

尿路感染症患者分離 *Proteus mirabilis* の 病原性発現因子の解析

岡山大学医学部細菌学教室 (指導: 金政泰弘教授)

室 谷 勝 久

(平成3年5月13日受稿)

Key words: *P. mirabilis*, 尿路感染, 病原因子, 走化性, ウレアーゼ, 付着性

緒 言

一般に単純性尿路感染症の起原菌の多くは腸管にその由来を有すると考えられている。*Proteus* 属細菌は、健康人の腸管常在菌であり、単純性尿路感染症の起原菌としては *E. coli* に次ぐ頻度で分離されている。中でも *P. mirabilis* は他の *Proteus* や *Morganella*, *Providencia* 等の類縁の細菌に比較しても特に高い分離頻度を有している¹⁾。*E. coli* 感染のほとんどは膀胱感染であるが、*Proteus* の感染は上部尿路特に腎臓に障害を与える傾向がある点で *E. coli* と大きく異なっている²⁾⁻⁴⁾。

P. mirabilis の病原性発現因子としては、(1)尿中の尿素を分解してアンモニアを遊離し、尿路上皮、特に腎臓の障害と尿のアルカリ化による尿路結石の形成を促進するウレアーゼ産生^{3),5)}、(2)上部尿路への感染に関わる強い運動性⁶⁾、(3)尿路上皮細胞への付着性とそれに関わる付着因子(線毛, Pili, Fimbriae)⁷⁾⁻¹²⁾、(4)血清および尿中の殺菌作用に対する抵抗性¹³⁾等の諸要因が考えられる。

過去における *P. mirabilis* の病原性発現機構の解析研究は、本菌のもつウレアーゼによる腎障害の研究に重点がおかれていた^{3),5)}。しかしながら、*P. mirabilis* のもつ著しい運動性および感染成立の初期過程における宿主細胞表層への細胞付着因子も病原性発現機構の解析には不可欠の要因であると考えられる。ところが現在までにこれらの要因に総合的解析を加え個々の病原因子の軽重と各菌株の有する総合的な病原性

を解析した研究は、Peerbooms 等によるマウス50%致死量 (LD₅₀) 測定と腎障害性に関する研究¹⁴⁾以外ほとんど行われていない。

本研究においては、尿路感染症患者由来株およびその対照として教室保存 *P. mirabilis* を用いて、各菌株の有する総合的病原性をラットの逆行性尿路感染モデルおよびマウスに対する LD₅₀ により解析を加えると共に、前述した4因子に解析を加え、各病原性発現因子の役割に検討を加えた。

材 料 と 方 法

1. 供試菌および培養

供試菌としては、教室保存株 *P. mirabilis* ATCC19906 (No. 1) および岡山大学医学部泌尿器科学教室において尿路感染症患者より分離された4株 (No. 2, No. 6, No. 25, No. 30) の *P. mirabilis* を用いた。供試菌は特にことわらないかぎりトリプティケースソイブロス培地 (以下 TSB) にて37°C一夜培養したものを用いた。菌の増殖は、光電比色計を用いて OD₆₅₀ の上昇で判定した。生菌数の測定は、*Proteus* が著しい運動性を有するので、運動阻止性のある CLED 培地を用いて測定した。

2. 病原性の判定

病原性の解析は、ラットの逆行性尿路感染モデルを用いて行った。動物通過後 TSB にて3代目の培養菌 1×10^9 cells/ml を一群8匹の6週齡雌ウイスターラット外尿道口より、静脈留置針のプラスチックガイドを用いて100 μ l 注入し、尿道口を30分間クランプして注入菌液の漏出を

防いだ後、ラットを一週間飼育した。途中死亡したラットおよび一週間飼育後のラットを剖検し、各尿路臓器における組織障害および尿路結石の有無に検討を加えた。

本実験に供試した *P. mirabilis* の LD₅₀ の測定は、一夜培養菌を集菌洗浄後 PBS にて各種菌濃度に調製したもの 0.1ml を一群 5 匹の 6 週齢雄スィスマウス尾静脈より注入し、4 日目までのマウスの生死を確認して行い、Reed and Muench の方法¹⁵⁾にしたがって算定した。

3. 付着因子の解析

各菌株の線毛の観察は、菌体を 2%ウラニール酢酸にてネガティブ染色を施して行った。また各菌株における線毛のタイプの判定と線毛保有菌の割合は、ネガティブ染色菌体 100 個を無作為に抽出して調べた。

