

マイコプラズマ属菌

後藤一雄
帝京大学医療技術学部

要約

実験用マウスまたはラットにおいて、実験感染も含めて病原性の報告があるマイコプラズマ属菌には *Mycoplasma pulmonis*, *M. arthritidis* および *M. neurolyticum* がある。しかし、わが国において病気との関連で分離される菌種は肺炎の原因菌としての *M. pulmonis* のみであり、後者2菌種が検出されることは稀である。*M. pulmonis* 感染の診断は主に気管ふき取り材料を用いた培養検査のほか、抗体検査によって行われる。しかし近年、わが国の動物実験施設においては大学の施設も含め、本菌による汚染率は低い。マイコプラズマ属菌はまた、培養細胞を汚染する細菌としても知られており、*in vitro* 培養されたヒト癌細胞などが、その品質管理の目的で検査されることがある。検出される菌種はヒト、ブタまたはウシ由来のそれであり、免疫不全動物を含めた実験動物の病原体としてではなく細胞への影響を考慮して検査されている。本稿では *M. pulmonis* を中心としてマイコプラズマ属菌全般についてその概要を解説する。

1. 細菌

マイコプラズマ属菌は細胞壁を欠き、多形態性であるが基本形態は球状でその直径は300～1,000 nmである。通性嫌気性で、芽胞を形成せず、鞭毛を有しない。グラム陰性であるが、グラム染色では染まりにくい。マイコプラズマはコレステロールを合成できず、その培養にはウマ血清の添加が必須である。PPLO寒天培地上のコロニーは丸い形態をしており、その大きさは37℃培養1週間で1 mmに満たない。マイコプラズマ属菌のコロニーは特徴的で、コロニー中央部が凹んでおり、目玉焼き状に見える。マイコプラズマのゲノムは約 5×10^8 ダルトンであり、これは *Escherichia coli* の約5分の1程度の大きさである。GC含量が25～42%であり、他の細菌 (*E. coli*; 51%) と比較して極めて低い。さらにリボソームRNAのコピー数もゲノムあたり *E. coli* が7コピーであるのに対し、1または2コピーと少数である。16SリボソームRNA配列および16S-23Sリボソーム遺伝子間のスペーサー配列はPCR法によるマイコプラズマDNA検出のターゲットとして用いられている。

M. pulmonis はグルコース発酵し、アルギニンを加水分解せず、ホスファターゼ活性は陰性である。さらにフィルムスポットを産生、嫌気性下でテトラゾ

リウムを還元し、モルモット血球を吸着する。マウスまたはラットから分離されるマイコプラズマは先にあげた3菌種の他、*M. collis* および *M. muris* (いずれも病原性は証明されていない) が報告されているが、このうち *M. pulmonis* および *M. muris* 以外の菌種は血球吸着せず、*M. muris* の分離は極めて稀なことから、PPLO寒天培地上のコロニーにモルモット血球浮遊液を注ぎ、コロニーに血球が吸着することを確認することで、簡易に *M. pulmonis* の同定が可能である [8]。

2. 宿主、病原性および感染経路

マイコプラズマ感受性の動物種は多岐にわたる。*M. pulmonis* はマウス・ラットの他、ハムスター、ウサギおよびモルモットからの分離報告がある。モルモットやハムスターからはそれぞれ動物種固有の菌種 (*M. caviae* および *M. cricetuli* など) も分離されているが、わが国の動物実験施設での流行は報告されておらず、また本菌種と病原性との関連は明らかではない。

M. pulmonis の主な感染経路は飛沫感染であり、感染初期の病変では、肺の赤色～赤灰色の病巣が顕著で、臨床症状として異常な呼吸音および鼻汁漏出等

が見られる。本菌は肺に侵入し付着・増殖し肺炎を引き起こすが、特にコンベンショナル動物では不顕性感染も多い。マウスと比べてラットは症状が重く呼吸困難により死亡するものもあるが、慢性化するものも多い。

