

## B スモンとマイコプラズマ

# マウスにおける *Mycoplasma neurolyticum* の病原性に関する実験的研究

尾形 学, 跡部ヒサエ, 奥水 馨

( 東京大学農学部家畜微生物学教室 )

## I 要 約

SMONの病因と *Mycoplasma* (以下Mと略)の毒性の関連性に着目し, 本菌 中唯一の神経毒素産成菌種として知られる *M. neurolyticum* のマウスにおける毒性について実験的研究を行なった。市販 (conventional) マウスの鼻腔 (29~38%), 気管 (21~25%), 肺 (0~20%), 脳 (0~25%) に *M. neurolyticum* の潜在的感染があることを明らかにしたが, これらのマウスには何等の神経症状も認められなかった。これらのM分離株の24時間培養菌液はマウスの尾静脈内接種により, 横回転, 運動失調, 向上性麻痺などの症状を示し, 5時間以内で死亡した。その毒素量は  $LD_{50} = 2^{3.2} \sim 2^{5.3} / 0.5 ml$  であった。SMONの原因としてMが関与する役割は現段階では否定的である。

## II 緒 言

SMON患者の舌苔, 糞便あるいは咽頭ぬぐい液から, 本間<sup>3)</sup>ら, 中村<sup>6)</sup>ら, 甲野<sup>5)</sup>ら, 俵<sup>10)</sup>ら, 妹尾<sup>4)</sup>らによってMが分離された。これらのMのうち中村<sup>6)</sup>らが患者舌苔より分離したMは *M. salivarium* 甲野<sup>5)</sup>らが舌苔より分離したMは *M. orale* Type 1 と同定されたが, 他の分離株を含めてこれらのMがSMONの病因としてとくに直接の意義をもつという証拠はえられていない。しかしながら, 本間<sup>3)</sup>らは, 患者舌苔より分離した株をモルモットの腹腔ならびに静脈内に接種したところ, 歩行困難, 痙攣等の症状を示し, またこのMはマウスの脳で長期にわたって滞留することを報告した。また妹尾<sup>4)</sup>らは, 患者下痢便から分離したMをマウスに脳内接種したところ, 毛皮立毛, 不安状態, 知覚麻痺, 異常動作などを示すことを報告した。これらのことから, 著者らはSMONの病因とMの毒性の関連性に着目し, 本菌属中唯一の神経毒素産成菌種として知られる *M. neurolyticum* とマウスの実験系を用い, 本菌種のマウスにおける分布ならびに毒性について実験的研究を行なった。以下その成績の概要を報告する。

## III 材料および方法

- 1) マウス: *M. neurolyticum* の分離をこころみたマウスは外見的に健康な (conventional) 1カ月, および5カ月令 dd 系 (2飼育場由来) 28匹, ならびに7~14カ月令 GPC 系 14匹である。毒性試験に用いたマウスは ICR 系 (SPF), ddY 系 (SPF) で業者より購入した。
- 2) 分離培養基ならびに分離培養法: M の分離培養基は PPL0-Agar (Difco) に馬血清 20%, 25% (W/V) イーストエキストラクト (日甜) 10%, ペニシリン G 1,000 u/ml, 2.5% 酢酸ナトリウム 1% を加えたものを使用した。分離培養法は鼻および気管からは滅菌綿棒によ

り粘液を採取し、肺、脳等はP P L O - Broth ( D i f c o ) を用い10%乳剤としたものを分離培地に直接接種し、好氣的に37°C 3~7日間培養した。

3) Mycoplasma株：Mの同定ならび毒性試験に对照として用いた標準株のうち、M. neurolyticum PG-28, M. pulmonis PG-22, M. arthritidis PG-6は、D. G. ff. Edward ( Wellcome Research Laboratories, England ) より分与を受けた。

4) Mycoplasmaの同定：血清学的性状はClyde<sup>1)</sup>によって報告された発育阻止試験により決定した。各種生物学的性状の検査は著者ら<sup>7)</sup>により先に報告された方法にもとづいて実施した。

5) マウス毒性試験：Mの増殖に用いた培地は、前記分離培地のうちP P L O - Agar ( D i f c o ) をP P L O - Broth ( D i f c o ) に代え、また酢酢タリウムは除外した。Tully<sup>11)</sup>の法に従がいS P Fマウスの尾静脈にMの24時間培養菌液の0.5 mlを接種し、以後症状の経時的観察を行ないマウスの生死を判定の指標とした。

#### IV 実験成績

##### 1) M. neurolyticumの分離成績

表1に示すように、マウス系統別(飼育場別)ではdd-s系35%, dd-F系50%, GPC系36%であった。これをマウスの部位別にみると鼻腔29~38%, 気管21~25%, 肺0~20%, 脳0~25%であった。このことからマウスの系統(飼育場別)によっては、呼吸器道ばかりでなく、肺、脳等にもかなりのM. neurolyticumが潜在的に感染していることが明らかとなった。

これらのMはすべて、M. neurolyticum PG-28株家兎免疫血清によって発育阻止され、その生物学的性状はブドウ糖分解性(+), アルギニン分解性(-), メチレンブルー還元性(+), テトラゾリウム塩還元性(+), 溶血性; モルモット血球( $\beta$ ), 馬血球( $\alpha$ )フィルム・スポット産生性(-)であった。

表1 外見上健康なマウスからのM. neurolyticumの分離成績

Mouse strain	Age* of mice	No of mice	Mice									
			Number of isolations from :									
			Nose		Trachea		Lung		Brain			
No.	pos. %	No.	pos. %	No.	pos. %	No.	pos. %					
dd-s	1	20	7	35	ND	ND	3/16	20	5/20	25		
dd-F	5	8	4	50	3/8	38	2/8	25	0/8	0	1/8	13
GPC	7-14	14	5	36	4/14	29	3/14	21	0/14	0	0/14	0

