



The impact of decreasing urinary IgA levels on decreased bacteriuria in a rat model of ileal augmented bladder.

三浦, 徹也

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2009-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4698

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004698>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名 三浦 徹也
博士の専攻分野の名称 博士（医学）
学 位 記 番 号 博い第 4698 号
学位授与の 要 件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付 平成 21 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

The impact of decreasing urinary IgA levels on decreased bacteriuria in a rat model of ileal augmented bladder.(回腸利用膀胱拡大術ラットモデルにおける細菌尿自然消失のメカニズムとしての尿中 IgA 濃度減少の意義)

審 査 委 員

主 査 教 授 堀田 博
教 授 具 英成
教 授 田原 真也

(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

The impact of decreasing urinary IgA levels on decreased bacteriuria
in a rat model of ileal augmented bladder

回腸利用膀胱拡大術ラットモデルにおける細菌尿自然消失の
メカニズムとしての尿中 IgA 濃度減少の意義

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻

腎泌尿器科学

(指導教員：藤澤 正人教授)

三浦 徹也

目的)

膀胱拡大術や回腸導管、新膀胱造設術といった腸管利用尿路再建術施行後は、高頻度に無症候性細菌尿が出現する。腸管利用新膀胱は、より自然な形での排尿、すなわち、尿道から自分の意志により排尿できる自然排尿型尿路変向術であり、最近では膀胱全摘術後の尿路変向術として標準的術式となってきた。腸管利用新膀胱造設術施行患者の多くは、残尿等の排尿障害を有さない排尿が可能となる。しかし、このような排尿状態が良好な患者においても術後、無症候性細菌尿の出現がしばしばみられる。良好な排尿状態にもかかわらず、高頻度に細菌尿が出現する原因はよく分かっていない。さらに、これらの細菌尿は抗菌薬を投与しなくても、術後経過とともに自然に消失していくことが多い。Abdel-latif らは回腸利用新膀胱造設術を施行した 47 例において術後細菌尿の出現率を検討し、術後 1 ヶ月では 75% に細菌尿がみられたが、術後 3 ヶ月で 55%、術後 1 年で 37%、術後 2 年では 5% 以下まで減少したと報告している。しかし、このような細菌尿の自然消失のメカニズムは未だはっきりしていない。

腸管粘膜は分泌型 IgA (secretory immunoglobulin A ; S-IgA) の産生能を有しており、S-IgA は腸管における局所免疫の主要な役割を果たしていると考えられている。腸管利用尿路再建術施行患者においては、健常人と比して尿中 IgA 濃度が有意に高いことが報告されている。このことから、尿路再建に利用された腸管片においても IgA 産生能が残存している可能性が示唆される。しかし、腸管利用尿路再建術における尿中 IgA の役割については未だ解明されていない。そこで今回我々は、回腸利用膀胱拡大術ラットモデルを用いて、拡大膀胱粘膜の細菌付着性と尿中 IgA 濃度の関連性、および尿路に挿入された腸管粘膜の術後時間経過による組織学的変化について調査した。

方法)

回腸利用膀胱拡大術施行ラットモデルの作製

SD ラット(雌、体重 200-220g)をネンブタール麻酔下に開腹し、約 10mm の回腸を遊離、腸間膜対側で切開する。切開した腸管片を膀胱切開部にパッチ状に当て、7-0 バイクリルにて連続吻合し膀胱拡大術を完成させた。

回腸利用膀胱拡大術ラットモデルを術後 3 ヶ月モデル、術後 1 年モデルの 2 つのグループにわけて検討を行った。また、約 10mm 膀胱を切開し、7-0 バイクリルにて再縫合し(sham operation) 作成したモデルをコントロールとした。

尿の細菌学的検討

各モデルから経尿道的に 22G アンギオカット針の先端を鈍にしたもので尿を採取し、24 時間定量培養し、 10^5 cfu/ml 以上の菌数を示したものを尿培養陽性とした。尿培養陰性個体を以下の実験に使用した。

