

実験的上行性腎盂腎炎モデルにおける *Enterococcus faecalis* と *Proteus mirabilis* との複数菌感染と薬剤治療効果について

Enterococcus faecalis を中心とした解析

山崎 浩・荒川 創一・守殿 貞夫

神戸大学医学部泌尿器科学教室* (主任 守殿貞人教授)

(平成2年9月19日受付・平成3年4月18日受理)

ヒト尿路感染症より分離された *Enterococcus faecalis* (以下 *E. faecalis*) および *Proteus mirabilis* (以下 *P. mirabilis*) を用いマウス上行性腎盂腎炎モデルを作製し、これら複数菌感染における両菌種の病原性および抗菌薬の治療効果を検討した。その結果以下のような成績を得た。

(1) 複数菌接種した場合の経日的腎内生菌数は *E. faecalis* は単独接種時より少なく、*P. mirabilis* は単独接種時より多かった。この成績より両菌による複数菌感染においては *P. mirabilis* の病原性が優位であることが示された。

(2) 複数菌接種後、enoxacin, ofloxacin, lomefloxacin, pipemidic acid, ampicillin のいずれかを投薬しその腎内生菌数の推移から治療効果を判定した。*P. mirabilis* の除菌効果をみると、本菌単独接種時と同等の効果を得るのに約2倍の投薬量を要し、複数菌感染での治療抵抗性が示された。

(3) 複数菌接種モデルにおいて *E. faecalis* は、*P. mirabilis* に比し全般に薬剤による除菌効果が悪く、感染防御能低下宿主等における日和見感染の原因菌としての重要性が示唆された。

(4) 両菌混合接種時の腎病理組織学的所見は一般にみられる非特異性炎症像を示すが、その生菌数に比例して炎症像は増強していた。

Key words: 実験的上行性腎盂腎炎, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, 複数菌接種

グラム陽性連鎖球菌の一種である *Enterococcus faecalis* は、主としてヒト腸管内に正常細菌叢として常在し、自然界にも広く分布している。

本菌は、一般的に用いられる多くの抗菌薬に低感受性であること、特に使用頻度の高いセフェム系薬剤に高度耐性であることから、*E. faecalis* による感染症が年々増加傾向にある。

従来、本菌は敗血症、感染性心内膜炎の起炎菌の一つとされていたが、最近では、泌尿器科領域の複雑性尿路感染症においても高頻度に分離されている。本菌は尿路に基礎疾患を有する複雑性尿路感染の他に、担癌状態、糖尿病、腎不全などの全身性易感染状態の(生体防禦能の低下した)いわゆる immuno-compromised host における尿路感染症でも見られる。泌尿器科、他科を問わず本菌が漸増傾向にあることは、最近の神戸大学医学部附属病院における尿路分離集計結果¹⁾ においても示されている。また、*E.*

faecalis はグラム陰性桿菌との複数菌感染の一翼として分離されることが多いことも知られている。*E. faecalis* の全身感染に対する病原性についての基礎的研究としては、Guzeら他²⁻⁵⁾ の報告が見られるか、尿路感染症については若干の報告^{6,7,9)} がみられるのみで、いまだ充分検討されていない。

一方、*Proteus mirabilis* はグラム陰性桿菌の中でもいわゆる major GNR の一種として位置づけられており、その尿路に対する病原性についてもすでに確立した一定の見解が得られている¹⁰⁾。

今回著者らは、*E. faecalis* の尿路に対する病原性を臨床の病態に即し検討する目的で、尿路感染症患者尿中より分離された *E. faecalis* および *P. mirabilis* の単独および両菌の複数菌接種によるマウスの実験的尿路感染症モデルを用いて検討すると共に、薬効評価モデルを作成し、これら単独菌および複数菌感染に対する各種抗菌剤の治療効果を検

* 神戸市中央区楠町7-5-1

討し、興味ある知見を得たので報告する。

1. 実験材料および方法

1. 実験動物: 4週齢のJCL ICR雌性マウス(日本クレア)を1~2週間予備飼育し、体重23~27gになったものを用いた。マウス数は各検討項目ごとに5匹ずつとした。

2. 被検薬剤: Enoxacin (ENX 大日本製薬), ofloxacin (OFLX 第一製薬), lomefloxacin (LFLX 塩野義製薬), pipemidic acid (PPA 大日本製薬), および ampicillin (ABPC 明治製薬) を使用した。

3. 使用菌株: 尿路感染症患者より分離された *E. faecalis* 16148 および *P. mirabilis* P 3003 を用いた。

4. 実験方法

1) 上行性腎盂腎炎モデルの作製および感染の推移
E. faecalis 16148 および *P. mirabilis* P 3003 は Tryptosoy broth で所定濃度の菌液になるよう希釈し、単独菌接種の場合、*E. faecalis* では、 1×10^7 , 1×10^6 および 1×10^5 CFU/mouse を接種、*P. mirabilis* では、 1×10^6 , 1×10^5 および 1×10^4 CFU/mouse、複数菌接種では *E. faecalis* 1×10^6 CFU と *P. mirabilis* 1×10^5 CFU/mouse を同時に経尿道的に膀胱内に 0.1 ml 注入した。注入は、ネプタール (大日本製薬) 麻酔下に先の丸い 23 ゲージの注射針と 1 ml の注射筒を用い行った。菌液注入後、外尿道口を 5 時間クランプすることにより、上行性腎盂腎炎を作成した。なお菌接種前に膀胱を腹壁上より圧迫、強制排尿させ、膀胱を空虚とし、接種後 24 時間は絶水させた。接種後、3, 7 および 14 日目にマウスを麻酔下に処理し、両側腎を無菌的に摘出した。摘出腎に 5 ml の生理食塩水を加えてホモジナイズしたものを、生理食塩水で希釈し、その希釈液を CLED (Oxoid), DHL (栄研) および バイルエスクリン寒天培地 (Difco) にマイクロピペットで 0.1 ml 正確に入れ、コンラージ棒で平板全体に広げた。その平板を 37°C で 24 時間培養後、腎当りの生菌数を算出した。病理組織学的検索は、腎を 10% ホルマリンで固定後、パラフィン切片、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作成し、光学顕微鏡にて観察した。*E. faecalis* による上行性腎盂腎炎の病理組織学的検討については、著者ら⁹⁾の報告に詳述されているので今回は省略した。

2) 感染治療実験

P. mirabilis 単独菌接種 (I) および *P. mirabilis* と *E. faecalis* の複数菌接種 (II) の 2 群に対する薬剤治療効果を検討した。接種経路等は前記実験と同様とした。(I) 群では *P. mirabilis* 1×10^5 CFU/mouse 単独菌接種、(II) 群では *P. mirabilis* 1×10^5 CFU と

