

# 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

森口直彦

近畿大学医学部小児科学教室

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

## 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 K1 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 O44, 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 K74 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<sup>1</sup>. 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<sup>2,3,4</sup>. 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<sup>5</sup>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付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, 年齢: 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, 年齢: 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, Kaijser<sup>6</sup>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°C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.

### 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<sup>7</sup>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<sup>8</sup>で37°C, 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°Cで凍結保存した. 使用時には Luria 寒天培地<sup>8</sup>で37°C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<sup>9</sup>に菌を穿刺して37°C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<sup>5</sup>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(-):

**Table 1** Profiles of the patients with various urinary tract infections

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

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

**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 identified by a immunofluorescent assay with a monoclonal antibody against the P-f<sup>11</sup>. The phenotype of hemolysin of Y-1, Y-2, B-1, B-2 was identified by a method of T. Sakazaki<sup>10</sup>.

F9: $\beta$ -hemolysin(+), O4 : H(-) : K1(-) :  
F7: $\alpha$ -,  $\beta$ -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  $\alpha$ -,  $\beta$ -hemolysin の有無は坂崎等の方

法<sup>10</sup> により判定し, P-f の有無は螢光抗体  
法<sup>11</sup> で判定した (Table 2).

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 Kaijser<sup>6</sup> の方法に従っ  
て家兎に免疫して作成した. すなわち, Luira  
培地<sup>8</sup> で一夜培養した細菌を120°C, 2気圧で60  
分加熱処理し, 0.15 M/l NaCl で洗浄後, 0.15  
M/l NaCl で 0.5, 1.0, 1.5, 2.0×10<sup>9</sup> CFU/ml  
の菌浮遊液を作成した. 初回は 0.5×10<sup>9</sup> CFU  
/ml, 1 ml を成熟雄性日本白色種兎 (1,800 g~  
2,200 g) に静注し, 以後 2 週毎, 菌濃度を 1.0,

1.5, 2.0×10<sup>9</sup> CFU/ml と漸増しながら 1 ml 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 O75K1 血清を作成した。O4, O6 の特異抗血清は Bacto-*E. coli* O antiserum (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、0.15 M/l NaCl で大腸菌を 10<sup>9</sup> CFU/ml に調整し、120°C、1 時間加熱後、0.15 M/l NaCl で 2 回洗浄した菌液を用いて菌体凝集法<sup>12</sup> 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<sup>11</sup> 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 10 ml に対し、0.05 ml 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<sup>6</sup> または 10<sup>7</sup>/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、1,500 rpm、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°C 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<sup>13</sup> の方法に従って <sup>3</sup>H 標識した。すなわち、<sup>3</sup>H-Lysine (37 MBq/ml, Amersham Japan, 東京) 1 ml を加えた Luria 培地 250 ml に、BBL 培地 (日本ベクトン・ディッキンソン, 大阪) で 37°C 一夜培養した大腸菌を接種し、37°C、一夜培養した。<sup>3</sup>H 標識菌は 0.15 M/l NaCl で洗浄して 8×10<sup>8</sup> CFU/ml に調整した。

多核白血球の貪食能は Peterson ら<sup>14</sup> 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 1×10<sup>7</sup>/ml の濃度に浮遊した。この浮遊液 1.8 ml に <sup>3</sup>H 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) × 100

血清の溶菌反応に対する抵抗性は、Leying ら<sup>15</sup> の方法を応用した。米増<sup>16</sup> の記載に従って、Mg 加 0.15 M/l NaCl (0.15 M/l NaCl 溶液に MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>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 <sup>3</sup>H-Lysine 標識大腸菌を, 終濃度  $8 \times 10^8$  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 ( $8 \times 10^8$ /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,

$$\text{溶菌率} = (\text{上清に放出された isotope の cpm} / \text{total bacterial cpm}) \times 100$$

