

Ureaplasma urealyticum による実験的膀胱結石

滋賀医科大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 友吉唯夫教授)
新井 豊, 竹内 秀雄*, 岡田 裕作**, 友吉 唯夫

EXPERIMENTAL BLADDER STONE PRODUCTION BY *UREAPLASMA UREALYTICUM*

Yutaka ARAI, Hideo TAKEUCHI, Yusaku OKADA and Tadao TOMOYOSHI
From the Department of Urology, Shiga University of Medical Science

We examined the relationship between struvite stone formation and *Ureaplasma urealyticum* in male Wistar rats by inoculating *U. urealyticum* and implanting a zinc disc into the bladder surgically. Cultures of *U. urealyticum* and pH measurements in urine obtained by forced urination were done on days 2 and 6 after operation. Half of the rats were killed 7 days after the operation and the remaining half 14 days after the operation. A total of 46 rats, consisting of 10 rats in the control group and 36 rats inoculated with *U. urealyticum*, were studied.

U. urealyticum was weakly virulent, because it was not detected in the urine culture on day 2 in 10 of the 36 rats inoculated with the organism, and showed a tendency towards spontaneous elimination in the other rats. Urinary pH was elevated slightly by the presence of *U. urealyticum*. Struvite stones were formed in 52% of the rats by the inoculation of *U. urealyticum*, and 69% and 71% of the positive rats in urine culture for *U. urealyticum* on day 2 and day 6 respectively. The stones tended to be larger the longer *U. urealyticum* was detected in urine. *U. urealyticum* may play a role in struvite stone formation, but not a major role.

(Acta Urol. Jpn. 42 : 729-734, 1996)

Key words: *Ureaplasma urealyticum*, Experimental bladder stone

緒 言

感染結石は, *Proteus* 属に代表される尿素分解細菌による尿路の感染によって発生増大する, すなわち, 細菌の産生するウレアーゼにより尿素が分解され, 尿のアルカリ化, アンモニウムイオンおよび炭酸イオンの尿中増加により, リン酸マグネシウムアンモニウムやカーボネートアパタイトなどの結石が形成されると考えられている¹⁾ しかし臨床的には感染結石であるのに, 尿や結石内より尿素分解細菌が分離されない症例が少なからずみられる²⁾ これは抗生剤使用の影響等も考えられるが, 従来の腸内細菌を対象としたルーチンの尿培養では分離できない微生物が感染結石の原因菌である可能性も考えられる。

Ureaplasma urealyticum (以下, *U. urealyticum* と略す) は, *Mycoplasmataceae* (科) の *Ureaplasma* 属に属し, ヒトから分離されるものの一種である。そして *U. urealyticum* は, 名前のごとくウレアーゼ活性を有し, 尿素を必須栄養源としている。この菌は非淋菌性尿道炎や男性不妊の患者よりしばしば分離され, その

病原的意義についての報告がみられる^{3,4)} また時に尿路結石患者からも分離されるとの報告があり⁵⁻⁷⁾, さらに *U. urealyticum* と感染結石の関連について基礎的実験も報告されている⁸⁻¹⁰⁾ 今回われわれは *U. urealyticum* による尿路感染と尿路結石形成についてラットを用いて実験したので報告する。

方 法

富山医科薬科大学より分与をうけた *U. urealyticum* (T-960) を実験に用いた。この菌を Taylor-Robinson 液体培地にて 37°C で12時間好気培養した。体重約 200 g のウィスター系雄ラットを用い, ネンブタール腹腔内麻酔下にて下腹部正中切開にてラットの膀胱を露出した。膀胱を頂部で切開して亜鉛リング1個を挿入し, さらに 10^7 colour changing units (CCU)/ml の *U. urealyticum* 菌液を 0.1 ml 直接膀胱に注入し, 膀胱を閉じた。そして腹筋および皮膚を縫合した。術後30分間尿道をクランプし, 術後2時間後より水分摂取を開始した。*U. urealyticum* 感染成立を確認するために術後2日目, 6日目に強制排尿させ, 尿中の *U. urealyticum* 培養および尿 pH を調べた。ラットの半数を7日目に, 残りを14日目に屠殺し, 尿路の観察, 膀胱結石の有無および結石重量, 尿 pH, さらにBUN,

