

Candida膀胱炎の実験モデル： とくにCandidaの付着について

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9380

Candida膀胱炎の実験モデル

—とくにCandidaの付着について—

金沢大学医学部医学科泌尿器科学講座 (主任: 並木幹夫教授)

押野谷 幸之輔

ラットの *Candida* 膀胱炎の実験モデルを確立し, *Candida* の付着に関する因子を検討した. 膀胱炎は *Candida albicans* KD14株を 2×10^6 コロニー形成単位 (colony forming unit, cfu) 含む菌液0.2mlを無処置のラット (C群), 両側尿管および尿道を結紮したラット (L群) および膀胱内への塩酸注入を追加したラット (LH群) に接種することにより作成した. 光学顕微鏡では, C群とL群では, 軽度の炎症と少数の酵母型菌の付着は観察されたが, 自然治癒傾向が認められ, 明らかな *Candida* 膀胱炎は成立しなかった. 一方, LH群では, 菌糸型菌の侵入や *Candida* 球体の形成など, 臨床的に認められる *Candida* 膀胱炎と類似の所見が認められ, 組織内への侵入には菌糸型菌が重要な役割を果たしていることが推察された. 走査型電子顕微鏡 (電顕) による観察では, LH群では他の2群に比し, 有意に多くの菌が膀胱壁に付着しており ($p < 0.05$), 特に上皮脱落部では高密度であった. 透過型電顕では, 付着菌の細胞壁最外層に小突起の形成が認められたが, 3群間で小突起の形態に差は認められなかった. ルテニウムレッド染色と走査型電顕により, 正常膀胱表面に認められたムチン層と考えられる顆粒状の物質は, 塩酸処置膀胱上皮表面では消失していたことより, ムチン層の消失が, *Candida* の上皮細胞への直接的付着を増加させるものと考えられた. フィブロネクチンの免疫染色の結果, LH群では染色強陽性の上皮脱落部位に菌が付着していたことより, フィブロネクチンが菌の付着に関与しているものと推察された. フィブリノーゲンの免疫染色にて, LH群で, 上皮脱落部に付着している菌の周囲が染色陽性であったことより, フィブリンも菌の付着に関与しているものと推察された. 以上より *Candida* 膀胱炎における菌の付着には, 菌の小突起のほかに, ムチン層の消失や, フィブロネクチンやフィブリノーゲンの動員を促す上皮の脱落が重要と考えられた.

Key words *Candida* cystitis, adherence, fibronectin, fibrinogen, mucin layer

近年抗菌剤の広汎化により, 尿よりの *Candida* 属の分離頻度は劇的に増加している¹⁾²⁾. さらに重症患者の生存期間の延長, 侵襲性の高い手術療法の発達, 免疫抑制剤や抗腫瘍剤の使用などによる易感染宿主の増加も加わり, 全身および尿路 *Candida* 症が増加している³⁾⁴⁾. ところで細菌性膀胱炎については, その発症に菌の膀胱上皮への付着が重要であることが数多く報告されているが⁵⁾⁶⁾, *Candida* 膀胱炎については, あまり知られていない. *Candida* 細胞の付着能を中心とした菌側の因子を, 膀胱上皮剥離細胞を用いた試験管内での検討の報告があるのみである⁷⁾⁸⁾. 膀胱には, 当然のことながら, 尿による洗浄作用を含め膀胱自体が有する微生物に対するいくつかの生体防御機構が存在している. *Candida* 膀胱炎の発症においても菌側の因子に加えて, 宿主側の因子も関与していると考えられるが, ほとんど解明されていない. そのためそれらを検討するためにも *Candida* 膀胱炎モデルの確立は重要である. そこで, 先ず, 尿流停止と膀胱上皮傷害を有するラットを用いて *Candida albicans* 膀胱炎モデルの作成を試みた. 次にそのモデルを用いて, 菌側の因子として *Candida* 細胞の付着因子と考えられてい

る細胞壁の小突起¹²⁾¹³⁾ および細菌性膀胱炎の発症において菌の付着を阻害する物質と考えられている上皮表面のムチン層¹⁴⁾ について電子顕微鏡 (電顕) にて検討した. また細菌の付着に関与するとされているフィブロネクチン¹⁵⁾¹⁶⁾ とフィブリン¹⁷⁾ の役割についても免疫染色を用いて検討した.

対象および方法

I. 使用菌株および菌液調整法

菌株には *Candida albicans* KD 14株²⁰⁾ (九州大学歯学部口腔細菌学講座中山宏明教授より譲渡) を用いた. この菌株は血清型 Aである. 菌液は YEPG プロス²¹⁾ (2%ポリペプトン (和光純薬工業, 大阪), 1%酵母エキス (Difco Laboratories, Detroit, USA), 2%ブドウ糖 (和光純薬工業)) にて16時間振盪培養した後, 0.01M リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) (pH7.4) で2回洗浄し, 比濁法にて 1×10^7 コロニー形成単位 (colony forming unit, cfu)/mlとなるように調整した. なおこの培養条件下においては接種時はほとんどすべての *Candida* 細胞は酵母型であった.

