

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

第 I 編 PPLO 分離のための Thallium Acetate 含有選択培地に就て

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 雅 男

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

I : A Selective Medium Containing Thallium Acetate for the Isolation
of Pleuropneumonia-Like Organisms (PPLO)

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) Three strains of PPLO isolated from male non-gonococcal urethritis (NGU) and 7 species of bacteria were examined to determinate the effects of thallium acetate in "PPLO agar (Eiken)" in suppressing their growth.

The results showed that ;

The three strains of PPLO were not inhibited by thallium acetate in a 1 500 concentration, but the strains of *Corynebacterium* and *Gaffkya tetragen*a were inhibited by a 1 2,500 concentration.

Concentrations of 1 : 1,000 of thallium acetate inhibited the growth of *Neisseria gonorrhoeae* and *Serratia marcescens*, while the strains of *Escherichia coli* were inhibited by a 1 500 concentration.

Gram positive diplococcus (isolated from NGU) was the only bacteria which appeared to be unaffected by the thallium acetate.

No "L" type colonies were observed on any of the thallium acetate plates inoculated with bacteria.

2) At the Urological Department of the Communications Hospital, Osaka, from 1955 to 1958, a total of 450 patients were studied to evaluate a selective medium containing thallium acetate for the isolation of PPLO from clinical material.

PPLO were isolated from 44 out of 450 cases ; 28 (12.2 per cent) of 230 male cases with NGU, 4 (3.1 per cent) of 131 gonococcal urethritis, 2 (3.5 per cent) of 56 healthy men and 10 (30.3 per cent) of 33 gynecologic patients.

Of a total of 44 strains of PPLO, 36 (82 per cent) grew on a selective medium containing of 0.04 per cent of thallium acetate, including 29 strains (80 per cent) that were isolated in pure cultures.

Of 44 strains, 24 were recovered on "PPLO agar (Eiken)" of which 6 (25 per cent) were isolated in pure culture.

On the "Ishihara medium" for gonococci, PPLO were isolated in pure culture in 7 (29 per cent) out of 24 cases with positive cultures.

The selective medium containing thallium acetate was most effective in inhibiting contaminants as compared with "PPLO agar (Eiken)" and "Ishihara medium" for gonococci, and thus has proven very useful for the isolation of PPLO from clinical material.

PPLOの培養においては、栄養価の高い培地と一般細菌にくらべ比較的長い培養時間を必要とする。かような条件下では培養も汚染され易く他細菌の発育は旺盛をきわめ、為にPPLO集落を看過すること多く、時にその分離を不可能ならしめる。従つて、広範囲に各種細菌の発育を阻止すると同時にPPLOの発育は妨げない選択培地の必要性が要望され、従来、この目的に副う為に種々の細菌発育阻止物質の選択培地への使用が研究されている(Edward¹⁾²⁾, Smith等⁶⁾, Morton等³⁾, White⁹⁾, MortonおよびLecce⁴⁾).

一般にPenicillin含有選択培地は、ある種の細菌のL型を形成するので好ましくないといわれる。Potassium telluriteは高圧滅菌に耐えない等の培地作成上に難点⁶⁾があり、Crystal violetは培地の含有蛋白量の多少によつてPPLOの発育を左右³⁾するという。その他Sulfamethazinを使用した報告⁶⁾もあるが、1953年MortonおよびLecce⁴⁾によりThallium acetateの優秀性が確認されて以来、現在PPLOの選択培地としてThallium acetateが最も広く用いられている。併し、臨床材料からのPPLO分離につき、本培地の使用を系統的に評価したのは皆無といつてよい

私は先づPPLOその他数種の細菌株をもつてThallium acetateの選択作用を実験した。次いで過去4年間大阪通信病院泌尿器科の男子尿道炎361および健康男子56計417例、並に少数例の婦人患者の培養に本培地を使用し、臨床材料からのPPLO分離の為にThallium acetate含有選択培地の实用価値を比較検討した。

(本論文の一部は昭和29年第5回中部連合泌尿器科学会⁷⁾及び昭和30年第43回日本泌尿器科学会総会⁸⁾に発表した。)

I. 実験材料及び実験方法

A. Thallium acetate (Tと略称)の選択作用に関する試験管内実験。

1) 使用菌株。非淋菌性尿道炎(NGU)からの大阪通信病院保存PPLO株3, Gram陽性Diplococcus 2, Corynebacterium 1, Gaffkya tetragena 1及びNeisseria gonorrhoeae 1計8株に加うるに、大阪大学微生物病研究所保存のCorynebacterium diphtheriae 1, Serratia marcescens 1, 大阪市立大学医学部第2外科教室保存株Escherichia coli 2, 総計12株を供試した。

