた。染色後、光学顕微鏡での細胞の観察を行った。

III. 結果

1) 薬剤感受性試験

反復性尿路感染症由来株のうちBK1は、PIPC、CEZ、GM、LVFX、CPFXに耐性を示した。BK3はLVFX、CPFXに耐性を示したのに対し、K-12、BK2は全ての抗菌薬に対して感性を示した (Table 1)。

2) *in vitro*での殺菌効果の検討

薬剤感受性試験の結果より、BK1における薬剤耐性率が高かったためBK1に対する殺菌効果について薬剤濃度の違いを比較した。

GM、CAZにおいては低濃度、高濃度で24時間後に殺菌効果が認められた。CPFXにおいては低濃度、高濃度共に24時間後に殺菌効果が認められなかった (Fig. 1)。CPFXの高濃度はグ

Table 1 Drug susceptibility test by broth microdilution method.

	PIPC	CAZ	CEZ	GM	LVFX	CPFX	CTRX
ATCC	2	0.25	1	0.25	0.008	0.008	0.06
K-12	2(S)	0.25(S)	2(S)	0.25(S)	0.03(S)	0.015(S)	0.06(S)
BK1	512(R)	0.5(S)	4(R)	128(R)	≥ 4 (R)	≥ 2 (R)	0.125(S)
BK2	2(S)	0.25(S)	1(S)	1(S)	0.06(S)	0.03(S)	0.06(S)
BK3	1(S)	0.25(S)	2(S)	0.5(S)	≥ 4 (R)	≥ 2 (R)	0.05(S)

(μ g/mL)

S: susceptible, R: resistance

ラフ上では24時間後、菌数が0にプロットしているように見えるがわずかに菌が残存しており殺菌効果が認められたわけではない。

3) 膀胱上皮細胞への菌残存率の検討

洗浄一回目、二回目、三回目にカウントした菌の合計と洗浄前にカウントした全菌数から剥離菌数を求め、残存した菌を付着または侵入した菌として菌残存率を導きだした。反復性尿路感染症由来株はK-12株と比べ残存率が有意 ($p < 0.05$) に高かった (Fig. 2)。BK1、BK2、BK3では有意差が認められなかった。残存率が高いものほど細胞付着性または侵入性が高く、洗浄効果が乏しいことが明らかとなった。

4) 膀胱上皮細胞への侵入性の検討

非病原性のK-12と反復性尿路感染症由来株の侵入性の比較について検討を行った。細胞周囲の菌の死滅を確認し細胞を破壊後に侵入した菌数の算定を行った結果、K-12株では侵入菌は認められず、BK1、BK2、BK3では侵入菌が認められた (Fig. 3)。

5) ヒメネス染色による観察

HTB-9にBK1株を反応させた結果を示す (Fig. 4)。コントロールには認められないBK1株菌の侵入がHTB-9において認められた。

IV. 考察

近年ニューキノロン系抗菌薬耐性大腸菌の増加が問題となっているとの報告がある²⁰。本研究での薬剤感受性試験においても既報と同様に、反復性尿路感染症由来株の検討した菌数は少ないものの3株中2株が第一選択薬であるニューキノロン系抗菌薬に対して耐性を示した。UPECは他の大腸菌と比べ、ニューキノロン系抗菌薬に耐性を示す頻度が増加している可能性があるため、尿路感染症の再発を引き起こしている株の収集と薬剤感受性の動向を把握する必要があると考えられる。ニューキノロン系抗菌薬は組織浸透性が高いが、それに対し第二選択薬である第三世代セフェム系抗菌薬のCAZやア

