

## SMON患者の舌苔および糞便 より *Mycoplasma* の検出

本間遜，帖佐浩，榎本美枝子，渡部肇（東大医科研）  
富山哲雄（東京大学分院中検），甲野礼作（国立予研）

### I はじめに

SMON患者に緑舌がみられ，これが臨床上重要な所見であることは井形昭弘博士（東大神経内科）等の強調したところである。私共は斉藤守（東大医科研），井形両博士の依頼により緑舌の原因となる菌の検索を行なうことになった。患者の腸内細菌叢の検索は中谷林太郎博士（公衆衛生院）が行なうことになっているので，私共の目標は舌苔について特に依頼された緑膿菌の他に *Mycoplasma* に限って検索することになった。

昨年（1969年）11月中島病院，東大神経内科入院患者について，今年2月井原病院入院患者について4回にわたり舌苔より菌の分離を試みた結果，高率に *Mycoplasma* を分離したのでその成績について報告する。<sup>1)</sup>

その間SMON患者よりウィルスの分離がづぎづぎと報告され，その材料が *Mycoplasma* に汚染されているかどうかについて検索を依頼された。その結果はいずれの材料よりもCPEで測定されたウィルス粒子の数と同じ濃度で *Mycoplasma* が検出された。これらのウィルスは患者の糞便より分離されたものであるので，今年8月井原病院入院患者の新鮮糞便より直接 *Mycoplasma* を分離することを試み，4例中2例より分離に成功した。

これらの *Mycoplasma* の同定およびSMONとの関連は今後の問題であるが，ここに中間報告として今までの結果を報告する。

### II 材料および方法

患者材料：舌苔材料は水で数回うがいした後，舌苔を綿球で強くこすり寒天培地に塗抹した。最後にこれを液体培地に投入した。培養は嫌気性および好気性に行なった。糞便材料は新鮮便1gを液体培地10mlに投入し，Gas Pak（BBL）で嫌気状態にしてもち帰り，37℃，5日間増菌後，寒天培地にうえ，嫌気的および好气的に培養した。さらに一方では増菌した液体培地を3,000rpm 30分後，上清を再び液体培地に継代した後，寒天培地に接種した。5日目および10日目に観察した。

培地：PPLO寒天，PPLOブロス（Difco）に新鮮25%イースト（ニッテン）抽出液10

%, 馬血清 20% になるように加え, それぞれ寒天地培地, 液体培地とした。舌苔よりの分離の場合にはペニシリンおよび酢酸タリウムをそれぞれ  $1000 \text{ U/ml}$ ,  $50 \text{ mcg/dl}$  に加えた。糞便よりの場合には  $\text{CB-PC } 100 \text{ mcg/ml}$ ,  $\text{CER } 100 \text{ mcg/ml}$  とした。

生物学的性状の検査: グルコース, マンニト, マンソース, キシロース, デキストリン, ラクトース, フルクトース, ゼルチット, サッカロースについて行なった。菌の増殖の有無は寒天培地に階段希釈液をぬり, 生じた集落数から判定した。テトラゾリウム還元能, メチレン青の還元, アルギニン分解能, 血球吸着能, 溶血能等すべて常法<sup>2)</sup>によった。

患者血清と分離株の血清反応: 井原市民病院, 青梅市立総合病院で  $\text{SMON}$  と診断された患者血清を使用した。抗原の調整に使用した *Mycoplasma* は中島病院と東大病院から分離された  $\text{NH}_2$  株,  $\text{NH}_4$  株の 2 株を用いた。一つの株を寒天培地 200 枚に塗抹し嫌気性に  $37^\circ\text{C}$ , 2 日間培養した。pH 7.2 の  $\text{M}/15 \text{ PBS}$  を加えて菌体を集め, フェノールを 0.5% に加え  $37^\circ\text{C}$ , 2 日間, さらに  $56^\circ\text{C}$ , 30 分加温して抗補体性を除去した。これを  $38,000 \text{ rpm}$  2 回洗滌し,  $20 \text{ ml}$  の  $\text{PBS}$  にうかべて  $\text{CF}$  抗原とした ( $\text{CF}$  抗原価は 512 単位であった)。

$\text{IHA}$  抗原にはこの菌体を  $10 \text{ Kc}$  20 分超音波処理して使用した。

コントロール血清をつくるため抗原  $1.5 \text{ ml}$  に Complete adjuvant  $1.5 \text{ ml}$  を加え約 3Kg のウサギの筋肉内に注射した。3 週間後に採血して血清を分離し, これに馬血清  $1/10$  容を加え氷室に 2 日間おき吸収操作を行ない, 遠心上清をコントロール血清として用いた ( $\text{CF}$  抗体価は 2,048 単位)。

$\text{CF}$  は Ko lmer 法によった。4 単位の抗原の他に 32 単位, 64 単位の抗原を使用した。

$\text{IHA}$  は等量の  $1:20,000$  タンニン酸処理 2.5% 感作血球  $0.05 \text{ ml}$ , 希釈液 0.6%  $\text{NRS}$  加 pH 7.2  $\text{M}/15 \text{ PBS}$  で管底用試験管を用いて行なった。

$\text{NT}$ , ( $\text{GI}$ ) は倍々希釈した患者血清  $0.1 \text{ ml}$  に液体培地  $0.9 \text{ ml}$  および *Mycoplasma* を加え,  $37^\circ\text{C}$  2 日間嫌気培養した後, 寒天培地に brushing して  $37^\circ\text{C}$ , 2 日間嫌気培養して判定した。

### III 実験結果

#### 1. 舌苔よりの検出

1969年11月28日と1970年1月12日の両日にわたり東大病院, 中島病院入院患者 16 名について舌苔より *Mycoplasma* の分離を試みた。表 1, 2 に結果を示したが 2 回の検索を通じて舌苔の緑色の有無に拘らず, 16 例中 12 例 (75%) に *Mycoplasma* が検出された。

第1表 舌苔よりの菌の分離

患者名	性別	年齢	経過	再日 発時	第1回検査 44.11.28		第2回検査 45. 1.12	
					緑舌	Mycop	緑舌	Mycop
1	F	48	1年 3月		-	+	/	/
2	F	61	2年10月		-	+	/	/
3	M	50	1年 1月		+	+	/	/
4	F	33	4月		+	+	/	+
5	F	28	6月		-	+	/	+
6	F	60	4月		+	+	/	/
7	F	60	9月		-	-	/	/
8	F	65	10月		+	-	/	/
小計 (総計)					6/8		2/2 (6/8)	

東大関係と協同調査

第2表 舌苔よりの菌の分離

患者名	性別	年齢	発日 病時	再日 発時	第1回検査 44.11.28		第2回検査 45. 1.12	
					緑舌	Mycop	緑舌	Mycop
9	F	33	41	45	/	/	+	+
10	M	37	40		/	/	+	-
11	F				/	/	+	+
12	F	42	41. 2		/	/	-	+
13	F	30	42	45	/	/	+	+
14	M	36	45. 3		/	/	+	+
15	F	75	44.12		/	/	+	-
16	F	73	45. 2		/	/	+	+
総計					6/8		6/8	

東大関係と協同調査

以上は散发例であったので井原のように疫学的に流行を思わせる地域の患者についても調査し、比較検討することになった。表3, 4はそれらの検査成績を示したものである。表3には舌苔が厚く、緑色あるいは褐色に着色しているものをのせたが、9例中9例にMycoplasmaが検出

された。表4には臨床的に軽いもので舌苔も薄く、色も薄いピンクまたは黄色、あるいは白色の例を集めたが、2回の検査を通じて9例中6例(66%)に本菌を検出した。

第3表 舌苔よりの菌の分離

患者名	性別	年齢	発日 病時	再日 発時	第1回検査 45. 2. 23		第2回検査 45. 5. 9	
					舌苔	Mycop	舌苔	Mycop
1	M	42	44.12		+++	+	+	+
2	M	23	42. 8		+++	+	+	+
3	M	60	44. 1		+++	+	+	+
4	F	37	44. 4	44.10	+++	+	+	+
5	F				+++	+		
6	F	39	43. 6	44.10			+++	+
7	M	19	43. 7	44.12			+++	+
8	M	55	44. 5				+++	+
9	M	34	45. 3				+++	+
小計 (総計)					5/5		8/8 (9/9)	

岩野郁造，広田滋（井原市民病院）との協同調査

舌苔+++は着色した厚い舌苔。+は薄く着色した舌苔。

第4表 舌苔よりの菌の分離

患者名	性別	年齢	発日 病時	再日 発時	第1回検査 45. 2. 23		第2回検査 45. 5. 9	
					舌苔	Mycop	舌苔	Mycop
10	F	40	43. 3	44. 7	+	+	+	+
11	F	32	44. 5	44.10	+	+	+	+
12	F	52	44. 4		+	+	+	+
13	M	63	44. 5	44. 8 12	+	+	+	-
14	F				+	-		
15	F	29	44. 7		+	+	+	+
16	F	22	44. 2	44.10	+	+	±	+
17	F	19	43.12		+	-	±	-
18	F	74	43.10		+	-		
小計 (総計)					6/9		5/7 (6/9)	

