

ラット腎盂腎炎モデル作成に関する研究

とくにBEA前処置について

松原秀三・遠藤久男・二木力夫

小川春樹・小山憲次朗

中外製薬株式会社総合研究所

(昭和53年7月25日受付)

今日まで多くの尿路感染症モデルが考案され、それぞれ目的に応じて実験に供されているが¹⁻⁹⁾、簡便で、しかも個体差を生じず、必要なだけの動物を実験に準備しうる方法には乏しいと思われる。我々はこの点の改善を目的とし、腎乳頭部分を特異的に障害する 2-bromoethylamine hydrobromide (BEA) を用いてラットに急性腎盂腎炎を発症させる方法を創案した。この発症法は比較的簡単であるにもかかわらず、ラット間のばらつきがなく均一な腎乳頭部膿瘍を形成させることができるので、多数の動物を必要とする抗菌剤のスクリーニングや治療効果の比較実験に有用と思われる。ここでは、その発症法の基礎的検討結果について報告する。

実験材料および方法

1. 実験動物

体重150g前後のWistar系雌ラット(実験動物繁殖研究所から購入)を用いた。実験期間中は恒温恒湿環境下で飼養し、十分な飼料および飲水を与えたが、BEA投与前1夜および細菌感染前約5時間は給水ビンを取外して飲水を制限した。

2. 感染菌株

当研究所保存の *Escherichia coli* C-11, *Proteus mirabilis* 9[†] および *Pseudomonas aeruginosa* GNB-1 を Heart infusion broth (ニッサン) で1夜培養後、それぞれ 10^6 個/ml の菌浮遊液を感染に用いた。これらの菌株はいずれもマウスに対して比較的強い感染力を有する。

3. BEAの前処置と逆行感染法

腎乳頭壊死を惹起するため¹⁰⁾、種々の濃度のBEA(試薬特級、東京化成工業)溶液1.0mlを、前述のように1夜給水制限したラットの腹腔内に投与した。この2時間後から十分な量の飲水を与えた。BEA処置3日後に再びラットの飲水を制限し、菌液を逆行性に感染した。すなわち、飲水制限5時間後にラットをエーテル麻酔し、尿道口をアルコール綿で充分消毒したのち、マウス用経ロゾンデを用いて上記の菌浮遊液1.0mlを経尿道的に注入した。注入の成否は外尿道口周辺の液漏と腹壁

からの膀胱触診によって判定し、完全に菌液が注入されたラットを実験に用いたが、それらに排尿阻止などの特別な処置は行わなかった。一方、静脈内感染を行う場合は、菌浮遊液0.5mlを尾静脈から接種した。

4. 生菌数の測定

感染後一定時間にラットを放血屠殺し、無菌的に血液、腎および膀胱尿を採取した。腎は4°Cに冷却した滅菌 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.0) 5mlを加えてホモジネートし、低速で遠心後その上清および尿を10段階希釈した。各々の希釈液0.5mlを eosin methylene-blue 寒天培地(ニッサン)10mlに混釈し、48時間培養後集落数を測定した。

5. 腎障害度の判定法

腎障害度の判定は腎の正中断面を肉眼的に観察することによって行った¹⁾。錐体頂部に限局して壊死が形成されたものを(+), 腎髄質辺縁にまで障害域の拡大しているものを(++)とし、対照腎と変らないものを(-)で表現した。

6. 腎機能検査法

BEA処置後2匹づつをラット用採尿ケージ(夏目製作所製)に入れ、毎日一定時間に排尿量を計測した。血中尿素窒素含量(BUN)はUni-graph(Warner Lab.)を用いて定量し、腎乳腫率は(腎重量/体重)×100%として表現した。また、腎組織標本は常法に準じ、Hematoxylin Eosin染色によって作製した。

実験成績

1. 給水制限の効果

腎髄質は糸球体濾過尿量の減少や尿細管尿の酸性化などによって影響され易いことが知られているので⁴⁾、まず、BEAの腎障害作用におよぼす給水制限の影響について検討した(Table 1)。約18時間飲水を制限した群と無処置群のそれぞれに100および150mg/kgのBEAを腹腔内投与後、3日目に腎の正中断面像を観察した。給水制限群は全てのラットに乳頭部を中心とする充血がみられ、それは150mg/kg投与群でより強く、かつ等しく発現した。しかし十分な飲水を与えた群では150

Table 1 Effect of water deprivation on development of papillary lesion in rats treated with BEA

