

氏 名 (本籍) とよ 豊 た 田 せい 精 いち 一

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 第 1995 号

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 63 年 2 月 24 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 昭 和 56 年 3 月
東 北 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業

学 位 論 文 題 目 尿 路 感 染 防 御 機 構 の 研 究
尿 中 マ ン ノ ー ス の 感 染 防 御 に お け る 役 割

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 折 笠 精 一 教 授 今 野 淳

教 授 菅 村 和 夫

論文内容要旨

はじめに

細菌が感染をひきおこすためには、様々な感染防御機構の中でも排尿という洗浄作用にまけずに粘膜に付着することが最初の重要なステップである。この付着に関与する特異的な因子として細菌線毛とそれに対する粘膜のリセプターの役割が注目されている。細菌線毛はIからVI型、P型及び性線毛等に分類されるが、I型線毛は普通線毛ともいわれるほど一般的で、マンノースをリセプターとして付着すると考えられている。従って尿中にマンノースが存在すれば細菌の線毛をマンノースが覆い、結果としてI型線毛による粘膜付着は起こらないと考えられる。

目的

I) 尿中にマンノースが存在するか否か、存在するとすればどの程度存在するかを明らかにする。

II) 尿中に存在する程度のマンノースが感染防御として働くかどうかを検討する。

I) の手段として高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて尿中マンノースの検出を試み、II) の手段として大腸菌のモルモット赤血球凝集阻止最小マンノース濃度を測定した。

I. HPLCによる尿中マンノースの検出

(方法) 糖がホウ酸塩緩衝液中で負に荷電して泳動することを利用して陰イオン交換法により分離し、アルギニンと反応させ蛍光検出法で検出する。まず本法の再現性をマンノース標品を用いて検討し、その後健常者49例、膀胱炎137例を対象に尿中マンノースの検出を試みた。尿は除蛋白後Sep-Pak[®]₁₈及びミリポアフィルターでろ過しその20 μ lを注入した。

(結果) 本法によるマンノース標品の保持時間のC.V.値は0.91%、0.12%、検出濃度のC.V.値は1.18%で十分な再現性がみられた。なお、マンノースの検出限界は0.02 μ gであった。

尿中マンノースは極く微量であり、近傍のピークの肩になったり隠れたりするため、マンノースのピークの現れ方により4つのTypeに分けた。Type Iはマンノースが単一のピークとして出現し、濃度が測定できた場合で膀胱炎24例であった。その濃度は2.6から108.7 μ g/mlであったが、ほとんどは20 μ l/ml以下の極く微量であった。Type IIはマンノースが近傍のピークの肩になり存在はわかるが濃度測定ができない場合で健常者26例、膀胱炎30例であった。Type IIIは他の大きなピークに隠れてマンノースのピークを同定できない場合で健常者9名、膀胱炎18名であった。Type IVは検出限界以下の場合で健常者14例、膀胱炎65例であった。Type III, Type

IVの例ではマンノースの存在が確認されないが、おそらく微量ながら存在すると思われる。

II. 赤血球凝集阻止最小マンノース濃度の測定

次に、極く微量に存在する尿中マンノースが感染防御に役立つかどうかを検討した。

(方法) Cooked meat 培地に保存した膀胱炎起炎大腸菌26株をTryptic soy brothで37℃, 8時間増菌後, 生理食塩水で洗浄し, 赤血球凝集及び線毛保有率の測定に使用する菌液とした。また, これらの菌液がどの程度線毛をだしているかをみるために, 陰性染色後透過電顕で観察し線毛保有率を求めた。

赤血球凝集試験はマイクロウエルプレートで行った。菌液と2%モルモット赤血球浮遊液を室温で2時間反応させ凝集の有無を判定した。この試験から凝集陽性を示す最小菌液濃度を各菌株について求め, この菌液濃度でマンノースによる凝集阻止試験を行った。

(結果) 線毛が全くでていない株が3株, 100%でている株が2株あり, 26株全体の線毛保有率は0から100%であった。同じ培養条件でも各菌株で線毛の保有率に違いがみられた。

