

非淋菌性尿道炎に於ける Pleuropneumonia-Like Organisms (PPLO) に関する研究

第Ⅱ編 PPLO 分離株の分類に就て

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（指導 藤野恒三郎教授）
大 島 升

Studies on Pleuropneumonia-Like Organisms in Non-Gonococcal Urethritis in the Male

II : Classification of the Strains of Pleuropneumonia-Like Organisms Isolated from Non-Gonococcal Urethritis in the Male

Minoru OSHIMA

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

The 12 strains of Pleuropneumonia-Like Organisms (PPLO) were examined to determine their biological properties ; 10 strains had been isolated from non-gonococcal urethritis in the male and 2 strains (07 and 'Campo L') isolated in America.

All of 12 strains grew as well on media enriched with rabbit serum as they did on horse serum agar. When grown on horse serum agar they did not form film and spots. They grew throughout a semi-solid medium, producing a markedly granular growth.

All strains did not produce haemolysis of horse blood agar and did not ferment glucose.

All except one ('Campo L') of the 12 strains produced no local abscesses in mice after subcutaneous inoculation.

Though serological identification has been made, there seems to be little doubt that all except one ('Campo L') of the strains tested are identical with the strains designated by Nicol and Edward as the Human Type 1.

Nocard 及び Roux (1898) による牛の胸膜肺炎菌の最初の分離以来、いわゆる Pleuropneumonia-Like Organisms (PPLO) と一括呼称される微生物は、広く自然界、動物界を通じて多数分離されている。然るにその分類法は、統一されないまま長らく未解決の問題として残されているが、近来、人体特に男女尿性器系からの分離頻度がとみに増加しつつあり、PPLO の分類の解決は、今や焦眉の問題として待望されている。

Nicol 及び Edward⁴⁾ (1953), 更に Edward¹⁾

(1954) は、PPLO の微生物学的性状に関する多年の研究に基いて、其の分類鑑別に資するに足る一つの系統的検索規準を示し、ついで最近 Edward 及び Freundt²⁾ (1956) は、新しく PPLO の命名及び分類法を提唱した。

著者は、非淋菌性尿道炎 (NGU) から分離した PPLO の10株につき、Edward の規準方式に従つて種々微生物学的性状を実験したのでその成績を報告する。

(本論文の要旨は⁵⁾、1956年第44回日本泌尿器科学会総会 一於北大一 に於て発表した。)

I 実験材料及び実験方法

A 実験材料

1) 供試菌株

第Ⅰ編記載の NGU からの PPLO 分離株の中10株 (OT-1, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 110, 111, 112 と略称) を選び、別に Morton よりおくられてきた 07株及び Campo 株 2 株を対照とし、計12株を供試した。

2) 使用培地

次の処方をもつ固形、流動寒天及び液体の3種の培地を用に応じて使用した。之らは何れも混和溶解し、pH 7.8 に補正、汙紙にて数回濾過後、15 分間高压滅菌し、20%に馬血清或は家兎血清を加える。但し固形及び流動培地では、寒天末を蒸溜水、其他成分を牛心肉水にて溶解し、別々に濾過後混和する。

(PPLO 用—固形培地) (—流動培地) (—液体培地)

ポリペプトン	20.0 g		
NaCl	5.0 g		
Na ₂ HPO ₄	5.0 g	同左	同左
牛心肉水	500. ml		
蒸溜水	500. ml		
寒天末	20.0 g	1.5g	0g

pH 7.8 とし、20%の割に脱線維血液又は血清を添加。

B 実験方法

実験(1) 血清を含まない培地に於ける発育。

血清を加えない PPLO 用固形培地の斜面培地を使用し、以下培養方法及び判定は第Ⅰ編記載と同様である。

実験(2) 馬血清加固形培地に於ける発育。

馬血清加固形培地を平板及び斜面培地とし、之に 5 乃至 6 日培養の集落を寒天 1cm² と共に液体培地内で砕いて浮遊菌液をつくり、その 2 白金耳宛を移植する。培養及び判定方法は前者と同じく、特に film and spots 形成の有無に注意する。之を認めた場合＋とし、認めないのを－とした。

実験(3) 家兎血清加固形培地に於ける発育。

家兎血清加固形斜面培地を使用し、以下実験方法は前者の通りである。同時に20%脱線維血液加固形培地にて同一条件の下に培養、之を対照とした。判定は両者の発育状態の比較によつてなされた。

