

主論文

①

In vitro 実験モデルによる複雑性尿路感染症の解析

岡山大学医学部泌尿器科学教室 (主任 大森弘之教授)

西谷 嘉夫

AN ANALYSIS OF COMPLICATED URINARY TRACT INFECTIONS
USING A NEWLY-DEVELOPED EXPERIMENTAL MODEL

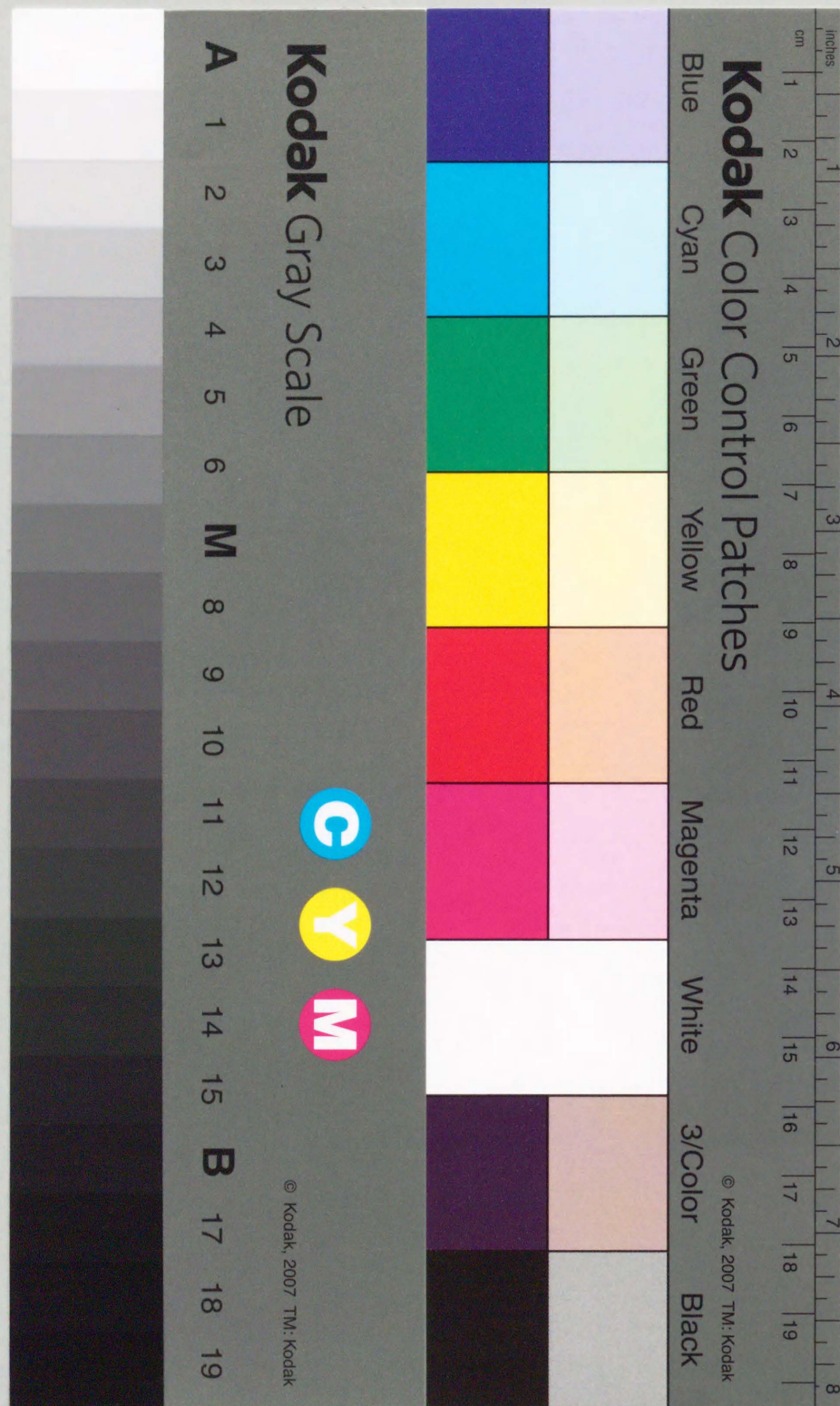
YOSHIO NISHITANI

Department of Urology (Director: Prof. H. Ohmori),
Okayama University School of Medicine, Okayama, Japan

西日本泌尿器科別冊

1991年5月発行

(第53巻第5号)



In vitro 実験モデルによる複雑性尿路感染症の解析

岡山大学医学部泌尿器科学教室 (主任 大森弘之教授)

西 谷 嘉 夫

AN ANALYSIS OF COMPLICATED URINARY TRACT INFECTIONS USING A NEWLY-DEVELOPED EXPERIMENTAL MODEL

YOSHIO NISHITANI

Department of Urology (Director: Prof. H. Ohmori),
Okayama University School of Medicine, Okayama, Japan

In order to evaluate the growth mode of uropathogenic bacteria and the therapeutic effects of antibiotics for the treatment of complicated urinary tract infections (UTI), a new experimental model of the urinary tract was developed *in vitro*. An artificial kidney and bladder connected with a modified Robbins device could reproduce the various therapeutic conditions resembling those of patients with complicated UTI. In the experiment using *Pseudomonas aeruginosa*, a thick adherent biofilm developed on the silicon disk of this device within 8 hours and bacteria in the biofilm were found to be still viable after 8 hours of exposure to an extremely high concentration (1000~2000 MIC) of gentamicin or piperacillin. This biofilm of *P. aeruginosa* also identified macroscopic aggregates in artificial urine, and this might be responsible for the prompt regrowth of bacteria following antibiotic treatment in the system without artificial materials. The presence of an artificial infectious stone, however, was a cause of regrowth in the system of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*. On the other hand, the presence of residual urine was not a cause of intractability to chemotherapy in this system.