平成10年11月18日受付, 平成10年12月1日受理

Abbreviations : cfu, colony forming unit; LSAB, labelled streptavidin biotin; PBS, phosphate-buffered saline; 光顕, 光学顕微鏡; 電顕, 電子顕微鏡

II. 動物

ウイスター系雌性ラット (三共ラボラトリー, 富山) (体重 200-250g) を使用した。ラットに以下のごとき前処置を施した。まず開腹し両側尿管および尿道を結紮した。さらに27ゲージ注射針にて0.1N 塩酸 0.2 mlを注入し, 2分後に塩酸を吸引し, 0.4mlのPBSにて4回洗浄した。前処置を施さないものを対照とした。

III. *Candida* 膀胱炎

27ゲージ注射針を用いて, *Candida albicans* KD 14株を 2×10^6 cfu 含む浮遊菌液 0.2mlを前処置を施していないラット (C群), 両側尿管および尿道を結紮したラット (L群), 塩酸処置を加えたラット (LH群) へ経膀胱的に接種した。

IV. 病理組織学的所見

菌接種 1, 6, 24, 48時間後に膀胱を摘出した。摘出した膀胱はPBSにて洗浄し, 縦に半切した。一片はHE染色, 過ヨウ素酸・シッフ染色による光学顕微鏡 (光顕), 他片は走査型電顕, 透過型電顕にて観察した。

V. 電顕用試料の作成

電顕用の試料は2.5%グルタルアルデヒド液-0.1M カコジール酸緩衝液 (pH7.4) にて1時間前固定し, 次いで2%オスミウムにて1時間後固定を行い, エタノール系列にて脱水した。

走査電顕用の試料は酢酸イソアミル内に30分浸漬後, 臨界点乾燥器 (HCP型, 日立, 東京) にて臨界点乾燥し, 白金パラジウムの蒸着を施した後, S-900型 (日立) ないしJSM-5400型 (日本電子, 東京) にて観察した。透過型電顕用の試料はエボン812に包埋後, ミクロトーム (LKB2188, LKB, Bromma, Sweden) を用いて超薄切片を作成し, 酢酸ウラニールおよび鉛の二重染色を施した後, H-600型 (日立) にて観察した。

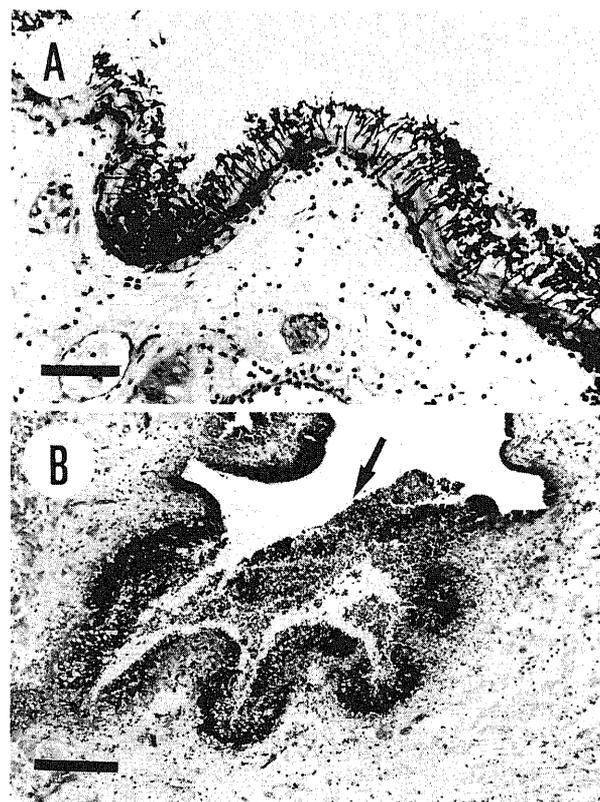


Fig.1. Light micrographs of the rat bladders. (A) The bladder of Group LH 6 hr after inoculation. Numerous mycelia are invading submucosal tissue. PAS, x 100. (B) The bladder of Group LH 24 hr after inoculation. Formation of *Candida* bezoar (arrow) in the lumen is demonstrated. PAS, x 40. Scale bar indicates 100 μ m (A), and 250 μ m (B).

