

マイコプラズマの培養条件の検討
— 発育阻止反応の応用 —

山口県衛生公害研究センター (所長：田中一成)

中尾 利器・若月 貞子・松村 健道・板垣 国昭・岩崎 明
岡田 雅裕Some Parameters of Mycoplasma Cultivation by Growth
Inhibition TestToshiki NAKAO, Sadako WAKATSUKI, Kendo MATSUMURA,
Kuniaki ITAGAKI, Akira IWASAKI, Masahiro OKADA

Yamaguchi Prefectural Research Institute of Health (Director: Dr. Kazushige TANAKA)

はじめに

マイコプラズマの同定法の中で、口紙ディスクを用いた発育阻止反応 (GI test)^{1~3)} は、種特異性を有する確実な血清学的同定法としてよく用いられている。

GI testでは、抗血清の力価を一定とすると、その阻止円の直径は培養細胞数に影響を受けるとされている⁴⁾。

このことは、発育コロニー数が何らかの要因により影響を受けると阻止円の径が変動することを示唆し、GI testの径は培養条件を反映し、コロニーの発育に影響を与えている要因を解析することが可能と考えられる。例えば、ある要因の変動により阻止

円の径が拡大するということは、当該要因がコロニーの発育に抑制的に作用したものと考えられる。このような観点から、培養シャーレの設置方法、発育状況把握のため液体培地によく添加されるグルコース (Glucose) およびアルギニン (Arginine) の添加等の影響について、GI testを応用して検討した。なお、コロニーの発育程度についても併せて観察した。

材料と方法

供試マイコプラズマ株

供試した株は、久留米大学医学部・中村昌弘教授 (現・名誉教授) より分与された5種で、ヒトを

表1 供試マイコプラズマ株

Mycoplasma (略称)	生化学的性状	
	グルコース分解性	アルギニン分解性
<i>M. pneumoniae</i> (M.p)	+	-
<i>M. salivarium</i> (M.s)	-	+
<i>M. orale</i> (M.o)	-	+
<i>M. hominis</i> (M.h)	-	+
<i>M. fermentans</i> (M.f)	+	+

宿主とし、その生化学的性状を表1に示した。なお、各株は当所にて3~4代継代し、 -80°C で凍結保存していたものである。

培地

一般によく用いられているChanockらのPPLO寒天培地^{5,6)}を用い、馬血清は 56°C 30分間非働化したものを添加した。グルコース分解性の*M.p*および*M.f*の培地には馬血清を20% (V/V) 加え、グルコースを無添加~1% (V/V) 添加したものを調製した。アルギニン分解性の*M.s*, *M.o*, *M.h*および*M.f*の培地には馬血清を10% (V/V) 加え、アルギニンを無添加~1% (V/V) 添加したものを調製した。なお、グルコースおよびアルギニンの最大添加量1%は、PPLO液体培地には通常よく用いられている量である。調製した培地は、ビニール袋に入れて密封し 10°C 以下に保管した。

GI test

培地の使用に臨んで、約2時間ふらん室内でフタをとり培地表面を乾かした。供試した5株は共に接種細胞数を $10^6/\text{ml}$ 濃度に調整し、その 0.2ml を培地表面に滴下してコンラージ棒で全面に塗抹した。表面が乾いた後、ろ紙製のPaper disc (8mm径、薄型、東洋製作所 Co.,LTD.) に、家兎を免疫して作製した抗血清 $25\mu\text{l}$ を浸透させたものを置き、湿箱中で好気性培養 (37°C) した。阻止円の測定は、沈降輪の直径測定に通常使用される定規⁷⁾を自製し、 0.1mm まで測定した。測定は3方向から行ない、平均値を求めた。

1 培養方法の違いによる影響の検討

1) シャーレの設置方法による影響、および2) グルコースまたはアルギニンの添加・無添加の影響をみるため、グルコースまたはアルギニンを1%添加したものと無添加のものについて、各々以下の3条件で培養を行ないGI testを実施した。

