

博士學位論文

尿路感染症起炎大腸菌の表現型と
大腸菌諸抗原の生体に及ぼす影響

近畿大学医学部
小児科学教室
森口直彦

博士

医乙

122

博士學位論文

尿路感染症起炎大腸菌の表現型と
大腸菌諸抗原の生体に及ぼす影響

平成 3 年 12 月

近畿大学医学部 小児科学教室

(指導：牧 淳教授)

森 口 直 彦

尿路感染症起炎大腸菌の表現型と 大腸菌諸抗原の生体に及ぼす影響

近畿大学医学部小児科学教室

森 口 直 彦

(指導：牧 淳 教授)

Antigenic phenotypes of *Escherichia coli* isolated
in urinary tract infections and the effect of these
antigens against host defense function

Naohiko Moriguchi

Department of Pediatrics, Kinki University School
of Medicine, Osaka, Japan

(Director: Prof. Sunao Maki)

ABSTRACT

We analyzed the relationship between the antigenic phenotypes of *E. coli* and clinical diagnosis, and the interaction between the bacterial antigens and host defense function. *E. coli* which possessed the O1 antigen were isolated more frequently from patients with acute and chronic pyelonephritis than from the normal controls ($p < 0.05$). K1 positive or P-fimbriae (P-f) positive *E. coli* were more frequently found in urine from patients with acute pyelonephritis than in the normal controls (either $p < 0.005$). *E. coli* which possessed the O1 antigen, tended to exhibit P-f.

Analysis of the immune bacteriolytic activities by normal pooled sera showed that the K 1 positive strains were more resistant than the standard strain. However, there was no relationship between the degree of the phagocytosed bacteria by normal polymorphonuclear leukocyte (PMN) and the kind of O- or K-antigen. To compare the stimulative activity of the bacterial antigens against the PMN's chemiluminescence (C.L.), various kinds of O antigen and K antigen were extracted from these *E. coli*. Antigen O 44, from the enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and O1 from the pyelonephritopathogenic strain stimulated normal PMN more significantly and showed a higher peak C.L. than the other kinds of O antigen ($p < 0.05$). Antigen K 74 from EPEC and K1 from a pyelonephritopathogenic strain revealed a higher stimulative effect than antigen K7 from the standard strain ($p < 0.01$). These findings indicate that the pyelonephritopathogenic strains belong to a small number of clones, and that these strains produce more severe inflammatory lesions.

Key words: urinary tract infection, P-fimbriae, O antigen, K1 antigen, host defense function

緒 言

尿路感染症 (urinary tract infection: UTI) の起炎菌としてグラム陰性桿菌, なかでも大腸菌の占める割合は大きい¹. これらの大腸菌には, P 線毛をはじめ特定の O 抗原, K 抗原などの表現型を示すものが多い^{2,3,4}. なかでも P 線毛大腸菌は, 腎尿路粘膜細胞レセプターへの接着性から, 近年, UTI の原因菌として注目されており, 著者等⁵ もその事実を確認した. しかし, 大腸菌の O 抗原, K 抗原が UTI の発症にどのように関与するかについては, 未だ十分に解明されていない.

本研究では, 小児 UTI 患者の尿から分離された大腸菌の P-線毛, O 抗原, K1 抗原の検査を行い, 臨床病型との関係を検討した. さらに, UTI 感染症の成立との関係を検討するために, これらの抗原が生体に及ぼす影響について研究した.

対象と方法

1. 病型分類

研究対象とした患者は, 1985年10月から1989年10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大腸菌性 UTI 患者 50 例 (男 18 例, 女 32 例, 年令: 生後 1 ヶ月 ~ 20 才, 中央値 6 才) で, 対照には, 現症にも既往にも腎疾患を認めず, スクリーニング尿細菌培養で大腸菌が contamination として得られた 28 例 (男 14 例, 女 14 例, 年令: 生後 1 ヶ月 ~ 16 才, 中央値 4 才) を用いた. UTI 患者の臨床病型は, Kaijser⁶ の分類を一部変更して以下のごとく定義した.

A) Acute pyelonephritis (APN): UTI の既往がなく, 菌尿 (10^5 colony forming unit (CFU)/ml 以上) と 38.5°C 以上の発熱を伴い, ①赤沈値 25 mm/h 以上か, CRP 2.0 mg/dl 以上, ②一過性尿濃縮力の低下 (800 mOsm/l 以下), ③背部痛または腎領域の痛み, の 3 項目のうち 1 項目以上を伴うもの.

B) Chronic pyelonephritis (CPN): 菌尿があり, ①UTI の既往, ②尿細

管機能障害（持続性の尿濃縮力の低下または左右 15%以上の機能の差），

③レントゲン上の腎実質の変化，④腎生検組織に間質の細胞浸潤を伴うもの，
の 4 項目のうちいずれか 1 項目以上を伴うもの。

C) Acute cystitis (AC)：菌尿があり，尿沈渣に白血球が 5/high per field (HPF) 以上の膿尿と排尿痛・頻尿を認め，体温 38.5℃未満，赤沈値 25 mm/h 未満あるいは CRP 2.0 mg/dl 未満，腎尿濃縮力正常，背部痛・腎領域の痛みを伴わないもの。

D) Non specific urinary tract infection (NS-UTI)：明らかな UTI の臨床症状ならびに所見を認めるが，A)，B)，C) の基準に入らないもの。

E) Asymptomatic bacteriuria (ABU)：菌尿が認められるが，膿尿がなく，現症にも既往にも，A)～D) の UTI の症状，検査所見を認めないもの。

各病型の男女比，症例数，年齢を Table 1 に示した。

Table 1 Profiles of the patients with various urinary tract infections

clinical diagnosis	SEX		total	Age (median)
	male	female		
A) APN	6	6	12	1M~10Y (2Y)
B) CPN	4	15	19	7M~20Y (10Y)
C) AC	2	5	7	3Y~11Y (5Y)
D) NS-UTI	2	3	5	5M~12Y (7Y)
E) ABU	4	3	7	1M~11Y (9Y)

Abbreviation

APN : acute pyelonephritis CPN : chronic pyelonephritis AC : acute cystitis
NS-UTI : non specific urinary tract infection ABU : asymptomatic bacteriuria
M : months old Y : years old

Numbers indicate the numbers of patients

2. 大腸菌の分離，保存，培地

尿からの菌の検出は，清潔中間尿採取法⁷で採取した尿を 3 時間以内に細菌検査室で Auto Micro Biosystem (VITEK 社，Missouri，USA) によって簡易定量培養を行った。

(1) 菌の保存

尿から分離した大腸菌の保存には、Luria 培地⁸で37℃、一夜培養後、等量の滅菌グリセリン（和光純薬工業株式会社，大阪）と混合し、-80℃で凍結保存した。使用時にはLuria 寒天培地⁸で37℃一夜培養を2回くり返した。大腸菌の数日間の保存には、Casitone 半流動培地⁹に菌を穿刺して37℃ 一夜培養後、室温に置いて保存した。

(2) 使用した大腸菌

実験には、UTI 患者から分離した *P-fimbriae* (*P-f*) 陽性株⁵ で国立予防衛生研究所に依頼して血清型を同定した菌のうち、O1:H7:K1(-):F11:hemolysin(-), O2:H(-):K1(-):F9: β -hemolysin(+), O4:H(-):K1(-):F7: α -, β -hemolysin(+), O6:H(-):K1(-):F12:hemolysin(-), O75:H(-):K1:F7:hemolysin(-) (以下、それぞれ U-1, U-2, U-3, U-4, U-5 と略記), さらに国立予防衛生研究所 (予防研) から分与された株 O1H7K1, O2H4K1 (以下、それぞれ Y-1, Y-2 と略記), 大阪大学微生物研究所 (阪大微研) から分与された株の O44H18K74 (腸管病原大腸菌, 以下 B-1 と略記), O14H(-)K7 (標準株, 以下 B-2 と略記) の 9 株を使用した。Y-1, Y-2, B-1, B-2 の α -, β -hemolysin の有無は坂崎等の方法¹⁰ により判定し、*P-f* の有無は蛍光抗体法¹¹ で判定した (Table 2)。

Table 2 Detailed properties of *E. coli* used in the present study

strain antigen	U-1	U-2	U-3	U-4	U-5	Y-1	Y-2	B-1	B-2
O	O1	O2	O4	O6	O75	O1	O2	O44	O14
K	K1(-)	K1(-)	K1(-)	K1(-)	K1	K1	K1	K74	K7
H	H7	H(-)	H(-)	H(-)	H(-)	H7	H4	H18	H(-)
F	F11	F9	F7	F12	F7				
hemolysin	$\alpha(-)$ $\beta(-)$	$\alpha(-)$ $\beta(+)$	$\alpha(+)$ $\beta(+)$	$\alpha(-)$ $\beta(-)$	$\alpha(-)$ $\beta(-)$	$\alpha(+)$ $\beta(-)$	$\alpha(+)$ $\beta(-)$	$\alpha(-)$ $\beta(-)$	$\alpha(-)$ $\beta(-)$
P-fimbriae	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)

U1~U5 were strains from patients with urinary tract infection, and their phenotypes O, K, H, F, and hemolysin were determined by Dr.T.Sakazaki, the National Institute of Health, Department of Bacteriology. Y-1, Y-2 were strains provided by Dr.T.Sakazaki. B-1, B-2 were strains provided by Dr.T.Miwatani, Dr.T.Honda, Research Institute for Microbial Disease, Osaka University. P-fimbriae(P-f) was indentified by a immunofluorescent assay with a monoclonal antibody against the P-f". The phenotype of hemolysin of Y-1, Y-2, B-1, B-2 was indentified by a method of T.Sakazaki".

