

## 実験腎盂腎炎における抗菌剤と抗炎症剤の併用に関する研究

松本 哲朗・原岡 正志・水之江義充  
高橋 康一・久保 周太・佐久本 操  
田中 正利・坂本 泰樹・熊澤 浄一  
九州大学医学部泌尿器科\*

(平成6年1月17日受付・平成6年2月25日受理)

腎盂腎炎における感染後の腎瘢痕化予防法についてラットの腎実質内直接感染モデルおよび膀胱内接種による上行性感感染モデルを用いて検討した。腎実質内直接感染モデルにおいて、MS線毛保有細菌は無線毛細菌、MR線毛細菌に比し、有意に瘢痕形成が強かった。ラットにあらかじめサイクロフォスファミドを投与し、白血球減少状態にした場合、MS線毛細菌感染後の瘢痕形成は有意に弱かった。また、MS線毛細菌の感染後プレドニゾン (Pred) とウリナスタチン (UST) を投与したが、いずれも強い瘢痕形成抑制作用が認められた。Predは1~2 mg/kg, USTは1,000~4,000 unit/kgの投与量が至適濃度と考えられた。これらの抗炎症剤の投与は腎内生菌数の推移には影響していなかった。また、上行性腎盂腎炎モデルで検討した結果、抗菌剤としてのシプロフロキサシン (CPFX) は感染6時間以内に投与すると腎瘢痕形成を完全に抑制したが、72時間後では瘢痕形成を抑制しなかった。抗菌剤の投与が遅れた場合 Pred を併用すると腎瘢痕形成は有意に抑制された。以上の結果より、腎盂腎炎に引き続く、腎瘢痕形成は細菌側要因としてMS線毛が関与し、宿主側要因として多核白血球が強く関与していた。この瘢痕形成の予防には感染早期の抗菌剤投与がもっとも良いが、投与が遅れた場合は至適用量の抗炎症剤の併用が必要と思われた。

**Key words:** Renal scarring, Pyelonephritis, Pili, Superoxide, Ciprofloxacin, Prednisolone, Ulinastatin

腎の細菌感染は腎盂腎炎と呼ばれ、腎へ至った細菌は腎実質のレセプターと結合し、腎内で増殖し、炎症を惹起する。細菌側には腎内のレセプターと特異的に結合する線毛を有しており、この線毛を介して、附着現象をおこす。細菌線毛としてはマンノース感受性 (MS) とマンノース抵抗性 (MR) の線毛があることが、*Escherichia coli* を始め、種々の細菌について知られている<sup>1)</sup>。また、*Serratia marcescens* は慢性複雑性尿路感染症の起炎菌として分離されることが多く、難治性感染の原因となることがある。この菌種も線毛を有する菌株があり、種類もMSとMRのあることが知られている<sup>2)</sup>。

我々は *S. marcescens* の線毛遺伝子をクローニングし、MSとMRの塩基配列を決定している<sup>3,4)</sup>。このMSおよびMR遺伝子DNAを無線毛大腸菌に移入し、*S. marcescens* のMSおよびMR線毛を持つ遺伝子変異株の作成に成功している。また、我々はこの遺伝子変異株を用い、腎実質内直接感染モデルにより、腎瘢痕形成実験を行い、MS線

毛が腎瘢痕形成に関与していることを報告している<sup>5)</sup>。

さらに、腎盂腎炎の慢性化および瘢痕形成には宿主側因子としては、多核白血球の関与が示唆されており、我々は、宿主側因子の検討を行った結果、多核白血球の産生するスーパーオキシド (SO) が重要であるとの結果を得ている<sup>6-8)</sup>。

今回は直接腎感染および上行性腎感染の両者のモデルを用い、腎盂腎炎の慢性化および腎瘢痕の予防法を抗菌剤および抗炎症剤を用いて検討した。

### I. 材料と方法

細菌: 急性単純性尿路感染症よりえられた *E. coli* HM 32株と複雑性尿路感染症より得られた *S. marcescens* US 46株を用いた。この両菌株はMSおよびMR線毛を持つことを赤血球凝集反応、抗体凝集反応、および電顕所見より確認している<sup>5,9)</sup>。細菌線毛の腎瘢痕への影響を検討するため、*S. marcescens* US 46株よりMSおよびMR線毛遺伝子DNAをクローニング

