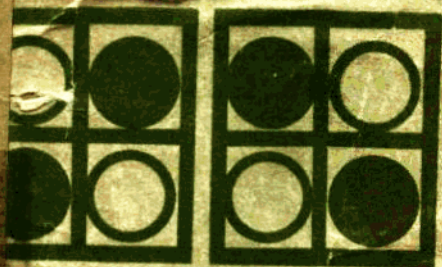


病原体

佐佐木正五 尾形学 中村昌弘 编



序

现在《枝原体病》这本书发刊了，尊敬的友人东海大学医学部长佐佐木正五教授认为我在“枝原体”方面有较高造诣，特委托写篇序文。本来不具备这一资格，所以一再恳求辞写，但由于盛意难却，不得已而从命执笔，对此，希见谅。

“枝原体”本是属于细菌一类，但具有病毒性质，近年来，把枝原体性肺炎用和病毒一样方法培养，例如用鸡胚培养，因为培养分离上培养基的困难致使无结果而中顿，因此长时间对这方面知识较少进展。一直到1962年美国的KIH的勤诺克（Chanock）氏等有了新的突破，可用无细胞培养基培养，成为阐明枝原体的研究工作一个极大的转折点。

枝原体是近年来各个方面都很重视的微生物之一。这种微生物已如前述具有病毒性质，当进行各种动物试验时，动物体内是否潜在本病原体，难于核实。以致成为小白鼠、老鼠等在长期动物试验中死亡的原因，另对癌症的动物试验和药物慢性中毒试验方面，也认为能引起极大影响。另外与此类似是在病毒进行细胞培养时，也常因为较多的组织细胞被枝原体污染而带来影响，如用鸡胚生产家禽免疫用的弱毒疫苗时，可由于枝原体病鸡传入病原造成鸡群感染，这给畜牧业大群养鸡带来极大危害。对此，应特别注意。

在致病性上，不用说这种病原体是十分重要的，按发现

历史时间顺序讲，兽医方面还是较早的，如所谓“牛肺疫”感染多数牛只发病即由本病原体传染造成，给当时养牛生产带来很大损失。在1765年法国波尔孟氏定名为牛肺疫(*Peripneumonie bovine*)以后，经过133年，即1898年诺卡尔和鲁克斯两人进一步成功地分离出本病的病原体，定名为 *Pleuropneumonia organism*, PPO。此后把以后一系列发生类似的病 (*Pleuropneumonia-like organism*) 笼统把这类疫病都称为胸膜肺炎，即简称PPLO。1929年诺瓦氏提议称为枝原体性胸膜肺炎 (*Mycoplasma peripneumoniae*)，到1955年福柳恩又称为枝原体菌 (*Mycoplasma mycoides*)。

至于医学方面则比较晚些，于1937年，底恩氏和爱底邵氏等从人的大前庭腺脓疡中最初分离得到本病原体，这样从1955年以后称之为 *Mycoplasma hominis*。1954年绪巴德氏又从人的子宫里分离获得枝原体T株。可是在医学上最早开始引起注意的还是在1944年，爱顿氏将原发性异型肺炎(PAP)病人所取材料用鸡胚按分离病毒的操作方法分离出一种所谓爱顿剂 (*Eaton agent*)，再经勤诺克和海福利氏等1962年用无细胞培养基培养获得定名为枝原体性肺炎菌 (*Mycoplasma pneumonia*) 证明，本病原体占肺炎的病原体的20—40%，约占感冒症候群的病原体的15%左右。在日本，中村、海老泽、北本氏等从成年人肺炎中和荒川氏等从小儿肺炎中都有分离出本病原体的报道，以致在研究上取得迅速进展。1967年日本内科学会定为急待解决的“病毒性及枝原体性肺炎”的专题，委托我负责研究加以探讨。此后，除淋菌性尿道炎以外，将部分关节炎、恶性肿瘤等病原体也曾拟定为枝原体，今后还要广泛地在多种疾病方面探讨它和