* 現: 神戸市立中央市民病院泌尿器科

** 現: 京都大学医学部泌尿器科学教室

血清クレアチニンを調べ、また尿中 *U. urealyticum* の培養を試みた。また対照群として、同じ方法で膀胱に同じ亜鉛リングを挿入し、Taylor-Robinson 液体培地のみ 0.1 ml 膀胱内に注入したラットを作成した。なお尿中 *U. urealyticum* の培養は Taylor-Robinson 液体培地を用いて定性検査のみをおこない、また尿 pH は東洋ろ紙社の pH 試験紙を使用した。ラットは代謝ゲージにて飼育し、餌は日本クレア社の CE-2 を与え、水分は水道水を自由摂取とした。創感染や、屠殺時の尿培養にて細菌感染があったラットは集計より除外し、*U. urealyticum* 接種群ラット36匹および対照群ラット10匹について検討した。

結 果

1) *U. urealyticum* 接種ラットの尿中 *U. urealyticum* 分離の頻度および尿 pH について

U. urealyticum 接種ラットの尿中 *U. urealyticum* の経時的培養により、36匹中、術後2日目で26匹は尿より *U. urealyticum* が分離されたが、10匹はすでに陰性であった。術後2日目陽性26匹のうち6日目には14匹が引続き *U. urealyticum* 陽性であったが、12匹は陰性で

あった。さらに術後6日目陽性ラット6匹を術後7日目に屠殺したが、そのとき採取された膀胱尿では2匹が陽性で4匹は陰性であった。また術後6日目陽性の残りのラット8匹も14日目の屠殺時にはすべて陰性であった。このように *U. urealyticum* の尿中よりの自然消失傾向が強かった (Fig. 1)。なお、*U. urealyticum* 培養陰性ラットは、その後の尿培養にて *U. urealyticum* が陽性になることはみられなかった。また、*U. urealyticum* 接種ラットの術後2、6日目および屠殺時の尿 pH の経時的变化を *U. urealyticum* 分離の有無別に Fig. 2 に示す。尿培養にて *U. urealyticum* 陽性でも、著しい尿 pH の上昇はみられなかった。しかし、術後6日目、7日目の尿培養で *U. urealyticum* 陽性ラットは、同時期の陰性ラットと比較すると軽度の尿 pH の上昇がみられた。

2) *U. urealyticum* 感染と膀胱結石形成について

U. urealyticum 感染と結石形成の関連をより明らかにするため、術後2、6日目の尿 *U. urealyticum* 培養の結果に基づいて、ラットを Fig. 3 のように3群に分類した。すなわち2日目 *U. urealyticum* 陰性のラット10匹を第1群、*U. urealyticum* が2日目陽性で6日

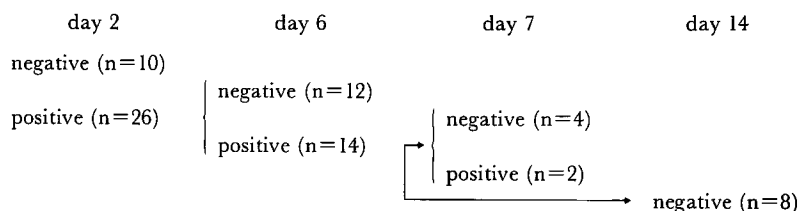


Fig. 1. Serial changes in urine culture for *U. urealyticum*.