E. faecalis 1×10^6 CFU/mouse とを同時接種し、菌接種 24 時間後より 1 日 2 回 5 日間、各薬剤を投与した。感染 7 日目にマウスを麻酔下に処理し、両側腎を無菌的に摘出、上述と同様に生菌数を算出した。薬効は腎内からの菌の消失および減少率から評価し、対照群に比し有意に減少した場合を有効とした。なお生菌数は原則として 10 を底とする対数値の平均値で表わした。なお、*E. faecalis* 単独菌接種群での薬剤の治療効果については、すでに著者らにより報告されており考察ではその成績を引用した。

また、(I) (II) 両群ともに腎の肉眼的および病理組織学的所見を検索した。

II. 結 果

1. 上行性腎盂腎炎モデルにおける腎内菌数の変化
1) *E. faecalis*, *P. mirabilis* 単独および複数菌接種時の生菌数

a) *P. mirabilis* 単独菌接種 (Fig. 1)

P. mirabilis 1×10^6 , 10^5 および 10^4 CFU/mouse 単独菌接種時のそれぞれの経日的平均腎内生菌数は、 1×10^6 CFU/mouse 接種では 3 日目で 8.4 (対数値)、7 日目で 7.4, 14 日目で 6.2 と感染が成立し、10~20% のマウスに感染死がみられた。 1×10^5 CFU/mouse 接種では、3 日目で 4.9, 7 日目で 4.2, 14 日目で 3.2 と時間の経過と共に生菌数に漸減傾向が認められたが、すべてのマウスで、3.0 以上の有意菌数が検出された。 1×10^4 CFU/mouse 接種では、3 および 7 日目で有意菌数が回収されているが、14 日目は全マウスで測定限界以下になり、感染の自然消退が観察された。

b) *E. faecalis* 単独菌接種 (Fig. 2)

E. faecalis 1×10^7 , 10^6 および 10^5 CFU/mouse 単独接種時の腎内生菌数は、 1×10^7 CFU/mouse 接種では接種後 3 日目で 6.9 (対数値)、7 日目で 8.5, 14 日目で 4.8 となり、7 日目に最高値を示した。 1×10^6 CFU/mouse 接種では、3, 7 および 14 日目の腎内生菌数はそれぞれ 6.6, 7.0 および 5.4 といずれの測定日においても有意の生菌数が回収された。 1×10^5 CFU/mouse 接種時には、3, 7 および 14 日目ではそれぞれ 5.7, 4.6 および 4.1 となり経日的に漸減傾向を示した。

c) *E. faecalis*, *P. mirabilis* 複数菌接種 (Fig. 3)

P. mirabilis 1×10^5 CFU/mouse と *E. faecalis* 1×10^6 CFU/mouse 同時接種後の両菌の腎内生菌数は、*E. faecalis* では、3 日目 5.5, 7 日目 5.6, 14 日目 4.3 と全般に単独菌接種時に比し菌数が少なく、かつ、14 日目で減少が認められるのに対して、*P. mirabilis* で

は、3、7および14日にそれぞれ、6.0、6.6および6.0と、単独菌接種時に比し菌数が明らかに多くかつ遷延する傾向が認められた。本成績は、両菌による複

数菌感染では、*P. mirabilis* の病原性が優位であることを示唆している。

2) 病理組織学的所見

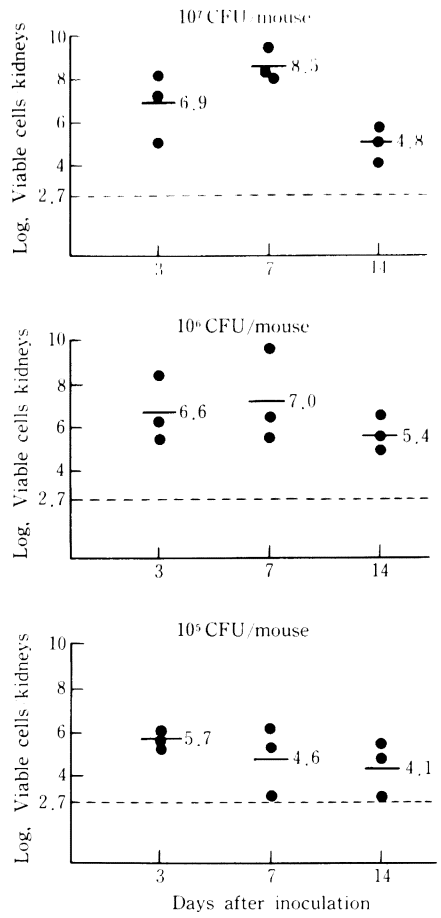
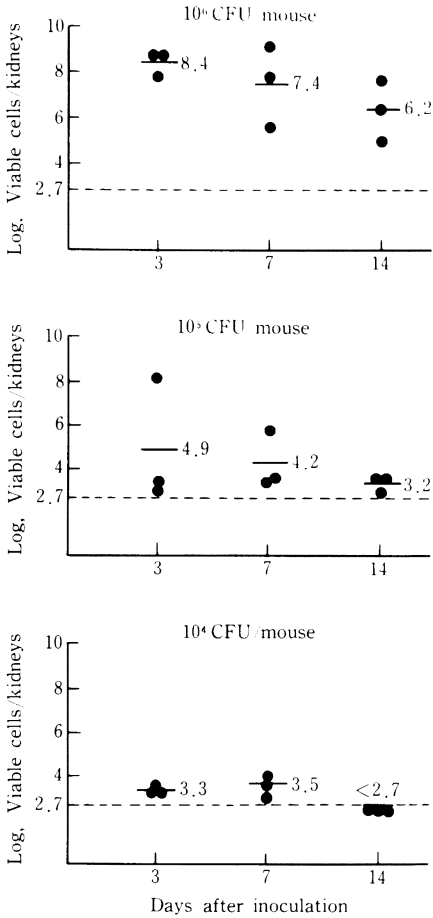


Fig. 1. Viable bacterial count in kidneys of mice inoculated with *Proteus mirabilis* P-3003.

Fig. 2. Viable bacterial count in kidneys of mice inoculated with *Enterococcus faecalis* 16148.

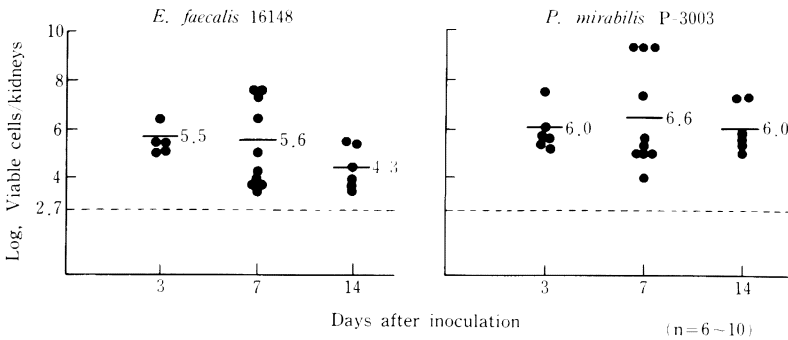


Fig. 3. Viable bacterial count in kidneys of mice inoculated with *Enterococcus faecalis* 16148 and *Proteus mirabilis* P-3003.

