

水腎症ラットにおける上行性カンジダ腎盂腎炎の実験的研究

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: 高島, 三洋 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8327

水腎症ラットにおける上行性カンジダ腎盂腎炎の実験的研究

金沢大学医学部泌尿器科学講座 (主任: 久住治男教授)

高 島 三 洋

(平成4年2月8日受付)

尿管の不完全閉塞による水腎症を有するラットを用いて, *Candida albicans* (*C. albicans*) による上行性腎盂腎炎作成を試み, 組織学的, 細菌学的に検討した. さらにカンジダ属の主要代謝産物である D-アラビニトールおよびマンナン抗原の血清中濃度を測定し, 上行性カンジダ腎盂腎炎における診断的有用性について検討した. 上行性カンジダ腎盂腎炎は, 以下のごとく作成した. すなわち, 化学的膀胱炎を惹起させる目的で0.75%酢酸溶液 0.5ml を経尿道的に膀胱内に注入した. 翌日 *C. albicans* ATCC 10259株菌液 1ml (菌数, 10^7 個) を経尿道的に膀胱内に注入し, 同時に左下部尿管に瞬間接着剤アロンアルファ®を1滴下して, 不完全尿管閉塞による水腎症を作成した. 菌接種 1, 3, 7, 14, 21および28日後に採血し, ラットを屠殺した. 血清中 D-アラビニトール濃度は酵素を用いた初速度蛍光分析法により, また血清中マンナン抗原濃度はビオチン-ストレプトアビジン系を用いた酵素免疫測定法により測定した. 腎盂腎炎の発症は菌接種 3日後までの水腎症ラットでは, 29腎中18腎 (62.1%) に, 菌接種 7日以降では55腎中50腎 (90.9%) に認められ, 経時的に病変は腎門蓋部, 腎乳頭部から腎実質部に拡大していった. D-アラビニトール/クレアチニン比は, 腎盂腎炎が認められた群では, 認められなかった群に比し高く, 菌接種 3日後まで ($p < 0.01$) および 7日後以降 ($p < 0.05$) のいずれにおいても有意差が認められた. また, 血清中マンナン抗原は, 菌接種 3日後までの腎盂腎炎が認められた群においてのみ有意の高値が認められた ($p < 0.05$). 以上の結果から, 尿流障害は上行性カンジダ腎盂腎炎を発症させる要因になり得ること, また D-アラビニトール/クレアチニン比および血清中マンナン抗原はカンジダ腎盂腎炎の診断に有用であることが示唆された.

Key words *Candida albicans*, ascending pyelonephritis, experimental model, D-arabinitol, mannan antigen

人口の高齢化や医療技術の高度化に加えて, 抗癌剤や免疫抑制剤などの広範な使用は免疫能の低下した宿主を増加させた. また, 静脈や尿路などへのカテーテル長期留置は微生物による感染機会の増加につながり, さらに強力な抗菌化学療法的一般化は, 本来偏利共生的な寄生生活を営むのが普通であるカンジダ属に対しても, 菌交代現象として感染頻度を高める要因となっている. カンジダ属の中でも, *Candida albicans* (*C. albicans*) は各種臨床検体からの分離頻度が最も高く¹⁾, 日和見真菌感染をひきおこし, 時には致死感染にまで重篤化することも報告され注目されている²⁾. 尿路においても *C. albicans* は最も分離頻度の高い真菌であるが¹³⁾, 尿路における病原性など十分に解明されているとは言えない. 実験的カンジダ尿路感染症, とりわけ腎盂腎炎についてはその多くは血行性感染経路によるものであり⁴⁾⁻¹¹⁾, 上行性経路による, 腎盂腎炎に関する研究は極めて少ない¹²⁾⁻¹⁵⁾. 上行性カンジダ腎盂腎炎の作成法としては全身免疫能を低下させる方法¹⁶⁾ のほかに, 膀胱内への異物の挿入により高い腎盂腎炎の発症率が得られたとする報告も見られる¹²⁾⁻¹⁵⁾. 細菌性尿路感染の発症に, 尿路通過障害が深く関与していること, また臨床的にカンジダ尿路感染症患者のほとんどが尿路に基礎疾患を有しているという事実³⁾ は, カンジダ腎盂腎炎の発症にも尿流障害が重要な要因の一つになって

いることを強く示唆している. この問題を少しでも解明するため, 臨床的に重要な疾患である水腎症を基礎に有するラットにおける上行性感験実験を試みた. さらに, *C. albicans* の主要な代謝産物である D-アラビニトール, および細胞壁の主要構成成分であるマンナンの血清中濃度の, カンジダ腎盂腎炎診断における有用性についても検討した.

材料および方法

I. 使用菌株および使用菌液の調整

C. albicans ATCC 10259 株を使用した. なお本菌株はカンジダチェック® (ヤトロン, 東京) により, 血清型 A であることを確認した. 使用菌液の調整は, まずサブローグルコース培地 [ポリペプトン (大五栄養化学, 大阪) 1.0%, ブドウ糖 4.0%, pH 5.6] にて 30°C, 24時間振盪培養した菌液 0.5ml をサブローグルコース培地に植菌した後, さらに 30°C にて培養を行い, 菌の増殖定常期初期 (16時間培養) の菌液を本実験に用いた.

II. 実験動物

体重 200g 前後の Wistar 系雌性ラットを使用した.

III. 上行性腎盂腎炎の作成法

まず折戸の方法¹⁶⁾ に従い, 0.75%酢酸溶液 0.5ml を経尿道的に膀胱内に注入することにより化学的膀胱炎を作成した. 翌日

Abbreviations: B-S EIA, biotin-streptavidin enzyme immunoassay; HE, hematoxylin and eosin; PAS, periodic acid-Schiff

C. albicans 菌液 1.0ml (菌数, 10^7 個) を経尿道的に膀胱内に注入し, 直ちに外尿道口を 1 時間クリップで挟み, その間に, 池田の方法¹⁷⁾に従って不完全尿管閉塞を作成した. すなわち, 尿管閉塞の作成は, ラット下腹部正中切開にて左尿管を剝離露出し, 尿管膀胱接合部より約 1cm 上方にて瞬間接着剤アロンアルファ[®] (東亜合成化学, 東京) を 1 滴滴下する方法を用いた. なお, 汚染細菌による混合感染を予防するために, 酢酸注入日より連続 8 日間ゲンタミシン (エセックス日本, 大阪) (8mg/kg) を 1 日 1 回筋注した.

