

Pleuropneumonia-like organism (PPLO) に関する研究

(第 II 報)

富山県立中央病院検査科
 鮎谷喜兵衛
 前川一郎
 高村孝

(昭和32年10月7日受付)

Studies on Pleuropneumonia-like Organism (PPLO) II Report

KIHEI GORIYA

ICHIRO MAEKAWA

TAKASHI TAKAMURA

Department of Clinical Laboratory, Central Hospital of Toyama Prefecture .

(Director : Dr. Kihei Goriya)

ABSTRACT

We prepared the following media for the cultivation of PPLO and investigated the influences of serums of various animal kinds on the development of PPLO (Human strain, F. No. 32).

The preparation of the medium is as follows : to equal mixture of cattle meat and cattle heart muscle infusion are added Bacto-peptone in 1%, soluble starch in 0.2%, Glucose in 0.5%, Na_2HPO_4 in 0.5%, common salt in 0.3%, agar in 2%, penicillin in 100~200 u/cc and animal serum in 15% (pH 7, 2~7, 6).

Among various kinds of animal serums, the cattle serum was proved to be the best for the growth of PPLO. On this medium the number of colonies was far more, the size larger and the development swifter than those on the media containing other animal serums. No difference was observed in the inner structure.

I. 緒 言

1898年 Nocard 等により牛の pleuropneumonie (牛肺疫)の病原体が発見されて以来、欧米において PPLO に関する研究が多数報告されている。我が国においても 1931年井上及び松本¹⁾²⁾によつて子宮頸管分泌物より bovine pleuropneumonia 病原体類似の微生物が分離せられ、以来諸家³⁾⁴⁾⁵⁾によつて同様の報告が行われている。

私達は腔分泌物より分離した PPLO について多少の知見を得、第29回日本細菌学会で追加⁶⁾、又同学会第10回北陸地方支部会で発表⁷⁾したが、今回は PPLO

の発育形式に対する培地 pH の影響その他に関し若干の知見を得たので報告する。

第1節 実験材料

第1項 使用菌株

私達が富山県立中央病院婦人科外来患者の腔分泌物より分離した PPLO (婦32株)を使用した。

第2項 使用培地

牛肉浸出液と牛心臓浸出液の等量に、バクトペプトン 1%, 可溶性澱粉 0.2%, ブドウ糖 0.5%, 第2磷酸ソーダ (又は第1磷酸カリ) 0.2~0.5%, 食塩 0.3

%, 精製寒天 1.8~2.0%, 以上を混和, pH 7.6 に修正. これに牛血清 (又は馬血清) 10~20%, ペニシリン 100~300u/cc を加える. 液体培地の処方は, 寒天を除いた他は固形培地のそれと同様である.

第2節 実験方法

培地 pH 5.8 (5.8), 6.4 (6.2), 6.8 (6.4), 7.2 (6.8), 7.6 (7.0), 8.0 (7.2), 8.4 (7.6), 9.0 (8.4) の pH の異つた 8 種類の培地を作り, 各々に牛血清 15

%, ペニシリン 200u/cc を加え, 滅菌シャーレに約 25cc 宛分注し 平板培地を作る. 液体培地或いは固形培地に 7~10日培養し滅菌生理食塩水にて一定濃度に稀釈したる PPLO 浮遊液を一滴ずつ上記平板培地に滴下し, コンラヂ棒にて一様に塗抹, 37°C に14日間培養観察した.

(註) () 内の数字は上記培地製造に際し血清を添加した後の最終 pH を示す.

II. 実験成績

第1節 集落の発生数

pH 6.4 から pH 8.4 までの培地では培養第3日目には既に集落の発生が認められたが, pH 5.8 及び pH

9.0 の培地では発育が認められず, 培養第5日目に漸く集落の発生が認められた. しかもその集落数は表1の如く極めて少数である. pH 6.8 から 7.6 までは

表 1 pHによる発育の影響 (集落の発生数)

その 培養 日数	pH								
	5.8 (5.8)	6.4 (6.2)	6.8 (6.4)	7.2 (6.8)	7.6 (7.0)	8.0 (7.2)	8.4 (7.6)	9.0 (8.4)	
1	3日	?	300	400	500	500	400	250	?
	5日	40	800	1000	1000	1000	800	400	25
	7日	110	900	1100	1100	1100	850	700	85
	14日	110	900	1100	1100	1100	850	700	96
2	3日	?	17	22	22	23	20	6	(-)
	5日	4	22	24	24	24	21	9	(-)
	7日	4	22	24	24	24	21	9	(-)
	14日	4	22	24	24	24	21	9	(-)

