

紫色蓄尿バッグ症候群に関与する新しい色素の検出

¹⁾永生病院検査科, ²⁾同・内科, ³⁾昭和大学医学部細菌学教室

柳川 容子¹⁾³⁾ 安藤 高夫²⁾ 島村 忠勝³⁾

(平成 14 年 5 月 14 日受付)

(平成 14 年 9 月 25 日受理)

Key words : purple urine bag syndrome, indigo blue, indigo red, new pigment

要 旨

紫色蓄尿バッグ症候群 (PUBS) にインジゴ青及び赤の色素が関与することは、以前から知られているが、これら以外の色素の関与についての報告は今までにない。

我々は、4 例の PUBS 患者の蓄尿バッグすべてからインジゴ青及び赤のほかに 3 種類の未知の赤色色素を分離した。そのうち 1 種類は肉眼では観察できず、紫外線照射時にのみ認められた。インジゴ青及び赤と未知の色素群の出現パターンは、2 例において完全に一致したが、他の 2 例においてはそれぞれ異なっていた。

さらに患者の尿から分離した細菌を用いて、インジカン添加アルカリ性培地 (pH9) で色素産生の再現を行った結果、80% 以上の細菌が *in vitro* で色素を産生した。色素産生が著明であった検体 1 の細菌 (*E. coli*, *M. morgani*, *Enterococcus*. sp.) は、すべてインジゴ青と赤双方の色素を同時に産生したが、未知の 3 種類の色素の産生を *in vitro* で確認することは、できなかった。

〔感染症誌 77: 10~17, 2003〕

序 文

近年、医療技術が進歩し、入院患者に膀胱内留置カテーテルを挿入し尿路を安全に確保する例が多い。しかし、カテーテルの長期挿入は尿路感染症を増加させ、しばしば蓄尿バッグ壁が紫色に着色する、いわゆる紫色蓄尿バッグ症候群 (PUBS) へと発展することがある。

本疾患は、尿路感染症と慢性便秘が合併する際に出現するといわれているが、1978 年に Barlow¹⁾らの最初の報告から、わが国を含め数例の報告^{2)~5)}があるにすぎない。

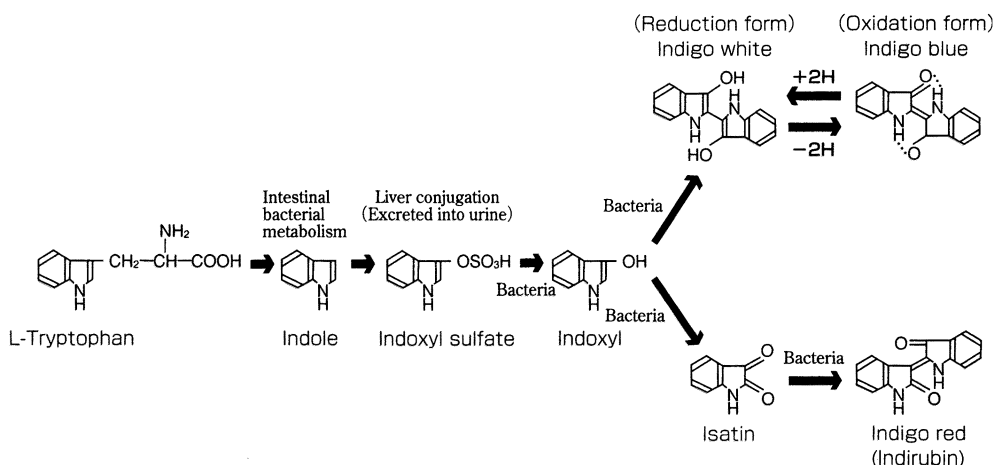
この反応は、トリプトファン代謝物の研究から (Fig. 1) 生合成経路が提唱され、トリプトファンか

らインジゴ青 (インジゴ) およびその異性体であるインジゴ赤 (インジルピン) の生成過程については、すでに解明されている⁶⁾。すなわち、ヒトの腸管内でトリプトファンは、細菌により有害なインドールに変換され、そのまま吸収されて肝臓で硫酸抱合後、無害なインジカン (indoxyl sulfate) として尿中へ排泄される。膀胱内バルーンカテーテルを挿入された患者は、尿路内に細菌が生息しているケースが数多くあり、これらの細菌によりインジカンは一旦、加水分解されインドキシルに変換されこのインドキシル 2 分子が縮合してインジゴ青となる。一方、インドキシルがさらに酸化されてイサチンとなり、イサチン 2 分子が縮合してインジゴ赤になる。これらの色素がプラスチック製の蓄尿バッグに付着するために PUBS が発現すると考えられている。