供試株のラットおよびマウス膀胱上皮細胞への付着能の測定は、剥離した膀胱上皮細胞への付着菌数により求めた。ラットおよびマウス膀胱上皮細胞は、膀胱を摘出、切開後、膀胱腔側を上にして虫ピンで伸展し、スライドグラスにて上皮細胞を PBS 中に剥離し、1 回 PBS で洗浄して破壊細胞を除き調製した。剥離細胞は、ポリ-L-リジン (平均分子量 20,000) 塗布スライドグラスに付着させ、残存のポリ-L-リジンは BSA にてブロックした。膀胱上皮細胞への付着菌数は、*P. mirabilis* 菌液 (1 × 10⁹ cells/ml) を上記スライドグラスに滴下、37°C、30 分間湿箱中でインキュベート後、未結合の菌体を PBS にて十分に洗浄除去したプレパラートをギムザ染色を施した後、検鏡下で算定した。各菌株の細胞付着性は、20 個の剥離膀胱上皮細胞に付着した菌数の平均を求めて比較を行った。

各菌株の赤血球凝集は、市販の各種動物脱織血を PBS にて数回洗浄後、PBS にて 4% 赤血球浮遊液として、1 × 10⁹/ml の菌懸濁液と等量混合後、4°C、20°C、37°C の各温度条件で各々 10 分間の微弱振盪攪拌後判定した。

4. ウレアーゼ活性の測定

ウレアーゼ活性は、Akamatsu により改良された¹⁶⁾インドフェノール法により測定した。一夜 TBS にて培養した菌液を 6,000xg、10 分間の遠心分離により集菌し、2 回 100mM リン酸カリウ

ム緩衝液 (pH 7.7) にて洗浄後、菌体を 50mM リン酸カリウム緩衝液に再懸濁して酵素液とした。Km および Vmax の測定は各種基質濃度における活性を Lineweaver-Burk プロットして求めた。タンパク質量は、Lowry 法にて測定した¹⁷⁾。

5. 運動性および走化性の測定

P. mirabilis の運動性は、長さ 45cm、内径 8mm の U 字形ガラス管に 0.14% 寒天加 TSB を入れ (培地全長 35cm)、一端に菌液 (10⁹ cells/ml) 0.2ml を他端に蛋白量 0.4mg/ml に調製した組織抽出液または PBS を 0.1ml 上層した後 37°C で静置し、培地中の濁りの移動を経時的に測定する事により判定した。組織抽出液に対する走化性は、各供試菌株の組織抽出液側での運動性の促進により判定した。

走化性試験のための組織抽出液は、正常ラット各種臓器を摘出し、PBS 中にて細切洗浄後ポッター型テフロンホモジナイザーにて組織懸濁液とし、10,000xg、30 分間の遠心分離にて未破壊の組織を除去した上清を 0.45μm フィルターにてろ過滅菌して調整した。

6. *P. mirabilis* の血清およびマウス尿中での生存性の測定

供試菌株の血清および尿中での生存性の測定は、一夜培養菌 0.5ml (1 × 10⁹ cells/ml) をそれぞれ等量のヒト血清、子牛血清、ウマ血清と混合後 37°C にてインキュベートし、経時的に菌数の測定を行った。マウス尿中での生存性は、マウス尿 0.45ml に一夜培養菌 50μl (5 × 10⁹ cells/ml) を混合後、37°C にてインキュベートし、経時的に菌数の測定を行った。供試菌の培養によらず尿素添加の影響は、TSB 培地に所定濃度の尿素添加を行い、37°C 弱振盪条件での菌の増殖により調べた。

結 果

1. 供試 *P. mirabilis* の病原性の判定

臨床分離 *P. mirabilis* (No. 2, No. 6, No. 25, No. 30) および実験の対照として毒力の非常に弱いと考えられる教室保存 *P. mirabilis* (No. 1) を用いて、各菌株の毒力の判定をラットの逆行性尿路感染モデル実験による致死活性および腎膿瘍と尿路結石形成の有無により、またマ

Table 1 Analysis of pathogenicity of various *P. mirabilis* strains.

Strains	Pathogenicity on rats			Pathogenicity on mice LD ₅₀
	Died	Cortical abscesses	Urinary stones	
No. 1	0/8	0/8	1/8	4.3×10 ⁹
No. 2	1/8	1/8	1/8	7.9×10 ⁸
No. 6	1/8	3/8	7/8	5.4×10 ⁸
No. 25	2/7	3/7	2/7	1.7×10 ⁷
No. 30	3/8	6/8	3/8	3.5×10 ⁶

Table 2 Distribution of piliated cells in various *P. mirabilis*.

Strains	Type of pili		None
	7 P	5 P	
No. 1	4	8	88
No. 2	2	23	75
No. 6	0	88	12
No. 25	98	0	2
No. 30	2	45	53

Data were expressed as % of each category of *P. mirabilis* cells.