註 () 内数字は血清及びペニシリンを加えたる後の pH

集落の発生数は多かつた. (表1)

第2節 集落の大きさ

培養第3日目では, pH 6.8 から pH 7.6 までの培地に発生した集落は, 小なるものは直径 0.07mm, 大なるものは 0.23~0.26mm であり, pH 6.4 及び pH

8.0 の培地に発生した集落の直径はやや小さくなり, pH 8.4 の培地に発生した集落の直径は 0.04~0.12 mm であつた. しかし培養日時の経過に従い, pH 9.0 の培地の集落を除いてはその差は殆んど認められなくなつた. (表2)

表 2 pH による発育の影響 (集落の大きさ)

培養 日数	pH			
	5.8~6.0(5.8~6.0)	6.4(6.2)	6.8(6.4)	7.2(6.8)
3日	?	0.05~0.23=100%	0.07~0.23=100%	0.07~0.26=100%
5日	0.2~0.3 = 50%	0.17~0.3 = 30%	0.2~0.3 = 20%	0.2~0.3 = 20%
	0.4~ = 50%	0.31~0.48 = 70%	0.31~0.42 = 80%	0.31~0.48 = 80%
7日	0.37~0.43=100%	0.23~0.3 = 20%	0.26~0.3 = 10%	0.26~0.3 = 10%
		0.31~0.59 = 80%	0.31~0.59 = 90%	0.31~0.51 = 90%
14日	0.76~0.83=100%	0.45~0.96=100%	0.51~0.87=100%	0.51~0.79=100%

pH 培養日数	7.6(7.0)	8.0(7.2)	8.4(7.6)	9.0(8.4~8.6)
3日	0.07~0.23=100%	0.05~0.2 =100%	0.04~0.12=100%	?
5日	0.26~0.3 = 50% 0.31~0.35= 50%	0.22~0.3 = 50% 0.31~0.42= 50%	0.2 ~0.23=100%	0.04~0.12=100%
7日	0.31~0.51=100%	0.26~0.3 = 20% 0.31~0.51= 80%	0.3 ~0.35=100%	0.07~0.25=100%
14日	0.51~0.82=100%	0.45~0.73=100%	0.62~0.76=100%	0.2 ~0.55=100%

註 () 内数字は血清及びペニシリンを加えた後の pH. 集落の直径は mm で表わす.

第3節 集落の形態学的変化

各種 pH における集落の形態については、大きさにおいて多少の差を認める他、著しい差異は認められなかつた。

その形態は乳房状で中央部は隆起し、寒天の中に深く入りこんでいる。透過光線で鏡検すれば、比較的明るい透明乃至半透明な外側の円形部分と、中央部は密で不透明な暗い 0.05~0.01mm の円形部分の境界明確な二重の円が明らかに見られる(写真1)。

これらの集落の辺縁部には L 型菌産生の際に見られるような大形体 (large body) 様のもが見られるも

のもあつた(写真2, 8)。

又、その集落につき捺印標本を作り、アルコール・ホルマリン等量液或いはメチールアルコールで固定、チール氏石炭酸加フクシン液或いはギームザ液で染色、鏡検すると、もやもやした塊の中に、大小の染らない円形状の空胞体が見られる(写真4)。

第4節 牛血清加培地と馬血清加培地の培養成績比較

当地にて馬血清の入手困難なため、比較的入手しやすい牛血清を用いて両者の培養成績を比較検討した。

第3表に示す如く、馬血清を加えた培地より血清を

表 3 牛血清加培地と馬血清加培地の比較(集落数及び集落の大きさ)

