

Acinetobacter calcoaceticus に関する研究

第4報：マウス実験的尿路感染症について

尾花芳樹・折笠義則・西野武志・谷野輝雄

京都薬科大学微生物学教室

(昭和 57 年 1 月 9 日受付)

臨床分離アシネトバクターによるマウス実験的尿路感染症の作製を試み、上行性腎盂腎炎の成立について、緑膿菌の場合と比較検討を行なった。

アシネトバクター 10 株中 3 株に細菌学および組織学的検査より明らかに腎盂腎炎の成立が認められ、これらの腎盂腎炎作製には $10^4 \sim 10^5$ cells/mouse の少量菌注入で成立可能であった。またこれらの検査結果より緑膿菌による腎盂腎炎の発症進展経過が強くかつ持続的であり死亡例が認められるのに対して、本菌によるものは穏やかな経過で進展し、組織障害もさほど強くないことが認められた。他の 7 菌株については、個体により感染性に差が認められ、細菌学的検査の結果、腎内生菌数にかなりのバラツキがあることが認められた。さらに腹腔内感染性（致死性）と尿路感染性との関連性を検討したが、明らかな相関性は認められなかった。

現在、細菌性感染症のうち尿路感染症の占める割合は呼吸器感染症について多く、特に腎盂腎炎においては、慢性化、難治化の傾向がみられ、臨床で大きな問題となっている。またこれらの起因菌として、もっとも分離頻度が高いのは、大腸菌、変形菌などの腸内細菌群であるが、抗生物質開発の進歩やカテーテル留置などの泌尿器科的操作の一般化などにより、従来は弱毒菌あるいは常在菌と考えられていた肺炎桿菌、セラチアおよび緑膿菌に代表されるブドウ糖非発酵性グラム陰性桿菌による感染症が非常に増加している^{1,2)}。緑膿菌以外のブドウ糖非発酵菌では、アシネトバクターによる感染症が臨床各科で注目されつつあり、泌尿器科領域でも、徐々に分離率が増加しており、本菌による感染症がクローズアップされてきた。

一方、実験的上行性尿路感染症については、大腸菌、変形菌、緑膿菌などを用いた数多くの報告³⁻⁶⁾がなされているが、アシネトバクターによる尿路感染症については、わずかに熊沢⁷⁾によるラットを用いた報告があるにすぎない。

そこで今回、既に報告してきたアシネトバクターによる *in vitro* および *in vivo* の易感染性の検討^{8,9)}に続き、マウス実験的尿路感染症の作製を試み、上行性腎盂腎炎の発症について、細菌学および組織学的検討を行なったので報告する。

I. 実験材料および実験方法

1. 使用動物

動物は Std-ddY 系雌マウス（体重 18~20g）を用いた。

2. 使用菌株

臨床的に分離された *Acinetobacter calcoaceticus* 10 株および *Pseudomonas aeruginosa* 3 株を用いた。

3. 腹腔内感染症の作製

接種菌液の調製は、Nutrient agar (NA: Nissui) で 37°C 18 時間斜面培養した菌を Nutrient broth (NB: Nissui) に懸濁し、同培地で希釈した。この希釈菌液に同量の 6% gastric mucin (Orthana Kemisk Fabrik A/S) を加え、0.5 ml/mouse 腹腔内に接種し、5 日間生死観察を行なった。あるいは mucin 無添加菌液についても、腹腔内接種を行ない、Probit 法により LD₅₀ 値 (cells/mouse) を算出した。

4. 上行性尿路感染症の作製および組織学的検査

接種菌液の調製は前述のように行ない、菌接種は 15 時間給水制限をしたマウスを強制的に排尿させた後、sodium pentobarbital (Nembutal: Abbott Lab. Co. Ltd.) で麻酔し、外尿道口周辺をアルコール消毒後、針先を切断し先端をまるめた注射針装着注射筒を用いて、経尿道的に 0.1 ml の菌液を膀胱内に注入した。直ちに膀胱触診によって注入の成否を確認後、外尿道口を小型クリップで 4 時間閉鎖し、菌液の漏れを防止した。菌注入後より経時的に 1 群 5~7 匹のマウス両腎を摘出 homogenize し、腎内生菌数を測定した。また肉眼的観察（膿瘍等の有無）および病理組織学的検索はヘマトキ