Water deprivation	Doses of BEA (mg/kg)	No. of rats	Grade of gross lesion ^c		
			++	+	-
yes ^a	100	7	5	2	0
	150	7	7	0	0
no ^b	100	7	0	3	4
	150	7	3	3	1

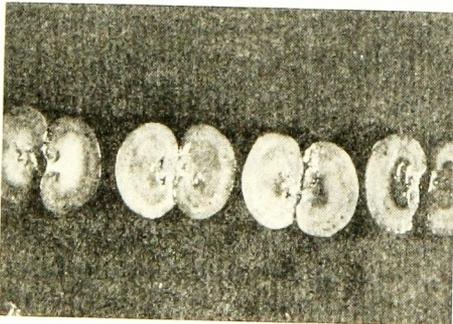
- a. BEA was injected intraperitoneally 18 hrs after deprivation of drinking water. Water supply was started 2 hrs later.
 b. Water was given freely throughout the experiment.
 c. The papillary lesion in kidneys was observed visually 3 days after the treatment with BEA. (-) indicates normal structure; (+), hemorrhagic lesion limited to papillary tip; (++) , more extensive hemorrhagic lesion in papilla. Numbers represent number of rats.

mg/kg の BEA を投与してもその障害度にばらつきがみられた。そこで以後の実験では BEA 投与前 1 夜給水を停止した。

2. 菌浮遊液の注入液量の効果

一般にヒトの腎盂腎炎は腎盂内圧の上昇によって発症する例が多いとされている¹⁵⁾。尿道口から菌液を逆行性に注入する感染法はそれ自体腎盂内圧の上昇を誘導するので、均一な感染を促す至適注入液量を明確にする目的で、BEA 処置ラットに *E. coli* 菌液 0.5 ml またはその 2 倍希釈液 1.0 ml を経尿道的に注入し、3 日後に腎お

Fig. 1 Renal papillary lesion 2 days after the treatment with BEA



From the left side, the photos indicate kidneys from rats treated with 50, 100, 150 and 200 mg/kg of BEA, respectively. It is remarkable that the hemorrhagic lesion in the papilla is enlarged in accordance with increasing doses of BEA and demarcated from viable tissue of the outer medulla.

Table 2 Effect of infusion amount of *E. coli* suspension on induction of pyelonephritis in normal and BEA-treated rats

Treatment with BEA ^a	Infusion amount (ml)	Viable <i>E. coli</i> ($\log_{10} \pm$ S. E.) in; ^b		No. with pyelonephritis/Total ^c
		kidneys	urine	
yes	1.0	8.2 ± 0.2	7.4 ± 0.1	6/6
	0.5	5.2 ± 0.8	5.2 ± 0.8	4/6
no	1.0	<1.0	5.1 ± 0.9	0/6

- a. *E. coli* was infected retrogradely 3 days after the treatment with 150 mg/kg of BEA.
 b. Viable bacteria were counted 3 days after the infection.
 c. Abscess in renal papilla was observed visually.

よび尿中生菌数を測定した (Table 2)。

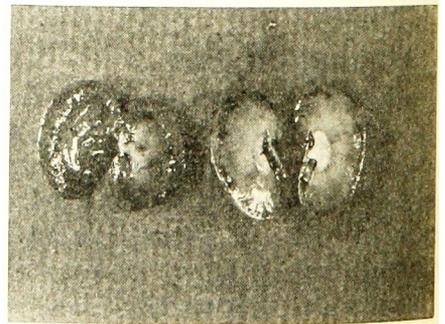
BEA 前処置ラットに 1.0 ml の菌液を注入した群はいずれも $10^7 \sim 10^8$ 個の *E. coli* が感染したが、0.5 ml 注入群では感染菌数にばらつきがみられ、腎臓断面像においても肉眼的に腎盂病変が認められないものもあった。また、BEA 無処置ラットに 1.0 ml の菌液を注入しても腎における *E. coli* の増殖は認められなかった。そこで、以後の実験から 1.0 ml の菌浮遊液を注入した。

3. BEA の前処置量の効果

BEA による腎障害の機序は尿細管下降中の尿濃縮によって発現されると考えられている¹⁰⁻¹²⁾。従って、腎乳頭に適当な範囲の壊死を形成させるためには、BEA の投与量の調節が最も重要なポイントとなる。そこで、50, 100, 150 および 200 mg/kg の BEA 投与の影響を比較検討した。