I型線毛保有菌は26株中11株で, これらの菌液によるモルモット赤血球阻止最小マンノース濃度は0.6から156 $\mu\text{g/ml}$ で, 11株中7株は20 $\mu\text{g/ml}$ 以下であり尿中マンノース濃度ほどの極く微量であった。このことから尿中に存在する程度の微量のマンノースだけでも, 菌株によっては尿路上皮への付着を阻止する可能性が示唆された。

結 論

1) 高速液体クロマトグラフィーにより, 尿中には微量ながらマンノースが存在することが確認された。

2) これら微量濃度の単糖のマンノースだけでもI型線毛保有大腸菌のモルモット赤血球凝集を阻止することがわかり, 尿中の微量マンノースがI型線毛を介する細菌の粘膜付着を阻止する可能性が示唆された。

さらに, マンノース以外にも尿中のTamm-Horsfall protein, 赤血球, 白血球, 剥離上皮などは自らに細菌を付着させ, 排尿とともに尿路外へ排出され, 結果として細菌の粘膜付着を妨げていると考えられる。マンノースなどの尿中微量分物を含めた様々な宿主の防御機構には個人差, 性差, 年齢差, 性周期による変化があると考えられ, このことが尿路感染に罹患しやすい, しやすいを決めている一因と思われる。今後さらに検討したい。

審査結果の要旨

尿路感染防御機構について多くの研究がなされているが、いまだ尿中微量物質という点から感染防御を考えた研究はない。この研究は細菌が粘膜に付着する時に重要といわれる線毛の中で最も一般的な I 型線毛のリセプター物質であるマンノースに注目し、尿中にマンノースが存在すれば細菌の粘膜付着を阻止するという発想にたち、尿中のマンノースを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で検出した。そして尿中に存在する程度の微量のマンノースが、感染防御に役立つかどうかを、細菌とモルモット赤血球凝集を阻止する最小マンノース濃度を求め検討している。

1) HPLCによる尿中マンノースの検出

優れた糖の検出法でも微量な糖の検出は難しく、尿中マンノースについても詳細な報告はない。著者は陰イオン交換法で分離後、アルギニンを用いたポストカラム蛍光検出法で 186 例の尿中マンノースの検出を試み、その 80 例にマンノースの存在を確認し、24 例で濃度の測定も行われ、その濃度は $2.6\sim 108.7\ \mu\text{g}/\text{ml}$ と報告している。マンノースの存在が確認されなかった 106 例については、近接する他のピークに隠れている例 27 例、検出限界 ($2.0\ \mu\text{g}/\text{ml}$) 以下 79 例あり、これらも微量ながらマンノースは存在すると推測している。より優れた検出法の開発が望まれるが、本研究ほど尿中マンノースの検出について詳細に述べた報告はない。

2) 赤血球凝集阻止最小マンノース濃度の測定

膀胱炎起炎大腸菌 26 株のうち I 型線毛保有菌株は 11 株で、これらの菌とモルモット赤血球との凝集を阻止する最小マンノース濃度は $0.6\sim 156\ \mu\text{g}/\text{ml}$ と微量であった。従って尿中に存在する程度の微量のマンノースでも I 型線毛を介する細菌の粘膜付着を阻止する可能性が示唆されている。これは *in vitro* の実験で、そのまま *in vivo* に反映されるとは限らないが、マンノースが粘膜付着を阻止する濃度を定量的に測定し、類推できる点で優れている。

また、これらの凝集試験に用いた菌が実際に線毛をどの程度保有しているかについて検討を加えている。菌を陰性染色後透過型電子顕微鏡で観察し、写真撮影後線毛保有菌数を観察全菌数で除したのから線毛保有率を求めたところ、26 株の線毛保有率は同じ培養条件でも各菌株で異なり、0~100%であった。このことより各宿主の環境の違いが線毛保有率に違いを生じさせ、ひいては病原性に影響を与えたと考えられる。

以上、この研究は尿路感染防御における尿中微量物質の役割という新しい発想にたち、尿中のマンノースに着目して、その感染防御における役割を検討した独創的且つ有用な内容で、学位授与に値する。