別刷請求先: (〒142-8555) 東京都品川区旗の台 1—5—8

昭和大学医学部細菌学教室 柳川 容子

Fig. 1 Production process from tryptophan to indigo blue and indigo red



我々は、PUBS の蓄尿バッグから赤紫色や紫色に着色した色素成分を抽出し、薄層クロマトグラフィー(TLC)で青色色素と赤色色素を単離した。これ以外に、インジゴ赤とは異なる2種類の未知の赤色色素や、紫外線照射時にのみ出現する未知の淡い赤色色素が検出されたのでここに報告する。

材料と方法

1. PUBS 患者：患者4名は永生病院における長期入院者で1994年9月から10月の2カ月間にこの現象を呈した患者である。

2. 尿の生化学的検査

検査した尿は肉眼的観察後、尿定性用試験紙(ウロペーパー, UHAGS, 栄研)を用いて生化学的検査を行った。結晶は、尿を500G、5分間遠心後、沈渣を鏡検した。

3. 尿の細菌学的検査

尿は、生理食塩水の10倍希釈系列を作成し、各希釈液をDHL寒天培地(栄研)、血液寒天培地(日水)、馬血液加フェニルエタノール寒天培地(Difco, USA)に100 μ lずつ接種し、37 $^{\circ}$ C、24時間培養した。発育したコロニーはグラム染色、オキシダーゼ試験、カタラーゼ試験を行い、同定はAPI20E、(バイオメリュー・パイテック社、仏)を用いた。細菌数は10⁴/ml以上を+++, 10²~10³/mlを++, 10¹/mlを+で表した。

4. 蓄尿バッグの色素試料の調整

着色した蓄尿バッグの色素をアセトン(和光純薬)5mlで洗浄し、減圧濃縮後クロロホルム(第一科学)0.3mlに溶解させ、不溶部を除去した。可溶成分を再び減圧濃縮し、以後の試験用試料とした。

5. 薄層クロマトグラフィー(TLC)による色素の分離と同定

色素を分離するためにTLCを行った。silica gel G₆₀F₂₅₄(Merk, 独)を使用し、展開溶媒にはクロロホルム：メタノール(和光純薬)20：1を使用した。一方、各色素成分の分取を目的に同一展開剤を用いて調整用TLCを行い、青色色素および赤色色素を単離した。各色素の部分を掻き取りクロロホルムで抽出し、紫外線分光光度計(日立製作所, U-3210)および電子質量分析計(日本電子, JEOLJMS-AX505WA)を用いて分析した。

測定条件は、イオン化電圧70eV、加速電圧3.0KVである。なお、青色色素の標品インジゴ青はSigma社(USA)を使用した。

6. *in vitro*での色素産生の再現

患者の尿から分離された各々の細菌を、梅木⁷⁾らの方法により、pH9に調整した0.3%インジカン加トリプチックソイブロス(Difco, USA)30mlの培地に単独に接種し、37 $^{\circ}$ C、3週間培養した。培養液全体の着色(赤紫色から青色)が一番顕著な症例1について、蓄尿バッグと同様に色素の抽出

Table 1 Clinical features and urinary findings of the 4 patients with PUBS

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4
Age/Sex	89/F	77/F	88/F	76/F
Diagnosis	Hypertension	Cerebral infarction	Cerebral infarction	Cerebral infarction
Chronic constipation	—	+	+	—
Urinary examination				
Color	Yellow	Yellow	Pale yellow	Pale yellow
Odor	++	++	++	++
Turbidity	+	++	++	++
pH	7	7	8	9
Protein	±	+	—	—
Glucose	—	—	—	—
Urobilinogen	±	±	±	±
Occult blood	±	—	+	—
Crystals	—	Ammonium urate Calcium carbonate	Magnesium-ammonium phosphate	Magnesium-ammonium phosphate