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<sup>17</sup>の方法に従って, Luria 培地<sup>8</sup>で培養して集めた *E. coli* の乾燥菌体 (10 g) 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<sup>18</sup>の方法に従った。大腸菌を Casamino acid medium (Watson<sup>19</sup>の変法<sup>18</sup>) 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 CaCl<sub>2</sub> 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<sup>20</sup>, Micro-Ouchterlony 法<sup>21</sup>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 50μg/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 50μl 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, barbitol 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 10μl 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<sup>22</sup>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<sup>23</sup>を用いて行った。また, 核酸の混入は, 蒸溜水に溶解した抗原液 100μg/ml を光路 1 cm 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スystem (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<sup>24</sup> 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,  $1 \times 10^6$  /ml に調整した. 多核球浮遊液 300 $\mu$ l に 50  $\mu$ l 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 $\mu$ l 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,  $\chi^2$  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 倍の希釈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 O75K1 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).

## 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

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	$\times 1,280$	$\times 20 \downarrow$	$\times 20 \downarrow$	$\times 20 \downarrow$	$\times 20 \downarrow$	$\times 1,280$	$\times 20 \downarrow$	$\times 20 \downarrow$	$\times 20 \downarrow$
E. coli O2 antiserum	$\times 20 \downarrow$	$\times 1,280$	$\times 20 \downarrow$	$\times 20 \downarrow$	$\times 20 \downarrow$	$\times 20 \downarrow$	$\times 1,280$	$\times 20 \downarrow$	$\times 20 \downarrow$
E. coli O4 antiserum (Difco)	$\times 20 \downarrow$	$\times 20 \downarrow$	$\times 640$	$\times 20 \downarrow$	$\times 20 \downarrow$	$\times 20 \downarrow$	$\times 20 \downarrow$	$\times 20 \downarrow$	$\times 20 \downarrow$
E. coli O6 antiserum (Difco)	$\times 20 \downarrow$	$\times 20 \downarrow$	$\times 20 \downarrow$	$\times 640$	$\times 20 \downarrow$	$\times 20 \downarrow$	$\times 20 \downarrow$	$\times 20 \downarrow$	$\times 20 \downarrow$
E. coli O75 antiserum	$\times 20 \downarrow$	$\times 20 \downarrow$	$\times 20 \downarrow$	$\times 20 \downarrow$	$\times 1,280$	$\times 20 \downarrow$	$\times 20 \downarrow$	$\times 20 \downarrow$	$\times 20 \downarrow$

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 meningitidis group B antiserum	$\times 20 \downarrow$	$\times 20 \downarrow$	$\times 20 \downarrow$	$\times 20 \downarrow$	$\times 320$	$\times 320$	$\times 320$	$\times 20 \downarrow$	$\times 20 \downarrow$

Living bacterial suspensions ( $10^9$  CFU/ml) were mixed with serially diluted antisera.  
\* Numbers indicate the dilution titers of antisera.

**Table 4** Numbers of serotypes of *E. coli* obtained from urine 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	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

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

O antigen	K1 or P-f		P-f											
	K1 (+)	P-f (+)	P-f (+)	P-f (-)										
O1 (n=9)	1	<table border="0"> <tr><td>6</td></tr> <tr><td>2</td></tr> <tr><td>* 3 *</td></tr> <tr><td>1</td></tr> <tr><td>2</td></tr> <tr><td>12</td></tr> </table>	6	2	* 3 *	1	2	12	<table border="0"> <tr><td>5</td></tr> <tr><td>21</td></tr> </table>	5	21	<table border="0"> <tr><td>7</td></tr> <tr><td>45</td></tr> </table>	7	45
6														
2														
* 3 *														
1														
2														
12														
5														
21														
7														
45														
O2 (n=4)	0													
O4 (n=6)	1													
O6 (n=10)	1													
O75 (n=5)	2													
rough (n=3)	0													
other (n=41)	7	12	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

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)。

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

**Table 6**  $^3\text{H}$ -labeling indexes of various *E. coli*

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

An inoculum of *E. coli* and 37 MBq of  $^3\text{H}$ -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 ( $8 \times 10^8$  CFU/ml).

