

感染結石における結石内細菌と結石構築について

滋賀医科大学医学部泌尿器科学教室（主任：友吉唯夫教授）

竹内 秀雄・小西 平

高山 秀則・友吉 唯夫

京都大学医学部泌尿器科学教室（主任：吉田 修教授）

岡田 裕作・桐山 啓夫・吉田 修

BACTERIOLOGICAL AND ARCHITECTURAL STUDIES OF INFECTION STONES

Hideo TAKEUCHI, Taira KONISHI,

Hidenori TAKAYAMA and Tadao TOMOYOSHI

From the Department of Urology, Shiga University of Medical Science

(Director: Prof. T. Tomoyoshi)

Yusaku OKADA, Tadao KIRIYAMA and Osamu YOSHIDA

From the Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyoto University

(Director: Prof. O. Yoshida)

The stones associated with urinary tract infection were cultured using a method to distinguish between surface contamination and bacteria within the stone. Twenty three of 30 stones (77%) were infected mainly by *Proteus mirabilis* or *Pseudomonas aeruginosa* and most were composed of struvite and/or apatite. Most oxalate and uric acid stones were sterile; occasionally the stones with positive culture had a non-urea-splitting bacteria and these were thought to have been infected secondarily.

Some infected stones were studied by light microscopy scanning electron microscopy and transmission electron microscopy. We found many rods in the interstices of crystals of struvite and apatite extensively from the nucleus to peripheral layers.

These findings are important in the prevention and treatment of infection stones.

Key words: Urinary stone, Bacteria, Architecture, Urinary tract infection

緒 言

感染結石 “infection stone” の定義は、まだ明確でないが、一般には尿路感染と密接に関係している結石とされている¹⁻³⁾。この感染結石は結石全体の約15～20%を占め^{1,2)}、結石除去後も再発しやすく、また尿路感染もきわめて難治であり、臨床上重要な問題となっている。

そこで今回われわれは感染結石の形成増大において細菌がどのようにかかわっているかを調べるため、手術的に得られた結石について、結石内細菌の培養および細菌の局在を結石構築との関係において検討し、感

染結石の特徴をよりあきらかにせんと試みた。

対象および方法

対象患者は滋賀医科大学および京都大学の泌尿器科入院患者で、尿路感染（膀胱尿の細菌培養にて菌数 $10^4/\text{ml}$ 以上、一部 $10^3/\text{ml}$ でも膿尿の著明のものを含む）をとまなう結石患者で、手術施行症例につき結石内細菌の培養および結石成分の分析をおこなった。そして、さらにリン酸塩で、結石培養陽性のものを選び、その一部についてX線撮影、薄切標本での検鏡や走査電顕および透過電顕での観察などより結石内細菌の局在および結石構築を調べた。なお、対象患者はほ

とんどすべて術前なんらかの抗生剤投与をうけていた。

摘出された結石は無菌的に割り、一部を培養に供し、一部は成分分析に供した。結石内細菌の培養は Fig. 1 のごとくにおこない、成分分析は赤外線分光分析にておこなった。また X 線撮影は超軟 X 線装置 (CMB-2 ソフテックス) にて撮影し、結石薄切標本作成は日本地科学社 (京都) にて約 60 μ の切片を作り、PAS 染色をおこなった。結石の走査型電子顕

微鏡 (SEM) の標本は自然乾燥またはグルタルアルデヒド固定をおこない、アルコール系列脱水後、臨界点乾燥したのち、金パラジウムのイオンコーティングを経て、走査電顕 (日立 S-900 型) にて観察した。

透過型電顕用標本はグルタルアルデヒド、オスミウム酸の二重固定後、アルコール系列にて脱水、エボン 812 に包埋、薄切後、鉛、ウラニウムの二重染色、日立 H-500 型電顕にて観察した。

結 果

I. 結石培養について

対象患者30人の内訳は Table 1 のごとく男9人、女21人で、男女比1:2.3となり、年齢は1~81歳、平均48歳で、腎結石22例、尿管結石1例、膀胱結石7例であった。腎結石での男女比は1:9と圧倒的に女が多く、また膀胱結石は男子に多かった。手術は切石術がほとんどであるが、無機能腎5例は腎摘をおこない、うち3例は黄色肉芽腫性病変をとまっていた。