ND: Not done

\*: Months

2) 毒性試験

分離株は、株により毒性の強弱の差が認められたが、全株が毒素産生株であった。また株の分離部位による毒性の差は認められなかった(表2)。マウスの系統による毒素感受性の差は認められなかった(表3)。多くのマウスは10~20分の潜伏期のあと、横回転、運動失調、向上性麻痺などrolling disease特有な症状を示し、5時間以内で死亡した。強い毒素産生株では2~5分以内に口から出血性の泡を出して死亡した。24時間培養の毒素量はiv投与方法で測定した時、№.1株はLD<sub>50</sub> = 2<sup>32</sup> / 0.5 ml, №.9株ではLD<sub>50</sub> = 2<sup>53</sup> / 0.5 mlであった(表3)。接種経路による死亡率は静脈内5/5, 腹腔内4/5, 脳1/5, 皮下0/5であった(表4)。

マウス各部位から分離されたM. neurolyticumの毒性試験

表2

Mycoplasma		Mouse toxicity
Recovery site	No. of strains tested	
Nose	8	5/5
Trachea	6	5/5
Lung	1	5/5
Brain	2	5/5
Nose	3	4/5
Trachea	3	4/5
Brain	1	4/5
Brain	1*	0/5
Lung	1**	0/5
Joint	1***	0/5

\* M. neurolyticum PG-28

\*\* M. pulmonis PG-22

\*\*\* M. arthritidis PG-6

\*\*\*\* No. dead / No. inoculated

マウスにおける M. neurolyticum の毒素定量試験

表 3

Strain	Mouse strain	Broth * dilution	Time of death					Mouse toxicity	LD <sub>50</sub>
			min. after inoculation						
No. 1	ICR (SPF)	Undiluted	2	2	120	180	180	5/5	23.3
		1 : 2	10	10	10	180	240	5/5	
		1 : 4	60	60	120	120	180	5/5	
		1 : 8	300	460	460	760	-	4/5	
		1 : 16	-	-	-	-	-	0/5	
No. 1	dd-Y (SPF)	Undiluted	20	20	60	180	240	5/5	23.1
		1 : 2	60	20	120	120	240	5/5	
		1 : 4	60	80	80	240	300	5/5	
		1 : 8	330	480	960	2880	-	4/5	
		1 : 16	-	-	-	-	-	0/5	
No. 9	ICR (SPF)	Undiluted	3	3	4	4	60	5/5	25.5
		1 : 2	3	3	5	5	180	5/5	
		1 : 4	30	30	60	120	180	5/5	
		1 : 8	60	120	120	180	180	5/5	
		1 : 16	180	180	180	210	240	5/5	
		1 : 32	180	180	180	300	630	5/5	
		1 : 64	-	-	-	-	-	0/5	
No. 9	dd-Y (SPF)	Undiluted	3	3	5	5	20	5/5	25.1
		1 : 2	3	3	3	180	240	5/5	
		1 : 4	25	60	60	120	330	5/5	
		1 : 8	60	60	120	180	-	4/4	
		1 : 16	180	210	330	490	540	5/5	
		1 : 32	180	640	900	-	-	3/5	
		1 : 64	-	-	-	-	-	0/5	

\* 24 hr broth culture

マウス接種経路による M. neurolyticum 毒性試験

表 4

Route of inoculation	Dose ( C F U )	Incidence of death <sup>*</sup>
Intravenous	0.5 ml ( $4 \times 10^7$ )	5 / 5
Intraperitoneal	0.5 ml "	4 / 5
Intracerebral	0.03 ml "	1 / 5
Subcutaneous	0.5 ml "	0 / 5

\* No. dead / No. inoculated

V 考 察

M. neurolyticum は Mycoplasma 菌属中唯一の神経毒素産生菌種として、マウスに実験的に rolling disease をおこさせることが知られている。しかしながら自然界においては、ウイルスあるいは原虫などをマウスの脳内で継代中に潜在的な M. neurolyticum が活性化し、rolling disease が発現された報告があるのみである。<sup>2)8)9)</sup> 今回の研究から明らかになったように、市販 (conventional) マウスは程度の差はあれ、呼吸器あるいは脳に本菌種の潜在的感染が認められた。しかしながら、このようなマウスは外見的には何等症状はなく、これから分離された M. neurolyticum 菌株の人工培養菌の接種によってのみはげしい神経症状が認められた。

一般に M の病原性を確認することはきわめて困難である。それは本菌属が通常健康な動物あるいは人の呼吸器、性生殖器粘膜の正常細菌叢を構成しており、他の原因による疾病の際に本菌属の分離率が若干高率になることが知られているからである。従って S M O N 患者の口腔、糞便等からの M の分離あるいは分離率の上昇が病因としか結び付くかは、にわかに判定しがたい。現在人由来の M は 8 菌種が知られているが、これらのうち M. pneumoniae を除いてその病原性は確定していない。従って S M O N 患者由来の M については、まずその確実な同定が先決と考えられる。さらに分離された M のマウス等に対する動物実験において、本研究において明らかにされたように使用されるマウスの潜在的 M 感染に慎重な考慮が払われなければならない。特に M 感染の場合、その症状の発現は潜在性の M あるいは他の微生物および物質の存在によってきびしく規制されることが知られているからである。<sup>12)</sup>

今回の研究により、一見健康 (conventional) マウスは M. neurolyticum の潜在感染を広くうけていることが明らかになったが、これらのマウスは何等の神経症状を示さなかった。これ

