

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

第 III 編 PPLO と特異的細胞内形態物との関係に就て

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 雍 男

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

III : Supplementary Studies on the Tissue Phase 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)*

A total of 398 male patients (270 cases with non-gonococcal urethritis, 65 with acute gonorrhoea and 63 healthy men) were examined to demonstrate the existence of characteristic, intracellular structures in clinical material.

Intracytoplasmic basophilic structures could be demonstrated in Giemsa stained urethral scrapings from 18 (5.4 per cent) of 335 cases with urethritis in the male. Ten (56 per cent) of 18 cases with positive urethral scrapings yielded PPLO colonies in primary culture. These PPLO comprised approximately 23 per cent of a total of 43 PPLO strains recovered from male urethritis patients.

These intracytoplasmic basophilic structures were indistinguishable in morphology, size and staining reaction to those of PPLO as a whole.

It is interesting to note that in 7 patients with acute inflammatory conditions (4 of non-gonococcal urethritis, 2 of gonococcal urethritis and one of cervicitis), the intracellular structures are found as well in the pus cells as in the cytoplasm of large epithelial cells, and furthermore, they are Gram-negative as visualized in Gram stained scrapings. We have observed abundant growth of PPLO repeatedly in culture from patients, from whom Gram negative intracellular structures were recovered in clinical material. The morphology, structure, and mode of development of these PPLO colonies were similar to that of the classic-type colonies of PPLO isolated from the non-gonococcal urethritis. Cultural observations in fluid and on solid medium suggested that the characteristic, intracellular structures observed in Gram stained as well as in Giemsa stained scrapings from the above-mentioned patients are interpreted to be the tissue phase of PPLO.

人体から分離された PPLO の性格に関する研究は近來かなり進んでいるが、PPLO が人体細胞内でどのような形態を示すかは必ずしも明らかにされていない。併し PPLO が分離証明された症例に一致し、その患者材料の塗抹標本に於て特定の形態物の存在を挙げている研究者がある^{6) 14) 4) 5) 2) 1) 11)}

非淋菌性尿道炎のある例において、Chlamydozoon oculogenitale 類似の virus 封入体を認める^{2) 5) 8) 13)} 封入体尿道炎とは別に、従来からその尿道上皮細胞質内にしばしば多形態小体が発見されることが報告されている。Williams¹⁴⁾ (1946) は、非淋菌性尿道炎患者の尿道 scraping にしばしばみられる細胞質内 PPLO 類似の多形性構造は、恐らく PPLO の細胞相であろうと考えた。最近 Shepard^{11) 12)} は Williams 説に賛意を表し、詳細なる自験成績に基いて、PPLO の組織相は従来の典型的多形性構造にのみ限定されるものでなく、むしろ種々の形態をとる場合が多いと述べた。

私は PPLO の分離培養と平行して、患者材料の塗抹標本検鏡に際し、上皮細胞内に特徴ある形態物をみつけ出し、之と PPLO との関連を追及した。その成績をここに報告する。

(本論文の一部は、第6回中部連合泌尿器科学会¹⁶⁾、第44¹⁵⁾、第45¹⁷⁾、第46回¹⁸⁾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

1954年1月より1958年12月に至る5年間の大阪通信病院泌尿器科男子尿道炎総数541例(NGU 326, 淋疾 215)中、NGU 270 例及び淋疾65例計335例に就ての観察である。NGU の内訳は無菌性98, 細菌性172例である。別に対照として1957及び1958兩年度に於ける健康男子63例を選んだ。

何れも尿道採取物を実験材料とする。患者の外尿道口周辺を酒精綿にて徹清拭後、白金耳を尿道内に挿入、尿道壁をかすり気味に引き出して材料を採取する。直ちに分離培養(石原淋菌用培地, PPLO 用培地, タリウム選択培地)を行う一方、少くとも6枚以上の塗抹標本を作成し、夫々Gram 染色及びGiemsa 染色を行い検鏡した。NGU の細菌性或は無菌性の区別は、石原淋菌培地⁹⁾に於ける培養及び塗抹染色標本

