

野生ホンダヌキ (*Nyctereutes procyonoides viverrinus*) からのウレアプラズマ分離と分離株の性状

輿水 馨・長嶺 ゆり

(家畜微生物学教室)

平成6年8月10日受理

Isolation of *Ureaplasma* Strains from Wild Raccoon Dogs (*Nyctereutes procyonoides viverrinus*) and Characterization of the Isolated Ones

Kaoru KOSHIMIZU and Yuri NAGAMINE

(Laboratory of Veterinary Microbiology)

緒 言

ウレアプラズマ属 (Genus *Ureaplasma*) はマイコプラズマ科 (Family *Mycoplasmataceae*) の中で尿素を分解する一群の無細胞壁原核生物である。本菌は1954年, M. C. Shepard¹²⁾ によってヒトの非淋菌性尿道炎から初めて分離されたが, その後各種の哺乳動物および鳥類からの分離が相次いで報告された⁸⁾。

これらのウレアプラズマのうち, その性状が詳細に調べられた結果, 種として命名されているものは, ヒト由来の *Ureaplasma urealyticum*¹³⁾, ウシ由来の *U. diversum*⁴⁾, ニワトリ由来の *U. gallorale*⁹⁾, ネコ由来の *U. felinum*²⁾ および *U. cati*²⁾, イヌ由来の *U. canigenitalium*³⁾ の6種に過ぎず, 自然界におけるウレアプラズマの生態, 分類, 病原性などに関しては不明の点が多い。今回, 鹿児島県下で捕獲された野生タヌキについてウレアプラズマを検索する機会があったので, その分離状況と分離株の生物学的・血清学的性状について報告する。

材 料 と 方 法

1. 検索動物

ウレアプラズマの検索を試みた動物は野生のホンダヌキ (*Nyctereutes procyonoides viverrinus*) で, 鹿児島大学農学部入来牧場および鹿児島市平川動物公園の周辺で捕獲された外見的に健康な雄3匹, 雌2匹である。

2. 実験に供した参照株

イヌ由来 *Ureaplasma canigenitalium* の4つの血清

型⁹⁾; D1M-C, D29M, D11N-A および D6P-C, ネコ由来 *U. felinum* FT2-B, ニワトリ由来 *U. gallorale* D6-1, およびヒト由来 *U. urealyticum* T960の諸株は, 東京大学医学部の原沢亮博士より分与を賜った。これらの参照株のほか, 今回著者等が新たに分離したネコ由来ウレアプラズマの FU1-Or および FU2-Or の2株も含まれる。

3. 分離培地

ウレアプラズマの分離には変法 Taylor-Robinson 培地¹⁵⁾ (T-broth) を使用した。その基本成分は PPLO-broth (Difco) 2.1 g, 馬血清 20 ml, 25% イーストエキス溶液 (日甜) 10 ml, 10% 尿素液 1 ml, ペニシリン G カリウム (10万単位/ml) 1 ml, 2.5% 酢酸タリウム液 0.5 ml, 0.4% フェノールレッド溶液 1 ml, 蒸留水 70 ml で, pH 6.0 ± 0.2 に調整した。

初代分離時には, 一般マイコプラズマの増殖を抑制するため, T-broth に 500 μg/ml リンコマイシンを 1 ml 添加した⁷⁾。固形培地 (T-agar) には上記 T-broth に Purified agar (Oxoid) を 0.9 g およびリン酸緩衝液 (1.5M KH₂PO₄ 液と 1.5M Na₂HPO₄ 液を 7:3 の割合に混合) を 2.5 ml 加えて用いた¹⁶⁾。

4. ウレアプラズマの分離方法

タヌキの口腔, 鼻腔, 気管, 尿道(♂)および膣の粘液を滅菌綿棒で拭いとり T-broth によく浸出し, これを 10⁻³ まで 10 倍段階希釈し 37°C で培養した。培養中に培地の色調が黄色 (pH 6.0) から桃色 (pH 6.8~7.0) に変化した時点でその培養液をさらに 10 倍段階希釈して, その各段階の 1 滴を