実験的膀胱炎による粘膜の細菌付着性の検討

大腸菌【*E. coli* C5 (type 1 pili, aerobactin)】を用いて実験的膀胱炎を惹起させた。実験的膀胱炎は、22G アンギオカット針の先端を鈍にしたものを用いて、各モデルの尿培養陰性各々10個体に対して、経尿道的に 1×10^5 CFU/0.3mlの*E. coli* C5を接種し、4時間尿道をクランプすることにより惹起させた。

菌接種後2週間で開腹し、拡大膀胱から26G 針注射器にて尿を採取した後、拡大膀胱を摘出。拡大膀胱を膀胱片、腸管片に切離しそれぞれをhomogenizeしたもの及び採取した尿を24時間定量培養した。

尿中IgA濃度の測定と免疫組織学的検討

各モデルの尿培養陰性各々8個体を開腹し、尿を採取し、拡大膀胱を摘出した。採取した尿を遠心分離し、ELISA法にてIgA濃度を測定した。摘出した拡大膀胱からパラフィン切片を作成し、HE染色および抗IgA抗体を用いた免疫組織染色を行った。

結果)

尿の細菌学的検討

術後3ヶ月モデル計44個体のうち尿培養陽性個体は、26個体(59.1%)であった。術後1年モデル全26個体のうち尿培養陽性個体は、6個体(23.1%)であった。コントロール群全20個体はすべて尿培養陰性であった。術後3ヶ月モデルでは、術後1年モデルと比較し有意に尿培養陽性率が高値であった。(p=0.035)

実験的膀胱炎による粘膜の細菌付着性の検討

実験的膀胱炎惹起後2週の大腸菌定量培養において、術後3ヶ月モデルは、術後1年モデルと比較して有意に大腸菌の菌数が増加していた。(術後3ヶ月モデル: 10^6 - 10^8 (中央値 10^7) cfu/ml、術後1年モデル: 0 - 10^6 (中央値 $10^{1.5}$) cfu/ml、p<0.01)

実験的膀胱炎惹起後2週の大腸菌の膀胱片および腸管片の大腸菌定量培養において、術後3ヶ月モデルは、術後1年モデルと比較して有意に大腸菌の菌数が増加していた。(膀胱片： 10^4 - 10^6 (中央値 10^5) cfu/mg、腸管片： 0 - 10^4 (中央値 $10^{1.5}$) cfu/mg、腸管片： 10^4 - 10^7 (中央値 10^6) cfu/mg、 0 - 10^5 (中央値 $10^{2.5}$) cfu/mg、p<0.01)

尿中IgA濃度の測定と免疫組織学的検討

術後3ヶ月モデル、術後1年モデルおよびコントロール群の尿中IgA濃度は各々、 $3.79 \pm 0.84 \mu\text{g/ml}$ 、 $1.43 \pm 0.92 \mu\text{g/ml}$ 、and $0.31 \pm 0.21 \mu\text{g/ml}$ であった。術後3ヶ月モデルは、術後1年モデルと比較して有意に尿中IgA濃度が上昇していた。(p<0.01) コントロール群は、いずれの回腸利用膀胱拡大術モデルと比較しても有意に尿中IgA濃度が低値であった。(術後3ヶ月モデル: p<0.01、術後1年モデル:

p<0.02)

HE染色において、術後1年モデルの拡大膀胱腸管粘膜の絨毛構造が萎縮していることが確認された。抗IgA抗体を用いた免疫組織染色において、術後1年モデルでは術後3ヶ月モデルと比較して、拡大膀胱腸管粘膜のIgA産生細胞の数が減少していることが確認された。

考察)

腸管利用尿路再建術における腸管粘膜の産生するS-IgAは、細菌の粘膜付着性を阻害すると考えられていたが、今回の回腸利用膀胱拡大術ラットモデルを用いた検討では、術後時間経過とともに尿中IgA濃度は低下し、同時に大腸菌の粘膜付着性も低下した。さらに、術後1年モデルでは拡大膀胱腸管粘膜のIgA産生細胞の数が減少していた。このことから、腸管粘膜の産生するIgAは細菌の粘膜付着性を阻害するというよりはむしろ促進している可能性が示唆された。

