

尿道狭窄を施したマウス尿路感染症モデル

柿澤 裕美・堀 りつ子・四 辻 彰・保 田 隆・才 川 勇

富山化学工業株式会社総合研究所*

長 谷 川 真 常

長谷川病院

(昭和 63 年 1 月 7 日受付)

実験的尿路感染症の発症率を高める補助手段として尿道狭窄を考え、雄マウスの尿道に 0.9 mmφ の狭窄を施し、膀胱内へ菌を接種することにより、マウス尿路感染症モデルを作成した。そしてその腎臓中生菌数や病理組織学的所見などを 14 日後まで経日的に調べた。

菌接種 1 日後からはほぼ全例のマウスの膀胱に尿管が認められた。腎臓中生菌数は 7 日後までは 10^6 cells/kidney で推移し 14 日後では 10^5 cells/kidney とやや減少した。病理組織学的所見では菌接種 1 日後皮質で軽度の尿細管腔の拡張が認められ、3 日後では皮質、髓質および腎盂の炎症性的変化は極期となった。しかし 7 日後では腎盂に炎症性的変化が残るものの、皮質や髓質にはなくなり、14 日後ではさらに回復傾向にあった。しかし、このような腎盂腎炎の病理組織学的所見には 3 匹のマウス間で強弱が認められた。また膀胱造影では 12 時間後に高率で vesicoureteral reflux が認められたものの、それ以後では認められなかった。

Key words: マウス尿路感染症モデル, 腎盂腎炎, 尿道狭窄, VUR, 実験感染

抗生剤の薬効評価などの化学療法 の 基礎的検討として、現在多くの施設でマウス尿路感染症モデルが用いられている^{1,2)}。尿路感染症モデルの作成には上行性感染による方法が多く用いられている。感染の発症率を高める補助手段としてガラス玉封入法³⁾、尿管処置法⁴⁾、腎乳頭壊死法⁵⁾ が主に用いられている。今回、新たな補助手段として尿道狭窄を考え、尿道狭窄を施したマウス尿路感染症モデルの作成を試みたので報告する。

I. 実験材料および方法

1. 使用菌株

当研究所保存の *Escherichia coli* NIHJ JC-2 を用いた。

2. 使用動物

SLC/ICR 系、雄マウス、6 週齢を用いた。

3. 尿道狭窄を施したマウス尿路感染症モデルの作成

雄マウスをエーテル麻酔下で仰臥位に固定し、外尿道口を動脈クレンメで閉じた。腹部に正中切開を加え、膀胱を体外へ露出し、膀胱内の尿を除いた後、菌を 0.05 ml 注入し穿刺部を手術用絹糸で結紮し、後部尿道に直径 0.9 mmφ の副木を添えて結紮した後、副木を取り除き尿道狭窄を施した (Fig. 1)。この尿道狭窄を施したマ

ウスを狭窄群とし、また狭窄を施さず菌注入のみのマウスを非狭窄群とした。いずれも動脈クレンメは 4 時間後に取り除いた。感染に用いた菌懸濁液は heart infusion agar (栄研) に一夜培養後、菌体をかきとり滅菌生理食塩液に浮遊させて調整した。

4. 病理組織学的検査

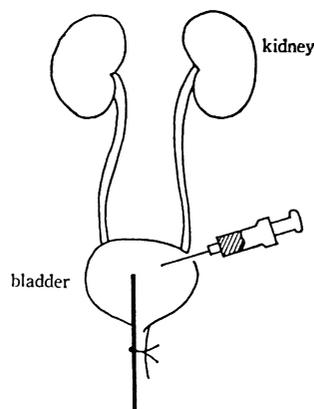


Fig. 1. Method to induce urinary tract infection using urethral stricture

* 富山市下奥井 2-4-1

菌接種 1 日後から経日的に腎の摘出を行ない、直ちに 10% ホルマリン液で固定した後、パラフィン包埋し、hematoxylin-eosin 染色を行ない組織学的観察を行なった。なお、各時間とも 1 群 3 匹について行なった。