実験(4) 流動寒天培地に於ける発育。

家兎血清加流動寒天培地を使用し、実験(2)と同様の菌浮遊液を 1 白金耳宛穿刺移植した。培養24時間毎ルーベにて観察し、集落の性状を精査する。

実験(5) 溶血現象

(i) 馬血清加固形平板培地を基礎培地として、之に対し 6 %脱線維馬血液加固形培地を重層用培地とす

る。

(ii) 実験(2)と同様の操作により菌浮遊液作成、之を 1.0 ml 宛、滅菌ピペットにて基礎培地に注加移植する。37°C 3 日間培養する。

(iii) 基礎培地に 3 日間培養した後、6 %馬血液加培地を約 5.0 ml 宛、各々の基礎平板培地の上に重層する。この場合、一旦加熱溶解した培地が 40°C に冷却した時を見定め、6 %の割に馬血液を加えて混和し、之を迅速に滅菌ピペットをもつて重層することに注意する。

(iv) その後は 10 日間に亘つて毎日集落顕微鏡 (30~90倍率) にて観察し、溶血現象を認めたものを＋、認めないのを－と判定した。

実験(6) ぶどう糖加培地に於ける酸形成。

(i) 培地は、PPLO 用流動寒天培地に 1 %の割にぶどう糖を加え、更に非働性家兎血清を添加し、BTB を示指薬としたものである。斯くして pH 7.8 及び 7.4 の 2 種培地を作成し、之らを各々小試験管に 4 ml、宛分注、使用に供する。

(ii) 3~5 日培養の固形培地の半斜面の集落をかき集め白金耳に採り、そのまま上記流動培地の各々に穿刺移植した。

(iii) 培養後10日間に亘り毎日集落形成の如何を観察すると共に、BTB の変色の有無を精査した。集落と変色を認めた場合＋とし、変色を認めないのを－と判定する。

実験(7) マウスの足趾皮下接種。

(i) 使用マウス。雌雄を問わず体重12~23 g の純系マウス 5 匹を以て一群とする。

(ii) 接種菌液は次の 2 種である。一は流動寒天培地に 4 日間発育した菌をそのまま培地と一緒にして作成された。他は今までの実験同様液体培地に浮遊させた菌液である。

(iii) 夫々ツベルクリン皮内針にて菌液 0.05ml 宛、マウスの足趾のふくらみへ皮下注射した。

(iv) 接種後20日間毎日観察し、膿瘍形成をみたのを＋、認めないのを－と判定する。

II 実験成績

1) 血清を含まない培地に於ける発育。表示の如く供試12株は総て発育を示さない。対照の家兎血液加固形培地では、同一条件にて何れも発育良好なる集落形成を示した (第 1 表)

2) 馬血清加固形培地に於ける発育。

07 及び Campo 株を含めて供試株の総ては発育良好、集落形成をみたにかかわらず、film and spots

Table 1. Growth on serum free media.

Strains	Growth on serum free media	Growth on rabbit blood agar (Controls)
OT l ₁	—	Good
" l ₄	—	"
" l ₅	—	"
" l ₆	—	"
" l ₇	—	"
" l ₈	—	"
" l ₉	—	"
" l ₁₀	—	"
" l ₁₁	—	"
" l ₁₂	—	"
07 (American)	—	"
Campo(")	—	"

Table 2. Growth on horse serum agar.

Strains	Growth	Production of film and spots
OT — l ₁	Good	—
" l ₄	"	—
" l ₅	"	—
" l ₆	"	—
" l ₇	"	—
" l ₈	"	—
" l ₉	"	—
" l ₁₀	"	—
" l ₁₁	"	—
" l ₁₂	"	—
07	"	—
Campo	"	—

を示したものはない(第2表)

3) 家兎血清加固形培地に於ける発育.

総て発育良好にして, 対照として用いた家兎血清加培地に於ける発育状態と全く同一である(第3表)

4) 流動寒天培地に於ける発育.

全株は, 遍く顆粒状の集落を作つて発育した(第4表)

5) 溶血現象の有無.

総て発育良好, 集落形成を示したが, 溶血現象は何れも陰性である. 対照として同一条件の下に, 男子尿道より分離した Gram 陽性球菌の溶血現象を観察したが, 之は明らかに陽性であつた(第5表)

6) ぶどう糖加培地に於ける酸形成.

Table 3. Growth on rabbit serum agar.

Strains	Growth on serum agar	Growth on blood agar (Controls)
OT — l ₁	Good	Good
" l ₄	"	"
" l ₅	"	"
" l ₆	"	"
" l ₇	"	"
" l ₈	"	"
" l ₉	"	"
" l ₁₀	"	"
" l ₁₁	"	"
" l ₁₂	"	"
07	"	"
Campo	"	"

Table 4. Growth in semi-solid medium.