は認められなかった (Table 5).

### 3. 大腸菌の標識率

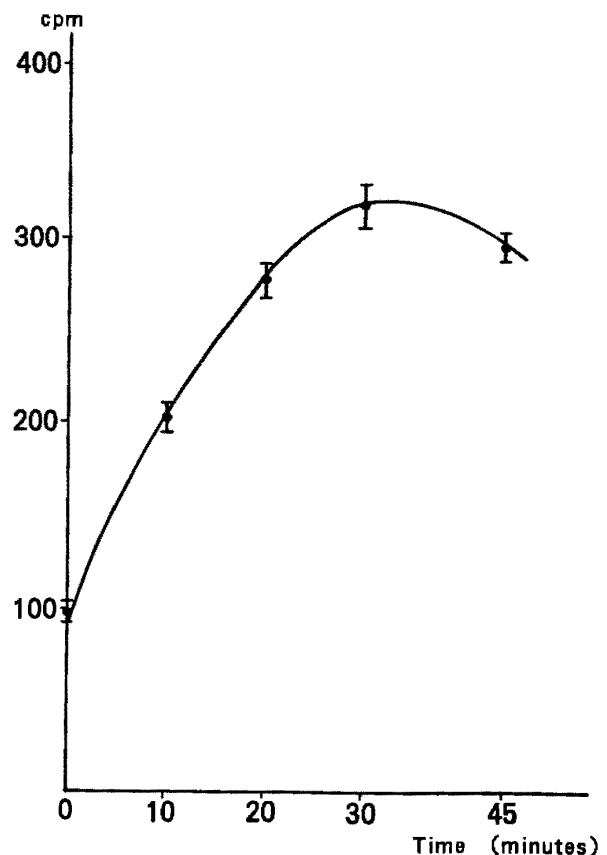
Y-1, Y-2, U-5, B-1, B-2 の 5 株の大腸菌の  $^3\text{H}$ -Lysine 標識率は, それぞれ  $2.4 \times 10^{-5}$  cpm/CFU,  $1.4 \times 10^{-5}$  cpm/CFU,  $1.2 \times 10^{-5}$  cpm/CFU,  $0.9 \times 10^{-5}$  cpm/CFU,  $1.9 \times 10^{-5}$  cpm/CFU であった (Table 6).

### 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 (318 cpm) を示し, 貪食率は17.3%であった (Fig. 1). Y-1, Y-2, U-5, B-1, B-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).

### 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 による溶菌率を検討したところ, U-5 が  $3.5 \pm 0.6\%$



**Fig. 1** Kinetics of human PMN engulfment of  $^3\text{H}$ -*E. coli* B-2(O14: H(-): K7: P-f(+): hemolysin(-))

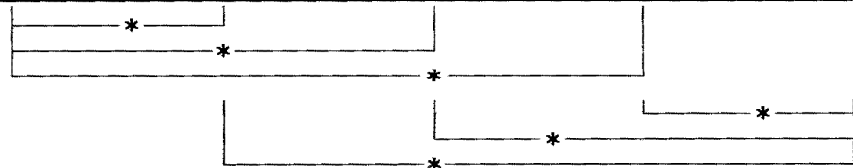
The mixture of PMN and  $^3\text{H}$ -bacterial suspension in 8% pooled serum was incubated at 37°C for 0, 10, 20, 30, or 45 minutes.  $^3\text{H}$  incorporated into the leukocyte was counted by a liquid scintillation counter.