培養当初は培地面を上(正置)にして一夜培養した後、

- ① 正置のまま継続して培養
- ② 2日目に、上下反対(倒置)にして培養
- ③ 4日間正置の後、5日目に倒置して培養

を行った。

なお、GI testは各株共1シャーレ3回ずつ、2枚のシャーレの計6回実施した。シャーレの設置方法は図1に示したとおりである。

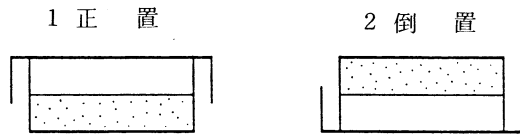


図1 培養シャーレの設置方法

2 グルコースおよびアルギニンの最適添加量の検討

最適な添加量を検討するため、*M.p*についてはグルコース、*M.f*についてはグルコースおよびアルギニン、その他の*M.s*, *M.o*, *M.h*についてはアルギニンの各添加濃度 [0%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1% (V/V)] の培地を用いてGI testを実施し、その阻止円径を測定した。実施方法は1に準じて行ったが、シャーレの設置方法は正置のみとした。

3 コロニーの発育度

1の実験に供したシャーレを用いてコロニーの発育度の観察を行った。また、阻止円の周縁の肉眼的明瞭度についても観察を行った。

結 果

1 培養方法の違いによる影響

GI testの発育阻止円の直径について、その平均値および標準偏差を、図2、図3に示した。

1) 設置方法の違いによる影響

グルコースまたはアルギニンを添加した場合も添加しなかった場合も、設置方法の違いによる特異的な影響は認められなかった。

2) グルコースまたはアルギニン添加の影響

① 正置の場合

*M. p*および*M. f*共に無添加よりもグルコース添加の方が阻止円が大きかった。*M. s*, *M. o*, *M. h*では、無添加よりもアルギニン添加した方が阻止円が大きかった。