の検鏡所見による。

2) 検査成績

検査総数398例(NGU 270, 淋疾65, 健康男子63)中、Giemsa 染色により細胞質内に Shepard の云う PPLO 封入体類似の形態物を証明したのは第Ⅰ表の如く18例である。別に婦人患者の1例があり之は後述する。健康男子からはこのような形態物は発見できなかった。

この18例中10例(56%)に PPLO が分離され、之は男子尿道炎よりの PPLO 分離全症例43例(第Ⅰ編)に対し23%に当る。

私の観察した上皮細胞内の特異形態物の性格は凡そ次の如くである。

共通してこのものは Gram 染色による観察は頗る困難であり、多くは Giemsa 染色標本に於て濃紫色を呈し容易に確認される。

(i) 第1図に示されるような特異形態物を第Ⅰ表の第1～第6例及び第18例計7症例に認めた。このものは PPLO 集落の捺印標本に於ける典型的多形性構造に頗る類似し、内構造は小球体或は卵形体、桿菌状、環状、糸状体等多様の形態をとる。

(ii) 第2図に示される形態物は比較的小さく、その内構造は顆粒状の単位小体が密に集団をなしている(第Ⅰ表、第7～12例計6症例)

(iii) 第3及び第4図に示される形態物は、その単位小体が第1図のものに比しやや大きい。併しその内構造は主として球形・桿菌形をふくむ多形態性である。このような形態物は上皮細胞質内のみならず白血球内にもみられる(第Ⅰ表、第13～18例計6症例)

第16及び17例は淋菌を分離証明した症例であつて、第4図の如く GC と指示された淋菌の集団とは別に、矢印の尖端部に第3図と同一形態の小体の集団が白血球形質内にみられる。

別掲の第19例は婦人患者であるが、その子宮頸管材料に、上記の記述に全く一致する特異形態物を発見した。

以上、(iii) の所見は、(i) 及び (ii) に比べやや趣を異にする。

先ず、(iii) に示される形態物を認めた男子尿道炎の6例は、症状が急激で淋菌性尿道炎に類似し(中2例は淋菌陽性)、潜伏期の長短はあるが何れも感染機会が明示されている。分泌物も多くは膿性を示し、分離培養に際して何れも PPLO を殆んど純培養の状態で証明できた。

第 I 表

症 例	年 令	感染機会 ↓ 発 症	尿 道 分 泌 物							培 養
			外 観	膿 球	細 胞 内 形 態 物					
					白 血 球		上 皮 細 胞			
					Gram	Giemsa	Gram	Giemsa		
1	23	不 明	粘液性	+	—	—	—	+	PPLO 卅	
2	26	不 明	膿 性	卅	—	—	—	+	PPLO 卅	
3	24	13 日	粘液性	+	—	—	—	+	PPLO 卅	
4	22	17 日	〃	+	—	—	—	+	Gram 陽性球菌 Corynebacterium	
5	30	14 日	〃	+	—	—	—	+	—	
6	19	6 日	膿 性	卅	—	—	—	+	—	
7	23	23 日	粘液性	卅	—	—	—	+	PPLO +	
8	36	30 日	漿液性	+	—	—	—	+	Gram 陽性球菌 Corynebacterium	
9	40	7 日	粘膿性	卅	—	—	—	+	—	
10	30	3 日	粘液性	卅	—	—	(グラム陽性桿菌+)	+	Corynebacterium	
11	29	2 日	漿液性	+	—	—	—	+	—	
12	32	14 日	粘膿性	卅	—	—	(グラム陽性桿菌+)	+	—	
13	50	5 日	膿 性	卅	+	+	+	+	PPLO 卅	
14	28	30 日	粘膿性	卅	+	+	+	+	PPLO 卅	
15	22	30 日	〃	卅	+	+	+	+	PPLO 卅	
16	19	3 日	膿 性	卅	+	+	+	+	PPLO + 淋 菌 卅	
17	28	3 日	〃	卅	+	+	+	+	PPLO 卅 淋 菌 卅	
18	26	21 日	粘液性	+	—	—	+	+	PPLO 卅	
19 ♀	28	慢性陰漏 (5年来)	子 宮 頸 管 分 泌 物							PPLO 卅
			外 観	膿 球	細 胞 内 形 態 物					
					白 血 球		上 皮 細 胞			
					Gram	Giemsa	Gram	Giemsa		
			粘液性	+	+	+	+	+		