膀胱尿および結石内の細菌培養の結果は、Table 2 のごとくで、膀胱尿では、*Proteus mirabilis*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Streptococcus faecalis* が多くみられた。結石培養では30例中23例 (77%) が陽性で、菌種は *Proteus mirabilis* が23例中13例 (57%) ともっとも多く、ついで *Pseudomonas* がみられた。結石培養陽性例のうち膀胱尿の培養検出菌との不一致例は6例にみられた。2種以上の複数菌感染は膀胱尿で4例、結石培養では *Pseudomonas* と *Alkaligenes* との1例がみられた。

結石成分は Table 3 のとおりで、尿路感染をとまなかった結石は、ほとんどリン酸マグネシウムアンモニ

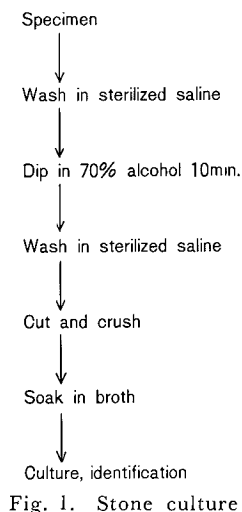


Fig. 1. Stone culture

Table 1. Infected urinary stones

	male	female	total
Kidney	3	19	22
Ureter	1	0	1
Bladder	5	2	7
	9	21	30

Table 2. Isolated bacteria

Urine		Stone	
<i>Proteus mirabilis</i>	11	<i>Proteus mirabilis</i>	13
<i>vulgaris</i>	1	<i>morganii</i>	1
<i>morganii</i>	2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
<i>E. coli</i>	7	<i>E. coli</i>	2
<i>Enterobacter cloacae</i>	5	<i>Citrobacter freundii</i>	1
<i>Citrobacter freundii</i>	1	<i>Alcaligenes faecalis</i>	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	<i>Streptococcus faecalis</i>	1
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	<i>Bacillus</i> sp.	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	total	24
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2		
<i>Streptococcus faecalis</i>	4		
total	37		

Table 3. Composition and culture of the infected stones

Magnesium ammonium phosphate	9	(9)
+ Calcium phosphate	3	(3)
+ Calcium oxalate	2	(0)
Calcium phosphate	9	(7)
+ Calcium oxalate	2	(2)
+ Ammonium acid urate	1	(1)
Calcium oxalate	1	(0)
Uric acid	2	(1)
Cystine	1	(0)
	30	(23)

(): positive stone culture

ウム (MAP) またはリン酸カルシウム (CaP) を主成分とし、蓚酸カルシウム結石 (CaOX) は少数であった。結石培養と成分との関係では、MAP 主成分の結石は14例中12例が培養陽性で、CaP 主成分の結石は12例中10例が陽性であった。CaOX 含有結石は5例中2例が陽性で、いずれも CaP との混合結石であった。尿素分解細菌との関係でみると、培養陽性例23例中18例に *Proteus*, *Pseudomonas* などの尿素分解細菌が検出され、成分は全例 MAP または CaP が主成分であり、*E. coli* や *Streptococcus* などの非尿素分解細菌の同定された5例の成分は CaP 3例、CaOX 1例、尿酸1例であった。また軟結石の合併は3例にみられ、結晶成分は MAP または CaP で、*Proteus mirabilis* が同定された。なお膀胱尿の細菌培養陰性の症例で試みに結石培養をおこなったところ、CaOX 5例、CaP 3例、UA 1例はすべて陰性であった。

II. 感染結石の構築について

a. 膀胱結石例：

MAP が主成分で、結石培養では *Pseudomonas aeruginosa* が同定された膀胱結石の構築を調べた。この結石の剖面は層構造を示し、内部は湿潤で悪臭を有し、一部の層は青紫色に変色していた。この結石のX線像 (厚さ約 1 cm に切断撮影したもの) は Fig. 2 のごとくで、結石の中心部は2つの核よりなり、これを取りまく比較的密な内層部と比較的疎な外層部よりなっている。薄切標本の PAS 染色での観察では、核部は比較的有機成分が多く赤紫色に染まり、無染色の MAP と思われる結晶成分を含んでおり (Fig. 3A)、その2つの核を取りかこむ内層は比較的結晶成分が多く、結晶間隙には PAS 陽性の有機成分が入りこんでいる。外層部はこれと逆に有機成分の部分の方