Fig. 1 Effect of inoculum size on recovery of viable *P. aeruginosa* E-2 and *A. calcoaceticus* Ac-54 from the mouse kidney

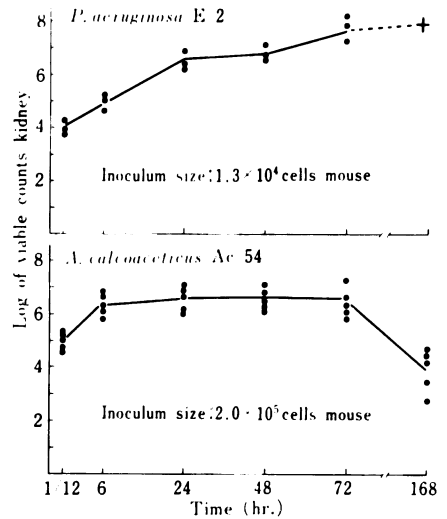
Organism	Inoculum size (cells/mouse)	Log of viable counts/kidney								Appearance*
		≤1	2	3	4	5	6	7	8	
<i>P. aeruginosa</i> E-2	5×10^5							●●●●●●●●	△	7/7 (1 Dead)
	5×10^4							●●●●●●●●	△	7/7
	5×10^3						●●●●●●●●	△	●●●●●●●●	4/7
<i>A. calcoaceticus</i> Ac-54	1×10^6							●●●●●●●●	△	7/7
	1×10^5							●●●●●●●●	△	6/7
	1×10^4			●	●●	●●	●●	●	△	1/7

* Positive rate

Fig. 2 Recovery of viable *A. calcoaceticus* from the mouse kidney

Inoculum size : 1×10^5 cells/mouse									
Strain	Log of viable counts/kidney								Appearance*
	≤ 1	2	3	4	5	6	7	8	
Ac-23	●●				△	●	●●●	●	4/7
Ac-24							●●●●●●	△	6/7
Ac-25							●●●●●●	△	6/7
Ac-31	●		●	●●	△		●●●●	●	3/7
Ac-54							●●●●●●	△	6/7
Ac-66	●		●		△	●●●●●●	●		3/7
Ac-78	●●			●	△	●●●●	●●		2/7
Ac-126		●●	●	●	△	●	●●●		3/7
Ac-156		●	●●	●●	△	●●●●	●		1/7
Ac-164	●		●	●	●	△	●●●	●●	1,7

* Positive rate

Fig. 3 Recovery of viable *P. aeruginosa* E-2 and *A. calcoaceticus* Ac-54 from the mouse kidney

シン・エオジン染色、カルボール・チオニン染色を施し、顕微鏡観察を行なった。さらに腎以外の臓器に対する細菌学的検査は、感染が一定した 72 時間後に、各臓器を摘出し、homogenize した後、生菌数を測定した。

II. 実験結果

1. 上行性尿路感染症の作製および組織学的検索

a) アシネトバクターの場合

アシネトバクターによる腎盂腎炎成立について検討した結果を Fig. 1~4 に示した。また感染腎の経時的变化を組織学的に検討した結果を Photo. 1~6 に示した。*A. calcoaceticus* Ac-54 株を用いて、 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ cells/mouse の菌液を注入し、48 時間後の腎内生菌数の測定を行なったところ、Fig. 1 に示すように $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ cells 注入においては、腎内生菌数は $10^6 \sim 10^8$ cells/kidney を示しており、また肉眼的病変からもほとんど

個体差なく、腎盂腎炎が成立することが認められた。しかし 1×10^4 cells 注入では、腎内生菌数および肉眼的病変のパラッキが認められ、腎盂腎炎の成立は一定しにくいものと思われた。そこで菌株を増やして検討を行なったところ、Fig. 2 に示すように *A. calcoaceticus* Ac-24 株および Ac-25 株については、 $10^6 \sim 10^8$ cells/kidney の感染菌が認められ、また肉眼的病変もほぼ全例に認められた。しかし、その他の 7 株では、個体差が大きく、感染菌数および肉眼的病変のパラッキがかなり認められ、菌株間で感受性に差があることがわかった。さらに腎盂腎炎の作製が可能である *A. calcoaceticus* Ac-54 株を用いて、経時的な腎内生菌数の推移と組織学的変化について検討を行なったところ、Fig. 3 に示すように腎内生菌数の消長では、菌注入後、直ちに腎内に感染菌が認められ、以後菌数の増加が認められ、6 時間後には、