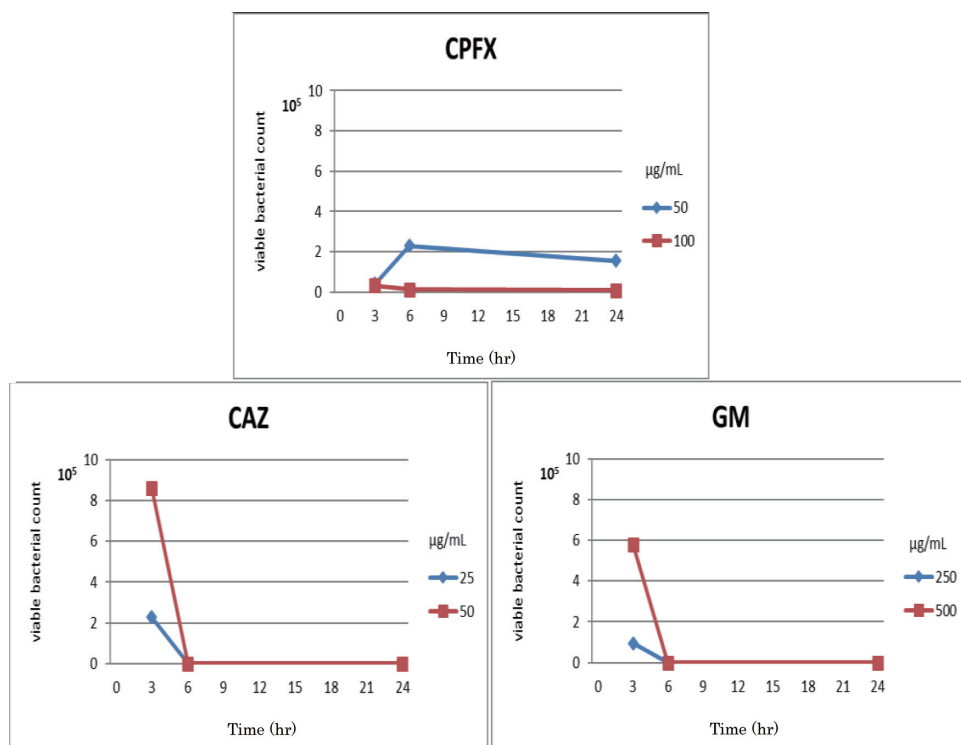


Fig. 1 Bactericidal action against BK1.

GM, CAZ were sterilized in 24 hours. On the other hand, CPFX was not sterilized in 24 hours.

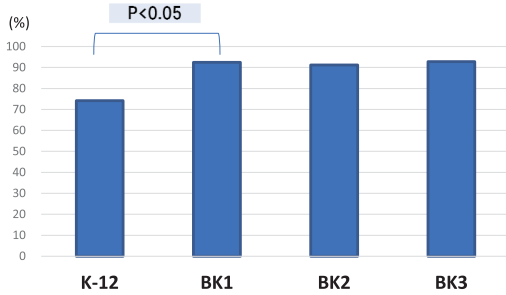


Fig. 2 Remaining rate.
BK1, BK2, BK3 remained significantly more than K-12.

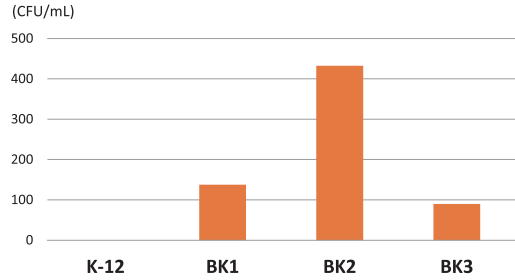


Fig. 3 Invasion assays.
After addition of Triton X-100, invasive bacteria were observed in BK1, BK2, BK3.

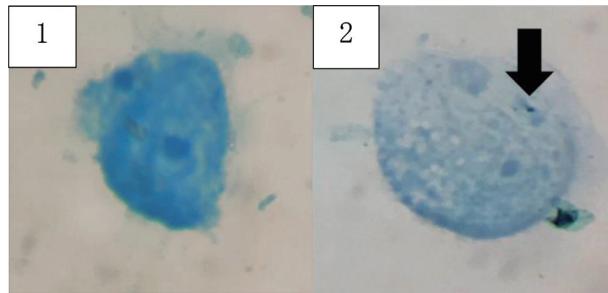


Fig. 4 Gimenez stain.
In BK1, invasion of bacteria not observed in the control was observed in the cells.
1: Control HTB-9 2: BK1 addition HTB-9

ミノグリコシド系抗菌薬のGMでは細胞内移行性が極めて低い抗菌薬であるためMIC値は感性を示している。このことからCAZやGMは細胞表面上の菌は殺菌できるものの、細胞内に移行した菌には薬効効果が乏しいものと考えられる。BK2ではニューキノロン系抗菌薬であるCPFXとLVFXに対して感性を示しているのにも関わらず尿路感染症の再発を起こしている菌株である。MIC値は感性でも肉眼的判定による静菌効果を調べている可能性があり、殺菌されているか否かは明らかでない。よってMIC値以下の薬剤濃度で最小殺菌濃度 (minimum bactericidal concentration; MBC) の確認が必要であると考えられた。

箱崎の報告²¹⁾によると尿路感染症由来大腸菌では付着性が高いことが論じられており本研究の結果でも反復性尿路感染症由来株では多くの付着、侵入による残存菌が認められた。非病原

性のK-12と比較すると有意に多く残存したことから付着性、侵入性と病原性との関連性が示唆される。加えて我々は細胞内に反復性尿路感染症由来株が侵入したことを明らかにした。細胞内に侵入した菌はオートファジーによって分解が起こる菌も存在するが、分解されず細胞外へと脱出する菌も存在する²²⁾。反復性尿路感染症由来株が細胞内で棲息できたのは特別な生存メカニズムを有していた可能性が考えられる。このことからUPECのメカニズムは膀胱上皮細胞内に侵入、潜伏し残存した菌が増殖することで尿路感染症を再発させる可能性を示唆した。つまり、細胞への付着、侵入を抑制することが可能であれば尿路感染症の再発を防げるかもしれない。今後は細胞内に残存した菌が再増殖するのか検討を行い既存の抗菌薬療法とは異なる着想をもとに治療戦略を執ることが課題であると考えられる。