岩野郁造，広田滋（井原市民病院）との共同調査

これらすべての *Mycoplasma* は嫌氣的に培養されたもので、初代好氣的に 1 個の集落でも形成したものはなかった。東大、中島両病院入院患者より培養された 12 株を 6 代継代後も同じ菌液を寒天培地にぬり、好氣性、嫌氣性の両方で培養を試みた。その結果 10 株は嫌氣性でのみ集落の形成をみた。他の 2 株は嫌氣性のプレートの集落数に比べて極めて少数の集落が好氣性培養で認められた。

#### 離株のマウスの脳内接種とモルモットに対する毒性

舌苔より分離されたものであるから当然、*M. Salivarum*, *M. orale* 等人由来の既知の *Mycoplasma* が混在していることは容易に想像される。これらの *Mycoplasma* 中に本病因とみられる菌株があるかどうかは今回は問題とされるわけである。従って単個集落分離を行なうことなく分離直後の継代しないプレート上の全集落をマウスの脳内に接種することにした。直径 6.5 cm のシヤレーに 2 ml の液体培地を加え、菌懸濁液をつくり、それをマウス (ddY, 4 週令) の静脈内に 0.2 ml または 0.3 ml を注射した。同時にその 0.01 ml を矢追針を用いて脳内に接種した。接種後 5 日, 7 日, 10 日, 14 日, のいずれかの日に殺し、脳, 肝, 腎, 脾, 肺をとり出し、ガラス棒または乳鉢で細挫し、これを寒天培地に塗抹し嫌氣性に 37℃ に培養した。その結果脳のみから回収できたが、他の臓器からは検出できなかった。そこで東大、中島、井原病院よりの分離株計 20 株について脳内接種を行なって脳内から再検出できるかどうか、検出できた場合はその株を分離し検査することを試みた。その結果、東大、中島病院の 12 株より 10 株、井原病院の 8 株より 6 株がマウスの脳から再検出できた。この際対照無処置のいずれのマウスの脳および他の諸臓器からは菌は検出できなかった。

12 株の中の 1 株である NH4 株について脳内接種の実験をくりかえして行なった。表 5 に示すように接種後、1 日, 2 日, 4 日, 5 日, 9 日目に 5 匹ずつ殺し脳内よりの分離を試みた。その結果検出例数は 5 日目, 9 日目で半減した。

NH4 株を N<sub>2</sub> ガス中でフーマセル (NB5) で 37℃ に培養し、その 2 日, 3 日の全培養をモルモット (200 ㏍) の腹腔内、静脈内に注射した。いずれの注射の場合にも注射直後に歩行困難、痙攣等の症状を示した。数日後注射した 4 匹は全部死亡した。対照として培地のみ同量注射したものではいずれの変化もみられなかった。

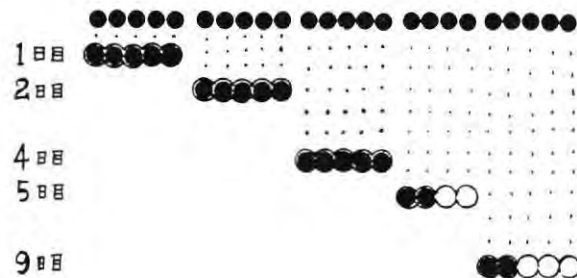
しかしその後同じ株で実験を反覆したが、注射直後の症状は多少弱いと認められたが、死亡するものはなかった。その他の株についても同様の実験を行なったが、注射直後からの耳朶の充血、咳、跳躍等の症状はみられたがいづれも恢復し 1 ヶ月間の観察中に異常は認められなかった。

ハムスターに対しては前記注射直後の症状は軽微であった。

表5 SMON患者 舌由来Mycoplasma のマウス  
脳内よりの再検出

1. マウス脳内接種後，5日以後に再検出されたMycoplasma (例数)
 

東大病院関係	10/12
井原病院関係	6/8
2. NH-4株接種マウス脳内よりのMycoplasma再検出数の変化



### 3. 分離株のBAT6細胞に対するCPE

東大，中島病院よりの4株についてしらべた。NH<sub>4</sub>，NH<sub>5</sub>，TH<sub>4</sub>，の3株を液状培地に数代継代し，その原液および10<sup>-1</sup>希釈液をBAT6細胞培養に0.1 ml ずつ4本接種した。初代ではTH<sub>4</sub>，NH<sub>4</sub>の2株では6日目CPE(-)であったが，NH<sub>5</sub>株では6日目CPE(++)となった。この時対照の未接種BAT6細胞はCPE(-)であった。各々の培養液を2代継代したところ，10<sup>-2</sup>希釈でTH<sub>4</sub>株は3日目CPE(+++)，NH<sub>4</sub>株，NH<sub>5</sub>株は4日目でCPE(+)となった。即ちこれらの3株はBAT6細胞にCPEを示した。

つぎにNH<sub>2</sub>株の寒天培地7代継代したものをさらに液状培地に1代継代し，BAT6細胞に接種した。初代は6日目CPE(+)であったが，対照に比べて前者程強くなかった。しかし陽性であった。2代継代したものについては行なわなかったが，継代によって強くなる可能性は前の3株の実験からみて濃いといえよう。

### 4. 分離株の生物学的性状

本来からいえば前述のように単集落分離しなければ菌株が純培養でない可能性が濃いので，現在この株の“クローン化”を行なっている。しかし，分離株の数代継代したものについて一応生物学的性状をあたってみた結果を表6に示した。

\*京大ウイルス研井上助教授がBovine adenovirus type 3によりtransformしたハムスター由来のCell line.

第6表 分離したMycoplasma 20株の生物学的性状

糖分解能(1%糖含有)

アラビノース	グリコーゲン	グルコース	
トレハロース	イノシトール	スターチ	
マンノース	マニトール	デキストリン	
イヌリン	キシロース	ズルチツト	
ガラクトース	ラクトース	サツカロース	
フルクトース	すべて		陰性
溶血能(4%馬血液, 5%綿羊血液)			陰性
血球吸着能(0.5%馬血液)			陰性
テトラゾリウム還元能(0.02%含有)			陰性(2株陽性)
メチレン青還元能(0.3%メチレン青)			陰性
ゼラチン液化(20%ゼラチン含有)			陰性
アンモニアの産生(尿素3%含有)			陰性
硫化水素の産生(酢酸鉛0.1%含有)			陰性
フィルムスポット	15株陽性	5株陰性	
アルギニン分解能			陽性

5. 分離株の薬剤感受性

デイクス法でしらべた結果を表7に示した。PC, AB-PC, SM, CFR, CEX, CL, PMX-P, NA, NBには耐性であったが, CP, TC, OTC, MC, DMCT, SPM, LM, GM, フラン, FRMには感受性であった。

第7表 抗生物質感受性

PC	—	CP	卍	LCM	卍
AB-PC	—	TC	卍	NA	—
MPI-PC	—	OTC	卍	NB	—
SM	—	MC	卍	GM	卍
KM	卍	DMCT	卍	Panfurans	卍
CER	—	EM	—	FRM	卍
CEX	—	OM	—		
CL	—	SPM	卍		
PMX-P	—	LM	卍		



6. 分離株 NH 2, NH 4 と患者血清との反応

30例の患者血清につき, CF, IHA, NT (GI)を行なったが3法ともすべて陰性であった(表8)。

第8表 分離株 NH 2, NH 4 と患者血清との血清反応

病院	日時 氏名	CF <sub>4u</sub>	CF <sub>64u</sub>	IHA	NT	病院	日時 氏名	CF <sub>4u</sub>	CF <sub>64u</sub>	IHA	NT	
井原	4.21	-	-	-	-	井原	4.22	-	-	-	-	
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
	5.9	5.9	-	-	-	-	对照	425	-	-	-	-
			-	-	-	-		426	-	-	-	-
			-	-	-	-		427	-	-	-	-
			-	-	-	-		1084	-	-	-	-
			-	-	-	-		1086	-	-	-	-
			-	-	-	-		1088	-	-	-	-
-			-	-	-	1097		-	-	-	-	
-			-	-	-	1098		-	-	-	-	
-			-	-	-	1099		-	-	-	-	
-			-	-	-	445		-	-	-	-	
-	-	-	-	446	-	-	-	-				
-	-	-	-	448	-	-	-	-				
-	-	-	-	449	-	-	1:8	-				