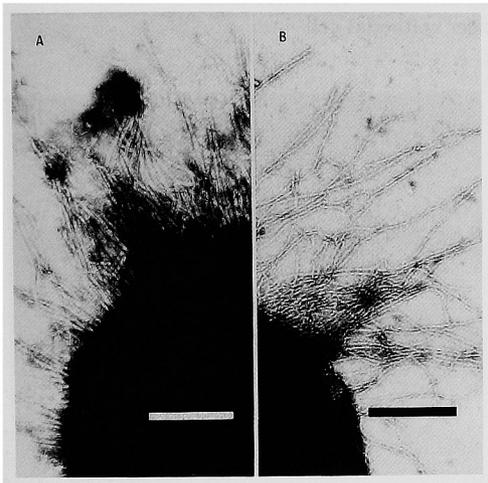


Fig. 1 Electron micrographs of two types of pili observed in clinically isolated *P. mirabilis* strains. A: 7 P pili of No. 25, B: 5 P pili of No. 30. Bar, 100nm.

25および No. 30では各々1.7×10⁷ および3.5×10⁶ と強力な毒性を示した。No. 1 では4.3×10⁹ であった。以上のように臨床分離株は比較的高い病原性を有することが明かとなったので以下の実験においてこれらの菌株における個々の病原性発現因子への解析を加えた。

2. *P. mirabilis* の付着因子の解析

近年、付着に關与する菌体側因子として線毛の存在が重要視されているので、臨床分離 *P. mirabilis* における線毛と各種細胞に対する付着活性に解析を加えた。Fig. 1 に代表的な菌株にみられる線毛のネガティブ染色像を示した。すなわち、線毛の径が7 nm、中空のため線毛の中へ染色液の侵入が認められる直線的な7 P (Fig. 1 A) と、線毛の径が4-5 nm、線毛内に染色液の侵入が認められない曲がりくねっている5 P (Fig. 1 B) に大別された。

ウスに対する致死活性を LD₅₀ の測定により求めた。Table 1 に示したごとく、臨床分離株は全てラットの致死活性、腎膿瘍および尿路結石形成を示した。特に No. 6 株は高率に尿路結石の形成を認め、そのうちの膀胱結石の大きさは4-5 mm径に達するものが多く存在した。No. 25 および No. 30は他の2株の臨床分離株に比べやや高い致死活性を示した。また、No. 30においては腎膿瘍が高率に観察された。一方、No. 1 においては1匹だけ約1 mm径の膀胱結石を有していたが、致死活性および腎膿瘍は全く観察されなかった。

動物通過後 TSB にて継代3代目の各菌株における線毛の種類、線毛保有菌の割合および線毛密度は、ネガティブ染色を施した各菌株を無作為に各々100個選び、電子顕微鏡観察により調べた。結果を Table 2 に示した。No. 2は、5 P 線毛保有菌が23%、7 P線毛保有菌が2%で、各線毛の密度は非常に低かった。No. 6は、5 P 線毛保有菌の割合が88%と高く、7 P線毛保有菌は存在しなかった。また、No. 6はNo. 2と同様菌の個体当りの線毛密度は低かった。No. 25は、98%が7 P 線毛を保有しており、線毛保有菌の線毛密度も非常に高かった (Fig. 1 A)。No. 30は、45%の菌が5 P 線毛を有し、線毛保有菌

マウスにおける LD₅₀ の測定から、臨床分離株は全て10⁸ オーダー以下の菌数を示し、特に No.

Table 3 Adherence of various *P. mirabilis* to bladder epithelial cells of mice and rats.

Strains	Adherence to bladder epithelial cells			
	Mouse cells		Rat cells	
	Distribution*	Mean**	Distribution*	Mean**
No. 1	0 - 1	0.3	0 - 2	0.6
No. 2	0 - 15	0.7	0 - 8	1.2
No. 6	1 - 19	4.8	0 - 11	3.2
No. 25	6 - 145	19.1	2 - 108	27.1
No. 30	1 - 62	17.3	1 - 14	9.3

* : Distribution of adherent bacterial numbers among 20 bladder epithelial cells.

** : Mean of adherent bacterial numbers on one bladder epithelial cell.

における線毛密度は非常に高かった (Fig. 1 B). また, 2%の菌は7P線毛を保有していたが, これらの菌における線毛密度は著しく低かった. いずれの菌株においても同一菌体に2種類の線毛を有するものはなかった. なお, No. 1は線毛保有菌の割合が10%以下であり, 保有菌における線毛密度も著しく低かった.