(Nishihon J. Urol. 53: 717-727, 1991)

key words: *in vitro* experimental model, complicated urinary tract infection, biofilm

キーワード: *in vitro* 実験モデル, 複雑性尿路感染症, バイオフィーム

緒 言

尿路感染症 (UTI) に対して抗菌化学療法を行う場合, その臨床効果を予測するにあたってまず重視されるのが, 使用する薬剤の起炎菌に対する最小発育阻止濃度 (MIC) である。一方, 特に複雑性 UTI において, 使用薬剤に感受性の菌株であるにもかかわらず, 治療後に同一菌株による UTI の再燃を見る事が稀ではない。UTI に対する抗菌化学療法効果は, 現実には薬剤側の要因である抗菌力および体内動態の特性に加え, 感染防御能の低下の有無, 尿路の基礎疾患にともなう尿流障害の程度, ならびに腎機能障害の有無などの宿主側の要因, さらには起炎菌の増殖様式といった細菌側の因子によって大きく影響を受ける。仮に, 尿路留置カテーテル表面に細菌が付着し, biofilm を形成して増殖した場合には UTI の

治療は困難をきわめ, 宿主の免疫能が低下した状態では全身性の感染症に移行する危険性もある。

今回宿主側要因としての薬剤の尿中排泄ならびに複雑性 UTI における種々の病態を simulate する *in vitro* 実験モデル系を新規に作成した。このモデル系を用いてカテーテル表面における biofilm の形成とその性状について検討するとともに, 種々の病態モデル下での治療実験を行った。

対象および方法

1. 試験菌

臨床分離株の *Pseudomonas aeruginosa* 29 株, *Enterococcus faecalis* 20 株, *Escherichia coli* 20 株ならびに *E. coli* 標準株 (NIHJ JC-2) を用いて, カテーテル素材表面における付着性の差を検討するとともに, その後の治

療実験に用いる菌株の選定を行った。各菌株は2代継代培養後、対数増殖期の状態で使用した。終濃度 10^6 cfu/ml に調整した菌液中に直径 1 cm, 厚さ 1 mm のシリコン樹脂性 disk (以下 silicon disk) を沈め、室温下で2時間静置後 disk を採取した。採取した disk は 0.01 M phosphate buffer saline (pH 7.4: 以下 PBS) にて洗浄後、ホルマリン固定に引き続いて methylene blue で染色し、肉眼的ならびに光学顕微鏡的に細菌の付着の程度を観察した。付着性の判定については便宜的に disk 面がほとんど確認できない程度に付着したものを(≡), disk 面の付着面積が 50%以上のもを(+), disk 面の付着面積が 50%未満のもを(±), 菌の付着が散在性であるものを(±), 付着が認められないものを(-)とした。

なお、今回液体培地としては、すべて 0.4% の乾燥ブイオンを添加した人工尿¹⁾を用いた。

2. 尿路モデル (Fig. 1)

尿路モデルにおける腎臓として日立製作所 L-6200 形インテリジェントポンプを用い、時間尿量、すなわち時間送液量の設定を行うと共に、抗菌剤投与時の尿中濃度推移を人工尿中に simulate した。膀胱モデルは、内面の疎水性を高めるためにワセリンコートをしたシリンダーに、静電容量センサーと電磁弁を組合せて、一回排尿量、排尿間隔ならびに残尿量の設定を行った。シリンダーと電磁弁との間のドレーンパイプは可能な限り短くし、dead space を可及的に減少させた。感染結石モデ

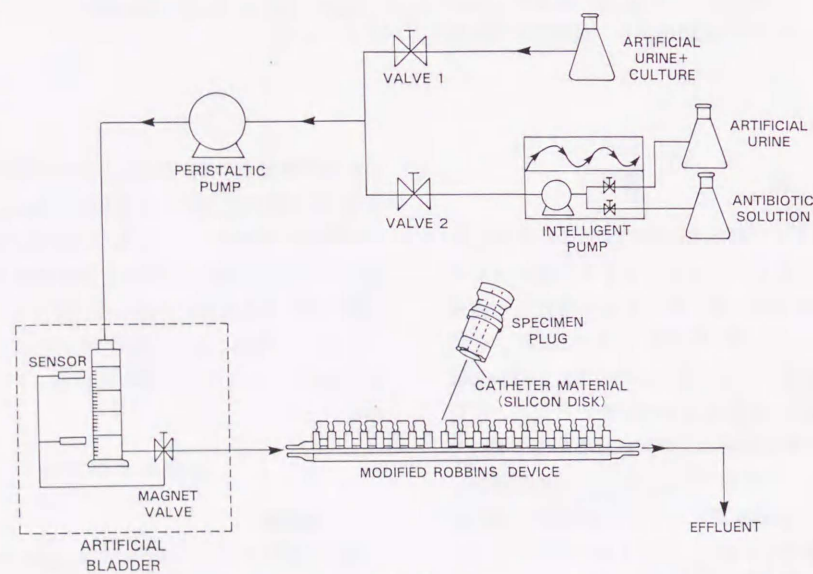


Fig. 1 Experimental system using artificial bladder connected with modified Robbins device and intelligent pump

ルとしては、再現性ならびに加工のしやすさを考え、終濃度 10^6 cfu/ml の菌液と共に 4 時間 incubate した直径約 5 mm の活性炭を用いた。尿路留置カテーテルモデルとしては modified Robbins device²⁾を用い、sampling disk としては前述の silicon disk を用いた。

3. カテーテル素材 (シリコン樹脂) 上における biofilm 形成の電顕的観察

膀胱モデル中の人工尿に終濃度が 10^6 cfu/ml となるよう菌を接種し、接続した modified Robbins device 内を 37°C にて 40 ml/hr の流速で灌流した。灌流開始後経時的に sampling port より sampling disk を無菌的に採取し、走査電顕による disk 表面の観察を行った。また、*P. aeruginosa* に関しては灌流開始 8 時間後より $20 \mu\text{g/ml}$ および $800 \mu\text{g/ml}$ に調整した piperacillin (PIPC) および gentamicin (GM) の人工尿溶液、ついで抗菌剤なしの人工尿にてそれぞれ 8 時間の灌流を行い、薬剤作用時ならびに作用後の biofilm の変化をあわせて観察した。