a) *P. mirabilis* 単独菌接種

P. mirabilis 1×10^5 CFU/mouse 単独接種後7日目の腎 (Fig. 4-1) は肉眼的に退色し、組織学的 (Fig. 4-2) には腎の皮質および髓質部に好中球の浸潤および広範な尿細管の変性を認めた。

b) *E. faecalis* および *P. mirabilis* 複数菌接種 *P. mirabilis* 1×10^5 CFU/mouse および *E. faecalis* 16148 1×10^6 CFU/mouse 複数菌接種7日目の腎 (Fig. 5-1) 表面には肉眼的に多数の小膿瘍が認められる。組織学的 (Fig. 5-2) に腎の皮質および髓質部に好中球の浸潤、出血、尿細管の変性が広範囲に認められた。

2. 感染治療実験

1) *P. mirabilis*-P 3003 1×10^5 CFU/mouse 単独菌接種時の実験的上行性腎盂腎炎に対する各種薬剤の治療効果



Fig. 4-1. Necropsy findings of an untreated mouse killed 7 days after inoculation with *Proteus mirabilis* P-3003 (1×10^5 CFU/mouse).

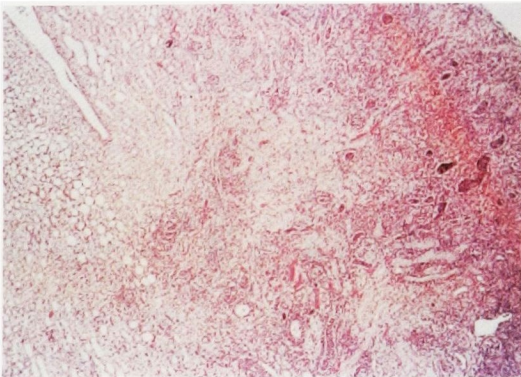


Fig. 4-2. Histopathological findings of an untreated mouse killed 7 days after inoculation with *Proteus mirabilis* P-3003 (1×10^5 CFU/mouse). (H. E. $\times 150$)

a) ENX (MIC: 0.39 μ g/ml) (Fig. 6-a)

P. mirabilis 単独菌感染における無治療コントロール群の腎内生菌数5.5に対し、ENX 50 mg/kg (1回投与量として) 投与群では、全てのマウスで菌陰性化し、25 mg/kg でも有意な減少が得られたが、12.5 mg/kg においては減少がみられなかった。

b) OFLX (MIC: 0.20 μ g/ml) (Fig. 6-b)

OFLX 50 mg/kg 投与群では、すべてのマウスで菌陰性化し、25 および 12.5 mg/kg 投与群においても有意に生菌数が減少していた。

c) LFLX (MIC: 0.39 μ g/ml) (Fig. 6-c)

LFLX 50 mg/kg および 25 mg/kg 投与において、腎内生菌数の有意の減少が認められたが、12.5 mg/kg

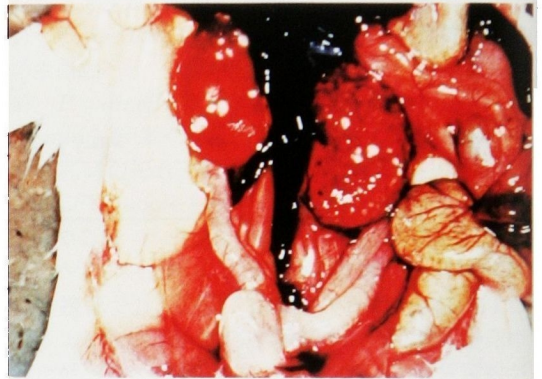


Fig. 5-1. Necropsy findings of a non-treated mouse killed 7 days after inoculation with *Enterococcus faecalis* 16148 and *Proteus mirabilis* P-3003 (1×10^5 CFU/mouse) (1×10^5 CFU/mouse).

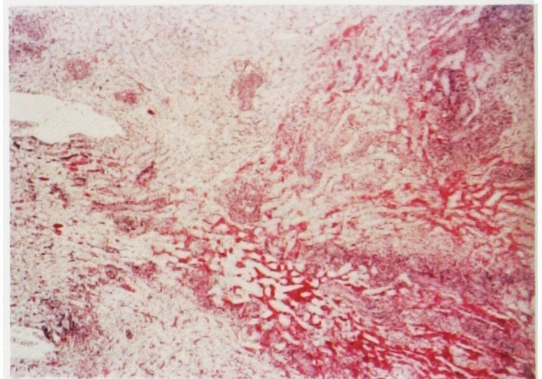


Fig. 5-2. Histopathological findings of a non-treated mouse killed 7 days after inoculation with *Enterococcus faecalis* 16148 and *Proteus mirabilis* P-3003 (1×10^5 CFU/mouse) (1×10^5 CFU/mouse). (H. E. $\times 150$)

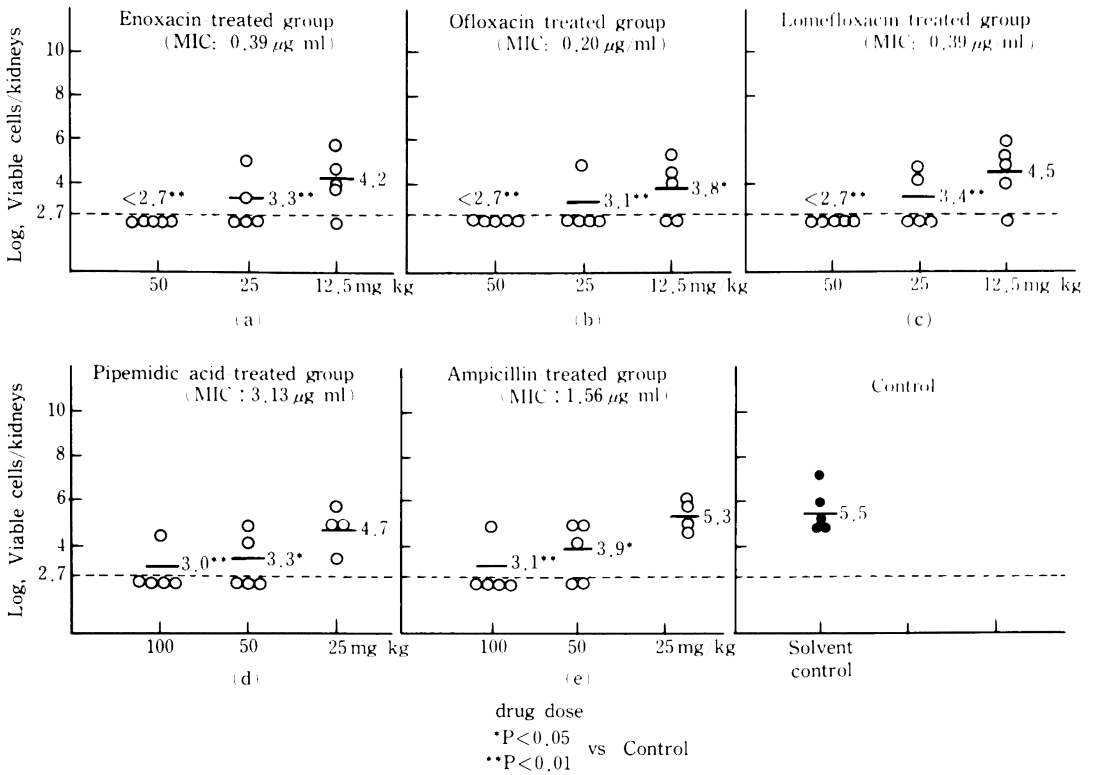


Fig. 6. Viable bacterial count in kidneys of mice 7 days after inoculation with *Proteus mirabilis* P-3003.