CF(-): 1:4未満, IHA(-): 1:10未満, NT(-): 1:10未満

7. 患者糞便よりの検索と検出株の性状

糞便よりウイルスを分離したといわれる培養細胞液4種類の分与を受け, 全例よりウイルス粒子と殆ど同数のMycoplasmaを分離した。これらの中1株は好気性で他の3株は嫌気性であった。集落の性状は嫌気性3株はよく似ていたが好気性の1株とは明らかに相違していた。

そこで同じ井原病院入院患者の新鮮糞便4検体を前述の方法に従ってMycoplasmaの分離を試みた結果, 2例から好気性, 嫌気性の両培養から分離できた。集落は小さく頭粒状で好気性



の方が嫌気性よりもやや大きい集落をつくった。

500 ml の肩つきコンベルに液状培地 200 ml を入れ、分離株を接種し振盪機で 36℃ で培養し、これを菌液および全培養として動物に注射した。ウサギ、モルモット、マウスに静脈内、腹腔内、脳内に注射したが 2 カ月間の観察で外見上いずれの異常もみとめられなかった。解剖所見も肉眼では異常はみとめられなかった。

はじめに述べたように一般細菌全般にわたっての検査は行なわなかった。ただ井原病院患者の舌苔 18 例中 4 例に *Serratia marcescens* を分離したことをのみを報告する。これを液状培地 (*Mycoplasma* 用) で培養し、その全培養液を綿球にしみこませて 37℃ に培養すると綿球は黒緑色に着色した。これを冷蔵庫 5℃ に放置すると、灰色、ピンク、黄色と時間の経過と共にいろいろの色調を呈した。

#### IV 考 察

SMON 患者 18 症例の舌苔より 15 例に *Mycoplasma* を検出できた。舌苔が厚く毛様の角化のひどい 9 例からは全例に検出された。これは舌苔のびどいものでは他の好気性の細菌も多数検出されていることから *Mycoplasma* の検出率も一段と高いことは容易に想像される。なかでも 18 例中 4 例に *Serratia marcescens* が検出されたことは興味深い。舌苔の鮮明な緑色がキノホルムによることは証明された<sup>3)</sup>。しかし舌苔の黒緑色、灰白色、ピンク、黄色に *Serratia marcescens* が関係していないとは断言できない。*Mycoplasma* の検出率であるが Heyflick<sup>4)</sup> によれば 280 例中口腔より 8% の割合と述べている。石田らは最近歯石より高率に<sup>5)</sup> 分離したことを報告している。

現在まで分離された菌株は同定されていないのは本文に述べた理由からである。今後クローン化を行ない血清学的検査を併試することによって同定を行なう予定である。ただ現在の検索で特徴と思われるものを強いて述べれば舌苔より分離したすべての株が嫌気性に増殖し、好気性にはごく一部の株しか生えないこと、しかしその集落数は嫌気性培養に比べて著しく少ないことである。またマウスの脳内に接種した場合 5 日以後 14 日まで再検出できる株が大部分であったことである。しかし脳内で増殖している証拠はまだえられていない。漸次消滅してゆくことと思われる。中村らは<sup>6)</sup> 人由来 *Mycoplasma* をマウスに脳内接種した場合再検出できるのは高々 48 時間で 3 日目には消滅すると報告している。私共は SMON との関係で実験を進めている関係上、人由来株の汚染からもし含まれるとすれば脳親和性株のみが選択的に増殖しないかと考えて、脳内接種を行なったわけであるが、再検出された株についての調査はまだ終わっていないのでいずれとも結論することはできない。一方、同じ理由でモルモット、ウサギ、ハムスター等に対する病原性、毒性をしらべたわけであるが、現在まで明確な現象をつかまえていない。

患者血清と分離した *Mycoplasma* との関係であるが、これは NH<sub>2</sub>、NH<sub>4</sub> の 2 種類のみを

抗原として用いたこと、抗原の調整方法、特にフェノール処理等抗原側の問題も決して万全を期したとはいえない。一方患者血清も採血の時期、保存方法等もさらに検討を要しようが、このような条件下では何等の関連は見出されなかった。今後株についてはクローン化され同定分離が行なわれた後、多くの株について抗原の作製方法も考慮に入れた上で再吟味したい。

## V 結 論

SMON患者の舌苔18例より15例にMycoplasmaを分離した。このMycoplasmaは大部分は嫌気性であり、マウスの脳に接種する時は5日頃まで検出できるが、その後消滅の傾向を示した。その同定は進行中である。SMON患者血清との間にまだ何等陽性成績をえていない。

SMON患者新鮮便4例より2例にMycoplasmaを分離したが、これは好気性の方が嫌気性よりよく発育した。さらにSMON患者の便より分離されたとするウイルス材料(組織培養)4種より全例Mycoplasmaを分離した。これらのうち1株は好気性で他の3株は嫌気性であった。

集落の性状は嫌気性の3株はよく似ていたが好気性の1株とは明らかに相違していた。これらの株の同定は進行中である。

本研究は豊倉康夫教授、井形昭弘博士(東大神経内科)、中島 穰博士、畠山正己博士(中島病院)岩野郁造博士、広田滋博士(井原市民病院)、緒方正名教授、鳥田宣浩博士(岡山大学)、吉植庄平博士(青梅市立総合病院)の御協力をえて行なわれたものであり、ここに厚く謝意します。

## 文 献

- 1) 本間 遜, 帖佐 浩, 榎本美枝子, 渡部 肇, 青山友三, 富山哲雄, 甲野礼作: SMON患者の舌苔よりの菌の検出  
第23回日本細菌学会関東支部例会抄録, 42, 1970
- 2) B. B. Aluotto, R. G. Witter, C. O. Williams and J. E. Faber  
: Standardized bacteriologic techniques for the characterization of Mycoplasma species. Intern. J. System. Bacteriol., 20: 35-58, 1970
- 3) 吉岡正則, 田村善蔵: SMON患者の緑色々素の本態。医学のあゆみ, 74: 320-322, 1970
- 4) L. Hayflick and E. Stanbridge: Isolation and identification of Mycoplasma from human clinical materials, Ann. N. Y. Acad. Sci., 143: 608-621, 1967.
- 5) 熊谷勝男, 由利恭子, 岩 武介, 宮本 勉, 日沼頼夫, 石田名香雄: 口腔内のマイコプラズマの生態。医学のあゆみ, 73: 639-640, 1970.
- 6) 中村昌弘, 坂本博章: ヒト由来マイコプラズマとウイルスとのマウスへの混合感染実験。日本細菌学雑誌, 25: 362-368, 1970.

# SMON患者由来マイコプラズマによる患者血清反応

富山 哲雄 (東大分院中央検査部)

## I はじめに

SMON患者舌苔から異常に高率にMycoplasma が分離されることが本間等により報告されたが、これらのMycoplasma がSMON発症とどういう関係にあるのかは未だに判然としていない。そこで、これらのMycoplasma とSMONの因果関係を解明する為の一つの方法として、分離したMycoplasma による血清反応を行ない、患者血中の抗体検出を試みた。

方法としては、通常Mycoplasma 抗体検出に応用されている三法、すなわち、補体結合反応、受身血球凝集反応、中和反応である。

## II 試料及び方法

### 1. 患者血清

患者血清は、岡山県井原市民病院及び東京都青梅市立病院で定型的SMONと診断された症例から採取したものである。

### 2. Mycoplasma

抗原の調製に使用したMycoplasma は、本間により埼玉県中島病院及び東大病院SMON患者舌苔から分離されたもので、諸種の条件から、NH<sub>4</sub>、NH<sub>2</sub>両株を使用した。いずれもMycoplasma 培地及び寒天で継代し、用に望んで寒天平板に分離してから用いた。

### 3. 抗原の調製

#### 1) 補体結合抗原

抗原調製用Mycoplasma は次の培地で培養した。

PPLO Broth w/o CV (Difco) .....	12g
Bacto Agar (Difco) .....	10g
Fresh Yeast Extract (自製) 25%溶液 .....	80ml
Dextrose. 40%溶液 .....	20ml
Horse Serum .....	160ml
精製水 .....	560ml

培地はシャーレに 2.5 ml ずつ分注して平板とし、Broth で前培養した NH<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub> 両株を接種し、コンラージ棒で塗抹した。培養は 37℃ 2日、嫌気ジャーを用いて、触媒下、水素ガス置換法で行った。

培養後、先ず 0.15 M PBS (pH 7.2) を平板上に注加し、コンラージ棒で菌体を集め、これを三角コルベンに集めて、フェノール 0.5% を加え、37℃ 2日、更に 56℃ 30分加熱して抗補体性を除去した。このものを、超遠心機にかけて集菌し、38,000 rpm 2回 PBS で洗滌して、PBS に suspend して補体結合抗原とした。