4. 複雑性 UTI 治療実験

今回治療実験に用いる薬剤としては、薬剤作用後の菌の再増殖についても検討を行う目的で、静菌的抗菌作用を持ち、かつ抗緑膿菌活性の高いと考えられる β -lactam 剤である PIPC を主として用いた。

治療実験は、膀胱モデル中の人工尿に終濃度が 10^6 cfu/ml となるよう菌を接種後、腎臓モデルによって健康人における PIPC の尿中排泄を simulate した人工尿を

37°C にて 50 ml/hr の流速で膀胱モデル内に注入し、経時的に生菌数測定を行った。膀胱モデルの最大容量は 200 ml とし、残尿設定系の残尿量は 100 ml とした。感染結石モデルでは、前述したように菌とともに incubate した活性炭を膀胱モデル内に挿入し治療実験を行った。また、菌の増殖に残尿がおよぼす影響について検討するため、膀胱モデル内に 10^3 ないし 10^4 cfu/ml と、比較的低菌量の菌を接種後、人工尿を 100 ml/hr の流速で注入し、残尿あり、なしの系の間で菌数変化について比較を行った。膀胱モデル内の菌液の採取はドレーンパイプ接続部より 22 G 針を膀胱モデル内に刺入して無菌的に行い、生菌数測定には混釈培養法を用いた。

5. 走査型電子顕微鏡による観察

走査電顕用資料作成は、資料を 2.5% グルタルアルデヒド-PBS (pH 7.4) および 1% 四酸化オスミウム-PBS (pH 7.4) にて二重固定後エタノール系列で脱水し、酢酸イソアミルに置換後、臨界点乾燥、白金-パラジウム蒸着を行い日立製作所 S-570 型走査電子顕微鏡にて観察を行った。

結 果

1. 菌種間における個体表面への付着性の差違

P. aeruginosa 29 株の silicon disk 表面への付着性を Table 1 に示す。silicon disk との接触時間が 2 時間と短いにもかかわらず、多くの菌株で高い付着性が認められた。一方、*E. coli*, *E. faecalis* に関してはいずれの菌株もその付着性は(±)以下であり、短時間での有意の付着性は認められなかった。

2. カテーテル素材 (シリコン樹脂) 上における biofilm 形成の電顕的観察

試験菌としては、*P. aeruginosa* については前述の付着

実験において silicon disk への付着性が(≡)であった No. 210, No. 138 および付着性が(+)であった No. 200 の計 3 株を用いた。*E. coli* および *E. faecalis* については付着性に差がなかったため、それぞれ任意に 2 株ずつを選択し、実験に用いた (*E. coli*: No. 450, NIHJ JC-2, *E. faecalis*: H-118, No. 97)。

Fig. 2, 3, 4 に、*P. aeruginosa* 菌液送液開始 8 時間後ならびに *E. coli* 菌液送液開始 24 時間後に採取した silicon disk 表面の走査電顕像を示す。*P. aeruginosa* No. 210, No. 138 では 8 時間後においてすでに disk 表面全面に菌が付着して発育し、exopolysaccharide と思われる net 状ないし不定型の粘液様の構造物による菌体間の架橋ないし被覆を認め、すでに biofilm が完成されているものと考えられた (Fig. 2, 3)。短時間での disk 表面への付着性の低かった *P. aeruginosa* No. 200 では No. 210, No. 138 に比べて biofilm の形成能は低かった。*E. coli* の 2 株 (No. 450, NIHJ JC-2) では 20 時間後までは明らかな付着は認められなかったが、24 時間後では disk 表面のほぼ全面に菌の付着が認められた。しかし不定型の cell debris の付着を認めるものの粘液状の exopolysaccharide の存在は明らかではなかった (Fig. 4)。*E. faecalis* の 2 株 (H-118, No. 97) では 24 時間後においても散在性の付着を認めるのみであり、菌体外構造物の存在も明らかではなかった。

3. 抗菌剤作用時の biofilm の変化

試験菌としては前述の実験で短時間において biofilm を形成し、かつ試験薬剤に感受性 (MIC: PIPC $0.39 \mu\text{g/ml}$, GM $0.78 \mu\text{g/ml}$) である *P. aeruginosa* No. 210 を用いた。Fig. 5 および 6 に、前述の実験系において菌液を 8 時間送液し biofilm を作成後、 $800 \mu\text{g/ml}$ の GM および PIPC を含有する人工尿溶液を 8 時間送液後の電顕像

Table 1 The adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to the silicon disk surface graded by our arbitrary criteria

strain (No.)	grade of adherence	strain (No.)	grade of adherence	strain (No.)	grade of adherence
213	+	191	+	217	+~#
212	+	175	+	199	+~#
192	+	201	+~#	197	+~#
215	+~#	138	#	198	+
206	+~#	202	+~#	204	±
165	±~+	214	#	200	+
185	+~#	194	+	150	+~#
195	+	203	+~#	218	#
210	#	211	+~#	205	+~#
135	#	190	±		

を示す。GM を作用させた系では、表層の菌に多少の変形を認めるものの溶菌などの致死的な変化は認められなかった (Fig. 5)。PIPC を作用させた系では菌は filament 化しながら増殖を続け、disk 表面の菌層の厚みはむしろ増加していた (Fig. 6)。

Fig. 7, 8 に、前述の薬剤作用終了後人工尿を 8 時間送液後の電顕像を示す。GM 作用群、PIPC 作用群とも各菌体はほぼ正常の形態に復し、菌層の厚みはさらに増加していた (Fig. 7)。個々の菌体間、ないし菌体外の net 状



Fig. 2 SEM of bacterial colonizations on a silicon disk surface 8hrs after contact with artificial urine containing 10^6 cfu/ml of *P. aeruginosa* No. 138.