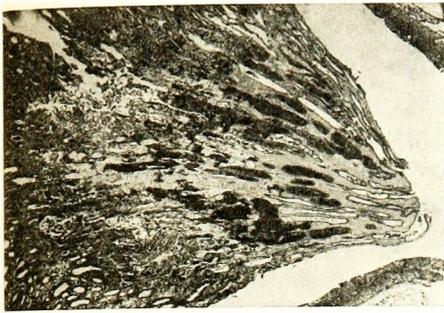
Fig. 1 は BEA 投与 2 日目の腎臓断面像である。50 mg/kg 投与群の腎所見は正常腎とほとんど変わらないが、投与量を増加するほど乳頭を中心とした充血が辺縁に拡大し、200 mg/kg 投与群では出血性炎症を惹起した。し

Fig. 2 Abscess in renal papilla 3 days after the retrograde infection with *E. coli*



Left section represents normal control.

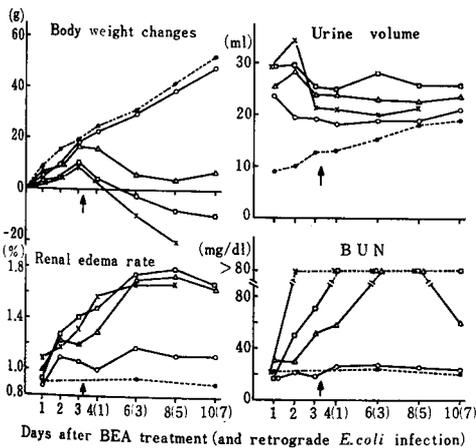
Fig. 3 Necrosis of epithelial cells and formation of bacterial clusters in renal papilla 3 days after the retrograde infection with *E. coli*



Necrosis affects all components of the papilla and is demarcated from viable tissue of the outer medulla. The inflammatory reaction in the junction zone is clear. (HE stain, ×30)

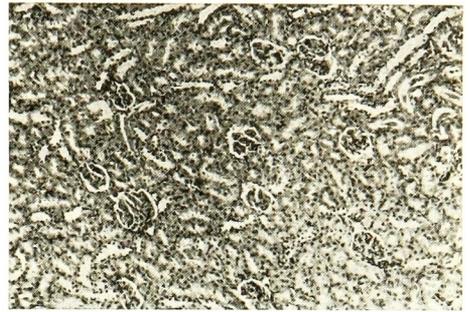
しかし、この場合でも皮質まで病変がおよぶことはなかった。Fig. 2 は 150 mg/kg BEA 処置群で、*E. coli* 感染 3 日後の腎縦断面像である。上記の BEA 障害領域の膿瘍形成が顕著であり、皮質の正常像と明瞭に区別された。組織学的にも皮質は異常を認めないが (Fig. 4)、腎乳頭部は尿管上皮細胞の変性壊死、尿管の拡張、正常域との境界の細胞浸潤、壊死部分の菌塊の形成などが観察された (Fig. 3)。

Fig. 5 Physiological changes after injection of BEA and retrograde infection with *E. coli* in rats



Rats deprived of water overnight were injected intraperitoneally with 50 mg/kg (—○—), 100 mg/kg (—△—), 150 mg/kg (—□—) or 200 mg/kg (—×—), or saline (—●—). As indicated by the arrow in the figure, the rats were infected with 1.0 ml of *E. coli* suspension (10⁶ cells/ml) via the urethra. Values are mean of 5 rats.

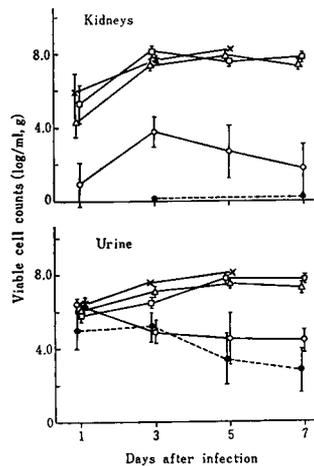
Fig. 4 Normal structure of the cortex of the same kidney indicated in Fig. 3



No affect of the abscess formed in the papilla is observed. (HE stain, ×30)

BEA 投与および *E. coli* 感染後のラットの生理的変動を Fig. 5 に示した。投与量の増加に伴って BUN の上昇、腎浮腫率の上昇、尿量の増加、体重の減少などが観察された。これらの変化は *E. coli* の腎内増殖と密接に関連した (Fig. 6)。BEA の 100 mg/kg 以上で前処置したラットの腎および尿中細菌数は感染 3 日後までに 10⁷ ~10⁸ 個/g or ml に達し、以後もその菌数を持続した。200 mg/kg 処置群では感染後 7 日目以前に全て死亡した。また 50 mg/kg 処置群では腎内の *E. coli* の増殖が不十分であり、BEA の前処置を行わない対照群では

Fig. 6 Effect of pretreatment with BEA on growth of *E. coli* in kidneys and urine.