この抗原は、ウサギ免疫血清との間に Box Titration を行って抗原価を測定したところ、512 単位であり、又、全く抗補体作用を示さなかった。

## 2) 受身血球凝集反応抗原

補体結合抗原を、10 KC 20分、超音波処理をして受身血球凝集抗原として使用した。

## 4. コントロール血清の調製

CF 抗原価 512 単位の抗原約 1.5 ml に Complete Adjuvant 1.5 ml を加え、よく混和して emulsion とし、約 3 Kg の家兎に約 10ヶ所筋注、更に、2週間後に追加免疫して3週間後に全採血して血清を分離し、これに馬血清を 1/10 容加えて氷室 2日吸収、3,000 rpm 30分遠心して、上清をとり、コントロール血清とした。

この血清は Box Titration で、補体結合抗体価 2048 単位を示した。又、1:32 以上で抗補体性を示さなかった。

## 5. 血清反応

### 1) 補体結合反応

すべて Ko lmer 法に準拠し、Micro-titer で行った。抗原は 4 単位の他に、32 単位、64 単位を用いた。

### 2) 受身血球凝集反応

新鮮羊赤血球を洗滌して 2.5% 浮游液とし、これに等量の 1:20,000 タンニン酸を混合して、氷水中 15分処理し、2回 PBS で洗滌し、原量の PBS に Suspend して、タンニン血球とした。次いで、37℃ 15分間抗原感作を行い、1回洗滌してから NRS 0.6% 加 0.15 M PBS に suspend して感作血球とした。患者血清は、管底用小試験管を用いて、PBS-NRS で 2<sup>n</sup> 稀釈を行い、これに 1/10 量の感作血球を加え、室温で 18時間反応させ、管底鏡で判定した。

### 3) 中和試験

患者血清を 2<sup>n</sup> 稀釈し、この稀釈血清 0.1 ml に P P L O Broth 0.9 ml, Mycoplasma 浮游液 1滴を加え、37℃、2日、嫌気培養を行った。判定は、これを P P L O Agar に滅菌濾紙で brushing をして、更に 37℃、2日嫌気培養して行った。

### III 結 果

補体結合反応，受身血球凝集反応，中和反応の結果は次の通りである。

病院	月日氏名	CF <sub>4u</sub>	CF <sub>64u</sub>	IHA	NT	病院	月日氏名	CF <sub>4u</sub>	CF <sub>64u</sub>	IHA	NT	
井原	4.21	-	-	-	-	井原	4.22	-	-	-		
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
	5.9		-	-	-	-	青梅	6.9	-	-	-	
			-	-	-	-			-	-		
			-	-	-	-			-	-		
			-	-	-	-			-	-		
			-	-	-	-			-	-		
			-	-	-	-			-	-		
			-	-	-	-			-	-		
-			-	-	-	-			-			
-			-	-	-	-			-			
-			-	-	-	-			-			
			-	-	-	-	対照	4.25	-	-	-	-
			-	-	-	-			-	-		
			-	-	-	-			-	-		
			-	-	-	-			-	-		
			-	-	-	-			-	-		
		-	-	-	-		4.26	-	-	-	-	
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-		4.27	-	-	-	-	
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-		1084	-	-	-	-	
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-		1086	-	-	-	-	
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-		1088	-	-	-	-	
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-		1097	-	-	-	-	
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-		1098	-	-	-	-	
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-		1099	-	-	-	-	
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-		445	-	-	-	-	
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-		446	-	-	-	-	
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-		448	-	-	-	-	
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-		449	-	1:8	-	-	
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			

CF(-): 1:4未満, IHA(-): 1:10未満, NT(-): 1:10未満

即ち，三法とも，いずれの患者においても陰性であった。対照群の一例にのみ64単位の抗原を用いた補体結合反応で1:8という弱い陽性を示した。

### IV 考 察

SMON患者舌苔より分離されたMycoplasmaを抗原として行った血清反応で，いずれの患者も陽性を示さず，この限りにおいては，このMycoplasmaとSMON発症との関係に知見を得ることはできなかった。ただ，この結果から直ちに，これらのMycoplasmaが本症の病因として無関係であることは断定できない。それは，ここで得られた結果から次の三つの場合が考えら

れるからである。

## 1. Mycoplasma が本症の病原であったとしても、尚、抗体が検出できなかった可能性

### 1) 株の選択の問題

ここでは分離された株を無選択に使用したが、この株が病原株であったかどうかは全く判然としない。多数の株の中には本症の病原となっているものが混在していた可能性を否定できない。あたかも腸管に *Salmonella* あるいは *Shigella* が常在菌の中に少数存在する如く、この場合も多数の常在 *Mycoplasma* の中に少数の病原 *Mycoplasma* が存在していたのかもしれない。しかし、現在この様な特殊な *Mycoplasma* に対する分離培地、更にはこの様な株の発育する培地についての知見はないので、この様な可能性をも考えて、培地及び培養法に考慮を払って更に検索を進めることが必要であろう。

### 2) 方法及び抗原調製法の問題

ここでは *Mycoplasma* に従来応用されてきた三つの方法を使用した。これらの方法の適用でよいかどうか、は問題であろう。又、本菌が強い抗補体性を示す為に、常用されているフェノール処理、加熱処理を行ったが、これらはいずれも抗原の性状に少なからぬ影響を与えるものであるから、抗原の処理法にも問題が残る。

### 3) 毒素の可能性

動物ではマウスの rolling disease の様に神経毒素産生 *Mycoplasma* が知られており、もしも本症がこの例の様に、感染 *Mycoplasma* の産生する毒素によるものであるとするならば、抗毒素としては検出されても、通常の抗体としては検出されない、という可能性もあり得よう。

### 4) 組織抗体の可能性

いわゆる液性抗体の形をとらずに、細胞性抗体の様な存在も考慮しなければならないであろう。

### 5) その他

その他にも、採血期の問題、抗血清の保存の問題、等々も考える必要があるであろう。

## 2. 病原ではあっても抗体が上昇しない可能性

本 *Mycoplasma* が病原ではあっても、これに対し抗体が産生されない、又は、されにくく、検出できない、という可能性も否定できない。

## 3. 病原ではない可能性

SMONが可成慢性的経過をたどることから、*Mycoplasma* の様な微生物が異常に増殖することは、むしろ自然の現象であって、ここから分離される *Mycoplasma* は原因ではなく単なる結果であるのかもしれない。

以上、可能性としてのみ三つの場合を考慮したが、この内のいずれであるかは現在全く不明で

あり，上述の諸要因，可能性を考えて，本症とMycoplasmaの相関を更に追求していかなければならない。

## V 要 旨

SMON患者舌苔由来のMycoplasmaを抗原として，本症患者血清について，補体結合反応，受身血球凝集反応，中和反応を行ったところ，いずれの方法においても全例陰性であった。

本研究を遂行するに当り，終始懇切な御指導と御協力をいただいた東大医科学研究所本間遜教授，患者試料について御高配いただいた井原市民病院岩野郁造，広田滋両博士は深謝する。又，本実験に当り技術的助力を惜しまれなかった東大分院中央検査部南波邦治，桜井敏子，高橋文子，神奈川県立こども医療センター検査科高橋明子の諸氏に感謝する。



# スモン患者舌よりのマイコプラズマの分離

中村昌弘，川口元也（久留米大学医学部微生物学）

## I 序

本間等<sup>(1)</sup>はスモン患者の舌より高率にマイコプラズマを分離し，これが従来報告されているマイコプラズマとマウス脳での滞留性その他の性状に於て著しく異っていることを報告した。

われわれもスモン患者の舌よりマイコプラズマ(M)の分離を試みたので，その成績を報告する。なお，対照として慢性疾患々者，歯科疾患々者及び健康者の舌よりの分離も平行して行った。

## II 方法と材料

### 1. スモン患者舌よりのMの分離

#### 1) 材料採取病院：

国立呉病院および久留米大学病院

#### 2) 材料採取年月日：

1970年9月18日と1971年1月29日の2回に亘って材料を採取したが，その間に不定期にも採取した。これらの月日は実験成績の項に示した。

#### 3) 材料採取方法とM分離方法

滅菌綿球で患者の舌をぬぐい，この綿球を直ちにPPLO broth (5ml) に投入し，持ち帰る。翌日PPLO broth 中の綿球を取り出しPPLO agar に塗株37℃でN<sub>2</sub>下で培養3日，及び7日にコロニー発生の有無を観察，一方，綿球は再びPPLO broth に投入し，普通フラン器で7日間培養後その0.1mlをPPLO agar へ塗抹N<sub>2</sub>下で培養す。マイコプラズマ様コロニーは確認のため，そのコロニー部のblock を agar - agar とPPLO agar に培養した。（前者37℃，後者37℃N<sub>2</sub>下）