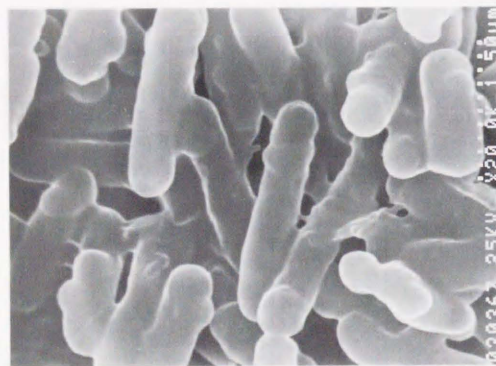


Fig. 3 A high magnification SEM of a part of Fig. 2, showing a biofilm formation.



Fig. 4 SEM of bacterial colonization on a silicon disk surface 8hrs after contact with artificial urine containing 10^6 cfu/ml of *E. coli* No. 450.



Fig. 5 SEM of a biofilm of *P. aeruginosa* No. 210 after 8hrs exposure to $800 \mu\text{g/ml}$ of GM.

の構造物は薬剤作用後においてその増加傾向が認められた (Fig. 8)。なお各薬剤を $20 \mu\text{g/ml}$ の濃度で作用させた場合にもほぼ同様の結果であった。

4. UTI 治療実験

以下の実験に用いた試験菌は、silicon disk への付着性ならびに PIPC に対する感受性により *P. aeruginosa* と

しては No. 210, *E. coli* としては NIHJ JC-2 および *E. faecalis* としては H-118 を選択した。

1) 残尿および異物なしの系における治療実験 (Fig. 9)

残尿および異物なしの系において、健康成人に PIPC 2 g を静脈内投与した際の尿中排泄を simulate して治療実験を行った。*E. coli* および *E. faecalis* では薬剤作用後の再増殖は強く抑制されていたが、*P. aeruginosa* では早期より再増殖が認められ、他の菌種に比較して治療直後においても多数の生菌が存在していた可能性が示唆された。



Fig. 6 SEM of a biofilm of *P. aeruginosa* No. 210 after 8hrs exposure to $800 \mu\text{g/ml}$ of PIPC.

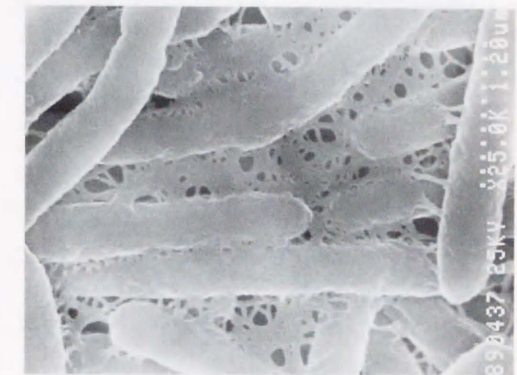


Fig. 8 SEM of a biofilm of *P. aeruginosa* No. 210 re-incubated for 8hrs in an artificial urine after 8hrs exposure to $800 \mu\text{g/ml}$ of PIPC.



Fig. 7 SEM of a biofilm of *P. aeruginosa* No. 210 re-incubated for 8hrs in an artificial urine after 8hrs exposure to $800 \mu\text{g/ml}$ of GM.

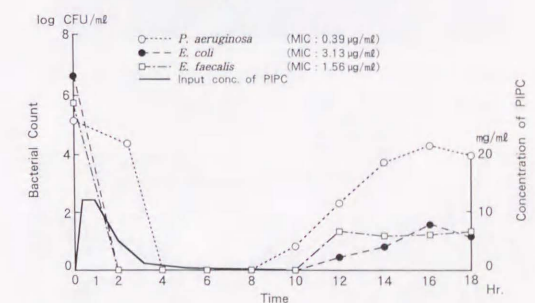


Fig. 9 Experimental growth curves of *P. aeruginosa*, *E. coli* and *E. faecalis* during and after the treatment of PIPC under the condition of bladder volume of 200 ml, no residual urine and urinary flow rate of 50 ml/h. The concentrations of PIPC in an artificial bladder were simulated with lapse of time to those in the urine after a single intra-venous administration of PIPC of 2g to a healthy adult.

なお、*P. aeruginosa* の治療実験中の膀胱モデル内には肉眼的に判別可能な大きさの多数の aggregate が認められた。Fig. 10 に、この aggregate の走査電顕像を示したが、silicon disk 上の biofilm と同様に粘液状物質に架橋ないし被覆された菌の凝集塊を認めた。

2) 残尿なしの系における感染結石の影響 (Fig. 11, 12, 13)

以下の実験では薬剤作用後の菌の再増殖について検討



Fig. 10 SEM of aggregates of *P. aeruginosa* No. 210 seen in an artificial bladder.

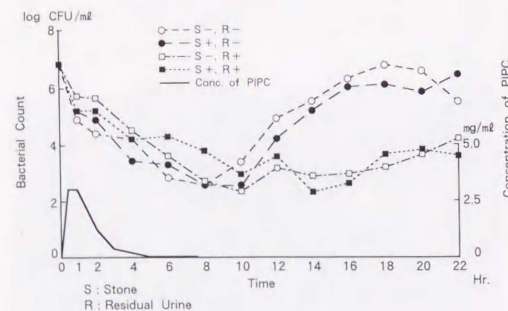


Fig. 11 Experimental growth curves of *P. aeruginosa* during and after the treatment of PIPC under the different four conditions. The concentrations of PIPC were simulated to those in the urine after a single intra-venous administration of PIPC of 500 mg to a healthy adult.