文献

- 1) 山本新吾、石川清仁、速見浩士、中村匡宏、宮入 烈、星野 直、蓮井正史、田中一志、清田 浩、荒川創一: JAID/JSC 感染症治療ガイドライン 2015 —尿路感染症・男性性器感染症—. 日化療会誌, 64: 1-30, 2016.
- 2) Tan CW and Chlebicki MP: Urinary tract infections in adults. *Singapore Med J*, 57: 485-90, 2016.
- 3) Ejrnaes K, Stegger M, Reisner A, Ferry S, Monsen T, Holm SE, Lundgren B and Frimodt-Møller N: Characteristics of *Escherichia coli* causing persistence or relapse of urinary tract infections: phylogenetic groups, virulence factors and biofilm formation. *Virulence*, 2: 528-537, 2011.
- 4) Ejrnaes K, Sandvang D, Lundgren B, Ferry S, Holm S, Monsen T, Lundholm R and Frimodt-Møller N: Pulsed-field gel electrophoresis typing of *Escherichia coli* strains from samples collected before and after pivmecillinam or placebo treatment of uncomplicated community-acquired urinary tract infection in women. *J Clin Microbiol*, 44: 1776-1781, 2006.
- 5) Russo TA, Stapleton A, Wenderoth S, Hooton TM and Stamm WE: Chromosomal restriction fragment length polymorphism analysis of *Escherichia coli* strains causing recurrent urinary tract infections in young women. *J Infect Dis*, 172: 440-445, 1995.
- 6) 小倉健一、齊藤冬彦、鶴岡 全、齊藤生朗: 尿路感染症から分離された大腸菌のレボフロキサシン耐性と患者背景因子の解析. 日臨微生物誌, 18: 221-226, 2008.
- 7) Gilbert DN, Chambers HF, Elipoulos GM and Saag MS: *Kidney, Bladder, Prostate, The Sanford guide to antimicrobial therapy*, 44th edition, Antimicrobial Therapy. VA, 55-58, 2014.
- 8) Nickel JC: Practical management of recurrent urinary tract infections in premenopausal women. *Rev Urol*, 7: 11-17, 2005.
- 9) Mody L and Juthani-Mehta M: Urinary tract infections in older women: a clinical review. *JAMA*, 311: 844-854, 2014.
- 10) Barber AE, Norton JP, Spivak AM and Mulvey MA: Urinary tract infections: current and emerging management strategies. *Clin Infect Dis*, 57: 719-724, 2013.
- 11) Sumukadas D, Davey P and McMurdo ME: Recurrent urinary tract infections in older people: the role of cranberry products. *Age Ageing*, 38: 255-257, 2009.
- 12) Tiba MR, Yano T and Leite DS: Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 50: 255-260, 2008.
- 13) Andersen TE, Khandige S, Madelung M, Brewer J, Kolmos HJ and Møller-Jensen J: *Escherichia coli* uropathogenesis in vitro: Invasion, cellular escape, and secondary infection analyzed in a human bladder cell infection model. *Infect Immun*, 80: 1858-1867, 2012.
- 14) 高橋 聡、竹山 康: 尿路感染症の発症メカニズム. *Urology View*, 3: 8-10, 2005.
- 15) 小林直樹: タイプ1線毛保有大腸菌のレセプター認識能の多様性の解析. 岡山医誌, 104: 311-321, 1992.
- 16) CLSI: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 25th informational supplement. *J Clin Microbiol*, M100-S25, 2015.
- 17) Sahly H, Podschun R, Oelschlaeger TA, Greiwe M, Parolis H, Hasty D, Kekow J, Ullmann U, Ofek I and Sela S: Capsule impedes adhesion to and invasion of epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun*, 68: 6744-6749, 2000.
- 18) Cortés G1, Alvarez D, Saus C and Albertí S: Role of lung epithelial cells in defense against *Klebsiella pneumoniae* pneumonia. *Infect Immun*, 70: 1075-1080, 2002.
- 19) Struve C and Krogfelt KA: Role of capsule in *Klebsiella pneumoniae* virulence: lack of correlation between in vitro and in vivo studies. *FEMS Microbiol Lett*, 218: 149-154, 2003.
- 20) Moura A, Nicolau A, Hooton T and Azeredo J: Antibiotherapy and pathogenesis of uncomplicated UTI: difficult relationships. *J Appl Microbiol*, 106: 1779-1791, 2009.
- 21) 箱崎直人: 尿路感染症由来大腸菌の細胞付着能に関する研究. 日医大医学会誌, 52: 367-375, 1985.
- 22) Hoon JC, Kwon YT: Crosstalk and interplay between the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Mol Cells*, 40: 441-449, 2017.