kg 投与では減少を認めなかった。

d) PPA (MIC: 3.13 μg/ml) (Fig. 6-d)

PPA 100 および 50 mg/kg 投与群において有意の生菌数の減少が認められたが、25 mg/kg 投与においては生菌数の減少を認めなかった。

e) ABPC (MIC: 1.56 μg/ml) (Fig. 6-e)

ABPC 100 および 50 mg/kg 投与において有意の生菌数の減少が認められたが、25 mg/kg 投与においては生菌数の減少を認めなかった。

2) *E. faecalis*, *P. mirabilis* 複数菌接種時の両菌に対する各種薬剤の治療効果。

a) ENX (Fig. 7-a)

E. faecalis の平均腎内生菌数は無治療コントロール群の 7.3 に対し、ENX 100, 50 および 25 mg/kg 投与群でそれぞれ、3.5, 4.0 および 5.6 であり、いずれの投与群においても有意の生菌数の減少を認めた。*P. mirabilis* はコントロール群の生菌数 7.3 に対し、100, 50 および 25 mg/kg 投与群では、それぞれ 100, 60, 20% のマウスで、菌陰性化し、50 および 25 mg/

kg 投与での平均生菌数は、それぞれ 3.4, 4.3 となり、コントロール群に比し有意に減少していた。

b) OFLX (Fig. 7-b)

E. faecalis の腎内生菌数は OFLX 100 および 50 mg/kg 投与でそれぞれ 3.8, 4.1 であり、コントロール群に比し有意に減少したが、25 mg/kg 投与で有意な生菌数の減少は認められなかった。

P. mirabilis では、100, 50 および 25 mg/kg 投与群において、それぞれ 100, 60, 60% のマウスで、菌陰性化がみられた。50 および 25 mg/kg 投与群での平均生菌においてもそれぞれ 3.3, 3.1 と有意や減少を認めた。

c) LFLX (Fig. 7-c)

E. faecalis の腎内生菌数は、100, 50 および 25 mg/kg 投与群でそれぞれ 4.5, 5.7 および 6.9 であり、100 および 50 mg/kg 投与群ではコントロール群に比し、有意な生菌数の減少が認められた。*P. mirabilis* では 100, 50 および 25 mg/kg 投与群では、生菌数はそれぞれ 3.2, 3.1 および 3.4 であり、有意に菌数が

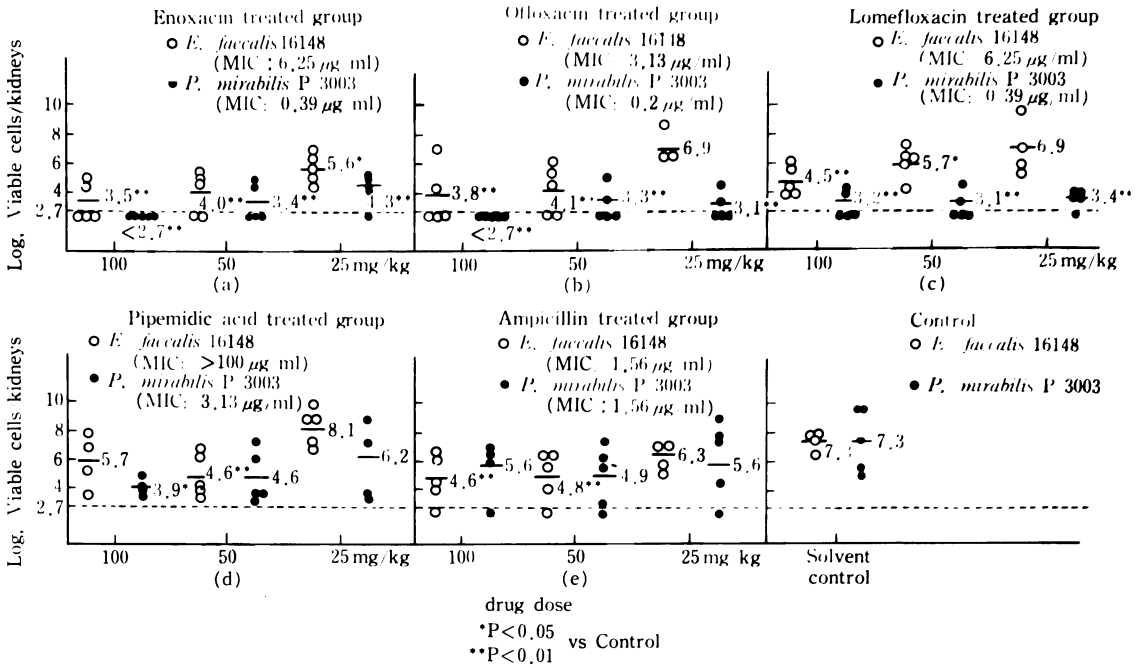


Fig. 7. Viable bacterial count in kidneys of mice 7 days after inoculation with *Enterococcus faecalis* 16148 and *Proteus mirabilis* P-3003.

Monomicrobial infection (<i>P. mirabilis</i> alone)				Polymicrobial infection (<i>P. mirabilis</i> and <i>E. faecalis</i>)			
Drug	MIC (<i>P. mirabilis</i>) (µg/ml)	Dose (mg/kg)	<i>P. mirabilis</i> P-3003 Log. Viable cells/kidneys	<i>P. mirabilis</i> P-3003 Log. Viable cells kidneys	MIC <i>E. faecalis</i> (µg/ml)	<i>E. faecalis</i> 16148 Log. Viable cells kidneys	
			3 5 7	3 5 7		3 5 7	
Enoxacin	0.39	100	<2.7**	<2.7**	6.25	3.5±0.5**	
		50	3.3±0.4**	3.4±0.5**		4.0±0.5**	
		25	4.2±0.5	4.3±0.4*		5.6±0.4**	
		12.5					
Ofloxacin	0.2	100	<2.7**	<2.7**	3.13	3.8±0.8**	
		50	3.1±0.4**	3.3±0.4**		4.1±0.6**	
		25	3.8±0.5*	3.1±0.3**		6.9±0.7	
		12.5					
Lomefloxacin	0.39	100	<2.7	3.2±0.3**	6.25	4.5±0.4**	
		50	3.4±0.4**	3.1±0.3**		5.7±0.5*	
		25	4.5±0.5	3.4±0.2**		6.9±0.7	
		12.5					
Pipemidic acid	3.13	100	3.0±0.3**	3.9±0.3*	>100	5.7±0.9	
		50	3.3±0.5*	4.6±0.8		4.6±0.7	
		25	4.8±0.4	6.2±1.1		8.1±0.5	
Ampicillin	1.56	100	3.1±0.4**	5.6±0.7	1.56	4.6±0.7**	
		50	4.0±0.5*	4.9±0.9		4.8±0.7**	
		25	5.3±0.3	5.6±1.0		6.3±0.4	
Control	-	-	5.5±0.5	7.3±0.2	-	7.3±1.0	

*P < 0.05 **P < 0.01 vs Control

Fig. 8. Effect of antibacterial agents against experimental urinary tract infection with *Enterococcus faecalis* 16148 and *Proteus mirabilis* P-3003 in mice.