3. 抗血清

O1, O2, O75 の特異抗血清は, それぞれ U-1, U-2, U-5 の大腸菌を Kaijser⁶ の方法に従って家兎に免疫して作成した. すなわち, Luria 培地⁸ で一夜培養した細菌を 120℃, 2 気圧で 60 分加熱処理し, 0.15M/1 NaCl で洗浄後, 0.15M/1 NaCl で 0.5, 1.0, 1.5, 2.0×10⁹ CFU/ml の菌浮遊液を作成した. 初回は 0.5×10⁹ CFU/ml, 1ml を成熟雄性日本白色種兎 (1,800g~2,200g) に静注し, 以後 2 週毎, 菌濃度を 1.0, 1.5, 2.0×10⁹ CFU/ml と漸増しながら 1ml ずつ計 4 回静注して免疫した. 最終静注後 1 週で採血した. また, U-5 の大腸菌の生菌を用いて抗大腸菌 O 特異抗血清と同様に家兎を免疫し, 抗大腸菌 O75 K1 血清を作成した. O4, O6 の特異抗血清は Bacto-*E. coli* O anti-serum (Difco Laboratories, Michigan, USA) を使用した. K1 抗原の有無は神奈川県衛生研究所 松崎稔先生から供与して頂いた抗 B 群髄膜炎菌家兎血清を用いた.

4. 大腸菌の抗原検査

尿から分離した大腸菌の各種O抗原の有無は、0.15M/l NaClで大腸菌を 10^9 CFU/mlに調整し、120℃、1時間加熱後、0.15M/l NaClで2回洗浄した菌液を用いて菌体凝集法¹²で判定し、血清160倍以上の希釈で凝集のみられたものを陽性とした。またK1抗原の有無は、生菌の大腸菌を使った菌体凝集法で判定し、血清80倍以上の希釈で凝集のみられたものを陽性とした。P-f抗原は、既報¹¹のように、当科で作成したモノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法で判定した。

5. 多核白血球の分離と pooled serumの作成

多核白血球は、健常成人・ボランティア（16人、20～34才、男13人、女3人）の静脈からヘパリン採血し〔血液10mlに対し、0.05mlのノボヘパリン（ノボ・ノルディスク A/S，デンマーク）を使用した〕、Mono-Poly Resolving Medium(Flow Laboratories, Irvine, Scotland)を用いて分離し、ハンクス液（フェノールレッド不含，日水製薬，東京）に 1×10^6 または 10^7 /mlに調整した。測定には、多核白血球含有量が95%以上でトリパンブルーの染色では95%以上の viable cell を有するものを実験に使用した。

pooled serumは、当院血清検査室で使用した20～30人の残余血清を採血後3時間以内にpoolして、1,500rpm，20分遠心して上清を取り、これを一つのロットとした。1991年2月24日から2月28日の間に計4種のロットが得られた。pooled serumは-80℃以下で保存し、1ヶ月以内に使用した。

6. 大腸菌に対する多核白血球の貪食能と血清の溶菌反応

予防研からのY-1，Y-2，UTIから分離されたU-5，阪大微研から分与されたB-1，B-2の大腸菌を，Millerら¹³の方法に従って³H標識した。すなわち，³H-Lysine（37MBq/ml，Amersham Japan，東京）1mlを加えたLuria培地250mlに，BBL培地（日本ベクトン・ディッキンソン，大阪）で37℃一夜培養した大腸菌を接種し，37℃，一夜培養した。³H標識菌は0.15M/l NaClで洗浄して 8×10^8 CFU/mlに調整した。

多核白血球の貪食能は Peterson ら¹⁴ の方法に準じた。pooled serum をハ
ンクス液で8%に希釈し，多核白血球を $1 \times 10^7/\text{ml}$ の濃度に浮遊した。この浮遊
液 1.8 ml に ^3H 標識した菌液 0.2 ml を加え，37°C，30 分間攪拌・反応させた。
この混合液から混和後 0 分，10 分，20 分，30 分，45 分の時間に 0.1 ml ずつ
とり，氷中の 0.15 M/l NaCl 10 ml を加え，攪拌後 1,500 rpm 10 分遠心し，
沈渣を 0.15 M/l NaCl で 2 回洗浄した。沈渣に蒸留水 0.5 ml を加えて 30 分静置
して細胞溶解し，ATOMLIGHT (DuPont, Massachusetts, USA) 4 ml と混
和し，LKB 1219 Liquid Scintillation Counter (Pharmacia Wallac,
Turku, Finland) で貪食された細菌の isotope を測定した。また，反応前に，
別に菌と多核白血球の混合液から 0.1 ml をとり，遠心せずに蒸留水を 1 ml 加え，
ATOMLIGHT 4 ml と混和し，initial mixture として液体シンチレーション
カウンターで測定し，貪食率を以下のように計算した。

貪食率 = (白血球沈渣の isotope の cpm / initial mixture の cpm) \times 100

血清の溶菌反応に対する抵抗性は，Leying ら¹⁵ の方法を応用した。米増¹⁶ の
記載に従って，Mg 加 0.15 M/l NaCl (0.15 M/l NaCl 溶液に $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
を 0.05% 溶解) で pooled serum の 5%，10%，15%，20%，25%，40%，
50% の溶菌液を作成した。また，pooled serum を 56°C，30 分で非働化し，
同じ濃度の非働化希釈血清を作成した。0.15 M/l NaCl で洗浄した ^3H -Lysine
標識大腸菌を，終濃度 8×10^8 CFU/ml となるように Mg 加 0.15 M/l NaCl ある
いは各濃度の溶菌液か非働化希釈血清 0.5 ml に再浮遊し，2 時間 37°C 加温して
反応させた。続いて 10,000 rpm 10 分遠心し，上清 0.5 ml に ATOMLIGHT 4
ml 加え，上記と同様に液体シンチレーションカウンターで測定した。溶菌液ま
たは非働化希釈血清の上清のカウント数と，Mg 加 0.15 M/l NaCl 浮遊液上清
のカウント数の差を，溶菌により上清に放出された isotope の値とした。別に，
Mg 加 0.15 M/l NaCl 0.5 ml に浮遊した菌液 ($8 \times 10^8/\text{ml}$) に ATOMLIGHT
4 ml を加えて測定した isotope のカウントを total bacterial cpm とし，
溶菌率 = (上清に放出された isotope の cpm / total bacterial cpm) \times 100
とした。貪食反応，溶菌反応は，いずれも重複して実施し，その平均をとった。

7. O 抗原, K 抗原の分離・精製

O 抗原の分離は, Bolanos ら¹⁷ の方法に従って, Luria 培地⁸ で培養して集めた *E. coli* の乾燥菌体 (10g) から粗抗原を phenol 抽出, 99.5% ethanol 沈殿で得た. 沈渣は 0.15 M/l NaCl に溶解し, cetavlon (SIGMA, Missouri USA) を 2% の濃度で加えて上清から O 抗原を抽出した.

K 抗原の分離は, Kasper ら¹⁸ の方法に従った. 大腸菌を Casamino acid medium (Watson¹⁹ の変法¹⁸) 10 liter で培養し, 遠心後, その上清を Amicon Diaflo Ultra Filtration (Amicon Corporation, Massachusetts, USA) を用い, PM-30 membrane (Amicon Corporation) を使用して 500 ml まで濃縮した. この液に 0.3% の濃度で cetavlon を加えて沈殿物を得た. 0.9 M/l CaCl₂ 100 ml で溶解後, 3 倍量の 99.5% ethanol を加えて再沈殿し, 精製抽出した.

分離精製した O 抗原, K 抗原の抗原性は感作赤血球凝集反応²⁰, Micro-Ouchterlony 法²¹ で検討した. 感作赤血球凝集反応は, 羊赤血球 (大阪大学微生物研究所, 大阪) を 0.15 M/l NaCl で溶解した 50 µg/ml の O 抗原または K 抗原溶液に 2% の濃度で浮遊し, 37°C, 1 時間の感作を行った. 0.15 M/l NaCl で 3 回洗浄後, 2% の感作赤血球浮遊液とした. 抗血清を 50 µl ずつ, 0.15 M/l NaCl を用いてプレート U リジット (三光純薬工業株式会社, 東京) で連続倍数希釈し, これに感作赤血球 50 µl を滴下して攪拌し, 1 時間室温静置後, 凝集の有無を判定した. Micro-Ouchterlony 法は, barbital buffer (pH 8.6, ヤトロン社, 東京) で 0.8% Agar Noble (Difco Laboratories) のゲルプレートを作成し, 径 2 mm の well を中央に作り, その周辺に well 間 3 mm で同じ径の well を作成した. 中央の well には抗原液 500 µg/ml を 10 µl 入れ, 周辺の well には等量の抗血清 (0.15 M/l PBS で 3 倍希釈) を入れた.