IV. 病理組織学的所見の観察



Fig. 1. An intravenous pyelogram showing moderate hydronephrosis (arrow) 7 days after placing a drop of α -cyanoacrylate monomer on the left lower ureter.

菌接種 1, 3, 7, 14, 21 および 28 日後にエーテル麻酔下にラットを屠殺し, 腎, 尿管, 膀胱, 肝, および肺を摘出した. 摘出標本は, 水腎の有無, 膿瘍, カンジダ菌球などの肉眼的観察後, ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin and eosin, HE), 過ヨウ素酸・シッフ (periodic acid-Schiff, PAS) およびグロコット染色により組織学的に観察した.

腎病変は Arana ら¹⁸⁾ の分類を一部改め以下のごとく分類した. すなわち, 程度 (Grade) 0 は炎症が認められないもの, 程度 I は炎症が腎盂に限局しているもの, 程度 II は炎症が腎髄質には及んでいるが皮質表面には達していないもの, 程度 III は炎症が腎皮質表面まで達しているもの, とした.

V. 腎内生菌数の測定

無菌的に摘出した左右腎をそれぞれ半切し, その一方を生理食塩水 (1.0ml/100mg 腎) を加えて磨碎して, 腎懸濁液を作成した. これを生理食塩水で 100 倍段階希釈し, その 0.1ml を以下の各種平板培地に塗布し, 腎組織内生菌数を測定した. *C. albicans* の検出にはカンジダ GE 培地 (日水製薬, 東京) を用い, 汚染細菌の検出にはドリガルスキー改良培地 (日水製薬) を用いた.

VI. 尿中生菌数の測定

被検尿は屠殺 1 時間前に外尿道口を結紮し, 屠殺時に膀胱を穿刺する方法で採取し, 腎内生菌数測定と同様の方法により生菌数を測定した.

VII. 血清中 D-アラビニトールの測定

屠殺時下大静脈より採血し, LABOFIT D-アラビニトール測定用試薬[®] (ナカライテスク, 京都) により, 酵素を用いた初速度蛍光分析法¹⁹⁾により測定した. 腎機能の影響を補正するため, 測定値を D-アラビニトール/クレアチニン比²⁰⁾で表した.

VIII. 血清中マンナン抗原の測定

Fujita ら²¹⁾ の方法によりビオチン-ストレプトアビジン系を用いた酵素免疫測定法 (biotin-streptavidin enzyme immunoassay, B-S EIA) により以下のごとく測定した. 日本白色家兔をカンジダ死菌で免疫して得た血清を, 硫酸アンモニウムで塩析後, セファセルカラムクロマトグラフィーにて IgG 分画を得た. この特異 IgG を biotin-N-hydroxysuccinimide ester (Pierce, Rockford, USA) にて標識した. マイクロタイタートレイ (Immulon 2) (Dynatech, Chantilly, USA) を特異 IgG で被覆し, 検体を加えた後, ビオチン標識抗体, ストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ (streptavidin-horseradish peroxidase) (BRL, Gaithersburg, USA), 最後に基質液を加え, easy reader EAR 340 AT (SLT-lab instruments, Grödig,

Table 1. The occurrence of hydronephrosis and pyelonephritis in rats

Condition of the left ureter*	No. of kidneys tested	No. (%) of kidneys with hydronephrosis	No. (%) of kidneys with pyelonephritis	No. of kidneys with pyelonephritis showing grade		
				I	II	III
A	10	10(100)	9(90)**	0	3	6
B	10	1(10)	2(20)	1	0	1
C	10	0(0)	0(0)	0	0	0

* A: A drop of α -cyanoacrylate monomer was placed on the lysed ureter.
B: Lysis alone.
C: No operation.

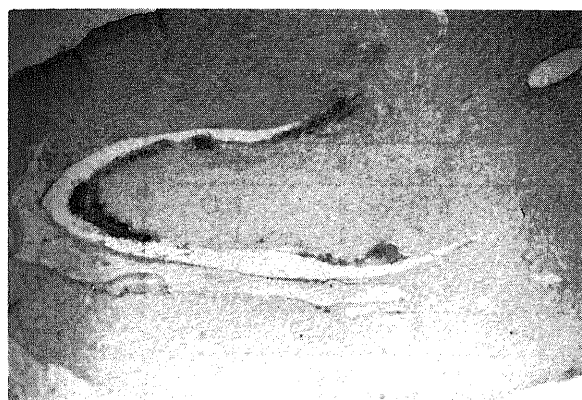
** $p < 0.01$ versus the B group and the C group by chi-square test.

Table 2-A. Histological grade of *Candida* pyelonephritis in left kidneys treated with α -cyanoacrylate monomer

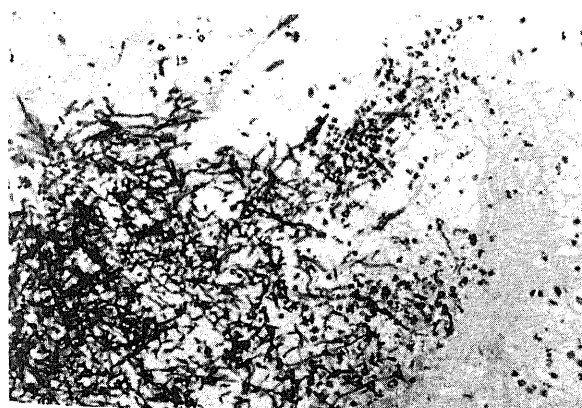
Time after inoculation (days)	No. of rats tested	No. of kidneys without contaminated bacteria	No. (%) of kidneys with pyelonephritis	No. of kidneys with pyelonephritis showing grade		
				I	II	III
1	15	15	8(53.3)	5	2	1
3	15	14	10(71.4)	4	2	4
Subtotal	30	29	18(62.1)	9	4	5
7	15	15	13(86.7)	1(1)*	5	7
14	15	15	13(86.7)	2	1	10(3)
21	15	13	12(92.3)	0	2	10(2)
28	15	12	12(100)	0	0	12(3)
Subtotal	60	55	50(90.9)**	3(1)	8	39(8)
Total	90	84	68(81.0)	12(1)	12	44(8)

* Figures in parentheses indicate the number of kidneys with a *Candida* bezoar in the pelvis.