T-agar 上にスポットした。接種した T-agar は嫌気培養ジャーに入れ、湿度を保ち炭酸ガス 5% と窒素ガス 95% の条件下において 37°C 2~3 日間培養後、ウレアプラズマ特有の微小集落の有無を実体顕微鏡により検索した。

5. 分離株のクローニング

T-agar 上の単個集落を注射針の先端で寒天ブロックごと切り取り、T-broth 中でよく碎いて混合した後 37°C で培養した。培地の色調の赤変により増殖を確認したら、その 10 倍段階希釈液を T-agar 上にスポットし、再び 37°C で数日間培養して集落を形成させた。この過程を 3 回繰返し、最後の培養液をクローニング株として -60°C に凍結保存した。

6. 生物学的性状検査

1) L 型菌との鑑別

各菌株を抗菌剤無添加の T-broth で 3 回継代し、各継代ごとに抗菌剤無添加の T-agar 上に集落を形成させ、細菌の集落型に復帰していないことを確認した。

2) 血清要求性

馬血清無添加の T-broth に各菌株を 3 回継代し、継代ごとに馬血清無添加の T-agar に接種して集落の発生が認められないとき血清要求性があるものと判定した。

3) 尿素分解性

T-broth に菌株を接種して 37°C で 2 日間培養し、培地の色調が黄色から赤色に変化した場合陽性と判定した。

4) ブドウ糖およびアルギニンの分解性

T-broth の馬血清の代わりにマイコプラズマ血清分画 (北研) を処方に従って蒸留水 15ml で溶解した液を加え、さらにブドウ糖を 0.5% の割合に添加した培地 (pH 7.6)、あるいは L-アルギンを 0.2% に添加した培地 (pH 7.0) のそれぞれに菌株を接種した。37°C で 7 日間培養を続け、培地の色調の変化がなければ陰性と判定した。

5) ミリポア濾過性

T-broth で 1 晩培養した菌液を 0.8 μm 、0.45 μm 、0.22 μm の各ポアサイズのメンブラン・フィルターで濾過し、その濾過前後の菌量を測定し、Color changing units (CCU)/ml で比較した。

7. 液体培地における増殖

各菌株の T-broth における増殖態度を増殖曲線を描き比較した。各菌株の $10^1 \sim 10^3$ CCU / 0.2ml を T-broth に接種して 37°C で培養し、6 時間ごと

に 10 倍段階希釈して CCU / 0.2ml を測定した。各菌株ごと 3 本の試験管に接種してその平均値をグラフ上にプロットした。

8. 血清学的性状検査

1) 免疫血清の作製

ウレアプラズマ菌株を 1 株当たり 3 l の T-broth に接種し 37°C で培養した菌液を 9,000 rpm 30 分間遠沈した。その沈渣を PBS に浮遊させ再び遠沈し、この操作を計 3 回繰返し最終の沈渣を 30ml の PBS に浮遊させ免疫用抗原とした。日本白色種のウサギ (雄、約 3 kg) を用い、抗原と Freund の完全アジュバント (Difco) の等量混合乳液剤 1 ml を皮下 0.5ml と筋肉 0.5ml に分けて 3 日間隔で 5 回接種し、その 14 日後から抗原液のみを 1 ml、1 ml、2 ml、2 ml、3 ml ずつ 3 日間隔で耳静脈内に接種した。最終の注射後 10 日目に試血し、十分な抗体価があれば心臓より採血して血清を分離し、-30°C に凍結保存した。

2) 代謝阻止試験

菌株の血清学的性状は代謝阻止試験により調べた。これは抗血清を加えた T-broth でウレアプラズマを培養すると、抗血清がウレアプラズマによる尿素的代謝 (ウレアーゼ活性) を抑制する結果、培地の色調変化 (黄色から赤色) が阻止されることを利用したもので、Purcell¹¹⁾らの方法に準じ、マイクロタイター・プレートを用いて行った。