註：表中 Gram+は Gram 染色によつて証明されるの義 (Gram positive に非ず)

次に、特異形態物を構成する小体は多形態を呈しているが、その中の大きなものは小桿菌様である。之らが上皮細胞のみならず、第18例の例外を除き其の他は凡て白血球にも存在する。しかも Gram 染色によれば陰性であるが、稀釈 Fuchsin により明らかに染色される。

この事は (i) 及び (ii) が白血球に殆んどみられず、又 Gram 染色法によつては殆んど確認できなかったのに比べ、特に異なる点である。そこで次の如き吟味実験を行った。

(iii) の特異形態物を認めた7例 (第13～19例) から分離された PPLO の集落を、他の症例 (第1～12例) から分離された PPLO 及び Campo 株の夫れと比較するに、その集落の性状並に集落捺印標本に於ける形態と染色性に於て、3者の間に何らの差異はみられなかつた。之ら PPLO 培養につき、稀釈 Fuchsin による単染色所見を比較するに、何れも2～3日培養菌は稀釈 Fuchsin 液により比較的よく染色されるが、5日培養以後のものは染色され難いことを知つた。

更に上述の特異形態物が固形培地上に於て如何なる發育過程を示すかを時間的に追及した。実験対象は第Ⅰ表の第15及び第19例の2例である。

採取された臨床材料から夫々3種の塗抹染色標本(Gram, Giemsa 及び細川染色⁹⁾)が作成され、同時に石原淋菌用, PPLO 用及びタリウム選択培地の3種の固形斜面に移植培養される。培養実験手技, 集落捺印標本の作成並に染色方法其の他は総て第Ⅰ編及び協同研究者大島の方法⁹⁾によつた。

実験例Ⅰ(第Ⅰ表, 第15例)

22才, 男子 感染機会後30日発症, 診断は NGU 急性型。尿道 scraping に於て, 上皮細胞形質内及び白血球内に Gram 陰性の形態物を証明, 3培地では何れも PPLO を純培養の状態で証明した。

以下石原培地に於ける時間的観察である。即ち, 尿道 scraping を同時に7本の培地に接種し, 塗抹白金耳の劃線に沿つてくまなく捺印標本を作成, 全標本を同時に細川染色を行つて検鏡した。

培養第1, 2日は患者材料の塗抹標本に於けると同型の球・桿菌形態物が均一に増殖し集団をつくる(第5図, 第6図) 第3日では更に増殖, 菌体の大小不同が更に著明, 染色に対し濃淡不同を呈するに至る(第7図) 第5日では, 従来の PPLO の天れに一致する特有の集落(径約 300 μ)が完成し, 検鏡するに典型的多形性構造が認められる(第8図)

実験例Ⅱ(第1表, 第19例)

28才, 女子 5年前より慢性腔漏。この間同棲した3人の男子は何れも同一症状を呈する尿道炎に罹患したという。子宮頸管 scraping の塗抹染色標本に於て, 上皮細胞形質内並に白血球内外に特異形態物を証明, PPLO 用培地及びタリウム培地にて PPLO の純培養を得たが, 石原培地では特有の PPLO 集落の発生をみなかつた。以下 PPLO 用培地に於ける観察である。

即ち, 子宮頸管 scraping を同時に PPLO 用培地10本以上に接種し, 第Ⅰ実験例同様, 順次時間的にその發育過程を観察した。

① 培養9時間。移植された細胞は崩壊し, 恐らくは細胞質内にあつたと思われる形態物が, かなり増殖しはじめたと思われる像をみることできる(第9図)

② 培養21時間。菌体の増殖は明白, 排列は密となり, 染色に対し濃淡不同を呈するものもみられる。更に 3 μ 以上にも及ぶ大形菌の出現がある(第10図)

③ 培養42時間。増殖著明, 集団の長径 35 μ に及

ぶ。

④ 培養48時間。集落顕微鏡下(30 $\times$)表面平滑なドーム型の集落形成を認める。捺印標本に於ける個々の菌体は大きい(第11図)