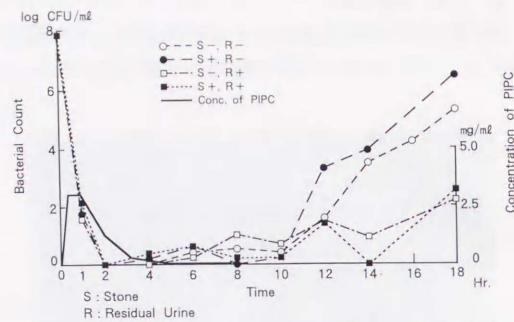


Fig. 12 Experimental growth curves of *E. coli* under the conditions described above (see Fig. 11).

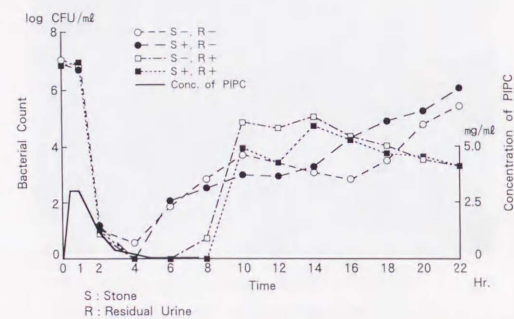


Fig. 13 Experimental growth curves of *E. faecalis* under the conditions described above (see Fig. 11).

するため、PIPC 500 mg 静脈内投与時の尿中排泄を simulate して作用させた。

E. coli, *E. faecalis* では感染結石モデル系で薬剤作用後の再増殖が早い傾向が認められたが、*P. aeruginosa* では感染結石あり、なしの系の間で差は認められなかった。

Fig. 14, 15, 16 に感染結石モデルとして用いた活性炭表面の走査電顕像を示す。*P. aeruginosa* では4時間の incubate 後には、すでに活性炭表面に biofilm を形成して菌が付着しており (Fig. 14)、活性炭断面においても同様の所見が認められた。この事より早期における活性炭の感染結石化が示唆されたが、前述の biofilm 同様の性質をもった菌の aggregate が存在するため低用量の薬剤作用下では感染結石あり、なしの系の間で再増殖に差がなかったものと考えられた。一方、*E. coli* (Fig. 15)、*E. faecalis* (Fig. 16) では活性炭表面への多数の菌の付着が認められるものの活性炭断面には散在性の付着を認めるのみであった。しかし、さらに長時間の incubate により、活性炭内外の菌の増殖に伴う感染結石化が生じ、薬

剤作用後の菌の再増殖に与える影響はさらに大きくなるものと考えられた。

3) 残尿の影響

異物の有無にかかわらず残尿が存在する場合の方が抗菌剤投与後の菌の再増殖は抑制され、その傾向は特に *E.*



Fig. 14 SEM of the surface of an artificial stone incubated with *P. aeruginosa* No. 210 for 4 hrs.



Fig. 15 SEM of the surface of an artificial stone incubated with *E. coli* No. 450 for 4 hrs.

coli において顕著であった。*E. faecalis* では、残尿設定群において、PIPC の同菌に対する殺菌力が低い (MBC > 100 μ g/ml) 事に起因すると思われる薬剤作用後の急激な菌数の増加を認めたが、その増加傾向は一過性であり、その後の再増殖は他の菌種同様抑制されていた (Fig. 11, 12, 13)。

低菌量接種後、治療を行わない系での菌量変化については、*E. coli*, *E. faecalis* では残尿なしの系において排尿による菌の wash out 効果による一過性の菌数減少を認め、経時的に残尿存在系における菌数が増える傾向にあった。*P. aeruginosa* についても同様の傾向を認めた

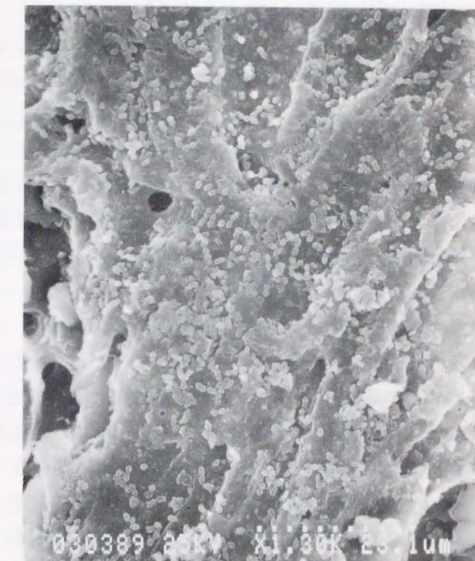


Fig. 16 SEM of the surface of an artificial stone incubated with *E. faecalis* H-118 for 4 hrs.

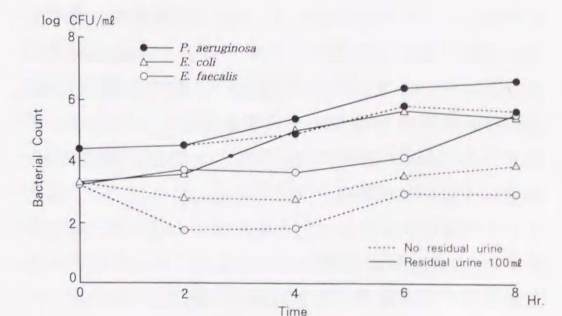


Fig. 17 Experimental growth curves of *P. aeruginosa*, *E. coli* and *E. faecalis* under the conditions with or without residual urine of 100 ml (bladder volume: 200 ml, urinary flow rate: 100 ml/h).