5. 膀胱造影

E. coli NIHJ JC-2 接種後のマウスの膀胱造影を経時的に行なった。マウスをエーテル麻酔下で仰臥位に固定し、腹部に正中切開を加え、膀胱を体外へ露出し、膀胱内の尿を除いた後、内尿道口付近を手術用絹糸で結紮した。次に造影剤 0.1 ml を膀胱内へ直接注入し、穿刺部を手術用絹糸で結紮後、直ちに造影した。なお造影剤はイオタラム酸メグルミン（第一製薬）を用い、撮影は SOFTEX-CMBW 型（ソフテックス）で行なった。

II. 実験結果

1. 尿道狭窄を施したマウス尿路感染症モデルにおける腎臓中生菌数変化

E. coli NIHJ JC-2 1.7×10^5 cells/mouse 接種後の非狭窄群における死亡率は約 6% なのに比べ、狭窄群における死亡率は約 30% とやや高く、死亡日数は多くが菌接種後 2~3 日であった。狭窄群、非狭窄群における腎臓中生菌数の経時変化を Fig. 2 に示した。

狭窄群では菌接種後 12 時間以降 7 日まで全例で、14 日では 10 例中 7 例で腎臓から生菌が検出され、生菌数は菌接種以降 7 日まで 10^6 cells/kidney で持続し、14 日では 10^5 cells/kidney とやや減少した。これに対し非狭窄群では各々の時間で、腎臓から全く菌が検出されないマウスも多く、生菌数は菌接種後 12 時間以降 3 日まで

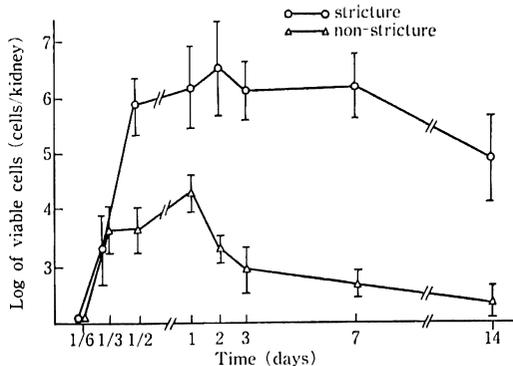


Fig. 2. Changes in viable cells in the kidney (n=7~10)

$10^3 \sim 10^4$ cells/kidney で推移し、それ以降は徐々に減少した。

2. 腎臓の肉眼的および組織学的変化

狭窄群の肉眼所見では菌接種 12 時間より腎臓の腫大が認められ、菌接種 24 時間には腎臓の腫大に加えほぼ全例の膀胱には約 0.2~0.4 ml の残尿が認められ、14 日まで続いた。非狭窄群では腎臓に特筆すべき変化や膀胱に残尿は認められなかった。

次に腎臓の病理学的所見を Table 1 および Fig. 3 a~f にしめた。

E. coli 接種 1 日後では皮質で軽度の尿細管腔の拡張 (Fig. 3 a), 髄質で軽度のうっ血および乳頭炎を伴う腎盂内膿球排泄が認められた。3 日後では皮質で軽度の尿細管腔の拡張に加え尿細管腔に硝子円柱の出現および間

Table 1. Histopathological observation

Changes in inflammation	Stricture Time (days) Number	Stricture												Non-stricture											
		1			3			7			14			1			3			7			14		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
Cortex	dilatation of the tubular lumen	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	hyaline cast in the tubular lumen	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	focal cell infiltration in the interstitium	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	necrosis of the tubular epithelia	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	focal fibrosis	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Medulla	dilatation of the tubular lumen	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	focal cell infiltration in the interstitium	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	necrosis of the collecting tubular epithelia	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	focal fibrosis	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	focal congestion	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pelvis	dilatation	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	focal cell infiltration of the epithelia	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	hyperplasia of the epithelia	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	purulent coat	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : non + : slight # : moderate ## : severe