⑤ 培養66時間及び78時間。集落の大きさは 150 μ から 200 μ に達し, 中に顆粒構造がみられるのみならず, PPLO の特徴といわれている放射状排列を呈し, 多形態の集団もみられる(第12, 13図)

⑥ 培養第4日。集落は更に大きさを増し, 周辺は波状を呈し, 染色による濃淡不同はいよいよ著明となる。

⑦ 培養第5日。集落は 400 μ 大に達し, 頂点のくぼみが明白となる。捺印標本では, 従来の PPLO に全く類似する特有の放射状構造が明白に示され, 周辺部では大小不同多形性菌体が多数明示された(第13図)

以上の2実験例から得られた固形培地上の集落は, その外形及び捺印標本検鏡所見よりして正に従来の定型的 PPLO 集落に一致する。之を液体培地に移植, 4~5代継代したが, 何ら性状の変化をみず終始 PPLO 特有の性状を持続した。かくして之を PPLO と判定した。

尚, 実験例Ⅱは Terramycin 腔洗滌其他により治療した。腔洗滌3回後採取された子宮頸管 scraping には, も早特異形態物は証明されず, 培養検査も陰性に終つた。

3) 総括及び考按

非淋菌性尿道炎に於ける PPLO の病原的意義は尙不明であるが, 時にいかにも PPLO が病原らしく推定される症例をみる事がある。従つてこの微生物が生体内でどんな形態をとるかを明らかにするのは, 病因解明上有意義であると思われる。その為には, PPLO が分離された症例について, それ等の特異的に存在し, しかも普遍性の高い形態物を採及する必要がある。

私は男子尿道炎の尿道 scraping の塗抹標本の検鏡によつて 335例中18例に於て細胞内特異的形態物を認めた。18例中10例に PPLO が分離され, これは男子尿道炎からの全分離症例45例の23%に相当する。

これら18例の細胞内特異的形態物を考察するに当り, まずいわゆる PPLO 封入体に関する文献を眺めてみよう。

PPLO の人体組織相に関する認識は比較的新しい。非淋菌性尿道炎の細胞内特異的形態物と PPLO との関連性に初めて注目したのは Johnston 及び McEwin⁹⁾ (1945) 次いで Williams¹⁴⁾ (1946) である。Linder (1910) の Waelsch 尿道炎に於ける virus 封入体の発見におくれること35年である。

従つてなお混迷期にあるこの分野に於ては、文献上種々の混同乃至錯誤があり、就中、初期論文の中ではしばしば virus 封入体といわゆる PPLO 封入体とが混同されて記載されている。Harkness⁵⁾ は、PPLO 封入体はその特徴的多形性構造により virus 封入体を鑑別出来ると述べた。彼の綜說的叙述に於ける細胞質内形態物の取扱いはしばしば明確を欠くものがあり、中には PPLO との関連が濃厚視される形態物を、その外観の類似のみを以て virus 封入体とみなしている場合もある。

最近 Shepard¹¹⁾ (1957) は、PPLO の組織相に関する新知見を発見し、従来諸家の PPLO 封入体に対する見解の誤りを余す所なく指摘した。彼は、PPLO 分離症例に示される細胞質内封入体はことごとく PPLO 自体の組織相であると断じ、しかもその封入体の内構造は一定すべきでないとして述べた。一部従来のような定型的多形性構造を示すものもあるが、むしろその内構造の多くは、例えば球状及び球桿状、或いは短桿菌状の如き単一同型の単位小体によつて構成されると述べた。稀には一見 virus 封入体とみ紛うばかりの単位小体の密集団をみることもあり、従来 virus 封入体として報告された中にはこのような PPLO 封入体の混同もあり得ると述べた。

私の男子尿道炎患者18例に於て示された細胞質内特異的形態物は、Giemsa 染色により紫堇色に染めあがり、上皮細胞内に或いは密に或いは粗に配列されて集団的に存在する。この集団的形態物を構成する単位小体は、球・桿状もしくは多形態性である。virus 封入体に類似した集団を示すものも単位小体は球・桿状を呈し、明らかに Trachoma 及び Lymphogranuloma の virus 粒子より大きい点で区別でき