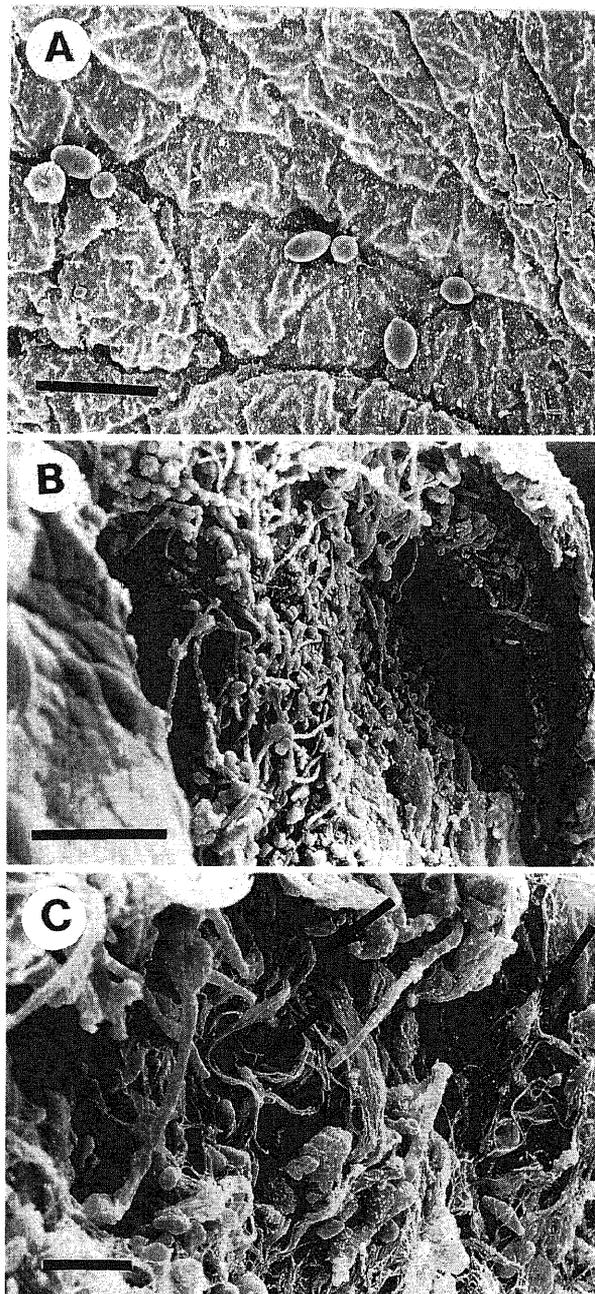


Fig.2. Scanning electron micrographs of rat bladders 24 hr after candidal inoculation. (A) Sporadic yeast adherence to normal-looking epithelium is observed in Group C. x 2000. (B) Adherence of copious *Candida* cells, both yeast and mycelial forms, to the exfoliated area of the epithelium is demonstrated in Group LH. x 500. (C) Fibrillar materials are observed in epithelial exfoliated area in Group LH. Some of them (arrows) are clinging to adherent *Candida* cells. x 1500. Scale bar indicates 10 μ m (A,C), and 50 μ m (B).

VI. 付着菌数の算出

走査型電顕を用いて、各群5匹の菌接種24時間後の付着菌を形態別に2000倍の任意の10視野で数えた。

VII. ムチン層の観察

膀胱粘膜表面のムチン層を観察する目的で正常膀胱、塩酸処置を施した膀胱および菌接種24時間後の3群の膀胱にルテニウムレッド染色を施し、走査型電顕にて観察した。試料はルテニウムレッド1,500 ppmを含む1.25% グルタルアルデヒド液-0.1M カコゾール酸緩衝液 (pH7.4) 4℃にて1時間前固定し、ルテニウムレッドを同濃度含む2% オスミウムにて3時間後固定した。この後の過程は上述の走査型電顕用試料の作成と同様に行った。

VIII. フィブリノーゲン、フィブロネクチンの免疫組織染色

正常膀胱、塩酸処置膀胱および菌接種3群の24時間後の膀胱を染色し検討した。フィブロネクチン、フィブリノーゲンの染色は、いずれも DAKO LSAB キット (DAKO, Carpinteria, USA) を用いて標識ストレプトアビジンビオチン (labelled streptavidin biotin, LSAB) 法で行った。フィブロネクチンの染色には1次抗体としてウサギ抗ラットフィブロネクチン抗血清 (Chemicon, Temecula, USA) を用い、2次抗体としてヤギビオチン標識抗ウサギ抗体 (DAKO) を使用した。フィブリノーゲンの染色には、1次抗体としてヤギ抗ラットフィブリノーゲン抗血清 (Cappel, Durham, USA)、2次抗体にはウサギビオチン標識抗ヤギ抗体 (DAKO) を使用した。

IX. 統計学的検討

統計学的処理には Kruskal-Wallis 検定を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

成 績

I. 光顕所見

塩酸処置後1および6時間後の膀胱には、1層から全層の上皮細胞の脱落、粘膜下層の浮腫および出血が広範囲に観察されたが、24および48時間後には脱落上皮の再生が観察され、粘膜下層の浮腫は減少傾向にあり、出血はほとんど消失していた。C群およびL群においては菌接種1時間後より部分的に上皮と粘膜下層の浮腫、若干の出血および多核白血球の浸潤が認められたが、炎症所見は軽度で菌接種24時間以降では自然治癒傾向が認められた。一方、LH群においては、菌接種1時間後では上皮の広範な脱落および粘膜下層の著明な浮腫、6時間後では出血および多核白血球の浸潤の炎症所見が観察され、以後これら炎症所見は経時的に高度となっていった。*Candida* 菌体は、

C, L群ではすべての観察時間で少数の酵母型菌が膀胱上皮に付着していただけであった。一方、LH群では菌接種1時間後では多数の酵母型菌の付着が観察され、6時間後には一部の菌は菌糸型に形態変換しており、この菌糸型菌が粘膜固有層へ侵入しているのが観察された (図1A)。菌接種24および48時間後には菌糸型菌に変換した菌体に、多核白血球、脱落した上皮細胞および組織内より析出した血漿成分と思われる物質が加わった *Candida* 球体が膀胱腔内に形成されているのが観察された (図1B)。

II. 走査型電顕所見

正常ラット膀胱上皮表面には、多角形の上皮細胞が整列していたが、塩酸処置膀胱では表層の上皮細胞が脱落し、下層の上皮細胞や基底膜が部分的に露出していた。C群、L群においては、菌接種後すべての時間帯において膀胱上皮は正常膀胱と大差はなく、少数の酵母型菌のみが散在性に付着していた (図2A)。一方、LH群では、*Candida* 細胞はすべての時間帯で、上

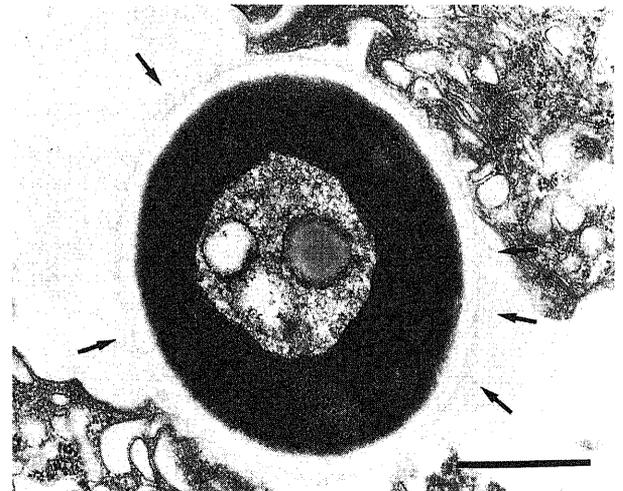


Fig. 3. Transmission electron micrograph of a yeast adhering to the epithelium in Group L 24 hr after inoculation. Microfibrils (arrows) are attached to the epithelial surface, protruding from the outermost layer of the cell wall. $\times 20000$. Scale bar indicates $1 \mu\text{m}$.

