変形菌による実験的ラット逆行性腎盂腎炎に関する研究

第1報 同一腎より病理組織標本と腎内全菌数の両者を得る試み

岡山大学医学部泌尿器科教室 高 本 均
(主任: 大森弘之教授)

STUDIES ON RETROGRADE PROTEUS MIRABILIS PYELONEPHRITIS IN THE RAT.

I. An Experiment to Obtain Both Pathologic Sections and Total Number of Bacteria from one Kidney Simultaneously.

Hitoshi Takamoto

Department of Urology, Okayama University Medical School, Okayama

(Director: Prof. H. Ohmori)

It has been difficult to obtain simultaneously the preparation of pathologic section and the total number of bacteria from the infected kidney. The present study was performed to solve this problem in retrograde *Proteus mirabilis* pyelonephritis in rats. Infected kidneys were removed aseptically five days after inoculation of the bacteria, and immediately frozen at -70°C , then some thin sections were obtained from the bisected kidneys using a cryostat. All of the remaining tissues including the chips of the frozen section were used for counting the total number of bacteria in the kidneys. The decrease in number of bacteria in the kidneys was negligible after preservation at -20°C for 48 hours. The degree of renal lesions were graded pathologically according to the classification of Arana et al. modified by Araki et al. The total number of bacteria in the infected kidney had a good correlation with the pathological grading ($p < 0.001$).

The results indicate that this method is excellent for both obtaining samples for pathologic sections and counting the total number of bacteria from one kidney, and that the pathological grading of infected kidneys is very useful in showing the degree of infection in the experimental retrograde pyelonephritis in rats, with this, in the acute stage without treatment, wanting the total number of bacteria in the kidney is thought to be omitted.

要旨: 実験的腎盂腎炎において, 同一腎より病理組織標本と菌数の両者を得る従来の方法にはどちらかを多少犠牲にするという不満足な点があつた. そこで実験的ラット逆行性腎盂腎炎において, この点を克服することを試みた. 菌接種後5日目に無菌的に腎を摘出し, -70°C で急速凍結し, クリオスタットを利用して腎病理組織標本作製した. 残腎組織は切片も全て含めて -20°C で48時間凍結保存後, 菌数測定に使用し, ほぼ腎内全菌数を求めた. -20°C , 48時間凍結保存による腎内菌数の減少は無視し得た. 腎病理組織学的所見は Aranaらの分類を修正した荒木らの分類に従つて Grade 分けを行なつた. 腎内全菌数と腎病変の Grade はよく並行し, 各 Grade の平均菌数間には有意差を認めた.

上記結果より本法は, 同一腎より病理組織標本と腎内全菌数の両者を得るのに良い方法であると考えられる. また, 同分類法は実験的ラット逆行性腎盂腎炎の重症度判定に有用であり, 少なくとも急性期で抗菌剤投与等の処置を施していない場合は, 腎内菌数も省略し得ると考えられる.

緒 言

実験的感染症における宿主の防御能や感染の重症度, 治療効果を判定する場合, 炎症巣の肉眼的, 病理組織学

的検討と共に, 菌数がまず問題となる. 実験的逆行性腎盂腎炎においても同様であり, 腎病変所見と腎内菌数の両者を検索する方法が種々行なわれている. その方法に

は大別して2通りあり、1つは、腎病変の病理組織学的所見を得るため、腎を切半して一方を組織標本に、他方を菌数の測定に使用する方法である¹⁾²⁾。他の1つは、腎病変は肉眼的所見にとどめ、腎全体を菌数の測定に使用する方法である³⁾⁴⁾。しかし、前者は逆行性腎盂腎炎の病変が必ずしも腎全域に一樣には生じないという点で、半切した腎の一方のみの菌数をもつて、一腎全体の菌数あるいは腎組織 1g 当りの菌数を算定するのは正確でない。一方、後者は腎内菌数には問題ないが、腎病変の病理組織学的所見が得られないという欠点がある。また、従来菌数の測定は腎摘出後直ちに行なわれていたため時間的な制約があり、小人数で実験を行なう場合には、必要とする他の実験に時間がさけないうらみがあつた。そこで、著者は、実験的ラット逆行性腎盂腎炎で、腎のほぼ全量を菌数測定に使用すると共に、その極一部を組織標本に使用できないかと考え、組織標本はクリオスタットを使用して凍結切片より作製し、残存組織は切片も全て含めて後日の菌数測定に使用することを試みた。