が多くみられた。強拡大で観察したところ、外層部および核部の結晶間隙に PAS 陽性の赤紫色に染まった無数の桿菌が見い出された (Fig. 3B)。さらにこの部を SEM にて調べると黒く偏平な MAP (struvite) の結晶と CaP (apatite) の球形および不整形の結晶があり (結晶形態と成分の関係は別に electron probe microanalysis で確認した)、この apatite の表面に丁度桿菌の形に相当する鋳型が多数みられた (Fig. 4)。しかし菌体そのものはほとんど認められなかった。

b. 腎サンゴ状結石：

サンゴ状結石のX線像は膀胱結石と同様に、核部をとりまき層構造をとって発育している。Fig. 5の腎結石の核部は不整形で腎盂内にあり、腎盂腎杯へ層構造をとりつつ樹枝状に発育している。核部と外層部とのX線像の違いより成分が異なることが推察され、調べたところ、核部は CaOX で、外層部は MAP および CaP であった。他にいくつかの結石についても調べたが、核部が腎杯にあるもの、2つの核をもつもの、核部と外層部の成分の同じもの、異なるものなどさまざまな結石が見いだされた。

腎結石の薄切標本での観察では膀胱結石と同様で、結晶成分と PAS 陽性の有機成分とが層状に配列し、一部には尿酸あるいは蓚酸の結晶と混じて形成されているものもみられた (Fig. 6)。

SEM での観察では、結晶構築はほぼ膀胱結石と同様で、細菌のぬけた鋳型も多数みられた。Fig. 7は *Proteus mirabilis* が同定された腎結石の核部分のもので、多数の桿菌が集落を形成し、あたかも増殖しているようであった。また結石内の有機成分の形態をグルタルアルデヒド固定により観察すると、結晶と結晶の間を相互につないでいる線維様のものがみられ (Fig. 8A)、さらに有機成分の豊富なところはちょうどくもの巣をはりめぐらしたような形で線維状の有機成分がみられ、内部には赤血球もみられた (Fig. 8B)。

c. 軟結石：

軟結石の構造も Fig. 9 のごとく層構造をとり、結晶成分の比較的多い層と細菌、白血球などの有機成分の多い層がみられたが、全体的には結晶成分はわずかであった。Fig. 10は透過電顕でみたものであるが、細菌、白血球、破壊遊離した細胞成分、膜構造その他の有機物が密につまっております。有機性基質 organic matrix の本態をよく示している。

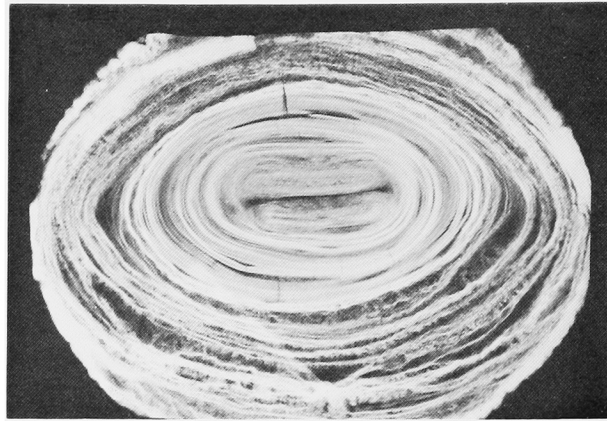
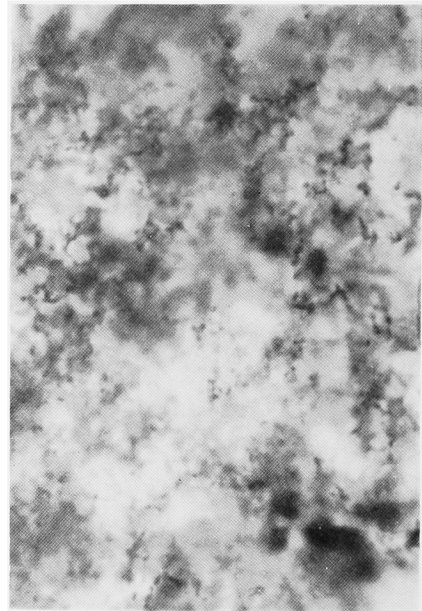


Fig. 2. Roentgenograph of a bladder stone shows laminal structure surrounding two nuclei