Table 2 Bacteria isolated from the urine of PUBS patients

Case 1		Case 2		Case 3		Case 4	
<i>E. coli</i>	++	<i>E. coli</i>	++	<i>K. pneumoniae</i>	++	<i>C. freundii</i>	++
<i>M. morganii</i>	++	<i>K. pneumoniae</i>	++	<i>C. freundii</i>	++	<i>P. aeruginosa</i>	++
<i>P. aeruginosa</i>	+	<i>P. mirabilis</i>	++	<i>P. mirabilis</i>	++	<i>P. mirabilis</i>	++
<i>Enterococcus sp.</i>	++	<i>Enterococcus sp.</i>	++			<i>K. pneumoniae</i>	++
						<i>Enterococcus sp.</i>	++

The viable number of bacteria in the urine was measured on DHL agar, Blood agar and Phenylethanol blood agar for 24hrs at 37°C.

Number of bacteria: ++, 10^4 cfu/ml; ++, $10^2 \sim 10^3$ cfu/ml; +, 10^1 cfu/ml.

を行い TLC を用いて色素成分の同定を行った。

成 績

1. 患者の臨床像と尿の性状

4 患者の臨床症状については、特記すべき事項は見られないが、高齢の女性で、2 例に慢性の便秘が認められた。尿は混濁が強く悪臭を呈し、何らかの尿路感染症が予測された。尿の pH は 4 例中 2 例がアルカリ性を示し、3 例からは、沈渣からアルカリ性の尿で出現することが多いリン酸アンモニウム・マグネシウム塩の結晶や、尿酸アンモニウム塩の結晶が認められた (Table 1)。

2. 細菌学的検査

全患者の尿からグラム陰性桿菌を主体とした複数の細菌が分離された (Table 2)。

3. 蓄尿バッグから抽出された色素の色

蓄尿バッグから抽出された色素はどれも濃い紫

色であった。

4. 色素の分離、同定

TLC を用いて分離した結果、4 検体とも青色と赤色の二種類の色素が分離された。青色色素の Rf 値は 0.54~0.61、赤色色素の Rf 値は、0.37~0.41 を示し、インジゴ青標品の Rf 値は 0.68、0.62 を示した (Fig. 2)。

青色色素とインジゴ青標品の Rf 値に差があるため、両者を混合して再び TLC を行った結果、同スポットとして分離された (データ未掲載)。したがって前者はインジゴ青と同じ物質と推察された。しかし、Fig. 2 では試料の量が少ないため精査を行う目的で带状に色素をスポットして TLC を行った。

4 試料とも Fig. 2 と同様に青色色素 (A) と赤色色素 (B) の 2 種類の色素が分離されたほか、1

の検体では赤色色素よりも Rf 値の低い 2 種類の未知の赤色色素 (C, D) が, 2 と 4 の検体でも同様の赤色色素 (D) が 1 種類検出された. またこれらの色素よりさらに Rf 値が低く, 紫外線照射にの

み出現する淡赤色の色素 (E) も 2, 3, 4 の検体で検出された (Fig. 3). 未知の色素群の出現パターンは, 検体 2 と 4 で完全に一致したが, 検体 1 と 3 では, それぞれ異なっていた.

さらに検体 1 から単離した青色色素の UV—可視スペクトルは λ_{\max} 604.8nm に, 特徴的な極大吸収を示し, 本吸収は標品のインジゴ青とほぼ同一のスペクトルが得られた (Fig. 4). これらの結果から, 青色色素はインジゴ青と考えられた.

一方, 単離した赤色色素は, λ_{\max} 540.4nm に特徴的な極大吸収を示し, 青色色素の吸収とは明らかに異なっていた (Fig. 5). そこで本物質を同定するために EI-Mass スペクトル分析を行った (Fig. 6 上). 本物質の分子イオンピークは, (M^+ イオン) m/z 262 を与え, その他の主要なフラグメントイオンとして m/z 234 (M^+-CO), m/z 205 ($M^+-CO-HCO$), m/z 179, m/z 151, m/z 131, m/z 103 を示した.