Table 1. Number of candidal cells adhering to rat vesical luminal surface 24 hr after inoculation

Group	Number of rats treated	Adhering candidal cells ^{a)}			
		Number		Form (%)	
		Mean	Range	Yeast	Mycelium
C	5	11.8	3-31	100	0
L	5	17.0	3-28	100	0
LH	5	196.4 ^{b)}	20-322	82	18

Groups (C, L, LH) are described in the text.

a) Ten visual fields reduced from $\times 2000$ were randomly selected.

b) $p < 0.05$ compared with group C and group L.

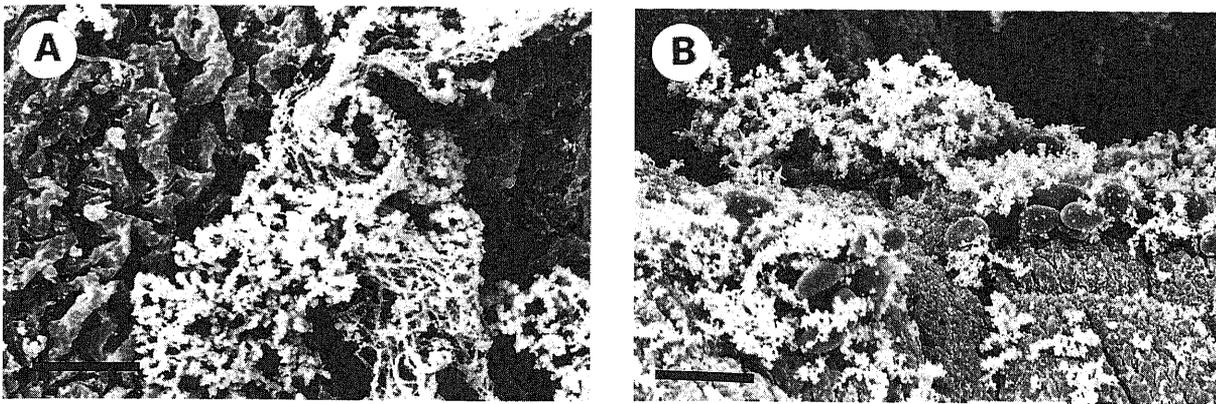


Fig. 4. Scanning electron micrographs of rat bladders stained with ruthenium red. (A) The amorphous materials, which consist of granular and fibrillar components, are observed on the normal bladder epithelium. $\times 10000$. (B) Yeasts covered with the amorphous material on the epithelial surface are demonstrated in Group L. $\times 2000$. Scale bar indicates $2 \mu\text{m}$ (A), and $10 \mu\text{m}$ (B).