Fig. 4 Recovery of viable *P. aeruginosa* E-2 and *A. calcoaceticus* Ac-54 from the mouse organ

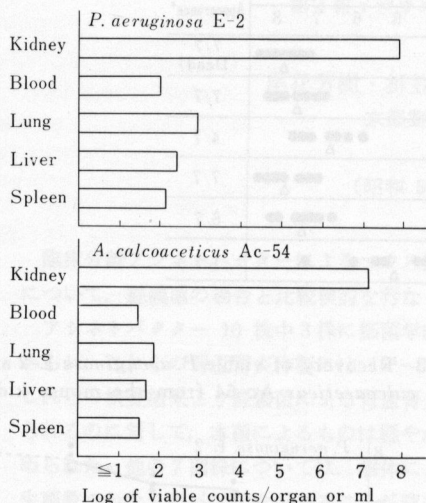


Photo. 1 Hemorrhage and formation of bacterial clusters in renal papilla 6 hours after inoculation of *A. calcoaceticus* Ac-54. Carbol-thionine stain ($\times 40$)

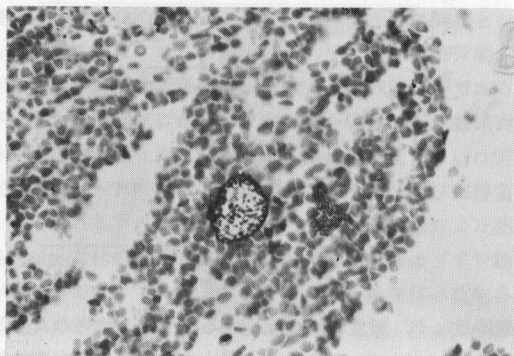
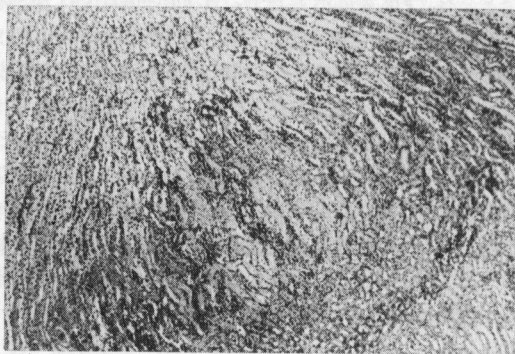


Photo. 2 Pyelitis occurs 24 hours after the inoculation. HE stain ($\times 4$)



約 50~100 倍の菌数となり、24 時間後には、ほぼプレートとなり、4~5 日間同レベルの菌数を存続するが、その後、漸次減少し、マウスは生存することが認められた。また Fig. 4 に示すように腎以外の各臓器において、感染菌は低いレベルの菌数しか認められず、本感染系は腎に限局した感染症を引き起こすことがわかった。さらに組織学的変化では菌注入直後に髄質内層部分に出血が認められ、6 時間後においても、Photo. 1 に示すように腎乳頭における出血と菌塊が観察できた。24 時間後では、Photo. 2 に示すように髄質内層において、充血、細胞浸潤、上皮の変性が認められ、48 時間後では、充血、尿細管上皮の変性、細胞浸潤、硝子様円柱、白血球円柱が認められ、尿細管内には菌塊が認められた (Photo. 3, 4)、また腎乳頭先端部分においても細菌円柱、細胞浸潤、化膿巣が認められた。さらに 72 時間後の皮質では、Photo. 5 に示すように化膿巣が認められるが、この部位の細胞浸潤はあまり強くないことが認められ、7 日後においても、Photo. 6 に示すように化膿巣 (充血、白血球

Photo. 3 Polymorphonuclear leukocytes infiltration are found 48 hours after inoculation. HE stain ($\times 20$)

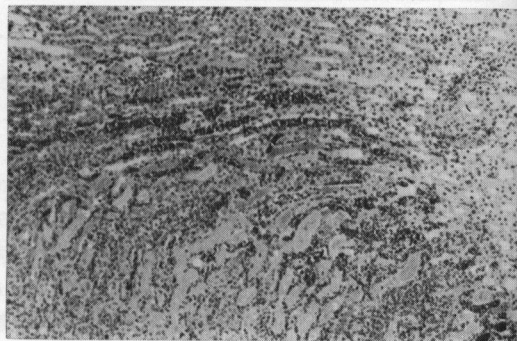


Photo. 4 Bacterial clusters in renal-tubules 48 hours after inoculation. Carbol-thionine stain ($\times 40$)

