

尿中分離細菌のウレアーゼ活性

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, 友吉 唯夫

滋賀医科大学医学部附属病院検査部 (主任: 越智幸男教授)

立 脇 憲 一

UREASE ACTIVITY OF BACTERIA IN URINE

Yutaka ARAI, Hideo TAKEUCHI and Tadao TOMOYOSHI

From the Department of Urology, Shiga University of Medical Science

Kenichi TATEWAKI

From the Laboratory Medicine, Shiga University of Medical Science

Urea splitting bacteria are related to the formation of struvite or apatite. We investigated the urease activity of bacteria by two methods; the direct measurement of urease activity of viable bacteria and sonicated bacteria from amounts of ammonia by the indophenol method, and the measurement of urease activity by alkalization of infected urine. *Proteus mirabilis* and *Pseudomonas aeruginosa* had moderate activity of urease, and *Morganella morganii* and *Staphylococcus epidermidis* had the most powerful activity. *P. mirabilis* caused the strongest alkalization in infected urine.

(Acta Urol. Jpn. 35: 277-281, 1989)

Key words: Urease activity, Bacteria, Urinary stone

緒 言

尿路結石症は泌尿器科領域の重要な疾患の一つである。しかしその成因については、いまだ不明な点が多い。尿路感染と関連した、いわゆる“感染結石”は、尿路結石の約15~20%を占めている¹⁾。特に感染結石の治療に際し、結石の再発、難治性尿路感染症、さらに通過障害や感染による腎障害など多くの問題がある。尿路感染症では、尿中細菌の産生するウレアーゼにより尿素が分解されてアンモニアが生じ、さらに尿はアルカリ性に傾き、リン酸塩結石の形成の要因と考えられている²⁾。しかし、いかなる細菌がウレアーゼ活性をもち、またどの程度の活性があるかについては、あまり報告されていない³⁻⁶⁾。今回われわれは、これらの点についていくつかの実験により検討したので報告する。

方 法

1)各種細菌のウレアーゼ活性の有無について
対象は1982年1月から12月までの1年間に滋賀医科

大学附属病院中央検査部にて同定された、おもな尿中の細菌についてウレアーゼ活性の有無を調べ陽性率を集計した。ウレアーゼ活性の有無の判定は、ウレアーゼ確認用尿素培地(栄研化学)またはエンテロチューブⅡ(日本ロシュ)を用いて行った。なお *Staphylococcus epidermidis* は、*Staphylococcus saprophyticus* を含めたものである。

2)細菌のウレアーゼ活性の定量

Proteus mirabilis, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* の8種の細菌についてウレアーゼ活性を調べた。細菌は滋賀医科大学附属病院中央検査部にて尿中より分離・同定された臨床分離菌を5株ずつ用いた。

ウレアーゼ活性の定量は、UN測定用キット(ヤトロン社)を用いて行った。十分量の尿素を細菌の有するウレアーゼにより分解させ、その分解により生じたアンモニアをインドフェノール反応にて発色して定量し、もとの分解された尿素量を求めた⁵⁾。そして

変化した尿素量でウレアーゼ比活性を求めた。

前述の各細菌を普通寒天平板培地に24時間培養し、その 10^8 個を pH 7, 0.1 M のリン酸緩衝液 1 ml に懸濁させ生菌粗酵素液とし、0.1 M 尿素 20 μ l を加え、25°C で30分間 incubation した。その後呈色液を加え、さらに 25°C, 30分間 incubation し、570 nm の吸光度を測定し、ウレアーゼ活性を求めた。

また、同じく24時間培養した細菌を2回滅菌蒸留水にて洗浄し、pH 7, 0.1 M のリン酸緩衝液に懸濁した。その後、超音波破砕器(トミー精工社)を用いて2~5分間破砕(200 W, 20 kHz)した。さらに15,000 rpm で15分間遠心し、その上清液を粗酵素液とした。粗酵素液の蛋白量を Biuret 法⁶⁾により測定し、さらにウレアーゼ活性は生菌と同じ方法で測定した。