A. Nucleus ($\times 40$)



B. Bacteria ($\times 1,000$)

Fig. 3. A thin section of a bladder stone (PAS stain)

考 察

感染結石（リン酸塩結石）の形成は尿路感染とくに *Proteus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* などの尿素分解細菌による尿性状の変化，すなわち，尿のアルカリ化，アンモニウムイオン NH_4^+ および炭酸イオン HCO_3^- の増加により，リン酸マグネシウムアンモニウム (MAP, struvite) およびリン酸カルシウム (CaP, carbonate apatite) の結晶が析出するためとされる^{1, 3)}。感染結石の治療および予防を考えると，尿および結石の細菌学的検索はとくに重要であるが，尿培養

はともかく結石培養は一般にはほとんどおこなわれていない。これまで結石内での細菌の存在，結石培養についての報告はいくらかなされている^{2, 4-6)} が，結石構築との関係をとのべたものはほとんどみられない。また結石内部の微細構造の観察は近年走査電顕の発達とともに数多くの報告があるが⁶⁻⁹⁾，結石内の細菌の局在，菌体の確認の報告はみられないようである。Cifuentes Delatte and Santos⁶⁾ や Dorsch and Koestel⁸⁾ は結晶面に残された細菌の鋳型は見いだしているが，菌体自体は見られなかったと報告している。

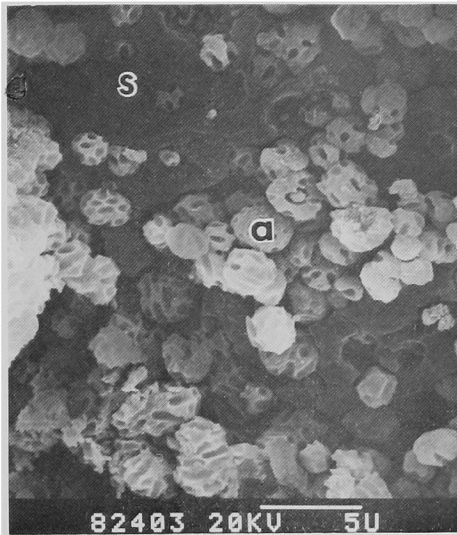


Fig. 4. A scanning electron micrograph of a bladder stone, composed of struvite (s) and apatite (a). Note impression of bacteria on surfaces of apatite crystals

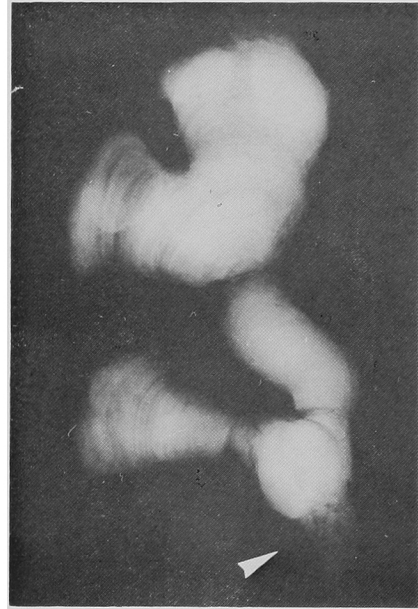


Fig. 5. Roentgenograph of a staghorn calculi shows laminal structure of peripheral layers and irregular structure of nucleus (arrow)



Fig. 6. A thin section of peripheral layer of a renal stone. (PAS stain, polarized light, $\times 40$). Arrows point birefringent layers

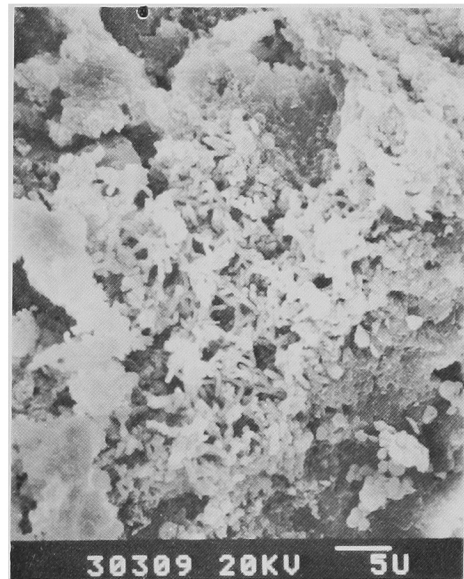


Fig. 7. A scanning electron micrograph of nuclei of a staghorn calculi. Note large numbers of rods of the size and shape of bacteria