た。以上共通する性状をもつ形態物は、多くの点に於て Shepard の記述に一致し、等しく PPLO の細胞内形態と考えて差支えない。

但し、急性尿道炎の6例(中2例は淋菌感染を証明)及び婦人患者の1例計7例に於ける細胞質内形態物は、上皮細胞のみならず白血球内にも見出され、更に Gram 陰性に染色された。之は尙検討する必要がある。

7例の形態物は明らかに Gram 染色に於て稀釈 Fuchsin によつて染色される。他の12例は Gram 陽性に染ることなく又後染色にも着色されない。併し吟味実験成績に示された如く、之ら全症例から分離された PPLO 株及び Campo 株は、その純培養株が固形培地上に2～3日培養された場合、何れも稀釈 Fuchsin によつて染色されるに反し、5日培養以後のものは染色され難いものであつた。

更に重要なことは上述の7例が急性炎症であつて、殆んど多量の PPLO が純培養の状態で分離された点である。7例中2例につき、石原培地(実験例Ⅰ)及び PPLO 用培地(実験例Ⅱ)に於て、その發育状況を経時的に追及したが、共に定型的 PPLO 集落の形成を認めた。かくして分離された PPLO 株の継代株を他の PPLO 株に比較するに、その性状に於て全く異なるところがなかつた。

以上によつて7例にみられた特異的形態物は正に PPLO 自体の細胞内形態であると推定して差支えない。

男子尿道炎からの PPLO 分離全症例43例中、細胞内特異形態物を証明したのは10例(23%)であることは既述した。即ち、全例に同一形態物を証明できたのではない。この点及び之ら特異形態物の Gram 染色に対する態度が必ずしも同一でない点など、今後尙検討すべき問題が残されている。併しかくして PPLO の細胞内形態の一部は把握されたと云つてよい。

最後に一言したい。非淋菌尿道炎に於ては現在尙 virus 学的技術を以てする研究が殆んどなされていない。従つて PPLO の細胞内形態の研究に当つて、virus 学に普及している“封入体”という術語を輕々しく使用することは妥当

でないと思ふ。

結 論

男子非淋菌性尿道炎 270, 男子急性淋疾 65, 健康男子 63 計 398 例の尿道 scraping 塗抹染色標本につき顕微鏡検査を行い, 次の如き結果を得た。

1) 男子尿道炎 335 例中 18 例 (5.4%) に於て, 尿道上皮細胞質内に特異形態物を証明した。これらは Shepard の云う intracytoplasmic inclusion に一致する。

2) 18 例中 PPLO を分離したのは 10 例で, 之は全 PPLO 分離症例 43 例の 23% に当る。

3) 非淋菌性尿道炎急性型の 4 例, 急性淋疾の 2 例, 別に慢性膿漏女子例計 7 例に於て, 上皮細胞形質内及び白血球内に Gram 陰性の特異形態物を認めた。培養実験其他によつて, この特異形態物と PPLO との密接なる関連性を推定した。

4) 特に 2 例に就て, 石原淋菌用培地或は PPLO 用培地上の集落形成を時間を追つて観察し, 又染色標本に於て形態を調べた結果, その集落及びその形態は他の PPLO 株と全く同一であつた。

以上の所見からみて, 上記 18 例にみられた細胞質内特異形態物は, 細胞内における PPLO の形態の一部であると推定する。

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, 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。

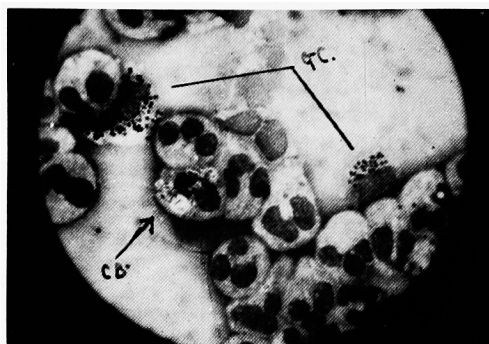
文 献

- 1) Ambrose, S. S., and Taylor, W. W.
Am. J. Syph., 37 : 501, 1953.

