

Ureaplasma urealyticum 精液感染症にかんする研究

京都大学医学部泌尿器科学教室（主任：吉田 修教授）

桐 山 菴 夫
吉 田 修UREAPLASMA UREALYTICUM INFECTION OF
SEMEN AND MALE INFERTILITY

Tadao KIRIYAMA and Osamu YOSHIDA

From the Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyoto University

(Chairman: O. Yoshida, M.D.)

Some authors have reported that *Ureaplasma urealyticum* is related to male infertility. To answer this question, following studies were conducted.

New solid medium, designated modified A3 medium, was prepared in order to perform rapid and steady isolation and identification for *Ureaplasma urealyticum* from human semen. It consisted of 2.4% trypticase soy broth, 0.9% purified agar, 20% horse serum and 0.25% yeast extract with addition of 1% urea and 0.02% phenol red. The medium was adjusted to pH 6.0 ± 0.5 and contained 1000 units of penicillin G per milliliter.

Positive cultures were obtained from 59% of 53 patients with idiopathic male infertility with the modified A3 medium, 53% with Taylor-Robinson's liquid medium and 51% with Shepards' A3 solid medium. Culture proved positive within 24 hours in 87% of the positive cultures with the modified A3 medium, 46.5% with the liquid medium and 26% with the A3 medium.

Semen yielded *Ureaplasma urealyticum* in 48.6% of 181 patients including the above-mentioned 53 patients. There were no significant differences in semen analyses including sperm count and motility rate among patients with positive or negative cultures. No significant differences were also noted in pH of semen, urea nitrogen level, and IgA and IgG concentrations in seminal plasma.

Minocycline was used for treatment of *Ureaplasma* infection. Seminal plasma levels of minocycline ranged from 1.56 to 2.35 $\mu\text{g/ml}$, about two thirds of serum level, in 5 patients about 5 to 6 hours later to the last dose of oral administration of 200 mg a day for one week followed by 100 mg a day for 3 weeks. These values were almost the same as the levels obtained in 2 *Ureaplasma*-negative healthy volunteers. A significant improvement in semen analyses was not found in 28 patients who were successfully treated for *Ureaplasma* infection.

Key words: *Ureaplasma urealyticum*, Male infertility, Minocycline, Ig in semen, Urea in semen.

緒 言

Mycoplasma は Protophyta 門, Mollicutes 綱に属す最も下等な原生生物であるが GC (グァニン+シトシン) 含量が22~39%と細菌よりも少ないことから原生動物との考えもある。*Mycoplasma* は最近まで PPLO (pleuropneumonia-like organisms) といわれていたもので、1) 最小の自己増殖可能な生物、2) cell wall

を欠き (WDMF = wall-defective microbial form) pleomorphic である。3) 発育にコレステロールや生の血清タンパクを要する。4) コロニーは寒天培地にくい込む。5) ペニシリンに完全耐性で TC 系抗生剤やマクロライド系抗生剤に感受性がある。6) 抗体によって発育が阻止される。7) 一般細菌 (parental form) との間に移行はない。8) 細胞膜親和性をもつなどの特徴を有する。

Ureaplasma urealyticum は *Mycoplasma* の一亜属で、1954年 Shepard によって非淋菌性尿道炎から始めて分離され、T-mycoplasma と呼ばれた。1974年 Shepard がヒト由来の T-mycoplasma を *Ureaplasma* と呼ぶよう提唱した。1973年 Gnarp らによって特発性男子不妊症の一部が *Ureaplasma urealyticum* 感染に起因すると報告されて以来、その当否が問題になり、いまだ解決をみていない。もし特発性男子不妊症の一部が *Ureaplasma urealyticum* の感染によって起こるものであり、これの治療によって妊孕性が回復しうるものであるならば、男子不妊症の大部分の原因が不明であり、適切なる治療法の存在しない今日、きわめて重要である。われわれはこれらの見地から 1) ヒト精液からの *Ureaplasma urealyticum* の分離・同定法の検討 2) *Ureaplasma urealyticum* 感染の精液所見に及ぼす影響 3) 治療法の確立 4) 治療効果の精液所見に及ぼす影響 を検討したので、その成績について発表する。

I. *Ureaplasma urealyticum* の分離・同定法の検討

目 的

ヒト精液より *Ureaplasma urealyticum* を分離・同定する臨床に適した簡便で確実な培養方法を確定する。

方 法

Ureaplasma urealyticum の培養にふつう使用されている Taylor-Robinson らの液体培地⁴⁰⁾、Shepard A₃ 平板培地³³⁾ およびわれわれが考案した A₃ 変法平板培地を使用し、分離率、培養時間を比較した。

1. 培地の組成

1) 液体培地 (Taylor-Robinson らの培地の変法)

組成と製法を Table I-1 に示す。PPLO broth, 酢酸タリウム, フェノールレッドを混和し、121°C, 15分間高圧滅菌する。

1N-塩酸で pH 6.0±0.5 に調整する。尿素, 酵母エキス液は汙過滅菌し, 非加熱ウマ血清とともに pH 6.0±0.5 に調整し, 滅菌した上記の PPLO broth に混和する。最後にペニシリン G を加え試験管に分注し, 使用まで冷蔵する。

2) 平板培地 (Shepard の A₃ 培地)

組成と製法を Table I-1 に示す。trypticase soy broth, purified agar を溶解し, 121°C 15分間高圧滅菌したあと pH 6.0±0.5 に調整する。これに pH 6.0±0.5 に調整した非加熱ウマ血清とペニシリン G を

Table I-1. 使用した培地の組成と作り方

1) 液体培地 (Taylor-Robinson の変法)

2.1% PPLO broth w/o cv(Difco)	70 ml
2% 酢酸タリウム	0.5ml
0.2% phenol red	0.1ml
高圧滅菌 121°C 15分	pH 6.0±0.5
2.5% 酵母エキス	10 ml
非加熱ウマ血清 (細胞培養用 微研)	20 ml
尿素	1 g
ペニシリン G	10万単位

注) 尿素・2.5% 酵母エキス 汙過滅菌
非加熱ウマ血清
2.5% 酵母エキス > pH 6.0±0.5

2) 平板培地 (Shepard A₃ 培地)

trypticase soy broth (BBL)	4.8 g
purified agar (Oxoid)	1.8 g
精製水	160 ml
高圧滅菌 121°C 15分	pH 6.0±0.5
非加熱ウマ血清 (pH 6.0±0.5)	40 ml
ペニシリン G	10万単位

3) 平板培地 (A₃ 変法培地)

trypticase soy broth (BBL)	4.8 g
purified agar (Oxoid)	1.8 g
2% phenol red	0.02ml
精製水	140 ml
高圧滅菌 121°C 15分	pH 6.0±0.5
非加熱ウマ血清	40 ml
2.5% 酵母エキス	20 ml
尿素	2 g
ペニシリン G	10万単位

注) 尿素 2.5% 酵母エキス 汙過滅菌
非加熱ウマ血清
2.5% 酵母エキス > pH 6.0±0.5

加え, ペトリ皿に分注し冷蔵する。

3) A₃ 変法平板培地

Taylor-Robinson らの液体培地の原法では尿道常在菌や精液の用手採取による汚染, 酢酸タリウムや尿素の添加による発育の遅延, および, 分離後の平板培地での同定という問題がある。Shepard の A₃ 平板培地では全視野の鏡検による発育の確認と同定という煩雑さがある。このためわれわれは *Ureaplasma urealyticum* の発育による培地のアルカリ化をフェノールレッドの赤変で取らえる Taylor-Robinson らの液体培地と *Ureaplasma urealyticum* の発育を colony の大きさ, 形態で直ちに確認しうる Shepard の A₃ 平板培地の両者の利点を組み合わせた A₃ 変法培地を作成した。