本病原体的相关问题确有必要。

本书的发刊，非常适时，深信本书所汇集的关于枝原体的优秀论文，一定对很多人们起着良好效果。

在本序的最后，特向为本书完成出版而努力的佐佐木教授等诸位作家以及为发行印刷做大量工作的出版单位及有关诸位表示深刻敬意。

1973年文化日

东京大学名誉教授 北本 治
杏林大学医学部长

目 录

I 概论	(1)
1.1 研究的出发点	(2)
1.2 分布和分类	(3)
1.3 繁殖	(13)
1.3.1 用液体培养基培养繁殖	(13)
1.3.2 用固体培养基培养繁殖	(15)
1.4 形态	(24)
1.4.1 微细结构	(25)
1.4.2 繁殖形式	(27)
1.5 在生物学上的性状	(30)
1.5.1 溶血性 (Hemolysis)	(30)
1.5.2 血细胞的吸附性能 (Hemadsorption)	(30)
1.5.3 糖分解性能	(31)
1.5.4 四唑还原作用	(31)
1.5.5 亚甲蓝抑制生长	(32)
1.5.6 对物理、化学处理的稳定性	(33)
1.5.7 毒素和酵素(酶)作用	(34)
1.5.8 干扰素 (interferon)	(35)
1.5.9 对抗菌素的感受性	(35)
1.6 菌体(株)成分	(36)
1.7 营养上的要求及代谢	(41)

1.8	枝原体、病毒(噬菌体)	(44)
1.9	病原性	(45)
1.10	抗原性	(47)
1.11	感染和免疫	(48)
1.11.1	感染和细胞性免疫	(48)
1.11.2	疫苗	(51)
附1	T-枝原体	(58)
附2	枝原体和L型菌株	(62)
I	病因论	(69)
2.1	人的疾病	(69)
2.1.1	原发性异型肺炎	(69)
2.1.2	泌尿器感染	(88)
2.1.3	慢性风湿性关节炎	(93)
2.1.4	其他疾患	(97)
2.2	动物的疾病	(99)
2.2.1	来源于各种动物的枝原体和疫病的关系	(100)
2.2.2	来源于各种动物的枝原体	(102)
2.3	植物的枝原体病	(129)
2.3.1	枝原体所致的植物病	(131)
2.3.2	抗菌素的治疗效果	(148)
2.3.3	萎黄丛生病病原枝原体的分离与培养	(149)
2.3.4	昆虫传播	(151)
II	技术篇	(153)
3.1	病料的采取和保存	(153)
3.2	培养基	(154)
3.2.1	PPLO琼脂培养基(Chanock 琼脂培养基)	(155)

3.2.2	PPLO液体培养基 (Chanock液体培养基)	(157)
3.2.3	双层培养基 (Diphasic medium)	(158)
3.2.4	覆盖培养基 (Overlay medium, OV-1, Alder 改良培养基)	(158)
3.2.5	肺炎枝原体(M.pneumoniae) 用选择培养基	(159)
3.2.6	动物体枝原体的分离培养基	(160)
3.2.7	T-枝原体用培养基	(163)
3.3	培养方法	(165)
3.3.1	好气性培养法	(165)
3.3.2	厌气性培养法	(165)
3.3.3	大量培养法	(166)
3.4	菌落的观察和染色法	(168)
3.4.1	菌落的观察	(168)
3.4.2	菌落的染色	(169)
3.5	继代, 纯化	(171)
3.5.1	继代	(171)
3.5.2	纯化	(172)
3.6	菌株数测定法	(172)
3.6.1	CFU测定法 (Smith方法)	(173)
3.6.2	CCU或MU测定法	(173)
3.7	枝原体的保存法	(174)
3.7.1	冷冻保存	(174)
3.7.2	冻干保存	(175)
3.8	生化学特性试验	(176)
3.8.1	固醇选择性试验	(176)