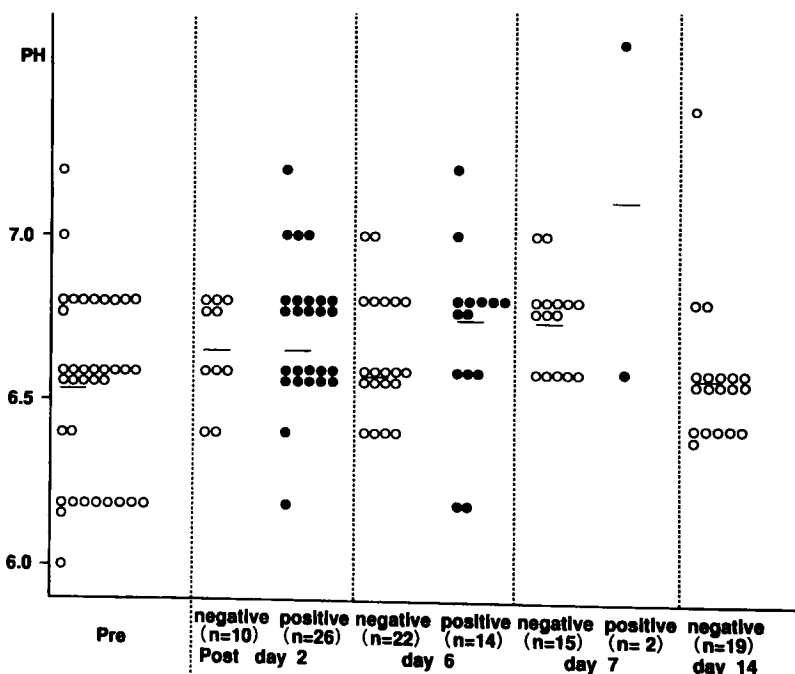


Fig. 2. Serial changes in the urinary pH of rats after inoculation of *U. urealyticum*.

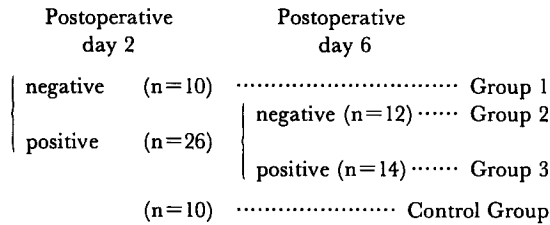


Fig. 3. Grouping of rats according to the results of urine culture of *U. urealyticum*.

目陰性の12匹を第2群, そして6日目も陽性のもの14匹を第3群とした。そして10匹の対照群の計4群間で膀胱結石形成について比較検討した。

各群別の膀胱結石形成の頻度および結石重量をFig. 4に示す。コントロール群ラットでは7日目, 14日目でも膀胱結石形成が見られなかった。第1群では14日目で1匹のラットの垂鉛リングにきわめて微量の結石の付着があったのみであった。第2群ラットでは7日目で6匹中4匹に膀胱結石形成があり結石の平均重量は4.5 mg, 14日目には6匹中4匹に結石形成があり平均重量は11.2 mgであった。また第3群では7日目で6匹中4匹に結石形成があり平均重量8 mg, 14日目で8匹中6匹に結石がみられ平均重量は

13.4 mgであった。これらの膀胱結石は赤外線分光分析より, いずれもリン酸マグネシウムアンモニウムであった (Fig. 5, 6)。

屠殺時の尿路の観察では, 比較的膀胱結石が大きいラットでは尿管の拡張がみられた。膀胱結石形成の有無に関係なく, すべてのラットでBUN, クレアチニンの上昇はみられなかった。また腎にも膿瘍形成をみたラットは1匹もみられず, また腎盂内にも結石形成は認められなかった。ラット膀胱の組織学的検索では, 結石形成ラットに軽度の炎症所見がみられるのみであった。

考 察

臨床において, 尿路結石を有する患者の尿や結石内よりさまざまな細菌が分離される。感染結石成立には, 尿中の尿素分解細菌が関与し, 各細菌のウレアーゼ活性の強いことが重要である。われわれはこれまでおもな細菌のウレアーゼ活性および感染結石形成について *in vitro* で実験し報告してきた¹¹⁾