培地の組成と製法を Table I-1 に示す。製法は Taylor-Robinson 変法液体培地, Shepard A₃ 平板培地の作成に準ずる。

2. 精液よりの *Ureaplasma urealyticum* 分離・同定法

Ureaplasma urealyticum の分離・同定法は Table I-2 に示すごとくに行なった。可能なかぎり無菌的に(血液寒天平板培地で培養した予備実験では無菌な精液は存在しなかった)採取した精液を30分ないし1時間室温に放置し、溶解させ、その 0.1 ml を取り、液体培地では滴下、混和した。平板培地では滴下させたあと綿棒で一面に塗布した。直ちに 35°C 72 時間まで 5% 炭酸ガス培養を行なった。24 時ごとに観察し、赤変した液体培地は A₃ 平板培地に塗抹し、同じく 35°C 5% 炭酸ガス培養し、24 時間後にそのまま鏡検、または平板にギムザ液を流し colony を染色して鏡検した。なお当初は Dienes 染色 (Fig. I-1)⁴³⁾ を施行したがギムザ染色で習熟すれば充分同定できる。

Table I-2. *Ureaplasma urealyticum* の培養同定法

- 1) (イ) 液体培地 10 ml に精液 0.1 ml を接種
 (ロ) A₃ 平板培地
 (ハ) A₃ 変法平板培地 } に精液 0.1 ml を滴下
 綿棒で塗布
- 2) 35°C 72 時間まで 5% 炭酸ガス培養
- 3) 24 時間ごとに観察
 (イ) 平板培地に塗抹, 35°C 5% 炭酸ガス培養, 24 時間後鏡検, コロニーをギムザ染色, 鏡検
 (ロ) > 鏡検
 (ハ) > 鏡検

平板培地を使用するときは同じく 24 時間ごとに観察した。A₃ 平板培地では全標本を全視野鏡検する必要があるが A₃ 変法平板培地では赤変したもののみを鏡検すればよい。両平板培地とも汚染菌の発育を完全に除去しえないが colony の鏡検が不可能になるほど一面に汚染菌が増殖することはなかった。なお精液を直接塗布した平板培地では上記のギムザ染色で colony が染色されなかった。

成 績

1. 各培地における培養成績

2 年以上の不妊を訴え、妻にもとくに産婦人科学的に異常を認めず、夫にも不妊の明らかな原因のない“いわゆる”男子不妊症 53 例の精液を上記の 3 培地に接種し、培養した分離成績を Table I-3 に示す。液体培地、A₃ 変法培地で培地の赤変し、陽性となったものは液体培地 31 例 (59%), A₃ 変法平板培地 33 例 (62%) であった。*Ureaplasma urealyticum* の colony が確認されたものは液体培地 28 例 (53%), A₃ 平板培地 27 例 (51%), A₃ 変法平板培地 31 例 (59%) と A₃ 変法平板培地の分離率ももっとも高かった。液体培地または A₃ 変法平板培地で陽性となっても *Ureaplasma urealyticum* が分離されなかったものは尿素分解能のある汚染菌の増殖によるものと考えられる。*Mycoplasma hominis* も *Ureaplasma urealyticum* とともに検出されるが A₃ 平板培地では検出されなかった。液体培地で不明とあるものは液体培地が赤変したにもかかわらず、平板培地では何のコロニーも検出されなかったものである。

Table I-3. 各培地における *Ureaplasma urealyticum* 検出率

検体材料 : 男子不妊症患者精液
 検体数 : 53 件

	液体培地	A ₃ 培地	A ₃ 変法培地
陽 性	31 (59%)	27 (51%)	33 (62%)
<i>U.urealyticum</i>	28 (53%)	27 (51%)	31 (59%)
<i>M.hominis</i>	2	0	2
不 明	1	0	0

各培地における培養時間と *Ureaplasma urealyticum* の検出率の関係をみると Table I-4 のごとくなる。*Ureaplasma* が分離された症例で、分離までの時間を

- Dienes 液 メチレンブルー 25 g
- アズール II 1.25 g
- マルトース 10 g
- 炭酸ナトリウム 0.25 g
- 安息香酸 0.25 g
- 精 製 水 100 ml

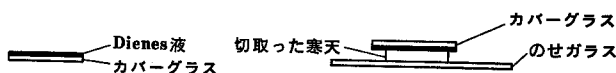


Fig. I-1. コロニーの染色法 (Dienes 法)

Table I-4. 各培地における培養時間と *Ureaplasma urealyticum* 検出率

培養時間	液体培地	A ₃ 平板培地	A ₃ 変法平板培地
24	13 (46.5%)	7 (26%)	27 (87%)
48	13 (46.5%)	16 (59%)	4 (13%)
72	2 (7%)	4 (15%)	
計	28	27	31

注) A₃ 変法平板培地の赤変: 24/31 (77%)

みると、24時間培養では液体培地13例 (46.5%)、A₃ 平板培地7例 (26%)、A₃ 変法平板培地27例 (87%) と A₃ 変法平板培地での結果がもっとも早く、A₃ 平板培地がもっとも遅い。しかし実際には液体培地では平板培地に接種し、さらに24時間培養して同定しなければならぬため、もっとも多くの労力と時間を要する。A₃ 変法平板培地では少なくとも全例が48時間までに検出され、液体培地、A₃ 平板培地では72時間まで培養して始めて検出されたものがそれぞれ2例 (7%)、4例 (15%) あった。したがって A₃ 変法平板培地では48時間まで、A₃ 平板培地では72時間まで、液体培地—平板培地では96時間まで分離に時間を必要とする。

2. 精液の *Ureaplasma urealyticum* 半定量培養法

A₃ 変法平板培地上に形成された *Ureaplasma urealyticum* の colony を顕鏡下に概算することによって半定量培養法としても役立つ (Table I-5)。*Ureaplasma urealyticum* の colony 数を1~2コ/全視野、数コ/全視野、1コ/数十視野、1~2コ/十数視野、1~2コ/数視野、1~2コ/1視野のごとく大雑把に分類すると対象とした48症例はそれぞれ1, 3, 1, 3, 28, 12例となる。このうち1~2コ/全視野、数コ/全視野、1コ/数十視野の全例および1~2コ/十数視野の2例はいずれも minocycline による治療中のものであった。したがって未治療の本感染症では大部分 (41例中40例98%) が1ないし数視野に1ない

Table I-5. 男子不妊症患者精液における *Ureaplasma urealyticum* の検出率 (初診時)

陽	性	75 ^{*1} (48.7%)
陰	性	76 ^{*2} (49.3%)
不	明	3 (2.0%)
計		154
Mycoplasma hominis		6 ^{*1, *2} (2.6%)