8. O 抗原, K 抗原の蛋白量, 糖質などの測定

蛋白量の測定は, ウシ血清アルブミン (fraction V, BSA, 和光純薬工業株式会社) を standard として, protein assay kit (Bio-Rad, Richmond, USA) を用いた色素法で行った. hexose の測定は, ブドウ糖 (和光純薬工業

株式会社)を standard としてフェノール・硫酸法²²で行い、シアル酸の測定は、N-acetylneuraminic acid (生化学工業株式会社, 東京)を standard としてレゾルシン試薬による定量法²³を用いて行った。また、核酸の混入は、蒸留水に溶解した抗原液 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を光路 1cm の石英セルを用いて、波長 230 nm, 260 nm, 280 nm で吸光度を Double Beam Spectrophotometer UV-190 (島津製作所, 京都)で測定した。Endotoxin 活性はトキシカラーシステム (生化学工業株式会社, 東京)で測定した。

9. O 抗原, K 抗原を刺激物とした時の多核球ルミノール依存性 Chemiluminescence (C.L.) の測定

多核球 C.L. の測定は、Pico-Lite ルミノメーター (Packard, Zurich, Switzerland)を用いて既報²⁴の通りに行った。多核白血球にトリス塩化アンモン溶血の操作を加えた後、 $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調整した。多核球浮遊液 300 μl に 50 μl の luminol (Boehringer Mannheim, West Germany)液を加え、反応管で 37°C, 10 分静置した。続いて各濃度で 0.15 M/l NaCl に溶解した O 抗原または K 抗原を刺激物として 50 μl 加え、反応カーブの peak C. L. 値を測定し、単位は counts per minutes (CPM)で示した。反応はすべて重複して行い、幾何平均値をとった。

10. 統計学的検討

統計学的有意差検定には、STAT FLEX NEC PC-9801 (日本電気, 東京)を用いて、 χ^2 検定, Mann-Whitney 検定などを計算した。

結 果

1. 実験に使用した大腸菌の抗血清の検討

大腸菌の U-1 から作成した抗大腸菌 O1 家兎血清, U-2 から作成した抗大腸菌 O2 家兎血清, U-5 から作成した抗大腸菌 O75 家兎血清は、いずれも該当する O 抗原を持つ大腸菌 U-1, U-2, U-5 の加熱死菌に対して、1,280 倍の希

積血清まで凝集を示した。Difco 社製抗大腸菌O4, O6 家兎血清は、該当する O 抗原を持つ大腸菌 U-3, U-4 の加熱死菌にいずれも 640 倍の希釈まで凝集を示した。しかし、いずれの抗血清とも 20 倍以上の希釈では、他の O 抗原を持つ大腸菌の加熱死菌との間に凝集を認めなかった。なお、抗O75 K1 家兎特異抗血清は U-5 生菌に 2,560 倍まで凝集を示した。

また、抗B群髄膜炎菌血清では、K1 抗原保有大腸菌である U-5, Y-1, Y-2 の生菌に対して 320 倍の希釈まで凝集を示したが、K1 抗原を持たない U-1, U-2, U-3, U-4, B-1, B-2 とは 20 倍以上の希釈血清では凝集を認めなかった (Table 3)。

Table 3 Bacterial agglutination titers of the antisera used in the present study

Anti-O sera*

strains antiserum	U-1	U-2	U-3	U-4	U-5	Y-1	Y-2	B-1	B-2
E.coli O1 antiserum	×1,280	×20 ↓	×20 ↓	×20 ↓	×20 ↓	×1,280	×20 ↓	×20 ↓	×20 ↓
E.coli O2 antiserum	×20 ↓	×1,280	×20 ↓	×20 ↓	×20 ↓	×20 ↓	×1,280	×20 ↓	×20 ↓
E.coli O4 antiserum (Difco)	×20 ↓	×20 ↓	×640	×20 ↓	×20 ↓	×20 ↓	×20 ↓	×20 ↓	×20 ↓
E.coli O6 antiserum (Difco)	×20 ↓	×20 ↓	×20 ↓	×640	×20 ↓	×20 ↓	×20 ↓	×20 ↓	×20 ↓
E.coli O75 antiserum	×20 ↓	×20 ↓	×20 ↓	×20 ↓	×1,280	×20 ↓	×20 ↓	×20 ↓	×20 ↓

Bacterial suspensions (10^9 CFU/ml) were heated to 120°C for 1 hour and were mixed with serially diluted antisera.

Anti-K1 serum*

	U-1	U-2	U-3	U-4	U-5	Y-1	Y-2	B-1	B-2
Neisseria meningitis group B antiserum	×20 ↓	×20 ↓	×20 ↓	×20 ↓	×320	×320	×320	×20 ↓	×20 ↓

Living bacterial suspensions (10^9 CFU/ml) were mixed with serially diluted antisera.

* Numbers indicate the dilution titers of antisera.

2. 尿分離大腸菌の抗原型

尿から分離した大腸菌 78 株のうち、120°C 加熱により自己凝集した rough 株は ABU の 7 株中 1 株、control の 28 株中 2 株の計 3 株に認められた。O 抗

原型はこれら rough 株を除いた 75 株について、K1 抗原、P-f 抗原は 78 株全株について検討した。

O1, O2, O4, O6, O75 の 5 種の抗原のうち、O1 は APN で 3/12 株、CPN で 5/19 株と、control (1/26 株) に比べて有意に多く検出された (いずれも $p < 0.05$)。K1 抗原は APN で 5/12 株と control の 1/28 株に比べて有意に多く認められた ($p < 0.005$)。P-f 抗原は APN で 7/12 株と、control の 4/28 株よりも多くみられた ($p < 0.005$)。これら 5 種の O 抗原のうち一つを保有している大腸菌の中で P-f 抗原を同時に保有している大腸菌は、APN で 4/12 株と、control の 2/26 株に比べて有意に高頻度であった ($p < 0.05$)。また、K1 抗原を同時に保有している大腸菌は、APN で 3/12 株と、control の 0/26 株に比べて多く認められた ($p < 0.01$) (Table 4)。

Table 4 Numbers of serotypes of *E. coli* obtained from the patients with UTI and normal control

	O1	O2	O4	O6	O75	rough	K1 antigen	P-f	one of five O antigens with P-f	one of five O antigens with K1	P-f with K1
A) APN (12 cases)	3	1	2	0	1	0	5	7	4	3	2
B) CPN (19 cases)	5	2	1	3	1	0	4	7	4	1	1
C) AC (7 cases)	0	0	0	1	1	0	2	2	1	1	2
D) NS-UTI (5 cases)	*1	*1	0	0	2	0	*3	*3	*1	*2	0
E) ABU (7 cases)	0	1	1	1	0	1	0	3	2	0	0
F) control (28 cases)	1	0	2	3	2	2	1	4	2	0	0

*1 $P < 0.05$ *2 $P < 0.01$ *3 $P < 0.005$

Abbreviation

UTI : urinary tract infection APN : acute pyelonephritis CPN : chronic pyelonephritis AC : acute cystitis
 NS-UTI : non specific urinary tract infection ABU : asymptomatic bacteriuria P-f : P-fimbriae

尿から検出された大腸菌の表現型について、5 種の O 抗原、K1 抗原、P-f 抗原の 3 種の抗原相互の関係を見ると、O1 抗原と P-f 抗原に有意の相関が見られたが ($p < 0.05$)、O 抗原と K1 抗原、K1 抗原と P-f 抗原には有意な相関は認められなかった (Table 5)。

Table 5 Correlation between various antigens of *E. coli*

O antigen \ K1 or P-f	K1 (n) P-f (n)	
	O1 (n=9)	1
O2 (n=4)	0	2
O4 (n=6)	1	3
O6 (n=10)	1	1
O75 (n=5)	2	2
rough (n=3)	0	0
other (n=41)	7	12

K1 \ P-f	P-f (+) (n) P-f (-) (n)	
	K1 (+) (n=12)	5
K1 (-) (n=66)	21	45

The data are compared between each O antigen and K1, and between each O antigen and P-f, and between K1 and P-f.