Table 3には各菌株の剥離したマウスおよびラット膀胱上皮細胞への付着性をまとめた. いずれの菌株においても膀胱上皮細胞への付着菌数には大きなばらつきが存在した. 単一の細胞当りの付着菌数を比較してみると, 線毛のタイプに関係なく, 線毛密度の高い菌株 (No. 25およびNo. 30) において高い付着菌数を示した. それぞれの菌株でマウスとラットの膀胱上皮細胞への付着性に有意差は殆ど認められなかった. なお, これらの菌の付着性は反応液中に0.1Mマンノースの添加を行っても阻止されなかった. Fig. 2は, マウス膀胱上皮細胞へ最も良く菌が付着した例を示した.

線毛のレセプター認識能の特異性に解析を加えるため, 各菌株における各種動物赤血球凝集性に検討を加えた. 血球凝集能は4℃, 20℃, 37℃の各温度条件で調べた. Table 4に示されるごとく, 各菌株共反応温度の上昇に伴った凝集活性の増加と凝集赤血球のスペクトルの広がりが観察された. また, 臨床分離の4株共に鳥類の赤血球を最も良く凝集した. No. 2とNo. 6はほぼ同一の成績を示した. そして, 凝集赤血球のスペクトルが広いNo. 25とNo. 30では

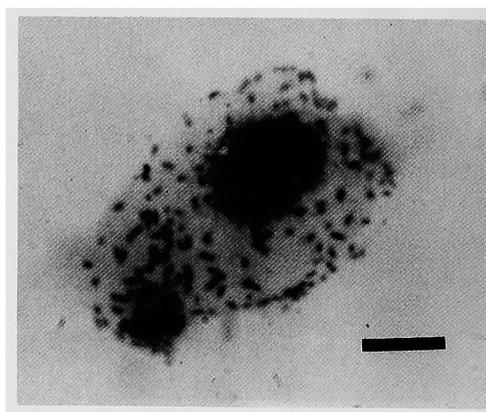


Fig. 2 Micrograph of piliated *P. mirabilis* adherence to exfoliated mouse bladder epithelial cell. The adherence pattern is obtained by No. 25. Bar, 0.1mm.

哺乳動物赤血球に広く凝集を示し, 差としては, 前者のみが羊と家兎の赤血球凝集性を示した. これら菌株において観察された赤血球の凝集性はいずれも反応液へのマンノースの添加で阻害を受けなかった.

3. ウレアーゼ活性およびウレアーゼ阻害剤の影響

ウレアーゼは, *Proteus* 属細菌においてはその産生量が高いことから有力な病原因子と考えられている. 臨床分離 *P. mirabilis* のウレアーゼ活性の測定を行った結果, 培地中に尿素が存在しない場合には菌株に関係なくウレアーゼ活性の80-85%が, 0.6%尿素存在下で培養した場合には90-95%が菌体画分に活性が存在した. そ

Table 4 Agglutinabilities of various *P. mirabilis* against the red blood cells of different animal species.

Strains	Assay temp. (°C)	Red blood cells									
		Human(O)	Horse	Cow	Sheep	Rabbit	Guinea-pig	Rat	Mouse	Goose	Fowl
No. 1	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	37	—	—	—	—	—	1+	—	—	1+	1+
No. 2	4	—	—	—	—	—	—	1+	—	—	—
	20	—	—	—	—	—	—	1+	—	1+	1+
	37	—	—	—	1+	—	1+	1+	—	2+	2+
No. 6	4	—	—	—	—	—	—	1+	—	—	—
	20	—	—	—	—	—	—	1+	—	1+	1+
	37	—	—	—	1+	—	—	1+	1+	2+	2+
No. 25	4	—	—	—	—	—	—	2+	—	3+	3+
	20	3+	1+	2+	1+	1+	2+	2+	2+	3+	3+
	37	3+	1+	3+	2+	2+	3+	2+	2+	3+	3+
No. 30	4	—	—	—	—	—	—	1+	—	—	—
	20	2+	1+	2+	—	—	1+	1+	1+	2+	2+
	37	2+	1+	2+	—	—	1+	1+	1+	2+	2+

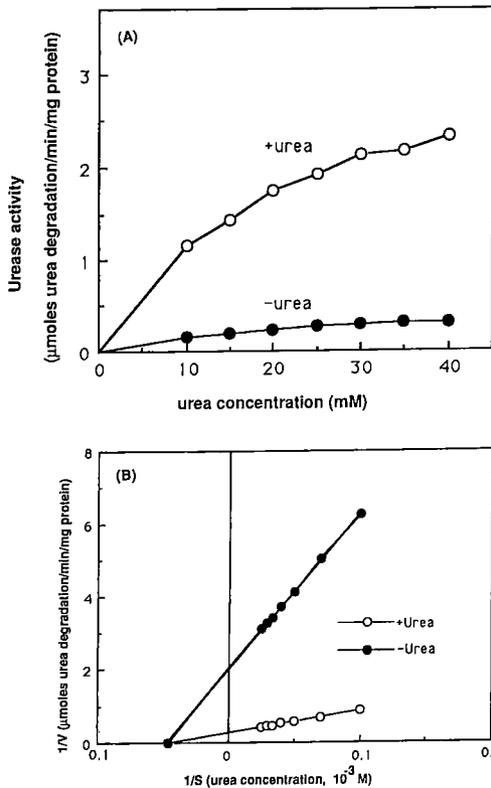


Fig. 3 Urease activities of *P. mirabilis* (No. 25) grown in media with and without urea (A) and those kinetics analysis (B).