3)細菌の尿アルカリ化作用

上記の実験で用いた *P. mirabilis*, *M. morganii*, *Ps. aeruginosa*, *S. epidermidis* の4種類の細菌のうちウレアーゼ陽性の株を3株ずつ用い、尿アルカリ化作用を検討した。各細菌を24時間培養し、その 10^6 個を健康人の尿 10 ml に混入し、37°C, 24時間保温し、経時的に pH メーターを用いて尿 pH の変化を測定した。また各細菌接種尿の沈殿物の観察、および12時間後、24時間後の尿中細菌数も調べた。

結 果

1)各細菌のウレアーゼ活性の有無について

尿中分離細菌のウレアーゼ活性の陽性率は Table 1 のごとくである。*Proteus*, *Morganella* および *Klebsiella* にウレアーゼ活性陽性株が90%以上であった。*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* は、一部陽性のものがみられた。しかし *E. coli* はまったくウレアーゼ活性陽性の株は認められなかった。また球菌では *Staphylococcus* 属に陽性を示すものがあった。

2)細菌のウレアーゼ活性の定量

生菌 10^8 個あたりのウレアーゼ活性を Fig. 1 に示す。*E. coli* にはウレアーゼ活性は認められなかった。*P. mirabilis*, *Ps. aeruginosa* および *K. pneumoniae* に中等度の活性があった。さらに *M. morganii* および *S. epidermidis* に強い活性を認めた。しかし、*S. aureus* および *S. faecalis* には陰性株から中等度活性株まで、株間に大きな差がみられた。

破砕細菌を用いたウレアーゼ活性の結果を Fig. 2 に示す。破砕細菌の蛋白 mg あたりの基質の変化量すなわち比活性を求めた。この実験でも、生菌 10^8 個を用いた場合と同じ傾向を示した。すなわち *P. mi-*

Table 1. Urease activity rate of bacteria in urine

Bacteria	No. of species	Positive (%)
<i>Proteus mirabilis</i>	85	81 (95)
<i>vulgaris</i>	33	32 (97)
<i>Morganella morganii</i>	48	44 (92)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	307	289 (94)
<i>oxytoca</i>	55	53 (96)
<i>Citrobacter freundii</i>	80	35 (44)
<i>Enterobacter cloacae</i>	179	41 (23)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39	6 (15)
<i>E. coli</i>	435	0 (0)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10	4 (40)
<i>Staphylococcus aureus</i>	14	3 (22)
<i>Streptococcus faecalis</i>	9	1 (11)

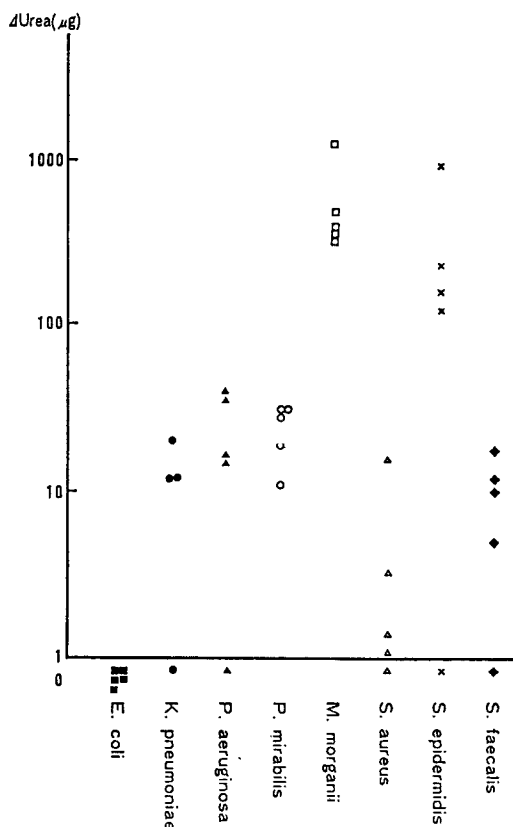


Fig. 1. Urease activity (viable cell)

rabilis および *Ps. aeruginosa* に中等度の活性があり、*M. morganii* および *S. epidermidis* に強い活性が認められた。また、*E. coli* には活性が認められなかった。