マイコプラズマの同定は形態と血清による発育阻止試験によった。

### 2. 対照実験

対照実験として慢性疾患々者，歯科疾患々者及び健康者の舌より同上の方法で材料をとり，Mの分離を試みた。疾患の種類については実験成績の項に示した。

1. スモン患者舌よりのMの分離

材料採取を2回行った成績を表1に一括する。初回の採取でMの陽性のものが15名中10名で66%であった。次回は15名中6名で40%であった。前者は秋季であり、後者は冬季であった。前回陽性であって、次回陰性になったものが5名あり、前回は次回も共に陽性であったものが5名、前回陰性で次回陽性になった者は1名であった。この陽性率は後述する他の疾患の舌よりの分離率より高率である。

表1 スモン患者舌よりのマイコプラズマ分離成績(材料2回採取)

患者No.	年齢	性	発病年月	緑舌の有無	材料採取年月日	
					1970.9.18	1971.1.29
9-99	26	♀	45.8	-	+	-
2-3	51	♀	42.2	-	-	-
18-20	53	♀	44.7	-	+	+
3-4	54	♀	43.5	-	+	+
5-1	55	♀	43.7	-	-	+
13-7	55	♀	45.4	-	+	-
12-11	57	♀	43.6	-	+	+
6-2	65	♀	41.7	-	-	-
4-5	65	♀	43.6	-	+	-
11-12	66	♀	45.6	+	+	+
17-21	66	♀	44.5	-	+	-
1-29	66	♀	42.7	-	-	-
10-8	69	♀	44.1	-	+	+
16-17	69	♀	42.12	-	-	-
14-10	70	♀	45.5	-	+	-
計	15名				10(66%)	6(40%)

次に追加して分離が試みられなかった5名の成績については表2に示す。3名は国立呉病院入院患者、2名は久留米大学病院患者であった。成績は5名中3名陽性で60%を示した。この分離成績も同率であった。

次に追加してのみ分離を試みた患者における分離成績は表3の如くである。この成績では特に培養方法による差を示したが共に同率で15名中6名で40%であった。

なお分離されたMはすべてM. salivariumであった。

表2 スモン患者舌よりのマイコプラズマ分離成績(材料1回採取) (1)

病院名	患者	年齢	性	発病年月	緑舌の有無	材料採取年月日	Mの分離
国立呉病院	S	27	♀	45.2	+	45.9.18	-
	A	51	♀	44.8	-	45.9.18	+
	O	54	♀	43.5	-	45.9.18	+
	S	39	♂	45.5	-	45.6.27	+
	I	56	♀	45.4	-	45.6.6	-
計	5名						3(60%)

表3 スモン患者舌よりのマイコプラズマ分離成績(材料1回採取) (2)

患者No	年齢	性	発病年月	緑舌の有無	成績(培養方法別)	
					好気性	嫌気性
24	31	♂	45.9	-	+	+
19	32	♂	45.1	-	-	-
22	35	♂	38.11	-	+	+
25	47	♂	44.11	-	+	+
15	53	♀	45.4	-	-	-
16	58	♀	45.7	-	-	-
23	62	♂	42.3	+	-	-
26	63	♂	45.4	-	-	-
13	67	♀	40.5	-	+	+
14	70	♂	43.12	-	-	-
30	70	♀	44.4	-	+	+
18	73	♂	43.8	-	-	-
27	73	♀	44.10	-	-	-
28	74	♀	43.5	-	+	+
6	77	♀	44.5	-	-	-
計	15名				6(40%)	6(40%)

## 2. 対照実験

対照として表4に示すような疾患についてMの分離を試みた。即ち慢性疾患者としては結核および白血病を含む癌疾患、更に肝疾患その他を選んだ。

歯科疾患としては歯槽膿漏、歯肉炎、う蝕症、歯周囲炎を選び、健康者も対照に加えた。成績は秋季における分離率と冬季における分離率を示した。

一般に慢性疾患々者、健康者共Mの分離率は約10%の恒常値を示した。歯科疾患については歯槽膿漏では約30~40%、歯肉炎も30~40%で、う蝕症は10名以下の分離率であった。

表4 慢性疾患，歯科疾患および健康者舌よりのマイコプラズマ分離

疾患名	件数	M分離数	M分離率(%)	計 (%)	
慢性疾患	結核	12 ※	1	8.3	12.5
		12 ※※	2	16.7	
	癌 (含白血病)	9	1	11.1	5.3
		10	0	0	
	肝	18	2	11.1	11.1
	その他	15	2	13.3	13.3
歯科疾患	歯槽膿漏	61	20	32.8	35.9
		31	13	41.9	
	歯肉炎	17	7	41.2	39.1
		6	2	33.3	
	う蝕度	3	0	0	6.8
		41	3	7.3	
	その他	3	0	0	0
健康者	51	5	9.8	9.0	
	126	11	8.7		

※ 上段：前回報告分

※※ 下段：今回報告分

#### IV 考 察

本間等<sup>(1)</sup>のスモン患者の緑舌よりのMの分離率に比すればここで行った実験成績は低率であるが、それでも、他の疾患々者の舌よりの分離率に比すれば高率である。本間等の成績は緑舌を示した患者よりの分離であるのに対してこの材料では殆んど緑舌を示さなかったものであるその点に分離率の差が生じたのかも知れない。しかし、スモン患者の舌よりのMの分離率が高率なのがスモンの発病と如何に関係があるのか、或はスモンの発病後の結果なのか将来の検討に待たなければならない。

興味あることは、前回も次回もMが陽性であったものが前回陽性数10例中5例もあることで、この点、更に分離を試みて意義づけたいと思う。

対照として行った分離材料のうち、歯科疾患々者より約30~40%の率でMの分離がみられたが、この分離源は明かに歯科疾患病巣であるので、全身感染症と思われるスモン患者よりのMの分離率と比較すべきではないと思われる。

従って、スモン患者舌よりのMの高率の分離率は明かに何らかの意義を有するものと推察される。

## V 結 論

延べ50名のスモン患者の舌よりマイコプラズマの分離を試み、40%より60%に及ぶ率でマイコプラズマを分離しえた。対照として慢性疾患患者・歯科疾患患者及び健康者を対象として分離を試みた成績はそれぞれ10%、30~40%及び10%であった。スモン患者より分離されたマイコプラズマは*M. salivarium*であった。

## 謝 辞

スモン患者より材料を採るについて、快く便宜を計っていただいた国立呉病院、大村一郎博士に深甚なる謝意を表す。

## 文 献

- 1) 本間遜, 帖佐浩, 榎本美枝子, 渡部肇, 青山友三, 富山哲雄, 甲野礼作: SMON患者の舌苔よりの菌の検出, 日本細菌学雑誌 25(12), 684-685, 1970
- 2) 川口元也, 池田敏昭, 犬塚昌穂, 江原勝弥, 永田孝之: 歯科疾患よりのマイコプラズマの分離, 久留米医学雑誌 33(6)864-867, 1970
- 3) 川口元也・池田敏昭・犬塚昌穂・江原勝弥・永田孝之・中村昌弘・大曲靖夫: 歯科疾患患者舌よりのマイコプラズマの分離, 久留米医学雑誌 33(12), 1682-1685, 1970

# SMON患者材料よりのマイコプラズマ分離の試み

甲野礼作，志賀定嗣，篠川旦，赤尾頼幸（国立予研・ウイルス中央検査部）

スモン患者の緑舌より高率にマイコプラズマが分離され，これがマウス脳での滞留性その他の性状で，従来報告されたマイコプラズマと異なることが本間等によって報告された。<sup>(1)</sup>

われわれもスモン患者材料，主として便よりマイコプラズマの分離を試み，一部分離菌の性状，実験動物に対する病原性について検査したので，その成績を報告する。

## I 材料と方法

分離材料：岡山，東京，千葉の各地より採取したスモン患者の咽頭ぬぐい液10例，舌苔ぬぐい液4例，便20例，髄液4例についてマイコプラズマの検出を行った。

分離方法：咽頭ぬぐい液，舌苔ぬぐい液はそのまま，便はDifco PPLO Brothで10%乳剤を作り，3000rpm 20分間遠心分離し，その上清を検査材料とした。

マイコプラズマの分離方法はPurcellら<sup>2)</sup>の方法に準じて37℃で好気および嫌気培養（H<sub>2</sub>+10%CO<sub>2</sub>混合気体で空気を置換した嫌気培養瓶内で行った）を行った。接種したPPLO—Agar平板は培養後4日，7日にコロニーの発生の有無を観察した。一方，同時にPPLO—Brothに接種し，増菌培養を行った試験管より，培養4日，7日に一白金耳をPPLO—Agar平板に移植してコロニー発生の有無を検査した。