Strains	Growth
OT — l ₁	Throughout granular
" l ₄	"
" l ₅	"
" l ₆	"
" l ₇	"
" l ₈	"
" l ₉	"
" l ₁₀	"
" l ₁₁	"
" l ₁₂	"
07	"
Campo	"

Table 5. Haemolysis of horse blood agar.

Strains	Haemolysis	Growth
OT — l ₁	—	Good
" l ₁	—	"
" l ₅	—	"
" l ₆	—	"
" l ₇	—	"
" l ₈	—	"
" l ₉	—	"
" l ₁₀	—	"
" l ₁₁	—	"
" l ₁₂	—	"
07	—	"
Campo	—	"

Table 6. Fermentation of Glucose.

Strains	pH 7.4 (Glucose semi-solid medium)		pH 7.8 (Glucose semi-solid medium)	
	Growth	Fermentation	Growth	Fermentation
OT— 1 ₁	Good	—	Good	—
" 1 ₄	"	—	"	—
" 1 ₅	"	—	"	—
" 1 ₆	"	—	"	—
" 1 ₇	"	—	"	—
" 1 ₈	"	—	"	—
" 1 ₉	"	—	"	—
" 1 ₁₀	"	—	"	—
" 1 ₁₁	"	—	"	—
" 1 ₁₂	"	—	"	—
07	"	—	"	—
Campo	"	—	"	—

Table 7. Local abscesses in mice after s/c inoculations.

Strains	Abscesses
OT — 1 ₁	None
" 1 ₄	"
" 1 ₅	"
" 1 ₆	"
" 1 ₇	"
" 1 ₈	"
" 1 ₉	"
" 1 ₁₀	"
" 1 ₁₁	"
" 1 ₁₂	"
07	"
Campo	Abscesses after 7 days

Table 8. Properties of strains of PPLO isolated from NGU in the male.

Strains	Growth on serum-free media	Film and spots	Growth on rabbit serum agar	Growth in semi-solid medium	Haemolysis of horse blood agar	Fermentation of glucose	Local abscesses in mice (after s/c inoc.)
OT — 1 ₁	—	—	Good	Throughout, Usually granular	—	—	None
" 1 ₄							
" 1 ₅							
" 1 ₆							
" 1 ₇							
" 1 ₈							
" 1 ₉							
" 1 ₁₀							
" 1 ₁₁							
" 1 ₁₂							
07 (American strain)	—	—	Good	Throughout, Usually granular	—	—	None
Campo(")							Abscesses

Table 9. Properties of species of pleuropneumonia-like organisms isolated from man.
(by Nicol et Edward ; 1953)

Human strain	Growth on serum-free media	Production of film and spots	Growth on rabbit serum agar	Growth in semi-solid medium	Haemolysis of horse blood agar	Fermentation of glucose	Pathogenicity for mice
Type 1	—	—	Good	Throughout. Usually granular	— or trace	—	None
Type 2	—	—	Good	Throughout, Usually granular	—	—	Abscesses after s/c inoc.
Type 3	—	+	Good	At bottom only, Smooth	—	+	Abscesses after s/c inoc.
Type 4	—	+ or —	Very good	At bottom only, Smooth	—	—	Not ested

何れもぶどう糖加培地によく発育した。併し酸形成を示したものはない。対照の同一条件のもとで淋菌株は酸を形成した(第6表)

7) マウス足趾皮下接種成績。

Campo 株の流動寒天菌液を注射したマウス群だけが、注射1週間後に膿瘍を形成し、他は何れも膿瘍を見ない。対照の流動寒天及び液体培地のみの注射群も総て何らの変化も認められなかつた(第7表)

以上の実験成績を一括すれば第8表の如くである。

Ⅱ 総括及び考按

Nicol & Edward⁴⁾ 及び Edward¹⁾ は、自己の分離株を中心に、英、米(Campo 株を含む)、仏及びオランダ(Ruiter & Wentholt のG株)株を加えた、多数の Pleuropneumonia-Like Organisms (PPLO) 株につき微生物学的研究を行い、人尿性器分離株は略々3型に区別されると報告した。彼らは、先ず血清学的に互に相異なる3型を区別したが、之らは培養並に生化学的性状に於ても夫々違つた特徴をもつことを知つた。従つて、諸種の培養及び生化学的性状に加うるにマウスに対する病原性に就き、一連の系統的検索を行うならば、比較的容易に PPLO 分離株の鑑別も可能であろうと指示した。彼らの判定規準を列挙すれば次の如くである。