\* 福岡市東区馬出3-1-1

し、無線毛大腸菌 p 678-54 株へコスミドベクターを介して移入し、MS および MR それぞれの線毛保有株を作成し、感染実験に用いた。MS 線毛保有株は p 678-54 (pYM 7), MR 線毛保有株は p 678-54 (pYM 122) とした。これらは線毛のみ異なり、他の病原因子は同一と考えられる<sup>3)</sup>。

動物: 腎盂腎炎の動物実験は Sprague-Dawley ラット 6 ないし 8 週齢, 体重 200 ないし 250 g のものを使用した。SPF にて, マウス用飼料と滅菌蒸留水にて飼育した。

感染実験: 上記の臨床分離株および遺伝子変異株を用いて腎実質内直接感染および上行性腎感染実験を行った。腎内直接感染モデルでは麻酔下に腹壁を切開し, 左腎を露出し, 菌液 0.1 ml ( $9 \times 10^7$  colony forming unit (CFU)) を 26G 針を用いて, 左腎実質内へ接種した。上行性腎感染はラットをエーテル麻酔下に開腹し, 膀胱を露出し, 26 G 針を用いて, 膀胱尿を除去し, 菌液 0.1 ml ( $9 \times 10^7$  colony forming unit (CFU)) を注入した。その後, 尿道を 4 時間クランプした。いずれのモデルにおいても, 6 週間後にラットを屠殺し, 腎を摘出し, 肉眼的, 組織学的に腎瘢痕の有無と程度を観察した。腎実質内直接感染モデルでは, 腎瘢痕の程度を (-): 瘢痕なし, (+): 線状瘢痕, (>): 小瘢痕, (>): 大瘢痕とし, それぞれ 0, 1, 2, 3 点とし, スコア化した (Fig. 1, 2)。このスコアの合計点数で瘢痕の程度を表わした。ラットは 1 群 8 匹用いた。また, 上行性腎感染モデルでは, 左右両腎の瘢痕形成の有無を観察し, 左右いずれかに瘢痕を認めた頻度を % 表示した (Fig. 3)。瘢痕の判定は盲目的に実験内容を知らない一人の判定者により行った。また, 腎内生菌数の測定を感染後 3 週間にわたって行った。腎を無菌的に摘出し, テフロンホモゲナイザーにてホモゲナイズし, 生食にて希釈し, 菌数を測定した。この場合, ラットは 1 群 4 匹とした。

使用薬剤: 腎瘢痕形成予防のための薬剤として以下の薬剤を用いた。腎感染後の瘢痕形成における多核白血球の影響を検討する目的で, cyclophosphamide (CP) を投与した。CP を 2 mg/kg の量で, 感染前 2 日に投与した。抗炎症剤としては Prednisolone (pred) および Ulinastatin (UST) を用いた。1 日 1 回 4 日間投与とした。また, 抗菌剤としては ciprofloxacin (CPF) を用いた。15 mg/kg の量で, 1 日 1 回 5 日間投与とした。

統計解析: 腎実質内直接感染モデルでは腎瘢痕の程度を Wilcoxon 順位和検定で行い, 上行性腎感染モデルでは腎瘢痕を有するラットの頻度を Fisher 直接

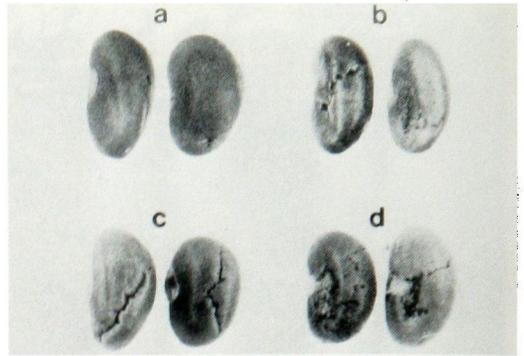


Fig. 1 Grades of scarring by parenchymal direct infection (macroscopic feature); a) -, b) +, c) #, d) #.

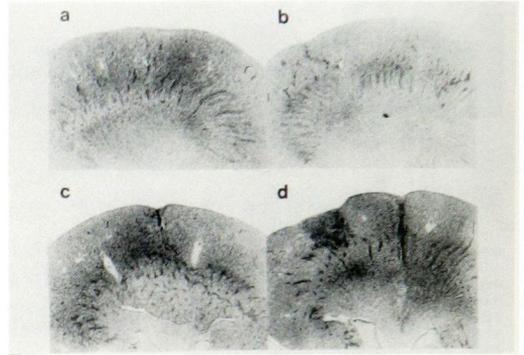


Fig. 2 Grades of scarring by parenchymal infection (microscopic feature); a) -, b) +, c) #, d) # (HE stain,  $\times 25$ ).

