

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32413

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15133

研究課題名(和文) 尿路感染症のプロアントシアニジンを用いた新規治療法の構築

研究課題名(英文) Development of a new treatment method for urinary tract infection by using proanthocyanidins

研究代表者

眞野 容子 (Mano, Yoko)

文京学院大学・保健医療学部・助教

研究者番号：90458555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、クランベリーの主成分であるプロアントシアニジン(A型PAC)と抗菌薬の併用効果について検証し、抗菌薬単剤の場合と比較し併用条件下では大幅な改善が認められたことを証明した。さらに反復する尿路感染症の要因として考えられる細胞侵入性を明らかにするため膀胱上皮細胞を用いた検討を実施しUPECが細胞内に潜むことを証明した。また、UPECの細胞侵入性阻害効果の検証を試みA型PACにより細胞内への侵入性が抑制されることを証明した。細胞侵入性に関わる鞭毛について電子顕微鏡にて撮影を実施しA型PACの有無による鞭毛の変化では、A型PAC含有培地で培養したUPECは鞭毛が変化していることが証明された。

研究成果の概要(英文)：This study examined the effects of combination treatments with proanthocyanidin (type A PAC), which is the main component of cranberry, and antibiotics. Significant improvements resulted from the combination treatment compared with single antibiotic agents. To clarify cell invasiveness, which is thought to be a factor in repeated urinary tract infections, we conducted an investigation using bladder epithelial cells and identified the presence of UPEC in the cell. We attempted to verify the inhibition of cell invasion by UPEC and demonstrated that the invasion into cells was suppressed by type A PAC. The flagellae associated with cell invasiveness were photographed by using an electron microscope and flagellar changes were observed in the flagella in UPEC cultured in medium containing type A PAC.

研究分野：微生物・感染症学

キーワード：プロアントシアニジン クランベリー 尿路病原性大腸菌 IBCs形成UPEC 細胞侵入性 併用効果 薬剤感受性試験

1. 研究開始当初の背景

(1) 尿路感染症は世界中で毎年1億7500万症例が発症すると推定され、患者から分離されるもっとも一般的な菌は80%以上が尿路病原性大腸菌である¹⁾。大腸菌は市中で発症した尿路感染症の80~90%、病院内で発症した尿路感染症の30%を占めており、女性では発症者の25%が6ヶ月以内に、50%が1年以内に再発している²⁾。再発患者から分離された大腸菌の約80%は適切な治療をしたにもかかわらず、最初の尿路感染症の原因となった大腸菌と同一株によっておこる。その要因はUPECの表層性膀胱細胞への侵入性と細胞内での急速な増殖であるとの報告がある³⁾。しかし、そのメカニズムは未だ不明である。さらに上述の通り、発症率の高さから膨大な医療費の高額化が問題となっている。

(2) 申請者はクランベリーの主成分であるポリフェノール類のプロアントシアニジン(PAC; EXTRASYNTHESIS, FRA)と抗菌薬のIn-Vitroでの併用効果についてClinical and Laboratory Standards Instituteに準拠した薬剤感受性試験を実施しており、Piperacillin単剤の場合と比較し、PACとの併用条件下では大幅な改善が認められている。さらに申請者はヒト膀胱上皮細胞(HTB-9)を用いてUPECの細胞侵入性の系を確立している。その結果、HTB-9に添加したUPECは抗菌薬をMIC濃度以上で投与したにもかかわらず細胞破壊後の培養液から菌の検出が明らかとなった。更に抗菌薬の種類によって細胞内寄生菌数に差が見られたことも証明されている。