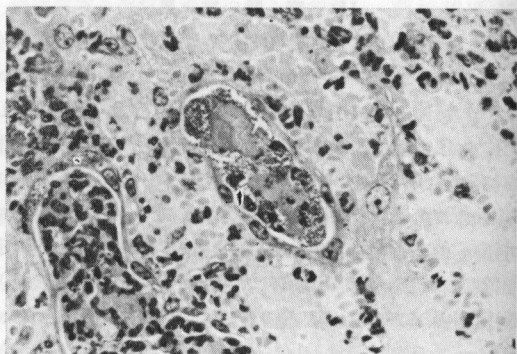


Photo. 5 Microabscesses are found 72 hours after inoculation. HE stain ($\times 4$)

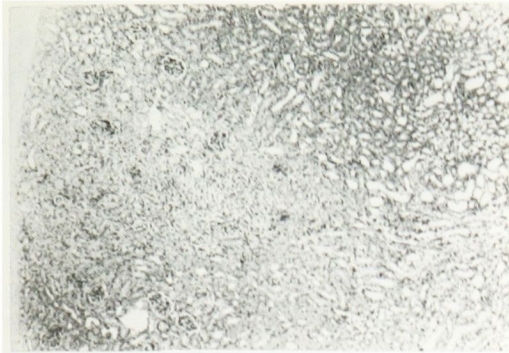
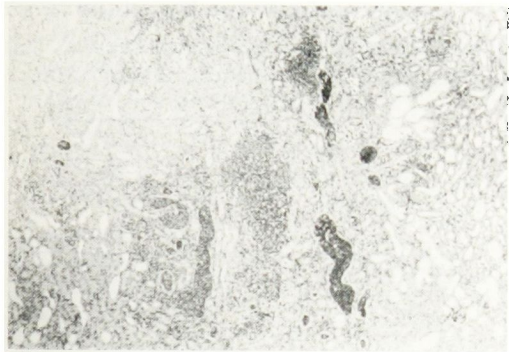


Photo. 6 Microabscesses remain 7 days after inoculation. HE stain ($\times 4$)



円柱)や尿細管の拡張が認められた。

b) 緑膿菌の場合

緑膿菌による腎盂腎炎成立について検討した結果を Fig. 1, 3~5 に示し、また組織学的検査結果を Photo. 7 ~13 に示した。*P. aeruginosa* E-2 株を用いて、 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^5$ cells/mouse の菌液を注入し、48 時間後の腎内生菌数の測定と肉眼的病変の検討を行なったところ、Fig. 1 に示すように、 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ cells 注入の場合は、 $10^7 \sim 10^8$ cells/kidney の感染菌が認められ、肉眼的病変も全例に認められ、また一部死亡例も認められた。また菌数が少ない場合は、若干腎内生菌数は低い、ほぼ個体差なく全例に検出でき、腎盂腎炎は成立しやすいものと思われた。さらに菌株数を増やして検討を行なったところ、Fig. 5 に示すようにいずれの菌株の場合も、多数の感染菌が認められ、また著明な膿瘍形成が認められた。また *P. aeruginosa* E-2 株を用いて、経時的に腎内生菌数の推移と組織学的検討を行なったところ、Fig. 3 に示すように腎内生菌数の消長では、菌注入後直ちに感染菌が認められたが、若干増殖率は低く、約

Fig. 5 Recovery of viable *P. aeruginosa* from the mouse kidney

Strain	Inoculum size: $5 \cdot 10^4$ cells/mouse								Appearance*
	Log of viable counts kidney								
	≤ 1	2	3	4	5	6	7	8	
E-2							●●●●●	●	7 7
							Δ		
No.12							●●●●●	●	7 7
							Δ		
No. 5							●●●●●	●	7 7
							Δ		

* Positive rate

Photo. 7 6 hours after inoculation of *P. aeruginosa* E-2. HE stain ($\times 10$)