同様に, 標品のインジゴ青の, EI-Mass スペクトラム (Fig. 6 下) は分子イオンピークとして, m/z 262 を示し, 両者は RT が酷似していることから, 分子量は 262, 分子式 $C_{16}H_{10}N_2O_2$ であると考

Fig. 2 Thin layer chromatogram (spot analysis) on silica gel of pigments obtained by urine bag in 4 patients

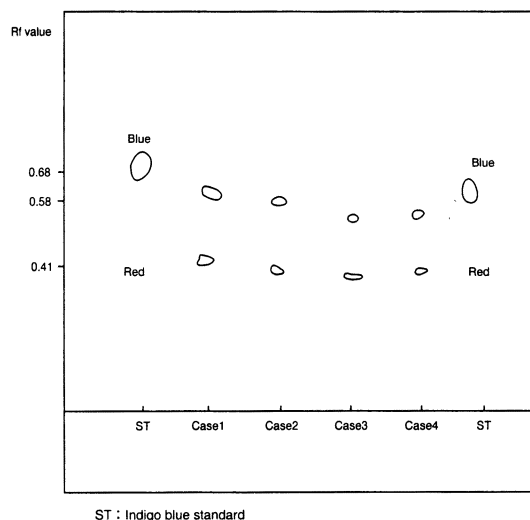


Fig. 3 Thin layer chromatogram (streak analysis) on silica gel of pigments obtained by urine bag in 4 patients

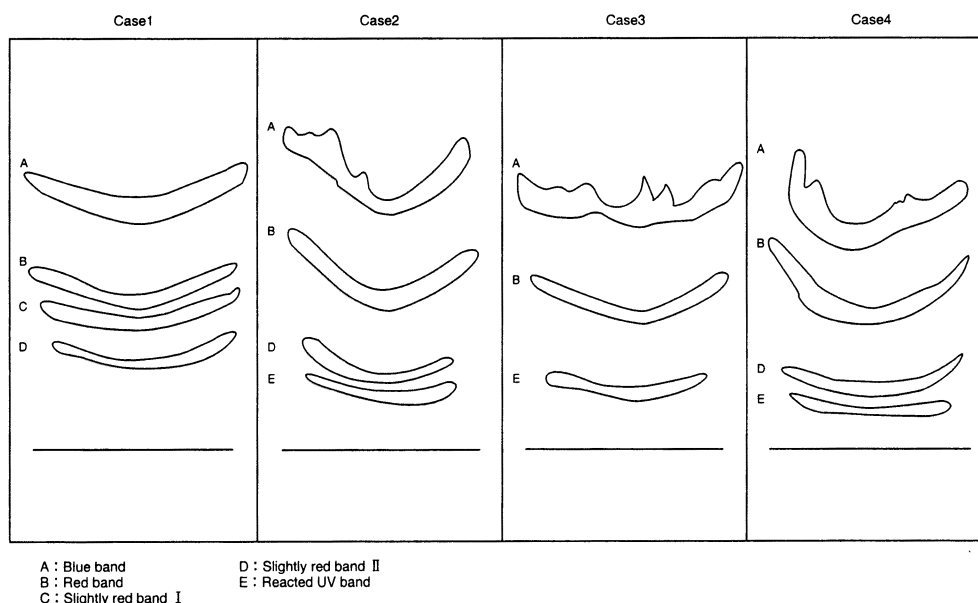
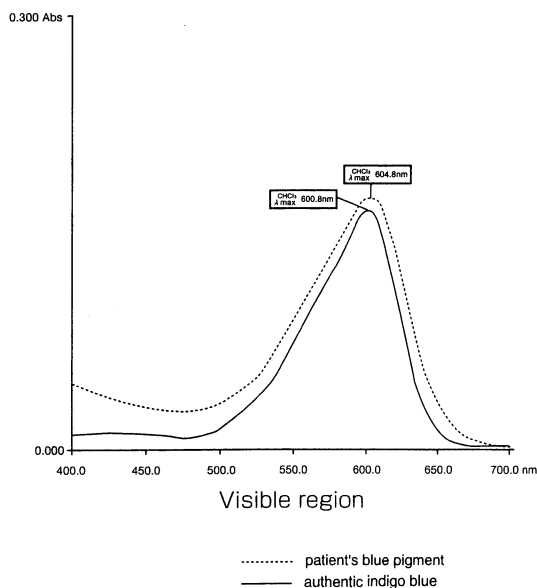


Fig. 4 UV-visible spectrums of the blue pigment from a patient and indigo blue authentic specimen.



