

氏名・(本籍)	新井 豊 (群馬県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士(論)第205号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成9年3月24日
学位論文題目	Corynebacterium属による感染結石形成に関する実験的研究
	審査委員 主査 教授 瀬戸 昭
	副査 教授 吉川 隆一
	副査 教授 友吉 唯夫

論文内容の要旨

【目的】

尿路の感染結石の形成はProteus mirabilisやStaphylococcus saprophyticusなどの尿素分解細菌の感染が原因とされる。最近、Corynebacterium group D2 (以下C. group D2と略す)やCorynebacterium group F1感染による尿路結石症の報告があり、今回Corynebacteriumのウレアーゼ活性や感染結石形成についてin vitro、in vivoで検討した。

【方法】

ウレアーゼ陽性のCorynebacterium renale (以下C. renaleと略す) 2株、Corynebacterium pseudodiphtheriticum (以下C. pseudodiphtheriticumと略す) 1株、Corynebacterium pilosum (以下C. pilosumと略す) 1株、C.group D2 2株の計4菌種6株を実験に用いた。

(in vivo) 各菌種のウレアーゼ活性を、尿のアルカリ化作用より検討した。4菌種6株の 10^7 colony forming units(CFU)を2種類の健常人の尿(pH 5.7および7.3)に混入して37°Cに保ち、経時的に尿pHを測定し尿中細菌数を調べた。さらに、各細菌 10^7 CFUあたりのウレアーゼ活性は、0.1Mリン酸塩緩衝液(pH5.7~8.0の6種類に調節)のもとで尿素を細菌ウレアーゼにより分解させ、生じたアンモニアをインドフェノール反応にて定量し、もとの分解された尿素量より求めた。

(in vitro) 体重約200gのウイスター系雄ラットを用い、手術的に亜鉛リング1個を膀胱内に挿入し、さらにC. renale、C. pilosum、C. group D2 3菌種の 10^6 CFUを膀胱内に注入し、感染膀胱結石形成を試みた。術後7日目に屠殺し、尿路とくに結石形成の有無を観察し、膀胱尿のpH測定と細菌培養をおこなった。

【結果】

(in vitro) C. renale、C. pilosumおよびC. group D2では時間の経過とともに尿pHの上昇がみられ、とくに、C. renale、C. pilosumで尿アルカリ化が著しかった。しかし、C. pseudodiphtheriticumでは、尿pHはほとんど不変であった。尿中の細菌数は、C. renaleのNo.2株でのみ増殖がみられた。ウレアーゼ活性の定量ではC. renale、C. pilosumは強い活性を示し、C. group D2の活性は中等度であった。そして、これらの活性はpHが高くなるにつれて増大する傾向がみられた。また、C. pseudodiphtheriticumでは、ごくわずかのウレアーゼ活性しか示さなかった。さらにウレアーゼ活性は同一菌種でも株間にばらつきもみられた。

(in vivo) C. renale接種ラットでは、5匹すべて、C. pilosumでは8匹中3匹、C. group D2では10匹中8匹で尿より接種菌が培養された。これらの尿培養陽性ラットの尿pHは、対照群と比較し有意に高く、そしてC. group D2接種の1匹を除いた15匹のラットで結石が形成された。結石成分は、リン酸マグネシウムアンモニウムであった。また、ほとんどのラットで水腎症がみられ、約半数には腎に膿瘍形成もみられた。

【考察】

C. renaleのNo.1株およびC. pilosum混入の尿pHの著しい上昇は、これらの菌のきわめて強いウレアーゼ活性より理解され、またpHが高くなるほどその活性がより強くなることより、pH5.7の

尿よりpH7.3の尿で、さらに時間とともに加速度的に尿pHが著しく上昇したことが理解できる。また、*C. renale*のNo.2株は、あまりウレアーゼ活性は強くはないが、経時的な細菌の増殖を考慮すると、尿pHの上昇も理解できる。さらに*C. group D2*についてもpHが高くなるにつれ、除々にはあるが、ウレアーゼ活性が強くなることより、時間とともに緩徐に尿アルカリ化が進行したこと、さらに実験開始時のpHが5.7より7.3の尿のほうでよりアルカリ化が顕著であったことも説明できる。*C. pseudodiphtheriticum*については、その微弱なウレアーゼ活性と尿pHにほとんど変化がないことが一致した。

従来、細菌の酵素活性の研究は、菌体内の酵素を取り出しておこなわれている。今回、菌量 10^7 CFUの viableな細菌が有するウレアーゼ活性を求めるといふ簡易法により、菌種間の比較をしたが、充分目的を達したと思われる。ただ尿素分解反応は、緩衝液のpHに影響され、*C. renale*および*C. group D2*では、pH8.0までのウレアーゼ活性しか測定できなかったため、これらの菌のウレアーゼの至適pHは、さらに高いpHのところにあるかもしれない。また、使用した*C. pilosum*株のウレアーゼの至適pHは7.5と推察される。

ラットを用いた膀胱結石形成実験では、膀胱尿よりの菌の分離頻度が菌種間で異なつたが、これは接種菌のvirulenceの違いによるものであろう。3種類の菌のいずれも、接種により感染が成立すれば、膀胱結石が形成されることが確認された。*Corynebacterium*も感染結石の原因菌として考慮されるべきであると考えられた。

【結 論】

尿のアルカリ化作用および生菌 10^7 CFUあたりのウレアーゼ活性の定量より、ウレアーゼ活性は*C. renale*および*C. pilosum*では強く、*C. group D2*は中等度であった。そして、これらの活性は、pHが高くなるにつれ、より強くなった。*C. pseudodiphtheriticum*のウレアーゼ活性は、ごくわずかであった。

膀胱結石形成の実験では、*C. renale*、*C. pilosum*および*C. group D2*にて結石が形成され、*C. renale*、*C. pilosum*および*C. group D2*は、感染結石形成の原因菌と考えられる。

論文審査の結果の要旨

*Proteus*等のウレアーゼ産生細菌の尿路感染は感染結石の原因となる。近年、低頻度とはいえ、*Corynebacterium*属の細菌が尿路感染症の患者から分離され、感染結石の原因となるのではないかと考えられている。本研究は*Corynebacterium*属4菌種6株についてウレアーゼ産生能と感染結石形成能を実験的に検討したもので、以下の結果を得ている。

- (1)、菌を接種したヒト尿における菌の増殖、尿中ウレアーゼ活性と尿pHの変化を検討した結果、尿中での増殖にかかわらずウレアーゼ産生能の高い*C. renale*と*C. pilosum*では尿のpHが急速にアルカリ性となり、リン酸カルシウム、リン酸マグネシウム・アンモニウム等の塩類が沈殿した。ウレアーゼ産生能の低い菌種では尿のpHの変化は遅いかあるいは殆ど見られず、また塩類の沈殿は尿pHの変化と相関した。
- (2)、ラットを用いた感染結石形成実験では、*C. renale*、*C. pilosum*、*C. group D2*を膀胱内に接種した場合には尿pHがアルカリ性となり、リン酸マグネシウム・アンモニウムの結石形成が高率に認められた。ウレアーゼ産生能が低い菌種では尿pHの変化も結石形成もみられなかった。

以上の結果から、ウレアーゼ産生能の高い*Corynebacterium*属の菌が尿路に感染すれば膀胱結石が形成されると考えられた。尿路感染症の患者の尿検査では、感染結石の予防のために*Proteus*属の菌などとともに*Corynebacterium*属の菌も念頭におく必要のあることを指摘している点で重要であり、博士(医学)の学位に値すると認める。