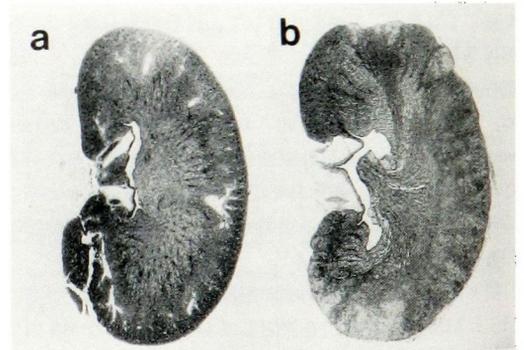


Fig. 3 Grades of scarring by ascending infection; a) -, b) + (HE stain,  $\times 10$ ).

確率計算法で解析した。なお、有意水準は5%とした。

## II. 結 果

### 1) 腎内直接感染モデルによる検討:

i) MS線毛保有菌株による腎瘢痕形成: MSおよびMR両線毛を有する臨床分離 *S. marcescens* US 46株, 無線毛株 (p 678-54), MS線毛保有株 (p 678-54 (pYM 7)), MR線毛保有株 (p 678-54 (pYM 122))を腎実質内に直接接種し, 6週間後の腎を観察した。その結果, US 46では強い瘢痕形成がみられたが, 無線毛株では瘢痕形成はほとんど起こっていなかった。MS線毛保有菌株のp 678-54 (pYM 7)では強い瘢痕形成が見られ, MR線毛保有株のp 678-54 (pYM 122)では逆に瘢痕形成はきわめて弱かった (Fig. 4)。このことは腎瘢痕形成に細菌側要因としてMS線毛が重要であることを示している。

ii) CPの影響: 宿主側要因の検討のため, 腎感染を起こす2日前にCPを2 mg/kgの量で1回投与した。細菌はMS線毛保有細菌であるp 678-54 (pYM 7)を用いた。その結果, CP投与されたラットでは腎瘢痕形成は有意に弱かった (Fig. 5)。この結果は宿主側要因として多核白血球の重要性を示唆しているものと思われた。

iii) 抗炎症剤の影響: p 678-54 (pYM 7)の感染後, 抗炎症剤としてpredおよびUSTを, それぞれ2 mg/kgと2,000 Unit/kgの量で, 5日間投与した。いずれも細菌接種2日後から投与開始し, 5日間投与した。その結果, いずれの薬剤においても腎瘢痕は有意に予防された (Fig. 6)。predとUSTの至適投与量を検討するため, predは1~8 mg/kg, USTは1,000~4,000 Units/kgの量で, 腎瘢痕形成予防効果の検討を行った。その結果, predは1 mg/kgおよび2 mg/kgの投与量では瘢痕形成を有意に予防したが, 4 mg/kgおよび8 mg/kgの量では予防効果を認めず, overdosisと考えられた (Fig. 7)。USTについては1,000, 2,000, 4,000 Units/kgの量で有意に腎瘢痕を予防した (Fig. 8)。次に, このような抗炎症剤が腎内生菌数に影響していないか検討した。細菌接種1日目には $8 \times 10^5$  cfu/kidneyの菌が分離され, 4日目にピークに達し, 以後漸減した。predおよびUST投与ラットにおいても非投与ラットと同様の腎内生菌数の推移を示した。3群ともまったく差を認めず, これらの抗炎症剤は腎内生菌数には影響していなかった (Fig. 9)。

2) 上行性腎感染モデルによる検討: 抗菌剤と抗炎症剤の腎瘢痕形成におよぼす影響を検討した。ラット

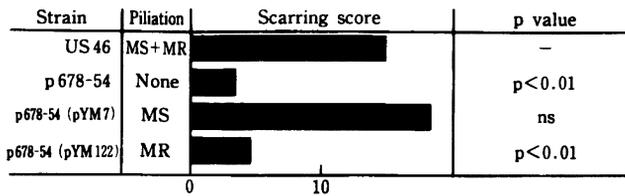
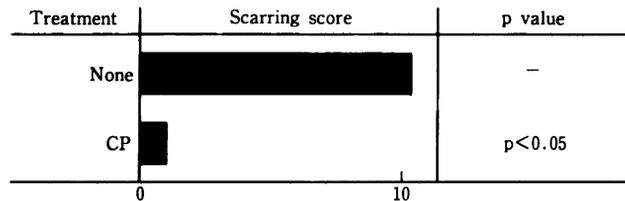


Fig. 4 Scarring of the kidneys inoculated with MS- or MR-piliated strains. Renal scarring was observed macroscopically 6 weeks after bacterial inoculation.