1974年, Friedlander と Braude がラットを用い, *U. urealyticum* を接種し膀胱にリン酸マグネシウムアンモニウム結石を作成し, はじめて *U. urealyticum* が

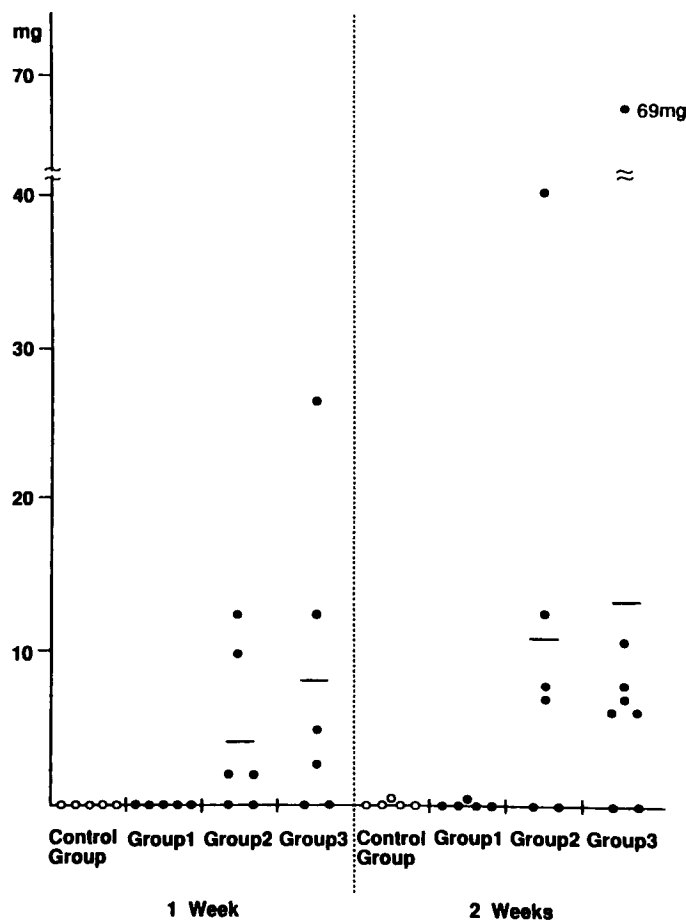


Fig. 4. Weight of bladder stones according to the groups and day of death.

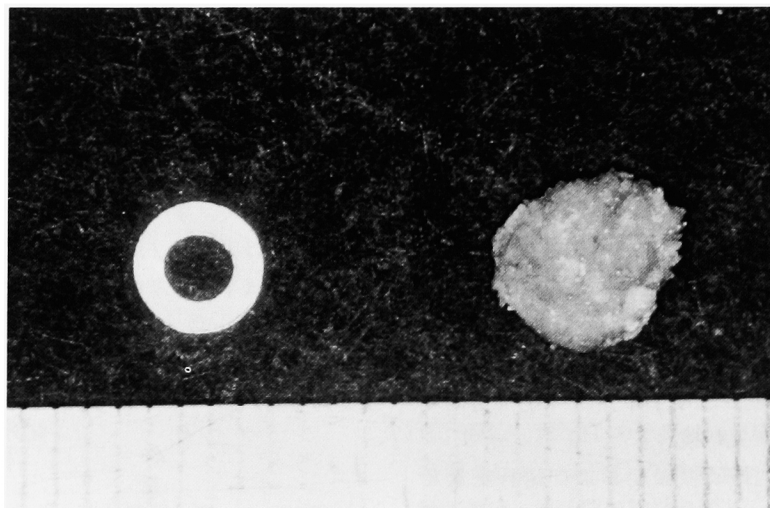


Fig. 5. Zinc ring and bladder stone.