減少し、いずれの投与群においても菌陰性例が認められた。

d) PPA (Fig. 7-d)

E. faecalis については、PPA 100, 50 および 25 mg/kg 投与群のいずれにおいても明らかな菌数の減少は得られなかった。*P. mirabilis* では、100, 50 および 25 mg/kg 投与群での生菌数の平均はそれぞれ 3.9, 4.6 および 6.2 であり、100 mg/kg 投与群で有意の生菌数の減少を認めた。

e) ABPC (Fig. 7-e)

E. faecalis の腎内生菌数は、ABPC 100 および 50 mg/kg 投与群でそれぞれ 4.6 および 4.8 であり、有

意の減少が得られたが、25 mg/kg では減少を認めなかった。*P. mirabilis* では、いずれの投与量においても有意な菌数減少を認めなかった。

f) 複数菌感染腎盂腎炎モデルに対する 5 薬剤の薬効 (Fig. 8)

P. mirabilis と *E. faecalis* の複数菌接種モデルにおいて、ENX および OFLX は両菌に対し優れた除菌および菌減少効果を示したが、*P. mirabilis* 単独菌感染と同じ治療効果を得るには約 2 倍の投与量が必要であることが明らかになった。これら薬剤の低用量投与群では、*E. faecalis* が残存し、日和見感染菌として持続しやすい可能性が示唆された。

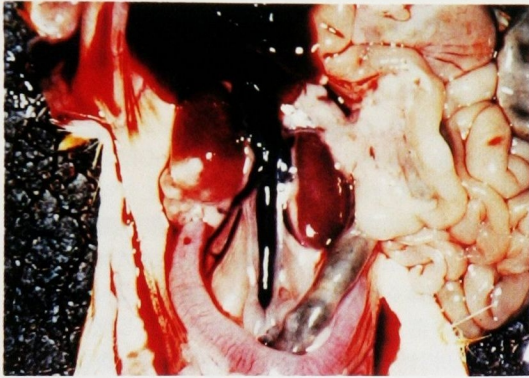


Fig. 9-1. Necropsy findings of an ampicillin 100 mg/kg treated mouse killed 7 days after inoculation with *Enterococcus faecalis* 16148 and *Proteus mirabilis* P-3003 (1×10^6 CFU/mouse) (1×10^5 CFU/mouse)

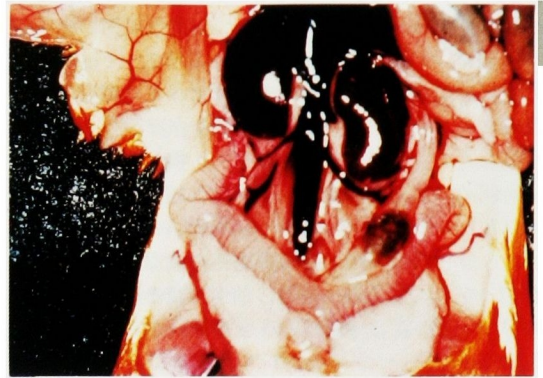


Fig. 10-1. Necropsy findings of an enoxacin 50 mg/kg treated mouse killed 7 days after inoculation with *Enterococcus faecalis* 16148 and *Proteus mirabilis* P-3003 (1×10^6 CFU/mouse) (1×10^5 CFU/mouse).

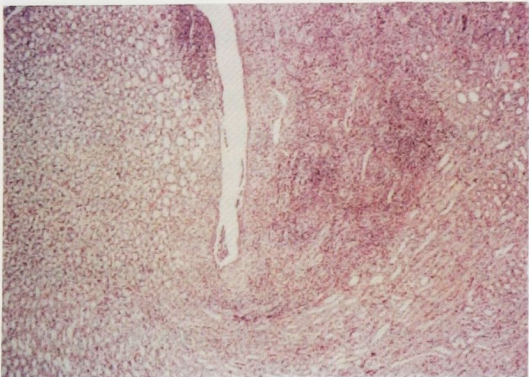


Fig. 9-2. Histopathological findings of an ampicillin 100 mg/kg treated mouse killed 7 days after inoculation with *Enterococcus faecalis* 16148 and *Proteus mimabilis* P-3003 (1×10^6 CFU/mouse) (1×10^5 CFU/mouse). (H. E. $\times 150$)

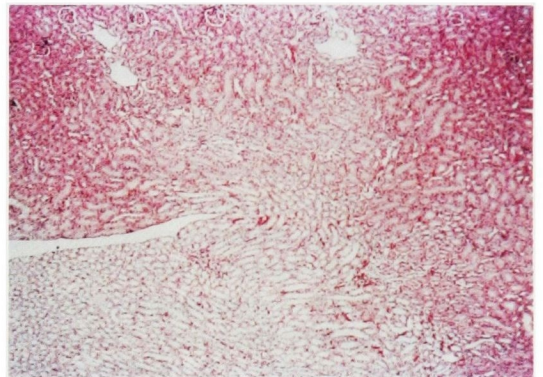


Fig. 10-2. Histopathological findings of an enoxacin 50 mg/kg treated mouse killed 7 days after inoculation with *Enterococcus faecalis* 16148 and *Proteus mirabilis* P-3003 (1×10^6 CFU/mouse) (1×10^5 CFU/mouse). (H. E. $\times 150$)

PPA は *E. faecalis* に、ABPC では *P. mirabilis* に無効であった。

3) *E. faecalis*, *P. mirabilis* 複数菌接種時の感染治療実験における7日目の病理組織学的所見。

治療実験での薬剤別病理組織学的所見に特徴は認めなかったため、代表例として無効であった ABPC 投与例 (a), 有効であった ENX 投与例 (b) を示す。

a) ABPC 100 mg/kg 投与マウス

肉眼的に腎表面に膿瘍を認め (Fig. 9-1) 菌回収成績でも両菌とも陽性であった。組織学的 (Fig. 9-2) に腎盂粘膜部、髄質部に好中球の浸潤が広範囲にみられ、腎乳頭部にも高度の好中球の浸潤と尿細管の変性を認めた。

b) ENX 50 mg/kg 投与マウス

肉眼的 (Fig. 10-1) および組織学的 (Fig. 10-2) に正常腎の形態を示し、薬剤投与により治癒したものと考える。

III. 考 察

今回の複数菌接種実験の複数菌の組み合わせとしては、*E. faecalis* と *P. mirabilis* を用いたが、冒頭で述べたように後者については尿路への病原菌としての評価が一定しているのに対し、前者ではその尿路に対する病原的意義に未解決の点も多いことから、*E. faecalis* を中心に成績を解析し、以下に考察を加えてみたい。