し2コの colony が検出される位の菌数を有していることになる。なお鏡検は100倍の拡大で行なった。

3. “いわゆる” 男子不妊症患者精液よりの *Ureaplasma urealyticum* の分離

1979年12月から1980年8月までの9カ月間に2年以上の不妊を主訴として京都大学附属病院泌尿器科不妊外来を訪れ、特発性男子不妊症と診断された154例が対象となり A₃ 変法 平板培地で精液の *Ureaplasma urealyticum* の培養が行なわれた (Table I-6)。このうち3名では汚染菌の増殖などの理由で結果が不明である。これを除いた151例のうち75例 (49.7%) が陽性であり、76例 (50.3%) が陰性と、半数に *Ureaplasma urealyticum* 精液感染症が証明された。なお *Mycoplasma hominis* の感染が *Ureaplasma urealyticum* 陽性例で2例、陰性例で6例、計8例が発見された。 *Mycoplasma hominis* の分離が少ないのは、これに対して充分注意して観察しなかったため見逃しているものもあると考えられる。

なお、*Ureaplasma urealyticum* 陽性例非淋菌性尿道炎の既往歴のあるものは2例 (2.7%) であった。

Table I-6. 精液の *Ureaplasma urealyticum* の半定量培養法の成績

	培養件数	%
0~1コ/全視野	1	2.1
数コ/全視野	3	6.3
1コ/数+視野	1	2.1
0~2コ/+数視野	3	6.3
0~2コ/数視野	28	58.1
0~2コ/1視野	12	25.0
計	48	

II. *Ureaplasma urealyticum* 感染精液の精液所見

目 的

Ureaplasma urealyticum 感染精液の性状を研究し、その所見より *Ureaplasma urealyticum* の感染を簡単に予測する方法の有無および精子に障害を与えると推測される精液の性状の変化の有無を調べる。

方 法

1. 精液検査: 4日以上禁欲後、用手法にて乾熱滅菌したガラス容器に精液を採取した。室温に約30分間静置した後よく攪拌してその一部を *Ureaplasma*

urealyticum の培養に供した。ついで精液の pH を測定し、精子濃度、精子運動率、精子奇型率を検鏡下に算定した。

2. pH 測定：精液検査終了後精液の pH を測定した。pH の測定には東洋ろ紙 pH 試験紙を用いた。

3. 精漿中尿素窒素濃度測定：精液検査後 2500 rpm, 20 分で精漿を分離し、尿素窒素テスト(和光純薬)で精漿中尿素窒素濃度を測定した。なお測定までの間精漿を -20°C に凍結保存した。

4. 血清免疫グロブリン濃度：精液採取後約30分して前腕皮静脈より採血し、血清を分離した。血清免疫グロブリン量をレーザーイムノアッセイ法で測定した。

5. 精漿免疫グロブリン濃度：pH 測定後 2500 rpm 20 分で精漿を分離し、LC パルチゲン(ペーリンガー)による単純抗散法で精漿 IgG, IgA 濃度を測定した。IgM 濃度は微量で LC パルチゲンは測定しえないため最初の数検体を測定したにとどめた。なお測定までの間 -20°C に凍結保存した。

成 績

1. 精液検査所見

精液培養を行なった 170 例で *Ureaplasma urealyticum* の感染と精子濃度との関連について成績をまとめると Table II-1 のごとくなる。*Ureaplasma urealyticum* 陽性例 84 例で精子濃度 $60 \times 10^6/ml$ 以上のものが 19 例 (22.6%), $59 \sim 40 \times 10^6/ml$ のものが 9 例 (10.7%), $39 \sim 20 \times 10^6/ml$ のものが 17 例 (20.2%), $19 \times 10^6/ml$ 以下のものが 28 例 (33.3%), azoospermia が 11 例 (13.1%) となる。これを一応 normozoospermia ($40 \times 10^6/ml$ 以上), oligozoospermia と azoospermia の 2 群にまとめると 28 例 (33.3%), 56 例 (56.7%) になる。一方、陰性例 86 例でみると精子濃度 $60 \times 10^6/ml$ 以上

Table II-1. *Ureaplasma urealyticum* 感染精液の精子濃度

精子濃度 ($10^6/ml$)	Ureaplasma urealyticum		
	陽 性	陰 性	
> 60	19*	26	} 36
59 ~ 40	9	10	
39 ~ 20	17	24	} 50
< 19	28	20	
0	11	6	

*, ** p > 0.10 (X²-test)

のものが 26 例 (30.2%), $59 \sim 40 \times 10^6/ml$ のものが 10 例 (11.6%), $39 \sim 20 \times 10^6/ml$ のものが 24 例 (27.9%), $19 \times 10^6/ml$ 以下のものが 20 例 (23.3%), azoospermia が 6 例 (7.0%) となる。陽性例と同じく 2 群に分けると 36 例 (41.9%), 50 例 (58.1%) 以下となる。精子濃度によって 5 群に分けても、また 2 群に分けても *Ureaplasma urealyticum* 感染と精子濃度の間には有意の関係は存在しなかった。

Table II-2. *Ureaplasma urealyticum* 感染精液の運動率

運 動 率	Ureaplasma urealyticum	
	陽 性	陰 性
0 ~ 30 %	12	6
30 ~ 60 %	12	11
> 60 %	45	62

p < 0.10 (X²-test)

Ureaplasma urealyticum 感染と運動率との関連についての成績を Table II-2 に示す。運動率を 0~29%, 30~59%, 60% 以上と分けると陽性例 69 例ではそれぞれ 12 例 (17.2%), 12 例 (17.4%), 45 例 (65.2%) である。陰性例 79 例では 6 例 (7.6%), 11 例 (13.9%), 62 例 (78.5) である。χ²-test は p < 0.10 で *Ureaplasma urealyticum* 感染精液の精子運動率が非感染のそれより悪い傾向がみられた。

Ureaplasma urealyticum の感染と精子奇型率との間には有意の関連性はみられなかった (Table II-3)。精液をパバニコロー染色し、精子 200 コ中の奇型精子を概算して、奇型率 5% 以下、6~9%、10% 以上とすると、*Ureaplasma urealyticum* 陽性例 57 例ではそれぞれ 27 例 (47.4%), 19 例 (33.3%), 11 例 (19.3%) であり、陰性例 63 例では 33 例 (52.4%), 22 例 (34.9%), 8 例 (2.7%) であった。

Table II-3. *Ureaplasma urealyticum* 感染精液の奇型率

奇型率	Ureaplasma urealyticum		
	< 5 %	6 ~ 10 %	> 10 %
陽 性	27	19	11
陰 性	33	22	8
	60	41	19

p > 0.10 (X²-test)

Table II-4. *Ureaplasma urealyticum* 感染精液の pH

培養	pH 7.0	pH 7.5	pH 8.0
陰性	9	39	15
陽性	12	45	10

p > 0.10 (X²-test)

2. 精液 pH

Ureaplasma urealyticum の感染が精液の pH を上昇させるか否かを検討するために測定した精液の pH の結果は、pH 7.0, pH 7.5, pH 8.0 に分けると陽性例 63例では 9例 (14.3%), 39例 (91.9%), 15例 (23.8%) となり、陰性例 67例では 12例 (17.9%), 45例 (67.2%), 10例 (14.9%) となる。*Ureaplasma urealyticum* 陽性精液と陰性精液の間に pH の分布に有意の差はなかった。

3. 精漿中尿素窒素濃度

精漿中尿素窒素濃度を測定した成績を Table II-5 に示す。*Ureaplasma urealyticum* 陽性精液40例の尿素窒素濃度は 3~21 mg/dl に分布し、平均値は 12.1 ± 4.0 mg/dl であった。陰性精液 39例の尿素窒素濃度は 8 mg/dl から 25 mg/dl に分布し、平均値は 13.7 ± 4.0 mg/dl であった。陽性例・陰性例の両群間に有意の差は認められなかった。なお対象となった症例のうち 32例の BUN は 8~20 mg/dl の正常範囲内にあった。