2) 供試Thallium acetate含有培地(T培地)

PPLO用基礎培地成分(ポリペプトン20.0g, 葡萄糖0.5g, NaCl, Na₂HPO₄各々5.0g, 寒天末20.0g, 蒸溜水及び牛心肉水各々500.0ml)を混和溶解し、之に予め高圧蒸気滅菌した10% Thallium aceticum oxydulatum (Merk)を適宜添加する。pH 7.8に修正後試験管に8ml宛分注、高圧蒸気滅菌し、65°C前後の温度の時に各分注試験管に家兎脱線維血液を2ml宛添加混和、斜面培地として使用に供する。本実験の目的に夫々0.04%, 0.1%及び0.2%のT培地が作成された。

3) 菌液の作成及び移植菌量。

(i) PPLO PPLO用固形培地(第I表)にて3日培養後、集落数の均一に発育した部分の約1cm²を寒天片と共に切りとり、之をPPLO用液体培地(第I表)2.0ml入り小試験管内に投入して碎くしばらく静置して寒天片の沈殿を待ち其上澄を1白金耳宛、夫々T培地に塗抹移植した。

(ii) Corynebacterium及びNeisseria gonorrhoeae: 淋菌用石原液体培地⁶⁾(第I表)5.0ml入り試

第 I 表

淋菌用石原液体培地	PPLO 用 培 地	
	液体培地	固形培地
ポリペプトン 20.0 g	……………同 左	……………同 左
葡 萄 糖 0.5 g		
NaCl 5.0 g		
Na ₂ HPO ₄ 5.0 g		
蒸 溜 水 1,000ml		
	500ml	寒天末 20.0 g
	牛心肉水 500ml	
pH 7.3	7.8	7.8
家兎脱線維血液10%	家兎血清 20%	家兎脱線維血液 20%

第 II 表

[i] G培地 (淋菌用石原培地)	[ii] E培地 (PPLO用培地)	[iii] T培地 (タリウム塩 含有培地)
ポリペプトン 20.0 g	……………同 左	[ii] +
葡 萄 糖 0.5 g		
NaCl 5.0 g		
Na ₂ HPO ₄ 5.0 g		
寒 天 末 15.0 g		
蒸 溜 水 1,000ml	20.0 g	0.04%タリウム 塩
	500ml	
	牛心肉水 500ml	
pH 7.3	7.8	7.8
家兎脱線維血液10%	20%	20%

験管に夫々1白金耳宛移植し、37°C18時間培養後、この千倍稀釈液の1白金耳宛をT培地に塗抹移植した。

(iii) 其他の菌株：淋菌用液体培地の代りに肉水を使用する他は、すべて上述同様の操作によつた。

4) 培養及び判定方法。

37°C、5日培養により肉眼的に集落発生を認めたとのを+とする。而して5日後試験管より固形培地を取出し、集落顕微鏡を用いて集落を認めないのを-と判定した。尚 PPLOの確定は、集落の捺印標本を作成し、Dienes 液或は細川氏液⁵⁾にて染色検鏡によつた。

B. 臨床実験。

1955年1月より1958年12月に至る4年間の大阪通信病院外来男子尿道炎361例、即ち NGU 230例及び淋菌性尿道炎 (GU) 131例を実験の対象とした。別に健康男子56例及び婦人患者33例を選び対照とした。

1) 実験材料の採取と移植。

何れも尿道分泌物を実験材料とし、先ず患者の亀頭、外尿道口及び舟状窩を酒精綿で嚴重清拭後、白金耳を尿道内に挿入、尿道壁をかすり気味に引出して分泌物を採取した。婦人患者では膣及び子宮頸管分泌物を材料とした。之を次の3種の固形培地面に夫々塗抹移植する。

2) 使用培地。

G培地には家兎血液を10%に加え pH 7.3 とし、E及びT培地には家兎血液を20%に加え pH 7.8 とし、夫々実験材料を塗抹する。T培地に就いては、最初試験管内実験成績に基き、0.04、0.1及び0.2%の3種含有培地を作成、基礎的臨床比較実験を試みた処、實際

上、0.04%濃度で充分普通細菌の發育を抑制すると共に PPLO の發育に支障を来さないことを認めた。よつて本実験は専ら0.04%T培地により行われた。

3) 培養方法。

37°C、好氣的培養による。但し最初の3日間は、底に湿綿を敷いた密閉硝子筒内に培養基を入れ孵卵器内に納める高湿度法を採用した。

4) 判定方法。

細菌に就ては、先づ2乃至5日目に肉眼的觀察、次いで7乃至10日目に固形斜面培地を試験管より取り出し集落顕微鏡下に精査し、夫々性状を異にする集落につき染色検鏡、判定を下した。PPLOの判定は、先に協同研究者の一人大島⁶⁾が詳細に記載した如くに行つた。