Table 5 Summary of urease activity kinetics of various *P. mirabilis* grown in media with or without urea.

Strains	Urea +		Urea -	
	Km	Vmax	Km	Vmax
No. 1	19.8	0.69	20.6	0.44
No. 2	20.1	1.67	20.9	0.47
No. 6	21.2	3.58	20.2	0.49
No. 25	22.2	1.85	22.2	0.46
No. 30	18.4	2.17	20.2	0.47

ここで、菌体を用いて、各種基質濃度におけるウレアーゼ活性の測定を行った。Fig. 3に1例として、尿素有無の条件で培養した No. 25におけるウレアーゼ活性と Lineweaver-Burk プロット図を示した。供試菌5株の Km と Vmax の成績を Table 5 に示したが、培養時における尿素の存在の有無に関係なく Km 値は18.4から22.2mM の範囲に存在しており、各菌株のウレアーゼはほぼ同一の性質を有するものであることが明かとなった。Vmax 値は尿素非存在下で培養した場合、0.44-0.49の範囲内にあり、臨床分離株ではほぼ同一の成績を示した。ウレアーゼは尿素存在下でその産生が誘導されるので、

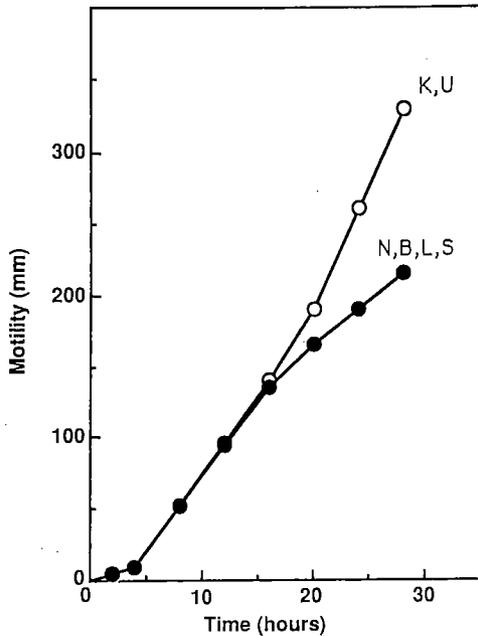


Fig. 4 Analysis of swarming ability and chemotaxis of *P. mirabilis* No. 25 to tissue extracts. The tissue extracts put on terminal side of medium in U-shape tube were abbreviated as kidney (K), ureter (U), spleen (S), liver (L), bladder (B) and PBS (N).

尿素存在下で培養した5株共にVmaxの上昇が観察された。Kmが同じ場合Vmaxの上昇は酵素量の増加と考えられるので尿素存在下で培養した菌におけるウレアーゼVmaxの差は、各菌株の産生する酵素量の差と考えられる。ウレアーゼ産生量は、No. 6, No. 30, No. 25, No. 2, No. 1の順であった。

また、ウレアーゼの特異的阻害剤として知られている2 mg/mlのacetoxyhydroxamic acid^{17),18)}を菌液と共に膀胱注入した場合には、No. 2およびNo. 6では尿路結石と腎膿瘍の形成は全く観察されず、No. 25およびNo. 30では小さい腎膿瘍の形成が観察された。

4. *P. mirabilis* の運動性と走化性

P. mirabilis は腸内細菌科の中でも最も活発な運動能を有している。Fig. 4にNo. 25のU字管での運動能測定結果の一例を示した。約15 cmのところまで組織抽出物の影響が認められず、

Table 6 Summary of chemotaxis assay of *P. mirabilis* to various rat tissue extracts.

Strains	Tissue extracts				
	Bladder	Ureter	Kidney	Liver	Spleen
No. 1	-	-	-	-	-
No. 2	-	-	-	-	-
No. 6	-	+	-	-	-
No. 25	-	+	+	-	-
No. 30	+	+	+	-	-

* : Chemotaxis to rat tissue extracts was measured by U-tube method.