代	血清 日数	牛血清	馬血清		
四代	4日	560個	200個		
六代	4日	400個	200個		
	10日	450個	270個		
七代	3日	160個	30個位?		
	5日	500個	110個		
	14日	600個	200個		
代	血清 日数	牛 血 清		馬 血 清	
十代	3日	110個	0.07~0.1 =20% 0.11~0.3 =80%	70個	0.05~0.1 =40% 0.11~0.26=60%
	5日	115個	0.26~0.3 =40% 0.31~0.41=60%	72個	0.2 ~0.3 =60% 0.31~0.36=40%
	14日	120個	0.4 ~0.5 =40% 0.51~0.8 =60%	75個	0.37~0.5 =50% 0.51~0.7 =50%
十三代	3日	440個	0.2迄 30% 0.3迄 70%	300個	0.2 迄 70% 0.26迄 30%
	5日	520個	0.24~0.4 =60% 0.41~0.5 =40%	380個	0.2 ~0.4 =70% 0.41~0.44=30%
	14日	530個	0.31~0.4 =15% 0.41~0.7 =85%	410個	0.31~0.4 =20% 0.41~0.64=80%

註 集落の直径は mm で表わす。

加えた培地が優秀な成績を示した。培地は上述せるものを使用し pH を 7.6 に修正した。培養方法は第2章第2節に記載した方法によつた。

培養第3日目には、牛血清加培地では既に肉眼的に集落の発生が認められ、その発生集落数も多かつたが、馬血清加培地では前者よりも集落発生数が少なく、又集落数大きさも比較的小さかつた。しかし7日、10日と培養日数が延引するに従い、両者培地における集落の大きさは大差を認めなくなつた。

即ち牛血清を加えた培地では、短時日の培養で PPLO 集落の急速な発育が認められるが、馬血清を加えた培地では PPLO 集落が徐々に発育してくるのを認め、培養日時が延引するに従い集落数並びに大きさに大差を認めなくなつてくる。

第5節 液体培地における PPLO の形態について

上に述べた固形培地から寒天を除いた培地を pH 7.6 に修正し、これに牛血清15%、ペニシリン 100~

鮎谷・前川・高村論文附図 (1)



