非淋菌性尿道炎に於ける Pleuropneumonia-Like Organisms (PPLO) に関する知見補遺

第Ⅱ編 PPLO の病原性に関する実験的研究

- I PPLO 人尿性器株の孵化鶏卵内培養
- II. PPLO 人尿性器株のマウス皮下接種実験
- III. PPLO 人尿性器株の猿の尿道内接種実験

大阪通信病院泌尿器科 (主任 山本 弘博士)

大阪大学微生物病研究所真正細菌学部 (部長 藤野恒三郎教授)

倉 岡 雍 男

Supplementary Studies on Pleuropneumonia-Like Organisms in Non-Gonococcal Urethritis in Males

II : Experimental Studies on Pathogenicity of Pleuropneumonia-Like Organisms (PPLO) of Human Genital Origin

Yasuo KURAOKA

*From the Department of Urology, Osaka Teishin Hospital
(Director : H. Yamamoto, M. D.)*

*From the Department of Bacteriology, Research Institute for
Microbial Diseases, Osaka University, Osaka
(Director : Prof. T. Fujino)*

1) The cultivation of PPLO in the developing chick embryo.

Three strains of PPLO isolated from the human genitourinary tract were cultivated in the developing chick embryo; two strains had been isolated from non-gonococcal urethritis in the male and one strain ("Campo L") isolated in America. Seven day old embryos were used for the yolk sac and the chorioallantois cavity routes of inoculation.

All 3 strains grew well in the chick embryo and they were grown consecutively for 9 transfers when they were inoculated by the yolk sac route.

No increase in mortality or no pathological involvement could be observed in the infected chick embryo.

2) Subcutaneous inoculation of PPLO in mice.

Seven strains of PPLO were examined to determine their pathogenicity for mice; 6 strains had been isolated from non-gonococcal urethritis in the male and 1 the "Campo L" strain. Cultures of each of these strains were subcutaneously inoculated in mice.

All except 1 of the 7 strains did not affect mice after subcutaneous inoculation. Only the "Campo L" strain produced local abscesses in mice by injection into the foot pads.

3) Intra-urethral inoculation of PPLO in monkeys (*Macacus irus*).

One strain of PPLO isolated from non-gonococcal urethritis (acute form) in the male was inoculated intra-urethrally into two male monkeys (*Macacus irus*) without any subsequent clinical or bacteriological evidence of infection.

Ⅰ. PPLO 人尿性器株の孵化鶏卵内培養

PPLO 人株の孵化鶏卵内培養に関する報告は少く、僅かに Paine 等⁹⁾(1950), Keller 及び Morton¹⁰⁾(1954) の 2 論文をみるに過ぎない。

PPLO は屢々人の尿性器病変に伴つて発見されるが、その病原的関連は尙未解決のまま残されている。此の微生物の孵化鶏卵内培養は、恐らく斯る問題解決の為の希望のもてる一手段であらうと思われる。

私の本実験の目的は、非淋菌性尿道炎からの分離 PPLO 株の孵化鶏卵内培養によつて、感染鶏卵内に何らかの病的変化或は致死作用が起るか否かを観察するにあつた。

(本論文の要旨¹⁰⁾は、1956 年第 44 回日本泌尿器科学総会に於て発表した。)

(1) 実験材料及び実験方法

i) 供試 PPLO 株：男子非淋菌性尿道炎急性型からの分離保存株 2 (OT-1₈, OT-1₁₃) 及び米国の Campo 株計 3 株を使用し、各 3 株の PPLO 用固形培地 4 日培養をもつて夫々菌浮游液を作成する(第Ⅰ編参照)。

ii) 使用鶏卵：生存力の確認された孵化鶏卵の 7 日卵。

iii) 接種方法：Beveridge 及び Burnet 法¹¹⁾に従つて PPLO 3 株の各々につき、卵黄囊並に漿尿膜接種を行つた。即ち、7 日卵 5 ケを 1 組とする次の各実験群に、各株の菌浮游液を夫々接種する(第Ⅰ表)。

第Ⅰ表

	第Ⅰ群	第Ⅱ群	第Ⅲ群	第Ⅳ群
卵黄囊接種	0.2ml 菌浮游液	0.2ml 菌浮游液 + 500u/ml Penicillin	0.4ml 菌浮游液	0.4ml 菌浮游液 + 500u/ml Penicillin
漿尿膜接種	同上	〃	〃	〃
対照				

以上実験群につき各 7 日目ごとに継代接種を行つた。即ち、各群から任意に 2 ケ宛の接種卵を選び、卵黄囊接種例では卵黄囊及び卵黄乳剤を、漿尿膜接種例では漿尿膜及び漿尿液乳剤を作る。之らを軽く 1,800 廻転 10 分間遠心分離しその上澄液を夫々 0.2ml 宛接