- 2) Durel, P., Roiron, V., Siboulet, A., and Sorel, C. : Brit. J. vener. Dis., 30 : 69, 1954.
- 3) Edward, D. G. : J. gen. Microbiol., 10 : 27, 1954.
- 4) Harkness, A. H., and Henderson-Begg, A. : Brit. J. vener. Dis., 24 : 50, 1948.
- 5) Harkness, A. H. : Non-Gonococcal Urethritis. E. and S. Livingstone Ltd., Edinburgh. 1950.
- 6) Johnston, G. A. W., and Mc Ewin, J. Med. J. Australia, 1 : 368, 1945.
- 7) Klieneberger-Nobel, E. : Biol. Revs., 29 : 154, 1954.
- 8) Moustardier, J., Brisou, J., and Perrey, M. : Ann. dermatol. syphilig., 81 : 521, 1954.
- 9) Oshima, M. : Acta Urologica (Jap.), 5 : 127, 1959.
- 10) Shepard, M. C. : J. Bact., 71 : 362, 1956.
- 11) Shepard, M. C. : J. Bact., 73 : 162, 1957.
- 12) Shepard, M. C. : J. Bact., 75 : 351, 1958.
- 13) Siboulet, A. : Brit. J. vener. Dis., 31 : 235, 1955.
- 14) Williams, S. : Med. J. Australia, 1 : 693, 1946.
- 15) Yamamoto, H., Ishihara, T., Oshima, M., and Kuraoka, Y. : Jap. J. Urol., 47 : 742, 1956.
- 16) Yamamoto T., Ishihara, T., Oshima, M., and Kuraoka, : Acta Urologica (Jap.), 2 : 370, 1956.
- 17) Yamamoto, H., Ishihara, T., Oshima, M. and Kuraoka, Y. : Jap. J. Urol., 48 : 460, 1957.
- 18) Yamamoto, H., Ishihara, T., Oshima, M. and Kuraoka, Y. : Jap. J. Urol., 49 : 651, 1958.



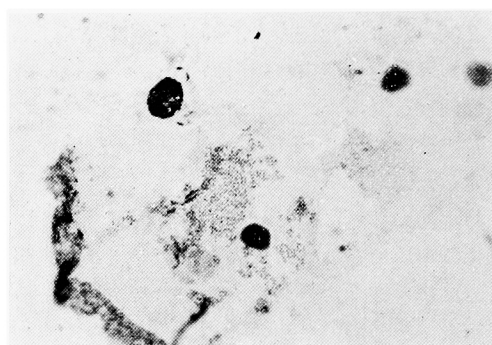
第1図 上皮細胞形質内特異的形態物
(Giemsa 染色900×)



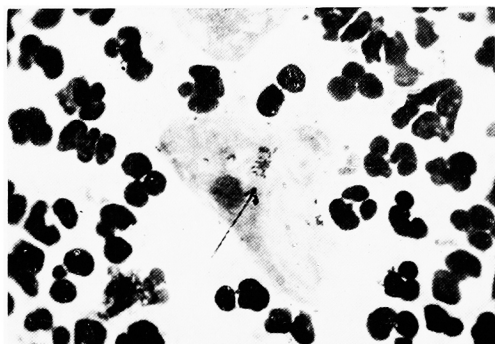
第4図 {白血球内特異的形態物
白血球内淋菌
(Giemsa 染色900×)



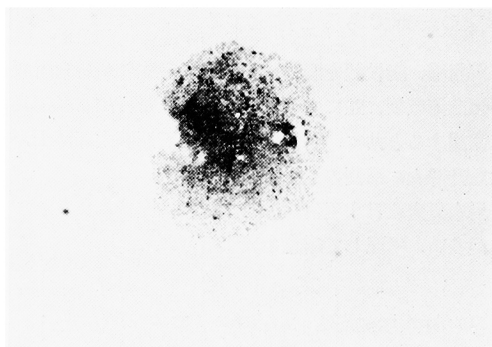
第2図 上皮細胞形質内特異的形態物
(Giemsa 染色900×)



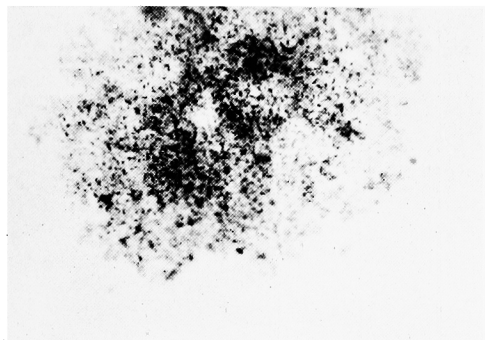
第5図 (実験例Ⅰ)
培養第1日捺印標本(細川染色900×)