えられた。

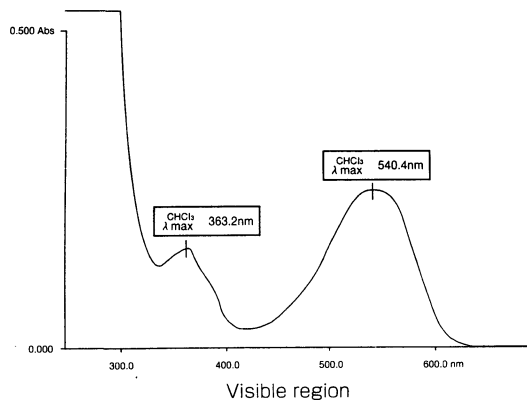
5. *in vitro* での色素産生の再現

検体1と4の *Pseudomonas aeruginosa* と検体4の *Proteus mirabilis* の3株を除くすべてのグラム陰性桿菌と *Enterococcus* sp.(13株)は、pH9のアルカリ性インジカン添加液体培地で色素を産生した(色素産生率81.3%)。特に色素産生が著明な検体1の3株(*Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Enterococcus* sp.)の色素をTLCで調べた結果、3菌種ともにすべて青色色素(インジゴ青)と赤色色素(インジゴ赤)の双方を産生した(データ未掲載)。

考 察

今回我々は、着色した蓄尿バッグから色素抽出を行い、薄層クロマトグラフィー、紫外線分光光度計、電子質量分析計を用いて青色色素をインジゴ青、赤色色素をインジゴ赤と同定した。このほかに紫外線照射時にのみ出現する色素を含み、3種類の未知の赤色色素を確認した。各々の未知の色素の出現パターンは、2検体で完全に一致したが、残りの2検体ではそれぞれ異なっていた。これは、患者により尿から検出される細菌が異なるためと考えられた。このことを確認するために、

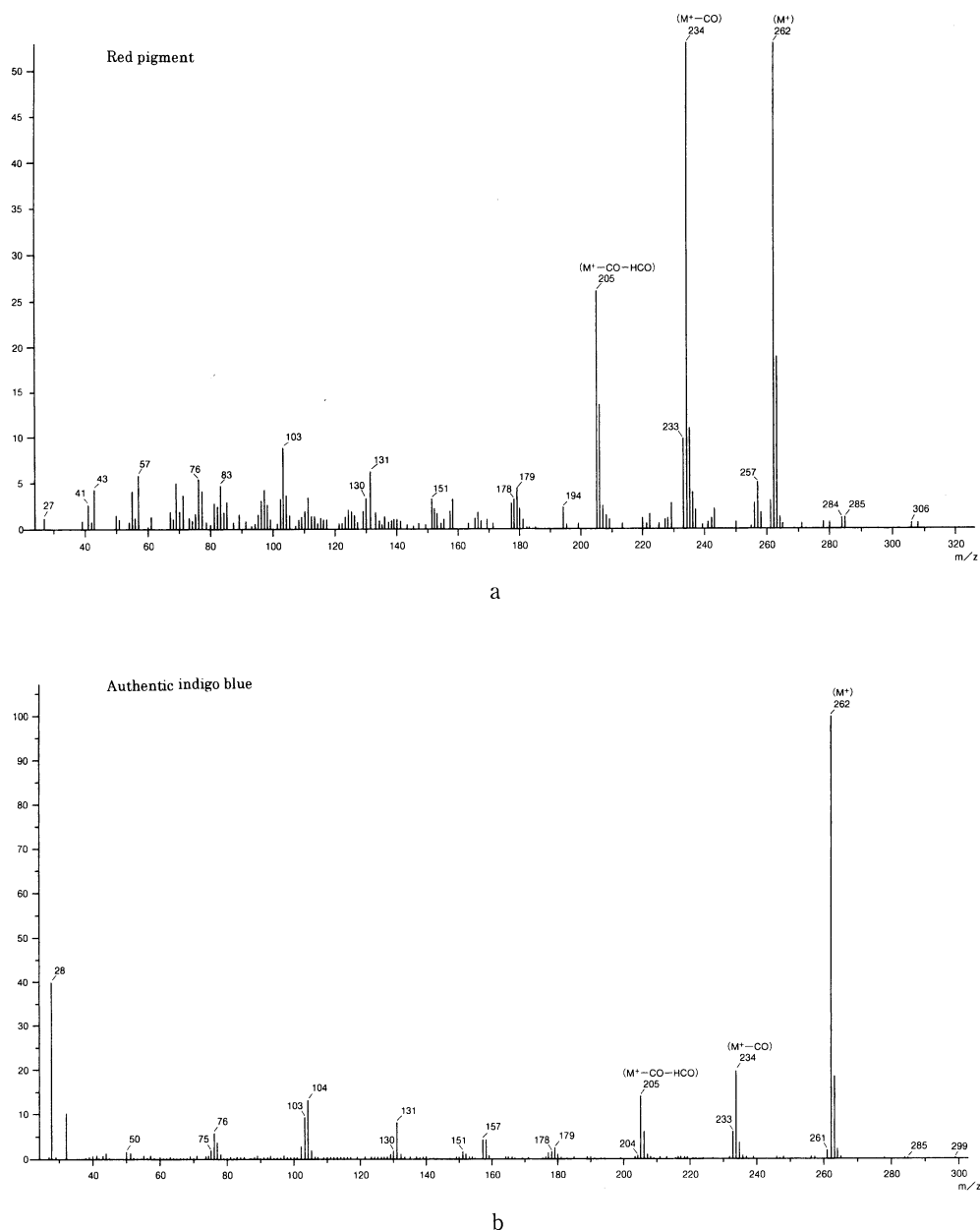
Fig. 5 UV-visible spectrum of the red pigment from a patient.