らのことから、現在の段階でSMONの原因としてMを唆示する結果は全く得られなかった。

## 文 献

- 1) Clyde, W.A., Jr.(1964):Mycoplasma species identification based upon growth inhibition by special antisera. J. Immunol., 92, 958-965.
- 2) Findlay, G.M., E.Klieneberger, F. O. MacCallum and R. D. Mackenzie (1938):Rolling disease,New syndrome in mice associated with a pleuropneumonia-like organisms.Lancet, 235, 1511-1513.
- 3) 本間遜, 帖佐浩, 榎本美枝子, 渡部肇, 富山哲雄, 甲野礼作(1971):SMON患者の舌苔および糞便よりMycoplasmaの検出。スモン調査研究協議会研究報告書, №3, 83-92.
- 4) 妹尾左知丸, 井上正直, 横村英一, 俵寿太郎(1971):スモンの病因に関する実験的研究。スモン調査研究協議会研究報告書, №4, 174-179.
- 5) 甲野礼作, 志賀定嗣, 篠川且, 赤尾頼幸(1971):SMON患者材料よりのマイコプラズマ分離の試み。スモン調査研究協議会研究報告書, №3, 103-106.
- 6) 中村昌弘, 川口元也(1971):スモン患者舌よりのマイコプラズマの分離。スモン調査研究協議会研究報告書, №3, 98-102.
- 7) 尾形学, 太田哲英, 跡部ヒサエ(1967):齧歯類のMycoplasmaに関する研究 —— ラットの慢性呼吸器病由来Mycoplasmaについて —— 日本細菌学雑誌, 22, 618-627.
- 8) Sabin, A.B.(1938):Isolation of a filterable, transmissible agent with "neurolytic" properties from toxoplasma infected tissues.Science, 88, 189-191.
- 9) Sabin, A.B.(1938):Identification of the filterable, transmissible neurolytic agent isolated from toxoplasma-infected tissues as a new pleuropneumonia-like microbe.Science, 88, 575-576.
- 10) 俵寿太郎, 金政泰弘, 林英生, 赤塚和也, 市川弘幸, 岡部昭延(1971):培養細胞による病原分離の試み。スモン調査研究協議会研究報告書, №3, 73-77.
- 11) Tully, J.G.(1964):Production and biological characteristics of an extracellular neurotoxin from Mycoplasma neurolyticum. J.Bact., 88, 381-388.
- 12) Tully, J.G.(1969):Murine mycoplasmas, In: The Mycoplasmatales and L-Phase of Bacteria, Edited by Hayflick L,pp.571 — 605, North-Holland Publishing Co., Amsterdam.

## イヌを用いたマイコプラズマおよび キノホルムの接種実験例

俵 寿太郎，金政泰弘，市川弘幸，赤塚和也，岡部昭延

(岡山大学医学部微生物学教室)

小川勝士，堤 啓，元井 真

(岡山大学医学部病理学教室)

実験動物として雑犬を用い，これにキノホルムを経口投与することにより前肢後肢に麻痺をきたしたものがあり，さらにスモン患者から分離したマイコプラズマを併用投与したものは，臨床症状が一層増悪し失明したものがみられた。そしてこのことは既に微生物部会<sup>1)</sup>およびキノホルム部会<sup>2)</sup>で報告してきた。しかしこれが果して再現性のあるものかどうかを長期観察例について追試中であり，その結果とこれまでに報告したものとを合せてまとめた次才である。

### 実験材料および方法

キノホルムは100~300mg/kg/day で連日経口与投与した。使用したマイコプラズマはスモン患者糞便から培養細胞を用いて分離後DifcoのPPL0培地で継代中のO-DM株であり，別に Mycoplasma gallisepticum を比較対照として使用した。それらの使用濃度は 3000 colonies/ml のものを投与した。

### 結 果

キノホルムを投与中マイコプラズマを併用投与したイヌの1例を示すと表1の如くである。

すなわち分離したマイコプラズマO-DM株のみを10日間投与したがその後61日間無症状であった。そのため62日目からキノホルムの経口投与を開始した。そして152日間連続投与したところで，マイコプラズマ2mlを10日間投与したが，投与中止後6日してイヌは失明し，後肢と前肢の麻痺が同時に現われた。失明はその後90日間続いたが，前後肢の麻痺は3日間で回復した。そこで前後肢麻痺回復後70日経過したところで，再びマイコプラズマ2ml宛を12日間投与したが，投与中止後5日して後肢に弱い麻痺が現われたので屠殺剖検した。この間のキノホルム投与総量は150gである。病理組織学的所見では，脊髄は頸髄から胸髄にかけて後索に変性像がみられ，グリアの増殖を伴っていた。頸髄のGoll索の病巣は境界明瞭で，一部でズダンⅢ陽性顆粒の集簇性の出現をみた。腰髄の側索にあたり，少数の軸索に変性と思われる像を認めた。

キノホルム投与によるイヌの発症々状は一般にはこのようなもので，後肢麻痺がまず現われ，歩く時よろけるようになり，しばらく歩いた後は坐してしまって歩行しなくなった。

その後，前肢にも麻痺が現れるようになって歩行は不能になり立つことも出来なくなって，ついには失明するに至った。



イヌによるキノホルムおよびマイコプラズマ接種実験の1例

表 1

日数(日)	1~28	~89	~241	~254	~260	~263	~333	~345	~349	剖
キノホルム量(g)			(106.4)			(150.8)				
症状	失明					■			検	
	前マ後肢ヒ				■					
O-DM株	1 ml × 10			2 ml × 10				2 ml × 12		

(O-DM株, 3000 colonies/1ml)

これらの症状をもって発症とし、後肢麻痺のみを示したものを+, 前肢後肢ともに麻痺をきたしたものを++, 前後肢麻痺に失明を示したものを++, そして発症しなかったものを-とすると、キノホルム投与例を一括した表2において、実験群Iは同時にエマホルム投与を開始したものであるが全てが発症した。

イヌにおける発症例

表 2

実験群	番号	接 種 材 料	症状	註
I	1	(エマホルム)+ (O-DM株)	++	+++- ..... ..... ..... ..... 前前後陰 後後肢性 肢肢麻 麻麻痺 痺痺 ・ 失明
	2	(エマホルム)+ (O-DM株)	++	
	3	(エマホルム)+ ( )	+	
	4	( )+ (O-DM株)	-	
II	5	(キノホルム)+ (O-DM株)	++	
	6	(キノホルム)+ (O-DM株)	++	
	7	(キノホルム)+ (O-DM株培養上清)	-	
	8	(キノホルム)+ ( )	-	
III	9	(キノホルム)+ ( )	-	
	10	(キノホルム)+ ( )	-	
	11	( )+ (O-DM株)	-	
	12	(キノホルム)+ (M.gallisepiticum)	-	
	13	(キノホルム)+ (M.gallisepiticum)	-	