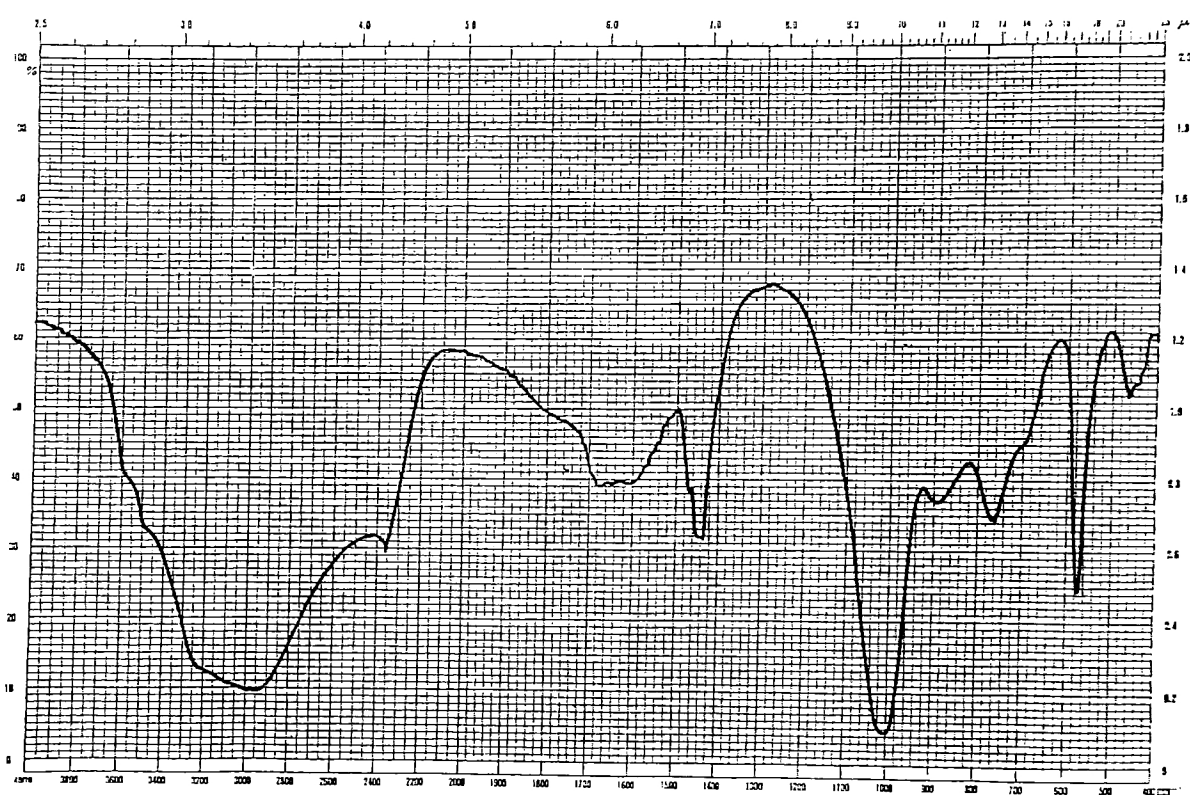


Fig. 6. Analysis of bladder stone by infrared spectroscopy.

尿路結石形成の原因菌になりうると報告した⁸⁾。そこで、われわれも、手術的にラット膀胱に亜鉛リングを挿入し、さらに *U. urealyticum* を接種し、膀胱結石形成について実験した。

予備実験でラットに *U. urealyticum* による尿路感染を起こす頻度が少なかった。そのため、術後、強制的排尿による採尿にて *U. urealyticum* の培養を行い、その経時の変化を調べた。術後2日、6日と分離される頻度は日毎に低くなった。さらに、6日目 *U. urealyticum* 陽性ラットも術後7日、14日の屠殺時にはほとんどのラットで陰性化していた。また膀胱の組織学的

所見にても炎症所見が軽度であったことより、実験に用いた *U. urealyticum* 株の感染性はかなり弱いと考えられた。これは菌株による感染性の違いであろうか。Friedlander と Braude の論文⁸⁾では、飼育期間中の尿や屠殺時の腎や膀胱の *U. urealyticum* の培養については言及がなく、この菌の感染継続期間については不明である。