3)細菌の尿アルカリ化作用

細菌接種尿 pH の経時的变化を Fig. 3 に示す。6

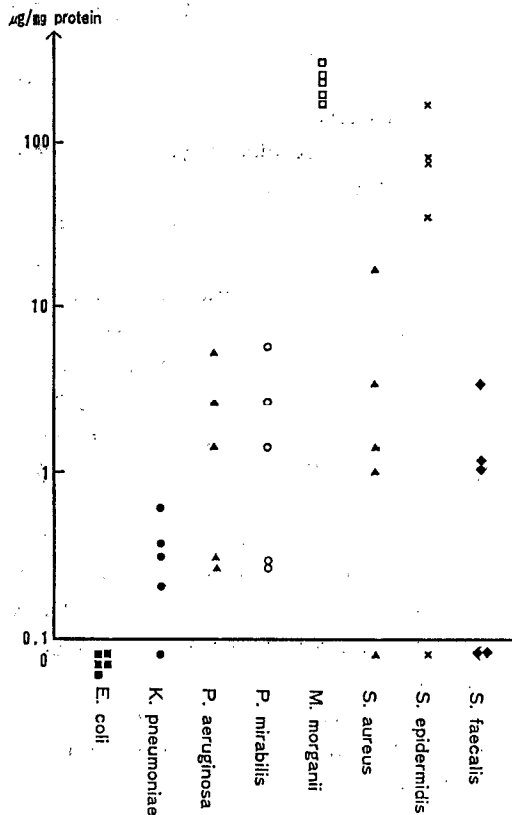


Fig. 2. Urease activity (sonicated cell)