エマホルム投与にマイコプラズマ分離株を併用したものは卅と卅で、症状が強かったのに反し、エマホルムのみでの投与例は十で、マイコプラズマ分離株のみを与えたものは勿論発症しなかった。そして実験群IIとIIIの例はキノホルム粉末により、I群にみられた現象の再現性の確認実験をしたものであるが、II群の5および6の例、つまりキノホルムとマイコプラズマ分離株を併用したものに卅と卅の症状が出た時に、その他の例、即ちキノホルムのみ、マイコプラズマのみ、マイコプラズマ培養遠沈上清およびMycoplasma gallisepticumとの併用例等はいづれも発症していなかった。

もっとも、その後キノホルム投与群はいずれも十または卅の発症をしたが、以上の結果は、キノホルムとマイコプラズマ分離株の併用投与例のみは、その他のものよりも発症が早く、しかも症状の強いことが考えられる結果であって、エマホルムでの投与例と同じ結果を得たわけである。これら実験群IIとIIIの5および6の例の発症時期におけるキノホルム投与量と体重との関係を示したものが表3であるが、キノホルムとマイコプラズマ分離株との併用投与群は、その他の投与群よりもキノホルムの投与量が少いか、あるいは同程度の投与量で既に発症したわけである。

### キノホルム投与量と発症の関係

表 3

実験群	番号	接 種 材 料	症状	体重(Kg)	キノホルム全量(g)	キノホルム投与期間(日)
II	5	(キノホルム)+(O-DM株)	卅	9	150.8	256
	6	(キノホルム)+(O-DM株)	卅	6	158.0	260
	7	(キノホルム)+(O-DM株培養上清)	-	7	158.0	260
	8	(キノホルム)+( )	-	7	158.0	260
III	9	(キノホルム)+( )	-	3	72.9	183
	10	(キノホルム)+( )	-	8	152.3	179
	11	( )+(O-DM株)	-	5	—	—
	12	(キノホルム)+(M.gallisepticum)	-	5	92.3	175
	13	(キノホルム)+(M.gallisepticum)	-	5	107.7	171

(2月10日現在)

### 考 案

生後1カ月のイヌを用いてキノホルムおよびマイコプラズマ分離株を投与したところ、後肢麻痺につづいて前肢麻痺が現われ、さらに失明するにいたる症状を示し、病理組織学的には頸髄から胸髄にかけて後索に変性像がみられ、グリアの増殖を伴っていた。なおgoll索の病巣は境界明瞭で、一部でズダンⅢ陽性顆粒の集簇性の出現をみたが、これらの所見はスモン患者の所見と酷似している。この症状と病理組織像は、キノホルムのみを与えたものにおいてもみられたので、それらの主役を演ずるものはキノホルムによるものであることは、大いに考えられることである。そしてこれらの症状の発現を促進するものとして多くの要因があると考えられるが、スモン患者糞便から分離したマイコ

ラズマを、キノホルムと併用投与したものは、キノホルムだけの投与群よりも発症が早く、症状が少  
少強く現われたので、これも促進要因のうちの一つである如き感がある。因みに対照として用いた  
Mycoplasma gallisepticumでは、マイコプラズマ分離株による如き促進症状はみられ  
なかった。

## 文 献

- 1) マイコプラズマおよびキノホルムの犬による実験例，微生物部会才一回ウイルス研究会  
(46.8.5)
- 2) 犬に於けるキノホルムおよびマイコプラズマの接種実験，キノホルム部会才3回研究会  
(47.2.28,29)

# SMON 患者舌よりのマイコプラズマの分離

中村昌弘・川口元也・松岡康恵・\*大村一郎  
(久留米大学医学部微生物学・\*国立呉病院)

## I 序

本間等<sup>1,2)</sup>はSMON患者にみられる緑舌の細菌検索にさいして緑膿菌とマイコプラズマに目標をおいて検索を進めたところ、東大神経内科・中島病院および井原病院入院患者より異常に高率にマイコプラズマを分離しえた。中野ら<sup>3)</sup>もSMON患者の舌苔より60%の割にマイコプラズマを分離しえた。われわれもSMON患者の舌よりのマイコプラズマの分離を試みたのでその成績を報告する。これらの成績の一部はスモン調査研究協議会研究報告書<sup>4)</sup>3においてすでに報告したが、今回は前回の分離対象よりさらに1回の分離を試みる機会を得たので、前回の成績も加えて総合した成績を報告することにする。この報告はすでに中村ら<sup>4)</sup>によって公表されたものであるが、改めて研究協議会報告書としてまとめることにした。

## II 方法と材料

### 1 対象患者と検体

国立呉病院入院SMON患者36名、うち11名からは3回、12名からは2回、13名からは1回材料を採った。久留米大学医学部付属病院入院SMON患者2名からは1回材料を採取した。対照として、結核、癌、肝疾患などの慢性疾患患者76名、歯科疾患患者162名、および健康者177名からも材料をとった。

### 2 マイコプラズマの分離法

材料は滅菌綿球で舌をぬぐい、それを直ちに5mlのPPL0 broth, (PPL0 broth, [Difco] 7容, ウマ血清2容, 新鮮イーストエキス[ニッテン]1容, ペニシリン1000u/ml, 酢酸タリウム0.5mg/mlを含む)へ投入して持ち帰り、3~4日間37℃で培養後(その間ときどき軽く振盪)、培養液の0.1mlをPPL0 agar平板に塗抹、37℃で好気的および嫌氣的(ガスバック使用[BBL])に培養、3~7日後にコロニー発生の有無を観察した。

マイコプラズマの同定はコロニーの形態と型免疫血清を含むdiscによる発育阻止試験(growth inhibition)のみによった。

## III 成績

国立呉病院入院SMON患者よりのマイコプラズマの分離成績は表1のようである。第1回目の分離試験では好氣的培養のみしか試みていないが検出率66.6%であり、第2回、第3回目では嫌氣的培養も試みたが、第2回は40%、第3回目は72.7%の検出率であった。3回分離試験ができたものの検出率は3回とも陽性が36.4%で、2回が27.3%、1回のみ陽性が18.2%で、3回とも陰性が18.2%であった。