** $p < 0.01$ versus number of left kidneys with pyelonephritis 1 to 3 days after inoculation by chi-square test.

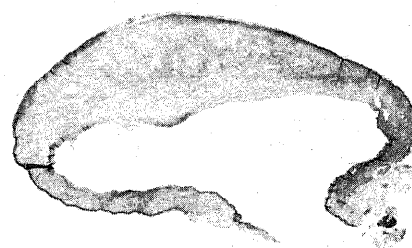


A

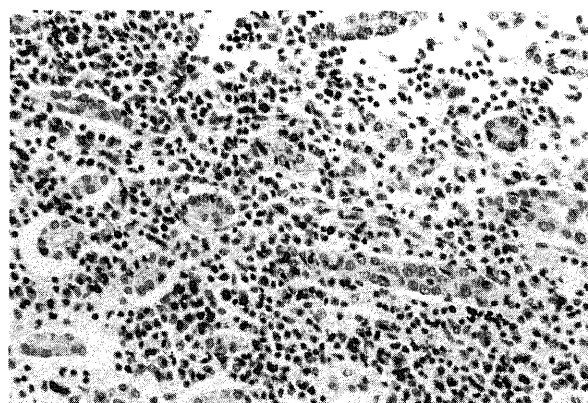


B

Fig. 2. Photographs of the infected kidney of a rat 1 day after inoculation of *C. albicans* cells. A. Acute inflammatory changes partly extended from the fornix into the medulla and papillary necrosis were observed (PAS stain, $\times 10$). B. The medulla was invaded by both mycelial and yeast forms of *C. albicans* (PAS stain, $\times 200$).



A



B

Fig. 3. Histological findings of the left kidney in a rat 28 days after inoculation of *C. albicans* cells. A. Chronic inflammatory changes extended into the cortex and severe distention of the pelvis were observed (PAS stain, $\times 2$). B. An inflammatory reaction with lymphocytes and plasma cells was observed in the medulla (PAS stain, $\times 200$).

Austria) を用い、450nm にてその吸光度を測定した。

IX. 血清クレアチニンの測定

サンテスト CRE-N[®] (三光純薬, 東京) を用いて測定した。

X. 統計学的処理

統計学的処理には X^2 検定, Kruskal-Wallis 検定を使用し、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

成 績

1. 腎盂腎炎作成のための基礎的実験

1. 不完全尿管閉塞による水腎症および腎盂腎炎の発症率

不完全尿管閉塞による水腎症および腎盂腎炎の発症率を検討するため、以下の基礎的実験を行った。酢酸処置したラットに、*C. albicans* 菌液 1.0ml (菌数, 10^7 個) を経尿道的に注入し、1時間後に一側尿管に接着剤を滴下した群、尿管の剝離だけにとどめた群、およびコントロールとして酢酸処置だけにとどめた群の3群、各10匹について検討した。

接着剤滴下群においては、7日後に10腎全例に水腎症が認め

られた (図1)。また、腎盂腎炎の発症は10腎中9腎 (90%) に認められ、尿管の剝離だけにとどめた群 (20%) およびコントロール群 (0%) に比し、その発症率に有意差 ($p < 0.01$) が認められた (表1)。

II. 腎盂腎炎発症の経時的観察

1. 病理組織学的観察

1) カンジダ腎病変

汚染細菌の分離されなかった腎はカンジダ接種ラット合計90匹の左右腎いずれも84腎 (93.3%) であった。

不完全尿管閉塞による水腎症を作成した左腎における腎盂腎炎の発症率は、菌接種1日後では15腎中8腎 (53.3%)、以後経時的に発症率は高くなり、28日後には12腎中12腎 (100%) に腎盂腎炎が認められ、7日以降で発症率は有意に高かった ($p < 0.01$) (表2-A)。また腎盂腎炎の程度も経時的に高くなる傾向がみられた。これに関連して、腎盂内に菌球の観察された腎は、菌接種7日以降の腎でのみ認められた。具体的な組織像は以下の如くであった。菌接種3日後までのカンジダ腎盂腎炎程度I

Table 2-B. Histological grade of *Candida* pyelonephritis in right kidneys treated without α -cyanoacrylate monomer

Time after inoculation (days)	No. of rats tested	No. of kidneys without contaminated bacteria	No. (%) of kidneys with pyelonephritis	No. of kidneys with pyelonephritis showing grade		
				I	II	III
1	15	15	6(40.0)	5	1	0
3	15	13	6(46.2)	2	2	2
Subtotal	30	28	12(42.9)	7	3	2
7	15	15	7(46.7)	1	4	2(1)
14	15	15	3(20.0)	1	1	1
21	15	13	6(46.2)	4(1)*	2(2)	0
28	15	13	4(30.8)	0	2(2)	2(2)
Subtotal	60	56	20(35.7)**	6(1)	9(4)	5(3)
Total	90	84	32(38.1)	13(1)	12(4)	7(3)

* Figures in parentheses indicate the number of kidneys with a *Candida* bezoar in the pelvis.

** $p < 0.01$ versus number of left kidneys with pyelonephritis during the period from 7 to 28 days after inoculation by chi-square test.

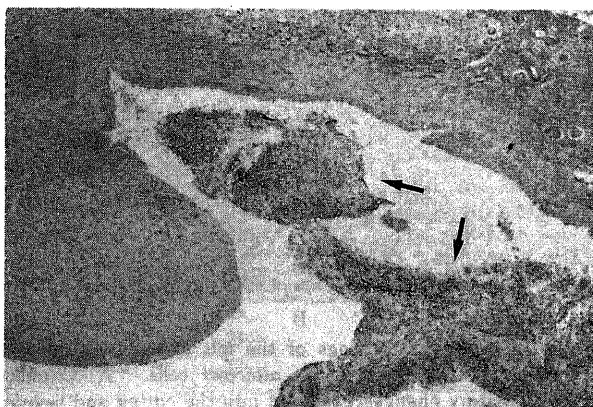


Fig. 4. *Candida* bezoars (arrows) filled the renal pelvis distended by incomplete ureteral obstruction (PAS stain, $\times 40$).