*P<0.05

P-f : P-fimbriae n : numbers

3. 大腸菌の標識率

Y-1, Y-2, U-5, B-1, B-2 の5株の大腸菌の ³H-Lysine 標識率は、それぞれ 2.4×10^{-5} cpm/CFU, 1.4×10^{-5} cpm/CFU, 1.2×10^{-5} cpm/CFU, 0.9×10^{-5} cpm/CFU, 1.9×10^{-5} cpm/CFUであった (Table 6)。

Table 6 ³H-labeling indexes of various *E. coli*

strain	Y-1	Y-2	U-5	B-1	B-2
Serotype	O1:H7:K1 P-f (-) α-hemolysin(+)	O2:H4:K1 P-f (-) α-hemolysin(+)	O75:H(-):K1 P-f (+) hemolysin(-)	O44:H18:K74 P-f (+) hemolysin(-)	O14:H(-):K7 P-f (+) hemolysin(-)
Labeling index (cpm/CFU)	2.4×10^{-5}	1.4×10^{-5}	1.2×10^{-5}	0.9×10^{-5}	1.9×10^{-5}

An inoculum of *E. coli* and 37 MBq of ³H-Lysine were mixed into 250 ml Luria broth medium and incubated at 37°C overnight. The bacterial sediment was obtained by centrifugation at 10,000 rpm for 10 minutes. After washing three times with sterile 0.15 M/l NaCl, the organism was finally suspended in 30 ml of sterile 0.15 M/l NaCl (8×10^8 CFU/ml).

4. 大腸菌の貪食率

B-2株の健康成人1例からの多核白血球による経時的貪食をみると、白血球に貪食された菌のcpmは時間とともに増加し、30分で最大のcpm(318cpm)を示し、貪食率は17.3%であった(Fig.1)。Y-1, Y-2, U-5, B-1, B-

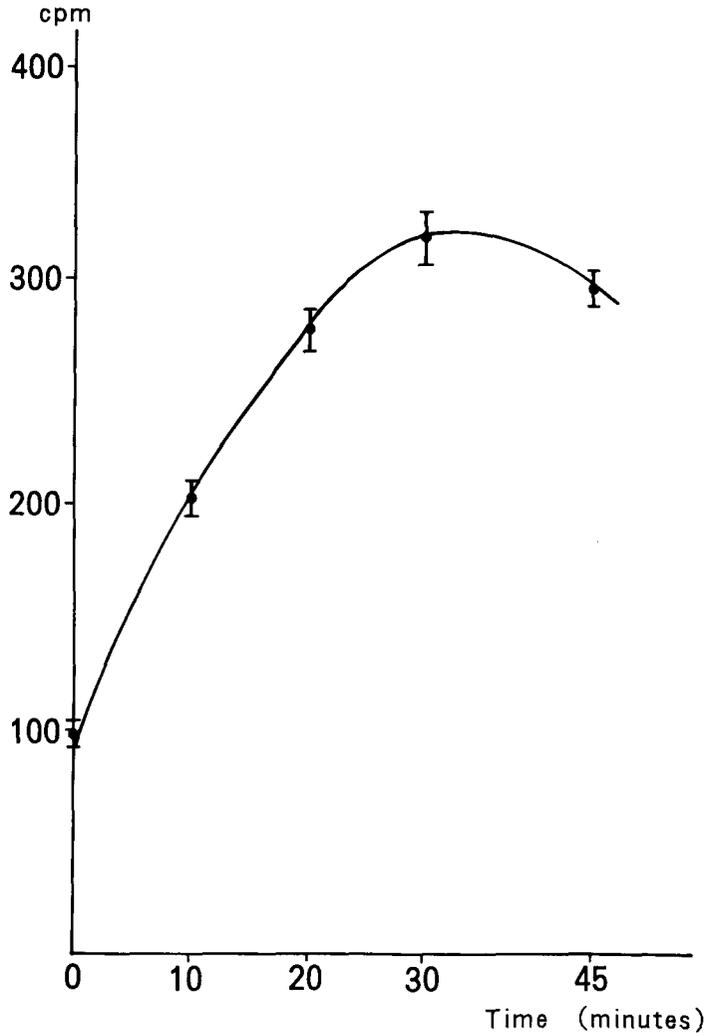


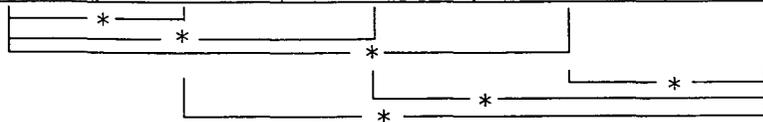
Fig.1 Kinetics of human PMN engulfment of ^3H -*E. coli* B-2 [O14:H(-):K7:P-f(+):hemolysin(-)]
The mixture of PMN and ^3H -bacterial suspension in 8% pooled serum was incubated at 37°C for 0, 10, 20, 30, or 45 minutes. ^3H incorporated into the leukocyte was counted by a liquid scintillation counter.

2 の，健康成人 6 例からの多核白血球による 30 分での貪食率は，Y-1 株と B-2 株は，それぞれ $16.3 \pm 2.0\%$ ， $16.9 \pm 2.8\%$ と，U-5 の $34.3 \pm 4.2\%$ ，Y-2 の $28.5 \pm 4.5\%$ ，B-1 の $30.0 \pm 6.0\%$ に比べて有意に低い貪食率を示した ($p < 0.01$) (Table 7) .

Table 7 The percent phagocytosed *E. coli* by normal polymorphonuclear leukocyte (%)

strain origin of PMN	Y-1 O1:H7:K1 P-f(-) α -hemolysin(+)	Y-2 O2:H4:K1 P-f(-) α -hemolysin(+)	U-5 O75:H(-):K1 P-f(+) hemolysin(-)	B-1 O44:H18:K74 P-f(+) hemolysin(-)	B-2 O14:H(-):K7 P-f(+) hemolysin(-)
28 Y m	14.2	22.6	37.2	21.0	19.2
26 Y m	13.5	33.5	33.0	31.0	20.5
23 Y f	17.2	24.0	38.1	NE	14.8
33 Y m	17.0	32.5	35.5	27.3	14.0
25 Y m	17.4	30.4	27.6	35.2	14.5
28 Y m	18.6	28.2	NE	35.3	18.1
mean \pm SD	16.3 ± 2.0	28.5 ± 4.5	34.3 ± 4.2	30.0 ± 6.0	16.9 ± 2.8

*P<0.01



Abbreviation PMN : polymorphonuclear leukocyte, m : male, f : female, Y : years old,
NE : not examined, SD : standard deviation
The percent phagocytosed *E. coli* by PMN was counted in duplicate after 30 minutes incubation at 37°C.
The calculation is as follows.
The percent of phagocytosis of PMN=(mean cpm in leukocyte pellet/mean cpm of initial mixture) $\times 100$

5. 大腸菌の溶菌反応

B-2 株を用いた pooled serum の 5, 10, 15, 20, 25, 40, 50% の各濃度における溶菌率は，血清濃度の増加にともなって増加し，血清 20% で peak に達した．しかし，非働化希釈血清による溶菌作用は，いずれも 5% 前後と低く，血清濃度の上昇に伴う溶菌率の増加は認められなかった (Fig. 2) . Y-1, Y-2, U-5, B-1, B-2 の 5 株について 4 種の 20% pooled serum による溶

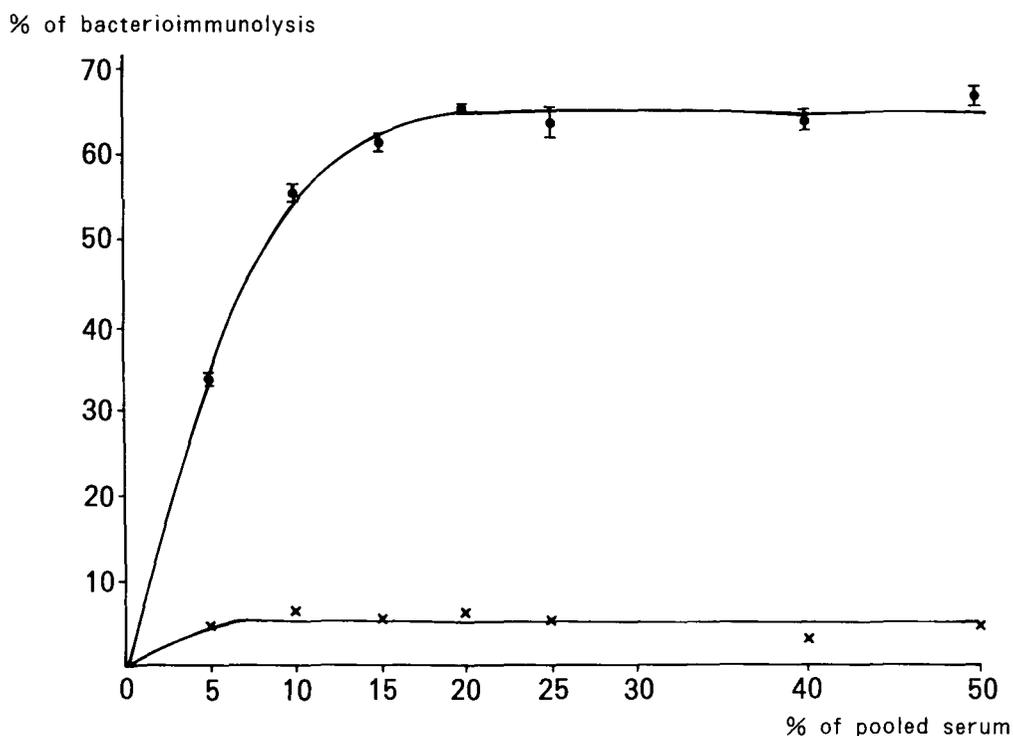


Fig. 2 The percent of bacterioimmunolysis of *E. coli* B-2 [O14:H(-):K7:P-f(+):hemolysin(-)] by the various concentrations of pooled serum. The diluted pooled serum or heat inactivated pooled serum (56°C, 30minutes) was diluted to 5, 10, 15, 20, 25, 40, and 50%, by 0.15M/l NaCl containing Mg.
 ●-●: pooled serum, ×-×: heated pooled serum
 The percent of bacterioimmunolysis =
 (mean of cpm in supernate / mean cpm of total bacteria) × 100