同様の現象が閉経後女性の膣粘膜においても確認されている。Schoorらは、閉経後女性の膣液中のIgA濃度は若年女性と比較して有意に高く、type1線毛を有した大腸菌の膣粘膜への付着性は、閉経後女性の膣粘膜において有意に高かったと報告している。

また最近、腸管内においても、S-IgAは腸内細菌の生育を助長することを示唆する報告が増えている。S-IgAにより、大腸菌のヒト腸管上皮細胞表面への凝集が促進され、細胞表面へのbiofilm形成が促されることが確認されており、腸管内のS-IgAは、血液中のものとは性質を異にし、腸管内細菌叢の腸管粘膜へのbiofilm形成を促し、その生育を助長すると考えられている。すなわち、S-IgAは正常腸管内細菌叢の生育を促すことにより、外界からの病原菌の腸管内での生育や腸管粘膜内への侵入を防ぐという、いわゆるプロバイオティックな作用をもっていると考えられている。腸内細菌のもつtype1線毛は、Man α 1-3(Man1-6)Man β というマンノース終末を認識しそこに付着する。IgAは、このMan α 1-3(Man1-6)Man β 構造を有しており、type1線毛を介して大腸菌が付着することにより、菌の凝集が促進され、細胞表面へのbiofilm形成が促されると考えられている。

これらのことから、腸管利用尿路再建術において術後早期に増加する尿中IgAが、細菌の粘膜付着性を促すことにより、術後早期では高頻度に細菌尿が出現し、術後時間経過とともに腸管粘膜のIgA産生能が低下することにより細菌尿が減少するという可能性が示唆された。

結論)

本研究において、術後時間経過とともに尿中IgA濃度は低下し、同時に大腸

菌の粘膜付着性も低下した。IgA と大腸菌の有す type1 線毛の相互関係から考えると、腸管利用尿路再建術において術後早期に増加する尿中 IgA が、高頻度に出現する細菌尿の原因の一つであることが示唆され、術後経過とともに腸管粘膜の IgA 産生能が低下することが、細菌尿自然消失のメカニズムの一つとして重要であることが考えられた。

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第 1994 号	氏 名	三 浦 徹 也
論文題目 Title of Dissertation	<p>The Impact of Decreasing Urinary IgA Levels on Decreased Bacteriuria in a Rat Model of Ileal Augmented Bladder</p> <p>回腸利用膀胱拡大術ラットモデルにおける細菌尿自然消失のメカニズムとしての尿中 IgA 濃度減少の意義</p>		
審査委員 Examiner	<p>主 査 堀 田 博 (Chief Examiner)</p> <p>副 査 具 英 成 (Vice-examiner)</p> <p>副 査 田 原 真 也 (Vice-examiner)</p>		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

膀胱拡大術や回腸導管、新膀胱造設術といった腸管利用尿路再建術施行後は、高頻度に無症候性細菌尿が出現する。腸管利用新膀胱は、より自然な形での排尿、すなわち、尿道から自分の意志により排尿できる自然排尿型尿路変向術であり、最近では膀胱全摘術後の尿路変向術として標準的術式となってきた。腸管利用新膀胱造設術施行患者の多くは、排尿障害を有さない通常の排尿状態となる。しかし、このような排尿状態が正常な患者においても術後、無症候性細菌尿の出現がしばしばみられる。排尿状態が正常にもかかわらず、高頻度に細菌尿が出現する原因は分かっていない。さらに、これらの細菌尿は抗菌薬を投与しなくても、術後経過とともに自然に消失していきことが多い。しかし、このような細菌尿の自然消失のメカニズムはいまだはっきりしていない。