実験材料および方法

(1) ラットおよび起炎菌

日本ラット K.K. (浦和市) から購入した雌ドンリューラット (生後5週, 体重 100~120g) を用いた。起炎菌は臨床分離の *Proteus mirabilis* (当教室番号 228L 株, 以下 Pm と略す) を用いた。

(2) 逆行性腎盂腎炎の作成および屠殺

荒木⁵⁾の方法に従い、経膀胱的に Pm $2 \sim 4 \times 10^2$ 個を接種した。全例 Pm 接種後5日目にエーテル麻酔下に開腹し、腹部大動脈より脱血後、腎、膀胱を無菌的に摘出した。腎は長軸に沿って切半し、膀胱は半切してデゾキシコレート培地 (ニッスイ) に塗布し、Pm の検出、同定を行なつた。腎は肉眼的観察と重量計測を行なつた。

(3) 腎組織標本の作製

腎は切半面を下にして、真鍮製金属ブロック (24×18×6mm) に接着させた。切半腎で肉眼的病変の程度に差のある場合は、高度病変側を使用した。金属ブロックに接着させた腎は、採取したい組織部位まで表面の組織をハサミで水平に切除した。以上の操作はすべて無菌的にアルミシャーレ (内径 60mm, 深さ 14mm) 内で行なつた。金属ブロックに真鍮を用いた主な理由は、真鍮は熱伝導率が良く、さびにくいことである。腎組織は金属ブロックと共にアルミシャーレごと -70°C のディーブフリーザーに入れて急速凍結させた後、 -20°C のクリオス

タットに移した。腎組織を接着させた金属ブロックを無菌的に取り出し、ユング型マイクロームにて、原則として腎乳頭部を含む凍結切片 (厚さ 10 μ) を2枚作製した。メスは各腎ごとに70%アルコールで消毒後、滅菌ガーゼでぬぐつて使用した。切片作製時に出来る切片、および金属ブロックに残存した組織は全て無菌的にアルミシャーレに回収した。凍結切片は95%アルコールで固定、水洗し、H.E. 染色を行なつた。残腎組織を回収したアルミシャーレは -20°C の冷凍庫に保存した。

(4) 腎内全菌数測定

腎組織は凍結48時間後に室温で解凍後、直ちに、腎重量の4倍量の生食水を加え、容量 10ml のテフロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした。つまり原液は腎組織を5倍に希釈したことになる。原液から 10^{-6} までの10倍希釈液を作り、各々をデゾキシコレート培地に 1ml ずつ希釈し、各2枚のプレートを作製した。プレートは 37°C で24時間培養後、発育したコロニー数より腎単位の菌数を算定した。ある程度実験が進んだ後は、原則として肉眼的に腎膿瘍を有する場合は 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 希釈液、腎盂内に膿を有する場合は 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、腎盂内に変化を認めないが腎割面より Pm を検出した場合は 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、腎割面より Pm を検出しなかつた場合には原液について、各々2枚のプレートを作製して菌数計算を行なつた。

結 果

(1) 菌数測定に与える凍結保存の影響

a) TSB (Trypticase soy broth-BBL) 中の菌数: Pm を TSB で 37°C 、18時間培養後菌数を測定した。同一液を -20°C で2週間および1ヵ月間凍結保存後、再度菌数を測定した。TSB 中の菌数は、2週間の凍結保存では変化を認めず、1ヵ月では約半数に低下した (Table 1)。

b) 腎内全菌数: Pm 接種後5日目のラットで腎膿瘍を有する6腎のうち、2腎 (No. 1, 2) は摘出後直ちにホモジナイズし菌数を測定した。同ホモジナイズ液の一部を -20°C で48時間凍結保存後、再度菌数を測定した。