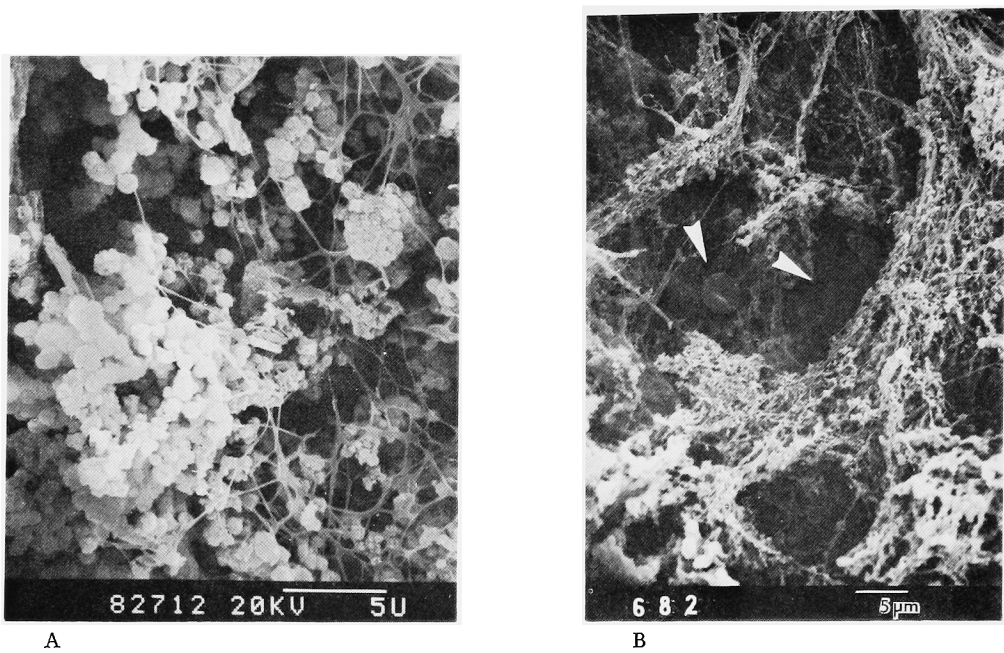


Fig. 8. A scanning electron micrograph of an infection stone. A, organic matter binding apatite crystals. B, large amount of organic substance and red blood cells (arrows).

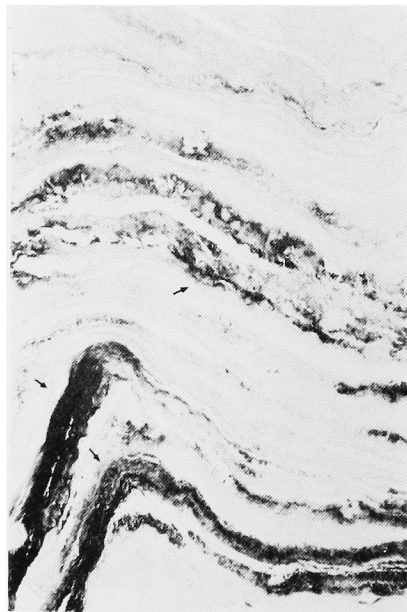


Fig. 9. A thin section of matrix stone shows laminal structure. Arrows point calcified layers. (HE stain, $\times 40$)