Rats were infected with 1.0 ml of *E. coli* suspension (10⁶ cells/ml) via the urethra 3 days after treatment with 50 mg/kg (—○—), 100 mg/kg (—△—), 150 mg/kg (—□—) and 200 mg/kg (—×—) of BEA, or saline (—●—). Viable *E. coli* in kidneys and urine were counted on the days indicated in the figure. Values are mean ± S.E. of 5 rats.

Table 3 Effect of infection routes of *E. coli* on induction of pyelonephritis in BEA-treated rats

Infection routes ^a	No. of infected <i>E. coli</i>	Viable <i>E. coli</i> ($\log_{10} \pm$ S. E.) in; ^b	
		kidneys	urine
intravenously	1×10^6	4.4 ± 0.9	3.2 ± 0.1
	1×10^8	All of 5 rats died until 2 days	
retrogradely	1×10^6	7.9 ± 0.2	7.6 ± 0.1

a. *E. coli* infected 3 days after the treatment with 150 mg/kg of BEA.

b. Viable bacteria were counted 3 days after the infection.

E. coli の腎内感染は生じなかった。このことは BEA の処置量が少なすぎると十分な腎内感染を促すことができず、また過重にすぎると腎の髄質から皮質領域まで障害し、感染が過激に進展することを示唆する。従って、できるだけ皮質側の機能に影響を与えず、感染菌の腎盂部定着を促すためには 100~150 mg/kg の BEA の投与量が適当と思われる。

4. 感染経路の効果

腎への至適感染経路を比較するために、BEA 処置ラットを 3 群に分け、1 群には従来どおり *E. coli* 菌液の経尿道的感染を行い、他の 2 群には 1 夜培養菌液の原液 (3×10^8 cells/ml) および 100 倍希釈液の 0.5 ml を尾静脈から感染し、一定時間後の腎および尿中の *E. coli* 菌数を比較した (Table 3)。

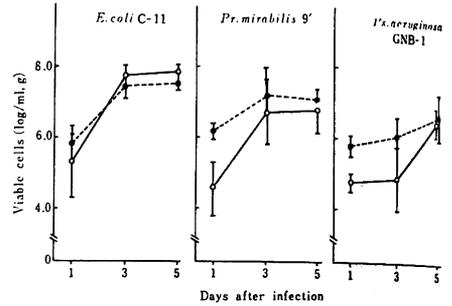
E. coli 培養原液を静注したラットは 2 日後までに全て死亡した。さらに、100 倍希釈菌液を静注感染した群でも逆行感染群に比較して腎、尿中の生菌数はラット間で大きく変動し、とくに尿中の菌数は明らかに少なかった。すなわち、静注感染では腎や尿中の生菌数が各ラット間で変動しており、腎以外の臓器組織に対する感染菌の侵襲作用も考慮しておく必要があるため、腎および尿路だけを標的とする感染経路としては経尿道的な逆行感染が適当と思われた。

5. 各菌液注入後の感染菌の定着

BEA 150 mg/kg 投与 3 日後に、*E. coli*, *Pr. mirabilis* および *Ps. aeruginosa* の約 10^6 個を逆行感染し、腎および尿中の生菌数を経日的に測定した (Fig. 7)。

E. coli および *Pr. mirabilis* は感染 3 日後には尿中、腎内生菌数ともに plateau に達した。*Ps. aeruginosa* の増殖は他菌種に較べて遅延するようであった。いずれにしても BEA の前処置によって、比較的速やかに感染菌の腎内定着が生じた。

Fig. 7 Bacterial growth in the urinary tract of BEA-treated rats



The rats were infected with 1.0 ml of bacterial suspension (10^8 cells/ml) via the urethra 3 days after the treatment with 150 mg/kg of BEA. Viable bacteria in kidneys (—○—) and urine (---●---) were counted on the days indicated in the figure. Values are mean \pm S. E. of 5 rats.