3.8.2	葡萄糖、精氨酸、尿素的分解试验 (Aluot-	
	to氏等方法).....	(177)
3.8.3	四唑盐的还原试验 (Aluotto方法)	(179)
3.8.4	黑点片 (film-spot) 的产生试验 (Fabrcant	
	和Freundt 方法)	(179)
3.8.5	溶血性试验	(180)
3.9	培养细胞株上污染的枝原体检出法及除去法	
		(181)
3.9.1	检出法	(181)
3.9.2	除去法	(181)
3.10	血清反应.....	(187)
3.10.1	制作免疫血清	(187)
3.10.2	抑制生长试验 [Growth inhibition	
	(GI) test]	(193)
3.10.3	抑制代谢试验 [Metabolic inhibition	
	(MI) test]	(197)
3.10.4	补体结合反应	(203)
3.10.5	荧光抗体法	(207)
3.10.6	免疫扩散法 (琼脂明胶沉淀法)	(211)
3.10.7	凝集反应	(214)
3.10.8	放射免疫沉淀反应 (RIP) 试验 [Ra-	
	dioimmunoprecipitation (RIP)Test]	
		(216)
3.10.9	胶乳凝集反应	(218)
3.10.10	间接红细胞凝集反应	(220)
3.10.11	红细胞凝集反应 (HI 试验)	(227)
3.10.12	红细胞吸附阻止反应	(229)

I 概 论

枝原体 (Mycoplasma) 这种微生物到最近都统称为 PPLO (Pleuropneumonia-like organisms), 具有以下特点。

1) 大小 其大小约为 125—150nm 的一种生物, 可以说它是自行增殖的生物中最小的一个。几乎和流行性感冒病毒属中的粘液性病毒大小相同。

2) 形态 本细菌缺乏一般细菌那样为了保持各自的原有形态所具有的细胞壁 (cell wall)。因此本菌没有一定形态, 而呈现多种多样形态。由三层限界膜 (unit membrane) 代替细胞壁包被着菌体。

3) 需要营养 除无胆固醇枝原体 (Acholeplasma) 外, 在生长发育上需要胆固醇和新鲜血红蛋白, 为此经常使用马血清。

4) 菌落的特征 菌落可生长繁殖在无细胞培养基上, 即生长在琼脂培养基, 经常是繁茂的生长发育, 形成如油煎蛋状 (fried egg), 乳头状 (nipple), 以及肚脐状 (navel) 等特殊形态的菌落。菌落的形态, 一般说是较小的, 大的直径也不过 1 毫米左右, 普通的只有 250—600 μ m, 因此肉眼直接观察是比较困难的。但用扩大镜扩大 40 倍即可观察清楚。

5) 对抗菌素的感受性 大部分的枝原体具有代替细胞壁而形成本菌对外界的屏障。为此, 对青霉素, 头孢菌素等

抗菌素有高度抗药性（例外，*M. neurolyticum*），但对四环素系和macroride系等抗菌素，虽然溶液浓度很低，也有感受性。

6）抗体抑制生长发育 本菌与病毒类似具有特异性抗体，在试管内，能抑制或阻止其生长发育。

7）与L型菌的差异 枝原体能变成一般细菌的形状，但从未见细菌也能变成枝原体的报道。

1.1 研究的出发点

现在枝原体经逐步加以整理而作为一个独立体系的生物体，还是用无细胞培养基培养成功时为起点的。为此还应追忆一下发现PPLO的历史。

这一发现是从探讨家畜的传染性疾病病原菌开始的。根据文献记载，1898年诺卡尔德（Nocard），路克斯（Reux）等对牛肺疫的病原体用无细胞培养基培养成功，1910年抱尔德特（Bordet）和爱欧莱路（Eorrel）氏等描述了它的形态。不久爱路福德（Elford）氏证明了本病原体可以通过Berkefeld V细菌滤过器，又用Gradocol膜断定了它的生活单位为125—150nm。

此后，1923年布莱德尔（Bridro），顿那特恩（Donatien）等分离得到了绵羊的传染性乳管闭塞症的病原体，1934年肖藤沙克（Shoetensack）氏在东京从犬瘟热狗的分泌物，肝以及肠发现了第三种病原体。还有1936年莱德路（Laidlau），爱路福德（Elford）氏等从阴沟水里发现了性质类似的细菌，称为胸膜肺炎生物体（Pleuropneumonia organisms），以后称为类胸膜肺炎生物体（PPLO），直到今天