Table II-5. *Ureaplasma urealyticum* 感染精液の精漿尿素窒素濃度

<i>Ureaplasma urealyticum</i>	(+)	(-)
尿素窒素濃度		
mean ± SD	12.1 ± 4.0	13.7 ± 4.0
(range)	(3 ~ 21)	(8 ~ 25)
	n = 40	n = 39

4. 精漿中免疫グロブリン濃度

Mycoplasma pneumoniae 感染、すなわち異型肺炎では *Mycoplasma pneumoniae* に対する抗体価が上昇する。現在までのところ *Ureaplasma urealyticum* の抗原が作成されていないので抗体価を測定しえない。このため *Ureaplasma urealyticum* 感染の不妊症患者の血清および精漿免疫グロブリン量を測定した。その成績を Fig. II-1~3 に示す。32例で測定した血清 IgM 量は 96.4 ± 68.1 mg/dl, IgG 量は 1012 ± 263 mg/dl, IgA 量は 186.8 ± 80.3 mg/dl であった (Fig. II-1)。い

れもその平均値は正常範囲 (それぞれ 60~250 mg/dl, 800~1800 mg/dl, 90~420 mg/dl) 内の低値にあるが、両側検定法によりいずれも正常値と有意の差はない。

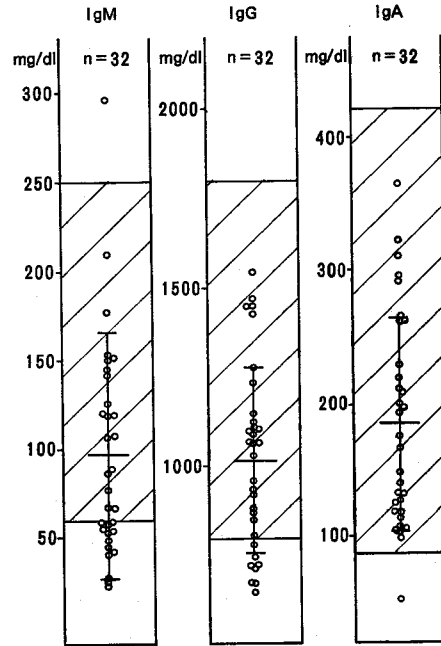


Fig. II-1. *Ureaplasma urealyticum* 精液感染症における血清免疫グロブリン

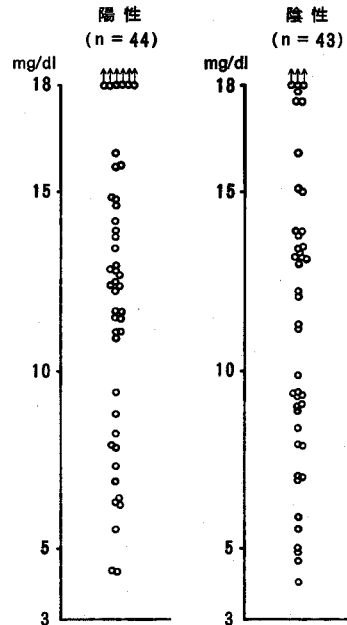


Fig. II-2. *Ureaplasma urealyticum* 感染精液の精漿 IgG 濃度

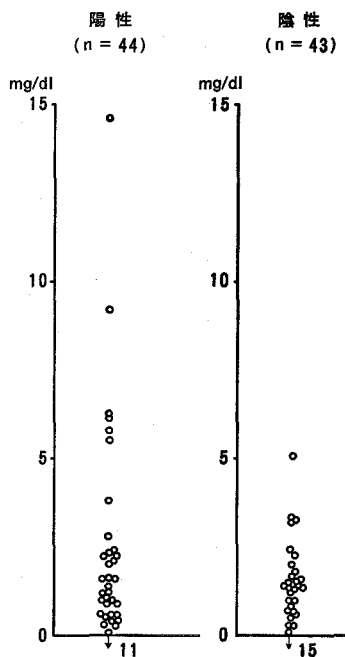


Fig. II-3. *Ureaplasma urealyticum* 感染精液の精漿 IgA 濃度

Ureaplasma urealyticum 陽性例 44 例の精漿 IgG 濃度と陰性例 43 例の精漿 IgG 濃度を Fig. II-2 に示す。同一症例の精漿 IgA 濃度を Fig. II-3 に示す。IgG では 18 mg/dl 以上 (15 mg/dl 以上は半定量となる)

の測定限界値を越える症例が陽性例で 6 例、陰性例で 3 例みられ、IgA では逆に trace であった症例が陽性例で 11 例、陰性例で 15 例みられた。陽性例で高値を示すものが 2 例みられた。IgG および IgA のいずれにおいても測定値限界値を越えるものや以下のものもあって正確な平均値を算出することは不可能であるが、一見して陽性例と陰性例の両群間に精漿 IgG 濃度および IgA 濃度に有意の差が存在しないのがわかる。なお精漿中の IgM 濃度を測定したが大部分は LC パルチゲンの測定限界値以下であった。

III. *Ureaplasma urealyticum* 精液感染症に対する治療

目 的

Ureaplasma urealyticum 精液感染症に対する治療方法を確立し、ついで本感染症を治療し、その結果精液所見が改善するか否かによって本感染症と男子不妊症との関連性について攻究する。

方 法

Ureaplasma urealyticum 感染症の治療に minocycline (Minomycin) の投与を試みた。治療計画として Fig. III-1 を考えた。

1. 精液中 minocycline 濃度の測定

実際の治療に先立って治療上の基礎データを得る目的で精液中の minocycline 濃度を測定した。minocyc-

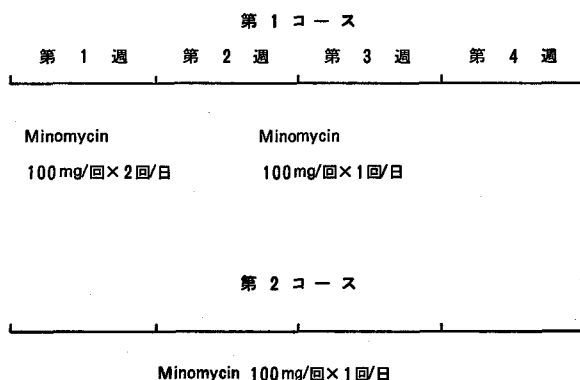


Fig. III-1. *Ureaplasma urealyticum* 感染症に対する治療計画

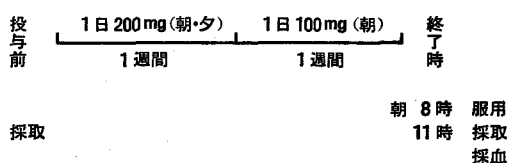


Fig. III-2. Healthy volunteers における精液濃度の測定のための minocycline の投与

Table III-1. minocycline の精液中濃度 ($\mu\text{g/ml}$) (healthy volunteers)

氏名	年齢	期間中の射精回数	服用後サンプル採取までの時間	血中濃度	精液中濃度
H. N.	24	5	27	0.74	0.059
T. M.	26	3	3	3.33	1.96
S. Y.	31	0	3	3.91	2.25