E. faecalis は腸内常在菌の一種で、元来心内膜炎等¹¹⁻¹³⁾での分離が報告されていたが、ヒトの各臓器に対しては感染力が弱く、弱毒菌の一種と言われてきた。近年、尿路感染症において本菌分離頻度の増加が多施設で報告されてきている^{1,9,13,14)}。このことには臨床上頻繁に使用されているセフェム系抗生剤に本菌が非感受性であることが要因とされ、また分離形態として本菌が主としてグラム陰性桿菌との複数菌感染において多く分離されることが指摘されている¹⁶⁾。金子ら⁸⁾の集計では、*E. faecalis* の分離されたもののうち複数菌感染は泌尿器科で35.7%、他科で63.1%であり、泌尿器科、他科とも複数菌感染における同時分離菌としてはグラム陰性桿菌が78.8%と多くみられたことが報告されている。この点、松本ら¹⁷⁾は *Enterococcus* 分離時、複数菌感染であったものは122株中63株であり、後者での同時分離菌は82株中グラム陰性菌が多くをしめたと報告している。一方公文ら¹⁸⁾は *E. faecalis* 分離の尿路感染症のうち33.3%が複数菌感染であったとしており、その同時分離菌としては *E. coli*, *P. aeruginosa* が多かったとしている。

いままでに、動物での *E. faecalis* の尿路への病原

性につき単独接種により検討された成績としては、ラットを用いたものとして Kalmanson ら⁹⁾、金子ら⁷⁾の報告があり、マウスにおけるものとしては、著者ら⁸⁾の報告がみられる。それらによると本菌は単独でも腎盂腎炎を惹起し、その感染は遷延して持続することが示されている。特に著者ら⁸⁾は、*E. faecalis* 単独接種のマウス腎への病原性および薬剤治療効果を検討し、健常マウスでも感染を惹起する菌株が多く、病理学的に非特異性炎症像を呈し、慢性化傾向を示すこと、また本菌は糖尿病マウスでは健常マウスに比し強い病原性を示すことを明らかにしている。また、これら上行性腎盂腎炎の実験系すなわち *E. faecalis* 16148 1×10^6 CFU/mouse 単独接種モデルを用いた各種薬剤の感染治療効果 (ED₅₀) は ENX (MIC 6.25 μ g/ml) は 48.7 mg/kg, OFLX (MIC 3.0 μ g/ml) は 45.8 mg/kg, LFLX (MIC 6.2 μ g/ml) は 84.3 mg/kg, PPA (MIC > 100 μ g/ml) は > 100 mg/kg, ABPC (MIC 1.56 μ g/ml) は 71.3 mg/kg と OFLX, ENX, LFLX, ABPC の順ですぐれていた。

E. faecalis の病原因子としては本菌の菌力と溶血性、SDD 活性、カタラーゼ活性およびプロテアーゼ活性との関係を検討した宮崎らの報告¹⁹⁻²²⁾によると、 β 溶血株の菌力が、非溶血株のそれに比し明らかに強く、SDD 活性その他の菌力との間に明らかな関係は認められないことが示されている。

さて、*E. faecalis* と他菌との複数菌接種感染モデルとしては、本邦では全身感染モデルとして腹腔内菌接種実験で *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* との組み合わせでの検討が小川ら²⁰⁾により行われ、いずれの組み合わせにおいても *E. faecalis* の溶血株では非溶血株に比し生残マウス数が少なく感染力が強いことが上記宮崎らの報告と関連して、示唆されている。さらに小川ら²⁰⁾ 宮崎ら¹⁹⁾ は、*E. faecalis* 溶血株と *E. coli* の複数菌接種モデルにおいてマウスの血中から回収される *E. coli* の菌数が単独接種時に比し増加し、マウス死亡率も上昇することを報告しており、このように複数菌接種した場合に溶血性の *E. faecalis* が相互の菌力を増強せしめるメカニズムが好中球の殺菌能障害にあることを別の実験で立証している。

尿路感染モデルとしての複数菌接種は金子ら⁷⁾がラットを用いた上行性腎盂腎炎モデルで *E. faecalis* と *P. mirabilis* との複数菌接種後3日目から latamoxef (LMOX) を5日間投与する治療実験において、14日目の腎病理組織所見から治療後も無治療群と同程度に70.8%のマウスで腎盂腎炎が認められたとしている。

一方、欧米での複数菌接種実験としては Fry ら²⁴⁾

がマウス皮下膿瘍モデルにおいて、*E. faecalis* と *E. coli* の複数菌接種により、それぞれの単独接種時に比し膿瘍が増大したとしている。*E. faecalis* と嫌気性菌の複数菌接種実験としては Brook²⁵⁾ のマウス皮下膿瘍モデルの報告があり、*Bacteroides fragilis* をはじめとする 11 菌種嫌気性菌と *E. faecalis* との組み合わせのうち 7 菌種との混合接種において *E. faecalis* の菌数が有意に増加したとしている。これらの成績からも *E. faecalis* は動物への混合接種実験において他菌と共存して増殖する性質のあることがうかがえる。

複数菌感染のモデル実験については、五島ら²⁶⁾ の指摘にあるように①菌の組み合わせ、②菌種と菌数の組み合わせ③感染死の原因菌検索および④両相互の生態的相互関係すなわち共存する場合どちらが優位かということが重要となる。このうち、菌の組み合わせという問題については、今回の実験に用いた 2 菌種では前述したように *E. faecalis* が弱毒菌といえるのに対し、*P. mirabilis* は比較的感染力の強いとして位置づけることができる。臨床の場で、これら 2 菌種の組み合わせが尿路感染症から分離される頻度は、金子⁷⁾ によると *E. faecalis* が関与する複数菌感染のうち約 5% とされている。この頻度は松本¹⁷⁾ らの臨床報告でもほぼ同様となっている。金子ら⁷⁾ によると、尿路感染症では *E. faecalis* と *E. coli* の組み合わせが、22% と頻度が高い。これら臨床的背景を勘案した場合、*E. faecalis* と *E. coli* の組み合わせがまず最も重要と考えられるが、全身感染を主体として、その解析は上述のように諸家によりすでに行われていること、同様の組み合わせとして次にあげられる *E. faecalis* と *P. mirabilis* については上述のように金子ら⁷⁾ がラットで検討を加えているが尿路感染モデルとしてはより普遍的な実験系と考えられるマウスでの追試が望まれることから、今回この後者の組み合わせを選択し検討を加えた。その結果、複数菌接種後の回収菌数（対数値）は、*E. faecalis* では 3 日目 5.5、7 日目 5.6、14 日目 4.3、*P. mirabilis* では 3 日目 6.0、7 日目 6.6、14 日目 6.0 を示し単独接種時のそれらに比し、*E. faecalis* では低値を、*P. mirabilis* では高値であった。このことは、*E. faecalis* と *P. mirabilis* の複数菌による腎盂腎炎では *P. mirabilis* が優位の感染菌となる可能性を示唆している。特に、*P. mirabilis* では 14 日目においても腎内生菌数が多く、感染の遷延とともに病巣内で主たる起炎菌としての役割をもつことが推定される。*P. mirabilis* は *Proteus* 属の中では感染力の強い菌とされ、しばしば尿路に基礎疾患のない単純性尿路感染症からも分離され、その尿路上皮付着は、