写真 1

7 日 96 ×

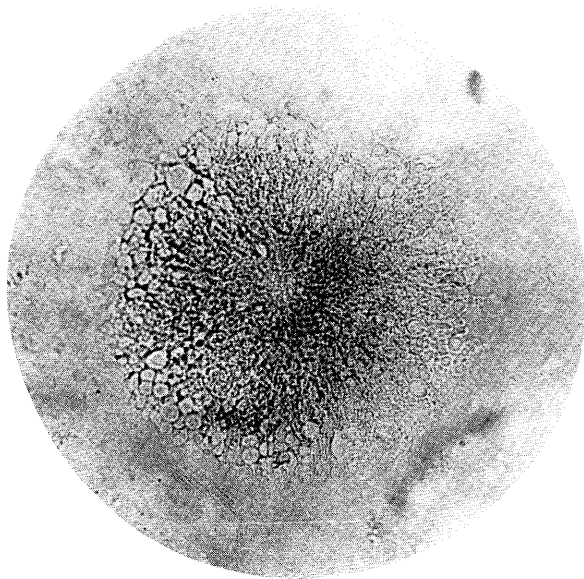


写真 2

3 日 115 ×

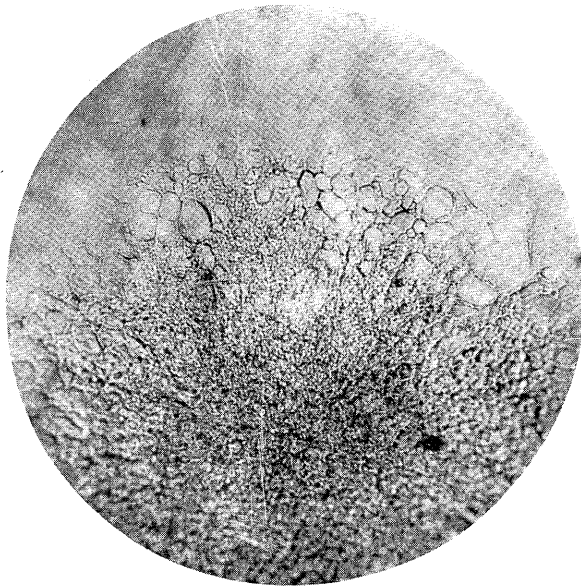


写真 3

5 日 192×

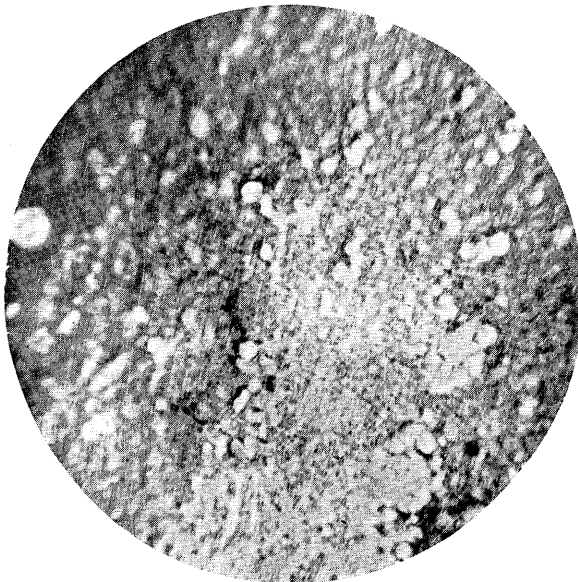


写真 4

5 日 960× ギムザー染色

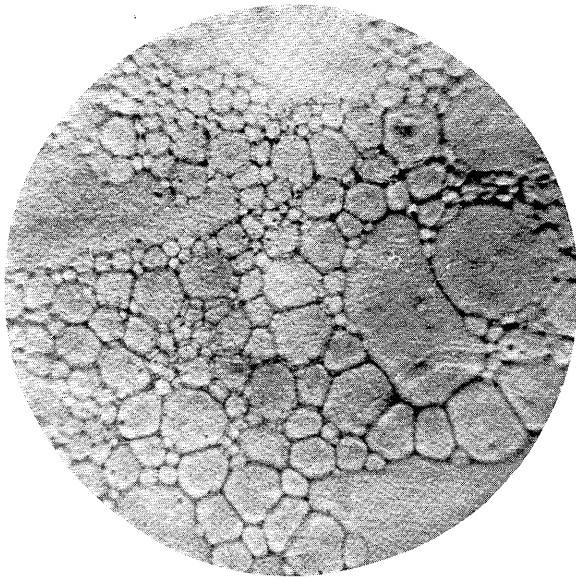


写真 5

3日 960× チール染色. 位相差顕微鏡

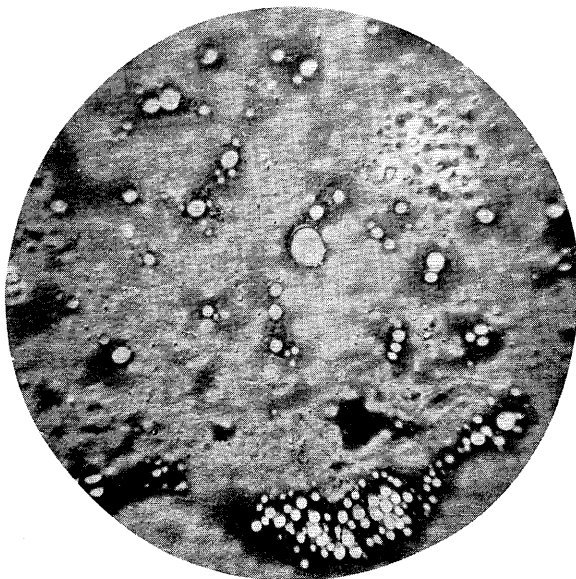


写真 6

14日 960× チール染色. 位相差顕微鏡

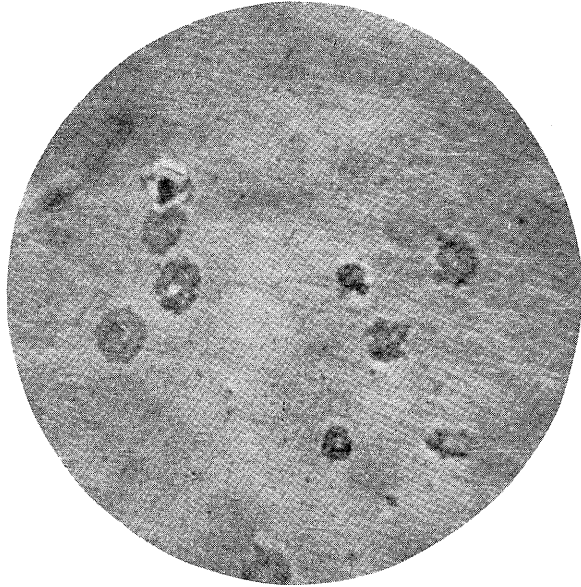


写真 7

21日 1320× 位相差顕微鏡

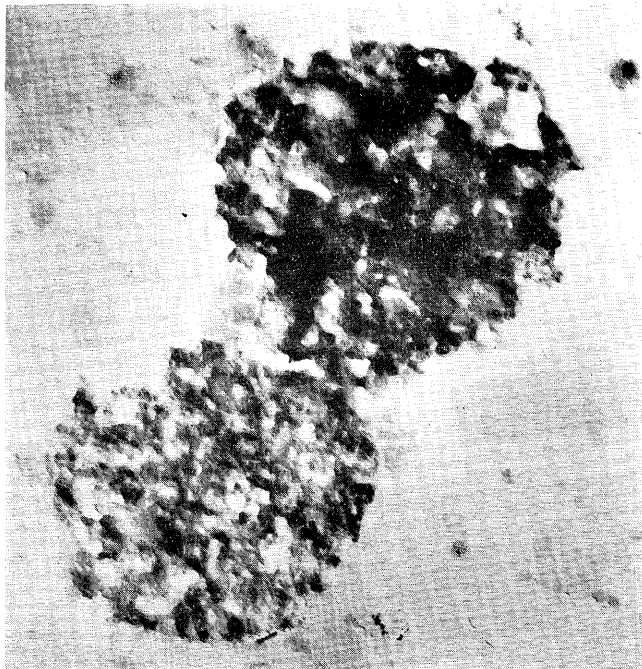


写真 8

21日 9000× 電子顕微鏡

300u/cc を加え、中試験管に 5cc 宛分注する。

先に平板培地に発生した PPLO の集落をかき取って上記液体培地に移植するか、或いは一定期間液体培地に継代培養したものを毎分 16000 廻転 20 分間遠心し、その沈澱物を同様にして 3 回遠心、沈澱、洗滌した後、その沈澱物を載せガラスに塗抹、標本を作製、位相差顕微鏡で観察した。又この標本を空温乾燥後、上述固定液で固定し、チール氏石炭酸加フクシン液或いはギームザ液で染色して普通光学顕微鏡で観察、その一部を又電子顕微鏡で観察した。

上記標本を位相差顕微鏡及び普通光学顕微鏡で観察すると、微細な小体からそれより大なる小球状体、環

状体、直径数 μ に達する円板状管等多種多様な像が見られる。