Table 3. Relationship between right and left renal histological grade of pyelonephritis

Grade of right kidney	No. of left kidneys* with pyelonephritis showing grade			
	0	I	II	III
0	14	5	7	25
I	2	4	2	4
II	0	2	1	9
III	0	1	1	5

* Kidneys treated with α -cyanoacrylate monomer

の腎には、腎盂上皮の浮腫、脱落や出血などの急性炎症像が認められ、カンジダ菌体は腎門蓋部や腎乳頭部を中心に腎盂上皮に付着していた。程度Ⅱを示した腎では、カンジダ菌体は腎乳頭部に侵入し、腎乳頭壊死が観察され、また、カンジダ菌体は腎門蓋部より腎髄質部にも侵入しており(図2-A)、カンジダ菌体が侵入している部位の周囲組織は壊死におちいっており、好中球の浸潤が認められた(図2-B)。菌接種7日以降の腎においては、腎盂は拡張し(図3-A)、腎皮質に達するリンパ球、形質細胞の浸潤が観察された(図3-B)。また、拡張した腎盂内にカンジダ菌球を有する腎も認められた(図4)。

一方、尿管処置を行わなかった右腎における腎盂腎炎の発症率は全経過を通じて左腎での発症率より低く、菌接種7日以降でその発症率に有意差が認められた($p < 0.01$) (表2-B)。両腎ともに汚染細菌が見られなかった82ラットにおいて、左右腎の腎盂腎炎の程度を比較すると、左腎の程度は右腎に比し52匹(63.4%)では高く、24匹(29.3%)では同等、また6匹(7.3%)でのみ低い成績であった(表3)。

2) カンジダ膀胱病変

菌接種3日後までの汚染細菌が認められなかった29匹中8匹(27.6%)にカンジダ菌体が膀胱粘膜に付着した急性炎症像が認められ、菌接種7日以降では17匹中4匹(23.5%)に軽度の慢性炎症像が観察された。

3) 他臓器でのカンジダ病変の観察

肝においては3日後まででは30匹中2匹(6.7%)、7日以降でも60匹中4匹(6.7%)にカンジダ病変が認められた。肺病変は菌接種3日後まででは30匹中2匹(6.7%)、7日以降では60匹中1匹(1.7%)に観察された。肝および肺にカンジダ病変が認められたラットではいずれも腎盂腎炎も認められた。

2. 腎内生菌数と腎盂腎炎の程度

腎組織内に汚染細菌の認められなかった菌接種28日後までの84ラットの左腎について、腎内生菌数と腎盂腎炎の程度との関係を菌接種3日後までの急性期と7日以降の慢性期に分け、図5に示した。菌接種3日後までは1%以下の危険率で、また7日以降では5%以下の危険率で腎盂腎炎の程度が高度となるに従い有意に高い生菌数が認められた。

3. 尿中生菌数と腎内生菌数

尿および腎組織内に汚染細菌が認められず、左腎のみに腎盂腎炎が認められた菌接種28日後までの15ラットの左腎内生菌数と尿中生菌数との関係を図6に示した。腎内生菌数と尿中生菌数との間には有意の相関関係が認められた($p < 0.05$)。

4. 血清中 D-アラビニトール/クレアチニン比

血清中 D-アラビニトール濃度は、以下の3群に分け比較検討した。すなわち、組織学的にカンジダ腎盂腎炎のみが認められ、他臓器にはカンジダ病変が認められなかった菌接種3日後までの17匹(A群)、同じく7日以降の23匹(B群)、および組織学的にカンジダ病変がいずれの臓器にも認められなかった7匹

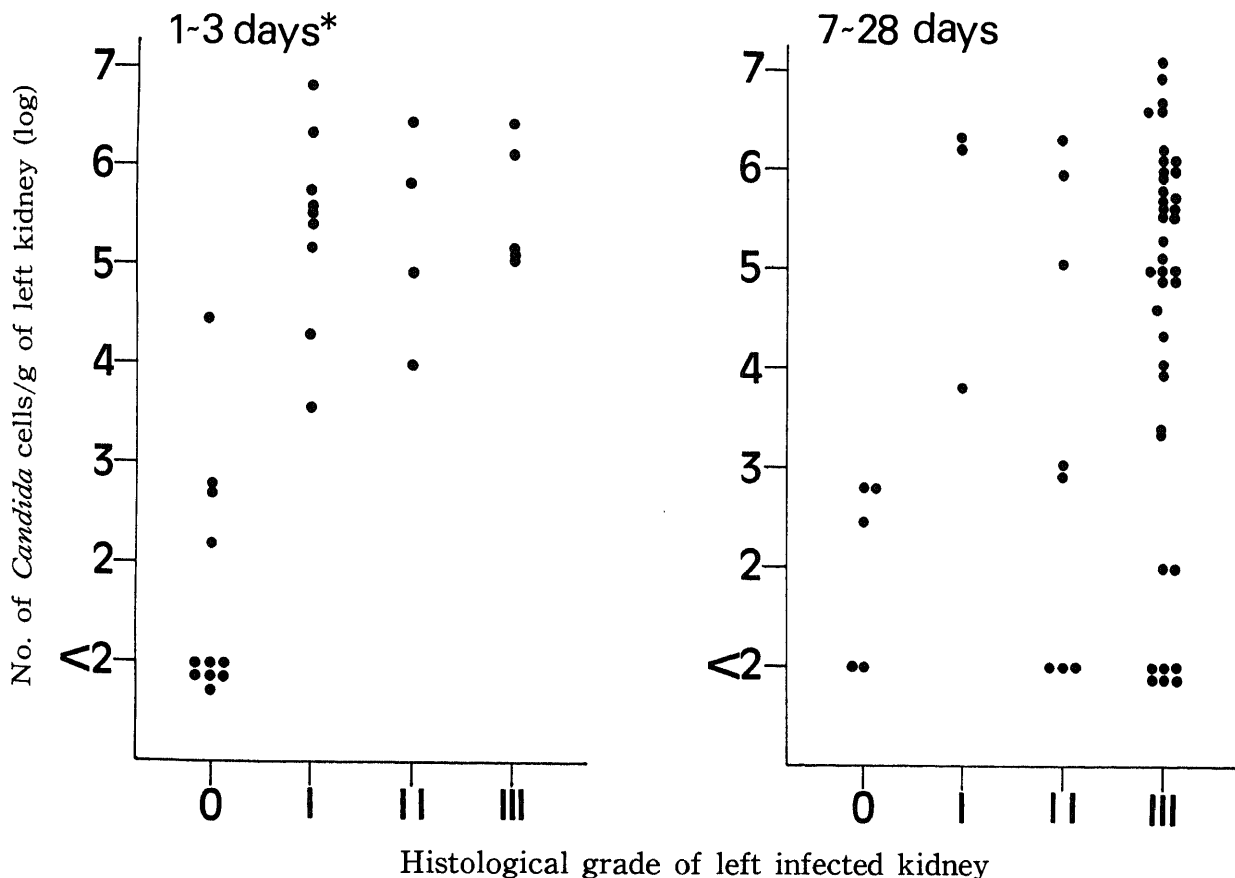


Fig. 5. Relationship between the histological grade of *Candida* pyelonephritis and renal *Candida* population in the left kidneys with open hydronephrosis. The number of *C. albicans* cells increased significantly depending on the histological grade in the left infected kidneys both within 3 days and during the period from 7 to 28 days after inoculation ($p < 0.01$ and $p < 0.05$ by kruskal wallis test, respectively). * Time after inoculation.