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



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

strain	Y-1 O1 : H7 : K1 P-f(-) $\alpha$ -hemolysin(+)	Y-2 O2 : H4 : K1 P-f(-) $\alpha$ -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 $\pm$ 2.0	28.5 $\pm$ 4.5	34.3 $\pm$ 4.2	30.0 $\pm$ 6.0	16.9 $\pm$ 2.8



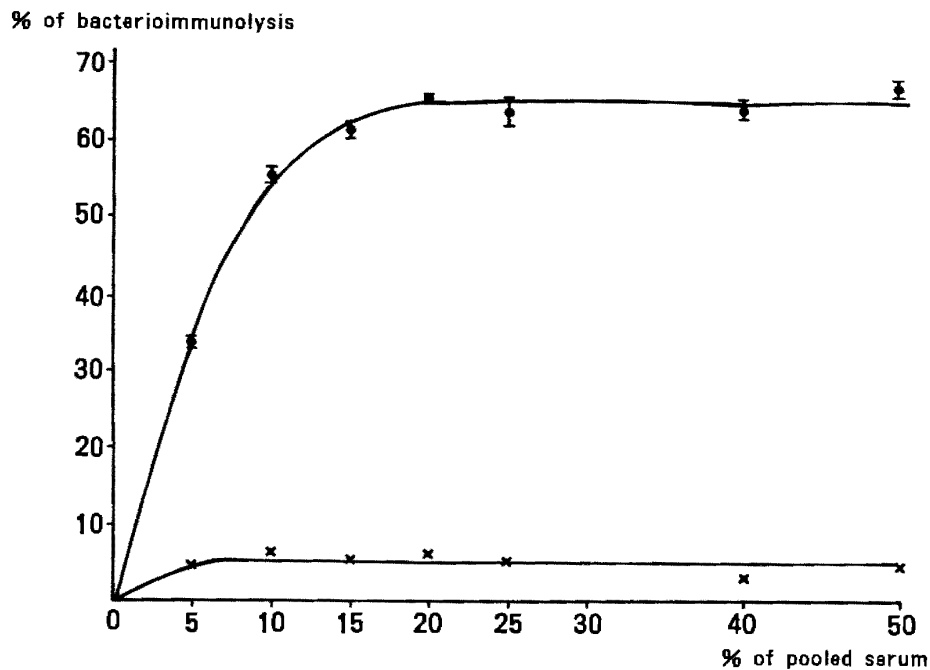
\* p < 0.01

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



**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, 30 minutes) 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)  $\times$  100

**Table 8** The percent bacterioimmunolysis by pooled sera

pooled serum lot No.	strain	Y-1	Y-2	U-5	B-1	B-2
	O1 : H7 : K1 P-f(-) $\alpha$ -hemolysin(+)	O2 : H4 : K1 P-f(-) $\alpha$ -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 $\pm$ SD	34.5 $\pm$ 1.8	17.2 $\pm$ 2.8	3.5 $\pm$ 0.6	14.2 $\pm$ 1.8	63.8 $\pm$ 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.

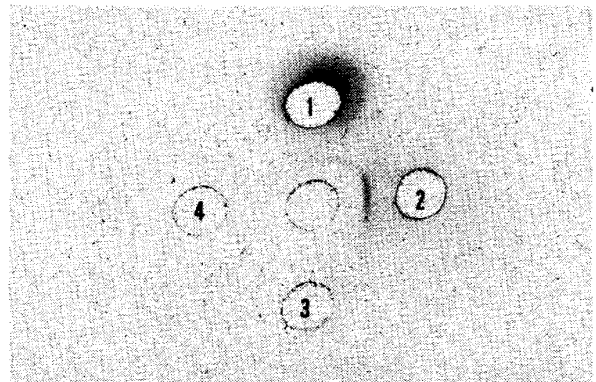
The percent of bacterioimmunolysis = (mean cpm of supernate / mean cpm of total bacteria)  $\times 100$ .

意に溶菌率が低く、血清抗抵性を示した (いずれも  $p < 0.05$ ) (Table 8).

#### 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(-) :  $\alpha$ -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(-) :  $\alpha$ -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



**Fig. 3** Immunodiffusion figure by the Micro-Ouchterlony assay. To the center well was added 10  $\mu$ l of 075 antigen (500  $\mu$ g/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, 0.15 M/l 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.