** : Concentration of tissue extracts adjusted to 0.4 mg/ml and 0.1 ml of each used chemotaxis experiments.

組織抽出物を入れた側まで移動してから典型的な運動性の差が観察された。他端にPBSのみを入れてある場合にはいずれの菌株においても4時間目から17時間目までは菌の運動速度はほぼ一定であり、No. 1で8.4mm/h, No. 2で9.0mm/h, No. 6で9.1mm/h, No. 25で10.5mm/h, No. 30で11.8mm/hで菌株による差はほとんど無かった。各菌株において、運動速度の増大が観察された場合を走化性陽性として、Table 6にその結果をまとめた。No. 1およびNo. 2は、いかなる組織抽出物に対しても走化性を示さなかった。一方、No. 6は尿管抽出物に、No. 25は尿管と腎臓抽出物に、No. 30は膀胱、尿管、腎臓抽出物に走化性を示した。なお、肝臓、脾臓抽出物に対してはいずれの菌株も走化性を示さなかった。

5. *P. mirabilis* の血清および尿に対する抵抗性の解析

4株の臨床分離株は、各々50%のヒト血清、子牛血清、ウマ血清と37℃にて1時間インキュベートすると、いずれの株においても90%以上の菌数の低下を観察したが、臨床分離4株間では明確な差異を認めなかった。また、この血清による殺菌作用は非動物血清においてもほぼ同じ成績が得られた。

上記と同様にしてマウス尿とインキュベートした場合においては、菌数の減少は70-80%程度であったが、2%の尿素存在下で菌を培養した場合には、著しい増殖阻害が全ての供試菌において観察された。

考 察

宿主一寄生体関係の解析は感染症発症機序を解明する上で不可欠な条件であり、多くの研究者が種々の寄生体を用いて解析を行っている。P. mirabilis は、尿路感染において、上部尿路、特に腎臓に障害を与える傾向がある点で大きな特徴を有している。本菌では、Senior のグループが積極的に解析を行っており、本菌の病原性発現因子としてウレアーゼが重要であると報告している^{1),3),4)}。Pazin and Braude⁶⁾によれば、菌体特に鞭毛に対する抗体が上部尿路への菌の移行を阻止することから、上部尿路での病原性の発揮は、強い運動性に起因するとしている。他方、Adegbola 等⁸⁾や Wray 等⁹⁾は、線毛の種類と尿路上皮への付着性に解析を加えて、本菌においては腎臓細胞表面のレセプターを特異的に認識して付着する線毛の存在は明かでないとして述べている。彼等とは逆に、Sareneva 等は、組織切片への P. mirabilis の結合能の観察より、MR/P 保有菌が尿細管上皮細胞に、MR/K 保有菌が糸球体と尿管基底膜にそれぞれ特異的に結合すると報告している¹²⁾。さらに、Peerbooms 等¹⁴⁾は、血清の有する殺菌作用に対する抵抗性の差も病原性発現に関係すると報告している。これらの報告の何れにおいても本菌の特異的感染様式を十分に説明できないでいる。

Proteus 属細菌における付着因子としては、マンノースの添加により赤血球凝集 (HA) が阻害されない MR/P 線毛または MR/K 線毛と、マンノース添加により HA が阻害される MS 線毛とが知られている¹⁰⁾。大腸菌では MS 線毛が尿路感染に深く関わっているが¹¹⁾、Proteus では MS 線毛はほとんど観察されず、本実験の供試菌株においても全く観察されなかった。他方、Proteus に存在する 4—5 nm の径を有する 5 P 線毛 (Fig. 1 B) は、形態学的に MR/K 線毛と同一と考えられ、7 nm の径を有する 7 P 線毛 (Fig. 1 A) は、MR/P 線毛に相当すると思われる¹⁰⁾。菌が保有する線毛の種類の違いは、剥離した膀胱上皮細胞への付着性や HA にほとんど影響しなかった (Table 3, Table 4)。さらに、線毛の種類は異なるが線毛を高密度に有

する菌体の多い No. 25 および No. 30 においては、強い HA および剥離した膀胱上皮細胞への付着性が観察された (Table 3)。以上のように、5 P および 7 P 線毛のレセプター認識能は、羊および家兎赤血球凝集性に差が認められる以外に明確な差は認められず、この結果は Adegbola 等⁸⁾の報告ともよく一致していた。

Pazin and Braude⁶⁾は、Proteus 菌を鞭毛または菌体に対する抗体で処理することにより、菌の膀胱から腎臓への上行が阻止されるので菌の上行感染には運動性が重要であることを指摘している。本実験においては、軟寒天培地を入れた U 字管における各供試菌株の運動性を調べたが、いずれの株も強力な運動性を示し、各株間の運動性にほとんど差を認めなかった。しかし、組織抽出物に対する走化性に検討を加えた結果、特に腎臓に対する病原性の強いと思われる No. 25 および No. 30 では、腎臓抽出物に対する走化性が観察された。このことは、P. mirabilis が高頻度に腎臓感染を起こす一因としてこの走化性の強さが重要な因子となっている可能性を強く示唆している。