種継代した。対照非接種群にも同様の操作を行う。

接種卵は透光により生死を毎日確める。

iv) 判定：接種時には菌液の一部は必ず 1 白金耳宛 PPLO 用固形培地に移植培養する。判定は固形培地に於ける PPLO の發育如何により、集落数 10~20 ケを +, 多数發育し、一部集落の融合するを冊とした尚、接種卵の肉眼的変化を観察すると共に、その卵黄及び漿尿液の塗抹標本並に漿尿膜の固定標本を作成し之らを Dienes 液或は細川氏液⁴⁾にて染色検した。

(2) 実験成績

PPLO 3 株の孵化鶏卵内卵黄囊接種及び漿尿膜接種実験成績を一括すれば第Ⅱ表の如くである。

第Ⅱ表 PPLO の孵化鶏卵内接種実験成績

	卵黄囊接種		漿尿膜接種	
	菌浮游液 (0.2, 0.4 ml)	菌浮游液 + Penicillin 500u/ml	菌浮游液 (0.2, 0.4 ml)	菌浮游液 + Penicillin 500u/ml
OT-1 ₈	+~冊 (9)	+~冊 (9)	+ (5)	+ (3)
OT-1 ₁₃	+~冊 (9)	+~冊 (6)	+ (6)	+ (6)
Campo	冊~冊 (9)	+~冊 (9)	+ (6)	+~冊 (4)

() : 継代数,

+ : PPLO 用固形培地の集落 10~20

冊 : PPLO 用固形培地の集落多数一部融合

表示の如く、卵黄囊接種に於ては、実験条件の如何を問わず 3 株の卵黄内發育は何れも良好であり、総て 9 代以上接種継代が可能であつた。然るに漿尿膜接種では、PPLO 集落数は比較的少く、接種継代も 3 乃至 6 代に終つた。

対照正常卵からの PPLO の分離培養は始終陰性である。

実験途上稀に死亡卵を認めたが、何れも接種操作時の雑菌混入に原因することが確認された。

孵化卵通過後、その集落の形態変化を示した PPLO 株はなかつた。又、各接種感染卵につき肉眼的及び顕微鏡的観察を行つたが、PPLO によると思われる病的変化を示したものはなかつた。

(3) 総括及び結論

牛の胸膜肺炎菌⁶⁾並に七面鳥²⁾及び野羊⁹⁾の伝染病から分離された PPLO 株は、感染孵化鶏卵に於て明らかに病変を惹起し且つその死亡率を著しく上昇せしめることが報告されてい

る。然るに Keller 及び Morton³⁾によれば、人尿性器からの分離 PPLO 株は、孵化鶏卵内に於て良好發育を示すが、感染卵に何らの病変を与えず又卵死亡率の上昇もみられなかつたと云う。

本実験に使用した PPLO の中 2 株は、急性淋疾類の激しい臨床所見を呈する非淋菌性尿道炎急性型からの分離株であり、他の 1 株はマウス足蹠に膿瘍を形成する米国の Campo 株である。之ら 3 株は夫々卵黄嚢及び漿尿管接種ルートによつて、孵化鶏卵内培養試験が行われた。

3 株は何れも孵化鶏卵内に於て良好發育を示し、就中卵黄嚢ルートによるものは 9 代以上接種継代が可能であつた。併し、接種感染卵総てを通じて何らの病変發生をみず又卵死亡率の上昇もなかつた。

孵化卵通過後、PPLO 集落の形態変化を示したものはない。又 Van Herick 及び Eaton⁸⁾が記載した如き正常卵からの PPLO 分離は、之を認め得なかつた。

Ⅱ PPLO 人尿性器株のマウス皮下接種実験

人体感染症からの PPLO 分離株をマウスの鼻腔に接種して肺炎を發生²⁾¹¹⁾せしめたという報告に対し、Edward³⁾⁴⁾は正常マウスに常住する PPLO が時に肺炎の原因ともなるとして之を反ばくした。人体尿性器から分離された G 株⁶⁾或は Campo 株は、明らかにマウス蹠に皮下膿瘍を形成⁴⁾し、現在マウスに対する病原性の有無は、PPLO 分類上の一重要規準⁴⁾をなすといわれる

大阪通信病院泌尿器科に於て非淋菌性尿道炎から分離した PPLO に就き、先に協同研究者大島⁵⁾はその分類実験を行つた。その際私は之に平行して之ら分離株の 2, 3 をもつてマウスの皮下接種実験を試み、その病原性の有無を検討したので報告する。

(本論文の要旨は、第43回⁷⁾、第44回⁸⁾ 日本泌尿器科学会総会に於て発表した。)