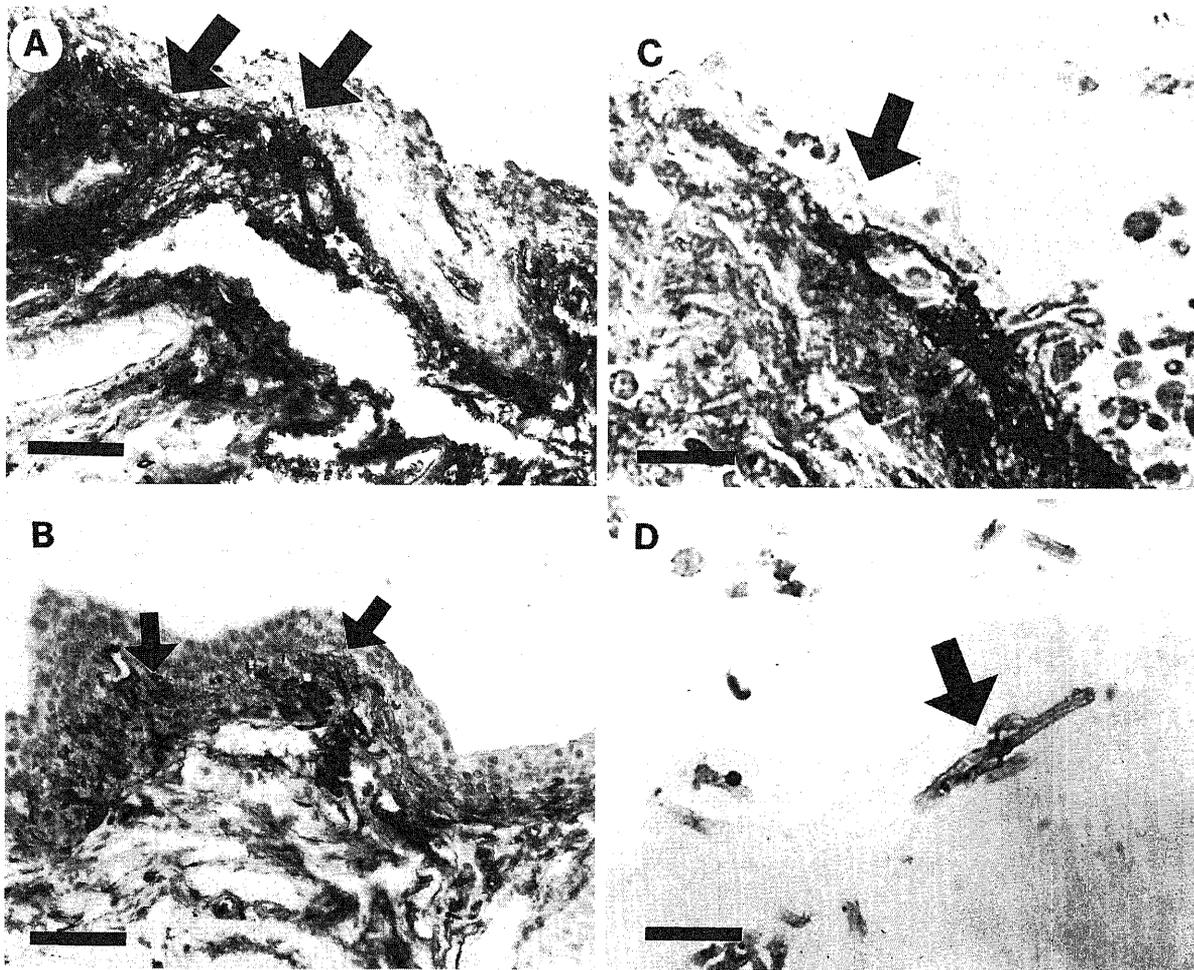


Fig. 5. Immunohistochemical staining in rat bladder for fibronectin. (A) Submucosa (arrows) in exfoliated area of the epithelium is strongly stained 24 hr after HCl treatment. $\times 200$. (B) Lamina propria mucosae and basement membrane (arrows) are weakly stained in Group C and Group L 24 hr after inoculation. $\times 200$. (C) *Candidal* adherence (arrow) to the strongly stained exfoliated area of the epithelium is demonstrated in Group LH 24 hr after inoculation. $\times 400$. (D) Some *Candida* cells (arrow) in the bladder lumen are positively stained in Group LH 24 hr after inoculation. $\times 400$. Scale bar indicates $50 \mu\text{m}$ (A,B), and $25 \mu\text{m}$ (C,D).

皮の非剥離部においても、C群やL群に比べて多く付着しており、上皮の脱落部では大きな集塊を形成し、非常に高密度に付着していた(図2B)。この群では菌接種6時間以降に酵母型から変換した菌糸型菌が出現し、その一部は膀胱壁内へ侵入していた。また上皮の脱落部にはフィブリンと考えられる細線維状の物質が、付着している菌体に絡まるように存在していた(図2C矢印)。

III. 付着菌数

C, LおよびLH群における10視野あたりの付着菌数の平均値は、それぞれ11.8, 17.0, 196.4で、LH群の付着菌数が、他群に比し有意に多かった($p < 0.05$, Kruskal-Wallisの検定)(表)。付着菌の形態については、菌糸型菌はLH群でのみ認められ、その割合は18%であった。

IV. 透過型電顕所見

C, LおよびLH群においては、膀胱壁に付着している *Candida* 細胞の細胞壁は少なくとも電子密度の高い外層と電子密度の低い内層からなっており、さらに最外層に電子密度の高い小突起が形成されていた。そしてこの小突起が上皮細胞に付着していた(図3)。小突起の形態は各群間で明らかな違いは認められなかった。

V. ムチン層の観察

正常ラットの膀胱を走査型電顕にて観察すると上皮表面には顆粒状物質が上皮表面を覆うように存在しており、さらに強拡大での観察では細線維状の物質とそれに一部絡む細顆粒状の物

質から構成されていた(図4A)。一方、塩酸処置を施したラット膀胱上皮表面にはこれらの物質はほとんど認められなかった。この顆粒状の物質はC群およびL群の膀胱では、上皮表面のみならず酵母型菌の周囲にも、菌体を包むように存在していたが(図4B)、LH群では認められなかった。

VI. フィブロネクチン、フィブリノーゲンの観察

1. フィブロネクチン

正常ラット膀胱では、明らかなフィブロネクチンの染色陽性部位は認められなかった。塩酸処置膀胱では上皮脱落部においてフィブロネクチンが強陽性に染色された(図5A)。C群、L群では、粘膜下組織が弱陽性に染色された(図5B)。LH群では染色強陽性の上皮の剥離部に多数の菌が付着しているのが観察された(図5C)。さらに一部の膀胱腔内の菌周囲にも染色陽性部が認められた(図5D)。

2. フィブリノーゲン

免疫染色の結果、フィブリノーゲンは、正常ラット膀胱、塩酸処置膀胱および菌接種したC群、L群の膀胱ではすべて染色陰性であった。一方、LH群の膀胱では、上皮表面に付着し、あるいは膀胱腔内に存在している一部の菌の周囲が、染色陽性であった(図6)。

考 察

Candida albicans のような弱毒菌による感染は、全身あるいは局所が易感染状態にある時に発症することは周知の事実である。今回の主要研究目的の1つは、どのような易感染状態にすれば *Candida* 膀胱炎の実験モデルを確立できるかにある。そこで最初に試みたのが両側尿管および尿道を結紮することにより注入菌の尿による洗浄作用を止めることであったが、この処置だけでは軽度の炎症所見と僅かの酵母型菌付着が認められるのみで、明らかな *Candida* 膀胱炎は発症しなかった。さらにこれに塩酸処置を追加すると、*Candida* 細胞は無数に付着するようになり、かつ酵母型から菌糸型へ形態変換するのが観察された。この菌糸型菌は、付着するとともに粘膜固有層内へ侵入し、最終的には高度な *Candida* 膀胱炎へと進展した。今回観察されたラットの *Candida* 膀胱炎は、*Candida* 球体を伴っており、臨床でみられる人の *Candida* 膀胱炎⁹⁾ と組織学的に極めて類似しており、*Candida* 膀胱炎の実験モデルとして適当であると考えられた。

膀胱壁に付着している *Candida* 細胞を透過型電顕で観察すると、細胞壁最外層に小突起の形成が認められた。この小突起は *Candida* 口内炎¹²⁾¹³⁾ で観察されたフロキユラー層あるいはフロキユラー物質と同じものであると考えられる。*Candida* 口内炎では、マンナン蛋白と推察される²⁰⁾ アドヘジンを含む、この小突起の発達の度合いが菌の付着性に関連している¹²⁾²³⁾²⁴⁾ と報告されている。今回の検討では、3群間および菌の形態の違いによりこの小突起の形成に明らかな違いは認められなかった。