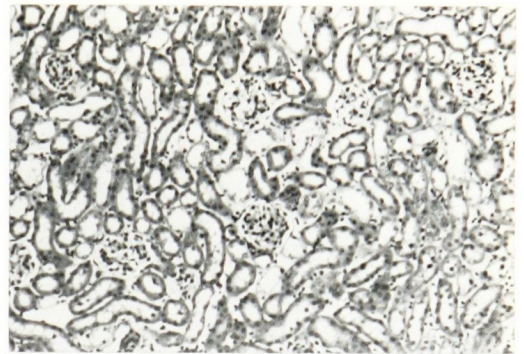
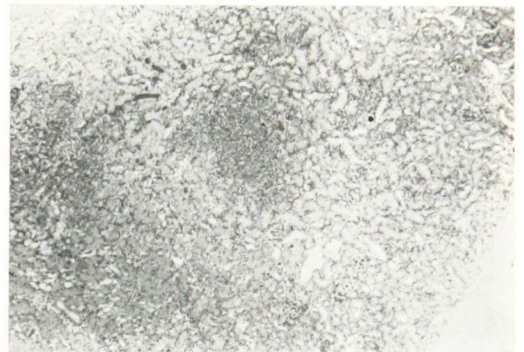


Photo. 8 Microabscesses are found in cortex 24 hours after inoculation. HE stain ($\times 4$)



48 時間後で菌数はほぼプラトー (1.0×10^8 cells/kidney) に達し、著明な膿瘍発生が認められ、以後徐々に死亡例が認められ、4~5 日後で、ほぼ全例が死亡した。また Fig. 4 に示すように腎以外の各臓器においては、 $10^2 \sim 10^3$ cells/organ の生菌が認められた。また組織学的検索では、菌注入直後、髄質内層部分に出血が認められ、6 時間後では、Photo. 7 に示すように、止尿処置の影響と考えられる尿細管および糸球体毛細管の拡張が認め

Photo. 9 Microabscesses are found in medulla 24 hours after inoculation. HE stain ($\times 4$)

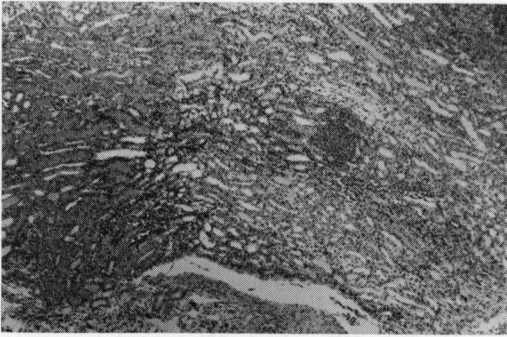


Photo. 10 Microabscesses are predominant 48 hours after inoculation. HE stain ($\times 4$)

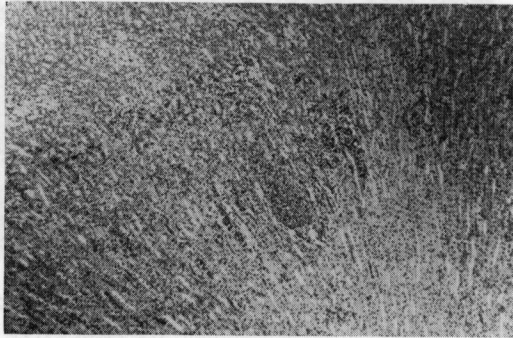
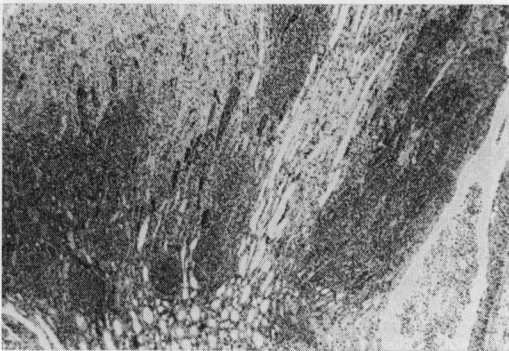


Photo. 11 Microabscesses are predominant 72 hours after inoculation. HE stain ($\times 4$)



られ、24 時間後では、皮質、髄質において化膿巣が (Photo. 8, 9) 48~72 時間後では、髄質内層の化膿性変化、充血および腎杯腔の膿性渗出物が認められた (Photo. 10, 11)。また腎乳頭には感染菌が認められるが、アシネトバクターでみられたような菌塊状態ではなく、点在状態として観察された (Photo. 12)。

Photo. 12 Bacterial cells in renal papilla 24 hours after inoculation. Carbol-thionine stain ($\times 40$)