考 察

疾患モデル動物作成の目的は臨床へのアプローチである。実験的腎盂腎炎ではヒト腎盂腎炎の確実な再現を目的として感染菌種、使用動物、感染方法、前処置など広範な検討がなされ、今日ではヒトの腎盂腎炎を正しく再現しうる実験系がほぼ確立されている。しかし、抗生剤の治療効果、抗生剤のスクリーニングなどの検討の際には同等の腎病変を呈するモデル動物を同時に多数作成する必要がある。このことからわれわれは今回腎盂腎炎の主病変部位である腎髄質を選択的に障害する BEA が腎盂腎炎モデル動物作成のための前処置として応用しうるか否かを知る目的で諸検討を行った。

BEA は腎乳頭を中心に障害し、その障害機序は本物質の尿管における濃縮と考えられている¹⁰⁻¹²。CUPPAGE ら¹³の詳細な組織学的検討では遠位尿管上皮細胞の変性壊死は BEA 投与 3 日後にもっとも強く発現し、その組織障害は outer medulla から cortex に至る部分ではみとめられないとされている。われわれはこれら BEA の特性に着目して、腎盂腎炎モデル作成の前処置として BEA を選択したが、今回の実験ではラット、*E. coli*、上行感染の系で腎盂腎炎モデル動物を作成する場合の BEA 至適量は 150 mg/kg であり、尿道口からの菌液注入を失敗しない限り、確実に腎盂腎炎を発症しうることをたしかめえた。この方法は比較的手技が簡単で、個体間のバラツキが少なく、さらにヒトの腎盂腎炎の主な感染経路^{14,15}を考慮すると、妥当性を有する最適の実験系と思われる。

一方、マウスのような小動物を用いる場合には経静脈

的感染が必要であり、事実 THIELE⁹⁾ はマウスを用いて BEA の前処置と血行感染の実験系で腎盂腎炎マウスの作成に成功している。この感染方法はヒトの腎盂腎炎の主な感染経路が上行感染である事実や血行感染の全身諸臓器への侵襲を考慮すると必ずしも適切とはいえない。われわれの実験結果 (Table 3) では *E. coli* の培養原液を経静脈的に感染すると、ラットは2日以内に全て死亡した。これは腎・尿路系だけが感染菌の標的となることなく、全身性侵襲が原因と考えられる。また逆に少ない菌数を静脈内感染した成績では腎・尿路系での感染菌の増殖は不十分であり、その病巣内生菌数は個体間で大きく変動していた。したがって、静脈内感染は生菌数の推移を指標とする抗生剤の治療効果や抗生剤のスクリーニングの検討には不相当と思われる。

われわれは現在 BEA 前処置、上行感染の系によって作成した腎盂腎炎ラットを抗生剤の治療効果の比較検討に用いている。*E. coli* や *Pr. mirabilis* を感染した場合、腎組織または尿中の生菌数は2~3日後には plateau に達するので、この時期に抗生剤を投与し、殺菌効果 (除菌効果) を比較しているが、感染菌の腎内侵襲度合を知るもっとも簡便な方法は体重であった。この他 BUN、腎浮腫率、尿量なども顕著な変動がみられるので判定指標となりうる。しかし、前2者は屠殺後に判明する指標であり、後者は BEA 投与後直ちに増加するために、BEA 処置の成否の指標にとどまる。したがって、体重測定はラットに負担を与えない有用な指標と考える。

一方、上記実験系によって作成した腎盂腎炎モデルでは腎盂や乳頭に形成された膿瘍は感染後4~5日までその部分に局在し、そのまま放置すれば、感染病巣は尿管に沿って皮質にまで達するが、7~8日後には腎皮膜下に進展して、半数以上のラットは死亡する。また、腎内生菌数は感染3~5日で $10^7 \sim 10^8$ に達する。この経過はヒトの急性腎盂腎炎像を再現するものではないが、われわれの実験系は確実に腎盂腎炎を発症しうる上に、個体差が少ないので、実験の目的に応じて適切な時期を選べば腎内生菌数や腎組織障害度を指標とする腎盂腎炎の基礎的検討 (とくに抗生剤の治療効果の検討) には有用なモデルと考える。

結 論

腎毒物 BEA を用い、新しいラットの腎盂腎炎モデルを作成した。BEA の至適量 (150 mg/kg) は腎の乳頭部だけを限局性に障害した。このようなラットに *E. coli*, *Pr. mirabilis* あるいは *Ps. aeruginosa* の菌液 (約 10^8 個/ml) 1.0 ml を経尿道的に注入すると、確実に腎盂腎炎を発症した。BEA 無処置ラットでは同様の感染を行っても発症しなかった。また、BEA 処置ラットに静注感染