CP: cyclophosphamide

Fig. 5 Effect of cyclophosphamide (CP) on renal scarring. A 2 mg/kg dose of CP was administered i.p. 2 days before bacterial inoculation.

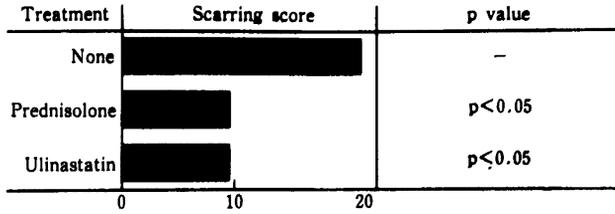


Fig. 6 Suppressive effect of prednisolone and ulinastatin on renal scarring. A 2 mg/kg dose of prednisolone or 2,000 unit/kg of ulinastatin were administered s.c. once daily for 4 days. The first dose was given one day before bacterial inoculation.

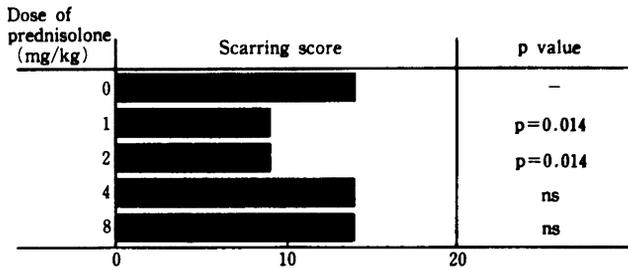


Fig. 7 Dosage of prednisolone used to prevent renal scarring following direct parenchymal infection. Various doses of prednisolone were subcutaneously administered once daily for 4 days. The first dose was given 2 days after bacterial inoculation.

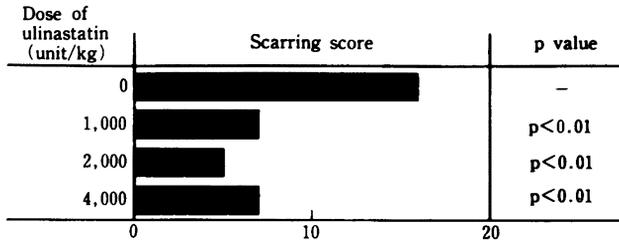


Fig. 8 Dosage of ulinastatin used to prevent renal scarring following direct parenchymal infection. Various doses of ulinastatin were subcutaneously administered once daily for 4 days. The first dose was given 2 days after bacterial inoculation.

に経膀胱的に大腸菌を接種すると、90%のラットに腎癒痕を形成した。しかしながら、抗菌剤を6時間以内に投与開始すると腎癒痕は完全に予防された。菌接種後、72時間に抗菌剤を投与開始しても、55%のラットは6週間後に腎癒痕が見られた。しかしながら、癒

痕形成予防作用のある pred を同時併用しておけば腎癒痕形成は10%に見られるのみで、腎癒痕形成は有意に予防された (Fig. 10)。

III. 考 察

細菌線毛は尿路感染症を始めとして、呼吸器や耳鼻

科領域、口腔外科領域、その他の感染症に深く関与していることが、明らかにされてきた。もっとも研究の進んでいる *E. coli* の線毛にはいくつかの種類のあることが知られている。非閉塞性急性腎盂腎炎に関与するとされている P 線毛は MR 線毛であり、急性腎盂腎炎の分離株に高頻度に存在するとされている<sup>10)</sup>。この P 線毛は特異的なレセプターである糖蛋白と結合することから、Pap または Gal-Gal pili ともよばれている。このレセプターは腎実質内に多量に存在するとされており、このレセプターと結合する P 線毛が

腎盂腎炎を起こしやすい理由の一つと考えられている<sup>11)</sup>。一方、Type 1 線毛はもっとも普遍的に存在する大腸菌線毛であり、MS 線毛である。この線毛はマンノース残基と結合することが知られており、尿路では下部尿路感染の原因となるとされている<sup>10)</sup>。Type 1 線毛遺伝子は普遍的に存在するので多くの P 線毛保有株は同時に Type 1 線毛を持つことが多い。