2. 研究の目的

(1) 反復性尿路感染症(UPEC)は適切な抗菌薬治療にもかかわらず、高率な再発率と抗菌薬耐性に関して健康上深刻な問題である。その要因は既に申請者らが構築したヒト膀胱上皮細胞へのUPECの侵入性とintracellular bacterial communities (IBCs)の形成であることを確認している。したがって現行の菌 抗菌薬作用のみを論じる薬剤感受性試験において感受性を示した抗菌薬の治療ではIBCs形成UPECには無効である。よって、既存の抗菌薬療法とは異なるコンセプトをもとに、治療戦略を執ることが急務となっている。そこで本研究では、抗菌薬の殺菌性にだけ着目するのではなく、ヒト膀胱上皮細胞への侵入の要因を明らかにし、関心の高まる食品を用いた新たな治療法の提案を目的とする。

(2) 本研究ではUPECの膀胱上皮細胞への侵入の要因を明らかにし、PACを用いた細胞侵入阻止の影響を評価することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 使用菌株

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

(2) チェッカーボード法に準拠したPACと各種抗菌薬の併用効果の検討

反復性尿路感染症由来株 *E. coli* を用いて各種抗菌薬のMIC値を測定し、さらにPACと抗菌薬を併用しMIC値を測定した。96ウェルプレートの横列に抗生物質の希釈系列、縦列にPACの希釈系列を作成し併用効果を評価した。

(3) ヒト膀胱上皮細胞への侵入性の検討⁴⁻⁵⁾

10% FCS 添加 RPMI-1640(High-Glu)とHTB-9を分注し、37℃にて炭酸ガス培養を実施した。細胞数は約 4×10^4 /mLになるように調整し、*in vitro*での殺菌効果の検討からFCS free RPMI-1640で300 μ g/mLに調整したGMを1mL添加後、24時間反応させ、HTB-9細胞周囲の菌を殺菌させた。反応後の上清中にすべての菌が殺菌されたことをLB agarを用いて確認した。well内をPBS 1mLで3回洗浄し、0.5%に調整したTriton X-100(ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社、東京)を添加後、室温で20分間反応させHTB-9を破壊したLB agarを用いてHTB-9内に侵入した菌数の算定を行った。

(4) ヒメネス染色による細胞内侵入性の検討

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

(5) PACを用いたヒト膀胱上皮細胞への侵入性抑制の検討

ヒト膀胱上皮細胞への侵入性の検討と同様の方法で、FCS free RPMI-1640を900 μ L添加時にPACを500 μ M⁵⁾の濃度になるよう含有させ、PAC無添加でのControlと比較を行った。

(6) PACを用いたマンノース感受性試験による1型線毛への影響

3%モルモット血球にDマンノースを添加したものとしていないものを1セットとし、Abs 600 nmで1.0となるよう調整した菌液

と等量混合した。その後、凝集の有無を確認し、マンノース添加時に非凝集でマンノース非添加時のみ凝集を起こしたものは1型線毛を保有していると判定した。本研究ではさらに PAC を添加し、凝集パターンがどう変化するかを検討した。

4. 研究成果

(1) チェッカーボード法に準拠した PAC と各種抗菌薬の併用効果の検討

PAC は 128 μ g/mL では PAC 単剤での抗菌活性は認められなかった。BK1 株は細胞壁合成阻害剤である Piperacillin(PIPC、東京化成工業)と A 型 PAC では併用時には 3 管差、Ceftazidime(CAZ、東京化成工業)と B 型 PAC 併用時では 2 管差と併用効果が認められた。

BK1 はもともと CAZ に感性であったが、併用効果があり耐性濃度が低下した。ESBL 産生大腸菌を用いて PAC の併用効果を確認したところ CAZ に耐性を示していた菌株が、併用効果により耐性濃度は低下し CLSI の耐性基準を下回った。このことから薬剤耐性菌の治療をする際に高濃度の薬剤を使用せずとも、PAC と併用することで薬剤量を減らすことができることが示唆された。

菌株によるが、併用効果があったということは、PAC と抗菌薬を併用することで使用薬剤量を減らし、耐性菌出現抑制や副作用軽減の可能性が見えてきた。さらに今後出現する可能性のある ESBL 産生 UPEC の治療、予防投与にもつながると考えられる。