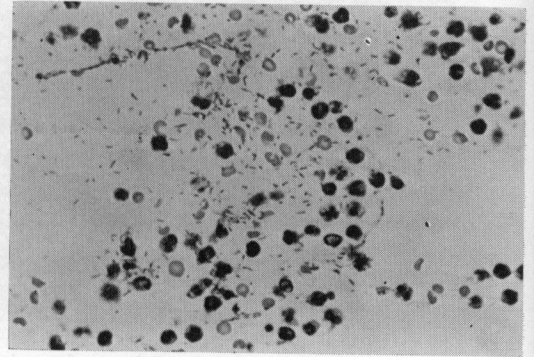
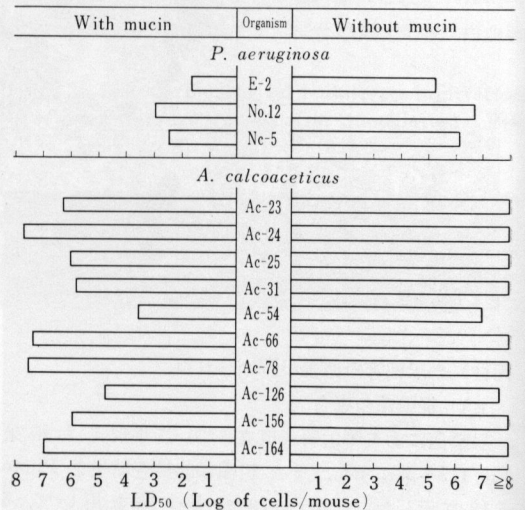


Fig. 6 LD₅₀ values of *P. aeruginosa* and *A. calcoaceticus* by intraperitoneal inoculation for mice



2. 腹腔内感染性との関連性

アシネトバクター 10 株および緑膿菌 3 株の腹腔内感染性 (LD₅₀ 値) の結果を Fig. 6 に、また腎盂腎炎起病性との関連性についての検討結果を Fig. 7, 8 に示した。Mucin 添加の場合、*A. calcoaceticus* Ac-54 および Ac-126 株の LD₅₀ 値 (cells/mouse) は Fig. 6 に示すように、それぞれ 5.0×10^3 , 8.0×10^4 cells/mouse であり、その他の菌株は $\geq 10^6$ cells/mouse であった。またこれらの腎盂腎炎起病性は *A. calcoaceticus* Ac-24, Ac-25 および Ac-54 株が強く、腹腔内感染性と腎盂腎炎起病性は完全に相関性があるとはいえないことがわかった (Fig. 7, 8)。また緑膿菌では 3 菌株ともに、その LD₅₀ 値は $5.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^3$ cells/mouse であり、

Fig. 7 Relationship between LD_{50} *in vivo* and number of bacteria deposited in the kidney against *P. aeruginosa* and *A. calcoaceticus*

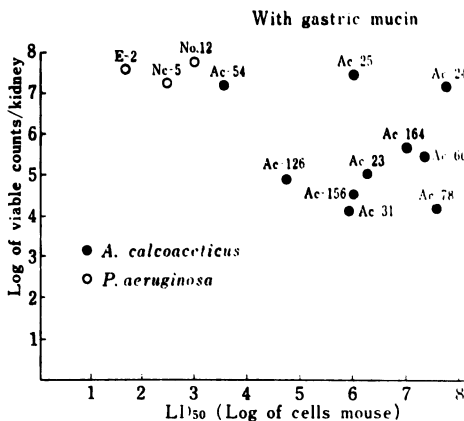
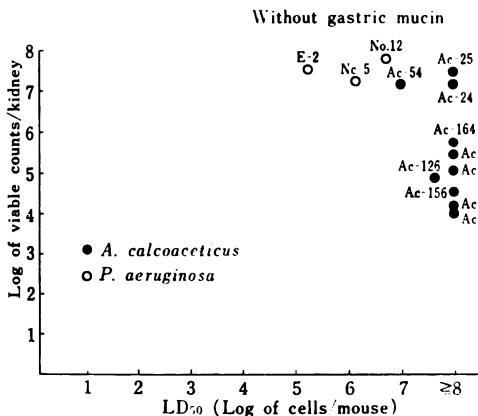


Fig. 8 Relationship between LD_{50} *in vivo* and number of bacteria deposited in the kidney against *P. aeruginosa* and *A. calcoaceticus*



強い腹腔内感染性を有しており (Fig. 6), またこれらの菌株の腎盂腎炎起病性も非常に強いことを認めており, 相関性があるものと思われた (Fig. 7, 8)。