*S. marcescens* にも MS と MR 線毛の 2 種類が存在することが知られている。我々は *S. marcescens* 線毛の検討を行い、いくつかの結果を得ている。*S. marcescens* の線毛は遺伝子解析の結果、大腸菌線毛ときわめて近い関係にあり、それぞれ大腸菌の P 線毛、Type 1 線毛と共通性が高い<sup>3,4)</sup>。さらに、MS および MR の遺伝子変異株を作成し、他の病原性因子を一定にし、線毛のみの異なる菌株を得ることができた。この菌株を使用して感染実験を行ったところ、MS 線毛保有株では強い癥痕形成を来したが、MR 線毛保有株では癥痕形成の弱いことが判明した。

次に、宿主側因子として、感染防御にもっとも関与すると考えられる多核白血球の意義を検討した。

Cyclophosphamide で白血球減少状態にしたラットでは癥痕形成が有意に弱かった。このことは多核白血球が感染防御的に働く一方で組織障害につながっていることを示している。また、多核白血球の産生する Superoxide (SO) の意義を検討した。その結果、SO の特異的スカベンジャーである SOD を投与した

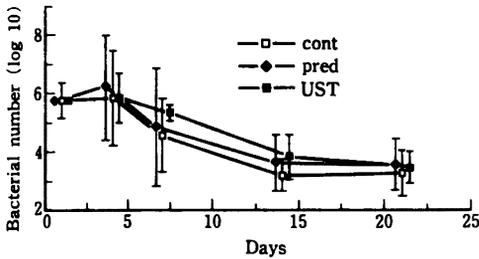


Fig. 9 Numbers of bacteria in the kidneys of rats inoculated with  $1 \times 10^9$  cfu of bacteria on Day 0, and administered with or without 2 mg/kg of prednisolone or 2,000 unit/kg of ulinastatin. Bars represent means  $\pm$  SD of log 10 of bacterial counts. Each group consisted of 4 rats.

Treatment	Percentage of rats with scarred kidney (%)	p value
None	~85	-
CPFX (Early)	~15	p<0.01
CPFX (Late)	~55	ns
CPFX (Late)+Pred.	~10	p<0.05

CPFX: ciprofloxacin

Fig. 10 Effect of antimicrobial agent and prednisolone on percentage of rats with scarred kidney. Early treatment was performed by administering a 15 mg/kg dose of ciprofloxacin (CPFX) i.m. twice a day for 5 days, beginning 6 hours after bacterial inoculation via bladder. Late treatment was performed by administering the same dose of CPFX, beginning 72 hours after bacterial inoculation. Furthermore, combination treatment by CPFX and prednisolone was administered with the same dose of CPFX and 2 mg/kg of prednisolone. Each group consisted of 8 rats.

ラットでは癬痕形成が有意に抑制された<sup>7)</sup>。この点より、感染局所に浸潤してきた多核白血球は細菌の刺激により、感染局所でSOを産生し、殺菌的に働く一方で、組織障害を起こしているものと思われる。さらに、このことを証明するため、MSまたはMR線毛保有株により多核白血球を刺激し、SO産生量を測定した。その結果、MS線毛保有株はMR線毛保有株に比し、有意にSO産生刺激作用が強かった<sup>14)</sup>。

以上の結果より、腎盂腎炎の最終的な過程である腎癬痕形成には細菌側要因として、MS線毛が重要であり、宿主側要因として多核白血球の産生するSOが重要であることが証明された。

さらに、以上のような癬痕形成の予防法として、臨床応用可能な薬剤が期待される。SOは組織障害に深く関与するので、SOのスカベンジャーであるSuperoxide dismutase (SOD)は注目すべき薬剤と考えられるが、いまだ臨床症例に安全に使用できるSODの開発はなされていない。また、SOを初めとする活性酸素の消去剤としてはアスコルビン酸とその誘導体であるCV 3611が知られている。これらを用いた癬痕予防実験では有為な癬痕予防がなされ、CV 3611の方が効果的であることも報告した<sup>12)</sup>。

さらに、Glauserら<sup>13)</sup>、Slotkiら<sup>14)</sup>の報告によると感染後早期に有効な抗菌剤投与を行うと組織障害が予防されるとしている。我々の検討でも、感染6時間以内に抗菌剤を投与すると腎癬痕形成は完全に予防された。しかしながら、投与開始が72時間になると腎癬痕の予防はできなかった。この場合、PrednisoloneやUlinastatinを併用すると、癬痕形成は有意に抑制された。

以上のことは腎盂腎炎での抗菌剤による治療は早期かつ適切な抗菌剤投与を行うべきことが考えられる。しかしながら、一般臨床では患者の受診の遅れや起炎菌の培養同定・感受性検査の結果判明までには時間を要し、不適切な薬剤投与がなされることがある。そのような場合はPrednisoloneを初めとする抗炎症剤の投与を要することが、本研究より明らかとなった。