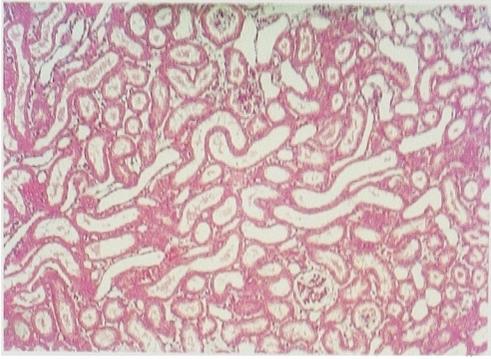


Fig. 3 a. Photomicrograph of the renal cortex at 1 day after infection with *E. coli* NIHJ JC-2 in urethrally strictured mice (hematoxylin and eosin stain $\times 100$)

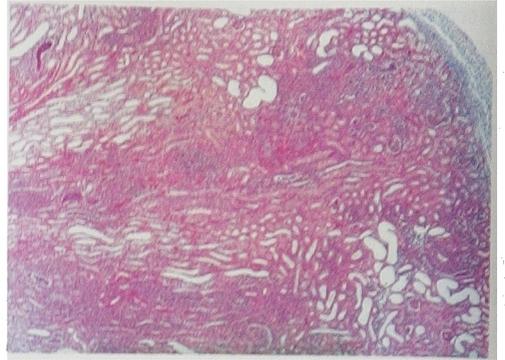


Fig. 3 b. Photomicrograph of the renal cortex and medulla renis at 3 days after infection with *E. coli* NIHJ JC-2 in urethrally strictured mice (hematoxylin and eosin stain $\times 40$)

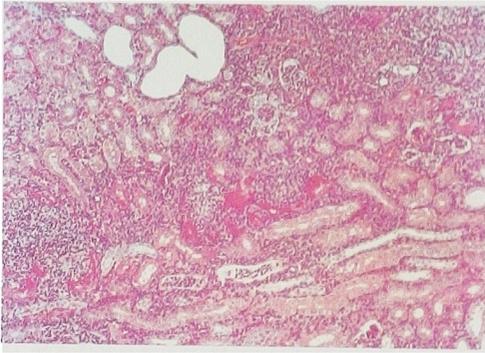


Fig. 3 c. Photomicrograph of the renal cortex at 3 days after infection with *E. coli* NIHJ JC-2 in urethrally strictured mice (hematoxylin and eosin stain $\times 100$)

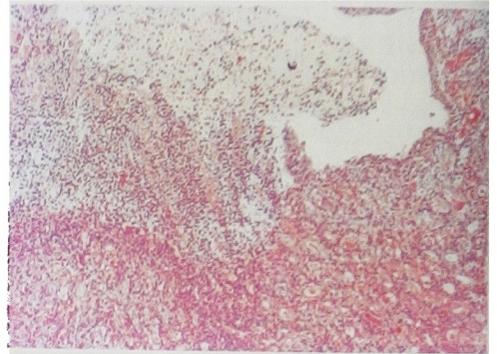


Fig. 3 d. Photomicrograph of medulla at 3 days after infection with *E. coli* NIHJ JC-2 in urethrally strictured mice (hematoxylin and eosin stain $\times 100$)

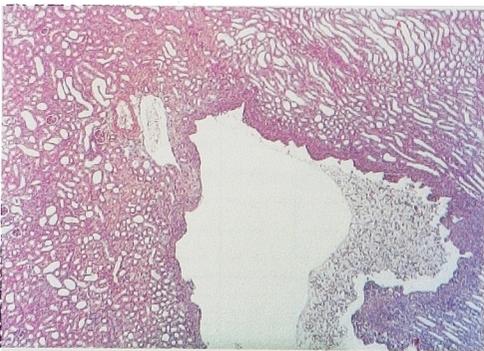


Fig. 3 e. Photomicrograph of renal pelvis at 3 days after infection with *E. coli* NIHJ JC-2 in urethrally strictured mice (hematoxylin and eosin stain $\times 40$)