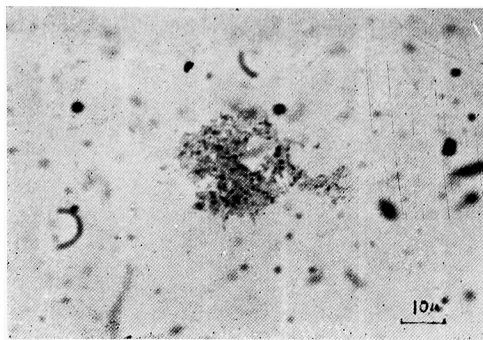
第2図 上皮細胞形質内特異的形態物
(Giemsa 染色900×)



第6図 : (実験例Ⅰ)
培養第2日集落捺印標本(細川染色900×)



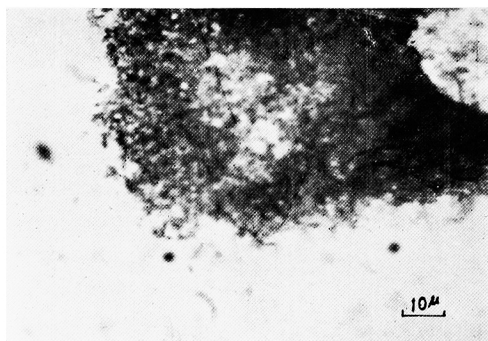
第7図：(実験例Ⅰ)
培養第4日集落捺印標本(細川染色900×)



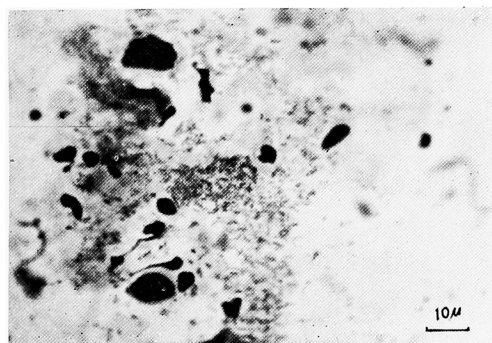
第10図：(実験例Ⅱ)
培養21時間, 捺印標本(細川染色900×)



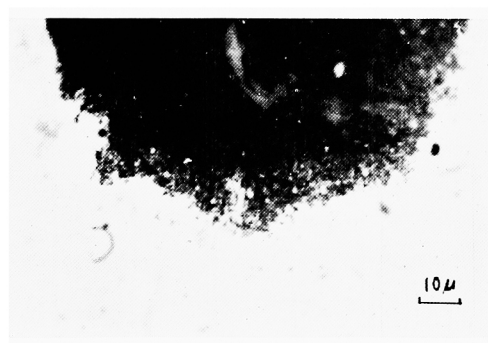
第8図：(実験例Ⅱ)
培養第5日集落捺印標本(細川染色900×)



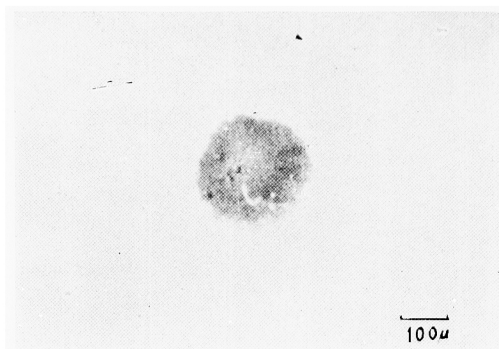
第11図 (実験例Ⅱ)
培養48時間, 集落捺印標本(細川染色900×)



第9図：(実験例Ⅱ)
培養9時間, 捺印標本(細川染色900×)



第12図：(実験例Ⅱ)
培養66時間, 集落捺印標本(細川染色900×)



第13図 (実験例Ⅱ)
培養78時間, 集落捺印標本(細川染色100×)



第14図 (実験例Ⅱ)
培養第5日, 集落捺印標本(細川染色900×)