(1) 実験材料及び実験方法

i) 供試菌株：男子非淋菌性尿道炎分離保存 PPLO 株 6 (OT-1, 1₆, 1₇, 1₈, 1₉, 1₁₂) 及び Campo 株 (米国), 計 7 株である。

ii) 使用マウス：雌雄をとわず体重 12~23 g の純系マウス 5 匹をもつて一群とする。

iii) 接種菌液：次の如く 2 種を作成する。一は PPLO 用流動寒天培地に 4 日間培養發育した菌株をそのまま培地と一緒にした菌液、他は液体培地による菌浮游液である (第 I 編参照)

iv) 接種部位と方法：ツベルクリン皮内針を以て夫々菌液を、マウスの足蹠のふくらみ及び腹部皮下に注射する。接種菌量は前者には 0.05ml, 後者には 0.1 ml 宛である。

v) 判定：接種後 20 日間毎日観察し、局所膿瘍を形成した例を +, しないものを - と判定する。経過観察期間中適宜屠殺し、斃死体をも含めて夫々剖検した。

尚、対照群を、PPLO 用流動寒天培地注射群、液体培地注射群及び無処置群の 3 に分けて比較した。

第Ⅲ表 PPLO 株のマウス皮下接種実験成績

	マウス No	接種部位	菌液	接種量 ml	判定	備考
OT-1 ₁	1	蹠	SS	0.05	-	
	2				-	
	3				-	
	4	腹	SS	0.1	-	
	5				-	屠殺 (20 日)
OT-1 ₆	6	蹠	SS	0.05	-	
	7				-	
	8				-	
	9	腹	SS	0.1	-	
	10				-	屠殺 (12 日)
OT-1 ₇	11	蹠	SS	0.05	-	
	12				-	
	13				-	斃死 (6 日)
	14	腹	SS	0.1	-	
	15				-	
OT-1 ₈	16	蹠	SS	0.05	-	
	17				-	
	18				-	斃死 (20 日)
	19	腹	SS	0.1	-	同上
	20				-	屠殺 (10 日)
OT-1 ₉	21	蹠	SS	0.05	-	屠殺 (10 日)
	22				-	
	23				-	
	24	腹	SS	0.1	-	
	25				-	
OT-1 ₁₂	26	蹠	SS	0.05	-	斃死 (7 日)
	27				-	
	28				-	
	29	腹	SS	0.1	-	屠殺 (7 日)
	30				-	

Campo	31	趾	SS	0.05	+	膿瘍(7日)
	32				+	同上
	33	腹	SS	0.1	-	斃死(7日)
	34				-	
35		F		-	屠殺(7日)	

対照	流動寒天培地注射群	趾 腹 趾 腹
	液体培地注射群	
	無処置群	

SS: 流動寒天培地菌液
F: 液体培地菌液

(2) 実験成績

第Ⅲ表の如く、Campo株のみ流動寒天培地菌液足跡皮下接種群の2匹が夫々皮下膿瘍を形成した。他の6株は総て局所膿瘍を形成しない。

皮下接種後20日以内に、各7株各群から適宜一匹宛選んで屠殺し、之に6乃至20日の間斃死した5匹を加えた計11匹につき剖検を行つた。各マウスの心、脾、腎は病理学的に何れも著変を認めず、又各血液の培養も陰性に終つた。

(3) 総括及び結論

男子非淋菌性尿道炎分離株6及び米國のCampo株計7株のPPLOのマウスに対する病原性を検討する為に、マウスの皮下接種実験を行つた。マウスの足跡のふくらみに局所膿瘍を形成したCampo株を除き、他の6株は何れもマウスに対し認むべき病的変化を起しえなかつた。

Ⅲ. PPLO 人尿性器株の猿の尿道内接種実験

Ruiter 及び Wentholt¹⁾ (1952) は、2例の糜爛潰瘍性龜頭炎から分離したPPLO株の病原性を確めるために、之らを正常人の龜頭包皮囊内に注入したが、何らの炎症反応も認め得なかつたと報告した。之は恐らく文献上唯一のPPLOの人体実験報告であろうと思われる。

私は非淋菌性尿道炎急性型からの分離PPLO株を尾長猿(Macacus irus)の尿道内に接種して、その病原性を試験した。

(本論文の要旨²⁾は、第43回日本泌尿器科学会総会に於て発表した。)