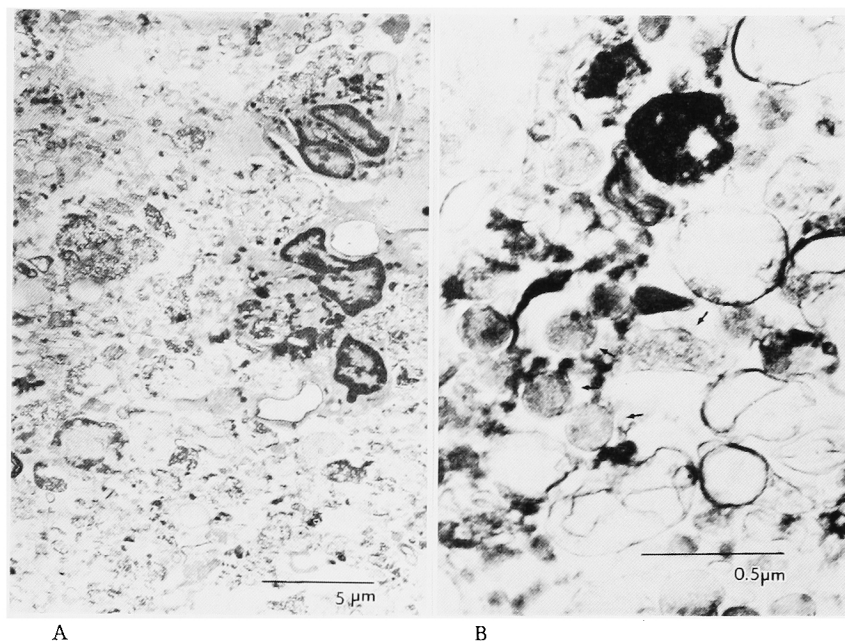


Fig. 10. Transmission electron micrograph of a matrix stone.
A, white blood cells and large amount of organic substance
B, bacteria (arrows)

そこでわれわれは膀胱尿が感染をしめしている結石患者を対象とし、結石内細菌の培養をおこない、結石成分との関係を調べ、また一部の結石培養陽性のリン酸塩結石については、さらに細菌の局在と結石構築を検討した。結石培養の方法は Nemoy and Stamey の方法²⁾ とやや異なり、結石表面の汚染、細菌混入を防ぐためアルコール消毒をおこなった。したがってアルコールの結石内浸透の関係で、ごく表層の部分の細菌は表面のものとともに殺菌されている可能性があり、結石内の比較的深い部分の培養をしていることになるかもしれない。その方法の結果、対象患者30例中23例が培養陽性で、菌種は *Proteus mirabilis* がもっとも多く、ついで *Pseudomonas* と、尿素分解細菌が18例にみられ、感染結石との密接な関係が裏づけされた。Thompson ら⁴⁾ の報告もほぼ同様であるが、これらの報告では結石培養で *Proteus mirabilis* と他の菌種の複数菌感染の例が多く、これは培養方法および対象患者の相違によるかと思われる。また膀胱尿と結石培養の菌種の関係であるが、不一致例が6例にみられたが、これは結石培養の菌種が膀胱尿にも実際は存在するが菌数が少なく除外された可能性、結石培養の方法の問題、抗生剤投与による菌交代の可能性などが考えられる。したがって膀胱尿の培養のみで同一菌種が結石内にあると推定するには問題がある。しかし尿

培養にて *Proteus mirabilis* が認められた例はほとんどの例で結石内にも *Proteus mirabilis* が存在しており、この場合はまず問題ないであろう。

結石成分との関係では *Proteus*, *Pseudomonas* の認められた結石はすべて MAP または CaP を主成分とする結石で、*E. coli* や *Streptococcus* などの非尿素分解細菌の培養された結石は UA, CaP, CaOX などであった。成分分析には赤外線分光分析を用いたため CaP が hydroxy apatite か carbonate apatite か不明であるが、前者の尿素分解細菌がみられた CaP の場合には carbonate apatite、後者の CaP は hydroxy apatite と思われる。また結石培養陰性のものはシスチン, UA, CaOX, CaP など、結石表面に細菌が付着していても内部には存在せず、すなわち結石があるところに二次的に感染が加わった可能性が考えられる。とくにシスチンや蔞酸カルシウム(1水化物)の場合その緻密な構造より考え、まず結石内には細菌は存在しないと思われる。以上の結石培養および結石成分などの結果より感染結石 infection stone は Thompson and Stamey⁴⁾ も述べているごとく

infection stone
infected stone (真の感染結石)
(広義の感染結石) secondarily infected stone
(二次感染結石)