(2) ヒト膀胱上皮細胞への侵入性の検討

非病原性の K-12 と反復性尿路感染症由来株の侵入性の比較について検討を行った。K-12 株では細胞内への侵入菌は認められず BK1, BK2, BK3 では侵入菌が認められた。

既報では尿路感染症由来大腸菌では細胞付着性が高いことが論じられており⁷⁾、本研究の結果から HTB-9 細胞の存在下で MIC 以上の抗菌薬濃度を作用させても反復性尿路感染症由来株では多くの菌が殺菌されないことが確認できた。これらのことから UPEC には膀胱上皮細胞内に侵入、潜伏し増殖することで尿路感染症を再発させる可能性が考えられた。

(3) ヒメネス染色による細胞内侵入性の検討

コントロールには認められない菌の侵入が BK1 株において認められた。UPEC は膀胱上皮細胞内に侵入することが顕微鏡下においても確認された。

(4) PAC を用いたヒト膀胱上皮細胞への侵入性抑制の検討

PAC 無添加の菌侵入率を 100%とし、PAC 添加時、PAC 無添加時での比較を行った。反復性尿路感染症由来大腸菌株の HTB-9 への菌侵入率は PAC 添加によって有意($p < 0.05$)

に減少した。K-12 では PAC 添加、PAC 無添加共に菌の侵入は認められなかった(Fig. 1)。

クランベリー由来の PAC は尿路感染症の予防・治療に有用であり、その機序として尿路上皮細胞への細菌の付着を妨害する可能性が指摘されているが⁸⁾、細胞内に侵入する菌数の減少メカニズムなどについては明らかになっていない。本研究では A 型 PAC により菌残存率が減少することから、細胞付着性・侵入性の抑制が認められた。よって A 型 PAC は UPEC の付着性・侵入性に対する阻害効果が考えられ、尿路感染症予防に有用である可能性が示唆された。

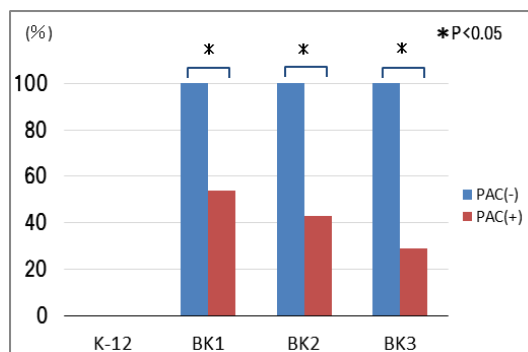


Fig.1 Invasion ratio is decreased by proanthocyanidins(PAC).

K-12(n=4), BK1(n=4), BK2(n=6), BK3(n=6)

(5) PAC を用いたマンノース感受性試験による 1 型線毛への影響

ATCC25922 株を陽性コントロールとして使用し、マンノース感受性試験で使用した全ての菌株で D マンノース添加時にモルモット赤血球凝集が起こらず、非添加時には凝集が認められた。よって、1 型線毛を保有していることが証明された。PAC 添加時の結果では、マンノース添加時には非添加時と同様にモルモット赤血球凝集は認められず、マンノース非添加時の凝集が阻害された。つまり PAC は 1 型線毛の細胞付着効果を阻害することが示唆された。

これまで尿路感染症においてクランベリーの消費による有意な予防効果は見られなかったとの報告がある⁹⁾。しかし、我々はクランベリー含有成分である A 型 PAC で検討した結果、尿路感染症予防や治療における抗生物質の低用量化へとつながる可能性を見出した。臨床の現場へとつなげていくためには経口摂取後の血中移行濃度や尿中排出濃度を検討すべきであると考えられる。