検査材料はPPLO Broth 5代，めくら継代を行い，PPLO—Agar平板でコロニーの認められないものを陰性とした。

マイコプラズマの同定は，形態と普通寒天に発育しないこと，抗血清による発育阻止試験によった。

## II 実験成績

### 1) スモン患者材料よりのマイコプラズマの分離

材料別の分離成績を表1，2，3，4に示す。

咽頭ぬぐい液10例中6例，便20例中9例に3代以降のめくら継代でマイコプラズマ様のコロニーの出現が認められたが，これらのコロニーは定型的なNippleを欠き周縁は不整で，中心部

に網目状構造を有するもので、継代は可能ではあるが、P P L O — B r o t h , A g a r 培地で増殖力が弱い。一部のコロニーは継代10代まで増菌培養を行ったが、増殖傾向が弱く同定は不可能であった。

表1 咽頭ぬぐい液

地域	年齢	性別	発病月日	採取月日	菌分離	
					好気	嫌気
岡山	48	♀	42. 8.	44.2.10	(+)*	N D
"	45	♀	43. 9.20	"	(+)	—
"	62	♀	43.10. 5	"	(+)	—
"	57	♂	43.12.10	"	—	N D
"	51	♂	44. 3.11	"	—	N D
"	61	♀	44. 4.21	"	(+)	(+)
"	35	♀	44. 9.10	"	—	N D
"	24	♀	44.10. 3	"	(+)	N D
"	37	♂	44.10.18	"	(+)	(+)
"	不明	♀	44. 2.10	44.2.15	—	—

\* (+)はマイコプラズマ様コロニーであるが、定型的なNippleを欠き、周辺は不整なものが多く、中心部に網目状構造を有する。継代は可能だが増殖傾向が弱い。同定は不可能である。

表2 便

地域	年齢	性別	発病月日	採取月日	菌分離	
					好気	嫌気
岡山	53	♂	44. 5.12	44. 8.23	(+)	N D
"				44. 9.24	(+)	N D
"	46	♀	44. 5.31	44. 6.23	(+)	(+)
"	18	♀	44. 6. 7	44.11.19	(+)	(+)
"	28	♀	44. 7. 1	"	(+)	(+)
"	67	♂	UN	"	(+)	(+)
"	45	♀	"	"	(+)	N D
"	53	♀	"	"	—	"
"	39	♀	"	"	—	"
"	61	♀	"	"	—	"
東京	34	♀	44. 9.	45. 2.13	—	"
"	UN	♀	44.12.29	45. 2. 3	(+)	"
"	56	♀	44.11.27	45. 2. 4	(+)	"
"	UN	♂	UN	UN	—	"
"	50	♂	45. 3.15	45. 6. 8	(+)	—
"	67	♂	45. 3.15	45. 6. 8	—	—
"				45. 5.11	—	—
千葉	46	♀	45. 5.25	45. 5.23	—	—
"				"	—	—
"				"	—	—



舌苔からの分離は4例中2例に定型的なマイコプラズマが検出された。分離株の生物学的性状は、

表3 舌 苔

地域	年齢	性別	発病月日	採取月日	菌 分 離	
					好 気	嫌 気
東京	67	♂	45.3.10	45.6.8	—	+※
"				45.6.9	—	+※
"				45.6.10	—	—
千葉	46	♀	45.5.23	45.5.28	—	—

※ CDC-2株, M, orale type 1

嫌気性発育で、液体培地でのにごりは認められず、ブドウ糖は分解せず、アルギニンを分解する。分離された2株はマイコプラズマ同定用NIH標準血清による発育阻止試験によって Mycoplasma orale type 1 と同定された。

髄液4例からのマイコプラズマ分離は陰性であった。

表4 髄 液

地域	年齢	性別	発病月日	採取月日	菌 分 離	
					好 気	嫌 気
東京	67	♂	45.3.10	45.6.8	—	—
"				45.6.9	—	—
"	50	♂	45.3.15	45.6.8	—	—
千葉	46	♀	45.3.25	45.5.28	—	—

## 2) 分離株の動物試験

スモン患者舌苔より分離されたCDC-2株の動物に対する病原性、毒素産生の有無を検討するために、培養菌をマウスの脳内、静脈内、モルモットの腹腔内に接種した。陽性対照として医科研本間教授がスモン患者舌苔より分離した犬塚株を同時に接種した。

接種培養菌の菌量は、CDC-2株  $10^8/ml$ 、犬塚株  $10^6/ml$  で、マウス脳内接種は0.03 ml 静脈0.1 ml、モルモットの腹腔には0.2 ml を接種した。

マウス脳内接種群は、接種後6日と10日に殺処分し、5倍脳乳剤を作り、3,000rpm 20分間遠心分離し、上清の菌量を測定した。

CDC-2株は、接種後6日で  $1.5 \times 10^1/Brain$ 、10日  $1.0 \times 10^1/Brain$  の生存を示した。犬塚株は、接種後6日  $1.5 \times 10^2$ 、の菌量の生存を認めたが、10日では陰性であった。

マウスの静脈内接種、モルモットの腹腔に接種した群では、接種後2週間観察を行ったが、いずれも無症状に経過した。

### Ⅲ 考察および結論

スモン患者材料からのマイコプラズマの分離を行った。検査例が少ないので明確な結論は下せないが、

スモン患者の縁舌よりのマイコプラズマの分離率は、本間らの指摘するように高率で4例の舌苔より2例からマイコプラズマが分離された。

咽頭ぬぐい液、便からの分離では、定型的なマイコプラズマのコロニーを示すものは認められず、非定型のコロニーが、めくら継代3代以降に咽頭ぬぐい液中に60%、便からは45%に出現した。分離株は、PPLO-Broth中での増殖性が悪く、同定不可能であった。

これらスモン患者から分離された株と発病との関係は今後の検討に待たなければならない。

分離株についてマウス、モルモットとの病原性を検討したが、マウス脳内での増殖、病原性はないように思われる。

### 文 献

1) 本間遜, 帖佐浩, 榎本美枝子, 渡部肇, 青山友三, 高山哲雄, 甲野礼作: SMON患者の舌苔より菌の検出, 日本細菌学雑誌 25(12), 684-685, 1970

2) Robert H. Purcell, and Robert M. Chanock,  
Diagnostic procedures for viral and rickettsial infections  
4th edition 780-823, 1969.

## BAT細胞におけるMycoplasmaの汚染

尾形 学, 奥水 馨 (東大農学部家畜微生物)

### I はじめに

各種の培養細胞株にMycoplasma (以下Mと略)の潜在的汚染が認められることは1956年Robinsonら<sup>9)</sup>の報告以来各国で追試がなされ,組織培養を用いてウイルス学的検索を行なうに際してはMの検索が必須な条件であることは多くの研究者によって認められている。著者ら<sup>6)</sup>もわが国の各種培養細胞株60株中52株(86.7%)がMによって汚染していることをすでに明らかにしている。

SMONの病因が京大・井上ら<sup>4)</sup>によってウイルス学的に検討され,新しいウイルスが分離されているが,本研究はスモン調査協議会の甲野会長より依頼を受け,井上らがウイルス分離に使用しているBAT-6細胞におけるMの汚染の有無につき検討したものである。以下その研究の概要を報告する。

### II 材料および方法

1) 細胞株: Mの汚染を検索した細胞株は京大・井上らによって樹立されたBAT-6細胞(ハムスター皮下腫瘍のクローン化継代細胞)で,予防衛生研究所において継代中のものを,甲野スモン調査協議会長より送付を受けた。

2) 分離培養基および培養法: BAT細胞よりのMの分離には変法Adler培地<sup>6)</sup>および変法Edward培地<sup>6)</sup>を用い,好氣的培養および,CO<sub>2</sub>10%,N<sub>2</sub>90%のガスを充満した嫌氣的培養法を併用した。変法Edward培地に細胞培養液の1,500rpm,5分遠沈上清を1白金耳塗抹する直接法と,変法Adler培地に細胞培養液の0.1mlを接種,37°C,3日増菌後,変法Edward培地に移植し5~7日後に集落の発生を観察する増菌法を同時に行なった。

3) Mycoplasma株: 著者らの分離株はMycoplasma-BAT株,本間らが分離し同定を依頼された株はMycoplasma-S TM株とされた。本研究に対照株として使用し,また家兎免疫血清作製のため用いたMのうち,M. hominis-C ATCC, M. orale N-1, M. salivarium C Hup 127, M. fermentans C ATCCは,久留米大・中村教授より, M. hominis PG 21, M. neurolyticum PG 28, M. hyorhinis PG 29はD. G. ff