② 倒置 (2日目) の場合

①と同様の結果であった。

③ 倒置 (5日目) の場合

*M. p*では、グルコース添加と無添加でほとんど差は認められなかった。他は①と同様の結果であった。

以上のように、*M. p*の倒置 (5日目) の場合を

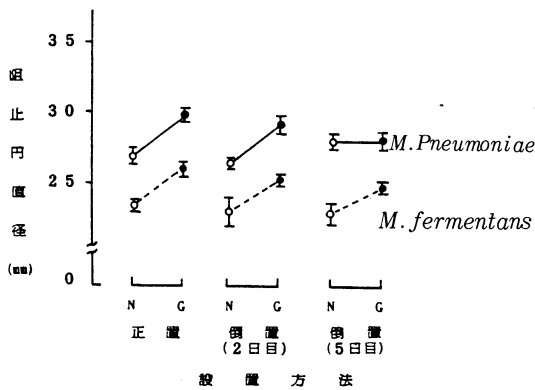


図2 各設置条件におけるグルコース添加の影響

N (○) : 無添加, G (●) : グルコース添加

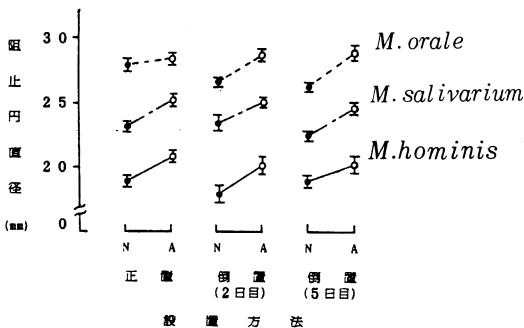


図3 各設置条件におけるアルギニン添加の影響

N (○) : 無添加, A (●) : アルギニン添加

除き、グルコースまたはアルギニンを添加した方が無添加に比べて阻止円が大きであった。

2 グルコースおよびアルギニンの最適添加量の検討

グルコースおよびアルギニンの各添加濃度における阻止円径の平均値並びに標準偏差について、各々図4、図5に示した。

1) *M. f*のアルギニン添加の場合を除いて、全てグルコースまたはアルギニンの添加濃度が上昇す

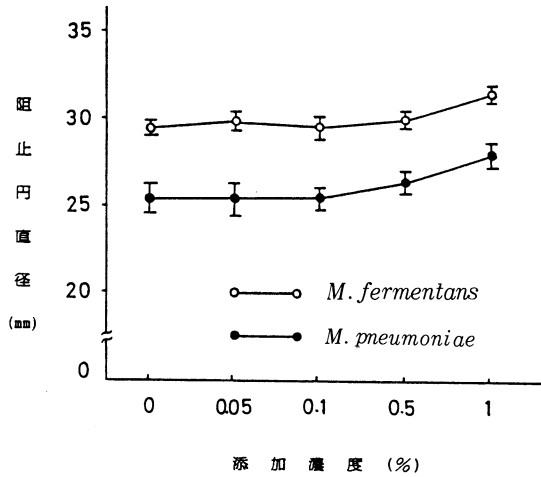


図4 グルコース添加と発育阻止反応

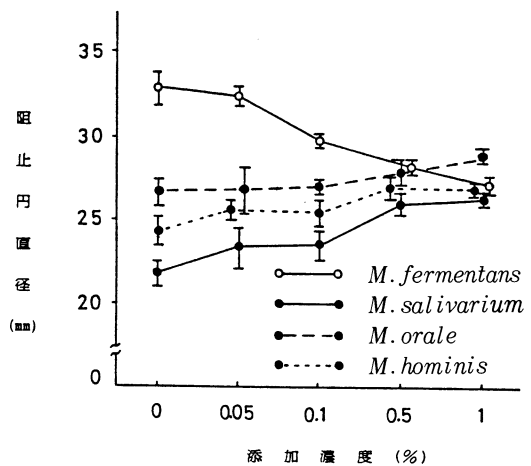


図5 アルギニン添加と発育阻止反応

るにつれて阻止円径が拡大する傾向を示した。

2) *M. f.*のアルギニンの添加の場合には逆に、アルギニンの添加濃度が上昇するにつれて阻止円径は縮小した。

3) 阻止円径に比較的影響が少なかったのは、グルコースおよびアルギニン共に0.1%までであった。

3 コロニーの発育度

培養法別コロニーの発育度は表2のとおりであり、良好なものから不良なものまでⅢ～Ⅹの3段階で示した。

*M. p.*では、グルコース添加したものはコロニーの発育が良くなく、とくに境界部周縁において不良で、肉眼的明瞭度に欠けるものであった。*M. f.*では、肉眼所見上グルコース添加および無添加でコロニーの発育度に差は認められず、周縁の明瞭度に差はみられなかった。*M. s.*, *M. o.*, *M. h.*は、アルギニ

ン添加と無添加でコロニー発育度に大きな差はみられなかったが、周縁の明瞭度ではアルギニン添加の方が優れていた。なお、周縁部に乳白色の環(2~3 mm幅)が*M. s.*と*M. h.*の大部分(11/12)に、また*M. o.*の一部(1/6)に認められた。

考 察

設置方法の違いによる影響について中村ら⁸⁾は、ヒトを宿主とする6種のマイコプラズマの中で、*M. p.*と*M. o.*以外のものは正置培養をした方が発育コロニー数が多く認められたと報告している。そして、正置培養よりも倒置培養を行った方が生細胞数は低く出る傾向があるが、安定した結果が得られるとしている。そこで著者らは、シャーレの設置方法を変更することにより、GI testが発育コロニー数に影響を受けてその阻止円径が変化すると考え、

表2 コロニー発育度の相違

供 試 株	正 置		倒置(2日目)		倒置(5日目)	
	無添加	添 加	無添加	添 加	無添加	添 加
	<i>M. pneumoniae</i>	+++	++	+++	++	++
<i>M. salivarium</i>	+++	(+++)	+++	[+++]	+++	[+++]
<i>M. orale</i>	+++	++	+++	++	+++	(+++)
<i>M. hominis</i>	+++	[+++]	+++	[+++]	+++	[+++]
<i>M. fermentans</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++

[] : 全て白濁環を生じたもの。 () : 一部白濁環を生じたもの。

Glucose 添加: *M. pneumoniae*, *M. fermentans*

Arginine 添加: *M. salivarium*, *M. orale*, *M. hominis*

各種条件における阻止円径を測定した。しかし、正置・倒置いずれの場合も阻止円径に明確な影響を与えているとは認められず、GI testからみた限りどちらの方法で培養しても発育には影響しなかった。

グルコースおよびアルギニン添加の影響については一部の例外を除き、グルコースまたはアルギニンを添加したもののほうが発育阻止円の径が大きく、これらの添加はコロニーの発育に抑制的に作用するものと推察された。

M.s, *M.o*, *M.h*では、1%濃度のアルギニン添加、*M.p*, *M.f*では1%濃度のグルコース添加により発育が抑制されることが明かになった。アルギニンの0.4%~1%濃度の添加はグルコース分解性マイコプラズマの発育を抑制するとの指摘もあるが⁹⁾、今回の成績はグルコースまたはアルギニン分解性マイコプラズマにとって本来分解性は有するものの従来の添加濃度(1%)で発育に抑制的であることを示した。グルコースおよびアルギニンの発育抑制作用は、液体培地でも同様に存在するものと考えられ、とくに生細胞数の少ない初代分離培養では相当大きな発育抑制因子となっている可能性がある。*M.p*の倒置培養(5日目)において、グルコース添加の影響が明確には認められなかったが、原因は不明である。*M.p*は供試株の中で最も発育速度が緩慢であり、これが何らかの遠因になっている可能性もある。