が、残尿あり、なしの系の間の菌数は他の菌種ほど大きく解離せず、また残尿なしの系における一過性の菌数の減少も認めなかった (Fig. 17)。

考 察

従来の *in vitro* 細菌感染症治療モデルにおける薬剤濃度は血中動態を simulate したものであり、dilution system を用いているため medium の補充に伴う system 内からの菌流出が避けられない³⁴⁾⁵⁾。仮にこれらの system を用いて抗菌剤の尿中排泄を medium 中に simulate する場合には、濃度勾配が血中濃度推移に比して著しく大きい場合、希釈に伴う菌量の変化が問題となる。一方、現実の感染症においては種々の生体防御反応が生じ、特に UTI では尿路粘膜下および尿中における非特異ならびに特異的 Ig 産生や好中球遊走などの局所反応、菌の付着した上皮細胞の剝離、脱落といった生体防御反応に加え、排尿に伴う菌量の減少が治癒機転に大きく影響しているものと考えられる。*in vitro* の実験系において、生体防御反応をモデル化する事は現実的には困難であるものの、排尿にともなう菌の排除機構を組込む事は可能である。

近年この点をふまえ、排尿機構を有する膀胱モデルを組込んだ UTI 治療実験についての報告がいくつか見受けられる⁶⁾⁷⁾⁸⁾ が、これらのモデル系には、排尿時に膀胱モデル内の菌液を完全に排除できない、drainage tube 留置にもとなす薬剤の拡散しにくい dead space が存在する、stirrer などの挿入が尿路内異物と同様に菌の付着、増殖の場となり、菌数に影響をおよぼす可能性があるなどの問題があり、今回新たに *in vitro* UTI 治療実験モデルを考案した。

この新しいモデル系においては排尿機構を system 内に組込むことの他に膀胱モデル内に感染結石や、異物などの挿入、あるいはカテーテルモデルである modified Robbins device を接続する事により、種々の複雑性尿路感染症の病態を simulate する事を可能にした。また、膀胱モデル内全面に菌が高度に付着した場合、治療実験の成績に少なからず影響を及ぼすと考えられたので、膀胱モデル内面をワセリンコートする事により内面の疎水性を高めた。また同様の理由から膀胱モデル内に stirrer などの異物は挿入せず、治療実験時に薬剤が拡散しにくい dead space を減少させるため、膀胱モデルから outlet valve 間の drainage tube は可及的に短くした。2g の PIPC 静脈内投与時の尿中排泄を simulate した治療実験の結果 *P. aeruginosa* 以外の菌種では薬剤作用後の菌の再増殖は強く抑制されており、モデル内に dead space

はほとんど存在しないものと考えられ、治療実験モデルとして充分使用に耐えるものであると考えられた。

今回行った尿路カテーテル素材である silicon disk への付着性の検討では *P. aeruginosa* において全般に高い付着性を認めたが、*E. coli*, *E. faecalis* では短時間で有意の付着を認めなかった。また、modified Robbins device を用いた実験の結果、短時間で silicon disk に付着する *P. aeruginosa* では早期に biofilm を形成したが、*E. coli* では付着に長時間を要し、*E. faecalis* では 24 時間後においても散在性の付着が認められるのみであり、それらの菌種では exopolysaccharide の産生を思わせる菌体外構造物も、観察した時間内 (24 時間) では明らかではなかった。

尿路感染症の発症には病原細菌の尿路腔への付着、ないし定着が必要であり、その様式としては 1) 細菌側の adhesin と、尿路内腔面を構成する上皮細胞上の receptor との間での特異的結合および 2) 細菌と尿路粘膜や尿路異物表面との非特異的結合に大別される。付着した細菌の増殖様式により差はあるものの、一般に宿主が早期に認識するのは主として前者の結合であり、その結果種々の炎症反応が生じ、効率的な病原細菌の排除が行われる。一方、後者の結合はイオン結合や細菌側の exopolysaccharide などによって媒介されるが、前者の特異的結合に比較するとその結合強度は比較的弱く、付着が起こった場合にも生体側の反応は比較的弱いと考えられている⁹⁾。後者の結合様式は残尿ないし尿路留置カテーテルを始めとする尿路内異物存在時の慢性複雑性 UTI における菌の付着様式と考えられ、現実にはそれらの症例では炎症反応に乏しいものが多い。

短時間で組織や固体表面に付着し、また biofilm を形成するという特性は、排尿による菌の wash out という生理的排除機構に逆らって粘膜やカテーテル表面に付着するために有利に働き、また尿路腔内に定着した後においても宿主に炎症反応を惹起しにくい事を意味しており、長期にわたる菌の存続を可能にする。これらは尿路上皮粘膜への特異的結合機構を持たない *P. aeruginosa* が、慢性複雑性 UTI、特にカテーテル留置例から高率に分離される¹⁰⁾ 主要な原因の一つであると考えられる。

P. aeruginosa は、おそらく最も普遍的な環境菌であると考えられており、その生体内外に広範に分布する能力は、種々多様な有機栄養を利用できる事に加えて、液中の固体表面に付着して biofilm を形成し、その中で増殖する事により外部からの攻撃因子に対し抵抗性を持つことで説明される¹¹⁾。biofilm の本体は菌の産生する exopolysaccharide matrix (glycocalyx) に菌体自身な

らびに液中の種々の固形物質、さらには他の共棲微生物が包埋されたものとされる¹¹⁾¹²⁾¹³⁾。*P. aeruginosa* の産生する glycocalyx の構造については、mannuronic acid と guluronic acid のポリマーである alginate がその主たる多糖成分¹⁴⁾である。この algininate は、ムコイド型 *P. aeruginosa* の産生する粘液物質の成分であり¹⁵⁾¹⁶⁾、ムコイド型 *P. aeruginosa* は、慢性呼吸器感染症から高率に分離されている¹⁷⁾。また、活性汚泥より分離された *Pseudomonas* sp. の菌体外多糖の分離、分別結果においてその糖鎖は glucosamine および glucose を始めとするヘキソースで構成されていたという報告¹⁸⁾もあり、UTI 由来の *P. aeruginosa* が産生する glycocalyx 構造の詳細については今後の検討を待ちたい。

biofilm を構成する菌体外の glycocalyx は、多価の陰イオンとしての性質を持ち、固体表面への付着に関与するだけでなく、一種のイオン交換樹脂として作用すると考えられ、この作用により外部の無機および有機物質を biofilm 内に取込む事ができるといわれている¹⁹⁾。また、いったん biofilm が形成されれば抗菌物質の菌体への到達が阻害されるとともに、好中球による貪食も浮遊細菌に対する場合と比較して低下する²⁰⁾²¹⁾²²⁾ 事より、生体内で増殖した細菌が biofilm を形成した場合、その除菌は非常に困難である。