尿から分離された細菌を用いて *in vitro* での色素産生実験を行った。しかし、蓄尿バックに比べ色素の産生量が少なく、Fig.3のように帯状にスポットしてTLCを行うほどの試料を得ることができなかった。そのためインジゴ青及び赤の色素の産生は確認できたが、未知の赤色色素の産生は、確認できなかった。従って、個々の細菌がどの未知の色素の産生に関与しているかは不明であった。しかし、これらの未知の色素が今回検討を行った4検体すべてから検出されたことから、蓄尿バックの着色にインジゴ青、インジゴ赤以外の複数の色素が関与している可能性が示された。

今回、尿から分離された細菌を個々にpH9のインジカン入り液体培地に接種して *in vitro* で色素の再現を行った。我々が経験した4例のうち、尿中pHが9を示したものは1例のみであったが、この症例を含め3例の沈渣からアルカリ性の尿から検出されることが多いリン酸アンモニウム・マグネシウム結晶や尿酸アンモニウム結晶が認められたこと、蓄尿バッグ内にたまっている尿のpHがすべて9前後を示したこと、梅木³⁾もpH9のインジカン添加培地で色素産生を再現していることなどから色素産生実験をpH9で行った。当初、インジゴ青または赤は別々の細菌が個々に産生するのではないかと考えたが、この実験で色素を産生する菌種は、インジゴ青及び赤の双方を同時に産生していることが判明した。Hart⁸⁾らも、*E. coli* に *Rho*-

Fig. 6 EI-Mass spectrum of the red pigment (top) from a patient and authentic indigo blue (bottom).



dococcus の DNA を組み込み、色素産生を再現し、インジゴ青及び赤の双方の産生を確認している。

Dealler⁶⁾らは、7.9mM のインジカンを添加した寒天培地に 150 株、41 菌種の臨床から分離された細菌を接種し、インジゴの産生を調べている。色

素が産生されたものは、*Providencia stuartii* 17 株、*Enterobacter agglomerans* , *Klebsiella pneumoniae* 各々 1 株の 3 菌種 19 株のみであった(色素産生率 12.7%)。

我々は、ほぼ同じ濃度のインジカンを液体培地

に添加し、培養を3週間と長く続けた結果、PUBSの患者から分離された7菌種、16株の細菌中6菌種13株から色素産生が高率に再現できた(色素産生率81.3%)。この結果から、*in vitro*における色素産生の再現には、寒天培地よりも長時間の培養が可能な液体培地が適することが判明した。