Table 1 Variance of number of bacteria in TSB after the preservation at -20°C

Preservation period	No. of organisms (per ml)
Before preservation	4.6×10^8
2 weeks	5.6×10^8
1 month	2.0×10^8

Table 2 Total number of bacteria in the kidneys with abscesses

No. of case	No. of organisms per kidney	
1	5.3×10^7 a	4.1×10^6 b
2	9.7×10^7 a	1.7×10^6 b
3	1.1×10^7 c	4.3×10^4 d
4	1.5×10^7 c	4.2×10^4 d
5	2.2×10^7 c	6.4×10^4 d
6	3.4×10^6 c	2.2×10^4 d

a : homogenized immediately after nephrectomy
b : after the preservation of homogenized kidney at -20°C for 48 hours
c : homogenized after the preservation of bisected kidney at -20°C for 48 hours
d : after the reprereservation of homogenized kidney at -20°C for 4 days

この場合は、菌数は 10^4 代の低下を認めた。また他の4腎(No. 3~6)は -20°C で48時間凍結保存後ホモジナイズし菌数を測定した。さらに同ホモジナイズ液の一部を再度 -20°C で4日間凍結保存後菌数を測定した。この場合は、菌数は $10^2 \sim 10^3$ 代の低下を認めた。しかし、摘出腎を直ちにホモジナイズした場合と、 -20°C 、48時間凍結保存後ホモジナイズした場合とを比べると、腎内全菌数は後者でやや低値を示したが、No. 6を除いて全て 10^7 代であつた。さらに No. 6 が小膿瘍を1個だけ有していたのに比し、他の5腎は多数の膿瘍を有していたことを考慮すると、 -20°C 、48時間凍結保存による腎内全菌数の変化は少ないと考えられた (Table 2)。

(2) 腎病変 Grade と腎内全菌数について

ラット33匹、66腎について腎凍結組織標本作製と腎内

Fig. 1 Low-photomicrograph of frozen sections of rat kidney

Grade 0: No inflammatory changes.
 Log_{10} No. of organisms per kidney: none

Grade I: The mild and early inflammatory changes were in the papilla and fornix.
 Log_{10} No. of organisms per kidney: 2.00

Grade II: The inflammatory changes extended into the corticomedullary area, especially at the fornix.
 Log_{10} No. of organisms per kidney: 6.61

Grade III: The inflammatory changes extended into the cortical surface with abscess formation.
 Log_{10} No. of organisms per kidney: 7.99

全菌数の測定を行なった。屠殺時 Pm は膀胱からは全例、腎では66腎中51腎から検出された。Pm が検出されなかつた15腎中2腎のみ菌数測定時 Pm が検出されたが、それらの菌数は $1.2 \sim 4.6 \times 10^1$ であつた。腎の病理組織学的所見は Arana ら⁹⁾の分類を多少修正した荒木ら⁵⁾の分類に従つて判定した。即ち、Grade 0: 炎症なし、Grade I: 炎症が腎盂内にとどまるもの、Grade II: 炎症が髓質内または軽度に皮質に浸潤するが皮質表面まで達していないもの、Grade III: 肉眼的、組織学的に皮質腫瘍を形成したもの、である。凍結組織標本はホルマリン固定標本に比べ明瞭さでやや劣るが、主として白血球浸潤の有無による炎症の判定には十分使用し得た。Fig. 1 に各 Grade の凍結組織標本を示した。上記の分類に従つて腎病変 Grade 別に66腎の腎内全菌数を常用対数で図示した。即ち、各 Grade における腎内全菌数の平均値±標準偏差は、Grade 0: 0.33 ± 0.75 , I: 3.01 ± 1.02 , II: 5.78 ± 0.85 , III: 7.25 ± 0.72 , であつた。Grade の進展と菌数の増加はよく並行し、各 Grade の平均菌数間には全て有意差 ($p < 0.001$) を認めた (Fig. 2)。