modified Robbins device を用いた今回の検討結果より、いったん生成された biofilm は浮遊状態の菌に対する MIC の 1000 倍以上の高濃度の抗菌剤に抵抗性を示した。このことは、カテーテル留置症例においてカテーテル表面に biofilm が生成された場合、いかなる化学療法を行っても真の除菌効果は得られないことを示唆するものであり、尿路留置カテーテルの存在はそれ自体が最大の UTI 難治化および易再発化因子であるものと考えられる。また、今回、抗菌剤を作用させた biofilm において glycocalyx と考えられる net 状構造物の増加が認められたが、これは biofilm 高度形成性の菌では低栄養下、抗菌剤作用時などの細菌の増殖にとって不利な環境下では biofilm 内での菌の増殖が優位になる¹¹⁾ という従来の報告と一致するものであり、glycocalyx の産生性が環境の変化によって誘導あるいは修飾されうる可能性が示唆された。この点を考慮に入れると、臨床の場合において尿路カテーテル留置例に対して漫然と抗菌剤投与を続ける事は、薬剤耐性ならびに biofilm 高度形成性細菌の selection を起こすということに加え、より強固な biofilm を発育させるという意味においても慎むべきものであると考えられる。

一方、前述のように *P. aeruginosa* は正常の尿路に対

する病原性は低いが、いわゆる日和見感染の起炎菌となり、免疫不全状態の患者に合併した場合には重篤な全身性の感染症に移行する危険性もあるため、菌の reservoir となる biofilm を除去する必要がある。*P. aeruginosa* 感染症の多くは尿路留置カテーテルを基礎疾患とするが、その治療は現在のところ強力な化学療法ならびに早期のカテーテル抜去ないし入れ替えにとどまっているのが現状である。しかし、化学療法に関しては tobramycin (TOB) と PIPC の併用によって biofilm 内の生菌数を著明に減少させる事が可能であったとする報告²³⁾、カテーテルに関しては、素材中に銀を含有するカテーテルを用い、細菌尿の発生ならびにカテーテル表面への菌の付着を減少せしめたとの報告もあり²⁴⁾、今後、多剤併用を中心とする化学療法ならびにカテーテル素材についての両面からの検討が必要であろう。

今回用いた *P. aeruginosa* は、液中の固体表面に付着し、biofilm を形成するのみならず、液体培地中で浮遊細菌同士の凝集が認められ、その aggregate の走査電顕所見では silicon disk 上の biofilm 同様、net 状の構造物に菌体が保持されていた。また、今回行った感染結石や残尿が存在しない系での治療実験の結果、抗菌剤作用後の *P. aeruginosa* の再増殖は *E. coli*, *E. faecalis* に比較して速やかであり、また治療を行わない系での実験の結果、*P. aeruginosa* は他の菌種に比べ排尿による wash out 効果を受けにくかった。これは *P. aeruginosa* を起炎菌とする UTI においては、たとえカテーテル非留置例であっても尿中に biofilm と同様の性質をもった細菌の aggregate が存在する事を示唆するものであり、臨床においてしばしば経験される *P. aeruginosa* を起炎菌とする複雑性 UTI がカテーテル非留置例にもかかわらず難治性であり、かつ再発を起こしやすいといった現象の原因であると考えられた。

P. aeruginosa を始めとして *Proteus*, *Klebsiella* などの urease 産生菌は感染結石を作りやすいことが知られている²⁵⁾²⁶⁾ が、逆に尿路結石を基礎疾患とする *P. aeruginosa* 感染症では、早期に結石内外に biofilm が生成されることにより、単純結石であっても感染結石化しやすく、それに伴い UTI を難治化、易再発化させやすいと考えられる。一方、今回の治療実験の結果 *E. coli* や *E. faecalis* についても感染結石モデル存在系において治療効果の低下を認めており、多数の菌が集積して付着すること自体が基底部の細菌への抗菌剤の浸透を阻害し、結果として治療効果を低下させる可能性が示唆された。また、実際の UTI 患者の尿中では、菌の産生する exopolysaccharide のほかに、尿中の種々の結晶成分や

蛋白成分が存在し、より複雑な組成の biofilm が形成されうると考えられた。

複雑性 UTI の治療における残尿の影響について、一般的に、残尿は UTI の難治化因子と考えられているが、今回の検討結果では残尿設定系においてむしろ菌の再増殖抑制が認められた。これは一見矛盾した結果の様に見えるが、Kawada ら²⁷⁾ も報告しているように、残尿存在時には抗菌剤投与時に高い尿中濃度が遷延し、特にペニシリン系薬剤のようにその抗菌力が時間依存性である薬剤の場合、残尿の存在が UTI の治療においてむしろ有利に働くものと考えられる。一方、残尿存在時には排尿に伴う総菌数の減少効果が低下し、尿中に細菌が混入した際に菌が増殖しやすくなる。また、特に *P. aeruginosa* 感染症において尿中にすでに細菌の aggregate が存在する場合には、化学療法直後に浮遊細菌が消失していても、抗菌剤の尿中濃度低下に伴い、残尿中の aggregate 内部に存在する viable な菌が再増殖し、UTI の再発をきたしやすくなるものと考えられる。結論として、残尿の存在は、それが腎機能を障害しない限りにおいては必ずしも UTI の難治化因子とはならず、むしろ易感染性因子ならびに易再発因子として捉えるべきものであろうと考えられた。

結 語

in vitro 複雑性 UTI 治療実験モデルを作成し、治療実験を行うとともに biofilm の形成ならびにその性質について検討した。

今回作成した UTI 治療実験モデルは種々の病態を simulate でき、抗菌化学療法剤の各種病態下での治療効果について検討しうる優れた実験系と考えられた。

biofilm の形成性については *P. aeruginosa* が最も高く、*E. coli*, *E. faecalis* では低かった。また、いったん形成された biofilm は浮遊状態の菌に対する MIC の 1000 倍以上の高濃度の抗菌剤に抵抗性を示した。