SMON患者の舌よりのMycoplasmaの分離成績

表1

患者No.	年齢 性	発病年月	材料採取年月日									分離率
			9/18/1970			1/29/1971			8/23/1971			
			好気	菌型	好気	嫌気	菌型	好気	嫌気	菌型		
5-1-5	56 ♀	1968 7	-		-	+	M.saliv.	-	+	M.saliv.	2/3	} 3/3 ...36.4% 2/3 ...27.3% 1/3 ...18.2% 0/3 ...18.2%
2-3-1	52 ♀	1967 2	-		-	-		-	-	0/3		
3-4-3	55 ♀	1968 5	+	M.saliv.	+	+	?	-	+	M.saliv.	3/3	
4-5-2	66 ♀	1968 6	+	M.saliv.	-	-		-	+	M.saliv.	2/3	
13-7-9	56 ♀	1970 4	+	M.saliv.	-	-		-	+	M.saliv.	2/3	
10-8-13	70 ♀	1969 1	+	M.saliv.	+	+		+	-	M.saliv.	3/3	
11-12-10	67 ♀	1970 6	+	M.saliv.	+	+		-	+		3/3	
18-20-12	54 ♀	1969 7	+	M.saliv.	-	+		-	+	contami	3/3	
17-21-21	67 ♀	1969 5	+	M.saliv.	-	-		-	?		1/3	
1-29-8	67 ♀	1967 7	-		-	-		-	-		0/3	
16-17-16	80 ♀	1967 12	-		-	-		-	+	M.saliv.	1/3	
6-2	66 ♀	1966 7	-		-	-					0/2	} 2/2 ...33.3% 1/2 ...33.3% 0/2 ...33.3% 2/2 ...33.3%
9-9	27 ♀	1970 8	+	M.saliv.	-	-					1/2	
14-10	71 ♀	1970 5	+	M.saliv.	-	-					1/2	
12-11	58 ♀	1968 6	+	M.saliv.	-	+					2/2	
6-6	78 ♀	1969 5			-	-		-	-		0/2	
13-4	68 ♀	1965 5			+	+		-	+	M.saliv.	2/2	
18-22	74 ♀	1968 8			-	-		+	+	M.saliv.	1/2	
19-17	33 ♂	1970 1			-	-		-	+		1/2	
22-20	36 ♂	1963 11			+	+		-	+	M.saliv.	2/2	
23-18	63 ♂	1967 3			-	-		-	-		0/2	
30-11	71 ♀	1969 4			+	+	M.saliv.	+	?	M.saliv.	2/2	
15-7	54 ♀	1970 4			-	-		-	-		0/2	
7-	28 ♀	1970 2	-								0/1	} 1/1 ...61.5% 0/1 ...38.5%
8-	53 ♀	1969 8	+	M.saliv.							1/1	
15-	55 ♀	1968 5	+	M.saliv.							1/1	
14-	71 ♂	1968 12			-	-					0/1	
16-	59 ♀	1970 7			-	-					0/1	
24-	32 ♂	1970 9			+	+					1/1	
25-	48 ♂	1969 11			+	+					1/1	
26-	64 ♂	1970 4			-	-					0/1	
27-	74 ♀	1969 10			-	-					0/1	
28-	75 ♀	1968 5			+	+					1/1	
-14	39 ♀	1971 5						-	+		1/1	
-15	61 ♂	1968 12						-	+		1/1	
-19	61 ♂	1970 5						-	+		1/1	
分離率			12/18(66.6%)			12/30(40.0%)			16/22(72.7%)			

2回分離試験ができたものの成績は表1に示すように33.3%で、1回のみの試験では61.5%が陽性であった。久留米大学付属病院入院SMON患者では2名の菌検出を試みたが、1名のみ陽性であった。なお、得られたマイコプラズマはすべてM. salivariumであった。

対照として試みた慢性疾患患者でのマイコプラズマの検出率は陽性者8名、10.5%、歯科疾患患者では45名陽性、27.8%、健康者では16名陽性で9%の検出率であった。

#### IV. 考 察

本間ら<sup>1)</sup>の示したSMON患者舌苔よりのマイコプラズマの分離率は異常に高く80%以上であるが、われわれの試みた成績でも66, 72%という高値であった。第2回の試みは寒冷のため検出率が悪かったと思われる。それでも対照として試みた他の患者および健康者の検出率よりはるかに高い。富山<sup>5)</sup>はSMON発症とマイコプラズマの検出率との間の因果関係を調べているが成績は不明のまま終っている。われわれの場合もなぜこのような高値の検出率が得られるか、その原因は不明のままである。

#### 文 献

- 1) 本間遜, 帖佐浩, 榎本美枝子, 渡部肇, 静山友三, 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) 本間遜, 帖佐浩, 榎本美枝子, 渡部肇, 富山哲雄, 甲野礼作: SMON患者の舌苔および糞便よりのMycoplasmaの検出, 日本臨床 29, 753-758, 1971.
- 3) 甲野礼作, 志賀定嗣, 篠川旦, 赤尾頼幸: SMON患者材料よりのマイコプラズマの分離の試み, スモン調査研究協議会研究報告書, 昭和45, 病原班研究報告, №3, 103-106, 1971.
- 4) 中村昌弘, 川口元也, 松岡康恵, 大村一郎: SMON患者の舌よりのマイコプラズマの分離, 医学のあゆみ, 80(6), 399-400, 1972.
- 5) 富山哲雄: SMON患者由来マイコプラズマによる患者血清反応, スモン調査研究協議会研究報告書, 昭和45, 病原班研究報告, №3, 93-97, 1971.