E. faecalis と競合した場合には優位であると考えられている²⁹⁾。今回の成績では *P. mirabilis* の回収菌数は *E. faecalis* との複数菌接種時の方が、その単独の場合より明らかに多く、*E. faecalis* の存在が *P. mirabilis* の病原性を増幅している可能性も示唆され、このことは前述した全身感染モデル^{19,20)} における *E. faecalis* と *E. coli* の複数菌接種での成績と類似しているが、今回の実験に用いた菌株の溶血性などについて今後さらに検討すべきと思われる。なお、これら 2 菌種の複数菌接種により腎に形成された膿瘍の中に両菌が混在するか否かについて、寒天培地に摘出感染腎の断面をスタンプし培養後のコロニーを検討したが、それぞれの膿瘍部から両菌のコロニーが認められ、それら膿瘍は両菌の複数菌感染として出現しているものと判断された。

治療実験については、*P. mirabilis* 単独接種モデルにおける抗菌薬治療効果は、ENX、OFLX、PPA、ABPC、LFLX とも、それぞれの MIC に見合った成績を示した。これに対し、*P. mirabilis* と *E. faecalis* の複数菌接種モデルでは *P. mirabilis* の除菌効果からみると、上記単独接種時と同等の効果を得るのにほぼ倍量の投薬を要したことから、複数菌感染では起炎菌の治療抵抗性が増強することを示している。複数菌感染では *E. faecalis* は *P. mirabilis* に比し全般に除菌効果がやや悪く、これは MIC が高いことにもよるが、本実験系の無治療コントロールでは両菌ともに回収菌数の対数値の平均が 7.3 と同等であるのに対し、治療後は *E. faecalis* が残存する傾向にあり、いわゆる感染防御能低下宿主における日和見感染菌としての *E. faecalis* の特徴が表れているものと考えられる。

以上の腎内生菌数による成績は、病理組織学的所見ともよく一致しており、除菌されているものでは腎組織所見もほぼ正常であるのに対し、有意菌数が回収されたものでは、肉眼的には膿瘍が、組織学的には炎症細胞の浸潤を認めた。

今回著者らの作成した上行性腎感染症モデルにおける腎での菌増殖については、その複数菌接種後の経日的な回収菌数からみた限り、*P. mirabilis* 優位であり、5 日間の抗菌薬治療後に *P. mirabilis* が除菌または減少しても *E. faecalis* が残存する傾向を認めた。このことについては、今回の被検薬のなかのキノロン剤に *P. mirabilis* は高度感受性で *E. faecalis* は中等度感受性であったことが一因と考えている。Cephem 剤ではこの両菌種に対する感受性の差はさらに大きく、*E. faecalis* にほとんどが耐性であることから臨床的には *E. faecalis* が高率に残存する可能性が本成績より

推測された。

またこの実験結果は上述の金子らのラットでの実験成績とよく一致するものといえる。

E. faecalis の病原性や臨床像について、松本ら¹⁶⁾は本菌単独感染の75%で膿尿を認めたと報告している。一方では他方のグラム陰性桿菌が消失し本菌が残存した場合、症状の軽快することが多いとする報告もありその評価が一定していない。公文¹⁸⁾らは *E. faecalis* 分離の尿路感染症の臨床的解析結果から、本菌の尿路への定着性、病原性は低く、複数菌感染例においても本菌に対する感受性薬剤をあえて併用する必要はないと述べている。

一方、臨床的には尿路感染症に対する抗菌薬療法後の出現細菌として *E. faecalis* の多いことが報告されている²⁷⁾。ただしこのように残存したり、交代菌として出現しやすいということと、病原性は、必ずしも平行しないという意見も多く、selectionによるminorな菌種の *E. faecalis* の単なる表在化と解釈するものもある¹⁸⁾。尿路感染の臨床においては本菌のMICが高くても除菌されることもあり、著者らの経験²⁸⁾でも、カテーテル留置の難治性と考えられる複雑性尿路感染症28例にceftazidime (CAZ)を単剤投与したところ、投与開始前の *E. faecalis* 4株は投薬5日目まで全株除菌されており、MICを測定した3株中2株が $>100 \mu\text{g/ml}$ 以上であった。しかも4株中3株は複数菌感染例から分離されており他菌の消失と一致して除菌されている。

E. faecalis の尿中分離頻度の上昇がいわゆる第2、第3世代といわれるcephem剤の登場と機を一にしていること^{1,4)}は事実であり、本菌が弱毒菌とはいえ実験的糖尿病マウスで比較的強い病原性が報告されていること⁶⁾、無処置ラット腎に対し単独では明らかな病原性は示さないがcyclophosphamide前処置群では単独接種で腎盂腎炎の発生をみ、*P. mirabilis*との混合接種を行った場合にはLMOXによる治療後も *E. faecalis* が高頻度に残存し回収されること⁷⁾など過去の報告を勘案して今回の実験成績をみた場合、immuno compromised hostあるいは尿路局所に易感染性の条件がある場合には、*E. faecalis* は他菌との複数菌感染あるいは治療後の交代菌として難治性の尿路感染をひきおこす可能性が考えられた。