(1) 実験材料及び実験方法

i) 供試菌株: 保存 OT-1₈ 株。この株は非淋菌性尿道炎急性型から純培養の状態で分離されたものである。

ii) 供試猿: 2頭の雄尾長猿(Macacus irus)。体重は夫々2,200及び1,050gである。

iii) 接種菌体及び接種量: 次の如く2種の接種菌を作成する。

a—固形斜面培地3日培養の OT-1₈ 集落を半斜面かき集めた菌体。

b—固形斜面培地に發育した集落の半斜面を流動寒天培地に移植し、5日培養後之を培地と共に混和。

a, b各々1白金耳(径1mm)を尿道内に接種する。

iv) 接種方法: 先づ予備試験として各猿は1週ごと3回その尿道分泌物の培養実験が行われ、PPLO陰性が確実にされた。次いで、外陰部を酒精消毒し、1頭にはa菌体を、他の1頭にはb菌体を、夫々1白金耳尿道内粘膜に塗擦接種した。

v) 判定: 接種後の臨床所見、尿道分泌物の塗抹検鏡及び培養成績によつて判定する。臨床症状の觀察は隔日ごとに1月に及んだ。この間2頭の猿から尿道分泌物を採取し、之を夫々石原培地、PPLO用培地及びタリウム選択培地(第Ⅰ編参照)に移植培養する。同時に採取物の塗抹染色標本を作り、白血球の有無其他につき検鏡を行つた。

(2) 実験成績

a. 固形斜面培地3日培養のPPLO集落を接種したMacacus irus。

接種後1月間認むべき臨床症状の発現をみない。接種後9日及び17日の2回にわたる尿道採取物の培養成績はPPLO陰性である。塗抹染色標本を検鏡するに白血球を認めない。

b. 流動寒天培地5日培養を培地と共に混和して接種したMacacus irus。

aと同様臨床症状は発現しない。12日目に採取された尿道分泌物の培養及び検鏡所見も、前と同様陰性成績を示した。

(3) 総括及び結論

PPLO人尿性器株の病原性に関する人体実験報告は、前述の如くRuiter及びWentholtを以て唯一とするが、一方、之を猿の尿道に接種しその病原性を探究せんとした試みも、従来なかつたように思われる。

本実験に使用した PPLO は、恰も急性淋疾に類似した激烈なる症状を呈した男子非淋菌性尿道炎から分離され、初代分離後比較的日の浅い5代継代株であつた。この PPLO 株の猿の尿道内接種によつて何らかの炎症病変の発現を期待したが、総ては陰性に終つた。

御指導、御校閲を賜つた大阪大学微生物病研究所藤野恒三郎教授、並に大阪通信病院泌尿器科山本弘部長に深謝すると共に、御援助を頂いた石原藤太野博士、大島升博士に感謝の意を表する。

尚本研究は日本電信電話公社医学研究費に負うところが多い。附記して謝意を表する。

文 献

I : 孵化鶏卵内培養.

- 1) Beveridge, W.I.B., and Burnet, R.M. : Spec. Rec. Ser. no. 256, His Majesty's Stationery Office, 1-92, 1946.
- 2) Hoyt, H.H., Pomeroy, B.S., and Roepke, M.H. Am. J. Vet. Research, **12** : 329, 1951.
- 3) Keller R., and Morton, H.E. : J. Bact., **67** 129, 1954.
- 4) Oshima, M. : Acta Urologica (Jap.), **5** : 127, 1959.
- 5) Paine, T.F. Jr., Murray, R., Perlmutter, I. and Finland, M. : Ann. Internal Med., **32** 554, 1950.
- 6) Sheriff, D., and Piercy, S. E. : Vet. Record, **64** 1, 1952.
- 7) Tang, F. F., Wei, H., and Edgar, J. : J. Pathol. Bacteriol., **42** 45, 1936.

- 8) Van Herick, W., and Eaton, M. D. J. Bact., **50** 47, 1945.
- 9) Yamamoto, R., Adler, H.E., and Cordy, D.R. J. Bact., **69** 472, 1955.
- 10) Yamamoto, H., Ishihara, T., Oshima, M., and Kuraoka, Y. : Jap. J. Urol., **47** 742, 1956.

II : マウス皮下接種実験.

- 1) Carson, H.J., Spector, S., and Douglas, H.G. : Amer. J. Dis. Child., **81** 193, 1951.
- 2) Grünholz, G. Klin. Wshr., **28** 480, 1950.
- 3) Edward, D. G. J. Path. Bact., **50** 409, 1940.
- 4) Edward, D.G., J. gen. Microbiol., **10** : 27, 1954.
- 5) Oshima, M. - Acta Urologica (Jap.), **5** 139, 1959.
- 6) Ruitter, M., and Wentholt, H.M.M. J. invest. Dermat., **18** : 313, 1952.
- 7) Yamamoto, H., et al. Jap. J. Urol., **46** : 523, 1955.
- 8) Yamamoto, H., et al. : Jap. J. Urol., **47** 742, 1956.

III : 猿の尿道内接種実験.

- 1) Ruitter, M., and Wentholt, H. M. M., J. invest. Dermat., **18** : 313, 1952.
- 2) Yamamoto, H., Ishihara, T., Oshima, M., and Kuraoka, Y. Jap. J. Urol., **46** 523, 1955.