(C群)の3群である(表4)。A, BおよびC群におけるD-アラビニトール/クレアチニン比はそれぞれ1.65~6.73(平均4.40) $\mu\text{mol}/\text{mg}$, 0~6.26(平均3.23) $\mu\text{mol}/\text{mg}$, および0.53~1.41(平均1.04) $\mu\text{mol}/\text{mg}$ で, A, C群間およびB, C群間にそれぞれ有意差($p < 0.01$ および $p < 0.05$)が認められたが, A, B群間には有意差は認められなかった。

5. 血清中マンナン抗原

血清中マンナン抗原は前述したA群16匹, B群23匹およびC群6匹に分けて比較検討した(表5)。マンナン抗原は, AおよびB群においてのみ検出され, その値はそれぞれ0~3.4(平均1.50) ng/ml および0~3.6(平均0.64) ng/ml であった。統計学的には, A, C群間にも有意差($p < 0.05$)が認められた。

考 察

従来よりカンジダ尿路感染症は, 一般に全身性カンジダ症の一部分症と考えられる傾向が強くなり, そのため感染経路も血行性が重視されてきた。しかし Tennantら²³⁾は腎のみにカンジダ病変が認められ, カンジダ血症や他臓器にカンジダ病変が証明されなかった症例を報告し, 原発性腎カンジダ症(primary renal candidiasis)と称した。原発性腎カンジダ症の大部分は腎盂腎炎であり, その感染経路は女性に多いことより上行性が推測され²⁴⁾, また Schönebeckら²⁵⁾により無症候性カンジダ尿症から症候性腎カンジダ症をきたしたと考えられる上行性カンジダ腎盂腎炎症例も報告されている。さらに上行性カンジダ腎盂腎炎からカンジダ血症, 全身性カンジダ症へ進展する可能性も報告されており^{26)~27)}, これらの報告は上行性カンジダ腎盂腎炎が存在し, かつ臨床的意義は決して小さくないことを示していると考えられる。この経路の存在を実験的に証明するため徳永¹⁴⁾は, ラットにサイクロフォスファミドを投与し, 全身の免疫能を低下させ, これに *C. albicans* ATCC 10259 株菌体を経尿

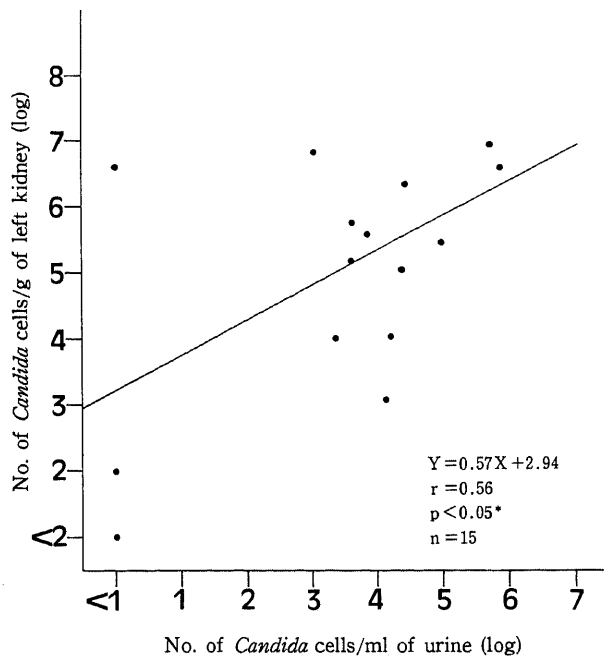


Fig. 6. Relationship between left renal and urinary *Candida* populations in the kidneys with open hydronephrosis. * $p < 0.05$ by linear regression test.

道的に膀胱内へ注入する方法を用いてカンジダ尿路感染症の作成を試み, 約80%の腎に腎盂腎炎を発症させることに成功した。それでは, 全身免疫能の低下はないが尿路通過障害がある場合はどうか。この問題を究明すべく, 著者は尿流障害を来したラットを用いて上行性カンジダ腎盂腎炎の作成を試みた。実験モデルを作成するにあたり, 実験動物は経尿道的操作が容易に行える雌性ラットを使用した。また菌株にも徳永¹⁴⁾と同じ標準株を使用した。尿流障害を来す基礎疾患としては, 臨床的に重要な意義を有する水腎症とし, 池田の方法¹⁷⁾に従って左側不完全尿管閉塞を作成した。これに徳永¹⁴⁾と同じ菌液量, 菌数を尿道より逆行性に注入することにより, 組織学的にカンジダ腎盂腎炎は菌接種7日後には尿管閉塞腎の86.7%に発症した。この成績は, ウサギの膀胱内にビーズ玉を留置する方法による上行性腎盂腎炎モデルにおける32%¹²⁾より高率であり, 徳永の全身免疫能低下ラットモデル¹⁴⁾における80%よりやや高い発症率であった。これらの結果は, ヒトにおいても宿主側の条件によっては, カンジダ尿路感染症が上行性経路にて発症し得ることを強く示唆しているものと考えられた。なお著者が用いた方法は手技が比較的容易で, かつ腎盂腎炎の発症率が高いだけでなく, 免疫抑制剤を使用していないため, 炎症反応がより明確に発現することから, 上行性カンジダ腎盂腎炎の実験モデルとしても有用であると考えられる。

本モデルにおける組織学的変化についての検討では, 不完全尿管閉塞を有する左腎での腎盂腎炎の発症率は, 経時的に高く

Table 4. Serum D-arabinitol/creatinine ratios

Group*	No. of rats tested	D-Arabinitol/creatinine ratio ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	
		Range	Mean
A	17	1.65-6.73	4.40**
B	23	0-6.26	3.23***
C	7	0.53-1.41	1.04

* A: rats with *Candida* lesions 1~3 days after inoculation.

B: rats with *Candida* lesions 7~28 days after inoculation.

C: rats without *Candida* lesions.