Edward (Wellcome Research Laboratories, England) より, *M. hyorhinitis* E-1 および *M. hyorhinitis* E-2 は T. Estola (The State Veterinary Medical Institute, Finland) より, *M. hyorhinitis* S は W. P. Switzer (The Iowa State University, U. S. A.) よりそれぞれ分与を受けた。その他の *M. hominis* DH は HeLa 細胞より, *M. hyorhinitis* SEP123 および *M. hyorhinitis* SEP40 はブタ流行性肺炎より著者らが分離したものである。

4) 血清学的性状の検査: 抗M家兔免疫血清は Lemcke<sup>5)</sup>の方法に準拠して作製した。ヒト由来のMの抗血清の一部は久留米大・中村教授および東北大・石田教授より分与を受けた。Mの血清学的性状の検査は Clyde<sup>3)</sup>のディスク法による発育阻止試験を用いて行なった。

5) 生物学的性状の検査: 分離株および対照株の生物学的性状の検査は, Aluotto<sup>1)</sup>らによって記載された方法, および著者ら<sup>6)</sup>が先に報告した法に基づき, 血清要求性, 液体培地のこん濁, 好気・嫌気条件下の発育, テトラゾリウムブルーの還元およびL-アルギニンの分解などにつき検討した。嫌気的条件下の性状検査はMを接種後, 小試験管の培地上層部に滅菌流動パラフィンを約1cmの高さに重層した。

### III 実験成績

1) BAT細胞からのM分離成績: カナマイシン無添加のイーグル液で継代された無接種BAT細胞およびカナマイシン60 $\gamma$ /ml添加イーグル液で継代された無接種BAT細胞より, CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub>嫌気的条件下において, 直接法および増菌法ともにMが分離された。好気的条件下では, いずれの方法でもMの分離は陰性であった。(表1)

表1 BAT細胞からのMycoplasmaの分離成績

Cell line	Tissue culture maintenance medium	Detection of mycoplasma		
		Culture condition	Direct method	Subculture method
BAT-6 cell	Eagle's solution (no Kanamycin)	AE ※	—	—
		AN ※※	+	+++
BAT-6 cell	Eagle's solution (60 $\gamma$ /ml Kanamycin)	AE	—	—
		AN	+	+++

※ AE: Aerobically

※※ AN: Anaerobically with CO<sub>2</sub> 10%:N<sub>2</sub> 90%

2) 分離株の血清学的性状：BAT細胞から分離されたMycoplasma-BAT株は対照のM. orale N-1株と共に抗M. orale 家兔免疫血清によって明らかに発育阻止が認められた。またMycoplasma-STM株は対照のM. hyorhinis PG29と共に抗M. hyorhinis 家兔免疫血清によって発育阻止が認められた。BAT細胞から分離されたこれらのMはいづれもM. salivarium, M. fermentans, M. pulmonis, M. neurolyticumとは交差が認められなかった(表2)。

表2 各種MycoplasmaおよびBAT細胞から分離した株の交差発育阻止試験

Mycoplasma	Strain	Origin	Growth inhibitory zone with antisera																	
			M. hominis-c	M. hominis PG21	M. hominis DH	M. orale N-1	M. orale O-1	M. orale O-2	M. salivarium-C	M. salivarium S-1	M. salivarium S-2	M. fermentans-C	M. fermentans-F-1	M. pulmonis PG22	M. neurolyticum PG28	M. hyorhinis E-1	M. hyorhinis E-2	M. hyorhinis S	M. hyorhinis SEP123	M. hyorhinis SEP40
M. hominis-C	ATCC	Human	3	3	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M. hominis	PG21	Human	ND	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M. hominis	DH	HeLa cell	ND	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M. orale	N-1	Human	0	0	0	3	8	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mycoplasma	BAT	BAT-cell	0	0	0	0	7	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M. salivarium-C	Hup 127	Human	0	0	0	0	0	0	6	10	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M. fermentans-C	ATCC	Human	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M. pulmonis	PG22	Rodent	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
M. neurolyticum	PG28	Rodent	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
M. hyorhinis	PG29	Swine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0	+
Mycoplasma	STM	BAT-cell	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3	3	4	2

※ 数字はディスク周辺よりの発育阻止帯の巾(mm)を示す。

ヒト由来の菌株および抗血清の一部は久留米大・中村教授，東北大・石田教授より分与を受けた。

十印は弱い発育阻止が認められるが明瞭な阻止帯を形成しないことを示す。

3) 分離株の生物学的性状：Mycoplasma-BAT株は血清要求性があり，嫌気条件下のみ発育する。その集落形態は写真1に示す。液体培地をこく濁せず，ブドウ糖を分解しない。テトラゾリウム・ブルーを還元しない。アルギニンの分解は好氣的・嫌氣的条件下共に明瞭でなく，この点を除くと表3に示すように対照株のM. orale N-1と一致した性状を示した。Mycoplasma-STM

株は、血清要求性あり、液体培地を弱くこん濁する。その集落形態は写真2に示す。好氣的・嫌氣的にいずれもよく発育する。ブドウ糖の分解およびテトラゾリウム塩の還元は陽性であるがアルギニンの分解は認められなかった。その性状は対照株の *M. hyorhinis* PG29 と完全に一致した。

表3 各種 *Mycoplasma* およびBAT細胞から分離された株の生物学的性状

Biological characters	Mycoplasma strain								
	<i>M. hominis</i> -C ATCC	<i>M. hominis</i> PG21	<i>M. hominis</i> DH	<i>M. orale</i> N-1	<i>Mycoplasma</i> -BAT	<i>M. salivarium</i> -C	<i>M. fermentans</i> -C ATCC	<i>M. hyorhinis</i> PG29	<i>Mycoplasma</i> -STM
Serum requirement	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Turbidity of liquid medium	-	-	-	-	-	+	-	±	±
Growth in aerobic or anaerobic condition	$\frac{AE}{AN}$	$\frac{AE}{AN}$	$\frac{AE}{AN}$	$\frac{AE}{AN}$	$\frac{AE}{AN}$	$\frac{AE}{AN}$	$\frac{AE}{AN}$	$\frac{AE}{AN}$	$\frac{AE}{AN}$
Glucose break down	—/— <sup>※</sup>	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	+/+	+/+
Tetrazolium reduction	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	±/+	+/+	+/+
Arginine hydrolysis	+/+	+/+	+/+	+/+	±/-	+/+	+/+	—/—	—/—

※  $\frac{AE}{AN}$ の性状を示す

4) 分離株の同定：分離株の血清学的性状および生物学的性状により *Mycoplasma*-BAT株は、*M. orale*, *Mycoplasma*-STM株は *M. hyorhinis* と同定された。

#### IV 考 察

Robinsonら<sup>9)</sup>の報告以来、培養細胞株にMの汚染があることが世界各国で追試され、HeLa細胞をはじめ多くの細胞株の40-100%がMによって汚染されていることが明らかにされた。これらの汚染Mには各種のspeciesが含まれているが、これまでに報告されたMのうちでは、*M. hominis*が大部分を占め、その他少数ながら *M. orale*, *M. hyorhinis*, *M. granularum*, *M. gallisepticum*, *M. laidlawii*, *M. arginini*, *M. arthritidis*などの汚染が報告されている。*M. hominis*および *M. orale*はヒトの咽喉頭部における常在菌の一種である。これらが細胞株汚染Mの大部分を占めることは、細胞株の取扱者が細胞株継代中に人為的に汚染をもたらしたと考えられる。*M. hominis*および *M. orale*は、培養液中のアルギニンを分解するが、その他の生物学的活性は弱く、一般には培養細胞に対し細胞変性効果を示さないので通常Mの汚染有無の不明のまま組織培養が使われ



ている場合が多く、今回のBAT細胞のM. oraleによる汚染もこの例にもれない。一方、M. hyorhinisはブタの鼻腔常在菌であるが、ブタ流行性肺炎の二次的侵入因子、多発性漿膜炎および関節炎の病原因子としても知られている。このようなブタを宿主とするM. hyorhinisがいかなる経路で細胞株汚染を来たしたかは不明である。M. hyorhinisの細胞株における汚染については1964年Butlerら<sup>2)</sup>が、HEP<sub>2</sub>細胞を継代中に培養基が酸性に変わって細胞変性がおこり継代が不能になったものから一種のMを分離したことに始まる。このMはGDL株と呼ばれていたが、後にPurcellら<sup>8)</sup>によってM. hyorhinisと同定された。M. hyorhinisは培養液中のブドウ糖を分解し酸を産生し生物学的活性も強いので、各種の組織培養細胞に対し細胞変性をおこすことが予想される。著者らが行なった実験によれば、HeLa細胞に対しては細胞変性効果は認められなかったが、トリ腎初代培養細胞に対しては明らかな変性効果を示した。