反復性尿路感染症由来大腸菌株は細胞へ付着・侵入し残存率が高い結果となった。また、A 型 PAC による細胞付着性・侵入性の抑制効果の検討結果より、A 型 PAC が細胞侵入性を抑制することが確認された。これらのことから *in vitro* での UPEC に対する A 型 PAC の抗付着性および抗侵入性は、尿中での PAC の存在が細菌の定着および尿路感染症の進行を減少させることを示唆した。

引用文献

Gregory G. Anderson, Karen W. Dodson, Thomas M. Hooton and Scott J. Hultgren, Intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. Trends Microbiol. 12(9), 2004, 424-430

Ejrnæs K. Bacterial characteristics of importance for recurrent urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. Dan Med Bull. 58(4), 2011, 4187-4195

Berry RE, Klumpp DJ, Schaeffer AJ. Urothelial cultures support intracellular bacterial community formation by uropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun. 2009, 77(7), 2762-2772.

Cortés G et al.: "Role of Lung Epithelial Cells in Defense against *Klebsiella pneumoniae* Pneumonia" Infect Immun, 2002; 70: 1075-1080.

Struve C, Krogfelt KA.: "Role of capsule in *Klebsiella pneumoniae* virulence: lack of correlation between in vitro and in vivo studies." FEMS Microbiol Lett, 2003; 218: 149-154.

de Llano DG, Esteban-Fernández A, Sánchez-Patán F, et al. Anti-adhesive activity of cranberry phenolic compounds and their microbial-derived metabolites against uropathogenic *Escherichia coli* in bladder epithelial cell cultures. Int J Mol Sci 2015, 16: 12119-12130.

箱崎 直人. 尿路感染症由来大腸菌の細胞付着能に関する研究. 日本医科大学医学雑誌 1985; 52(4): 367-375.

de Llano DG, Esteban-Fernández A, Sánchez-Patán F, et al. Anti-adhesive activity of cranberry phenolic compounds and their microbial-derived metabolites against uropathogenic *Escherichia coli* in bladder epithelial cell cultures. Int J Mol Sci 2015; 16: 12119-12130.

Stapleton AE, Dziura J, Hooton TM, et al. Recurrent urinary tract infection and urinary *Escherichia coli* in women ingesting cranberry juice daily: a randomized controlled trial. Mayo Clin Proc 2011; 87: 143-150

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

長谷川 洋, 眞野 容子, 古谷 信彦. 反復性尿路感染症由来大腸菌における反復メカニズムの解析. 生物試料分析, 査読有, Vol.41(2), 2018, 115-120.

[学会発表](計 5 件)

Hiroshi Hasegawa, Keita Noguchi, Yoko Mano, Katsumi Fujitani, Nobuhiko Furuya. Preventive effect of proanthocyanidins against urinary tract infections caused by uropathogenic *Escherichia coli*. International Congress of Chemotherapy and Infection. 2017.

Keita Noguchi, Hiroshi Hasegawa, Yoko Mano, Katsumi Fujitani, Nobuhiko Furuya. The effect of proanthocyanidin on Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC). International Congress of Chemotherapy and Infection. 2017.

Hiroshi Hasegawa, Yoko Mano, Syusaku Suzuki, Katsumi Fujitani, Nobuhiko Furuya. Preventive effect of Uropathogenic *Escherichia coli* using Proanthocyanidins. ASM Microbe. 2017.

眞野 容子, 長谷川 洋, 井上 翔太, 古谷 信彦. 尿路病原性大腸菌に対するプロアントシアニジンと各種抗菌薬の併用効果の検討. 生物試料分析科学会. 2018.

野口 圭太, 眞野 容子, 長谷川 洋, 越川 拓郎, 古谷 信彦. 反復性尿路病原性大腸菌(UPEC)における Biofilm 形成能測定法の基礎検討. 日本臨床検査学教育協議会. 2017.

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

眞野 容子 (Mano, Yoko)

文京学院大学・保健医療技術学部・臨床

検査学科
研究者番号：90458555

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()