マイコプラズマ属菌は培養細胞に細胞の形態、代謝、増殖能または染色体数とその形態などに変化をもたらす [7]。 *M. orale*, *M. hyorhinis* および *M. arginini* などが主な汚染菌種であり、それぞれヒトの口腔、細胞継代時に用いられるトリプシン、および培地の添加物であるウシ血清がその由来であると考えられている。培養細胞を汚染するこれらの菌種は後述する *M. fermentans* も含め、マウス・ラット等実験動物の病気とは直接的には関連しないと考えられており、培養細胞と実験動物とではマイコプラズマ検査の意義は異なる。

3. 汚染の現状

マイコプラズマ属菌のうち国立大学法人動物実験施設協議会 (国動協) が実験動物の授受に関するガイドラインで定める検査対象微生物は *M. pulmonis* のみである。本菌種はカテゴリー B (伝染力が強く動物を致死させる恐れがある微生物) に分類されており、発生頻度は「時々あり」とされているが、ICLAS モニタリングセンターが行った 2011 年の報告によると、わが国の *M. pulmonis* の発生状況は製薬企業の研究所、大学等のマウス維持施設約 2,500 施設中 5 施設 (0.2%)、ラット施設では約 500 施設中 3 施設 (0.6%) が陽性を示すのみである [3]。しかし、他のアジア諸国 [5, 9]、ヨーロッパでの疫学調査 [6] の報告をみると本菌汚染率は日本よりも高く、動物を輸入する際には注意が必要である。

また、同じく ICLAS モニタリングセンターが 2012 年に行った培養細胞のマイコプラズマ属菌汚染調査では検査総数 1,138 検体のうち 83 検体 (7.3%) がマイコプラズマに汚染されていた。菌種内訳では *M. hyorhinis* が 63 検体 (75.9%)、*M. fermentans* が 14 検体 (16.9%) であり、後者はヒトおよびサル類の尿生殖器由来とされている菌種である。

4. 検査方法と新しい菌種同定法

M. pulmonis の感染症診断には培養法、ELISA 法による抗体検査および PCR 法による菌 DNA 検出が有効である。培養検査に用いられる材料は鼻腔または気管ふき取りであり、これにはイースト抽出液、ウマ血清、ペニシリンおよび酢酸タリウムを添加した

PPLO 寒天培地を用いる。液体培地にはここから寒天を抜いたものに、グルコースおよびフェノールレッドを添加し、*M. pulmonis* のように接種菌がグルコースを分解すれば培地の pH は低下し黄色を呈する。菌種の同定は抗 *M. pulmonis* ウサギ免疫血清を用いた発育抑制試験によって行われるが、前述の通り血球凝集能を調べることで迅速に *M. pulmonis* を同定することが可能である。ELISA 法による抗体検査はスクリーニング検査として用いられており、確認試験には BHK-21 細胞に *M. pulmonis* を吸着させたものを抗原とした蛍光抗体法などで行われる [4]。蛍光抗体法の感度および特異性は高い。また、*M. pulmonis* 抗体検出のための ELISA キットは市販されており、容易に入手可能である。PCR 法は動物の検査においては *M. pulmonis* 菌種特異的プライマーが、細胞の検査においてはマイコプラズマ属特異的プライマーが用いられるほか、Hoechst33258 を用いた蛍光抗体法によって培養細胞に感染しているマイコプラズマを直接光らせて検査する方法がある。Hoechst33258 は二本鎖 DNA の AT リッチな領域に結合する染色試薬であり、マイコプラズマ DNA に特異的ではないが、マイコプラズマ感染細胞をこの試薬で染色すると、感染している菌種にかかわらず細胞質に顆粒状の蛍光が多数みられ、容易に診断が可能である [1]。

最近、新しい菌種同定手段として、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析計 (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization—Time of Flight Mass Spectrometer; MALDI-TOF MS) が、特にヒトの病原細菌の同定技術として注目されている。これは、菌 (タンパク) にレーザーを照射して得られたイオンを検出し、そのスペクトルパターンによって迅速で簡易に菌種を同定するものである。実験動物の病原体では、本法を用いて PPLO 寒天培地上のコロニーから少なくとも *M. pulmonis*, *M. arthritis* および *M. neurolyticum* の同定ができることが示されている [2]。マイコプラズマのこの他の菌種、および実験動物のマイコプラズマ以外の病原細菌についてはそのスペクトルパターンがまだ整備されておらず、今後実験動物の病原体に特化したスペクトルパターンのデータベース化が期待される。