# SMON患者の舌苔および糞便より分離したMycoplasmaの同定

本間 遜, 帖佐 浩, 李 貴連

(東大医科研微生物株保存施設)

SMON患者の菌の検索にあたり私共はMycoplasmaの分離と同定を分担することになったが、患者の舌苔および糞便よりのMycoplasmaの検出の方法及び結果については前報<sup>1,2</sup>のとおりであるが、これらの方法で舌苔より分離した株23株とその病原性をしらべる目的でマウスの脳内に接種して再分離した6株および糞便より分離した株2株で計31株について生物学的性状及び血清学的性状をしらべ同定したので報告する。

## 実験方法

患者材料および分離方法：前報参照<sup>1,2</sup>

被検菌株：SMON患者舌苔由来株23株と糞便由来株2株、それに舌苔由来株23株中の6株をマウスに脳内接種を行い、マウスの脳を通過したそれらの株の6株計31株の同定を行った。対照株として既知の標準株として人由来5株、齧歯類由来株1株を用いた。これらのMycoplasmaはスキムミルク3%、ブドウ糖5%(PH7.6)を分散媒として凍結したものを使用した。

培地はChanock等(3)のPPL0用の寒天培地、液状培地を用いた。37℃3日間ないし7日間好氣的、嫌氣的培養を行いその菌体を検査材料とした。検査方法は以下に記す<sup>6</sup>

ブドウ糖の分解能：液状培地に1%になるようにブドウ糖溶液と0.2%PR液を加えてPHが7.4になるように1N NaOHで修正し菌を加えて37℃3日間ないし7日間好氣的、嫌氣的に培養を行った。

アルギニン分解能：液状培地に1%になるようにアルギニン溶液と0.2%フェノールレット試液を加えてPHが7.0になるように1N HClで修正し菌を加えて37℃で3日間ないし7日間好氣的、嫌氣的に培養を行なった。

テトラゾリウム還元能：2,3,5-triphenyl tetrazolium chlorideをPPL0用の寒天培地に0.02%になるように含ませた培地とMycoplasmaの孤立した集落面のある寒天ブロックを切りとり培養面を重ね合せ37℃で3日間ないし7日間好氣的、嫌氣的培養を行いコロニーの紅変の存無をしらべた。

オプトヒン感受性：Mycoplasmaの $10^6/ml$ コロニー程度の菌液をPPL0用の寒天培地に全面に塗布してその上にオプトヒン感受性ディスク(BBL製Taxo Pディスク及び昭和オプトヒン感受性ディスク)を置いて37℃3日間ないし7日間好氣的、嫌氣的に培養を行ないディスクの周囲に阻止帯が出来たものを(BBL製Taxo Pディスクの場合は紙の端から1mm以上の阻止帯で昭和製感受性ディスクは紙の端から5.8mm以上の阻止帯)陽性とした。これは一応肺炎球菌の陽性



S M O N 患者より分離した Mycoplasma の同定

No.	由来	Strain	Glucose breakdown	Arginine hydrolysis	Tetrazidum reduction	Methylene blue reduction	Film and spots	Sensitivity to optochin	Hemolysis $\beta$ (Sheep cells)	Growth inhibition test						同定	
										M. pneumoniae	M. fermentans	M. arithritis	M. hominis	M. salivarium	M. orale		M. pulmonis
1	舌苔	NH-1	-	+	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	M. orale
2	"	NH-2	-	+	-/-	-/-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	M. Salivarium
3	"	NH-3	-	+	-/-	-/-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	"
4	"	NH-4	-	+	-/-	-/-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	"
5	"	NH-5	-	+	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	M. orale
6	"	NH-6	-	+	-/-	-/-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	M. Salivarium
7	"	TH-1	-	+	-/-	-/-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	"
8	"	TH-2	-	+	-/-	-/-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	"
9	"	TH-3	-	+	-/-	-/-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	"
10	"	TH-4	-	+	-/-	-/-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	"
11	"	TH-5A	-	+	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	"
12	"	TH-5B	-	+	-/-	-/-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	M. orale
13	"	IO-1	-	+	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	M. Salivarium
14	"	IO-2	-	+	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	"
15	"	IO-3	-	+	-/-	-/-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	"
16	"	IO-4	-	+	-/-	-/-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	"
17	"	IO-5	-	+	-/-	-/-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	"
18	"	IO-6	-	+	-/-	-/-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	"
19	"	IO-8	-	+	-/-	-/-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	"
20	"	IO-9	-	+	-/-	-/-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	"
21	"	IO-12	-	+	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	M. orale
22	"	IO-13	-	+	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	M. Salivarium
23	"	IO-14	-	+	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	"
24	糞便	古林	-	+	-/-	-/-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	M. hominis
25	"	佐々木	-	+	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	"
26	マウス脳	TH-5BCR	-	+	-/-	-/-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	M. Salivarium
27	"	TH-5ACR	-	+	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	M. orale
28	"	TH-1CR	+	-	-/+	-/+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	M. pulmonis
29	"	TH-2CR	+	-	-/+	-/+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	"
30	"	IO-4ACR	-	+	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	M. Salivarium
31	"	IO-8ECO	-	+	-/-	-/-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	"
32	コントロール	PG-27	-	+	-/-	-/-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	M. arithritis
33	"	PQ-6	-	+	-/-	-/-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	"
34	"	Mac	+	-	+/+	-/+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	M. pneumoniae
35	"	PG-21	-	+	-/-	-/-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	M. hominis
36	"	Orale ATCC 15539	-	+	-/-	-/-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	M. orale
37	"	Salivarium	-	+	-/-	-/-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	M. Salivarium



の規準に従って判定したものである。

メチレン青還元試験：0.1%メチレン青液をMycoplasmaの増殖した液状培地に2滴加えて好氣的嫌氣的に24時間培養を継続しメチレン青液の脱色をもって陽性とした。

溶血能試験：10%綿羊赤血球を加えたPPL0用寒天培地をMycoplasmaの増殖したPPL0用寒天培地に薄く重層して好氣的に37℃に3日間ないし7日間培養を行ない溶血(β)したものを陽性とした。