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。

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

**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 <sup>*1</sup>	2.4	3.0	4.0	3.8	2.8	ND	ND	ND
hexose <sup>*1</sup>	38.0	33.0	40.0	25.0	50.0	ND	ND	35.0
sialic acid <sup>*1</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	70.0	5.6	ND
Absorbance <sup>*2</sup>								
A <sup>1 cm</sup> <sub>230 nm</sub>	0.101	0.194	0.200	0.137	0.186	0.057	0.089	0.165
A <sup>1 cm</sup> <sub>260 nm</sub>	0.209	0.366	0.357	0.205	0.375	0.029	0.056	0.111
A <sup>1 cm</sup> <sub>280 nm</sub>	0.113	0.191	0.191	0.116	0.192	0.019	0.042	0.100
Endotoxin <sup>*2</sup> (EU/ml)	scale over	scale over	scale over	scale over	scale over	319	64	110

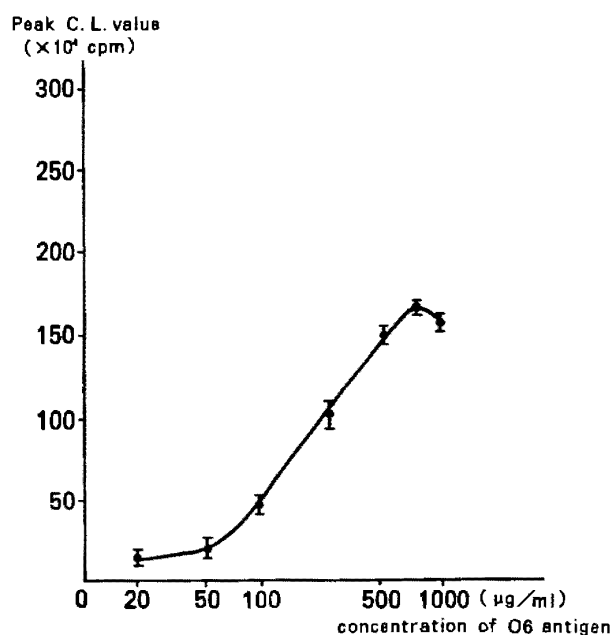
scale over : more than  $5 \times 10^4$  EU/ml      ND : not detectable

\*1 :  $\mu\text{g} / 100 \mu\text{g}$  dry weight      \*2 :  $100 \mu\text{g}$  dry weight/ml distilled water

菌免疫血清 (抗大腸菌 O75K1) を周辺の well に入れた 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  $100 \mu\text{g}$  を  $1 \text{ ml}$  の蒸留水に溶解して, 蛋白, hexose, シアル酸,  $230, 260, 280 \text{ nm}$  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  $100 \mu\text{g}$  あたり  $5 \mu\text{g}$  以下であったが, hexose は 5 種の O 抗原では  $25 \sim 50 \mu\text{g} / 100 \mu\text{g}$  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  $260 \text{ nm}$  で peak を示し,  $0.20 \sim 0.38$  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  $230 \text{ nm}$  が peak で  $0.05 \sim 0.17$  の間であった.

Endotoxin 活性は, O 抗原ではいずれも  $5 \times 10^4$  endotoxin unit (EU)/ml 以上と高値であったが, K 抗原ではいずれも  $64 \sim 319 \text{ EU} / \text{ml}$



**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  $750 \mu\text{g} / \text{ml}$  of O6 antigen.

を示したに過ぎなかった. (Table 9).