P. aeruginosa は silicon disk 表面に biofilm を形成するのみならず、浮遊細菌同士で aggregate し、biofilm 状の構造をとるため、カテーテル留置例以外でも UTI 難治化の原因となる可能性が示唆された。

残尿の存在は、それが腎機能を障害しない限りにおいては必ずしも UTI 治療上の難治化因子とはならず、むしろ易感染性因子ならびに易再発因子として捉えるべきものであると考えられた。

(稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を頂いた恩師大森弘之教授、直接御指導頂いた公文裕巳助教授、電子顕微鏡技術につ

いてご指導頂いた大野勝雄技術長ならびに研究遂行にあたり御協力頂いた光畑律子、的野由夏技術員に深謝致します。)

文 献

- 1) Minuth, J. N. et al.: Inhibition of the antibacterial activity of gentamicin by urine. *J. Infect. Dis.* **133**: 14-21, 1976.
- 2) Nickel, J. C. et al.: Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**: 619-624, 1985.
- 3) Grasso, S. et al.: New *in vitro* model to study the effect of antibiotic concentration and rate of elimination on antibacterial activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **13**: 570-573, 1978.
- 4) Nishida, M. et al.: Bacterial activity of cephalosporins in an *in vitro* model simulating serum levels. *Antimicrob. Agents Chemother.* **14**: 6-12, 1978.
- 5) 佐野靖之・他: TE-031 の基礎的臨床的研究. *Chemotherapy* **36** suppl. 3: 600-607, 1988.
- 6) O'Grady, F. et al.: Treatment of "bacterial cystitis" in fully automatic mechanical models simulating conditions of bacterial growth in the urinary bladder. *Br. J. Exp. Pathol.* **54**: 283-290, 1973.
- 7) 河田幸道・他: 試験管内膀胱モデルについて. *Chemotherapy* **29**: 1143-1148, 1981.
- 8) 説田 修: 尿中抗生剤の濃度と細菌増殖抑制効果 Bladder model による検討. *Chemotherapy* **32**: 985-999, 1984.
- 9) Svanborg, E. C. et al.: Adherence, Lipopolysaccharide and mucosal inflammation. *Monogr. Allergy.* **24**: 9-15, 1988.
- 10) 那須良次・他: 尿路感染症の年次的変遷と化学療法剤の関連性について. *西日泌尿.* **50**: 557-566, 1988.
- 11) Costerton, J. W.: The etiology and persistence of cryptic bacterial infections: a hypothesis. *Rev. Infect. Dis.* **6** suppl. 3: 608-616, 1984.
- 12) Costerton, J. W. et al.: The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* **35**: 299-324, 1981.
- 13) Costerton, J. W. et al.: The role of bacterial surface structures in pathogenesis. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **8**: 303-338, 1981.
- 14) Sutherland, I. W.: *Surface Carbohydrates of the Prokaryotic Cell.* Academic Press, London, 1977.
- 15) Linker, A. and Jones, R. S.: A new polysaccharide resembling alginic acid isolated from *Pseudomonas*. *J. Biol. Chem.* **241**: 3845-3851, 1966.
- 16) Evans, L. and Linker, A.: Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **116**: 915-924, 1973.
- 17) Doggett, R. G.: Incidence of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* from clinical sources. *Appl. Microbiol.* **18**: 936-937, 1979.

- 18) 多胡義孝: 細菌の凝集現象——活性汚泥細菌のフロック形成機構——. *微生物* **1**: 51-57, 1985.
- 19) Costerton, J. W. et al.: How bacteria stick. *Sci. Am.* **238**: 86-95, 1978.
- 20) Speert, D. P. et al.: Opsonin-independent phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiot. Chemother.* **36**: 88-94, 1985.
- 21) Stiver, H. G. et al.: Inhibition of polymorphonuclear leukocyte chemotaxis by the mucoid exopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Invest. Med.* **11**: 247-252, 1988.
- 22) Jensen, E. T. et al.: Human polymorphonuclear leukocyte response to *Pseudomonas aeruginosa* grown in biofilms. *Infect. Immun.* **58**: 2383-2385, 1990.
- 23) Anwar, H. and Costerton, J. W.: Enhanced activity of combination of tobramycin and piperacillin for eradication of sessile biofilm cells of *Pseudomonas*

aeruginosa. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**: 1666-1671, 1990.

- 24) Liedberg, H. et al.: Refinements in the coating of urethral catheters reduces the incidence of catheter associated bacteriuria. An experimental and clinical study. *Eur. Urol.* **17**: 236-240, 1990.
- 25) 竹内秀雄・他: ウレアーゼ阻害剤による尿路結石の予防第1報 感染尿とウレアーゼ阻害剤. *泌尿紀要.* **22**: 115-120, 1976.
- 26) Griffith, D. P. et al.: Urease: The primary cause of infection-induced urinary stones. *Invest. Urol.* **13**: 346-350, 1976.
- 27) Kawada, Y. et al.: Factors affecting antibiotic concentrations in bladder urine. *Invest. Urol.* **17**: 484-486, 1980.

(1991年4月1日受付 特別掲載)

MEMORANDUM FOR THE RECORD

DATE: 10/15/54

TO: SAC, NEW YORK

FROM: SA [Name], NEW YORK

SUBJECT: [Subject]

RE: [Subject]

[Text]

[Text]

[Text]

[Text]

[Text]

[Text]

[Text]

[Text]

[Text]

[Text]

[Text]

[Text]

[Text]

[Text]

[Text]

[Text]

[Text]

[Text]

[Text]

[Text]

[Text]

[Text]

[Text]

[Text]

[Text]

[Text]

[Text]

[Text]

[Text]

[Text]

[Text]

[Text]

[Text]

[Text]