菌率を検討したところ、U-5が $3.5 \pm 0.6\%$ と最も低く、次いでB-1の $14.2 \pm 1.8\%$ 、Y-2の $17.2 \pm 2.8\%$ 、Y-1の $34.5 \pm 1.8\%$ の順であり、いずれもB-2株の $63.8 \pm 2.8\%$ に比べて有意に溶菌率が低く、血清抵抗性を示した(いずれも $p < 0.05$) (Table 8)。

Table 8 The percent bacterioimmunolysis by pooled sera

strain pooled serum lot No.	Y-1	Y-2	U-5	B-1	B-2
	O1:H7:K1 P-f(-) α-hemolysin(+)	O2:H4:K1 P-f(-) α-hemolysin(+)	O75:H(-):K1 P-f(+) hemolysin(-)	O44:H18:K74 P-f(+) hemolysin(-)	O14:H(-):K7 P-f(+) hemolysin(-)
1	36.6	19.2	3.1	12.2	63.9
2	34.8	13.1	3.0	15.4	67.4
3	32.3	17.9	4.0	13.0	60.6
4	34.4	18.4	4.0	16.0	63.4
mean ±SD	34.5 ±1.8	17.2 ±2.8	3.5 ±0.6	14.2 ±1.8	63.8 ±2.8

*	*	*	*
---	---	---	---

* P<0.05

SD : standard deviation

The percent of bacterioimmunolysis was counted after 2 hrs incubation at 37°C

with 4 kinds of 20% pooled sera.

The calculation is as follows.

The percent of bacterioimmunolysis=(mean cpm of supernate/mean cpm of total bacteria)×100.

6. 分離したO抗原, K抗原の組成

U-1 (O1:H7:K1(-):F11:P-f(+):hemolysin(-)), U-4 (O6:H(-):K1(-):F12:P-f(+):hemolysin(-)), U-5 (O75:H(-):K1:F7:P-f(+):hemolysin(-)), B-1 (O44:H18:K74:P-f(+):hemolysin(-)), B-2 (O14:H(-):K7:P-f(+):hemolysin(-)) の菌株を用いて, それぞれO1, O6, O75, O44, O14の抗原を抽出し, さらにY-2 (O2:H4:K1:P-f(-):α-hemolysin(+)), B-1, B-2の菌株を用いて, K1, K74, K7の抽出を行った.

Y-2 (O2:H4:K1:P-f(-):α-hemolysin(+)) から分離したK1抗原を感作した赤血球は, 抗B群髄膜炎菌家兔血清で256倍希釈血清まで凝集を示したが, 抗大腸菌O2家兔血清では全く凝集を示さなかった. 一方, U-5 (O75:H(-):K1:F7:P-f(+):hemolysin(-)) から分離したO75抗原は, 抗大腸菌O75家兔血清では1,024倍まで強い凝集を示したが, 抗B群髄膜炎菌家兔血清

には凝集は見られなかった。他のO抗原, K抗原についても, 同様に感作赤血球凝集反応で特異抗血清との反応をみたが, 同様の結果であった。

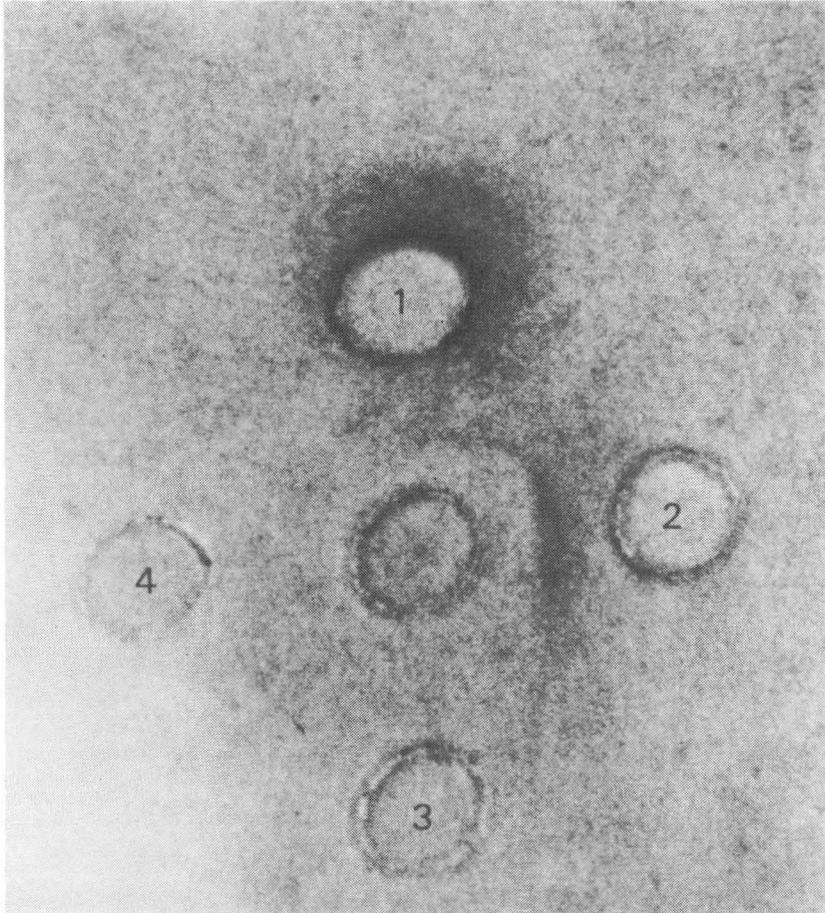


Fig. 3 Immunodiffusion figure by the Micro-Ouchterlony assay. To the center well was added $10\mu\text{l}$ of O75 antigen ($500\mu\text{g}/\text{ml}$) extracted from U-5 [O75:H(-):K1:F7:P-f(+):hemolysin(-)]. The same volume of anti-*E. coli* U-5 rabbit antiserum, anti-O75 rabbit antiserum, 0.15M/1 NaCl, and anti-group B *neisseria meningitis* rabbit serum were put into the wells No 1, 2, 3 and 4, respectively. The central antigen created an identical precipitation line against the wells No 1 and 2.

O75 抗原を中心の well に入れ, U-5 (O75:H(-):K1:F7:P-f(+): hemolysin(-)) 加熱死菌 (抗大腸菌O75) 血清ならびに U-5 生菌免疫血清 (抗大腸菌O75 K1) を周辺の well にいれた Micro-Ouchterlony 法では, 両 well との間に共通した一本の沈降線が認められた (Fig. 3).

分離精製した O 抗原, K 抗原乾燥重量 100 μg を 1ml の蒸留水に溶解して, 蛋白, hexose, シアル酸, 230, 260, 280nm の吸光度について測定した結果を Table 9 に示した. 蛋白量はいずれの O 抗原, K 抗原も dry weight 100 μg あたり 5 μg 以下であったが, hexose は 5 種の O 抗原では 25~50 $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ dry weight と比較的多く含まれていた. K 抗原では K74 は 35 $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ dry weight と多く含まれていたが, K1, K7 は感度以下であった. シアル酸は O 抗原では検出できず, K1 では 70 $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ dry weight と多量に含まれていたが, K7 では 5.6 $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ dry weight と少量で, K74 では感度以下であった. 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の O 抗原溶液の吸光度は, いずれも 260nm で peak を示し, 0.20~0.38 の間であった. 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の K 抗原溶液の吸光度は, いずれも 230nm が peak で 0.05~0.17 の間であった.

Endotoxin 活性は, O 抗原ではいずれも 5×10^4 endotoxin unit (EU)/ml 以上と高値であったが, K 抗原ではいずれも 64~319 EU/ml を示したに過ぎなかった (Table 9).