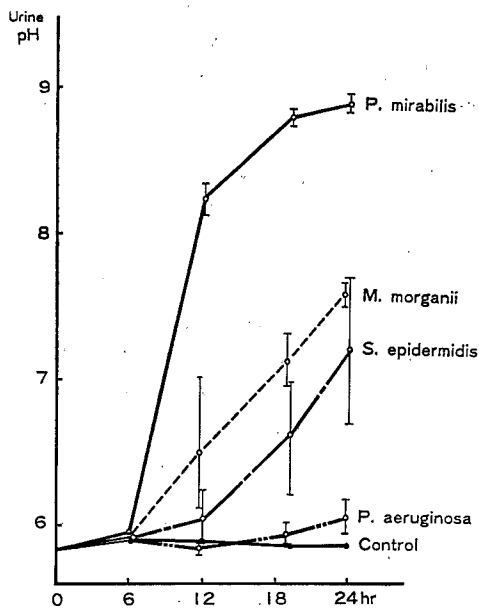


Fig. 3. pH of infected urine

間後の尿 pH は菌種によりほとんど差を認めなかつ

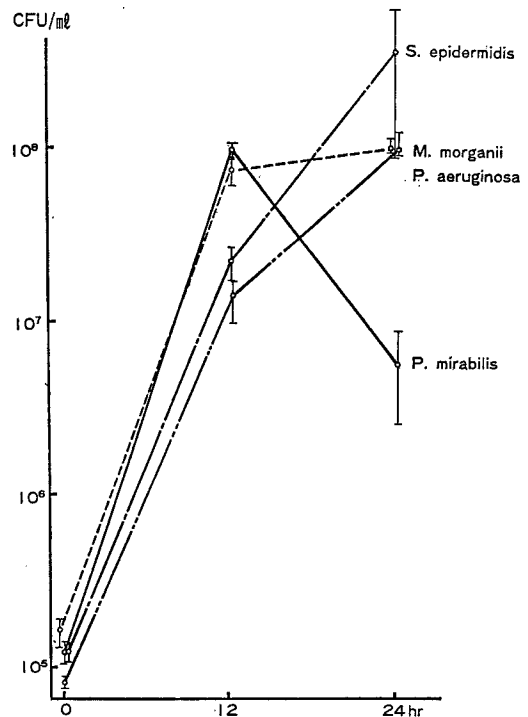


Fig. 4. Bacteria counts of infected urine

時たが, *P. mirabilis* 接種尿は12時間後に pH 8 以上に上昇し, 18時間後, 24時間後さらに上昇し 8.9 まで達した。また *M. morganii* および *S. epidermidis* 接種尿は, 経時的に, 尿 pH は上昇したが, *Ps. aeruginosa* 接種尿については尿 pH は変化しなかった。

P. mirabilis 接種尿は12時間後より, また *M. morganii* および *S. epidermidis* 接種尿は 18 時間後より塩類が析出しはじめた。沈殿物にはリン酸マグネシウムアンモニウム (struvite) や, リン酸カルシウム (carbonate apatite) の結晶および細菌が多数認められた。

尿中細菌数を Fig. 4 に示す。12時間後にはいずれも約 10⁷ cfu/ml に増殖した。しかし 24 時間後では, *P. mirabilis* 接種尿では, 細菌数の減少がみられた。

考 察

P. mirabilis を代表とするウレアーゼ産生菌による尿路感染については多くの報告があり, いずれも臨床上の問題を提起している。Musher ら⁷⁾は, 腎臓にはウレアーゼによる尿アルカリ化自体が nephrotoxic であり, さらに細菌の尿管への侵入を容易にしていると述べている。また Parsons ら⁸⁾は, 膀胱に関して, 感染防御の役割をする膀胱粘膜の GAG 層に対し,

ウレアーゼ活性により生じたアンモニアが GAG 層を inactivate する, と述べている. さらに Beeson ら⁹⁾は, アンモニアが, 血清の細菌に対する作用を減少させるとしている.

さて, 感染結石における細菌学的検討についてもいくつかの報告がなされており^{10,11)}, いずれも *Proteus* を代表とするウレアーゼ産生菌が感染結石の形成に重要な役割を演じている, と述べている.

しかし, このようにウレアーゼ産生菌による尿路感染症を問題としながらも, その各細菌のウレアーゼ活性の程度の比較については, わずかの報告があるにすぎない⁴⁾. 多くは, 細菌のウレアーゼ活性の陽性率から, 各細菌のウレアーゼ活性を, さらに尿路感染と結石形成の関連を検討している^{1,11)}.

われわれは, 1,294 例の尿路感染の起因菌のウレアーゼ活性陽性率を集計したが, その結果は Griffith¹⁾と同様に *Proteus* に高い陽性率を示した. しかしわれわれの集計では *Klebsiella* は陽性率90%以上, *Citrobacter freundii* は陽性率44%, そして *Pseudomonas* は陽性率15%と, Griffith の集計とやや異なった. また, *E. coli* は Griffith と同様すべて陰性であった. また球菌についても検討すると, *Staphylococcus* には陽性を示すものがあり, 結石内細菌より *Staphylococcus* が分離された報告^{10,11)} と合わせ考えると, 結石形成に関連があると思われる.

各種細菌のウレアーゼ活性の強さの比較を目的として, 2つの実験を行った.

各細菌のウレアーゼ活性の測定には, 細菌の形態を2つにわけておこなった. 1つは臨床モデルとして 10^8 個という細菌集団を用い, 他方は細菌を超音波破碎し菌体内酵素をとりだし, 蛋白重量あたりでウレアーゼ活性を測定した. 両者の結果はいずれも同様の傾向を示した. とくに強いウレアーゼ活性を示す株では, 生菌・破碎細菌いずれの実験系でもその活性の強さは良く対応していた. 従来, 細菌の酵素活性の研究では, 細菌の細胞壁を超音波法や摩擦法などにより, 内部の酵素をとりだしている^{12,13)}. しかし本実験の結果より, 一定集団の細菌をもちいる簡易法によってもウレアーゼ活性を半定量的に測定しうると推測される.