宿主側の因子うち、膀胱上皮表面のムチン層は、細菌付着を阻害するネガティブ因子の役割を果たすと考えられている¹⁹⁾。このムチン層は、一般に用いられているグルタルアルデヒド、オスミウム固定による走査型電顕で少数の研究者により観察されている²⁵⁾²⁶⁾。しかし、この物質はおそらく固定の段階で剥離してしまうため、前述の方法での観察は困難で、著者もこの固定法では観察できなかった。そこでムチン層の観察に透過型電顕で有用性が報告されている²⁷⁾²⁸⁾ ルテニウムレッドを用いて走

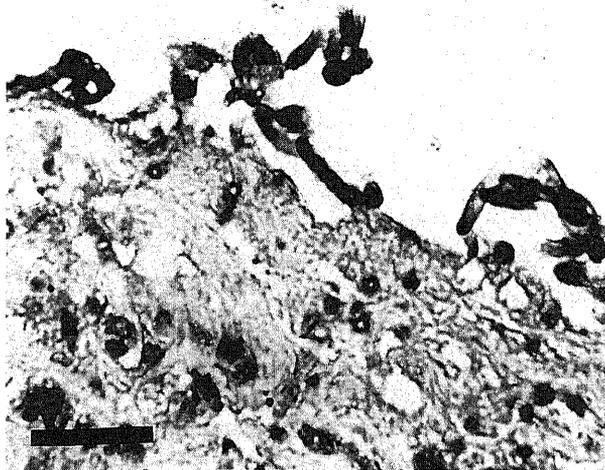


Fig. 6. Immunohistochemical staining for fibrinogen. Adherence of positively stained *Candida* cells to the exfoliated area of the epithelium is shown in Group LH 24 hr after candidal inoculation. $\times 400$. Scale bar indicates 25 μ m.

査型電顕での観察を試みた。その結果、正常ラットの膀胱上皮表面に存在した細線維状あるいは細顆粒状の物質はムチン層と考えられた。この物質は塩酸処置膀胱では上皮の脱落部のみならず、非脱落部にも認められなかったことより塩酸処置によりムチン層は消失するものと考えられた。さらにこの物質は、CおよびL群では菌を包み込むように存在していたが、LH群では認められなかった。この結果は *Candida* 膀胱炎発症過程において、ムチン層は、むしろ菌を取り込み、尿流により取り込んだ菌を伴って剥がれることで菌の上皮への付着を阻害しているとする報告²⁰⁾に合致しており、その消失は菌の上皮への直接的な付着を増加させるものと考えられた。なお、ムチン層は上皮表面を切れ目なく覆うゲル状の物質と考えられるが、今回の実験では、試料のエタノール脱水および臨界点乾燥のため、細線維、細顆粒状に変形したものと推察している。

LH群では、菌の付着は、上皮の非剥離部より、剥離部により多く観察されたことより、上皮の剥離部にはムチン層の消失以外に付着を増強する因子が存在するものと推察される。フィブロネクチンは、生体内において全身の組織に組織間の接着因子²⁹⁾として、さらに血漿中には生体防御機構の一員³⁰⁾として豊富に存在することが知られている。そして膀胱においては粘膜固有層や基底膜に局在していると報告されている³¹⁾。また、フィブロネクチンは、細菌のアドヘジンに対するレセプターとして付着に関与しているとも考えられており¹⁹⁾¹⁰⁾。膀胱においては、*Bacillus Calmette-Guerin*の膀胱上皮への付着に関与していることが報告されている¹⁷⁾¹⁸⁾。*Candida*感染症においては、フィブロネクチンの口腔上皮や膈上皮への付着への関与が指摘されている³²⁾が、尿路での報告はない。今回の免疫組織科学的検討では、正常ラット膀胱粘膜には染色陽性部位はなくフィブロネクチンの局在は明らかにできなかったが、塩酸処置膀胱や3群の膀胱の粘膜下組織が染色陽性であったことより、酸や *Candida* 接種による炎症により粘膜下組織にフィブロネクチンが集まることが示唆された。特に塩酸処置膀胱やLH群の膀胱では、上皮脱落部が強陽性に染色され、LH群の膀胱では、強陽性部位に菌が付着してただけでなく、膀胱腔内の菌体周囲が染色陽性であった結果は、組織内のフィブロネクチンだけでなく、組織外からの可溶性のフィブロネクチンが動員されたことを示している。恐らく血漿より動員されたフィブロネクチンが、上皮の傷害部位に沈着し、*Candida*の付着を増強し、さらには膀胱腔内へ溶出し、*Candida*菌体周囲へも付着したものと考えられた。

さらに、フィブロネクチン同様血漿成分であるフィブリンは、電顕的に、長期間留置された尿道留置カテーテル表面に付着する細菌や結晶周囲に、細線維状の物質として存在し、細菌や結晶の付着に関与することが報告されている¹⁹⁾³³⁾。今回、LH群の上皮剥離部でも、菌に絡みつく細線維状の物質が存在し、その物質は免疫染色でフィブリンであることが確認された。これらの結果よりフィブリンも、*Candida*細胞の付着に関与する因子の一つであることが考えられた。

以上の結果より、*Candida*膀胱炎発症には、菌側のアドヘジン以上に、ムチン層の消失や、フィブロネクチンやフィブリノーゲンを動員する上皮剥離が重要であると推察された。そしてこのことは *Candida*膀胱炎が、ムチン層を消失させ、膀胱上皮を剥離させる原因となる尿道留置カテーテル留置患者で好発している³⁴⁾³⁵⁾臨床所見に合致していると考えられた。