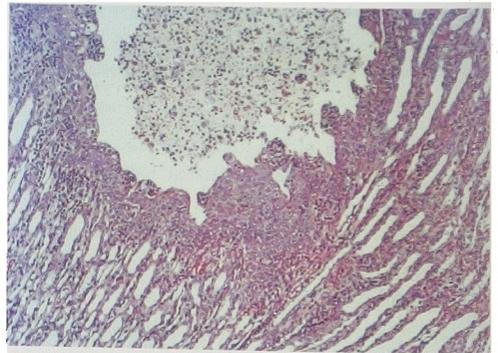


Fig. 3 f. Photomicrograph of renal pelvis at 7 days after infection with *E. coli* NIHJ JC-2 in urethrally strictured mice (hematoxylin and eosin stain $\times 200$)

質に限局性細胞浸潤 (Fig. 3 b, c) が認められた。髄質では軽度のうっ血に加え集合管上皮細胞の壊死と間質に細胞浸潤 (Fig. 3 d) が、腎盂では軽度の拡張や膿球排

泄に加え粘膜炎下に限局性細胞浸潤が認められた。7日後では皮質や髄質に3例中1例で炎症性的変化が認められたが、他の2例では認められなかった。腎盂では全例で

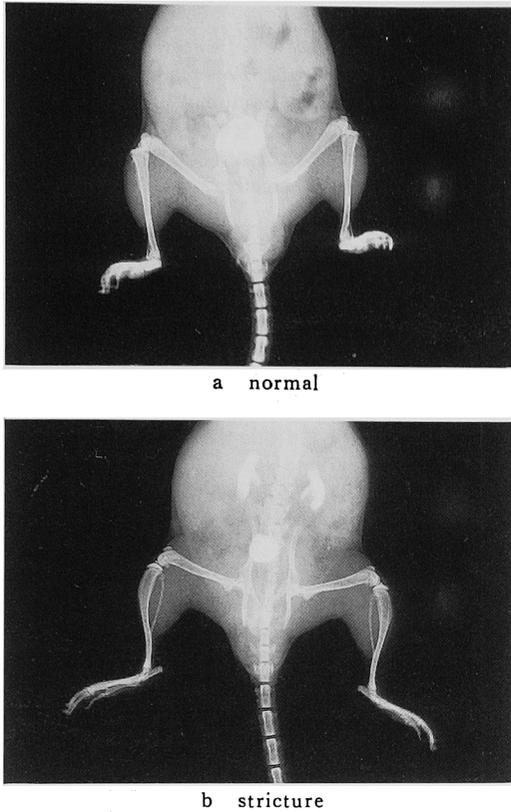


Fig. 4. Vesicoureteral reflux

拡張 (Fig. 3 e) や粘膜下の限局性細胞浸潤に加え粘膜の線維性肥厚や粘膜上皮細胞の過形成 (Fig. 3 f) が認められた。以上狭窄群を腎臓の病理組織学的所見から見ると、1日後では皮質で軽度の尿管腔の拡張や髓質で軽度のうっ血が認められ、3日後では皮質、髓質および腎盂の軽度の拡張やうっ血に加え、さらに細胞浸潤や細胞の壊死も加わった。しかし7日後では腎盂に炎症性的変化が残るものの皮質や髓質では少なくなり、14日後ではさらに回復傾向にあった。ただし、このような腎盂腎炎の病理組織学的所見には3匹のマウス間で強弱が認められた。一方非狭窄群では皮質、髓質および腎盂において炎症性的変化は全く認められなかった (Table 1)。

3. 膀胱造影

狭窄群、非狭窄群の膀胱造影を経時的に行なった。

正常な雄マウスの膀胱造影では膀胱だけが造影され、膀胱尿管逆流 vesicoureteral reflux (VUR) は認められなかった (Fig. 4 a)。これに対し狭窄、非狭窄群では4, 8時間後にはVURは認められなかったが、12時間後には両群とも3例中2例で膀胱に加え尿管および腎盂も造影されVURが認められた (Fig. 4 b)。また24時間後には狭窄群で6例中1例、非狭窄群では6例中5例でVURが認められた。狭窄群では7日、14日後に各々3例中1例、非狭窄群では3日、7日後に各々3例中1例にVURが認められた。