増殖阻止試験：増殖したMycoplasmaの $10^6/ml$ 集落の菌液をPPL0用寒天培地に全面に均一に塗抹してその上にClydeの方法<sup>4</sup>で人由来Mycoplasmaの抗血清0.02mlを経6.5mmの濾紙に吸収させたもの及びBBL製Taxo 1ディスク～Taxo 6ディスクを置いた。濾紙に吸収させたものは濾紙の外端より2mm以上のものを陽性としBBL製Taxoディスクは1mm以上のものを陽性とした。

実験結果：Mycoplasmaの同定に必要な諸検査を行なった結果以下のような同定の成績を得た。これを表Iに記す。

舌苔より分離したMycoplasma 22例中に同一患者1名より2株分離されたものを加えて計23株について同定を行った。その結果19株はM. salivarium 4株はM. oraleと同定された。なお同一患者から分離された2株はM. salivariumとM. oraleであった。糞便を濾過し組織培養を行ったウイルス材料から分離したMycoplasmaの2株はいずれもM. hominisであった。今回の検索は病原株混入の有無をしらべるのが元来の目的であったから単個集落分離を行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生理食塩水浮遊液としてマウスの脳内に接種した。そして再分離されたMycoplasma 6株を接種前の6株と比較同定した。その結果4株はマウスの脳内に接種したものと同一であったが他の2株は一致しなかった。すなわちM. salivarium 3株とM. orale 1株で他の2株はM. pulmonisと同定された。

前報<sup>1,2)</sup>に記したとおりこれらの分離株は嫌氣性だけに増殖し好氣性培養では全く増殖しなかった。しかし継代を数代重ねるにしたがい好氣性にも極めて少数の集落を生ずるものも出てきた。しかしこれはわずかであるためにすべて嫌氣性の状態で検索した。

## 考 察

舌苔より分離したMycoplasmaの同定の結果は予想通り口腔に常在するM. salivariumとM. oraleであった。これらのMycoplasmaは正常人の舌表面より極めて分離率が高いのは舌苔の角化がひどく毛様物質は長いものでは1cmにも達するという異常な舌表面に関係があると考えられる。これは石田等<sup>5</sup>が歯石より高率に分離をみているように口腔内局所の汚染の甚しい場合にみられる現象と考えてもよいのではなからうか。私共は他の菌の検索はしていないがたまたまSerratiaを多数分離同定した結果<sup>1,2)</sup>からの汚染部には好氣性の菌と嫌氣性のMycoplasmaが共存して見出されたものとする。さきにも述べた通り今回は病原性Mycoplasmaの検出の有無がその目的であるの

でこれが存在しているとしても多数の常在Mycoplasmaと混在することが当然予想されるわけで、その分離を如何にするかについて考えた。その結果分離Mycoplasmaをクローン化する前に直ちにマウスの脳内に接種したわけであるがその結果は新しいMycoplasmaを分離することは出来なかった。たゞ6株のM. salivariumを接種し、脳内通過後M. salivariumと異なるM. pulmonisを2株分離する結果になった。これは患者材料にM. pulmonisが混在していたか、又はマウスの脳に既に存在していたものか、又は脳内接種によって誘発されたものか不明である。しかし私共が正常マウス4週令迄は15匹の脳をしらべた結果ではその飼育所のマウス脳からは何のMycoplasmaも分離できなかった。

糞便を濾過し組織培養を行ったウイルス材料中のMycoplasmaの検索を依頼されその結果組織培養液より分離したMycoplasmaの2株はいずれもM. hominisであった。これが腸管由来のものであるか、組織培養が既に汚染されていたものか不明である。又SMONの病原検索にあたっていくつかのウイルスの分離が報告されたが私共によってその材料中にMycoplasmaが存在することが見出された。今後もウイルスの検索に当ってはこの点を十分に吟味することの必要性を痛感する。以上の実験を通じてMycoplasmaが直接にSMONの病原とのつながる証拠は得られなかった。唯、口腔内の汚染に伴い極めて高率に分離されることが見出された。

SMONの検索の初めに緑舌が注目され緑色々素の原因の究明のため斎藤守教授および井形教授より緑膿菌検索の依頼があったのが私共班研究参加のそもそもの初まりであった。ついで私共は緑膿菌の存在を否定し、Mycoplasmaを多数分離し、色素産生菌としてSerratiaを検出した。この菌が舌苔の毛根部に着色物質を産生する可能性はin vitroの実験から推定されるがその鮮明な緑色はキノホルムによることが明らかにされた。緑色の追求から井形教授が患者の緑色々素の結晶を多数混じた尿をもってこれ菌によるものかを問われた。その結晶は驚くべき程多く直ちに化学分析することをおすすめしたがこれがキノホルムの検出につながったことは興味深い<sup>7</sup>。

同時にウイルス材料の組織培養に薄い緑色色素が入っているとして、ウイルスに疑問をもちMycoplasmaの検索を私共に依頼された甲野博士の感も甚だすどかったと云わねばなるまい。

SMONの原因追求が終始緑色に関連して動き遂に目的を達したことは班長始め班員の熱烈な研究心によるものであるが、その経過は回顧すれば誠に興味深いものである。

## 結 論

SMON患者の舌苔および糞便より分離されたMycoplasma 31株について生物学的、血清学的性状の検討を行った。その結果

- 1) 舌苔より分離されたMycoplasma 23株中19株はM. salivarium, 4株はM. oraleであった。
- 2) 舌苔より分離された23株中6株のMycoplasmaの病原性をしらべる目的でマウスの脳内の通過を行って再び分離したMycoplasma 6株について同定を行った。マウス通過後の6株

のうち5株はM. salivariumで1株はM. oraleであった。しかしマウス脳通過後分離した6株中3株はM. salivariumで1株はM. oraleでマウス脳通過前と同じであったが2株はM. pulmonisで通過前のM. salivariumとは異った。

- 3) ウイルス組織培養液2種より分離したMycoplasmaの同定を行った結果2株ともM. hominisであった。
- 4) マウス脳通過前と後で分離された2株のMycoplasmaが違っていたことの原因について考察を加えた。

以上の結果を通じSMON患者の舌苔及び糞便より新しい病原性Mycoplasmaを分離同定しえなかった。しかし舌苔の汚染部より人由来Mycoplasmaが多数かつ高率に分離された。