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

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  $20, 50, 100, 250, 500, 750,$

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

O antigen 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	*2	*1
	*1	*2	*1

\*1  $p < 0.05$  \*2  $p < 0.001$

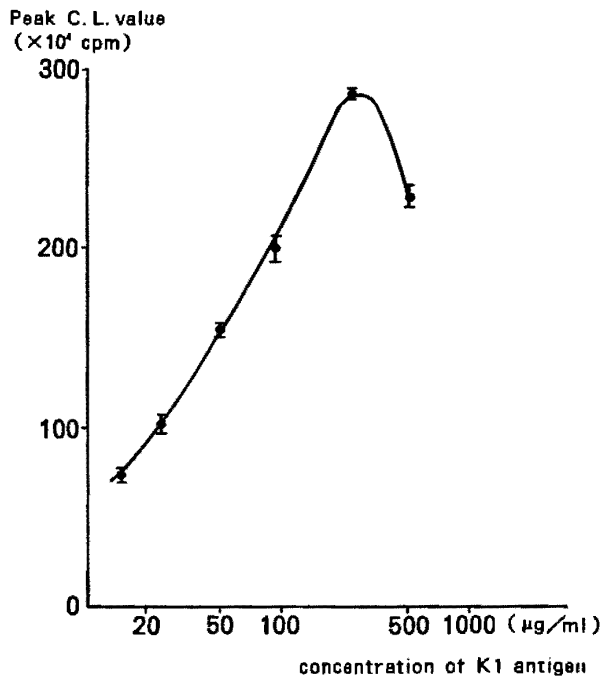
PMN : polymorphonuclear leukocyte, SD : standard deviation

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

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

1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$  で C. L. 活性を測定した。peak C. L. 値はO抗原量が  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  から上昇し始め、 $750 \mu\text{g}/\text{ml}$  では  $163.5 (\times 10^4 \text{ cpm})$  と最も強い C. L. を示し、 $1,000 \mu\text{g}/\text{ml}$  では  $155.0 (\times 10^4 \text{ cpm})$  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  $250 \mu\text{g}/\text{ml}$  での peak C. L. 値を測定した結果は、O1抗原では  $105.7 \pm 13.0 (\times 10^4 \text{ cpm})$ 、O44抗原では  $106.7 \pm 21.4 (\times 10^4 \text{ cpm})$  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)。

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  $285.2 (\times 10^4 \text{ cpm})$  と最高値を示し、 $500 \mu\text{g}/\text{ml}$  では  $226.4 (\times 10^4 \text{ cpm})$  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,



**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  $250 \mu\text{g}/\text{ml}$  of K1 antigen.

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

K antigen	K1	K7	K74
human PMN			
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  $\mu$ g dry weight/ml (final concentration) of K antigen.

K74, K7 100 $\mu$ g/ml で刺激した多核白血球 peak C. L. 値は, K1 抗原では 202.8 $\pm$ 69.7 ( $\times 10^4$  cpm), K74 抗原では 254.4 $\pm$ 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).

### 考 察

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 家兔血清は, 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 群髄膜炎菌家兔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<sup>18,25</sup>, 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<sup>1</sup>, 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<sup>1,26</sup>, 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<sup>27</sup>. 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<sup>25,28,29</sup>. また, P-f 保有大腸菌は, 上部尿路粘膜の  $\alpha$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Gal からなる受容体に特異的に接着し<sup>30</sup>, 尿路感染の初期段階に重要な因子と考えられている<sup>5</sup>. 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<sup>1,3,28,30</sup>, 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.

$^3\text{H}$ -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<sup>13</sup> 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ため, 単純に標識率が悪いと判断できないと考えられる。

健常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<sup>13</sup>, Peterson ら<sup>14</sup> 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(-) :  $\alpha$ -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<sup>31,32</sup>, 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<sup>33</sup>。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<sup>33</sup> 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<sup>34</sup>, 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(-):  $\alpha$ -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<sup>15,33,35</sup> 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<sup>35,36</sup>。Hughes C. ら<sup>36</sup> 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テストで 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テストで 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 lip-

opolysaccharide 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<sup>37,38</sup>、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<sup>38</sup>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<sup>39</sup>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付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群髄膜炎菌家兔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, 松本頴樹. 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. 腸内細菌検査法. 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. Leying 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  $\alpha$ ) 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,  $\phi$ rskov F,  $\phi$ 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. Källenius 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. Correlation 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, Fasmon 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.