ウレアーゼは以前より良く知られた Proteus 属細菌の病原性発現因子であるが^{3),5)}、これが最重要の組織障害因子である可能性は Table 1 および Table 5 の結果を比較することにより明かである。ウレアーゼ産生量の高い No. 6 において高頻度に尿路結石が形成されるが、これらはほとんどが膀胱結石であり腎臓組織中での結石形成は認められなかった。ウレアーゼが尿路特に膀胱内での尿素分解に伴った尿のアルカリ化による結石形成に関与している事は明かである。なお、腎局所でのウレアーゼの関与は明確にできなかったが、ウレアーゼの特異的阻害剤 aceto-hydroxamic acid の注入実験¹⁸⁾で腎臓瘍の形成が著しく軽減したことや Griffith and Musher の報告より¹⁹⁾、本酵素の腎障害への関与は明かなものと考えられる。ウレアーゼを強力に産生する菌による組織障害は、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、あるいは慢性胃炎患者から高頻度に検出される Helicobacter pylori においてよく研究されている。Hazell 等^{20),21)}は、本菌ウレアーゼと消化性潰瘍との関連を強調している。しかし本実験に

において、直接的に組織障害性と *P. mirabilis* ウレアーゼの関係は明瞭に出来なかった。

Table 1 に示した総合的な病原性判定結果と個々の因子に関する解析結果の関連を各菌種についてまとめると次の如くなる。No. 30は、付着性、ウレアーゼ、走化性いずれをとっても強い活性を示し、ラットでの高率の膿瘍、結石形成およびマウスでの致死活性の高いこともよく一致していた。No. 25は、付着性と走化性はNo. 30とほぼ同じであったが、ウレアーゼ活性が低かったため結石は2/7にとどまった。No. 6においては、ウレアーゼ活性が最も強力であったので観察された膀胱結石は極めて大きかった。付着性は弱く、走化性も尿管に対してのみ示すNo. 6に腎臓に対する病原性は期待できないはずであるにもかかわらず、高率に腎膿瘍を認めたことは、膀胱結石のため尿の滞留に伴った菌の腎臓への流入があったためと考えられる。また、No. 1およびNo. 2のようにいずれも病原性が弱いかまたは無い場合には全ての病変がほとんど認められなかった。

以上の点から、*P. mirabilis* による尿路感染時における病原性発現過程は、

- 1) 菌の膀胱侵入後膀胱上皮への付着定着のための付着因子、
- 2) 膀胱内侵入後の尿成分に対する菌の抵抗性、
- 3) 強力な運動性と走化性による腎臓への上行、
- 4) 腎臓への上行後、強力なウレアーゼ活性による結石の形成および組織障害の進行よりなり、これら諸因子の全てあるいは一部の関与により病原性の強さあるいは病態が異なる

ものと考えられる。

結 論

本研究では、病原性の異なる臨床分離 *P. mirabilis* を用いて、尿路感染症における *P. mirabilis* の病原性発現過程に、1) 菌の膀胱内侵入後尿路上皮への付着・定着、2) 尿成分に対する菌の抵抗性、3) 強力な運動性により腎臓への上行、4) 腎臓への上行後、菌の産生する強力なウレアーゼによる組織障害の進行等の観点から解析を加えた。

その結果、高い病原性を有する *P. mirabilis* (No. 25, No. 30) は、5P または7P 線毛の種類には関係なく、個々の菌体における線毛密度の高いものが尿路上皮への高い付着性を示した。これらの強病原性発現株では、運動性は他の弱病原性株と異ならないが、尿路臓器抽出物に対して強力な走化性を示す点で異なっていた。更に、臨床分離 *P. mirabilis* における病原性の発現は、前述の要因に、尿中尿素の存在によりその産生が誘導されるウレアーゼによる尿路結石形成と腎臓組織の障害が加わることにより、*P. mirabilis* に特異的な上部尿路での病原性が発現されることが明かとなった。

稿を終えるにあたり御指導御校閲を賜りました恩師金政泰弘教授に深謝致します。なお、実験にあたり御指導頂きました友近健一講師に感謝の意を表します。更に、有益なるご助言を頂きました平井義一助教授はじめ教室の皆様、菌株の御分与並びに数々の御助言を頂きました本学泌尿器科学教室大森弘之教授、公文裕巳助教授に厚く感謝致します。