腸管粘膜は分泌型 IgA の産生能を有しており、腸管における局所免疫の主要な役割を果たしていると考えられている。腸管利用尿路再建術施行患者においては、健常人と比して尿中 IgA 濃度が有意に高いことが報告されている。このことから、尿路再建に利用された腸管片においても IgA 産生能が残存している可能性が示唆される。しかし、腸管利用尿路再建術における尿中 IgA の役割についてはいまだ解明されていない。

本研究者は、回腸利用膀胱拡大術ラットモデルを用いて、拡大膀胱粘膜の細菌付着性と尿中 IgA 濃度の関連性、および尿路に挿入された腸管粘膜の術後時間経過による組織学的変化について調査し、下記の事を明らかにした。

1) 術後3ヶ月モデル44個体のうち尿培養陽性個体は26個体(59.1%)、術後1年モデル26個体では6個体(23.1%)が陽性、コントロール群20個体はすべて尿培養陰性であった。術後3ヶ月モデルでは術後1年モデルと比較し有意に尿培養陽性率が高かった。

2) 実験的膀胱炎惹起後2週の尿の大腸菌定量培養において、術後3ヶ月モデルは術後1年モデルと比較して有意に大腸菌の菌数が多かった。

3) 実験的膀胱炎惹起後2週の拡大膀胱の膀胱片および腸管片の大腸菌定量培養において、術後3ヶ月モデルは術後1年モデルと比較して有意に大腸菌の菌数が多かった。

4) 術後3ヶ月モデルは術後1年モデルと比較して有意に尿中 IgA 濃度が高かった。いずれの回腸利用膀胱拡大術モデルも、コントロール群と比較して、有意に尿中 IgA 濃度が高かった。

5) HE染色において、術後1年モデルの拡大膀胱腸管粘膜の絨毛構造が萎縮していることが確認された。抗 IgA 抗体を用いた免疫組織染色において、術後1年モデルでは術後3ヶ月モデルと比較して、拡大膀胱腸管粘膜の IgA 産生細胞の数が減少していることが確認された。

以上の結果より、本研究者は下記のように考察した。まず、腸管利用尿路再建術における腸管粘膜の産生する分泌型 IgA は細菌の粘膜付着性を阻害すると考えられていたが、本研究者らの回腸利用膀胱拡大術ラットモデルを用いた検討では、術後時間経過とともに尿中 IgA 濃度は低下し、同時に大腸菌の粘膜付着性も低下した。さらに、術後1年モデルでは拡大膀胱腸管粘膜の IgA 産生細胞の数が減少していた。このことから、腸管粘膜の産生

する IgA は細菌の粘膜付着性を阻害するというよりはむしろ促進している可能性が示唆された。そして、同様の現象が閉経後女性の膣粘膜においても確認されていると考察した。すなわち、閉経後女性の膣粘液中の IgA 濃度は若年女性と比較して有意に高く、type1 線毛を有した大腸菌の膣粘膜への付着性は閉経後女性の膣粘膜において有意に高かったという報告を参照している。また、腸管内においても、分泌型 IgA は腸内細菌の生育を助長する可能性があることを考察した。分泌型 IgA により大腸菌のヒト腸管上皮細胞表面への凝集が促進され、細胞表面への biofilm 形成が促される。腸内細菌の type1 線毛は $\text{Man}\alpha\text{1-3}(\text{Man1-6})\text{Man}\beta$ というマンノース終末を認識し、そこに付着する。IgA はこの $\text{Man}\alpha\text{1-3}(\text{Man1-6})\text{Man}\beta$ 構造を有しており、type1 線毛を介して大腸菌が付着することにより、菌の凝集が促進され、細胞表面への biofilm 形成が促されると考えられている。

これらのことから、本研究者は、腸管利用尿路再建術において術後早期に増加する尿中 IgA が細菌の粘膜付着性を促すことにより、術後早期では高頻度に細菌尿が出現し、術後時間経過とともに腸管粘膜の IgA 産生能が低下することにより細菌尿が減少するという可能性を提唱した。

以上、本研究は、腸管利用尿路再建術後の尿路感染症について、その発症機序を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった尿中分泌型 IgA による細菌の粘膜付着性及びその影響について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。