#### 文 献

- 1) 松本哲朗, 水之江義充: バクテリアル・アドヘレンス 泌尿器科MOOK「尿路・性器感染症」動向と治療の実態。熊澤浄一編, pp 18-28, 金原出版, 東京, 1992
- 2) Matsumoto T et. al.: Hemagglutination by

various species of bacteria isolated from the urine of patients with urinary tract infections. Nishinon J. Urol. 49: 95~97, 1987

- 3) Mizunoe Y et. al.: Cloning and sequence of the gene encoding the major component of mannose-resistant fimbriae of *Serratia marcescens*. J. Bacteriol. 170: 3567~3574, 1988
- 4) Mizunoe Y, Matsumoto T et. al.: Identification and nucleotide sequence of the gene determining the adhesive capacity of *Serratia marcescens*. J. Bacteriol. 173: 3257~3260, 1991
- 5) Matsumoto T et. al.: Increased renal scarring by bacteria with mannose-sensitive pili. Urol. Res. 18: 299~303, 1990
- 6) Matsumoto T, Mizunoe Y, Ogata N et. al.: Role of superoxide in renal scarring following infection by mannose-sensitive piliated bacteria. Urol. Res. 19: 229~233, 1991
- 7) Matsumoto T, Mizunoe Y, Sakamoto N et. al.: Suitability of colchicine and superoxide dismutase for the suppression of renal scarring following an infection with bacteria showing mannose-sensitive pili. Nephron 56: 130~135, 1990
- 8) Matsumoto T, Haraoka M, Mizunoe Y et. al.: Renal scarring is enhanced by phorbol myristate acetate following infection with MS-piliated bacteria. Nephron 64: 405~408, 1993
- 9) Haraoka M, Matsumoto T, et. al.: Suppression of renal scarring by prednisolone combined with ciprofloxacin in ascending pyelonephritis in rats. J. Urol. in press.
- 10) Dominique G J et. al.: Significance of P-fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infection. J. Urol. 133: 983~989, 1985
- 11) 松本哲朗: 腎盂腎炎における大腸菌のレセプター。Annual Review 腎臓, 中外医学社, pp 98~101, 1992
- 12) Matsumoto T, Mizunoe Y, Ogata N et. al.: Antioxidant effect on renal scarring following infection by MS-piliated bacteria. Nephron 60: 210~215, 1992
- 13) Glauser M P, Lyon J M, Braude A I: Prevention of chronic experimental pyelonephritis by suppression of acute suppuration. J. Clin. Inves. 61: 403~407, 1978
- 14) Slotki I N, Asscher A W: Prevention of scarring in experimental pyelonephritis in the rat by early antibiotic therapy. Nephron 30: 262~268, 1982

Experimental studies on prophylaxis of renal scarring following  
bacterial pyelonephritis by administering antimicrobial  
and anti-inflammatory agents

Tetsuro Matsumoto, Masashi Haraoka, Yoshimitsu Mizunoe,  
Koichi Takahashi, Shuta Kubo, Misao Sakumoto,  
Masatoshi Tanaka, Yasuki Sakamoto  
and Joichi Kumazawa

Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyushu University,  
3-1-1, Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan

Using direct parenchymal infection and the ascending infection model of rat, prophylaxis of renal scar formation following bacterial pyelonephritis was investigated. Mannose-sensitive (MS) piliated bacteria strongly stimulated renal scarring, but not afimbriated or mannose-resistant (MR) piliated bacteria. In neutropenic rats injected with cyclophosphamide 2 days before bacterial inoculation, renal scarring was significantly reduced. Treatment with prednisolone and ulinastatin significantly suppressed renal scarring at doses of 1 to 2 mg/kg and 1,000 to 4,000 unit/kg, respectively. At 6 hours after the bacterial inoculation, administration of ciprofloxacin (CPFX) completely suppressed renal scarring, but not at 72 hours. When CPFX was administered at 72 hours after the bacterial inoculation, combined treatment with prednisolone significantly suppressed renal scarring. These results suggested that MS-piliated bacteria promoted renal scar formation by the stimulation of the inflammatory process and that the early initiation of treatment by antimicrobial agents was important to prevent scarring. When the initiation of antimicrobials was delayed, combined treatment with optimal doses of anti-inflammatory agents was effective in preventing renal scar formation.