測定限界: 0.05 $\mu\text{g/ml}$

line の測定は *B. cereus var. mycoides* ATCC 11778 を検定菌とした cup plate 法で行なった。healthy volunteer 3名における濃度の測定では、その投薬は Fig. III-2 のごとくに行なった。すなわち1日 200 mg 1週間、ついで1日 100 mg 1週間、計 2100 mg 投与後の精液中の minocycline 濃度を測定した。最終服用を朝 8 時とし血中濃度のもっとも高くなる 3 時間後に精液と血液を採取した。

つきに本感染症患者 5 名における濃度の測定では、第 2 コース終了時 (Fig. III-1)、最終服用 5~6 時間後に精液と血液を採取した。

精液および血清は濃度測定までの間 -20°C に凍結保存した。

2. 本感染症患者における minocycline の治療成績と治療後の精液所見

本感染症患者に対する治療を Fig. III-1 のごとくに行なった。すなわち第 1 コースは第 1 週 1 日 200 mg、以後 3 週間は 1 日 100 mg を服用させた。第 2 コース以後は 1 日 100 mg 4 週間の連続投与とし、精液中の *Ureaplasma urealyticum* が陰性となるまで投薬することにし、各コース終了ごとに精液検査と *Ureaplasma urealyticum* の培養を施行することを基準とした。われわれは不妊夫婦の妻については *Ureaplasma urealyticum* の培養を全く行っていない。このため *Ureaplasma urealyticum* 精液感染症の治療には、その妻に対しても夫と同様な期間、同様な方法で minocycline の治療を行なった。

成 績

1. healthy volunteer における minocycline の精液中濃度

healthy volunteer 3 名の成績を Table III-1 に示す。症例 2 (T.M.) と 3 (S.Y.) のごとく期間中の射精の回数に関係なく、精液中濃度は 1.96 $\mu\text{g/ml}$, 2.25 $\mu\text{g/ml}$ とほぼ同値であった。また最終服用後 27 時間経過して採取した精液中の濃度は 0.059 $\mu\text{g/ml}$ と trace

であった。ピーク時と思われる投薬 3 時間後の精液中 minocycline 濃度は血中濃度の約 60% (58.9%, 57.5%) であった。

2. 本感染症患者における minocycline の精液中濃度

症例 1 (Y.I.) のみが最終服用後 5 時間で精液を採取したが、この精液中濃度が 2.35 $\mu\text{g/ml}$ と高く、他の 5 例では 6 時間後に採取した精液の minocycline 濃度は 1.56~1.96 $\mu\text{g/ml}$ (平均 1.71 $\mu\text{g/ml}$) であった (Table III-2)。

Table III-2. 2 コース服用後の minocycline の精液中濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

氏名	年齢	服用後サンプル採取までの時間	精液中濃度
Y. I.	32	5	2.35
T. S.	31	6	1.66
H. H.	28	6	1.96
Y. O.	27	6	1.56
T. S.	35	6	1.66

3. 本感染症に対する治療成績

第 2 コースまでの治療効果を確実に追跡しえた 22 例の成績を Table III-3 に示す。第 1 コース終了時に精液の *Ureaplasma urealyticum* を培養しえた 2 例は、いずれも陽性であったため、以後は 2 コースの治療を原則とした。2 コース終了後に精液の培養を全例で行ない、うち 15 例 (68.2%) は陰性となった。他の 5 例 (22.7%) はなお陽性であった。残る 2 例 (9.1%) は菌数の著減 (投与前 0~1/数視野のものが 1~2/全視野, 4/全視野となった) をみながなお陽性であった。完全な陰性化のためにはさらに 2 週間の minocycline の投与が必要であった。第 2 コース終了後も陽性であった 5 例はさらに 1 コースの治療を追加

Table III-3. minocycline の *Ureaplasma urealyticum* 感染症に対する治療成績

第1コース		
(+) → (+)	2例	
第1+2コース(22例)		
(+) → (-)	15例	
(+) → (+)**	2例	
(+) → (+)	5例	
第1~3コース(5例)		
(+) → (-)	3例	
(+) → 不明	2例	
** 0~1/数→1~2/全, 4/全		

した。この追加で4例は陰性となった。他の1例も培養を施行しえたが汚染菌の増殖が著しく、判定が不能であった。残る1例は lost to follow up となった。

4. *Ureaplasma urealyticum* が陰性化した精液の所見 minocycline の治療によって *Ureaplasma urealyticum* が陰性化した18例の投薬前後の精液所見を比較した (Table III-4)。精子濃度が100%以上の改善をみたもの7例 (38.9%)—Table II-5 の第6例は93.8%の増加であるが改善のなかに入れた一、不変であったもの7例 (38.9%)、50%以上の悪化、すなわち半分以下

Table II-I4. *Ureaplasma urealyticum* が陰性化した18例の精液所見

	精子濃度	運動率
改善	7 (38.9%)	7 (38.9%)
不変	7 (38.9%)	9 (50.0%)
悪化	4 (22.2%)	2 (11.1%)

になったもの4例 (22.2%) であった。運動率についてみると、50%以上の改善をみたもの7例 (38.9%)、不変であったもの9例 (50.0%)、2/3以下に悪化したもの2例 (11.1%) であった。

つぎに精子濃度の改善した7例、悪化した7例、運動率の改善した7例についてさらに詳細に検討してみた。精子濃度の改善した7例 (Table II-5) のうち運動率の改善をみたものは症例1、2の2例に過ぎず、他の5例の運動率は不変であった。全18例中2例 (11.1%) が精子濃度・運動率の双方で改善したことになる。この7例のうち投薬前後の奇型率を算定したものが5例あり、このうち1例 (症例3) において奇型率が改善している。したがって投薬前後で精子濃度、運動率、奇型率を算定しえた17例で、この3所見がそろって改善した症例は1例もなかったことになる。

つぎに運動率の改善した7症例をみる (Table II-6)。精子濃度の改善がともにみられたものは2例であり、うち1例 (症例2) は normozoospermia であり、100%以上の改善をみたものは症例1にすぎず、しかも奇型率では悪化している。運動率の改善をみた7例のうち5例 (症例4~7) は精子濃度の悪化を伴い、さらに症例7では奇型率の悪化を伴っている。

精子濃度の悪化したものは4例 (Table III-7) であるが、いずれも運動率の改善をみている。奇型率の改善をみたものはなく、逆に症例4では奇型率の悪化を招いている。運動精子数 (精子濃度×運動率) を計算してみると症例1 ($9.6 \times 10^6/\text{ml} \rightarrow 5.4 \times 10^6/\text{ml}$)、症例2 ($2.7 \times 10^6/\text{ml} \rightarrow 10.2 \times 10^6/\text{ml}$)、症例3 ($18.5 \times 10^6/\text{ml} \rightarrow 9.6 \times 10^6/\text{ml}$)、症例4 ($0.3 \times 10^6/\text{ml} \rightarrow 1.6 \times 10^6/\text{ml}$) と改善、不変、悪化とまちまちの成績であった。

考 察

ヒトからの mycoplasma の分離の最初の報告は1937年 Dienes and Edsall によるもので、バリトリ

Table II-5. *Ureaplasma urealyticum* の陰性化で精子濃度の改善した症例

症例	精子濃度 ($\times 10^6/\text{ml}$)		運動率 (%)		奇型率 (%)	
	前	後	前	後	前	後
1	129	184	40	70		
2	16	36	50	90	6	15
3	21	88	95	90	15	2
4	61	98	90	95	2	5
5	21	80	60	60	3	4
6	16	31	80	90	2	6
7	10	20	70	70		