特に培養日数の短かいものでは、位相差顕微鏡で観察すると、ガラス様の滑沢性を帯びた大きなもの、又その染色標本を見ると染らない大きなものが多く見られる(写真 5)。

培養日数の長いものでは、球状体の中に極微細な小体が見られて粗なるものが多数見られた(写真 6, 7)。

培養日数の長いものについて電子顕微鏡で観察すると、球状体と思われるものの中に多くの極微細な小体が見られる(写真 5)。

IV. 結

1) 各種 pH の差異による PPLO 集落発生に対する影響につき観察するに、その至適 pH は 7.0 から 7.6 の間と考える。

2) 各種 pH の差異による集落形態の相異については、大きさにおける差異は多少認められるが、そのほかは殆んど著しく差異は認められなかつた。

3) 牛血清加培地と馬血清加培地を比較検討すると、前者では集落の発生が早く、かつ集落数も多数認められ、後者に比して極めて優秀な成績が得られた。

4) その他固形培地の集落辺縁部に見られる大形体

論

(large body) 様のものと、液体培地上に見られる大球状体は同一なものと思われる。

L 型菌産生の際にもこれと同様なものが観察された。

5) 大形体 (large body) 様のものの発生状態、形その他については未だ不明であり、今後の研究にまつと共に極めて興味深い問題である。

執筆するに臨み、恩師谷教授の御懇篤なる御指導並びに御校閲に対し深く感謝します。

文

- 1) 井上・松本：北海道医誌，9，480，1931.
- 2) 井上：中医誌，9，1069，1940.
- 3) 井上：大阪医誌，39，1795，1940.
- 4) 医学のあゆみ，21，2：101，1956.

献

- 5) 本間：医学のあゆみ，14，2：95，1952.
- 6) 鯨谷：日本細菌学雑誌，11，7：610，1956.
- 7) 鯨谷・前川・高村：日本細菌学会雑誌，12，1：68，1957.