グルコースおよびアルギニンの最適添加量を検討することにより、*M.f*のアルギニン添加の場合を除き、全て添加量の少ない程発育阻止径が小さくなることが分かった。

このことから、グルコースおよびアルギニンの過度の添加がこれらのマイコプラズマの発育に抑制的に作用していることが明らかであり、出来るだけ添加は避けた方がよいと思われる。また、液体培養において増殖程度を把握するにはこれらの添加が必要となるが、その場合でも可能な限り低濃度とすることが望ましい。この5株の最適添加量を一律に求めることは困難であるが、0.1%が比較的影響が

少ない濃度と考えられる。*M.f*のアルギニン添加の場合では、添加濃度の上昇につれて阻止円径は縮小し、*M.f*がアルギニンの添加により発育が助長されることを示した。この点、他のマイコプラズマ種に比べて特徴的であった。また、このことは、必ずしもグルコース分解性マイコプラズマが高濃度のアルギニン添加により発育が抑制される⁹⁾とは限らないことを示すものである。

アルギニン分解性のマイコプラズマでは、無添加よりもアルギニン添加したもののほうが阻止円の周縁は明瞭で発育阻止円が大きかったが、これはアルギニンの添加により特に阻止円の境界線のコロニーの発育が抑制されたためと考えられる。*M.p*では、グルコース添加したものより無添加の方がコロニーの発育がよく、グルコースの添加は発育に抑制的であると考えられた。*M.f*では、グルコース添加のほうが阻止円径は大きかったものの、コロニー発育度の差は肉眼的には認められなかった。これらのことから、原則として、グルコースおよびアルギニンの添加はしない方がよいという結果を得た。アルギニン分解性マイコプラズマでは、阻止円周縁に乳白色の環がみられたが、これはフィルム・スポット産生と類似した機序により¹⁰⁾、リパーゼ等のマイコプラズマ代謝産物と抗血清とが反応して生成したものと考えられる。

以上のように、GI testを用いることにより、マイコプラズマの培養条件に影響を与える要因のいくつかを明らかにすることが出来た。この方法は、マイコプラズマの培養における他の諸要因の解析をはじめ、ウレアプラズマにおけるウレア添加濃度の検討等に応用可能と考えられる。

まとめ

- 1 マイコプラズマの培養におけるシャーレの設置方法は、発育阻止反応からみる限り、正置・倒置どちらでも発育に影響はなかった。
- 2 培地へのグルコースの過度の添加は、

*M. pneumoniae*および*M. fermentans*の発育に抑制的に作用することが明らかになった。

3 培地へのアルギニンの過度の添加は、*M. salivarium*, *M. orale*, *M. hominis*の発育に抑制的に作用することが明らかになった。

4 *M. fermentans*は、アルギニンの添加により発育が助長され、他のマイコプラズマとは異った性質を示した。

5 培地へのグルコース、アルギニンの添加濃度は必要最小限に止めるべきで、0.1%が適当と考えられた。

本論文執筆にあたり、懇切丁寧な御指導を賜りました所長・田中一成博士、生物学部長・遠藤隆二博士並びに山口大学医学部微生物学教室・中澤晶子教授、小西久典助教授に深甚の謝意を表します。

文 献

1) Clyde, W. A. Jr. : J. Immunol. 92,

958~965 (1964)

2) 富山哲雄 : 臨床検査. 19, 11 (1980)

3) Stanbridge, E., Hayflick, L. : J. Bacteriol. 93, 1392~1396 (1967)

4) 佐々木正五 : マイコプラズマ図説. 東京, 東海大学出版会, 1980, p.36.

5) Chanock, R. M. et al. : Proc. Nat. Acad. Sci. 48, 41~48 (1962)

6) 佐々木正五ら : マイコプラズマ. 東京, 講談社, 1977, p.154~156.

7) 松橋直ら : 免疫学実験入門. 東京, 学会出版センター, 1985, p.98.

8) 中村昌弘, 松岡康恵 : 臨床検査. 16, 415~419 (1972)

9) 中村昌弘ら : ヒト・動物および植物マイコプラズマの分離と同定. 東京, 菜根出版, 1982, p. 9.

10) 市丸弘子ら : 日本細菌学雑誌. 34, 853~859 (1979)