Mの組織培養汚染は培養細胞に影響を与えるのみならず、共存するウイルスの増殖にも種々な影響を与えることが知られている。Rouseら<sup>10)</sup>はアデノ2型ウイルスのブラック形成がMの汚染によって抑制されることを、また、Somersonら<sup>12)</sup>はラウス肉腫ウイルスの増殖が、M. oraleの感染によって抑制されることを明らかにしている。坂本<sup>11)</sup>は鶏卵漿尿膜組織培養を用いて、インフルエンザウイルスとM. pneumoniaeあるいはM. oraleとの同時感染がウイルスの増殖抑制をおこすことを報告した。

このように組織培養におけるM感染は、単に培養細胞に影響を与えるのみならず、共存するウイルスの増殖にも著しい影響をもたらすことが明らかにされている。SMONの病因がウイルス学的に検索され各種の組織培養が使用されていると思われる。もし、SMONをslow virus infectionの立場からその病因としてのウイルスを分離し、さらにそのウイルスの性状を検討するのであれば、組織培養中に存在するMの影響は決して軽視できないものであろうと考える。

今回、BAT細胞から分離されたM. oraleは、カナマイシン $60 \text{ }^{\gamma}/\text{ml}$ の濃度に耐性であった。このMのカナマイシンに対する最高耐性度は測定されなかったが、著者<sup>7)</sup>はさきにHeLa細胞汚染のM. hominisをカナマイシンで除去することを試み、 $100 \text{ }^{\gamma}/\text{ml}$ では除去されず、 $1,000 \text{ }^{\gamma}/\text{ml}$ で除去しうることを報告した。しかしこの濃度のカナマイシンでも除去できないMも存在することも認められたので、細胞株汚染Mの除去の確認は極めて慎重でなければならない。M-freeの確認には人工培地による培養法がもっとも確実であり必要と思われる。

## V 要 約

SMONの病因のウイルス学的検索に使用されているBAT細胞にMycoplasma(以下Mと略)が潜在的に汚染していることを明らかにし、そのMの生物学的性状および血清学的性状を検討することによって同定を行なった。これらのMは2種類あり、未接種BAT細胞から著者らが分離したMは嫌気性のM. oraleと同定された。また、京大・井上らのSMONウイルス接種BAT細胞



胞から医科研・本間らによって分離されたMはM-hyorhinitisであることが明らかになった。

#### 参 考 文 献

- 1) Alutto, B. B., R. G. Wittler, C. C. Williams and J. E. Faber (1970): Standardized bacteriologic techniques for the characterization of mycoplasma species. *Int. J. Sys. Bact.*, 20, 35-58.
- 2) Butler M. and R. H. Leach (1964): A mycoplasma which induces acidity and cytopathic effect in tissue culture. *J. gen. Microbiol.*, 34, 285-294
- 3) Clyde, W. A. (1964): Mycoplasma species identification based upon growth inhibition by specific antiserum. *J. Immunol.* 92, 958-965.
- 4) 井上幸重, 西部陽子, 中村良子 (1970): スモン患者糞便より高率に分離された新しいウイルス, *医学のあゆみ*, 72, 321-322
- 5) Lemcke, R. M. (1964): The serological differentiation of mycoplasma strains (pleuropneumonia-like organisms) from various sources. *J. Hyg.*, 62, 199-219.
- 6) Ogata, M. and K. Koshimizu (1967): Isolation of mycoplasmas from tissue cell lines and transplantable tumor cells *Jap. J. Microbiol.*, 11, 289-303.
- 7) 尾形学, 興水馨, 秦 泰子 (1965): 培養細胞株におけるMycoplasma (PPLO) の汚染について, *ウイルス*, 15, 328-329.
- 8) Purecell, R. H., N. L. Somerson, H. Fox, D. C. Turner, and R. M. Chanock (1966): Identification of acid-inducing agent and related mycoplasma as *Mycoplasma hyorhinitis*. *J. Nat. Cancer Inst.*, 37, 251-253.
- 9) Robinson, L. B., R. H. Wichelhausen and B. Roizman (1956): Contamination of human cell cultures by pleuropneumonia-like organisms. *Science* 124, 1147.
- 10) Rouse, H. C., V. H. Bonifas, R. W. Schlesinger (1963): Dependence of Adenovirus replication on arginine and inhibitory of plaque formation by pleuropneumonia-like organisms. *Virology* 20, 357-365.

- 11) 坂本博章(1968):人系マイコプラズマに関する研究. 久留米医学会雑誌, 31, 964-991.
- 12) Somerson, N.L. and M.K. Cook(1965):Suppression of Rous sarcoma virus growth in tissue cultures by Mycoplasma orale. J. Bact., 90, 534-540.

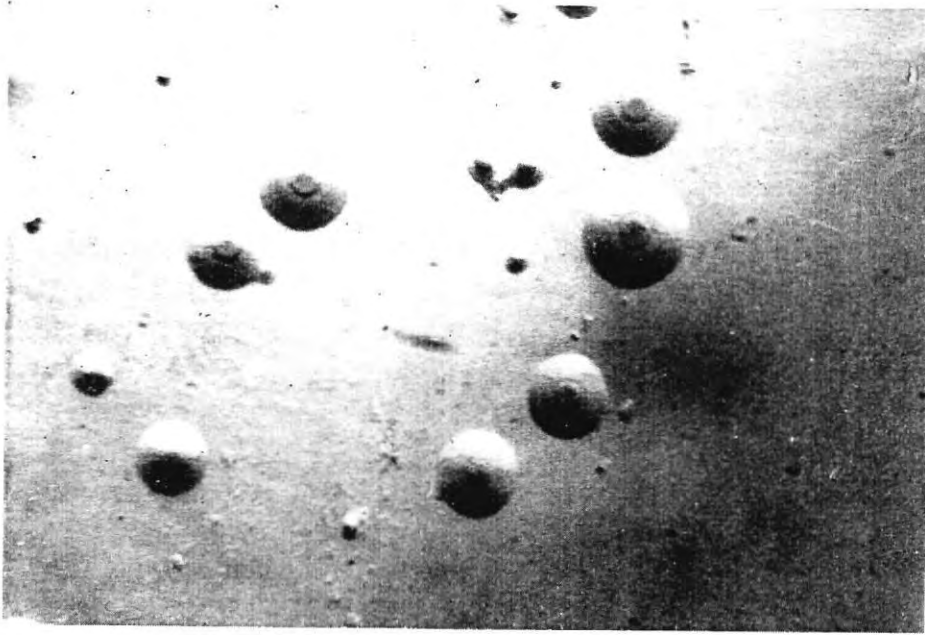


写真 1. *Mycoplasma orale* BAT 株。

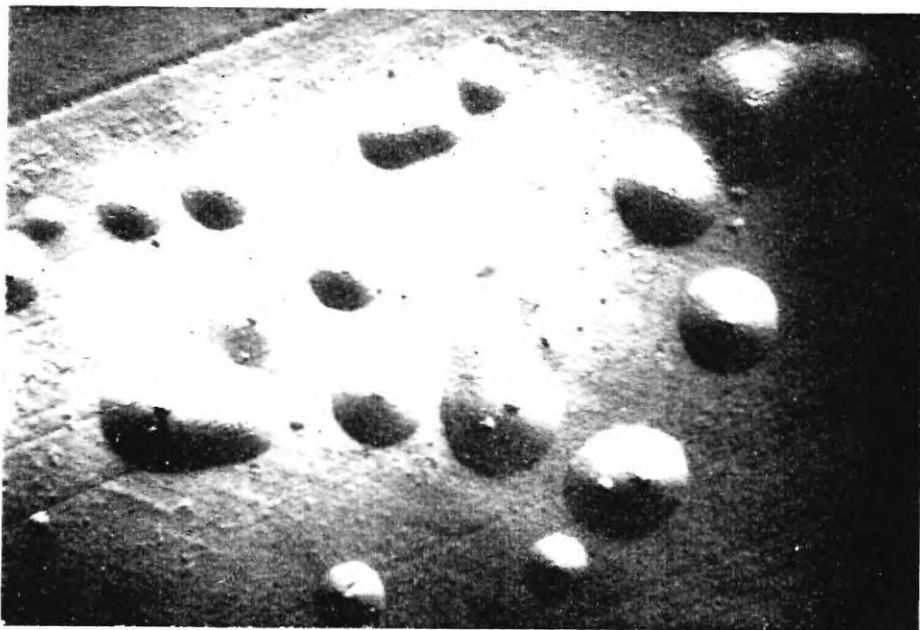


写真 2. *Mycoplasma hyorhinitis* STM 株。