Table 9 Composition of extracted various O, K antigen of *E. coli*

	O antigen					K antigen		
	O1	O6	O75	O14	O44	K1	K7	K74
protein* ¹	2.4	3.0	4.0	3.8	2.8	ND	ND	ND
hexose* ¹	38.0	33.0	40.0	25.0	50.0	ND	ND	35.0
sialic acid* ¹	ND	ND	ND	ND	ND	70.0	5.6	ND
Absorbance* ²								
A _{230nm} ^{1cm}	0.101	0.194	0.200	0.137	0.186	0.057	0.089	0.165
A _{260nm} ^{1cm}	0.209	0.366	0.357	0.205	0.375	0.029	0.056	0.111
A _{280nm} ^{1cm}	0.113	0.191	0.191	0.116	0.192	0.019	0.042	0.100
Endotoxin* ² (EU/ml)	scale over	319	64	110				

scale over : 5×10^4 EU/ml 以上

ND : not detectable

*1 : $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ dry weight

*2 : 100 μg dry weight/ml distilled water

7. O 抗原, K 抗原を刺激物としたときの多核白血球ルミナル依存性 C. L. 活性の測定

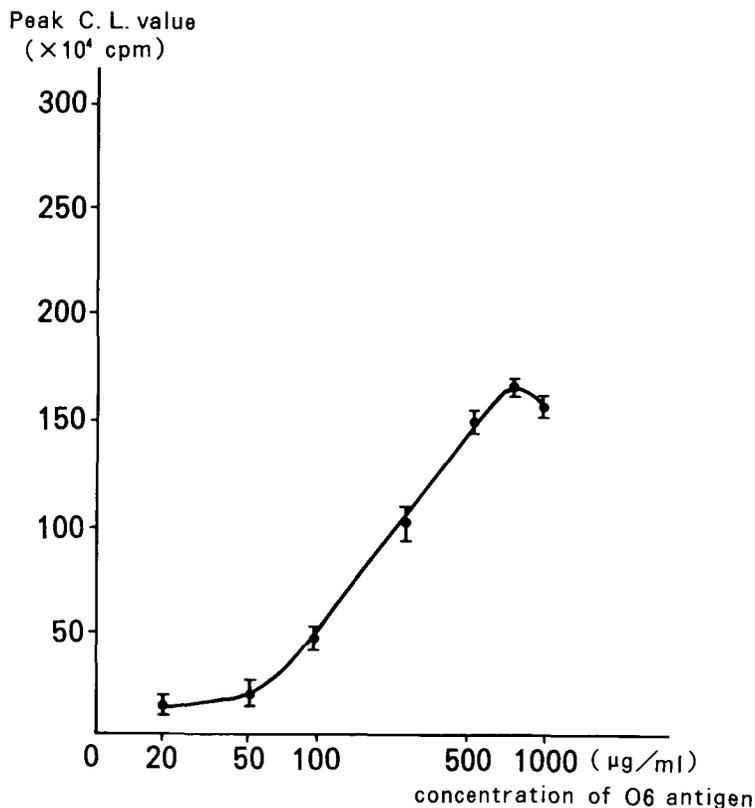


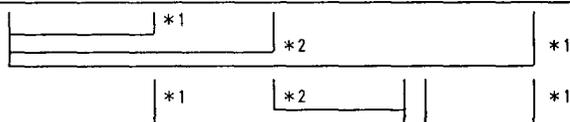
Fig. 4 The peak values of luminol dependent chemiluminescence of PMN stimulated by various concentrations of O6 antigen. A maximum peak C.L. value was obtained by 750 $\mu\text{g/ml}$ of O6 antigen.

U-4 菌株から抽出したO6 抗原を用いて反応管内のO 抗原濃度 20, 50, 100, 250, 500, 750, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ で C. L. 活性を測定した. peak C. L. 値はO 抗原量が 50 $\mu\text{g/ml}$ から上昇し始め, 750 $\mu\text{g/ml}$ では 163.5 ($\times 10^4$ cpm) と最も強い C. L. を示し, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ では 155.0 ($\times 10^4$ cpm) と低下した (Fig. 4). U-1, U-4, U-5, B-1, B-2 からそれぞれ分離したO 抗原, O1, O6, O75, O44, O14 の 250 $\mu\text{g/ml}$ での peak C. L. 値を測定した結果は, O1 抗原では 105.7 ± 13.0 ($\times 10^4$ cpm), O44 抗原では 106.7 ± 21.4 ($\times 10^4$ cpm) と高い多核白血球

C.L. 刺激性が認められ、他の抗原の場合と比べて有意な差が見られた (Table 10)。

Table 10 The peak values of luminol dependent chemiluminescence of PMN stimulated by various O antigens

Oantigen human PMN	O1	O6	O75	O44	O14
22 Y f	99.4	82.4	39.3	94.3	82.3
29 Y m	85.8	70.3	23.4	109.2	70.3
28 Y m	117.7	66.8	35.4	133.1	105.9
33 Y m	106.2	77.7	19.9	107.9	63.9
20 Y f	81.1	69.5	23.1	69.5	50.1
27 Y m	112.2	91.3	41.1	95.3	78.5
34 Y m	117.9	92.3	29.5	121.6	88.4
31 Y m	109.1	93.1	24.3	97.0	52.4
28 Y m	115.2	117.5	63.5	142.9	119.1
27 Y f	112.0	59.8	44.1	95.9	47.9
mean ±SD	105.7 ± 13.0	82.1 ±17.0	34.4 ±13.3	106.7 ±21.4	75.9 ±23.9



*1 $P < 0.05$ *2 $P < 0.001$

PMN : polymorphonuclear leukocyte, SD : standard deviation

m : male, f : female, Y : years old

The data indicates peak C.L. value ($\times 10^4$ cpm) stimulated by 250 μg dry weight/ml (final concentration) of O antigen.

Y-2 から分離抽出した K1 抗原を用いて反応管濃度 10, 25, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で C.L. 活性を調べた。peak C.L. 値は K 抗原量が 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から軽度の上昇傾向が見られ、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から急激に上昇し、250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で 285.2 ($\times 10^4$ cpm)

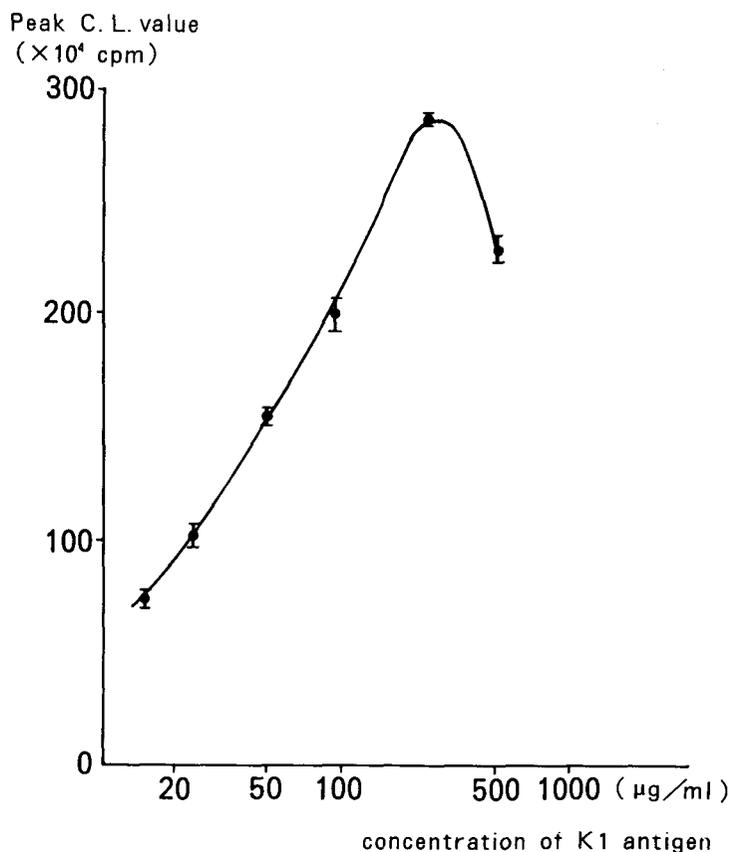


Fig. 5 The peak values of luminol dependent chemiluminescence of PMN stimulated by various concentrations of K1 antigen. A maximum peak C.L. value was obtained by 250 $\mu\text{g/ml}$ of K1 antigen.

と最高値を示し、500 $\mu\text{g/ml}$ では226.4 ($\times 10^4$ cpm)と低下した (Fig. 5). Y-2, B-1, B-2 からそれぞれ分離したK抗原, K1, K74, K7 100 $\mu\text{g/ml}$ で刺激した多核白血球 peak C.L. 値は, K1 抗原では 202.8 ± 69.7 ($\times 10^4$ cpm), K74 抗原では 254.4 ± 59.1 ($\times 10^4$ cpm) と K7 抗原に比べてきわめて高い値をとった ($p < 0.01$) (Table 11).

Table 11 The peak values of luminol dependent chemiluminescence of PMN stimulated by various K antigens.

human PMN	K antigen		
	K 1	K 7	K 74
26 Y m	178.0	55.4	229.4
21 Y f	186.7	45.6	265.5
29 Y m	184.6	34.3	244.7
26 Y m	143.5	NE	204.4
28 Y m	342.2	50.1	317.2
27 Y m	240.9	54.9	342.3
33 Y m	143.6	25.3	177.5
mean ±SD	202.8 ±69.7	44.3 ±12.1	254.4 ±59.1



* $P < 0.01$

PMN : polymorphonuclear leukocyte, NE : not examined

m : male, f : female, Y : years old

SD : standard deviation

The data indicates peak C. L. value ($\times 10^4$ cpm) stimulated by 100 μ g dry weight/ml (final concentration) of K antigen.