また、今回の実験にて、明らかになったことは *U. urealyticum* が尿に存在してもラットの尿 pH は、極軽度の上昇しかみられなかったことである。これまで健康人の尿を用いた *in vitro* の実験では *U. urealyticum*

のウレアーゼ活性により尿 pH の上昇がみられている^{9,10)} 今回の結果は, ラットの尿 pH が, この菌の発育至適 pH やこの菌が有するウレアーゼ活性の至適 pH に適さないためであろうか. または, 尿中の菌量が少ないためであろうか. いずれにせよ今回の実験条件での尿 pH の変化からは, 用いた *U. urealyticum* のウレアーゼ活性は弱いと考えられる.

先に述べたように *U. urealyticum* の感染性が弱いと考えられるため, *U. urealyticum* 接種群ラットを菌接種後 2, 6 日目の尿培養結果より前述のように 3 群にわけた. この分類によって結石形成について考察すると, 第 1 群は 2 週間飼育してもコントロール群とほぼ同様であり, 第 2 群, 第 3 群と *U. urealyticum* が尿中に存在する期間が長くなるに従い, 平均結石重量は増加している. この結果より, *U. urealyticum* は感染結石形成に関与すると考えられる. さらに第 2, 3 群では術後 7 日目と 14 日目を比較すると, 飼育期間が長い程, より大きな結石が形成されている. これはある程度の大きさの結石がいったん形成されると, 尿停滞や膀胱の炎症などにより結石形成が促進されると想像される. 繰り返し菌培養が陽性であっても, 単に尿中に微生物が存在するだけの colonization の可能性もあり, 必ずしも感染成立とはいえないが, 尿培養の結果より, これら 3 群を第 1 群=感染不成立群, 第 2 群=第 1 群と第 2 群の中間群, さらに第 3 群=感染成立群とも解釈可能であろう. なお, 実験では *U. urealyticum* の培養は Taylor-Robinson 液体培地による定性検査のみであり, 菌の定量培養は施行しておらず, 感染の程度については検討できていない. しかし第 2, 3 群においても結石が形成されないラットも見られた. この原因として, 菌量が少なかった, *U. urealyticum* は単なる尿中の colonization であった, また初期にはごく小さな結石はできていたが尿 pH の低下により溶解した, などが考えられる.

Friedlander と Braude の実験では, 膀胱内菌接種, 腎臓内菌接種で, 6 週後にそれぞれ 90%, 78% のラットの結石形成がみられた⁸⁾ われわれもラットに腎臓内菌接種の方法も試みにおこなったが, 10 匹中 2 匹に膀胱結石が見られたのみであった. われわれの実験では, 膀胱内に異物である亜鉛リングを挿入したにもかかわらず, 結石形成頻度は低かった. この差は用いたラットの系統, *U. urealyticum* の菌株の違い, または培地や培養方法が異なるためかもしれない. さらに菌接種後のラットの飼育期間の長さの違いなども原因であるかもしれない. 今回の実験は, 一度に多量の菌をラットに接種して 2 週間で結石形成の有無を判定するという短期間の観察であり, この結果がただちに臨床に直結するとはいえないが, *U. urealyticum* は感染結石の原因菌となりうるということが判明した. われわれ

はこれまでさまざまな細菌について, 同じ方法によって膀胱結石形成の実験をおこない, *Proteus mirabilis* では, 1 週間ですべてのラットに平均 30 mg の膀胱結石が形成された. 接種した菌の培養方法や菌量は異なり, 数値からの単純な比較は不適切であるかもしれないが, *U. urealyticum* の結石形成能は, *Proteus* 属と比較すると弱いと考えられた.