II 実験成績

A. Thallium acetate の選択作用に関する実験成績。

種々の濃度のT培地をもつて PPLO 其他各種細菌純培養株の發育に及ぼすTの選択作用を觀察し、第III表の如き結果を得た。

NGU から分離された PPLO 3株は何れもTの影響をうけず、夫々0.04、0.1、0.2%T培地に何れも良好なる發育を示した。之に対し、NGU から分離した *Corynebacterium* 及び *Gaffkya tetragena* 並に *Corynebacterium diphtheriae* (大連株) は0.04%で既に發育を認めず、以下 *Neisseria gonorrhoeae*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* の順に高度の發育阻止がみられた。Gram 陽性双球菌 (NGU

第III表 Thallium acetate の PPLO 及び各種細菌の発育に及ぼす影響

菌種	Thallium acetate 濃度			
	0	1:2,500 (0.04%)	1:1,000 (0.1%)	1:500 (0.2%)
PPLO (OT-1 ₄)	++	+	+	+
PPLO (OT-1 ₆)	+++	+++	+++	+++
PPLO (OT-1 ₆)	+++	+++	+++	++
Corynebacterium (NGU 分離株)	+++	—	—	—
Gram positive Diplococcus (//)	+++	+++	++	+
Gram positive Diplococcus (//)	+++	+++	++	+
Gaffkya tetragenae (//)	+++	—	—	—
Neisseria gonorrhoeae (GU 分離株)	+++	++	—	—
Corynebacterium diphtheriae (大連株)	+++	—	—	—
Serratia marcescens (阪大微研)	+++	+++	—	—
Escherichia coli (大阪市大)	+++	+++	+	—
Escherichia coli (//)	+++	+++	+	—

+++ 多数集落 + 僅少集落

分離株)に対するTの影響は比較的僅少であるとはいえ、0.2%ではかなりの発育抑制がみられ、而もこの抑制された微小集落は明らかに PPLO 集落と区別することができた。

以上、7種9株の細菌を移植したT培地に於てL型集落をみたものはなかった。

B. Thallium acetate 含有選択培地の臨床実験成績。

第IV表 3培地の培養陽性率の比較

	培 養 陽 性				培養陰性
	T+	E+	G+	PPLO	
非淋菌性尿道炎 (NGU) 230	163 (71%)				67 (29%)
	135 (58.8%)			28 (12.2%)	
	68 (50.4%)	133 (98.5%)	133 (98.5%)		
淋菌性尿道炎 (GU) 131	131 (100%)				0
	127 (96.9%)			4 (3.1%)	
	5 (3.9%)	127 (100%)	127 (100%)		
健康男子 56	53 (95%)				3 (5.4%)
	51 (91.1%)			2 (3.5%)	
	20 (39%)	51 (100%)	51 (100%)		

Thallium acetate 含有培地, PPLO 用培地及び石原淋菌用培地の3培地を同時に用いて行い得た NGU 230, 淋菌性尿道炎 (GU) 131計361例及び健康男子56例の培養成績を第IVの如く表示する。

(i) 上記3培地の培養陽性率について。

NGU 少くとも3培地の何れかに培養陽性を示したのは、PPLO分離28例(12.2%)を含めて、230例中163例(71%)である。陰性は67例(29%)である。PPLO以外の菌の陽性率をみるために、培養陰性67例及びPPLO 分離28例計95例を除く135例に就き、各3培地の陽性頻度を比較するに、E及びG培地では各100%近くが培養陽性であり、T培地の夫れは50%に過ぎない。

GU: E, G 培地では全例総て淋菌発育を認め、多くは純培養、一部他細菌と混在する。然るにT培地では全く淋菌発育をみず、僅かに5例が他菌発育を示した。PPLO分離は4例(3.1%)である。

健康男子群: 56例中培養陰性3(5.4%)及びPPLO分離2例(3.5%)を除く51例(91.1%)の、E、及びG培地の陽性頻度は、NGUの夫れに略々一致するが、T培地の陽性率は遙かに低い。