Fig. 2 Correlation between the pathological grades and the total number of bacteria in the kidneys

考 按

実験的逆行性腎盂腎炎において、同一腎より病理組織標本と菌数の両者を得る従来の方法には、冒頭に述べた如く、どちらかを多少犠牲にするという不満足な点があつた。そこで実験的ラット逆行性腎盂腎炎において、この点を克服することを試みた。摘出腎を -70°C で急速凍結し、クリオスタットを利用して腎組織の極一部を組織標本として使用し、残腎組織は切片も全て含めて -20°C で48時間凍結保存後菌数測定に使用することによりほぼ腎内全菌数を求めた。菌数測定に及ぼす -20°C 凍結保存の影響は、TSB 中の菌数では2週間不変であり、また腎内全菌数でも48時間ではほぼ無視し得た。腎凍結組織標本はホルマリン固定による組織標本に比べ、明瞭さでやや劣るが、主として白血球浸潤の有無による炎症の判定には十分使用し得た。以上より、本法は同一腎より病理組織標本と腎内全菌数の両者が得られ、しかも菌数測定を後日に行なうため、腎摘出当日を他の目的の実験にも使用し得る良い方法と考えられる。

また、腎内菌数と腎病理組織標本とは、いずれも実験的腎盂腎炎の検索に必要なものであるが、菌数測定は後者に比し、一般に時間と手間を要する。一方、組織は連続切片でもとらぬ限り腎内の病変をすべて明らかにすることはできない。しかし、現実には多数の実験動物すべてにこれらの操作を行なうわけにはいかない。できるだけ簡単で病変の程度を的確に反映する判定法が望まれるわけである。教室の荒木ら⁵⁾は Arana らの分類を多少修正した簡単な分類をもつて、腎盂腎炎の重症度を判定して来たが、今回の実験の結果、この分類法が腎内菌数とよく並行することが判明した。従つて、実験的ラット逆行性腎盂腎炎の重症度判定で、少なくとも急性期で、抗菌剤投与等の処置を施していない場合には、腎内菌数を省略し、同分類法を用いても良いと考えられる。

結 語

(1) 本法は、実験的ラット逆行性腎盂腎炎において、同一腎より病理組織標本と腎内全菌数の両者を得るために良い方法である。

(2) 実験的ラット逆行性腎盂腎炎の重症度判定において、荒木らの分類は腎内全菌数と良く並行し、少なくとも急性期で、抗菌剤投与等の処置を施していない場合は、腎内菌数も省略し得る有用な分類法である。

文 献

- 1) Cortran, R.S., Vivaldi, E., Zangwill, D.P. and Kass, E.H.: Retrograde proteus

- pyelonephritis in rats: Bacteriologic, pathologic and fluorescent-antibody studies. *Am. J. Path.*, **43**, 1—30, 1963.
- 2) Miller, T.E., Burnham, S. and North, J.D.K.: Immunological enhancement in the pathogenesis of pyelonephritis. *Clin. Exp. Immunol.*, **24**, 336—345, 1976.
- 3) Hunter, B.W., Akins, L.L. and Sanford, J.P.: The role of immunity in the pathogenesis of experimental retrograde pyelonephritis. *J. Exp. Med.*, **119**, 869—879, 1964.
- 4) Brooks, S.J.D., Lyons, J.M. and Braude, A.I.: Immunization against retrograde pyelonephritis. *Am. J. Path.*, **74**, 345—364, 1974.
- 5) 荒木 徹: 腎盂腎炎の細胞性免疫に関する研究 ; 変形菌による実験的ラット逆行性腎盂腎炎における adoptive immunity. *日泌尿会誌*, **69**, 771—779, 1977.
- 6) Arana, J.A., Kozij, V.M. and Jackson, G.G.: Retrograde *E. coli* urinary tract infection in rats. *Arch. Path.*, **78**, 558—567, 1964.
- (1980年11月18日受付)
-