Table II-6. *Ureaplasma urealyticum* の陰性化で運動率の改善した症例

症 例	運 動 率 (%)		精 子 濃 度 (× 10 ⁶ / ml)		奇 型 率 (%)	
	前	後	前	後	前	後
1	50	90	16	36	6	15
2	40	70	129	184		
3	30	70	80	52		
4	10	80	27	17	5	6
5	50	80	37	12	10	11
6	60	90	16	6		
7	1	10	34	16	5	12

Table III-7. *Ureaplasma urealyticum* が陰性化した
精子濃度の悪化した症例

症 例	精 子 濃 度 (× 10 ⁶ / ml)		運 動 率 (%)		奇 型 率 (%)	
	前	後	前	後	前	後
1	16	6	60	90		
2	27	17	10	60	5	6
3	37	12	50	80	10	11
4	34	16	1	10	5	12

ン腺膿瘍に由来する⁶²。ヒト性器 mycoplasma 感染症は性行為伝染 (sexually transmitted) によるものであり、童貞²⁸³や処女^{3,27}では検出されないが性行為の相手がまずにつれて検出率が増加する^{27,283}。これに対して妊婦や避妊薬の服用者で検出率が高く、思春期前や閉経後の女子で低いことから、ホルモン環境の相違による局所の変化に起因するとの考えもある²⁴。白人女性よりも黒人女性に多いことから、社会的経済的因子も考慮されている¹⁰。性器に感染する mycoplasma には *Mycoplasma hominis* type I, *Mycoplasma fermentas* と *Ureaplasma urealyticum* が知られている。*Mycoplasma fermentas* はきわめてまれであり、*Mycoplasma hominis* はしばしば検出され、流産を惹起しやすいとの報告¹⁰もあるが一般には病原性に疑問がある⁴¹。*Ureaplasma urealyticum* は Shepard によって1954年非淋菌性尿道炎から始めて分離され³²、その後、いくつかの疑問点と反対意見を残しながらも、ほぼ非淋菌性尿道炎の possible cause として認められている^{13,34}。このほかにも子宮内膜炎¹⁷、自然流産^{20,21}、早産²⁰、胎児の出産時体重の減少¹⁹と感染¹⁹、骨盤腔炎³⁷や帝王切開後の創傷感染³⁷など、主として女性の性器の炎症と生殖能の障害の原因に挙げられている。

Ureaplasma urealyticum が注目を浴びたのは、不妊症との関連を挙げた Gnärpe and Friberg の報告¹²以

後である。不妊夫婦 52 組で、夫精液 (86.6%) および妻頸管分泌液 (90.3%) からの検出率は対照正常者のそれ (26%, 23%) とはきわめて有意に高く、doxycycline の投与で29%が妊娠した^{11,13}。以後、いくつかの報告があり、*Ureaplasma urealyticum* の精液からの分離率については不妊男子では50%前後、対照男子では30%前後とほぼ一致している¹³。しかし、現在、*Ureaplasma urealyticum* の男子妊孕性に及ぼす影響は大きく、有無の2つに分れている。*Ureaplasma urealyticum* 分離率のもとより、この感染が精液所見、挙児率などに及ぼす影響や治療後の精液所見と挙児率に大きな影響を与えない、すなわち、*Ureaplasma urealyticum* の感染は男子の妊孕性に関係なく、その培養や治療も無駄とする否定的な意見がある^{4,5,15,18,25}。われわれの成績もこれに近いものであるが最終的には妊娠率の調査を行ない、その結果をみるまで結論を延したい。女子においても同様な成績が得られ、不妊女子では膈分泌液や頸管分泌液からの *Ureaplasma urealyticum* の分離率が正常 (fertile) 女子からのそれよりもすこし大きいが *Ureaplasma urealyticum* の感染は膈分泌液や頸管分泌液の性状および postcoital test の成績に何らの変化をももたらさないし、治療も挙児率の改善に役立たない^{18,31}。

これに対して一方では *Mycoplasma hominis* までも

不妊と関連するとする意見もある²³⁾。Gnarpe and Friberg は精液を遠沈して上清の精漿と沈渣の精子にわけて培養すると *Ureaplasma urealyticum* は沈渣から分離される¹³⁾ので精子に附着して存在するとした。さらに走査型電子顕微鏡 (SEM) で精子の sperm head の後部または middle piece に附着してみられる bud-like outgrowths として証明した¹⁴⁾。Fowlkes et al. もこれを追試し、さらに特有な所見として直径 200 nm の spherules and associated fibrils および coiled tail を挙げた⁸⁾。これらの SEM での所見に相当する光顕 (Papanicolaou 染色) 上の所見として tail segment の fuzzy, granular coating を紹介し、Ureaplasma index (UI) (coiled tail を示す精子細胞の百分と fuzzy tail を有する精子細胞の百分の積) を導入し、この index が 1000 を越えるか否かを基準にして 70% の確率で *Ureaplasma urealyticum* の培養成績を予測しようとした¹²⁾。これらの研究は 233 名²⁹⁾、682 名⁹⁾ のいわゆる男子不妊症の精液所見の解析から *Ureaplasma urealyticum* は精子濃度の低下、運動率の減少、tapering forms や spermatids の出現などを惹起し^{9,29)}、tetracycline または doxycycline による治療は運動率や奇型率を改善する³³⁾という臨床成績を裏付けるものである。不妊で *Ureaplasma urealyticum* 陽性の男子の妻から *Ureaplasma urealyticum* の検出される率は general population と比較すると 3 倍も高い²⁹⁾。

Ureaplasma urealyticum 感染と不妊の関連性を支持するこれらの業績の大部分は O'Leary 一派によるもので、しかも O'Leary and Frick²⁹⁾ は病原性の少ないことから *Ureaplasma urealyticum* を避妊法の 1 つに利用することさえ示唆している。

Ureaplasma urealyticum の感染が不妊症を惹起する機序として 1) *Ureaplasma urealyticum* の附着による精子運動能の減少、2) 細菌の侵入を阻止する頸管腔を spermatozoa-bearing に侵入した *Ureaplasma urealyticum* による子宮内膜炎、3) *Ureaplasma urealyticum* の産生する neuramidase 様物質による受精の障害¹⁴⁾などが挙げられる。

O'Leary 一派の仕事は非常に興味があり、説得力がある。しかし Taylor-Robinson はそれらの 1 つずつに対して、たとえば、1) *Ureaplasma urealyticum* 陽性の女性のうち 23% が 1 年以内に妊娠している、2) SEM で観察される精子上の blobs も *Mycoplasma hominis* や *Chlamydiae* などの可能性もある、3) ウシ精子でもよく *Ureaplasma urealyticum* が附着するが高い妊孕性を有している、など個々の例を挙げて、*Ureaplasma urealyticum* 感染と不妊症との関連について結論付ける