** $p < 0.01$ versus the C group by kruskal-wallis test.

*** $p < 0.05$ versus the C group by kruskal-wallis test.

Table 5. Serum levels of mannan

Group*	No. of rats tested	Serum levels of mannan (ng/ml)	
		Range	Mean
A	16	0-3.4	1.50**
B	23	0-3.6	0.64
C	6	0	0

* A: rats with *Candida* lesions 1~3 days after inoculation.

B: rats with *Candida* lesions 7~28 days after inoculation.

C: rats without *Candida* lesions.

** $p < 0.05$ versus the C group by kruskal-wallis test.

なり、菌接種28日後には100%で、その範囲も急性炎症期には、腎乳頭部や腎盂蓋部にしか認められなかったものが、その後腎実質へ拡大していくのが観察された。上行性カンジダ腎盂腎炎の腎内の感染経路としては、本研究でも観察された、腎乳頭から侵入するのが特徴¹⁴⁾¹⁵⁾²⁵⁾²⁶⁾とされているが、本モデルでは腎盂蓋部から侵入する経路¹⁴⁾も観察された。腎盂蓋部は、腎盂から深く切り込んだ位置にあるため尿の浄化作用を受けにくく、細菌の付着、増殖が容易な部位である²⁰⁾だけでなく、解剖学的に腎盂蓋部上皮下の結合組織繊維成分は尿管側腎盂上皮組織に比して乏しく、かつ壁の薄い毛細血管や小静脈が多いため、損傷を受け易い^{20)~31)}ことが知られている。したがって本モデルにおける高い腎盂腎炎の発生率は、不完全尿管閉塞による腎盂内圧上昇により、脆弱な腎盂蓋部が損傷したことにも起因しているものと考えられた。また本研究において観察された肺や肝のカンジダ病変の発症頻度は徳永のモデル¹⁴⁾より低い。これは全身免疫能低下が、全身へのカンジダの播種に大きく関与していることを示しているものと考えられた。

なお、水腎症を作成しなかった右腎においても腎盂腎炎の発症が認められた。これは、左腎で増殖したカンジダ菌体が持続的に膀胱内に流入し、膀胱尿管逆流現象によって右腎に達して腎盂腎炎を発症させるものと推察された。しかしその発症率は左腎に比し全経過を通じて低く、さらに炎症範囲も限局していた。これらの成績は、カンジダ腎盂腎炎の発症および進展に尿路障害が深く関与していることを示しているものといえよう。

カンジダ尿路感染症における有意の菌数については議論のあるところである。適切な採尿法にて採取された尿検体であれば菌数にかかわらず臨床的意義があるとする報告²⁵⁾³²⁾や、真の尿路感染症と判定するには 10^4 /ml以上の菌数が必要であるとの報告³³⁾もあり、有意の菌数についての基準は未だ明確にされているとは言えない。今回の検討では、尿中菌数と腎組織内菌数との間には有意の相関関係が認められ、かつ腎組織内菌数は腎盂腎炎の程度をよく反映していた。この結果は、尿中菌数はカンジダ腎盂腎炎の診断に重要な意義を有することを強く示唆しているものと考えられた。

深在性カンジダ症の血清を用いた診断法には、いくつかの方法が報告されている。その中で、血中カンジダ抗体を検出する方法^{34)~40)}は、カンジダ症が認められない患者でも高頻度にカンジダ抗体を保有すること⁴⁰⁾⁴¹⁾、カンジダ症の患者の多くは免疫能の低下した宿主であり、カンジダ抗体産生が低下している例が多いこと³⁶⁾、カンジダ抗体産生能があっても抗体産生までに一定期間を要すること⁴²⁾などにより診断、特に早期診断には不適當であるとされている。

近年、血中カンジダ代謝産物や抗原の検出が注目されており、カンジダの代謝産物であるD-アラビニトール¹⁹⁾⁴³⁾や細胞壁多糖類のマンナン抗原²¹⁾⁴⁴⁾⁴⁵⁾の有用性を示唆する報告が見られる。D-アラビニトール濃度の測定には、従来よりガスクロマトグラフィー⁴⁶⁾が用いられていたが、一検体当たりの測定時間が長く、かつ操作が煩雑であることなどのために、一般検査室での測定には不適當であった。近年、酵素を用いて初速度蛍光分析法で測定する方法¹⁹⁾が開発・キット化され、その値はガスクロマトグラフィーによる値と、高い相関関係のあることが明らかとなっている⁴⁶⁾⁴⁷⁾。一方、マンナン抗原の検出法にはB-S EIA法が優れた特異性および感度を有することが報告されている³⁹⁾。著者は、これらの報告をもとにLABOFIT[®]を用いて血

清中D-アラビニトール濃度を、B-S EIAを用いてマンナン抗原濃度を測定し、上行性カンジダ腎盂腎炎の診断における有用性を検討した。その結果、D-アラビニトールは腎盂腎炎が認められたラットにおいて、認められなかったものより急性期、慢性期のいずれも有意の高値を示した。一方、マンナンは急性期でのみ、腎盂腎炎を有するラットで有意の高値を示した。これらの成績は、血清中D-アラビニトール/クレアチニン比、およびマンナン抗原は、いずれもカンジダ腎盂腎炎の早期診断に有用であることを示唆しているものと考えられた。マンナン抗原がカンジダ感染の急性期のみに一過性に検出される理由に関し、鈴木ら⁴⁸⁾は非致死感染においては、感染初期の膿瘍性病変から数日で肉芽腫性病変へと変化することにより、病巣内のカンジダが肉芽腫内に隔絶され、血中にマンナン抗原が流出しにくくなるためと推察している。一方D-アラビニトールが急性期のみならず慢性期においても検出されるのは、カンジダマンナンとD-アラビニトールの分子量の差、すなわちカンジダマンナンは1~5糖類のオリゴ糖がブランチに分歧した⁴⁹⁾、分子量39,000から54,000のものであるのに対し、D-アラビニトールはD-アラビノースの5炭糖アルコールであり、分子量は152.15とカンジダマンナンに比べてはるかに小さい。そのため慢性期においてもD-アラビニトールは肉芽腫性病変部からも血中に流出しうるものが推察された。従って血清中D-アラビニトールが高値を示す場合は、急性期および慢性期を問わずカンジダ病変の存在を示し、血清中マンナンが高値を示す場合は急性期のカンジダ病変の存在を示すものと推察された。

結 論

不完全尿管閉塞を有するラットを用いて、*C. albicans*による上行性腎盂腎炎の実験モデルを作成し、組織学的、細菌学的に検討した。さらにカンジダ腎盂腎炎の病期や程度と、尿中カンジダ数、カンジダ属の主な代謝産物の1つであるD-アラビニトールの血中濃度、およびカンジダ細胞壁多糖類であるマンナン抗原の血中濃度との関係についても検討し、以下の結論を得た。