III. 考察

抗生剤の薬効評価などの化学療法の基礎的検討のため、実験的尿路感染症モデルは種々の方法で検討されている。感染経路として血行性、上行性の2つの経路があげられる。血行性感染による尿路感染症モデルは前処置が複雑であり、临床上、上行性感染が多いこと⁶⁾より尿路感染症モデルの作成には上行性感染による方法が多く用いられている⁷⁾。実験動物としてはマウス、ラット、家兎が多く用いられているが、抗生剤の薬効評価など多数の個体を同時に必要とする実験系においては、膀胱内への菌接種のみで腎盂腎炎を発生し得るマウスやラットが多く用いられている⁷⁾。マウスやラットに上行性感染を惹起する方法としては、主に経尿道法あるいは膀胱内接種法が用いられている。経尿道法は外尿道口から細いカテーテルなどを用いて膀胱内へ菌液を注入後、外尿道口を閉鎖し腎盂腎炎を発生させる方法であり、膀胱内直接接種法は腹部に正中切開を加え膀胱を体外へ露出し、膀胱へ直接菌を注入する方法である。これらの方法に何らかの補助手段を加え、腎盂腎炎の発症率を高める試みがなされている。補助手段としては膀胱内異物となるガラス玉を膀胱内へ封入するガラス玉封入法³⁾、尿管に不完全な狭窄を設ける尿管処置法⁴⁾、薬物投与により腎乳頭壊死を惹起させる腎乳頭壊死法⁵⁾が主に用いられている。それ以外に菌液を注入後腎や膀胱をマッサージする方法^{8,9)}、膀胱壁の一部を切除する方法¹⁰⁾、免疫抑制剤や副腎皮質ホルモンなどを投与して宿主免疫能を低下させる方法^{11,12)}も検討されている。

今回新たな補助手段として尿道狭窄を考え、尿道狭窄

Table 2. Vesicoureteral reflux

	Time (days)							
	1/6	1/3	1/2	1	3	7	14	
Stricture	---	---	- + #	--- +	---	- - +	- - +	
Non-stricture	---	---	- + +	- + + # # #	- - +	- - +	- - -	

- : non VUR + : unilateral VUR # : bilateral VUR

を施したマウス尿路感染症モデルの作成を試みた。雄マウスの尿道に狭窄を施し *E. coli* NIHJ JC-2 を感染させたモデルは非狭窄群に比べ腎臓内に定着した菌数は多かった。VUR の観察と腎臓中生菌数の変化を考えた場合、狭窄群では膀胱内へ接種された菌が、12 時間後に 3 例中 2 例と高率で認められる VUR によって腎臓内へ侵入し、1 日後には VUR はなくなるものの、尿道狭窄に伴う尿の停滞のために腎臓からの菌の消失は遅れ、腎臓中生菌数は高菌量で持続したと思われる。一方非狭窄モデルでは 12 時間および 1 日後に高率で VUR が認められるものの、尿の停滞がないため腎臓からの菌の消失は速やかで、腎臓中生菌数は低菌量で推移したものである。肉眼所見では膀胱の残尿と腎臓の腫大が、病理組織学的所見では皮質、髄質および腎盂に炎症像が認められ、実験的に腎盂腎炎を高率に発症させることができた。

上田¹³⁾は菌種による実験的腎盂腎炎の発症について、*Proteus mirabilis* の定着が最も良く、次いで *Pseudomonas aeruginosa*、ややおとって *Klebsiella pneumoniae*、*E. coli* は定着が最も悪いと報告している。

最近、尿路感染症から分離される細菌は多種多様で、これらの細菌の尿路における病原性を検索することは重要である。*E. coli* でも補助手段として尿道狭窄を施すことで腎盂腎炎を作成できたことは、ある細菌がどの程度尿路に病原性を有しているかの推察が、その細菌を用いて狭窄群と非狭窄群を作成し比較することで行えると考えられる。また狭窄群の腎臓中生菌数は持続的に推移し 7 日後で 10^6 cells/kidney, 14 日後でも 10^5 cells/kidney であった。本モデルにおいて、さらに病理組織学的にもバラツキの少ない一定の所見が得られるように出来れば、新抗菌剤の薬効を、尿路感染症の臨床検討に先立って評価するうえでも有用であると考えられる。