にはなお論拠に乏しいと論評している³⁰⁾。

治療についてみると Gnarpe and Friberg の報告以来 doxycycline が広く使用されている^{4,15,25,38)}。doxycycline の *Ureaplasma urealyticum* に対する MIC については 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 以下であるがときに 0.6 $\mu\text{g/ml}$ までのものもある¹³⁾、0.16~0.32 $\mu\text{g/ml}$ ⁴⁾ と報告されている。doxycycline 200 mg の最終服用後 12~14 時間の血清濃度は 0.4~1.35 $\mu\text{g/ml}$ ¹³⁾ で、精漿濃度は 0.2~1.8 $\mu\text{g/ml}$ (平均 0.95 $\mu\text{g/ml}$)¹³⁾ である。100 mg 服用後 4~5 時間の血清濃度は 0.43~2.76 $\mu\text{g/ml}$ (平均 1.55 $\mu\text{g/ml}$)⁴⁾、100 mg 服用後 24 時間の精漿濃度は 0.22~0.95 μg (0.49 $\mu\text{g/ml}$)⁴⁾ である。われわれの minocycline の成績と比較すると doxycycline は精漿への移行がよく、半減時間も長そうである。われわれの *Ureaplasma urealyticum* 精液感染症の治療に適しているようであるが胃腸症状などの副作用を訴えることが多く、長期の運用に耐えないことが多い。われわれのシリーズで胃腸症状、目まい感などの副作用を訴えて薬剤の投与を中止したものが 2 例あった。

Evans and Taylor-Robinson⁷⁾ によると 141 例の非特異性尿道炎から分離された *Ureaplasma urealyticum* 14 株 (9.9%) は minocycline と oxytetracycline に耐性を示した。感受性株を in vitro で耐性化することは可能であったが自然耐性株ほどの耐性を獲得させることはできなかった。

われわれは液体培地として Taylor-Robinson 液体培地、固体培地として Shepard A₃ 標準平板培地を改良した A₃ 変法培地を使用し、分離・同定したが、最近のものとして Shepard U₉ 液体培地³⁵⁾、Shepard A₇ 標準平板培地³⁶⁾が発表されている。現在われわれはこれらの培地の評価を行なっている。なお、われわれの A₃ 変法培地の尿素濃度が 1.0% と多いのは 0.1% では発色しないためである。この結果 colony の変性が早く、遅くとも 48 時間以内に同定した方がよい。

Mycoplasma pneumoniae の感染症である異型肺炎では、抗体価が上昇し、その測定が診断に利用されている。*Ureaplasma urealyticum* の感染では抗体価測定の試み³⁰⁾がなされているに過ぎない。*Ureaplasma urealyticum* の serotyping も始められている^{2,22)}。

結 語

Ureaplasma urealyticum 精液感染症の実態を知り、男子不妊症との関連を知る目的で実験を行ない、以下の成績を得た。

1) 精液から *Ureaplasma urealyticum* を簡便かつ確実に分離するために Taylor-Robinson et al. の液体

培地と Shepard の A_3 平板培地を混合したような A_3 変法平板培地を作成した。液体培地, A_3 平板培地, A_3 変法平板培地での *Ureaplasma urealyticum* の分離率を比較したところ A_3 変法平板培地がもっとも優れていた。男子不妊症 53 例で精液よりの *Ureaplasma urealyticum* の分離率は液体培地+ A_3 平板培地, A_3 平板培地, A_3 変法培地でそれぞれ 53%, 51%, 59% であった。それらのうちで 24 時間以内に分離されたのはそれぞれ 46.5% (液体培地からの陽性例), 26%, 87% であった。

A_3 変法平板培地では半定量培養法としても利用しうる。未治療例では大部分 (98%) が 1 ないし数視野に 1 ないし 2 コ位以上の colony が検出される。

2) いわゆる男子不妊症 151 例では 75 例 (49.7%) の精液から *Ureaplasma urealyticum* が分離され, 残る 76 例 (50.3%) が陰性だった。この 75 例で非淋菌性尿道炎の既往のあるものは 2 例 (2.7%) であった。

3) *Ureaplasma urealyticum* を培養した 170 例の精液を *Ureaplasma urealyticum* 陽性の精液例と陰性の精液 86 例に分けて, それぞれ精子濃度, 精子運動率, 精子異型率について関連性を検討したが有意の成績は得られなかった。

4) *Ureaplasma urealyticum* の感染が精液 pH に与える影響を 130 例 (陽性 63 例, 陰性 67 例) の精液で検討したが有意の差はなかった。

5) 精漿中尿素窒素濃度を 79 例 (陽性 40 例, 陰性 39 例) の精液で測定したが有意の差を認めなかった。

6) 精漿中 IgA, IgG 濃度も 87 例 (陽性 44 例, 陰性 43 例) の精液で有意の差を認めなかった。血清 IgG, IgM, IgA 濃度を *Ureaplasma urealyticum* 精液感染症 32 例で測定した。その値は正常値の下限にあった。

7) healthy volunteer 3 名で, 1 日 200 mg 1 週間, ついで 1 日 100 mg 1 週間, 計 2100 mg の minocycline 投与で, 最終薬剤服用後 3 時間 (2 例), 27 時間 (1 例) 後の精液中 minocycline 濃度は 1.96 $\mu\text{g/ml}$, 2.25 $\mu\text{g/ml}$, 0.059 $\mu\text{g/ml}$ で, 前 2 者で血中濃度と比較すると精液中濃度は血中濃度の約 60% であった。

8) *Ureaplasma urealyticum* 陽性不妊症患者 6 例において 1 日 200 mg 1 週間, ついで 1 日 100 mg 3 週間の minocycline の連続投与で, 最終服用 5~6 時間後の精液中 minocycline 濃度は平均 1.71 $\mu\text{g/ml}$ (1.56~1.96 $\mu\text{g/ml}$) であった。

9) 1 日 200 mg 1 週間, ついで 1 日 100 mg 3 週間の minocycline の連続投与を第 1 コースとし, 以後 1 日 100 mg 4 週間の連続投与を 1 コースとして治

療した。治療効果を確実に追跡しえた 22 例で第 2 コース終了時陰性になったものは 15 例 (68.2%), 完全に陰性になるのに第 3 コースまでの治療を必要としたものは 5 例 (22.7%) であった。

10) *Ureaplasma urealyticum* が陰性化した 18 例で投薬前後の精液所見を比較した。精子濃度, 運動率, 奇型率のいずれについても明らかな改善をみたとは言いがたい成績であった。精子濃度・運動率の双方で改善したものは 18 例中 2 例 (11.1%) みられたが, 精子濃度・運動率・奇型率のすべてが改善したものは 17 例中 1 例のみみられなかった。

本論文の要旨は第 25 回日本不妊学会総会, 第 55 回日本感染症学会総会において口演した。*Ureaplasma urealyticum* の培養に熱心なるご協力をいただいた本院中央検査部の永野三輪子技官に深謝します。

文 献

- 1) Braun P, Lee YH, Klein JO, Marcy SM, Klein TA, Charles C, Levy P, Kass EH: Birth weight and genital mycoplasmas in pregnancy. *New Engl J M* 284: 167-174, 1971
- 2) Clyde WA Jr.: Mycoplasma species identification based upon growth inhibition by specific antisera. *J Immunol*, 92: 958-965, 1964
- 3) Csonka GW, Williams REO, Corse J.: T-strain mycoplasma in nongonococcal urethritis. *Lancet i*: 1292-1295, 1966
- 4) De Louvois J, Blades M, Harrison RF, Hurley R, Stanley VC: Frequency of Mycoplasmas in fertile and infertile couples. *Lancet i*: 1073-1075, 1974
- 5) Desai S, Cohen MS, Khatamee M, Leiter E: *Ureaplasma urealyticum* (T-mycoplasma) infection: Does it have a role in male infertility? *J Urol* 124: 469-471, 1980
- 6) Dienes L, Edsall J: Observations on L-organism of Klieneberger. *Proc Soc Exper Biol Med* 36: 740-744, 1937
- 7) Evans RT, Taylor-Robinson D: The incidence of tetracycline-resistant strains of *Ureaplasma urealyticum*. *J Antimicrob Chemoth* 4: 57-63, 1978
- 8) Fowlkes DM, Doohar GB, O'Leary WM: Evidence by scanning electron microscopy for an association between spermatozoa and T-myc-