考 案

大腸菌のO抗原, K抗原検査には赤血球凝集反応や菌体凝集反応, さらには phage typing など様々な方法が利用されている. 今回の実験に使用した抗大腸菌O家兎血清は, 当科で作成した血清, Difco 社製とも加熱死菌に対して 640 ~ 1,280 倍まで凝集を示し, いずれも他のO抗原型の加熱大腸菌とは交叉反

応を認めず、また、B 群髄膜炎菌家兎血清を用いた生菌の大腸菌との菌体凝集反応でも、K1 抗原保有株は 320 倍希釈血清まで凝集を認め、他の K 抗原株とは交叉反応を認めなかった。B 群髄膜炎菌には大腸菌 K1 抗原と免疫学的に交叉する抗原の存在が知られており^{18,25}、今回の抗血清による菌体凝集反応での O 抗原、K 抗原型検査は信頼に足ると考えた。

臨床分離株の抗原型と病型の関係を見ると、尿路感染症特異 O 抗原と言われる¹、O1、O2、O4、O6、O75 の抗原のうち、O1 抗原が APN、CPN の上部尿路感染症で多く検出され、K1 抗原を保有する大腸菌は APN で多く出現していた。また、P-f 陽性大腸菌も APN で多く検出された。

このように特定の O 抗原が上部尿路感染症で多く検出される理由としては、これらの O 抗原保有大腸菌が P-f 抗原や hemolysin を多く有するためと考えられており^{1,26}、O 抗原はこれらの毒性因子のマーカーであると言われている²⁷。今回の我々の結果でも、検討した尿路感染症特異 O 抗原保有大腸菌に K1 抗原または P-f 抗原を保有する頻度は APN で有意に高かった。さらに、これらの O 抗原のうち、O1 抗原保有大腸菌に P-f 抗原を同時に保有する頻度が高かったことは、O 抗原がマーカーであるという説を裏づけるものではないかと考えられた。

一方、K1 抗原保有大腸菌については、APN や新生児細菌性髄膜炎の起炎菌として認められることが多く、生体の免疫反応に抵抗する大腸菌の毒性因子の一つとして従来より報告されてきた^{25,28,29}。また、P-f 保有大腸菌は、上部尿路粘膜の α -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal からなる受容体に特異的に接着し³⁰、尿路感染の初期段階に重要な因子と考えられている⁵。これら K1 抗原、P-f 抗原は pyelonephritis で多く検出されると数多く報告がみられ^{1,3,28,30}、今回の結果もよく一致していた。

しかし、O 抗原や K 抗原などの毒素因子が生体に及ぼす影響についてはこれまであまり検討されていない。そこで、これらの諸抗原を持った大腸菌を使って多核白血球機能、血清溶菌反応を検討した。さらに、抗原を抽出して多核白血球 C.L. 反応に対する刺激性を検討し、O 抗原や K 抗原の生体防御機能に対する反応性を検討した。

^3H -Lysine で label した大腸菌の標識率は $0.9 \sim 2.4 \times 10^{-5}$ cpm/CFU で、Miller ら¹³ の *Staphylococcus albus* への標識率 $3.8 \sim 7.5 \times 10^{-4}$ cpm/CFU と比べてかなり低かった。しかし、これは、一方がグラム陰性桿菌であり、他方がグラム陽性球菌と細菌の性状が大きく異なっているので、単純に標識率が悪いと判断できないと考えられる。

健康人の多核白血球の経時的貪食率では、30分後に最大の貪食率を認めた。これは、Miller ら¹³、Peterson ら¹⁴の報告と同様で、多核白血球の菌の摂取は短時間のうちに完了すると考えられた。大腸菌の30分後の貪食率を検討した結果、Y-1 [O1:H7:K1:P-f (-): α -hemolysin (+)] と B-2 [O14:H(-):K7:P-f (+):hemolysin (-)] の2種の大腸菌が、他の U-5、Y-2、B-1 に比べて、貪食率が低かった。一般に、K抗原を持つ大腸菌は、多核白血球の貪食に抵抗性を持つと言われており^{31,32}、特に K1 抗原保有大腸菌は貪食に対する抵抗性が高いという報告もある³³。しかし、今回の結果では、必ずしも K1 抗原陽性大腸菌がすべて他の抗原を持つ大腸菌に比べて貪食率が低いとは限らなかった。一方、多核白血球の貪食に対する大腸菌の抵抗性については、O抗原、outer membrane も関与する³³と言われている。また、貪食能は尿の浸透圧が 500 mOsm/kg 以上では極端に低下することも指摘されており³⁴、実際の炎症の場では K 抗原以外の菌体抗原や周囲の環境因子も関与して、多核白血球による貪食率を複雑に変化させると考えられる。

Pooled serum による大腸菌の免疫溶菌反応は、血清濃度の変化に伴って溶菌率が増加し、20%の濃度の血清で plateau に達した。非働化血清では、pooled serum の時の 5%前後の溶菌率しか認められなかったことから、この血清による溶菌反応は補体活性などの thermolabile opsonin が主要な役割を担っていると考えられた。20%の濃度の血清による種々の大腸菌の溶菌率は、K1 抗原保有大腸菌群が、腸管病原大腸菌の B-1 [O44:H18:K74:P-f (+):hemolysin (-)] とともに標準株大腸菌の B-2 に比べて有意に低い溶菌率を示し、血清抵抗性が認められた。しかし、同じ K1 抗原保有株でも、U-5 [O75:H(-):K1:F7:P-f (+):hemolysin (-)]、Y-2 [O2:H4:K1:P-f (-): α -hemolysin (+)]、Y-1 の順で溶菌率は 3.5~34.5% と大きな開きがみら

れた．K1 抗原保有大腸菌が血清の殺菌溶菌作用に対して抵抗性を示す報告は以前から知られている^{15,33,35} が，血清溶菌反応には K1 抗原だけでなく，smooth lipopolysaccharides も重要な関与をしていると言われている^{35,36}．Hughes C. ら³⁶ は，尿路感染症起炎大腸菌の O 抗原の種類と血清の免疫溶菌反応に対する抵抗性について検討し，O1, O2, O4 などの O 抗原保有大腸菌は血清の溶菌反応に対して感受性株が多いと述べており，今回の結果は，O 抗原の種類の違いも関係していたと考えられる．

このように，大腸菌の各抗原が生体に及ぼす影響を検討した，これまでの報告では，生菌全体を使用した実験系が多いため，他の抗原の影響を無視できない．そこで，O 抗原，K 抗原の分離精製を行い，O 抗原，K 抗原の白血球膜に対する刺激性を検討した．分離抽出したいずれの抗原も感作赤血球凝集反応で特異抗血清に反応が見られた．また，O 抗原は Micro-Ouchterlony でも特異 O 血清と一本の沈降線を認めており，その組成もトキシカラートで 50,000 EU/ml 以上の高い endotoxin 活性を保有していた．K 抗原はトキシカラートで 300 EU/ml までであったが，1 EU/ml は *E. coli* O111:B4 の 354 pg/ml に相当するので，endotoxin の混在量は 0.1% 以下である．K1 抗原はシアル酸含量が多く，今回の抽出した O 抗原，K 抗原は，諸家の報告と類似した組成を示しており，充分精製された抗原が採取されたと考える．

これらの抗原を刺激物として多核白血球 C.L. を測定したところ，O 抗原では O1 抗原と O44 抗原が，他の抗原型に比べて有意に高い C.L. 活性を示した．O 抗原は，その主成分である lipopolysaccharide のうち lipid A が白血球膜を刺激し，白血球機能に影響を及ぼす本体であると考えられており^{37,38}，O 抗原の種類による白血球膜刺激性の差は lipid A の含有量の違いという報告³⁸もある．今回の結果は，O1 抗原，O44 抗原が，他の O 抗原に比べて多核白血球活性酸素産生刺激性が高いことを示していると考えられた．一方 K 抗原では，K1 抗原と K74 抗原が標準株の K7 抗原に比べて有意に高い多核白血球 C.L. 産生刺激性を持つことが認められた．K 抗原の多核白血球に対する刺激性については，今回のような K 抗原を分離して比較した報告は検索した範囲では認められず，大腸菌の菌体を使って活性酸素産生を測定した報告³⁹によると，K 抗

原の種類による差は見られなかったという結果が得られている。しかし、この報告に見られるような直接菌体を用いた結果は他の抗原の影響も考慮する必要がある。従って、今回の結果はK抗原の種類による白血球膜刺激性に差異のあることを示す有力な所見と考えられる。