にわけて考える必要がある。

つぎに、感染結石の構築であるが、X線撮影や薄切標本でみると、MAP や CaP の結晶成分とPAS 陽性の mucoprotein と思われる有機成分が、密にあるいは疎に結合し、核部より周辺まで層構造をとっている。これは UA, シスチン, CaOX (とくに1水化物) などでは結晶成分がほとんど全体を占め、層構造もあまりみられないことと比較して、結石形成増大の観点より興味深い。また軟結石は有機成分が多く、感染結石のひとつの極端なものと考えられる。結石内の細菌は核部より周辺まで広範囲に存在し、少なくとも一部は生きており、とくに有機物の多い、また CaP の比較的豊富な結晶の間隙にあり、この空洞は尿で満たされていると考えられるが、この中を自由に遊泳し、増殖し、代謝活動も活発であると推定される。したがって結石の増大は周辺よりおこっているが、結石内部においても細菌による尿性状の変化にてMAP や CaP の結晶形成がおこり、内部構築も時間的に変化しているものと考えられる。これはちょうど海中におけるサンゴとサンゴ虫の関係を思わせ、感染結石は生きている結石 living stone といえるかもしれない。また結石内に赤血球がそのままの状態が存在していることは赤血球の尿中での寿命にも関係するが、結石形成の速度が速いこと、結石内部の状態が血球形態保持に好条件であると推察される。なお赤血球が結石内にみられるとの報告はないようである。

走査電顕での観察にて apatite の結晶表面にみられる細菌の鋳型の形成機序は不明である。Cifuentes Delatte and Santos⁶⁾も述べているごとく、鋳型に入っている細菌が走査電顕のための前処置の段階で飛び散ったためと思われるが、核部や外層部の一部に菌体そのものも残っており、細菌と結晶の固着の問題と思われる。そして鋳型そのものは結石が体内にあるときから形成されているものでなく、むしろ体外に摘出され、乾燥される段階で apatite の析出とともに菌体が封入固定されるためかと思われる。

今後、さらに感染結石の構築について詳細に検討する予定であるが、本研究を進めれば感染結石の形成増大および予防や治療に関し重要な所見が得られることと考えられる。

結 語

感染結石 infection stone の特徴を調べるため結石内細菌と構築につき検討した。

1) 尿路感染をともなった結石30例につき結石内細菌培養をおこなった。30例中23例(77%)が培養陽性

で、菌種として *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* などの尿素分解細菌が多かった。

2) 培養陽性例の結石成分ではリン酸マグネシウムアンモニウムまたはリン酸カルシウムが多く、陰性例は尿酸カルシウム、尿酸、シスチンなどであった。

3) 結石内の細菌は核部より周辺まで広範囲の、リン酸マグネシウムアンモニウムやリン酸カルシウムの結晶間隙の有機物の多いところに見られた。

4) 以上より感染結石 infection stone は狭義の意味では尿酸結石や尿酸結石などに二次的に感染した secondarily infected stone と区別すべきであると考えられた。すなわち感染結石はリン酸塩よりなり、結石内に尿素分解細菌が生存する結石と定義するのが妥当と思われる。

5) 結石内の細菌の生存は感染結石の治療および予防に重要な事柄と考えられる。

稿を終るにあたり本研究に御協力をいただきました京都微生物研究所臼井 通氏に深謝いたします。

本論文の要旨の一部は第70回日本泌尿器科総会において発表した。

文 献

- 1) Resnick MI : Evaluation and management of infection stones. *Urologic Clinics of North America* 8: 265~276, 1981
- 2) Nemoy NJ and Stamey TA : Surgical, bacteriological, and biochemical management of "Infection stones" *JAMA* 215: 1470~1476, 1971
- 3) Griffith DP: Struvite stones. *Kidney International* 13: 372~382, 1978
- 4) Thompson RB and Stamey TA: Bacteriology of infected stones. *Urology* 2: 627 ~ 633, 1973
- 5) Hellström J: The significance of staphylococci in the development and treatment of renal and ureteral stones. *Brit J Urol* 10: 348~372, 1938
- 6) Cifuentes Delatte L and Santos M: Calcified bacteria in renal stones; electron-microscopic aspects. *Eur Urol* 3: 96~99, 1977
- 7) Meyer AS, Finlayson B and Dubeis L: Direct observation of urinary stone ultrastructure. *Brit J Urol* 43: 154~163, 1971
- 8) Dosch W and Koestel C: Rasterelektrone-

- mikroskopie von Harnsteinen. Z Urol **68** : structural study of apatites in human urinary
24~41, 1975 calculi. Calcif Tissue Int **31**: 93~108, 1980
- 9) Santos M and Gonzalez-Diaz PF : Ultra- (1983年9月8日受付)