III. 総括および考察

実験的腎盂腎炎の発症機作や病態については, 以前より大腸菌, 変形菌などを用いて精力的に検討され, 数多くの報告¹⁰⁾がなされている。一方, 各種医療の進歩により, 宿主側の感染防禦機能の変化と感染菌の変化により昨今尿路感染症は著しく変遷してきている。そこで, opportunistic pathogen として問題になりつつあるアシネトバクターについて, 実験的上行性腎盂腎炎の作製を試み, その感染経過を緑膿菌の場合と比較検討した。

アシネトバクター 10 株中 3 株については, 1.0×10^5 cells/mouse の菌液注入により, 細菌学的検討および肉眼的病変 (膿瘍形成など) より腎盂腎炎の成立が認めら

れるが, 他の 7 菌株では個体により腎盂腎炎の成立は著明ではなく, かなりバラツキのあることが認められた。また供試菌株数が 3 株と少ないが, 緑膿菌ではいずれの菌株においても腎盂腎炎の成立が認められた。さらに腎盂腎炎起病性のある両菌種とも接種菌量に依存した病変を示し, $10^4 \sim 10^5$ cells/mouse 注入により腎盂腎炎を発病させることが可能であった。ここで両菌種による腎盂腎炎の感染経過を細菌学的面および組織学的面より比較すると, アシネトバクターによる腎盂腎炎の成立経過は, 緑膿菌によるものほど著明なものではなく, 腎内菌数の急速な増加は認められるものの, 組織学的変化は隠やかな経過をたどって進行し, 感染後 1~2 日で, peak になるものと思われ, その後徐々に自然治癒に向うものと考えられた。緑膿菌による腎盂腎炎成立は非常に強い病変を伴って進行するものと思われた。緑膿菌についてはすでに実質に対する変性・壊死作用が強いこと¹¹⁾が, 熱傷感染や肺炎において指摘されており, また小河ら⁴⁾は, 緑膿菌性尿路感染症における protease, elastase などの組織障害作用を示す酵素の関与を示唆しているが, 今回供試した *P. aeruginosa* NC-5 株は, protease, elastase を産生しない¹²⁾ため, これら酵素以外の関与が充分に考えられるところである。一方, アシネトバクターでは, このような組織障害作用を有する酵素の存在が明らかでないため, 尿路感染症の成立・経過が緑膿菌とは少し異なる様相を示すものと考えられる。すでに熊沢⁷⁾はラットを用いて本菌の尿路感染症について基礎的に検討し, 尿路感染性は低いと報告しているが, これは供試菌株や感染条件が異なるため, さらに詳細に本菌の感染性について考慮しなければならないと考えており, 大腸菌においては, 尿路感染症の起病性を左右するといわれている膀胱上皮細胞への付着性, 赤血球凝集反応性など¹³⁾について, 本菌を用いて検討を加えている。また組織学的検査で, 両菌種注入直後に, 髄質内層に出血が認められるのは, 注入による物理的, 機械的な圧力により生ずるものと考えられるが, この部位 (髄質内層) からの菌の侵入, 増殖も充分に考えられ, さらに検討を加えている。すでに HEPTINSTALL¹⁴⁾ はラットで同様の出血現象を認めており, 感染の助長を示唆している。一方 NISHI ら⁸⁾は, われわれとはほぼ同様な方法で上行性尿路感染症を惹起させたが, 出血現象は認めておらず, これは接種容量 (彼らは 0.05 ml の菌液を膀胱内に注入) による差が考えられ, さらに検討を加えている。また腹腔内感染による菌力 (致死性) との関連性を検討してみたが, アシネトバクターでは腹腔内感染力と尿路感染力での明らかな相関性を認めなかった。しかし緑膿菌では, 今回の供試菌株では相関性を認めたが, さらに菌株を増

やして検討を行なうと相関性を示さないものも存在しており、明らかな相関性はないものと思われた。しかし全般的に腹腔内感染力の強い菌株は、尿路感染力も強いものと考えられた。