(ii) 分類菌別の比較。

上記3種の培地上に現われた集落の顕微鏡検査を実施した結果、Gram 陽性球菌, Gram 陽性桿菌, Gram

第 V 表 分離菌別の比較

	非淋菌性尿道炎 163			淋菌性尿道炎 131			健康男子 53		
	T	E	G	T	E	G	T	E	G
Gram 陽性球菌	55	85	97	3	17	11	20	42	43
Gram 陽性桿菌	9	112	120	3	14	18	1	26	25
Gram 陰性桿菌	2	6	8	0	0	0	1	4	6
Gram 不定多形性菌・淋菌	9	15	13	2	2	0			
				0	127	125			
計	75	218	238	8	158	154	22	72	74
PPLO	21	16	16	3	2	4	2	2	2

陰性桿菌, Gram 不定多形性菌, 淋菌(純培養菌により同定), PPLO に大別して第 V 表に示した。

163例の非淋菌性尿道炎例をみるに, E と G 培地に於いては明らかに, Gram 陽性球菌と桿菌の陽性度は, T 培地に比して高い。この傾向は淋菌性尿道炎と健康男子例にもみられるところである。

淋菌性尿道炎 131例についてみるに, E と G 培地に於いては, 淋菌が高率に分離されているに拘らず, T 培地に於いての淋菌の培養は皆無であるのがめだつ。

要するに Thallium acetate の添加により Gram 陽性球菌の陽性率は1/2もしくはそれ以下に抑えられ,

第 VI 表 PPLO の分離された例 (44例) の培地別比較成績

	T		E		G	
	PPLO +他菌	PPLO +他菌	PPLO +他菌	PPLO +他菌	PPLO +他菌	PPLO +他菌
NGU 28/163	16	5	5	11	6	10
	21 (4)		16 (2)		16 (4)	
GU 4/131	3	0	0	2	1	3
	3		2		4 (1)	
健康男子 2/53	1	1	0	2	0	2
	2		2		2	
婦人患者 10/33	9	1	1	3	0	2
	10 (5)		4		2	
	29 (80%)	7 (20%)	6 (25%)	18 (75%)	7 (29%)	17 (71%)
	36 (9)		24 (2)		24 (5)	
	82% (20%)		55% (5%)		55% (11%)	

() : 他の培地では集落を作らなくて, 当該培地上にだけ集落を作った例数を示す

又 Gram 陽性桿菌もまた強く抑制される。その上 Thallium acetate により淋菌の増殖は完全に抑えられる。

(iii) PPLO の分離について。

上記 3 培地による PPLO の分離状況を比較するに (第 VI 表), NGU 163例に於て T 培地では 21例陽性で最高である。E 及び G 培地では 16例でやや劣る。しかし詳細にこれをみるに, 3 培地の何れにも陽性であったものは 7例にすぎず, 他の 2 培地では陰性であったものが T 培地でだけ陽性のもの 4 例, E 培地にだけ陽性のもの 2 例, G 培地にだけ陽性のもの 4 例であった。

此の表で特にめだつのは婦人患者 33例中 PPLO 陽性 10例であること, 然もこの 10例ともに T 培地に於て陽性であることである。

淋菌と PPLO との混合感染 4 例があり, 健康男子尿道より 2 例の PPLO の分離をみていることも見逃せない

又 PPLO の分離された 44例中 29例は, T 培地に於いて純培養の状態で分離され, T 培地を用いた場合, 44例中 36例まで陽性である事実よりみれば, Thallium acetate の PPLO 分離に際しての重要な意義がみとめられる。

III. 総括及び考按

1) PPLO 並に 7 種の純培養細菌株をもつて Thallium acetate の選択作用に関する培養試験を行い, 次の結果を得た。

PPLO 3株は何れも 1/500 T 濃度にて発育阻止されない。然るに *Corynebacterium* の 2 株および *Gaffkya tetragena* は 1/2, 500, *Neisseria gonorrhoeae* および *Serratia marcescens* は 1/1,000, *Escherichia coli* は 1/500, 夫々の T 濃度で全く発育が阻止された。Gram 陽性双球菌の 2 株 (NGU 分離) は 1/500 T 濃度にてなお発育を認めたものの, それは可なり抑制的であつた。これら細菌株が移植された T 培地に L 型集落の発生を認めたものはなかつた。

Edward¹⁾ (1947) は, PPLO は 1/500 T 濃度で発育阻止され, *Diphtheroid*, *Staphylococcus albus* および *aureus* は 1/1,000 T 濃度で発育阻止されないと報告したが, Morton および Lecce⁴⁾ (1953) は, 1/500 T 濃度では PPLO 発育は阻止れさず, 供試細菌中 *Streptococcus*