また同一菌種でも株間により, ウレアーゼ活性が著しく異なる場合がある. たとえば, *S. epidermidis* では強い活性を示す株から, 陰性の株まで存在した. この原因は, 現在の細菌の同定法によると考える. すなわちウレアーゼ活性が同定の決定的要素とならない細菌では, 同一菌種間でも株によりさまざまな尿素分解反

応を示す可能性がある. 従って尿素分解能を重要視すればさらに新しい菌種の分類が必要かもしれない. 近年ソポビオシンに対する感受性の相違より *S. epidermidis* と *S. saprophyticus* を区別するようになってきた¹⁴⁾. そして *S. saprophyticus* に高いウレアーゼ活性を示す傾向があるとされている¹⁵⁾.

細菌接種による尿アルカリ化作用の実験では, 尿 pH の変化の程度より, 各細菌のウレアーゼ活性を判定した. この実験では *P. mirabilis* 接種尿に強い pH の上昇が早期から認められ, ウレアーゼ活性が強いことが示唆された. このように尿アルカリ化作用が強い点より, 感染結石内に *P. mirabilis* が多く分離されるという報告^{10,11)}とあわせ考えると, *P. mirabilis* が結石形成に大いに関係があると思われる. また *M. morganii*, *S. epidermidis* にも pH 上昇が認められた. しかし *Ps. aeruginosa* にはほとんど pH 上昇がなかった. この尿 pH 上昇の違いは, 細菌の増殖によるものとも考えられ, 尿中細菌数も調べた. しかし増殖の程度は各種菌はほぼ同様であり, 尿 pH の変化の違いは単に細菌数が原因ではなく, 各細菌のウレアーゼ活性の強さと考えられる. なお *P. mirabilis* は, 24時間後の細菌数は減少しており, これは尿 pH の急激な上昇で死滅したのと考えられた.

さて, 細菌のウレアーゼ活性の定量の実験と細菌の尿アルカリ化の実験を比較すると, 一部異なる結果になった. *S. epidermidis* や *M. morganii* と比較すると *P. mirabilis* ではウレアーゼ活性が中等度なのに尿アルカリ化作用は著しかった. その原因として, 反応時間や pH の影響が考えられる. ウレアーゼ活性定量の実験は反応時間は30分であり, 細菌接種により尿 pH が変化していく過程のほんの一部だけを反映しているだけかもしれない. また各細菌のウレアーゼの至適 pH が異なるとも考えられる. 今回のウレアーゼ活性測定は pH 7 で行っており, この pH に適したウレアーゼを有する細菌が強い反応を示すと考えられる. Suzuki らは, 細菌ウレアーゼ活性は pH によっておおいに変化し, とくに *P. mirabilis* では pH が6→7→8と上昇するに伴いウレアーゼ活性が急上昇すると報告している¹³⁾. この報告より *P. mirabilis* 接種尿では尿 pH が軽度上昇することにより細菌のウレアーゼ活性の働きが高まり, 尿素が分解されその結果さらに尿 pH が上昇し, そのため, よりウレアーゼ活性が強くなり, 最終的に著しい接種尿の pH 上昇を呈したと考えられた. しかし他の細菌では尿素分解により尿 pH が上昇しても, 上昇した pH でのウレアーゼ活性が弱ければ, 反応はあまり進まず最終

的な接種尿 pH の上昇は軽度となると考えられる。

結 語

1) 尿中細菌のウレアーゼ活性の陽性率を調べると, *Proteus*, *Morganella*, *Klebsiella* で90%以上の株で陽性であり, *E. coli* は全例陰性であった。球菌についても陽性をしめすものがあった。