さて日常臨床において, 尿路結石患者の尿中の *U. urealyticum* の分離はどうであろうか. 臼井らは健常人と尿路結石患者間での尿中 *U. urealyticum* の分離頻度より, この菌による尿路感染が結石を形成する可能性があるとした⁵⁾ さらに Hedelin ら⁶⁾ や Grenago ら⁷⁾ は, 感染結石症例において他の尿素分解細菌が培養されずに *U. urealyticum* のみが分離されたとの報告をおこない, この菌が感染結石形成の原因菌となりうるとした. しかし, 臨床においては一般には腸内細菌を中心とする尿培養がされており, たとえ尿中に *U. urealyticum* が存在しても, 尿を Taylor-Robinson 培地に接種しないと分離されない. さらに *U. urealyticum* 培養においては検体の保存方法も問題とされており, 尿採取から検査までの条件も重要である¹²⁾. 感染結石の症例で, 一般の尿素分解細菌が分離されない時は, 頻度は少ないが *U. urealyticum* 感染についても考慮する必要がある, 培養方法や治療にも注意を要する.

結 語

Ureaplasma urealyticum の感染結石形成への関与を調べるために, ラット膀胱に手術的に亜鉛リングを挿入し, さらに同菌を注入して検討した.

1) *U. urealyticum* の感染性は弱く, 尿培養にて, 菌接種後 2 日目にすでに 36 匹中 10 匹は陰性であり, さらに 2 日目に陽性ラットも, その後の尿培養にて, 時間の経過とともに菌は尿中より陰性化する傾向があった.

2) *U. urealyticum* 感染により, ごく軽度の尿 pH の上昇がみられるのみであった.

3) 術後 2 日目の尿中に *U. urealyticum* がみられたラットでは, 69% に膀胱内に結石が形成され, また術後 6 日も尿中に *U. urealyticum* が陽性であったラットでは 71% に結石がみられた.

4) *U. urealyticum* は結石形成の原因菌となりうるということが示唆された.

文 献

- 1) Griffith DP: Struvite stones. *Kidney Int* **13**: 372-382, 1978
- 2) 竹内秀雄, 岡田裕作, 吉田 修, ほか: 結石にともなう尿路感染症. 1. 尿路感染の意義について.

- 泌尿紀要 **35** : 749-754, 1989
- 3) Bowie WR, Pollock HM, Forsyth PS, et al.: Bacteriology of the urethra in normal men and men with nongonococcal urethritis. *J Clin Microbiol* **6** : 482-488, 1977
 - 4) Swenson CE, Toth A and O'Leary WM: *Ureaplasma urealyticum* and human infertility: the effect of antibiotic therapy on semen quality. *Fertil Steril* **31** : 660-665, 1979
 - 5) 臼井幸男, 渡辺 聡, 在原和夫, ほか: 尿路結石症患者における尿中 *Ureaplasma urealyticum* の意義. 泌尿器外科 **4** : 167-169, 1991
 - 6) Hedelin H, Brorson JE, Grenabo L, et al.: *Ureaplasma urealyticum* and upper urinary tract stones. *Br J Urol* **56** : 244-249, 1984
 - 7) Grenago L, Hedelin H and Pettersson S: Rapidly recurrent renal calculi caused by *Ureaplasma urealyticum*: a case report. *J Urol* **135** : 995-997, 1986
 - 8) Friedlander AM and Braude AI: Production of bladder stones by human T mycoplasmas. *Nature* **247** : 67-69, 1974
 - 9) Takebe S, Numata A and Kobashi K: Stone formation by *Ureaplasma urealyticum* in human urine and its prevention by urease inhibitors. *J Clin Microbiol* **20** : 869-873, 1984
 - 10) 山下拓郎: *Ureaplasma urealyticum* による尿路結石発生に関する研究. 西日泌尿 **46** : 1229-1238, 1984
 - 11) 新井 豊, 竹内秀雄, 友吉唯夫, ほか: 尿中分離細菌のウレアーゼ活性. 泌尿紀要 **35** : 277-281, 1989
 - 12) 岩田英樹, 米田尚生, 斉藤昭弘, ほか: *Ureaplasma urealyticum* の保存方法について. 第2回尿路感染症研究会抄録集 31, 1991
- (Received on May 16, 1996)
(Accepted on July 19, 1996)
(迅速掲載)