簇のみがTによつて作用を受けない唯一の細菌であると主張した。彼等はまたT培地では細菌のL型発生をみないと称し、一方 Crystal violet の選択作用は培地の含有全蛋白量に左右されることを確認し、従来のCrystal violet と Potassium tellurite の混合含有培地⁶⁾は選択培地として不適當であると述べた。

私の実験成績は略々 Morton および Lecce に一致し、斯くしてT含有培地がPPLO分離培養の為の最も優秀なる選択培地であることは、次の諸点によつて確實視される。

(i) L型発生を認めない。

(ii) 幅広い細菌スペクトルを有ち、Gram 陽性および陰性菌の両者に対する唯一の細菌発育阻止物質である。

(iii) 培地において高圧滅菌に耐え、その選択作用は培地の含有蛋白量に左右されない

2) 男子尿道炎患者、健康男子および婦人患者から PPLO を分離する為に0.04% T培地を使用し、その成績を次の如く総括し PPLO 用培地 (E) および石原淋菌用培地 (G) と比較した。

(i) E, G 各培地によつて健康男子尿道から分離し得る細菌の多くは、Gram 陽性球菌および桿菌にして、その他比較的少数の Gram 陰性桿菌がみられる。これに反し、T培地の発育菌はほとんどGram 陽性球菌に限られ、その頻度もE或いはG培地の1/2を示すに過ぎない。NGUにおける成績もほとんど、傾向を同じくする。GUにおいてはT培地に限り淋菌の発育は皆無であつた。

(ii) 各患者群の PPLO 分離総数44例につき、3培地の培養所見を比較するに、T培地の PPLO 分離頻度は最も高く82%を示し、EおよびG培地では約55%であつた。更にT培地ではPPLOの純培養例が36例中29例80%の多きに達し、E培地の25%、G培地の29%に比し、格段の差異を示す。また、T培地にのみ発育をみたのは44例中9例20%であるのに対し、E、G培地は夫々4.5%、11%である。即ち、各培地を単独使用する場合、T培地の PPLO 分離成功

率が最も高いといえる。

以上の臨床成績は正に純培養菌による実験成績に一致し、かくして PPLO の為の選択培地としてのT培地の優秀性が臨床的にも立証された。

結 論

1) PPLO 並に7種の細菌を用いて Thallium acetate の選択作用につき培養試験を行つた結果は次の如くである。

非淋菌性尿道炎分離 PPLO株は1/500 Thallium acetate 濃度にて何れも発育阻止されなない。Gram 陽性双球菌はこの濃度でなお発育したが夫れはかなり抑制的である。これに反し、Corynebacterium および Gaffkya tetragena は1/2,500, Neisseria gonorrhoeae および Serratia marcescens は1/1,000, Escherichia coli は、1/500, 夫々の Thallium acetate 濃度で完全に発育が阻止された。

これら細菌株を移植した Thallium acetate 含有選択培地にL型集落の発生を認めなかつた。

2) 男子尿道炎患者、健康男子および婦人患者からの PPLO 分離のために、0.04% Thallium acetate 含有選択培地、慣用 PPLO 培地および石原淋菌培地の3者を併用して次の成績を得た。

(i) Thallium acetate 培地による分離菌はほとんど Gram 陽性球菌に限られ、分離頻度も他の2つの培地の半ばに過ぎない。淋菌、Gram 陽性或いは陰性桿菌の発育はほとんど完全に抑制された。

(ii) 3培地併用による PPLO 分離総数44例中、Thallium acetate 培地の分離頻度は純培養29例(80%)を含めて36例82%であるのに対し、PPLO 培地は24例55% (中純培養6例25%)、石原淋菌培地は24例55% (中純培養7例29%)である。

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、並び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 藤太郎博士、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

- 1) Edward, D. G. : J. gen. Microbiol., **1**: 238, 1947.
- 2) Edward, D.G. : J. gen. Microbiol., **10** : 27, 1954.
- 3) Morton, H. E., Smith, P. F., Williams, N. B., and Eickenberg, C. F.: J. Dental Research, **30** 415, 1951.
- 4) Morton, H. E., and Lecce, J. G. J. Bact., **66** 646, 1953.
- 5) Oshima, M. : Acta Urologica (Jap.), **5** : 127, 1959.
- 6) Smith, P. F., Morton, H. E., and Leberman, P. R. : Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., **74** : 552, 1950.
- 7) Yamamoto, H., Ishihara, T., Oshima, M., and Kuraoka, Y.: Acta Urologica (Jap.), **2** : 235, 1956.
- 8) Yamamoto, H. : Jap. J. Urol., **46** :523. 1955.
- 9) White, R. W.: Brit. vet. J., **108**: 111, 1952.