5. 感染制御・予防

マイコプラズマ属菌は熱に弱く、60℃では1分間の加熱で死滅する。消毒薬は70%エタノールが最も有効であり、1分間以内に死滅する。このほか50%イソプロパノール、3%クレゾール石鹼液なども用いられる。*M. pulmonis* 感染動物のクリーニングには体

外受精や帝王切開が有効だが、本菌種はメスの生殖器にも定着していることがあり、注意を要する。本菌の治療にサルファ剤などの有効性が報告されているが一般的ではない。

培養細胞の培地に添加するウシ血清は 220 nm のメンブランフィルターによる濾過滅菌を 2 回以上行い、またトリプシンは 100 nm フィルターによる濾過滅菌が推奨される。マイコプラズマ属菌は細胞壁を欠くので圧力をかけての濾過は避けるべきである。汚染細胞からマイコプラズマ属菌を除去するためにテトラサイクリンなどの抗生物質の添加による除去が報告されているが、本菌除去を目的とした薬剤も市販されている。

6. おわりに

M. pulmonis は培養可能であり、比較的統御しやすい病原体であることから、わが国での発生率は極めて低い状況にある。しかし、海外から動物を導入する機会が増え、さらに同じ動物施設で免疫不全動物が飼われているような状況においては、国動協の実験動物の授受に関するガイドラインに「ステータス Minimum；本菌が陰性であること」と示されている通り、注意すべき病原体であることに変わりはない。

謝辞

培養細胞のマイコプラズマ汚染調査結果につきましては、ICLAS モニタリングセンター 林元展人先生より未発表のデータを提供していただきました。お礼申し上げます。

参考文献

1. Battaglia, M., Pozzi, D., Grimaldi, S., *et al.* 1994. Hoechst 33258 staining for detecting *Mycoplasma* contamination in cell cultures: a method for reducing fluorescence photobleaching. *Biotech. Histochem.* 69: 152–156.
2. Goto, K., Yamamoto, M., Asahara, A., *et al.* 2012. Rapid identification of *Mycoplasma pulmonis* isolated from laboratory mice and rats using Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Vet. Med. Sci.* 74: 1083–1086.
3. Hayashimoto, N., Morita, H., Ishida, T., *et al.* 2013. Current microbiological status of laboratory mice and rats in experimental facilities in Japan. *Exp. Anim.* 62: 41–48.
4. Kraft, V., Meyer, B., Thunert, A., *et al.* 1982. Diagnosis of *Mycoplasma pulmonis* infection of rats by an indirect immunofluorescence test compared with 4 other diagnostic methods. *Lab. Anim.* 16: 369–373.
5. Liang, C., Shih, A., Chang, Y., *et al.* 2009. Microbial contaminations of laboratory mice and rats in Taiwan from 2004 to 2007. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 48: 381–386.
6. Schoondermark-van de Ven E., Philipse-Bergmann, I., and van der Logt, J. 2006. Prevalence of naturally occurring viral infections, *Mycoplasma pulmonis* and *Clostridium piliforme* in laboratory rodents in Western Europe screened from 2000 to 2003. *Lab. Anim.* 40: 137–143.
7. Stanbridge, E. 1971. Mycoplasmas and cell cultures. *Bacteriol. Rev.* 35: 206–227.
8. Tamura, H., Ishihara, C., Sasama, A., *et al.* 1981. Efficacy of hemadsorption for rapid identification of *Mycoplasma pulmonis*. *Lab. Anim. Sci.* 31: 713–714.
9. Yi-Rang, N., Seok, S., Lee, H., *et al.* 2010. Microbiological quality assessment of laboratory mice in Korea and recommendations for quality improvement. *Exp. Anim.* 59: 25–33.