#### 文 献

- 1) 本間遜, 帖佐浩, 榎本美枝子, 渡部肇, 富山哲雄, 甲野礼作, SMON患者の舌苔および糞便よりMycoplasmaの検出  
スモン調査研究協議会研究班報告書№3 昭和45年度病原班研究報告書83~92頁
- 2) 本間遜, 帖佐浩, 榎本美枝子, 渡部肇, 富山哲雄, 甲野礼作: SMON患者の舌苔および糞便よりのMycoplasmaの検出, 日本臨床29巻2号 昭和46年2月号
- 3) Chanock, R.M., Hayflick, L. and Barile M.F. (1962): Proc. Natl. Acad. Sci., 48, 41~49
- 4) Clyde, W.A.: J. Immunol. 92, 958~965
- 5) 熊谷勝男, 由利恭子, 岩淵武介, 宮本勉, 日沼瀬夫, 石田名香雄: 口腔内マイコプラズマの生態医学のあゆみ, 73: 639~640, 1970.
- 6) Barbara B. Aluttc, Ruth G Wittler, Carol O Williams and John E. Faber (1970):  
Internatinal Journal of Systematic Bacteriology 20, 1, 35~58
- 7) 田村義蔵: SMON患者の緑尿および緑便に含まれる緑色物質の本態  
スモン調査研究協議会研究班報告書№3 昭和45年度病原班研究報告書159~161頁

# SMON 患者由来 *Mycoplasma salivarium* による CF および PHA 反応

富山 哲雄

(東大分院中央検査部)

要旨：岡山県井原地区 SMON 患者由来 *Mycoplasma salivarium* 3 株を抗原として、井原地区 SMON 患者につき、CF 及び PHA 反応を行ったが、全例陰性であった。

## I はじめに

前報のように SMON 患者に患者舌苔由来 *Mycoplasma* に対する抗体がみいだされず、高率にみられる保有 *Mycoplasma* と SMON 発症の因果関係は判然としなかった。しかし、ここで使用した *Mycoplasma* が埼玉県戸田地区患者からの分離株であり、患者血清が岡山県井原地区及び一部東京都青梅地区患者であった為の問題もなしとしなかった。

そこで、この点を追求する為、今回は井原地区患者由来 *Mycoplasma* 3 株で抗原を調製し、同地区患者血清につき CF 及び PHA 反応を試みた。

## II 試料及び方法

### 1 患者血清

患者血清はすべて岡山県井原市民病院で定型的 SMON と診断された症例から採取されたものである。

### 2 *Mycoplasma*

抗原の調製に使用した *Mycoplasma* は井原市民病院 SMON 患者舌苔より昭和 45 年 8 月に分離したもので、*Mycoplasma* 寒天培地で継代し、 $-80^{\circ}\text{C}$  に保存したのから、用に臨み寒天平板に分離してから用いた。

### 3 抗原の調製

前報と同様に *Mycoplasma* 寒天平板に培養後菌体を集め、フェノール処理、加熱後、超遠心機で集菌し、超音波処理を行って抗原とした。

### 4 血清反応

#### 1) CF 反応

Kolmer 法に準拠し、Microtiter 法で行った。

#### 2) PHA 反応

羊血球を使用し、 $1:100,000$  タンニン処理、抗原感作を行って感作血球を調製し、希釈患者血清と Microtiter plate で反応させ、管底像で判定した。

## III 結 果

CF、および PHA 反応の結果は表 1 のとおりである。

井原地区SMON患者におけるMycoplasma抗体

表 1

反 応	C F			P H A			反 応	C F			P H A		
	1	2	3	1	2	3		1	2	3	1	2	3
4/21原 ○	-	-	-	-	-	-	○ 林	-	-	-	-	-	-
○ 井	-	-	-	-	-	-	馬 ○	-	-	-	-	-	-
橋 ○	-	-	-	-	-	-	○ 合	-	-	-	-	-	-
○ 井	-	-	-	-	-	-	鈴 ○	-	-	-	-	-	-
河 ○	-	-	-	-	-	-	○ 木	-	-	-	-	-	-
○ 林	-	-	-	-	-	-	花 ○	-	-	-	-	-	-
馬 ○	-	-	-	-	-	-	○ 永	-	-	-	-	-	-
○ 合	-	-	-	-	-	-	○ 辺	-	-	-	-	-	-
鈴 ○	-	-	-	-	-	-	4/22花 ○	-	-	-	-	-	-
○ 木	-	-	-	-	-	-	○ 原	-	-	-	-	-	-
5/9 原 ○	-	-	-	-	-	-	渡 ○	-	-	-	-	-	-
○ 井	-	-	-	-	-	-	○ 本	-	-	-	-	-	-
橋 ○	-	-	-	-	-	-	森 ○	-	-	-	-	-	-
○ 井	-	-	-	-	-	-	对照 425	-	-	-	-	-	-
河 ○	-	-	-	-	-	-	426	-	-	-	-	-	-

CF(-): 1 : 8 以下, PHA(-) 1 : 40 以下

すなわち、井原地区分離 Mycoplasma による抗原を用いても、同地区患者に抗体は見出されなかった。

#### Ⅳ 考 察

S MON 患者舌苔に高率にみられる Mycoplasma と発症との関係を血清学的に検討したが、井原地区患者分離株由来抗原でも患者に抗体は見出されず、この限りにおいては Mycoplasma と本症発症との関係を見出すことはできなかった。Mycoplasma が S MON のようなキノホルム投与例での慢性疾患に単に結果として見出されるのか、更に何らかの関与をしているのかは依然として判然とはしないが、舌苔にこれだけ多量にみられる Mycoplasma に対し、CF、PHA 両法共に全く抗体が見出されなかったことは、少なくとも舌苔由来 Mycoplasma が有意の agent である可能性は少いと思われる。

この研究について、種々御配慮をいただいた東大医科研本間遜教授、井原市民病院岩野郁造、広田滋両博士に感謝する。