結 論

ラットを用いて *Candida* 膀胱炎の実験モデルを確立し、そのモデルを用いて *Candida* の膀胱粘膜への付着に関与する因子を検討し、次のような結果を得た。

1. 無処置のラット (C群)、両側尿管および尿道を結紮したラット (L群) に菌を接種すると少数の酵母型菌の付着は認められたが、明らかな *Candida* 膀胱炎は成立しなかった。

2. 膀胱内への塩酸注入を追加したラット (LH群) に菌を接種すると菌糸型菌の侵入や *Candida* 球体の形成など、臨床的に認められる *Candida* 膀胱炎とほぼ同様の所見が認められた。

3. 走査型電顕による観察では、LH群では他の2群に比し、有意に多くの菌が膀胱壁に付着しており ($p < 0.05$)、特に上皮脱落部では高密度であった。

4. ルテニウムレッド染色と走査型電顕により、正常膀胱表面に認められたムチン層と考えられる顆粒状の物質が認められた。この物質は塩酸処置膀胱上皮表面では消失していたことより、ムチン層の消失が、*Candida* の上皮細胞への直接的付着を増加させるものと考えられた。

5. フィブロネクチンの免疫染色の結果、LH群では染色強陽性の上皮脱落部位に菌が付着していたことより、フィブロネクチンが菌の付着に関与しているものと推察された。フィブリノーゲンの免疫染色にて、LH群で、上皮脱落部に付着している菌の周囲が染色陽性であったことより、フィブリンも菌の付着に関与しているものと推察された。

以上より *Candida* 膀胱炎の発症には宿主側の因子として尿流の停滞に加えて、ムチン層の消失や、フィブロネクチンやフィブリノーゲンの動員を促す上皮の脱落が重要と考えられた。

謝 辞

稿を終えるに当たり、御指導、御校閲を賜りました並木幹夫教授に深甚なる謝意を表します。また直接御指導いただきました大川光央助教授 (現 金沢市立病院泌尿器科)、ならびに御教示、御助言を賜りました金沢大学医学部微生物学講座中村信一教授、金沢大学医学部第一病理学講座中西功夫教授に深謝いたします。さらに本研究に多大なる御協力を賜りました金沢大学泌尿器科学講座の諸先生方に感謝いたします。

文 献

- 1) Schönebeck J, Ånséhn S. The occurrence of yeast-like fungi in the urine under normal conditions and in various types of urinary tract pathology. Scand J Urol Nephrol 6:123-128, 1972
- 2) Roy JB, Geyer JR, Mohr JA. Urinary tract candidiasis: an update. Urology 23:533-537, 1984
- 3) Schönebeck J. Studies on *Candida* infection of the urinary tract and on the antimycotic drug 5-fluorocytosine. Scand J Urol Nephrol, 11 (Suppl): 7-48, 1972
- 4) Michigan S. Genitourinary fungal infections. J Urol 116:390-397, 1976
- 5) Bodey GP, Fainstein V. Systemic candidiasis. In GP Bodey, V Fainstein (eds), *Candidiasis*, 1st ed, p135-168, Raven Press, New York, 1985
- 6) Ellen RP, Gibbons RJ. Parameters affecting the adherence and tissue tropisms of *Streptococcus pyogenes*. Infect Immun 9:85-91, 1974
- 7) Parsons CL, Greenspan C, Mulholland SG. The primary