を行うと、致死性が高く他臓器に対する感染菌の組織侵襲が疑われた。BEA の前処置と上行感染を組合せた我々の腎盂腎炎モデルは、比較的簡便で、確実に腎盂腎炎を発症しえるので、多数の動物を必要とする抗生剤のスクリーニングや治療効果の比較に有用な実験モデルと思われる。

文 献

- 1) ARANA, J. A. ; V. M. KOZIJ & G. G. JACKSON : Retrograde *E. coli* urinary tract infection in rats. Arch. Path. 78 : 558~567, 1964
- 2) BURROUS, S. E. & J. B. CAWEIN : Rat pyelonephritis model suitable for primary or secondary screening. Appl. Microb. 18 : 448~451, 1969
- 3) KAYE, D. & H. ROCHA : Urinary concentrating ability in early experimental pyelonephritis. J. Clin. Invest. 49 : 1427~1437, 1970
- 4) ANDRIOLE, V. T. : Water, acidosis, and experimental pyelonephritis. J. Clin. Invest. 49 : 21~29, 1970
- 5) FIERER, J. ; L. TALNER & A. I. BRAUDE : Bacteremia in the pathogenesis of retrograde *E. coli* pyelonephritis in the rat. Am. J. Path. 64 : 443~455, 1971
- 6) MILLER, T. E. & K. B. ROBINSON : Experimental pyelonephritis. A new method for inducing pyelonephritis in the rat. J. Infect. Dis. 127 : 307~310, 1973
- 7) FITZPATRICK, F. K. & J. BLADZINSKI : Pyelonephritis in the mouse. III. Therapeutic experiments. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 127 : 1180~1185, 1967
- 8) HUBERT, E. G. ; G. M. KALMANSON & L. B. GUZE : Antibiotic therapy of *Escherichia coli* pyelonephritis produced in mice undergoing chronic diuresis. Antimicrob. Agents & Chemoth. 1968 : 507~510, 1969
- 9) THIELE, E. H. : An *in vivo* pyelonephritis assay for screening therapeutic agents. J. Antibiotics 27 : 31~41, 1974
- 10) FUWA, M. & D. WAUGH : Experimental renal papillary necrosis. Effects of diuresis and antidiuresis. Arch. Path. 85 : 404~409, 1968
- 11) MURRAY, G. ; R. G. WYLLIE, G. S. HILL, P. W. RAMSDEN & R. H. HEPTINSTALL : Experimental papillary necrosis of the kidney. I Morphologic and functional data. Am. J. Path. 67 : 285~301, 1972
- 12) HILL, G. S. ; R. G. WYLLIE, M. MILLER & R. H. HEPTINSTALL : Experimental papillary necrosis of the kidney. II. Electron microscopic and histochemical studies. Am. J. Path. 68 : 213~234, 1972
- 13) CUPPAGE, F. E. & A. TATE : Repair of the rat kidney following papillary necrosis produced by bromoethylamine hydrobromide. Lab. Invest.

- 31 : 593~601, 1974
- 14) SANFORD, J. P. : Urinary tract symptoms and infections. Ann. Rev. Med. 26 : 485~498, 1975
- 15) 上田泰, 松本文夫 : 腎盂腎炎。内科 35 : 1072~1082, 1975

A NEW AND SIMPLE EXPERIMENTAL PYELONEPHRITIS MODEL IN RATS

SHUZO MATSUBARA, HISAO ENDO, RIKIO NIKI,
HARUKI OGAWA and KENJIRO KOYAMA
Research Laboratories, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.

Acute pyelonephritis was induced by retrograde bacterial infection in female rats treated with a renal toxic agent, 2-bromoethylamine hydrobromide (BEA). The necrotic lesion was developed exclusively in renal papilla when the dehydrated rats were treated intraperitoneally (ip) with 100 to 150 mg/kg of BEA, but the cortex area of the kidneys was histopathologically normal. Three days after the treatment, the rats were infused retrogradely 1.0 ml of suspension (10^6 bacteria/ml) of *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* or *Pseudomonas aeruginosa* via the urethra. Maximum growth of the microorganisms was observed in kidneys and bladder urine 3 to 5 days after the infection, but the bacteria were not detected in sera, spleens and livers of same rats. The observation that the focus formation localized in the renal pelvis was confirmed histopathologically. No renal infection occurred in intact rats without BEA treatment. This model is useful for the study of renal infection and for the therapeutic evaluation of antimicrobial agents, because it is technically simple and reproducible in establishment of pyelonephritis.