1. 腎盂腎炎の発症は不完全尿管閉塞側腎では菌接種3日後までは29腎中18腎(62.1%)で、菌接種7日以降では、55腎中50腎(90.9%)に認められ、炎症の範囲も経時的に拡大した。一方非閉塞側でも腎盂腎炎の発症が認められたが、尿管閉塞側腎に比し、発症率は低く、炎症範囲も狭かった。組織学的観察では、菌接種3日後までは主に多核白血球が腎盂粘膜、一部腎髓質に浸潤した急性炎症が、また菌接種7日以降では小円形細胞浸潤を中心とした腎皮質まで達する慢性炎症所見が認められた。

2. 腎内生菌数は腎盂腎炎の程度をよく反映していた。

3. 腎内生菌数と膀胱尿中生菌数の間には有意の相関関係が認められた($p < 0.05$)。

4. 腎盂腎炎の認められたラットのD-アラビニトール/クレアチニン比は、腎盂腎炎が認められなかったものに比し高く、菌接種3日後までのラットでは $p < 0.01$ で、菌接種7日以降のラットでは $p < 0.05$ でいずれも有意差が認められた。一方、血清中マンナン抗原は、菌接種3日後までのラットにおいてのみ、有意の高値を示した($p < 0.05$)。

以上の所見より不完全尿管閉塞による尿路障害は、上行性カンジダ腎盂腎炎の発症を惹起する要因となり、尿中生菌数は腎

腎盂炎の程度を反映しているものと考えられる。血清中 D-アラビニトールは病期にかかわらず、またマンナン抗原は急性期のカンジダ腎盂腎炎の診断に有用であることを示唆している。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始、ご指導とご校閲を賜りました恩師久住治男教授および本学微生物学教室中村信一教授に深く感謝します。また本研究の遂行に当たり、直接ご指導いただいた大川光央助教授、ならびにご教示、ご助言をいただいた当教室徳永周二講師、本学微生物学教室山川清孝講師、および本学臨床検査部藤田信一講師に感謝します。さらに本研究においてご協力いただいた当教室員、ならびに微生物学教室員各位に感謝するとともに、病理標本作製に協力を惜しまれなかった田中耕一技官に感謝します。なお、本論文の要旨は第78回日本泌尿器科学会総会、第11回国際腎臓病学会総会、第22回国際泌尿器科学会総会および第65回日本感染症学会総会において発表した。また本研究の一部は文部省科学研究費一般研究B課題番号02454369の補助を受けたもので、付記して謝意を表する。

文 献

- 1) Ohkawa, M., Tokunaga, S., Takashima, M., Nishikawa, T., Hisazumi, H., Fujita, S. & Wheat, R. W.: In vitro susceptibility testing of *Candida* isolates from clinical specimens to four antifungal agents. *Chemotherapy*, **36**, 396-402 (1990).
- 2) Schönebeck, J.: Asymptomatic candiduria. Prognosis, complications and some other clinical considerations. *Scand. J. Urol. Nephrol.*, **6**, 136-146 (1972).
- 3) 大川光央, 徳永周二, 高島三洋, 久住治男: *Candida* 尿路感染症, ことに腎盂腎炎について. *泌尿紀要*, **37**, 969-974 (1991).
- 4) Adriano, S. M. & Schwarz, J.: Experimental moniliasis in mice. *Am. J. Pathol.*, **31**, 859-873 (1955).
- 5) Louria, D. B., Fallon, N. & Browne, H. G.: The influence of cortison on experimental fungus infections in mice. *J. Clin. Invest.*, **39**, 1435-1449 (1960).
- 6) Louria, D. B., Brayton, R. G. & Finkel, G.: Studies on the pathogenesis of experimental *Candida albicans* infections in mice. *Sabouraudia*, **2**, 271-283 (1963).
- 7) Hurley, R. & Winner, H. I.: Experimental renal moniliasis in the mouse. *J. Pathol. Bacteriol.*, **86**, 75-82 (1963).
- 8) Louria, D. B. & Finkel, G.: *Candida* pyelonephritis. In E. H. Kass (ed.), *Progress in Pyelonephritis*, 1st ed., p179-184, F. A. Davis Co., Philadelphia, 1965.
- 9) 塚田 修: マウスのカンジダ症に発生する片側性腎病変とその成因について. *日泌尿会誌*, **73**, 446-461 (1982).
- 10) Chmel, H. & Armstrong, D.: Experimental candidiasis: Pathogenesis and selological studies in rabbit model. *Infection*, **9**, 70-75 (1981).
- 11) Barnes, J. L., Osgood, R. W., Lee, J. C., King, R. D. & Stein, J. H.: Host-parasite interactions in the pathogenesis of experimental renal candidiasis. *Lab. Invest.*, **49**, 460-467 (1983).
- 12) Parkash, C., Chugh, T. D., Gupta, S. P. & Thanik, K. D.: *Candida* infection of urinary tract-an experimental study. *J. Assoc. Physicians India*, **18**, 497-502 (1970).
- 13) Hatala, M., Prát, V., Slugeň, I., Liška, M. & Konířková, L.: Experimental ascending candida infection in urinary way. *Cas. Lek. Cesk.*, **110**, 553-558 (1971).
- 14) 徳永周二: *Candida albicans* による上行性腎盂腎炎の実験的研究. *日泌尿会誌*, **74**, 683-697 (1983).
- 15) 押 正也: *Candida albicans* による実験的上行性腎盂腎炎. *日泌尿会誌*, **79**, 513-520 (1988).
- 16) 折戸松男: *Proteus mirabilis* による腎盂腎炎の化学療法に関する実験的研究. *日泌尿会誌*, **72**, 680-693 (1981).
- 17) 池田彰良: 不完全尿管閉塞による実験的水腎症に関する研究 (第1報). *日泌尿会誌*, **72**, 1056-1063 (1981).
- 18) Arana, J. A., Kozij, V. M. & Jackson, G. G.: Retrograde *E. coli* urinary tract infection in rats. *Arch. Pathol.*, **78**, 558-568 (1964).
- 19) Soyama, K. & Ono, E.: Enzymatic fluorometric method for the determination of D-arabinitol in serum by initial rate analysis. *Clin. Chim. Acta*, **149**, 149-154 (1985).
- 20) Wong, B., Bernard, E. M., Gold, J. W. M., Fong, D. & Armstrong, D.: The arabinitol appearance rate in laboratory animals and humans: Estimation from the arabinitol/creatinine ratio and relevance to the diagnosis of candidiasis. *J. Infect. Dis.*, **146**, 353-359 (1982).
- 21) Fujita, S., Maeno, K. & Soyama, K.: Mannan and D-arabinitol concentrations in serum from a patient with *Candida albicans* endocarditis. *Mycopathologia*, **105**, 87-92 (1989).
- 22) Tennant, F. S. Jr., Remmers, A. R. Jr. & Perry, J. E.: Primary renal candidiasis. *Arch. Intern. Med.*, **122**, 435-440 (1968).
- 23) Schönebeck, J. & Winblad, B.: Primary renal candida infection. *Scand. J. Urol. Nephrol.*, **5**, 281-284 (1971).
- 24) Lehner, T. & Lond, M. B.: Systemic candidiasis and renal involvement. *Lancet*, **1**, 1414-1416 (1964).
- 25) Schönebeck, J. & Ånséhn, S.: The occurrence of yeastlike fungi in the urine under normal conditions in various types of urinary tract pathology. *Scand. J. Urol. Nephrol.*, **6**, 123-128 (1972).
- 26) Knepshild, J. H., Feller, H. A. & Leb, D. E.: Papillary necrosis due to *Candida albicans* in a renal allograft. *Arch. Intern. Med.*, **122**, 441-444 (1968).
- 27) Beilke, M. A. & Kirmani, N.: *Candida* pyelonephritis complicated by fungaemia in obstructive uropathy. *Br. J. Urol.*, **62**, 7-10 (1988).
- 28) Tomashefski, J. F. & Abramowsky, C. R.: *Candida*-associated renal papillary necrosis. *Am. J. Clin. Pathol.*, **75**, 190-194 (1981).
- 29) 中嶋孝夫: 実験的上行性腎盂腎炎・光学顕微鏡, 走査型電子顕微鏡および透過型電子顕微鏡による観察. *日泌尿会誌*, **75**, 1359-1371 (1984).
- 30) Fierer, J., Talner, L. & Braude, A. I.: Bacteremia in the pathogenesis of retrograde *E. coli* pyelonephritis in the rat. *Am. J. Pathol.*, **64**, 443-456 (1971).
- 31) Heptinstall, R. H.: Experimental pyelonephritis: Bacteriological and morphological studies on the ascending