以上、臨床分離株の表現型の分析結果から、上部尿路感染症惹起性大腸菌には特定のごく限られた大腸菌クローンが存在することがうかがわれた。これらの菌はP-fで上部尿路粘膜細胞のreceptorに付着し、K1抗原を持つ菌では、血清による免疫溶菌反応に抵抗性が強く、特定のO抗原やK1抗原を持つ菌では、多核白血球による貪食に際して強い活性酸素を産生させ、感染局所の強い組織障害を惹起するものと推察された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導・御校閲を賜った牧 淳教授に深謝いたします。また、直接に御指導いただいた宮田曠助教授、ならびに検体採取など種々のご協力をいただいた小児科学教室員御一同、ならびに中央臨床検査部細菌検査室の諸氏に感謝します。本研究にあたって、*E. coli*の血清型同定をしていただき、*E. coli*の分与をしていただいた国立予防衛生研究所細菌第1部 坂崎利一先生、*E. coli*の分与をしていただいた国立大阪大学附属微生物研究所 菌株保存室 三輪谷俊夫先生、本田武司先生、B群髄膜炎菌家兎血清を分与していただいた神奈川県衛生研究所 山井志郎先生、松崎稔先生に謝意を表します。なお、本論文の要旨は、第32回日本腎臓学会総会（平成1年、浜松）、第22回日本小児感染症学会（平成2年、東京）、第26回日本小児腎臓病学会（平成3年、札幌）で発表した。

文 献

1. Burns MW, Burns JL, Krieger JN. Pediatric urinary tract infection. *Ped Clin North Amer* 1987;34:1111-1120.
2. O' Hanley P, Low D, Romero I, et al. Gal-Gal binding and hemolysin phenotypes and genotypes associated with uropathogenic *Escherichia coli*. *N Engl J Med* 1985;313:414-420.
3. Hanson LA, Fasth A, Jodal U, Kaijser B, Eden CS. Biology and pathology of urinary tract infections. *J Clin Pathol* 1981;34:695-700.
4. Sidor TA, Resnick MI. Urinary tract infection in children. *Ped Clin North Amer* 1983;30:323-332.
5. 宮田曠, 片岡知, 森口直彦ら. 尿路感染症から検出された *Escherichia coli* の諸抗原と臨床病型. *小児臨* 1987;40:257-262.
6. Kaijser B. Immunology of *Escherichia coli*: K antigen and its relation to urinary-tract infection. *J Infect Dis* 1973;127:670-677.
7. 寺脇良郎, 松本穎樹. 臨床細菌検査. 金井正光編. 臨床検査法提要 東京: 金原出版株式会社, 1983:1251-1314.
8. Lounatmaa K, Makela PH, Sarvas M. Effect of polymyxin on the ultrastructure of the outer membrane of wild-type and polymyxin-resistant strains of *Salmonella*. *J Bacteriol* 1976;127:1400-1407.
9. 柳沢謙. 微生物検査必携 細菌・真菌検査. 東京: 財団法人日本公衆衛生協会, 1978.
10. 坂崎利一, 波岡茂郎. 腸内細菌検索法. 東京: 納谷書店, 1956:112-113.
11. 宮田曠, 片岡知, 森口直彦ら. Pyelonephritis associated P-pili に対するモノクローナル抗体についての研究. *日児学会誌* 1989;93:1305-1312.

12. Vahlne G. Serological typing of the colon bacteria. Chapter II Serology of the colon group. Acta Pathol Microbiol Scand 1945 ; 62 : 14 - 67.
13. Miller D, Beck S. Polymorphonuclear leukocyte phagocytosis : quantitation by a rapid radioactive method. J Lab Clin Med 1975 ; 86 : 344 - 348.
14. Peterson PK, Verhoef J, Sabath LD, Quie PG. Extracellular and bacterial factors influencing staphylococcal phagocytosis and killing by human polymorphonuclear leukocytes. Infect Immun 1976 ; 14 : 496 - 501.
15. Laying H, Suerbaum S, Kroll HP, Stahl D, Opferkuch W. The capsular polysaccharide is a major determinant of serum resistance in K-1-positive blood culture isolates of *Escherichia coli*. Infect Immun 1990 ; 58 : 222 - 227.
16. 米増国雄, 溶菌反応. 進藤宙二編. 免疫学・アレルギー学実験法. 東京 : 文光堂, 1971 ; 322 - 325.
17. Bolanos R, Dewitt CW. Isolation and characterization of the K1(L) antigen of *Escherichia coli*. J Bacteriol 1966 ; 91 : 987 - 996.
18. Kasper DL, Winkelhake JL, Zollinger WD, Brandt BL, Artenstein MS. Immunochemical similarity between polysaccharide antigens of *Escherichia coli* O7 : K1(L) : NM and group B *Neisseria meningitidis*. J Immunol 1973 ; 110 : 262 - 268.
19. Watson RG, Scherp HW. The specific hapten of group C (group II α) meningococcus I. preparation and immunological behavior. J Immunol 1958 ; 81 : 331 - 336.
20. 田所一郎, 凝集反応. 進藤宙二編. 免疫学・アレルギー学実験法. 東京 : 文光堂, 1971 ; 303 - 318.
21. 木村和郎. Ouchterlony 法. 進藤宙二編. 免疫学・アレルギー学実験法.

- 東京：文光堂， 1971；266 - 272.
22. Dubois M, Gilles K, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F.
A colorimetric method for the determination of sugar.
Nature 1951 ; 28 : 167.
 23. Svennerholm L. Quantitative estimation of sialic acids. II.
A colorimetric resorcinol - hydrochloric acid method. Biochim
Biophys Acta. 1957 ; 24 : 604 - 611.
 24. 森口直彦，木下智弘，宮田曠．各種病態における末梢多形核白血球の
chemiluminescence の検討．日小血誌．1987 ; 1 : 141 - 146.
 25. Robbins JB, McCracken GH, Gotschlich EC, ϕ rskov F,
 ϕ rskov I, and Hanson LA. *Escherichia coli* K1 capsular
polysaccharide associated with neonatal meningitis. N Engl
J Med 1974 ; 290 : 1216 - 1220.
 26. 宮田曠，森口直彦，片岡知ら．尿ならびに糞便から得られた大腸菌の表現
型に関する研究．日児学会誌 1991 ; 95 : 656 - 660.
 27. Harber MJ, Asscher AW. Virulence of urinary pathogens.
Kidney Int 1985 ; 28 : 717 - 721.
 28. Kaijser B, Hanson LA, Jodal U, Lidin-Janson G. Frequency
of *E. coli* K antigens in urinary-tract infections in children.
Lancet 1977 ; 26 : 663 - 664.
 29. Wilfert CM. *E. coli* meningitis : K1 antigen and virulence.
Ann Rev Med 1978 ; 29 : 129 - 136.
 30. Kallenius G, Svenson SB, Möllby R, Cedergren B, Hultberg
H and Winberg J. Structure of carbohydrate of receptor on
human uroepithelial cells for pyelonephritogenic *Escherichia*
coli. Lancet 1981 ; ii : 604 - 606.
 31. Rottini G, Dri P, Soranzo MR, and Patriarca P. Correla-
tion between phagocytic activity and metabolic response of
polymorphonuclear leukocytes toward different strains of

- Escherichia coli*. Infect Immun 1975 ; 11 : 417 - 423.
32. Verweij - Van Vught AMJJ, Namavar F, Peerbooms PGH, Sparrius M and Maclaren DM. The role of different K antigens of *Escherichia coli* in phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes. J Med Microbiol 1984 ; 17 : 141 - 150.
 33. Timmis KN, Boulnois GJ, Bitter - Suermann D, and Cabello FC. Surface components of *Escherichia coli* that mediate resistance to the bactericidal activities of serum and phagocytes. Curr Top Microbiol Immunol 1985 ; 118 : 197 - 218.
 34. Suzuki Y, Fukushi Y, Orikasa S, and Kumagi K. Opsonic effect of normal and infected human urine on phagocytosis of *Escherichia coli* and yeasts by neutrophils. J Urol 1982 ; 127 : 356 - 360.
 35. Vermeulen C, Cross A, Byrne WR, and Zollinger W. Quantitative relationship between capsular content and killing of K1-encapsulated *Escherichia coli*. Infect Immun 1988 ; 56 : 2723 - 2730.
 36. Hughes C, Phillips R, and Roberts AP. Serum resistance among *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection in relation to O type and the carriage of hemolysin, colicin, and antibiotic resistance determinants. 1982 ; 35 : 270 - 275.
 37. Henricks PAJ, Van der Tol ME, Thyssen RMWM, Van Asbeck BS, and Verhoef J. *Escherichia coli* lipopolysaccharides diminish and enhance cell function of human polymorphonuclear leukocytes. Infect Immun 1983 ; 41 : 294 - 301.
 38. Wilson ME. Effects of bacterial endotoxins on neutrophil function. Rev Infect Dis 1985 ; 7 : 404 - 418.
 39. Falkenhagen U, Easmon CSF, Nimmich W, Zingler G, and Naumann G. Stimulation of particle-induced chemiluminescence

in human granulocytes by various *Escherichia coli* strains.
Br J exp Path 1986 ; 67 : 297 - 303.