結 果

1. 分離成績

入来牧場および平川動物公園周辺で捕獲されたホンドタヌキ (*Nyctereutes procyonoides viverrinus*) 雄 3 匹、雌 2 匹から Table 1 に示すように口腔 (4/5)、鼻腔 (2/4)、気管 (2/4)、尿道 (♂) (1/2) からウレアプラズマが分離された。しかし膈は 2 匹とも陰性であった。これらのウレアプラズマからクローニングによって得られた 9 株について各種性状を調べて同定した。

2. 生物学的性状

タヌキ由来代表株 RU 1-Or および各種動物由来参照株は Table 2 に示すように、いずれの株も細菌への復帰は認められず、血清要求性があり、尿素を 18 時間以内に強く分解したが、ブドウ糖およびアルギニンの分解は認められなかった。これらのウレアプラズマは T-agar 上に直径 30~60 μm の微小な集落を形成した (Fig. 1)。

Table 1. Isolation of ureaplasmas from the various sites of raccoon dogs

Raccoon dog	Sex	Captured place	Oral cavity	Nasal cavity	Trachea	Urethra (♂)	Vagina
R-1	♂	A	+	ND	ND	ND	ND
R-2	♀	B	-	-	+	ND	-
R-3	♂	A	+	+	-	-	ND
R-4	♀	A	+	+	-	ND	-
R-5	♂	B	+	-	+	+	ND
Total 5	(♂3 ♀2)		4/5	2/4	2/4	1/2	0/2

A : Iriki Livestock Farm, Faculty of Agriculture, Kagoshima University

B : Hirakawa Zoological Park, Kagoshima

Table 2. Biochemical characteristics of ureaplasma strains isolated from raccoon dogs and other animals

Ureaplasma strain	Origin	Reversion to bacteria	Serum requirement	Urea hydrolysis	Glucose fermentation	Arginine hydrolysis
<i>Ureaplasma</i> sp. RU1-Or	Raccoon dog	-	+	+	-	-
<i>U. canigenitalium</i> D1M-C	Dog	-	+	+	-	-
<i>U. felinum</i> FT2-B	Cat	-	+	+	-	-
<i>U. gallorale</i> D6-1	Chicken	-	+	+	-	-
<i>U. urealyticum</i> T960	Human	-	+	+	-	-

Table 3. Filtrability of ureaplasma strains through different pore sizes of membrane filter

Ureaplasma		Original culture	Pore size (μ m) of membrane filter		
Origin	Strain		0.22	0.45	0.8
Raccoon dog	RU1-Or	10^7 *	0	10^4	10^6
Dog	D1M-C	10^6 *	0	10^3	10^5
Cat	FT2-B	10^7 *	0	10^6	10^7
Chicken	D6-1	10^5 *	0	10^3	10^4
Human	T960	10^7 *	0	10^5	10^7

* : CCU/ml

タヌキ由来分離株および各種動物由来参照株のミリポア濾過性は Table 3 に示すようにポアサイズ $0.8 \mu\text{m}$ および $0.45 \mu\text{m}$ をある程度通過するが、 $0.22 \mu\text{m}$ のポアサイズは全く通過しなかった。

3. 液体培地における増殖

T-broth における増殖は Fig. 2 にみられるように、菌株によって多少の相異はあるが、接種後18時間に最高菌量 $10^6 \sim 10^7$ CCU/0.2ml に達し、以後急速に減数し、36時間後にはヒト由来 T960 株を除き生菌数は全く測定されなかった。

4. 血清学的性状

タヌキ由来9株の血清学的性状は Table 4 に示すように、代表株 RU1-Or の家兔免疫血清によって640~5120倍まで代謝が阻止され、しかもイヌ由来 *U. canigenitalium* の1血清型である D1M-C 株の抗血清によっても80~1280倍まで代謝が阻止された。逆にイヌ由来 D1M-C 株はタヌキ由来 RU1-Or 株の抗血清により160倍で代謝阻止が認められた。一方、タヌキ由来株はイヌ由来 *U. canigenitalium* の他の血清型すなわち D29M, D11N-A, D6P-C のいずれ