- route of infection in the rat. *Nephron*, **1**, 73-92 (1964).
- 32) Michigan, S.: Genitourinary fungal infections (review article). *J. Urol.*, **116**, 390-397 (1976).
- 33) Kozinn, P. J. & Taschdjian, C. L.: *Candida albicans*: Saprophyte or pathogen? A diagnostic guide line. *J. A. M. A.*, **198**, 190-192 (1966).
- 34) Winner, H. I.: A study of *Candida albicans* agglutinins in human sera. *J. Hyg.*, **53**, 509-512 (1959).
- 35) Chilgren, R. A., Hong, R. & Quie, P. G.: Human serum interaction with *Candida albicans*. *J. Immunol.*, **101**, 128-132 (1968).
- 36) Filice, G., Yu, B. & Armstrong, D.: Immunodiffusion and agglutination test for *Candida* in patients with neoplastic disease: Inconsistent correlation of results with invasive infections. *J. Infect. Dis.*, **135**, 349-357 (1977).
- 37) 稲垣正義, 松村万喜子, 森 健, 池本秀雄, 渡部晶子: 抗体検出法—HA テスト. *臨床と微生物*, **17**, 288-290 (1990).
- 38) 高木宏治, 澤枝義郎: 血液疾患患者における抗カンジダ抗体価 (HA テスト) の検討. *臨床と微生物*, **17**, 291-293 (1990).
- 39) Fujita, S., Matsubara, F. & Matsuda, T.: Enzyme-linked immunosorbent assay measurement of fluctuations in antibody titer and antigenemia in cancer patients with and without candidiasis. *J. Clin. Microbiol.*, **23**, 568-575 (1986).
- 40) 羽山正義, 稲葉 鋭, 発地雅夫, 亀子光明: カンジダ症における血中抗体の ELISA 法における検出. *臨床と微生物*, **17**, 295-298 (1990).
- 41) Ohkawa, M., Tokunaga, S., Shoda, R. & Hisazumi, H.: Clinical significance of the antibody-coated bacteria test in patients with candiduria. *Br. J. Urol.*, **66**, 22-25 (1990).
- 42) Shaffer, P. J., Medoff, G. & Kobayashi, G. S.: New directions in diagnosis and treatment of fungus infections. In L. Weinstein & B. N. Fiels (eds.), *Seminor in Infectious Disease*, Vol. II, 1st ed., p193-216, Stratton Intercontinental Medical Book Co., New York, 1979.
- 43) Kiehn, T. E., Bernard, E. M., Gold, J. W. M. & Armstrong, D.: Candidiasis: Detection by gas-liquid chromatography of β -arabinitol, a fungal metabolite, in human serum. *Science*, **206**, 577-580 (1979).
- 44) Warren, R. C., Bartlett, A., Bidwell, D. E., Richardson, M. D., Voller, A. & white, L. O.: Diagnosis of invasive candidiasis by enzyme immunoassay for serum antigen. *Br. Med. J.*, **1**, 1183-1185 (1977).
- 45) 鈴木 宏, 中村 明, 田口英昭, 西村和子, 宮治 誠: Avidin-biotin 系を用いた enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法による血中カンジダ抗原の検出法, 第1報, 基礎的検討. *感染症誌*, **60**, 336-344 (1986).
- 46) Tokunaga, S., Ohkawa, M., Takashima, M. & Hisazumi, H.: Clinical significance of measurement of serum β -arabinitol levels in candiduria patients. *Urol. Int.*, in press.
- 47) Ohkawa, M. & Tokunaga, S.: Clinical significance of candiduria: An update. *Int. Urogynecol. J.*, in press.
- 48) 鈴木 宏, 中村 明: Avidin-biotin-amplified ELISA による抗原検出法. *臨床と微生物*, **17**, 279-287 (1990).
- 49) Suzuki, M. & Fukazawa, Y.: Immunochemical characterization of *Candida albicans* cell wall antigens: Specific determinant of *Candida albicans* serotype A mannan. *Microbiol. Immunol.*, **26**, 387-402 (1982).