文 献

- 1) Senior BW : *Proteus morgani* is less frequently associated with urinary tract infections than *Proteus mirabilis*. An explanation. J Med Microbiol (1983) 16, 317-322.
- 2) Braude AI, Shapiro AP and Siemienski J : Hematogenous pyelonephritis in rat. iii. Relationship of bacterial species to the pathogenesis of acute pyelonephritis. J Bacteriol (1959) 77, 270-280.
- 3) Senior BW, Bradford NC and Simpson DS : The ureases of *Proteus* strains in relation to virulence for the urinary tract. J Med Microbiol (1980) 13, 507-512.
- 4) Senior BW : The special affinity of particular types of *Proteus mirabilis* for the urinary tract. J Med

- Microbiol (1979) **12**, 1—8.
- 5) MacLaren DM : The significance of urease in *Proteus* pyelonephritis : A histological and biochemical study. J Pathol (1969) **97**, 43—49.
 - 6) Pazin GJ and Braude AI : Immobilizing antibodies in urine. II. Prevention of ascending spread of *Proteus mirabilis*. Invest Urol (1974) **12**, 129—133.
 - 7) Silverblatt FJ : Host-parasite interaction in the rat renal pelvis. A possible role for pili in the pathogenesis of pyelonephritis. J Exp Med (1974) **140**, 1696—1711.
 - 8) Adegbola RA, Old DC and Senior BW : The adhesins and fimbriae of *Proteus mirabilis* strains associated with high and low affinity for the urinary tract. J Med Microbiol (1983) **16**, 427—431.
 - 9) Wray SK, Hull SI, Cook RG, Barrish J and Hull RA : Identification and characterization of a uroepithelial cell adhesin from a uropathogenic isolate of *Proteus mirabilis*. Infect Immun (1986) **54**, 43—49.
 - 10) Old DC and Adegbola RA : Haemagglutinins and fimbriae of *Morganella*, *Proteus* and *Providencia*. J Med Microbiol (1982) **15**, 551—564.
 - 11) Duguid JP and Old DC : Adhesive Properties of *Enterobacteriaceae*. Beachey EH Ed "Bacterial Adherence" (1980) p 185—217, Chapman and Hall, London.
 - 12) Sareneva T, Holthofer H and Korhonen TK : Tissue-binding affinity of *Proteus mirabilis* fimbriae in the human urinary tract. Infect Immun (1990) **58**, 3330—3336.
 - 13) Larsson P and Olling S : O antigen distribution and sensitivity to the bactericidal effect of normal human serum of *Proteus* strains from clinical specimens. Med Microbiol Immunol (1977) **163**, 77—82.
 - 14) Peerbooms PG, Marian A, Verweij JJ and MacLaren DM : Urinary virulence of *Proteus mirabilis* in two experimental mouse models. Infect Immun (1982) **36**, 1246—1248.
 - 15) Reed LT and Muench H : A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am J Hyg (1938) **27**, 493—497.
 - 16) Akamatsu S : Some Micromethods for Enzyme Studies. J Biochem (1952) **39**, 203—210.
 - 17) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ : Protein measurement with Folin phenol reagent. J Biol Chem (1951) **193**, 265—257.
 - 18) Griffith DP, Musher DM and Campbell JW : Inhibition of bacterial urease. Invest Urology (1973) **11**, 234—238.
 - 19) Griffith DP and Musher DM : Prevention of infected urinary stones by urease inhibition. Invest Urology (1973) **11**, 228—233.
 - 20) Ferrero RL, Hazell SL and Lee A : The urease enzymes of *Campylobacter pylori* and a related bacterium. J Med Microbiology (1988) **27**, 33—40.
 - 21) Carrick J, Lee A, Hazell SL, Ralston M and Daskalopoulos G : *Campylobacter pylori* duodenal ulcer and gastric metaplasia possible role of functional heterotropic tissue in ulcerogenesis. Gut (1989) **30**, 790—797.

**Analysis of pathogenic factors of *Proteus mirabilis* isolated
from urinary tract infection**

Katsuhisa MUROTANI

**Department of Microbiology,
Okayama University Medical School,
Okayama 700, Japan**

(Director : Prof. Y. Kanemasa)

Proteus mirabilis has several pathogenic factors such as adherent ability to urinary tract epithelial cells, urease, motility and resistance to urine. The pathogenic activities of clinically isolated *P. mirabilis* were analyzed. Higher pathogenic strains (No. 25 and No. 30) which had morphologically different pili but had a higher density of pili showed strong adherent activity to bladder epithelial cells of mouse and rat. These strains also showed a clear chemotaxis to urinary tract tissue extracts. These findings indicate that the combination of adherent, chemotaxis and urease activities is essential for causing of typical kidney infection by *P. mirabilis*.