に対する抗血清によっても代謝阻止は認められず、さらにネコ由来 *U. felinum* FT2-B, ニワトリ由来 *U. gallorale* D6-1 およびヒト由来 *U. urealyticum* T960 に対する抗血清により全く代謝阻止を受けなかった。これらのことにより、タヌキ由来ウレアプラズマ株はイヌ由来 *U. canigenitalium* の1血清型と類似した抗原性を持つことが明らかにされた。



Fig. 1. Ureaplasma colony of strain RU1-Or isolated from a raccoon dog. Bar indicates 100 μ m

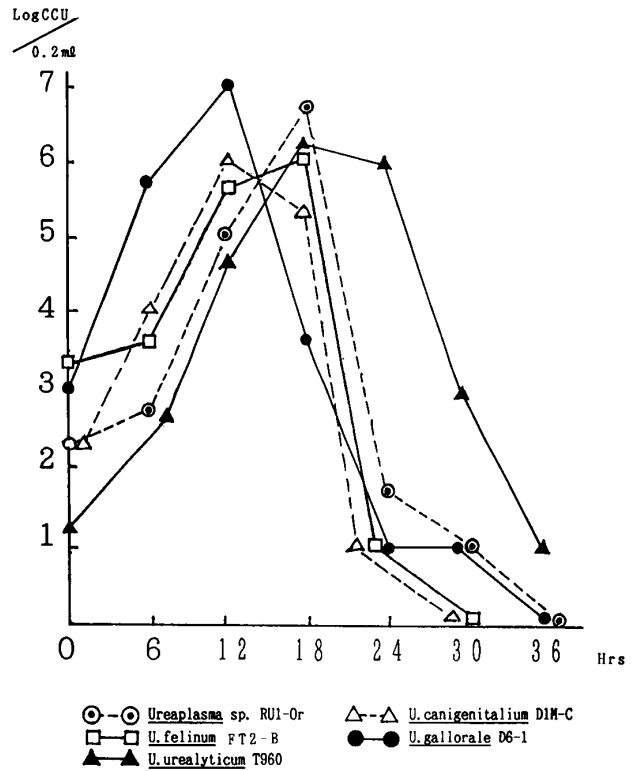


Fig. 2. Growth curves of ureaplasma strains at 37°C in T-broth

Table 4. Comparison of serological characteristics between ureaplasma strains isolated from raccoon dogs and those from various animal species determined by the metabolism inhibition test

Ureaplasma	Antiserum Strain	Raccoon dog		Dog			Cat	Chicken	Human
		RU1-Or	D1M-C	D29M	D11N-A	D6P-C	FT2-B	D6-1	T960
<i>Ureaplasma</i> sp.	RU1-Or	5120*	640	—	—	—	—	—	—
	RU2-T	1280	160	—	—	—	—	—	—
	RU3-Or	2560	320	—	—	—	—	—	—
	RU3-N	2560	640	—	—	—	—	—	—
	RU4-Or	2560	320	—	—	—	—	—	—
	RU4-N	640	80	—	—	—	—	—	—
	RU5-Or	1280	320	—	—	—	—	—	—
	RU5-T	2560	320	—	—	—	—	—	—
	RU5-P	2560	1280	—	—	—	—	—	—
<i>U. canigenitalium</i>	D1M-C	160	1280	—	—	—	—	—	—
	D29M	—	—	2560	—	—	—	—	—
	D11N-A	160	—	—	2560	—	—	—	—
	D6P-C	—	—	—	80	2560	—	—	—
<i>U. felinum</i>	FT2-B	—	—	—	—	—	1280	—	—
	FU1-Or	—	—	—	—	—	1280	—	—
	FU2-Or	—	—	—	—	—	640	—	—
<i>U. gallorale</i>	D6-1	—	—	—	—	—	10240	—	
<i>U. urealyticum</i>	T960	—	—	—	—	—	—	2560	