- anti-bacterial defense mechanism of the bladder. Invest Urol 13:72-76, 1975
- 8) Davis CP, Balish E, Mizutani K, Uehling DT. Bladder response to Klebsiella infection: A scanning electron microscopy study. Invest Urol 15:227-231, 1977
 - 9) Marrie TJ, Costerton JW. The ultrastructure of *Candida albicans* infections. Can J Microbiol 27:1156-1164, 1981
 - 10) Centeno A, Davis CP, Cohen MS, Warren MM. Modulation of *Candida albicans* attachment to human epithelial cells by bacteria and carbohydrates. Infect Immun 30:1354-1360, 1983
 - 11) Sandin RL, Rogers AL, Beneke ES, Fernandez MI. Influence of mucosal cell origin on the *in vitro* adherence of *Candida albicans*: Are mucosal cells from different sources equivalent? Mycopathologia 98:111-119, 1987
 - 12) Howlett JA, Squier CA. *Candida albicans* ultrastructure: Colonization and invasion of oral epithelium. Infect Immun 29:252-260, 1980
 - 13) Montes LF, Wilborn WH. Ultrastructure features of host-parasite relationship in oral candidiasis. J Bacteriol 96:1349-1356, 1968
 - 14) Parsons CL, Greenspan C, Moore SW, Mulholland SG. Role of surface mucin in primary antibacterial defense of bladder. Urology 9:48-52, 1977
 - 15) Doran JE, Raynor RH. Fibronectin binding to protein A-containing staphylococci. Infect Immun 33:683-689, 1981
 - 16) Simpson WA, Beachey EH. Adherence of group A streptococci to fibronectin on oral epithelial cells. Infect Immun 39:275-279, 1983
 - 17) Hudson MA, Brown EJ, Ritchey JK, Ratliff TL. Modulation of fibronectin-mediated *Bacillus Calmette-Guerin* attachment to murine bladder mucosa by drugs influencing the coagulation pathways. Cancer Res 51:3726-3731, 1991
 - 18) Ratliff TL, Palmer JO, McGarr JA, Brown EJ. Intravesical *Bacillus Calmette-Guerin* therapy for murine bladder tumors: initiation of the response by fibronectin-mediated attachment of *Bacillus Calmette-Guerin*. Cancer Res 47:1762-1766, 1987
 - 19) Ohkawa M, Sugata H, Sawaki M, Nakashima T, Fuse H, Hisazumi H. Bacterial and crystal adherence to the surfaces of indwelling urethral catheters. J Urol 143:717-721, 1990
 - 20) Shimokawa O, Kato Y, Nakayama H. Accumulation of 14-methyl sterols and defective hyphal growth in *Candida albicans*. J Med Vet Mycol 24:327-336, 1986
 - 21) Shimokawa O, Nakayama H. Isolation of a *Candida albicans* mutant with reduced content of cell wall mannan and deficient mannan phosphorylation. J Med Vet Mycol 22:315-321, 1984
 - 22) Douglas LJ, McCourtie J. Effect of tunicamycin treatment on the adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. FEMS Microbiol Lett 16:199-202, 1983
 - 23) McCourtie J, Douglas LJ. Relationship between cell surface composition of *Candida albicans* and adherence to acrylic after growth on different carbon sources. Infect Immun 32:1234-1241, 1981
 - 24) Douglas LJ, Houston JG, McCourtie J. Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells after growth on different carbon sources. FEMS Microbiol Lett 12:241-243, 1981
 - 25) Davis CP, Avots-Avotins AE. Evaluation of bacterial attachment to acid treated bladder epithelium. Scan Elect Microsc 2:825-830, 1982
 - 26) Balish MJ, Jensen J, Uehling DT. Bladder mucin: A scanning electron microscopy study in experimental cystitis. J Urol 128:1060-1063, 1982
 - 27) Dixon JS, Holm-Bentzen M, Gilpin CJ, Gosling JA, Bostofte E, Hald T. Electron microscopic investigation of the bladder urothelium and glycocalyx in patients with interstitial cystitis. J Urol 135:621-625, 1986
 - 28) Pantazopoulos D, Legakis N, Antonakopoulos G, Sofras F, Dimopoulos C. The effect of pentosanpolysulphate and carbenoxolone on bacterial adherence to the injured urothelium. Br J Urol 59:423-426, 1987
 - 29) Yamada KM, Olden K. Fibronectins-adhesive glycoproteins of cell surface and blood. Nature 275:179-184, 1978
 - 30) Yang KD, Bohnsack JF, Hill HR. Fibronectin in host defense: implications in the diagnosis, prophylaxis and therapy of infectious diseases. Pediatr Infect Dis J 12:234-239, 1993
 - 31) Deen S, Ball RY. Basement membrane and extracellular interstitial matrix components in bladder neoplasia-evidence of angiogenesis. Histopathology 25:475-81, 1994
 - 32) Skerl G, Calderone RA, Segal E, Sreevalsan T, Scheld WM. *In vitro* binding of *Candida albicans* yeast cells to human fibronectin. Can J Microbiol 30:221-227, 1984
 - 33) Fuse H, Ohkawa M, Nakashima T, Tokunaga S. Crystal adherence to urinary catheter materials in rats. J Urol 151:1703-1706, 1994
 - 34) Singh CR, Lytle WF Jr. Cystitis emphysematosa caused by *Candida albicans*. J Urol 130:1171-1173, 1983
 - 35) Greene MH. Emphysematous cystitis due to *Clostridium perfringens* and *Candida albicans* in two patients with hematologic malignant conditions. Cancer 70:2658-2663, 1992

An Experimental Model of *Candida Albicans* Cystitis with Special Reference to Candidal Adherence

Yukinosuke Oshinoya, Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 – J. Juzen Med Soc., 107, 446 – 453 (1998)

Key words *Candida* cystitis, adherence, fibronectin, fibrinogen, mucin layer

Abstract

We established an experimental model of rat *Candida albicans* cystitis and studied possible factors involved in the adherence of *Candida* cells. Cystitis was induced by injecting a 0.2ml suspension containing 2×10^6 colony forming units of the *Candida albicans* KD14 strain into untreated rats (Group C), rats in which the bilateral ureters and urethra had been ligated (Group L), and rats in which hydrochloric acid (HCl) was injected intravesically (Group LH). Although light microscopy revealed mild inflammation and slight yeast adhesion in Group C and Group L, a tendency to spontaneous healing was noted with no frank *Candida* cystitis established. On the other hand, in Group LH, *Candida* cystitis similar to those noted clinically such as mycelia invasion and *Candida* bezoar formation were found, suggesting that myceliae play a vital role in candidal tissue invasion. Scanning electron microscopy (SEM) revealed a significantly greater number of *Candida* cells adhered to the luminal surface of the bladder wall ($p < 0.05$), most notably to exfoliated areas of epithelium in Group LH as compared to the other two groups. Transmission electron microscopy revealed the formation of tiny projections in the outermost layer of the wall of the adherent cells with no difference noted in this feature between the three groups. Since ruthenium red staining and SEM had shown that the granular material thought to be the mucin layer found on the luminal surface of normal bladder epithelium had disappeared from the surface of the HCl-treated bladder epithelium, it is deduced that this disappearance of the mucin layer directly enhances the adhesion of *Candida* to the epithelial cells. The results of fibronectin immunohistochemical staining suggest that fibronectin is involved in the adhesion of *Candida* cells since in Group LH *Candida* cells adhered to areas of exfoliated epithelium that were strongly stained. In fibrinogen immunohistochemical staining, the surface of *Candida* cells adherent to areas of exfoliated epithelium stained positive in Group LH, suggesting that fibrin also plays a role in the adhesion of *Candida* cells. These results indicate that disappearance of the mucin layer, and epithelial exfoliation which promotes mobilization of fibronectin and fibrinogen, in addition to the formation of small projections in the *Candida* cell wall, are important factors in the adhesion of *Candida* cells in cases of *Candida* cystitis.