尿路感染症も他の感染症と同様、host-parasite 相互関係のバランスの乱れから生ずるものである¹⁵⁾。本菌はすでに著者が報告^{8,9)}してきたように、細菌学的性状の結果からも、opportunistic pathogen としての特徴を供えており、糖尿病、担癌などの宿主側に感染防禦機能を低下させる基礎疾患があり、アシネトバクターに感受性の低い抗生物質 (β -lactam 系抗生物質など) が投与された場合、菌交代現象などにより、尿路系においても充分病原性を発揮することが予想され、さらにこれらのことを充分認識した上で、化学療法などを行なう必要があるものと考えられ、病態動物での易感染性、化学療法などの基礎的検討を続けていきたいと考えている。

文 献

- 1) 熊沢浄一, 中牟田誠一, 伊藤秀明, 百瀬俊郎: 泌尿器科の手術と病院感染, 緑膿菌感染を中心に。最新医学 30: 402~408, 1975
- 2) 岸 洋一, 小磯謙吉: 霊菌と緑膿菌の尿路感染症。日本臨床 36: 2338~2339, 1978
- 3) 松原秀三, 遠藤久男, 二木力夫, 小川春樹, 小山憲次郎: 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。Chemotherapy 27: 269~274, 1979
- 4) 田中紀子, 采 孟, 小河秀正: 実験的尿路感染症。臨床と細菌 7: 15~24, 1980
- 5) 岩日朋幸, 土屋皖司: *Proteus mirabilis* によるマウスにおける実験的尿路感染症について。感染症学雑誌 55: 254~261, 1981
- 6) NISHI, T. & K. TSUCHIYA: Experimental urinary tract infection with *Pseudomonas aeruginosa* in mice. Infect. Immun. 22: 508~515, 1978
- 7) 熊沢浄一: 尿路感染症。最新医学 32: 2107~2112, 1977
- 8) 尾花芳樹, 井上千佳, 北川明子, 後藤光成, 仙波昌三, 西野武志, 谷野輝雄: *Acinetobacter calcoaceticus* に関する研究, 第1報 生理および抗菌剤に対する感受性。投稿中。
- 9) 尾花芳樹, 西野武志, 谷野輝雄: *Acinetobacter calcoaceticus* に関する研究, 第2報 マウスに対する菌力および各種抗生物質の治療効果。感染症学雑誌 56-9
- 10) 熊沢浄一: 実験的腎盂腎炎研究の現況。Chemotherapy 29: 1~8, 1981
- 11) MEINKE, G.; J. BARUM, B. ROSENBERG & R. S. BERK: In Vivo Studies with the Partially Purified Protease (Elastase) from *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 2: 583~589, 1970
- 12) KOBAYASHI, F.: Experimental Infection with *Pseudomonas aeruginosa* in Mice. I. The Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* for Mice. Japan. J. Microbiol. 15(4): 295~300, 1971
- 13) HAGBERG, L.; U. JODAL, T. K. KORHONEN, G. LIDIN-JANSON, U. LINDBERG & C. S. EDÉN: Adhesion, Hemagglutination, and Virulence of *Escherichia coli* Causing Urinary Tract Infections. Infect. Immun. 31(2): 564~570, 1981
- 14) HEPTINSTALL, R. H.: Experimental pyelonephritis: Bacteriological and morphological studies on the ascending route of infection in the rat. Nephron 1: 73~92, 1964
- 15) 百瀬俊郎, 熊沢浄一: 尿路感染症の臨床 (第3版)。金原出版, 東京, 1974

STUDIES ON *ACINETOBACTER CALCOACETICUS*

IV. EXPERIMENTAL URINARY TRACT INFECTIONS IN MICE

YOSHIKI OBANA, YOSHINORI ORIKASA,

TAKESHI NISHINO and TERUO TANINO

Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy

An experimental urinary tract infection model was prepared in mice using clinical isolates of *Acinetobacter calcoaceticus*. The establishment of ascending pyelonephritis was compared to that induced by *Pseudomonas aeruginosa*.

Pyelonephritis was distinctly caused by 3 of 10 strains of *A. calcoaceticus* based on bacteriological and histological examinations. Induction of pyelonephritis with these strains was possible by the inoculation of $10^4 \sim 10^5$ cells/mouse. The results of various tests revealed that the onset and progression of *P. aeruginosa*-induced pyelonephritis was intense and continuous, whereas that caused by *A. calcoaceticus* progressed moderately without very severe tissue disturbances. The other 7 strains differed in their virulence, bacteriological examination revealed a wide range in the numbers of viable cells in the kidney. The relationship between peritoneal infections (lethal) and urinary tract infections was investigated without finding any distinct association.