2) 各細菌のウレアーゼ活性を定量的に調べた。 *M. morganii*, *S. epidermidis* に強い活性があった。 *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* は中等度の活性を示した。 *E. coli* は陰性であった。また *S. epidermidis* は株により, 強い活性から陰性のものまであった。

3) ヒト尿にウレアーゼ産生菌を混入し, 尿 pH の変化を調べた。 *P. mirabilis* 接種症で著しい尿 pH の上昇があり, ウレアーゼ活性が強いことが示唆された。また *M. morganii*, *S. epidermidis* にも尿 pH 上昇を認めたが, *P. aeruginosa* では尿 pH は上昇しなかった。

4) 細菌のウレアーゼ活性定量と尿アルカリ化作用は必ずしも一致しなかった。これは各細菌の至適 pH の相違および反応時間によるものと推測された。

本論文の要旨の一部は, 第34回, 第35回日本泌尿器科学会中部連合総会にて発表した。

文 献

- 1) Griffith DP: Struvite stones. *Kidney Int* 13: 372-382, 1978
- 2) Resnick ML: Evaluation and management of infection stones. *Urol Clin North Am* 8: 265-276, 1981
- 3) White EC and Hill JH: Bacterial urease. *J Urol* 45: 744-759, 1941
- 4) 竹内秀雄, 吉田 修, 竹部幸子, 小橋恭一, 長谷純一: 慢性尿路感染症の尿中ウレアーゼ活性. *泌尿紀要* 23: 647-651, 1977
- 5) Chaney AL and Marbach EP: A modified technique for ultramicro estimations of urea nitrogen. *Clin Chim Acta* 8: 810-812, 1963
- 6) 水野映二, 仁科甫啓, 北村元仕: 血清総蛋白定量法の改良. *臨床病理* 19: 427-430, 1971
- 7) Musher DM, Griffith DP, Yawn D and Rossen RD: Role of urease in pyelonephritis resulting from urinary tract infection with proteus. *J Infect Dis* 131: 171-181, 1975
- 8) Parsons CL, Stauffer C, Mulholland SG and Griffith DP: Effect of ammonium of bacterial adherence to bladder transitional epithelium. *J Urol* 132: 365-366, 1984
- 9) Beeson PB and Rowley D: The anticomplementary effect of kidney tissue. Its association with ammonia production. *J Exp Med* 110: 685-698, 1959
- 10) 竹内秀雄, 小西 平, 高山秀則, 友吉唯夫, 岡田裕作, 桐山香夫, 吉田 修: 感染結石における結石内細菌と結石構築について. *泌尿紀要* 30: 479-487, 1984
- 11) 吉田 修, 桐山香夫, 岡田謙一郎, 岡田裕作, 渡辺 決, 三品輝男, 内田 睦, 渡辺康介, 友吉唯夫, 高山秀則, 竹内秀雄, 中川清秀, 上山秀麿, 平竹康裕, 古沢太郎, 海法裕男, 林 正, 臼井通: 感染をともなう尿路結石の細菌学的研究. *泌尿紀要* 30: 191-198, 1984
- 12) 大島泰郎, 高橋美帆: 微生物細胞からの酵素抽出法, 生化学実験講座, 日本生化学会編, 第1版, 第5巻, 169-175, 東京, 1975
- 13) Suzuki K, Benno Y, Mitsuoka T, Takebe S, Kobashi K and Hase J: Urease-producing species of intestinal anaerobes and their activities. *Appl Environ Microbiol* 37: 379-382, 1979
- 14) 黒坂公生: コアグラゼ陰性ブドウ球菌 (CNG) 尿路感染症. *日本臨床* 44: 2638-2643, 1986
- 15) Kunin CM: Urease Inhibitors. Detection, prevention, management of urinary tract infections. fourth edition, p. 386, Philadelphia, 1987

(1988年2月29日受付)