稿を終るにあたり、病理組織標本の作成に御助力くださった、当社、安全性研究所の河村泰仁氏、中川重仁氏、膀胱造影に御助力くださった中村昌三氏に謝意を表します。

文 献

- 1) NISHI T, TSUCHIYA K: Experimental urinary tract infection with *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Infect. Immun.* 22: 508~515, 1978
- 2) 大森康男, 小川正俊, 宮崎修一, 五島瑛智子: 各種グラム陰性桿菌による実験的尿路感染症に関する基礎的研究。 *Chemotherapy* 30: 1237~1249, 1982
- 3) 熊沢淨一: 基底患を伴う実験的腎盂腎炎に対する化学療法の効果。 *西日泌尿* 33: 183~189, 1971
- 4) 百瀬俊郎, 熊沢淨一, 楢橋勝利, 日高正明: 実験的腎盂腎炎に対する Enduracidin の効果。 *Chemotherapy* 16: 466~469, 1968
- 5) 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に関する研究。とくに BEA 前処置について。 *Chemotherapy* 27: 269~274, 1979
- 6) MONTGOMERIE J Z, GUZE L: The renal response to infection, in *The kidney*, vol. II (BRENNER, B. M. & F. C. RECTOR Jr) pp. 1079~1112 W. B. Saunders Company, Philadelphia, London & Toronto, 1976
- 7) 熊沢淨一: 実験的腎盂腎炎研究の現況。 *Chemotherapy* 29: 1~8, 1981
- 8) SOMMER J L: Experimental pyelonephritis in the rat with observations on ureteral reflux. *J. Urol.* 86: 375~381, 1961
- 9) HEPTINSTALL R H: Experimental pyelonephritis. *Nephron* 1: 73~92, 1964
- 10) ROCHA H, BARRROS M: Experimental pyelonephritis: Characteristics of infection in rats following reduction of bladder capacity. *Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.)* 120: 122~124, 1968
- 11) JACKSON G G, ARANA J A, KOZIJ Y M: Retrograde pyelonephritis in the rat and the role of certain cellular and humoral factors in the host defence, in *Progress in Pyelonephritis* (KASS, E. H.) pp. 202~210 F. A. Davis Co., Philadelphia, 1965
- 12) 長田恭明, 中条正行, 小河秀正: 実験的尿路感染症の研究。 *日本細菌学雑誌* 26: 553~561, 1971
- 13) 上田 泰: 実験的腎盂腎炎の化学療法にかんする研究。発症と進展に関連して。 *Chemotherapy* 22: 1474~1478, 1974

EXPERIMENTAL URINARY TRACT INFECTION INDUCED BY A URETHRAL STRICTURE IN MICE

HIROMI KAKIZAWA, RITSUKO HORI, AKIRA YOTSUJI, TAKASHI YASUDA
and ISAMU SAIKAWA

Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd., 2-4-1, Shimookui, Toyama 930, Japan

MASATSUNE HASEGAWA
Hasegawa Clinic

The purpose of this study was to induce an experimental urinary tract infection, pyelonephritis, in mice by using a urethral stricture followed by intravesical inoculation of bacteria. Viable cells in the kidney were studied and histopathological observations made for 14 days.

Urinary retention was observed in all mice at 24 hours after the inoculation. A large number of bacteria remained in the kidney : 10^6 cells/kidney at 7 days and 10^5 cells/kidney at 14 days. Histopathologically, inflammatory cells were observed in the renal cortex at day 1 and in the renal cortex, medulla and renal pelvis at day 3. Inflammatory cells were observed in the renal pelvis but not in the renal cortex and medulla at day 7. Subsequently, all inflammatory cells decreased at day 14. Vesicoureteral reflux was frequently observed at 12 hours.

Thus, in the urethrally strictured mice bacteriuria continued which derived from vesicoureteral reflux. Histopathologically, however, pyelonephritis developed differently in three animals. Further investigation is under consideration.