* : Figures indicate metabolism inhibition titers — : 20 or less

考 察

今回、鹿児島県下の2箇所において捕獲された野生ホンダヌキ (*Nyctereutes procyonoides viverrinus*) の口腔、鼻腔、気管、尿道(♂)からウレアプラズマが分離されたので、その生物学的・血清学的性状を調べた。分離株および参照株の T-broth における増殖曲線から明らかのように、ウレアプラズマは菌量のピークに達した後急激に減少し、約36時間後には死滅することが明らかにされた。これは本菌が尿素を分解しアンモニアを産生することが知られており⁷⁾、培地の pH が短時間のうちに急上昇し、強いアルカリ性を呈するに至ったためと考えられる。従って本菌の継代や抗原作製に当っては培養時間に十分注意を払うことが必要と思われる。

1979年、Kotani and Ogata¹⁰⁾は38匹の健康犬と5匹の死亡犬から多数のウレアプラズマ株を分離し、それらが発育阻止試験と代謝阻止試験によって4つの血清型に分かれることを明らかにした。Kanamotoら⁵⁾は、広島県の一動物園から提供された5匹のホンダヌキの口腔、鼻腔、直腸からウレアプラズマを分離し、これらの株の血清学的性状がイヌ由来ウレアプラズマ DIM-C株と一致することを報告したが、我々の成績も期せずしてこの Kanamoto らの報告を追認する結果になった。その後 Harasawa ら³⁾は、これらイヌ由来株の微細形態、生物学的性状、血清学的性状および遺伝学的性状を詳細に調べ、これらの血清型間に抗原性以外の性状に有意の差が認められないことから、これらを一括してウレアプラズマ属の新菌種 *U. canigenitalium* と命名した。今回タヌキから分離されたウレアプラズマが *U. canigenitalium* の1血清型と代謝阻止試験により交差を示し、また生物学的性状も一致したことから、これらを *U. canigenitalium* と同定して差し支えないと思われるが、さらに DNA レベルでイヌ由来株と比較することが望まれる。いずれにしても、タヌキは動物分類学上イヌ科の動物なので、イヌ由来のウレアプラズマと同じ菌種(血清型)が検出されたことは本菌の生態学的見地から興味ある知見である。

ウレアプラズマの病原性については不明の点が多く、これまでヒト由来 *U. urealyticum* がヒトの非淋菌性尿道炎の病原体として知られており¹²⁾、またウシ由来 *U. diversum* が子牛に肺炎を起こすことが実証されているが¹⁾、他動物由来ウレアプラズマの病原性については報告者^{6,14)}によって異なり、必ず

しも一定の見解は得られていない。今回、タヌキ由来のウレアプラズマは外見的に健康なタヌキから分離されたものであり、特に病気とは関連づけられなかった。今後ウレアプラズマと動物の疾病との関係については検討すべき課題の一つと考えられる。

要 約

鹿児島県下で捕獲された外見的に健康な野生ホンダヌキ (*Nyctereutes procyonoides viverrinus*) 5匹(雄3, 雌2)の気道および泌尿生殖道からウレアプラズマの分離を試みた。本菌は口腔(4/5)、鼻腔(2/4)、気管(2/4)、尿道(♂)(1/2)から分離されたが膿は陰性であった。これらの分離株は血清要求性があり、尿素を分解したが、ブドウ糖およびアルギニンは分解しなかった。代謝阻止試験により血清学的性状を調べたところ、すべての分離株はイヌ由来 *Ureaplasma canigenitalium* の1血清型と交差したが、ネコ、ニワトリ、ヒト由来のウレアプラズマとは関係が認められなかった。