特定の疾病との関連については、小児の blue diaper syndrome⁹⁾で知られている、腎石灰症とインジカン尿を特徴とする家族性高カルシウム血症や回腸導管造設術後¹⁰⁾に PUBS が出現するとの報告がある。その他、晩発性皮膚ポルフィリン症¹¹⁾、クローン病、白血病¹²⁾の患者の尿から、インジゴ青とインジゴ赤を分離したとの報告もある。Blanz¹²⁾らは白血病患者の尿からインジゴ青およびインジゴ赤を高分解能 Mass スペクトルおよび 1H-NMR の双方から同定した。これらの結果と我々の得た EI-Mass スペクトルは完全に一致した。

なお本論文の要旨は、第69回日本感染症学会総会学術講演会で報告した。

謝辞：稿を終えるにあたり、色素の分析にご指導を戴いたわかもと製薬(株)発酵研究室室長、大橋良民博士、有益なご助言を戴いた昭和大学医学部細菌学教室、佐々木武二博士に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Barlow GB, Dickson JAS : Purple urine bags. Lancet 1978 ; i 220—1.
- 2) 信国圭吾, 河原 伸, 永礼 旬, 藤田裕子 : Purple urine bag syndrome の5症例の着色機序に関する検討. 感染症誌 1995 ; 69 : 1269—71.
- 3) 梅木茂宣, 馬場清一 : 紫色蓄尿バッグ症候群(PUBS). 日本医事新報 1994 ; 3664 : 37—40.
- 4) 松尾啓左, 石橋経久, 荒木長太郎, 酒巻宏行, 馬詰裕之, 植木幸孝, 他 : *Escherichia coli*, *Morganella morganii* 両菌種共存による紫色採尿バッグ症候群の3症例. 感染症誌 1993 ; 67 : 487—90.
- 5) 峯山浩忠, 狩野健一, 武藤正樹, 林 勝満, 渋谷信蔵 : 採尿バッグの赤紫色化. 臨秘 1993 ; 47 : 789—91.
- 6) Dealler SF, Hawkey PM, Millar MR : Enzymatic degradation of urinary indoxyl sulfate by *Providencia stuartii* and *Klebsiella pneumoniae* causes the purple urine bag syndrome. J Clin Microbiol 1988 ; 26 : 2152—6.
- 7) 梅木茂宣 : 高度アルカリ尿における purple urine bag syndrome. 感染症誌 1993 ; 67 : 1172—7.
- 8) Hart S, Koch KR, Woods DR : Identification of indigo-related pigments produced by *Escherichia coli* containing a cloned Rhodococcus gene. J Gen Microbiol 1992 ; 138 : 211—6.
- 9) Drummond KN, Michael AF, Ulstrom RA, Good RA : The blue diaper syndrome : Familial hypercalcemia with nephrocalcinosis and indicanuria. Am J Med 1964 ; 37 : 928—48.
- 10) Hildreth TA, Cass AS : Blue collection bag after ileal diversion. Urology 1978 ; 11 : 168—9.
- 11) Jackson AH, Jenkins RT, Grinstein M, Sancovich A-MF, Sancovich HA : The isolation and identification of indigoid pigments from urine. Clin Chim Acta 1988 ; 172 : 245—52.
- 12) Blanz J, Ehninger G, Zeller K-P : The isolation and identification of indigo and indirubin from urine of a patient with leukemia. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 1989 ; 64 : 145—56.

Detection of New Pigments Related to Purple Urine Bag Syndrome

Yoko YANAGAWA¹⁾³⁾, Takao ANDOH²⁾ & Tadakatsu SHIMAMURA³⁾¹⁾Departments of Clinical Laboratory and ²⁾Internal Medicine, Eisei Hospital³⁾Department of Microbiology and Immunology, Showa University School of Medicine

It is well known that participation of two kinds of pigments, indigo blue and indigo red, are concerned with purple urine bag syndrome (PUBS).

However, there is no research which describes the participation of other pigments. We separated three new kinds of red pigments, other than indigo blue and indigo red, from four patients with PUBS. One of the pigments was not visible to the naked eye and appeared only when an ultraviolet ray was irradiated. The appearance patterns of indigo blue, indigo red and the three new red pigments were in complete agreement in two cases, but differed in the other two cases.

Moreover, bacteria isolated from the urine were cultured in an indican-added alkaline liquid media (pH9), 80% or more bacteria produced purple pigments. In case 1, from deep-colored pigments, each bacterium produced both indigo blue and indigo red, although new pigments could not be observed in the *in vitro* media.