稿を終るにあたり、本研究遂行にあたり多大な御協力をいただきました中田勝久氏はじめ教室の諸先生方に深く感謝いたします。

なお本論文の一部は第61回日本化学療法学会西日本支部総会および第15回国際化学療法学会において

発表された。

文 献

- 1) 高木伸介, 前田浩志, 柯 昭仁, 藤井 明, 田 珠相, 荒川創一, 松本 修, 守殿貞夫: 尿路分離菌と薬剤感受性—神戸大学病院における5年間の推移—. 西日泌尿 52: 148~156, 1990
- 2) Guze L B, Goldner B H, Kalmanson G M: Pyelonephritis on the course of chronic non obstructed enterococcal infection in the kidney of the rat. Yale J. Biol. and Med. 33: 372~385, 1961
- 3) Erlanson Jr A L, Gagliardi L A: The pathogenesis of experimental enterococcal pyelonephritis in mice. J. Infect Dis. 108: 181~188, 1961
- 4) Pitchon H, Glassock R, Kalmanson G M, Guze L B: Experimental pyelonephritis. The effect of T-cell deficiency on the course of hematogenous enterococcal pyelonephritis in the mouse. Am. J. Pathol. 115: 25~30, 1984
- 5) 宮崎修一, 宇治達哉, 青木孝子, 小林真詔, 五島巖智子: *Enterococcus faecalis* の病原性に関する基礎的検討—マウスに対する菌力と産生物質の関連性—. 感染症学雑誌 61: 318~324, 1987
- 6) 川端 岳, 荒川創一, 守殿貞夫: *Enterococcus faecalis* の病原性に関する研究—無処置および糖尿病マウスにおける尿路感染実験—. Chemotherapy 36: 617~631, 1988
- 7) 金子裕憲: *Enterococcus faecalis* の尿路における病原性に関する基礎的・臨床的研究. 日泌尿会誌 78: 238~248, 1987
- 8) 金子裕憲: *Streptococcus faecalis* の分離された尿路感染症の臨床的検討. Chemotherapy 32: 685~691, 1984
- 9) Kalmanson G M, Sommers S C, Guze L B: Pyelonephritis. VH Experimental ascending infection with progression of lesions in the absence of bacteria. Arch Path 80: 509~516, 1965
- 10) 藤井 明, 荒井創一, 守殿貞夫: 細菌性前立腺炎に関する実験的研究, 第4報: *P. mirabilis* 感染モデルに対する治療効果およびラット前立感染実験系について. 西日泌尿 49: 107~113, 1987
- 11) Drake T A, Rodgers G M, Sande M A: Tissue Factor is a Major Stimulus for Vegetation Formation in Enterococcal Endocarditis in Rabbits. J. Clin. Invest. 73: 1750~1753, 1984
- 12) Walter R, Wilson M D, Conrad J, Wright A J, Sande M A, Gerdc J E: Treatment of Streptomycin-Susceptible and Streptomycin-Resistant Enterococcal Endocarditis. Ann. Intern. Med., 100: 816~823, 1984
- 13) Lennette E H, Balows A, Hausler W J Jr, Shadomy H J (ed.): Manual of clinical microbiology, Washington, D. C., 1985

- 14) 山口恵三, 菅原和行: 腸球菌. 化学療法領域 1: 570 ~ 575, 1985
- 15) 小栗豊子: 2. 腸球菌群の耐性の現状. 日本臨床 46: 209 ~ 219, 1988
- 16) 山口恵三, 朝野和典, 館田一博: 腸球菌. 臨床検査MOOK 25: 65 ~ 75, 1987
- 17) 松本哲朗, 田中正利, 井秀 隆, 久保周太, 熊沢浄一: 腸球菌尿中分離症例の検討. 西日泌尿 48: 467 ~ 471, 1986
- 18) 公文裕巳, 宮田和豊, 那須良次, 津川昌也, 岸 幹雄, 水野全裕, 大森弘之: 複雑性尿路感染症における *Enterococcus faecalis* の臨床的検討. 西日泌尿 49: 495 ~ 501, 1987
- 19) 宮崎修一: 腸球菌感染症—基礎の立場から. 感染症 20: 213 ~ 217, 1990
- 20) 小川正俊, 宇治達哉, 宮崎修一, 五島達智子: *Enterococcus faecalis* の実験的敗血症における病原因子に関する基礎的検討. 感染症学雑誌 62: 217 ~ 225, 1988
- 21) 小林寅詰, 他: ヒト正常腸内フローラよりの *Enterococcus faecalis* 薬剤感染症と溶血性, プロテアーゼ活性の関係について. Chemotherapy 35: 529 ~ 534, 1987
- 22) 小林寅詰, 他: *Enterococcus faecalis* その他D群連鎖球菌の分離材料別溶血性, プロテアーゼ活性および各種抗菌剤感受性の比較. Chemotherapy 34: 1238 ~ 1245, 1986
- 23) Peerbooms P G H, Vekwelj A M J J, Maclaren D M: Uropathogenic properties of *Proteus mirabilis* and *Proteus vulgaris*. J. Med. Microbiol. 19: 55 ~ 60, 1985
- 24) Donald E Fry, Susan Bererich M D, R Neal Garrison M D: Bacterial Synergism between the Enterococcus and *Escherichia coli*. J Surg. Res. 38: 475 ~ 478, 1985
- 25) Itzhak Brook M D, M Sc Bethesda, Md.: Effects of *Streptococcus faecalis* on the growth of Bacteroides species and anaerobic cocci in mixed infection. Surgery 103: 107 ~ 110, 1988
- 26) 五島達智子, 小川正俊: 感染モデルと治療効果—基礎的考察. 最新医学 35: 1805 ~ 1811, 1980
- 27) 尾形信雄, 熊澤浄一: 感染症腸球菌性尿路感染症とその治療. current therapy 5: 1560 ~ 1566, 1987
- 28) 荒川創一, 高木伸介, 前田浩志, 柯 昭仁, 松本修, 守殿貞夫: 難治性複雑性尿路感染症に対する抗菌薬単独療法—カテーテル留置例に対する Ceftazidime (CAZ) の有用性. 泌尿器外科 2: 427 ~ 431, 1987

BASIC STUDIES ON THE PATHOGENICITY OF *ENTEROCOCCUS FAECALIS*: POLYMICROBIAL INFECTION WITH *ENTEROCOCCUS FAECALIS* AND *PROTEUS MIRABILIS* IN EXPERIMENTAL ASCENDING PYELONEPHRITIS MODELS

Hiroshi Yamasaki, Soichi Arakawa and Sadao Kamidono

Department of Urology (Director: Prof. S. Kamidono), School of Medicine,
Kobe University, 7-5-1 Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe 650, Japan

We assessed the pathogenicity of *Enterococcus faecalis* and *Proteus mirabilis* and the *in vivo* activity of antimicrobial agents against these organisms by ascending urinary tract infection models in mice. The organisms assessed were *E. faecalis*-16148 and *P. mirabilis*-P 3003 clinically isolated from in-patients with complicated urinary tract infections. The results were as follows.

(1) The number of viable bacteria in the kidney of polymicrobial infection models using these two organisms was smaller for *E. faecalis* and larger for *P. mirabilis* than in monomicrobial infections. This suggests that in combined *E. faecalis* and *P. mirabilis* infections, *P. mirabilis* is more prominent than *E. faecalis*.

(2) The efficacy of antimicrobial agents (enoxacin, ofloxacin, lomefloxacin, pipemidic acid, ampicillin) was assessed by checking the number of viable bacteria in the kidney in combined *E. faecalis* and *P. mirabilis* infections. To eradicate *P. mirabilis* in polymicrobial infection models required twice the dose of each drug necessary in monomicrobial infection. The results suggest that *P. mirabilis* is more resistant in polymicrobial than in monomicrobial infection.

(3) In combined infections, *E. faecalis* was more effectively eradicated by the drugs tested than was *P. mirabilis*, reflecting the characteristics of *E. faecalis* as a cause of opportunistic infections.

(4) In combined infections, histopathological investigation showed nonspecific inflammation in parallel to the number of viable cells in kidneys, as in monomicrobial infection.