謝 辞

野生タヌキからの採材に御援助賜った獣医学科解剖学教室の松元春光助教授に深く感謝いたします。

文 献

1. Gourlay, R. N. and Thomas, L. H. : The experimental production of pneumonia in calves by endobronchial inoculation of T-mycoplasmas. *J. Comp. Pathol.*, **80**, 585-594 (1970)
2. Harasawa, R., Imada, Y., Ito, M., Koshimizu, K., Cassell, G. H. and Barile, M. F. : *Ureaplasma felinum* and *Ureaplasma cati*; new species isolated from the oral cavity of cats. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **40**, 45-51 (1990)
3. Harasawa, R., Imada, Y., Kotani, H., Koshimizu, K. and Barile, M. F. : *Ureaplasma canigenitalium* sp. nov., isolated from dogs. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **43**, 640-644 (1993)
4. Howard, C. J. and Gourlay, R. N. : Proposal for a second species within the genus *Ureaplasma*, *Ureaplasma diversum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **32**, 446-452 (1982)
5. Kanamoto, Y., Kotani, H., Ogata, M. and Matsuo, Y. : Isolation of *Mycoplasma* and *Ureaplasma* species from raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides viverrinus*). *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 2447-2450 (1983)
6. Koshimizu, K., Kotani, H., Magaribuchi, T., Yagihashi, T., Shibata, K. and Ogata, M. : Isolation of ureaplasmas from poultry and experimental infection in chickens. *Vet. Rec.*, **110**, 426-429 (1982)
7. Koshimizu, K., Ito, M., Magaribuchi, T. and Kotani, H. : Selective medium for isolation of ureaplasmas from animals. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **45**, 263-268 (1983)
8. 奥水 馨 : ウレアプラズマの細菌学。STD 一病因・診断・治療—臨床と細菌, 臨時増刊, 62-74 (1984)
9. Koshimizu, K., Harasawa, R., Pan, I. J., Kotani, H., Ogata,

- M., Stephens, E. B. and Barile, M. F. : *Ureaplasma gallorale* sp. nov. from the oropharynx of chickens. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **37**, 333–338 (1987)
10. Kotani, H. and Ogata, M. : Isolation and serological grouping of ureaplasmas from dogs. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **41**, 639–646 (1979)
11. Purcell, R. H., Taylor–Robinson, D., Wong, D. and Chanoock, R. M. : A color test for the measurement of antibody to T–strain mycoplasmas. *J. Bacteriol.*, **92**, 6–12 (1966)
12. Shepard, M. C. : The recovery of pleuropneumonia–like organism from Negro men with and without nongonococcal urethritis. *Am. J. Syph. Gonor. Vener. Dis.*, **38**, 113–124 (1954)
13. Shepard, M. C., Lunceford, C. D., Ford, D. K., Purcell, R. H., Taylor–Robinson, D., Razin, S. and Black, F. T. : *Ureaplasma urealyticum* gen. nov., sp. nov. : Proposed nomenclature for the human T (T–strain) mycoplasmas. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **24**, 160–171 (1974)
14. Stipkovits, L., Rashwan, A. and Sabry, M. Z. : Studies on the pathogenicity of ureaplasmas in poultry. *Zentralbl. Veterinaarmed. B*, **25**, 707–712 (1978)
15. Taylor–Robinson, D., Haig, A. and Williams, M. H. : Bovine T–strain mycoplasma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **143**, 517–518 (1967)
16. Windsor, G. D., Edward, D. G. ff. and Trigwell, J. A. : A solid medium for culture and identification of human T–mycoplasmas. *J. Med. Microbiol.*, **8**, 183–187 (1975)

Summary

Using apparently healthy 5 wild raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides viverrinus*) (Male 3, Female 2) captured in Kagoshima Prefecture, isolation of ureaplasmas from the respiratory and urogenital tracts of the respective individuals was attempted, with the following results obtained.

It was from the following 4 organs that the isolation of the organisms were performed, namely, the oral cavity (4/5), nasal cavity (2/4), trachea (2/4), male urethra (1/2), while from vagina none was isolated.

These isolates were noted to be in requisition of a certain amount of serum for their growth, and were fixed to be effective in hydrolyzing urea, though powerless in breaking down glucose and arginine.

Through the metabolism–inhibition test, it was ascertained that they were capable of cross–reacting with one serotype of *Ureaplasma canigenitalium* of canine origine, but were incapable of having any serological relationships with feline, avian and human ureaplasmas.