- 1) 血清を含まない培地上の発育の有無。
- 2) 馬血清凝固形培地に於ける film and spots 形成の有無。
- 3) 家兎血清凝固形培地の発育状態。
- 4) 流動寒天培地に於ける発育状態。
- 5) 馬血液凝固形培地に於ける溶血現象の有無。
- 6) ぶどう糖分解の如何。
- 7) マウスに対する病原性の有無。

以上に基き、彼らは人に由来する PPLO を第9表の如く、Human Type 1~4 に分けた。Type 1~3 は尿性器株、Type 4 は唾液分離株である。

第8表に示した著者の実験では、分離株の総ては血清を含まない培地に発育せず、馬血清培地に於て film and spots 形成を認めず、家兎血清培地の発育は良好である。流動寒天培地に

於て、穿刺線の全層にわたり微細顆粒状の発育を示し、又溶血現象もぶどう糖加培地に於ける酸形成も認めなかつた。更にマウスの足趾皮下接種による膿瘍形成をみたものはない。対照の Campo 株は、培養及び生化学的性状に於て NGU 分離株と同一であるが、マウスの皮下接種後7日目に局所膿瘍発生を認めた。

即ち、著者の実験分離株は総て Edward の Human Type 1 に属するものと思われる。

Edward & Freundt²⁾ (1956) は、人の PPLO の Species を *Mycoplasma hominis*, *M. fermentans* 及び *M. Salivarium* と命名分類し Human Type 1 及び2は *M. hominis* に、Type 3 は *M. fermentans* に統一すべきことを提唱した。

上述の分類法に従えば、著者の実験株の総ては *Mycoplasma hominis* Type 1 に属することになる。

Nicol & Edward⁴⁾ は、NGU、正常尿道及び肛門から計91株の PPLO を分離したが、1株を除く他は尽く Human Type 1 にして、少くとも性器株と肛門株は血清学的、生物学的性状の観点から同一 Species に属することを結論した。1株のみ Type 3 に類似するが、之は NGU の既往症を有し、検査時には健康と推われた症例から分離されたものである。

Freundt³⁾ は、実験57株の大半を、*M. hominis*, 8株のみ *M. fermentans* と認定した。8株の *M. fermentans* は、その源をもとめると NGU 1, 潜在性 NGU 2, 正常尿道2の割合である。

第Ⅰ編に述べた如く、其の分離成績から PPLO の NGU に於ける病原的意義を疑問視した Edward¹⁾ らは、分離株の殆んどがマウスに病原性をもたない *M. hominis* Type 1 に属することを明らかにし、本微生物は尿性器に於ける雑菌の共生体に過ぎないことを確信するに到つた。又 NGU に比し正常尿道からの分離頻度が著しく高いと言う Freundt³⁾ は、分離株の大半が *M. hominis* Type 1 に、一部 *M. fermentans* に属することを実証した。然も *M. fermentans* の分離頻度が NGU、正常尿

道の両方に同率であることから, PPLO は正常尿道に通常みられる雑菌叢の一部をなすものと結論した。

著者の得た NGU からの PPLO 分離頻度は正常尿道に比し高く, 百分率に於て統計的に有意義なる差異を認めた。然して供試した NGU 分離株は総て Edward, Freundt の言うように, *M. hominis* Type 1 に属することは明白である。併し著者の実験株は何れも NGU より分離されたものの一部に限られ, 正常尿道よりの分離株を含む其他に就ては実験を行っていない。従つて本実験成績に基き, 「PPLO が尿性器に於ける雑菌的共生体である。」との Freundt らの見解を検討するのは, 妥当でないと考えられる。

結 論

NGU から分離した PPLO 株に就き, 次の如き培養及び生化学的性状試験を行うと共に, マウス皮下接種実験を行った。

- 1) 総て血清を含まない培地に發育しない
- 2) 馬血清培地に film and spots を形成しない。
- 3) 家兎血清培地の發育は総て良好である。
- 4) 流動寒天培地に於て全体に普く微細顆粒状の發育を示す

- 5) 総て溶血現象を呈しない。
- 6) ぶどう糖加培地に於て酸を形成しない。
- 7) マウスの皮下接種により膿瘍を發生しない。

以上の実験成績により供試株の総ては, Edward による Human Type 1 に属するものと認定される。

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, 倉岡雅男学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., **10**: 27, 1954.
- 2) Edward, D.G., and Freundt, E. A.: J. gen. Microbiol., **14**: 197, 1956.
- 3) Freundt, E. A. Brit. J. vener. Dis., **32**: 188, 1956,
- 4) Nicol, C.S., and Edward, D.G. Brit. J. vener. Dis., **29** 141, 1953.
- 5) Yamamoto, H., Ishihara, T., Oshima, M., and Kuraoka, Y., Jap. J. Urol., **47**: 742, 1956.