- plasmas in men of infertile marriage. *Fertil Steril* **26**: 1203-1211, 1975
- 9) Fowlkes DM, MacLeod J, O'Leary WM: T-mycoplasmas and human infertility: correlation of infection with alterations in seminal parameters. *Fertil Steril* **26**: 1212-1218, 1975
 - 10) Foy H, Kenny GE, Wentworth BB, Johnson WL, Grayston JT: Isolation of mycoplasma hominis, T-strains, and cytomegalovirus from the cervix of pregnant women. *Amer J Obstet Gynec* **106**: 635-643, 1970
 - 11) Friberg J, Gnarpe H: Mycoplasma and human reproductive failure. III. Pregnancies in "infertile" couples treated with doxycycline for T-mycoplasmas. *Amer J Obstet Gynecol* **116**: 23-26, 1973
 - 12) Gnarpe H, Friberg J: Mycoplasma and human reproductive failure. I. The occurrence of different Mycoplasmas in couples with reproductive failure. *Amer J Obstet Gynecol* **114**: 727-731, 1972
 - 13) Gnarpe H, Friberg J: T-mycoplasmas as a possible cause for reproductive failure. *Nature* **242**: 120-121, 1973
 - 14) Gnarpe H, Friberg J: T Mycoplasmas on spermatozoa and infertility. *Nature* **245**: 97-98, 1973
 - 15) Harrison RF, De Louvois J, Blades M, Hurley R: Doxycycline treatment and human infertility. *Lancet* **i**: 605-607, 1975
 - 16) Harwick HJ, Purcell RH, Iuppa J, Fekety FR Jr: Mycoplasma hominis and abortion. *J Infect Dis* **121**: 260-268, 1970
 - 17) Horne HW, Hertig AT, Kundsins RB, Kosasa TS: Sub-clinical endometrial inflammation and T-mycoplasma. A possible cause of human reproductive failure. *Int J Fertil* **18**: 226-231, 1973
 - 18) Idnss WM, Patton WC, Taymor ML: On the etiologic role of *Ureaplasma urealyticum* (T-mycoplasma) infection in infertility. *Fertil Steril* **30**: 293-296, 1978
 - 19) Klein JO, Buckland D, Finland M: Colonization of newborn infants by mycoplasmas. *New Engl J M* **280**: 1025-1030, 1969
 - 20) Kundsins RB, Driscoll SG: Mycoplasmas and human reproductive failure. *Surg Gyn Obst* **89-92**, 1970
 - 21) Kundsins RB, Driscoll SG, Ming PL: Strain of mycoplasma associated with human reproductive failure. *Science* **157**: 1573-1574, 1967
 - 22) Lin JL, Kendrick MI, Kass EH: Serologic typing of human genital T-mycoplasmas by a complement-dependent mycoplasmacidal test. *J Infect Dis* **126**: 658-663, 1972
 - 23) Love W, Jones M, Andrews B, Thomas M: Mycoplasmas in human infertility. *Lancet* **i**: 1130-1131, 1973
 - 24) Mardh P, Westrom L: T-mycoplasmas in the genito-urinary tract of female. *Acta path microbiol scand* **78**: 367-374, 1970
 - 25) Matthews CD, Clapp KH, Tansing JA, Cox LW: T-mycoplasma genital infection: the effect of doxycycline therapy on human unexplained infertility. *Fertil Steril* **30**: 98-99, 1978
 - 26) Matthews CD, Elmslie RG, Clapp KH, Svigos JM: The frequency of genital mycoplasma infection in human fertility. *Fertil Steril* **26**: 988-990, 1975
 - 27) McCormack WM, Almeida PC, Bailey PE, Grady EM, Lee Y: Sexual activity and vaginal colonization with genital mycoplasmas. *JAMA* **221**: 1375-1377, 1972
 - 28) McCormack WM, Lee Y, Zinner SH: Sexual experience and urethral colonization with genital mycoplasmas. A study in normal men. *Ann Int Med* **78**: 696-698, 1973
 - 29) O'Leary WM, Frick J: The correlation of human male infertility with the presence of Mycoplasma T-strains. *Andrologia* **7**: 309-316, 1975
 - 30) Purcell RH, Taylor-Robinson D, Wong D, Chanock RM: Color test for the measurement of antibody to T-strain Mycoplasmas. *J Bacteriol* **92**: 6-12, 1966
 - 31) Rehewy MSE, Jaszczak S, Hafez ESE, Thomas A, Brown WJ: *Ureaplasma urealyticum* (T-mycoplasma) in vaginal fluid and cervical mucus from fertile and infertile women. *Fertil Steril* **30**: 297-300, 1978
 - 32) Shepard MC: The recovery of pleuropneumonia-like organisms from Negro men with and without nongonococcal urethritis. *Ann J Syn*

- Gonor Ven Dis **38**: 113-124, 1954
- 33) Shepara MC: Fundamental biology of the T-strains. In the Mycoplasmatales and the L-phase of bacteria. ed. L Hayflick, Appleton-Century-Crofts Division, Meredith Corp, New, York NY, 1969.
- 34) Shepard MC: Nongonococcal urethritis associated with human strains of "T" mycoplasmas. JAMA, **211**: 1335-1340, 1970
- 35) Shepard MC, Lunceford CD: Urease color test medium U-9 for the detection and identification of "T" mycoplasmas in clinical material. Appl Microbiol **20**: 539-543, 1970
- 36) Shepard MC, Lunceford CD: Differential agar medium (A7) for identification of *Ureaplasma urealyticum* (human T mycoplasmas) in primary cultures of clinical material. J Clin Microbiol **3**: 613-625, 1976
- 37) Solomon F, Capsi E, Bukovsky I, Sompolinsky D: Infections associated with genital mycoplasma. Am J Obstet Gynecol **116**: 785-792, 1973
- 38) Swenson CE, Toth A, O'Leary WM: *Ureaplasma urealyticum* and human infertility: the effect of antibiotic therapy on semen quality. Fertil Steril **31**: 660-665, 1979
- 39) Taylor-Robinson, D: T-mycoplasmas and infertility. Nature **248**: 267, 1974
- 40) Taylor-Robinson D, Addey JP, Goodwin CS: Comparison of techniques for the isolation of T-strain mycoplasmas. Nature **222**: 274-275, 1969
- 41) Taylor-Robinson D, Purcell RH: Mycoplasmas of the human urogenital tract and oropharynx and their possible role in disease: a review with some recent observations. Proc Roy Soc Med **59**: 1112-1116, 1966
- 42) Toth A, Swenson CE, O'Leary WM: Light microscopy as an aid in predicting *Ureaplasma* infection in human semen. Fertil Steril **30**: 586-591, 1978
- 43) 中村昌弘・尾形 学: コロニーの観察と染色法. 佐々木正五・尾形 学・中村昌弘編 "マイコプラズマ" pp. 167, 講談社サイエンティフィック, 東京, 1977

(1981年1月8日受付)