使用这个名称。目前所分离到的菌株与到现在为止的一般细菌相比要小，而且小得几乎与病毒近似。

从此晚些时候，发现了人的原发性异型肺炎的病原菌，并且经人工培养成功，对枝原体认识的系统化做出较大贡献。最初在1944年爱顿埃金（Eaton agent）对本病原体进行了接种感染试验，结果认为是一种病毒。但从一些病例用抗菌素治愈，推测可能是一种特殊病毒。一直到1962年勤诺克（Chanock）氏等用PPLO的无细胞培养基，对本病原体培养成功这个事实，澄清了相继二十多年的各种推论，把枝原体学科迅速地向前推进一步。当然，对枝原体的研究是多年以来研究PPLO的积累结果。

1.2 分布和分类

从枝原体可用人工培养基培养成功时起，就有从牛、绵羊、狗、鼠、小白鼠、鸡、阴沟水和人体等陆续分离出本病原体的报告，使我们认识了本病原体在自然界的分布是十分广泛的。最近还有从植物，甚至也还有更特殊的从煤里分离得到本病原体的报告，对分别发现的每个病原体的种种名称，有必要加以统一起来。概略的顺序是1910年的丝状菌（*Asterococcus mycoids*），1911年的胸膜肺炎小杆菌（*Coccobacillus mycoides peripneumoniae*），1923年的牛传染性胸膜肺炎菌（*Mycromyces peripneumoniae bovis Contagiosa*），1929年的胸膜肺炎枝原体（*Mycoplasma peripneumoniae*），1931年的牛胸膜肺炎星状菌（*Asteromyces peripneumoniae bovis*），等等，各个时期。以后又认为是波氏病原体（*Borrelomyces*），再次在1941年认为

是变形菌(*Paramycetes*),再次从PPLO终于明确为枝原体(*Mycoplasma*)。此时虽然也曾在分裂菌类(*Shizomyces*)中单设一目(Corden)为枝原体目(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 7版, 1957年),但还在又另设一新纲(Class)称为软体纲(Class Mollicutes即 pliable skin; 柔软皮肤),以区别于一般分裂菌。也还有从宿主和病原体的关系根据生物学的性状进行分类,最近从阴沟水里分离获得一个胆固醇(Cholesterol)不存在而能生长的菌株,把这一株菌称为莱德路枝原体(*Mycoplasma laidlawii*),将其另设一科(family),称为无胆固醇枝原体(*Acholeplasmataceae*),其种型称为无胆固醇莱德路枝原体(*A. laidlawii*)。无胆固醇枝原体由于醋酸盐的作用具有合成长链脂肪酸的能力,此点和枝原体有明显区别,还与酰(基)载体蛋白(acyl carrier protein)的活性有关。此外,无胆固醇枝原体具有比枝原体大二倍的基因组体积也可使两者加以区别。前者 $4.0-5.6 \times 10^8$ dalton (氢原子质量的1/16),后者是 $0.99-1.1 \times 10^8$ dalton。最近枝原体和无胆固醇枝原体的区别不止于单从对胆固醇的要求性,与此相关,包括代谢过程中的异同之处归纳列出如表1.1所示。

表1.1 枝原体和无胆固醇枝原体生化学的差异

项	目	枝原体	无胆汁枝原体	文 献
对胆固醇的要求性		要 求	不要求	19)
由于醋酸钠的作用合成脂质性能		小	大	20)
酰(基)载体蛋白能		小	大	16)
基因组大小		小	大	18)
溶卵磷脂的感受性		有感受性	感受性弱	22)

软体动物纲属于最下等原生生物，枝原体属于这一个纲的理由是它不具备形态上清晰的核，缺乏包围核的核膜和包围菌体的细胞壁以及葡萄糖(GC)含量为22—39%等，特别是葡萄糖(GC)的含量比细菌还少，虽有原生动物组成脱氢核酸盐基的水平，但也有枝原体不属于原生动物的意见。

以上各节加以整理后得到最新的分类，如图1.1。

还有将现在分离得到枝原体的种类及其分离的病料与有关的疾病如表1.2所示。此外，就有特殊意义的枝原体的分布，补加两三个说明如下。

《枝原体污染组织培养细胞菌株》

在病毒的研究上不可缺少的是细胞菌株被枝原体所污染，最早由鲁滨逊(Robinson)氏等指出了这一点。日本国内也根据尾形氏等调查了几个研究所的细胞菌株，说明了如表1.3所示，约80%以上被枝原体污染。如下所述，研究枝原体上显著地消耗了精氨酸等。根据病毒的种类用污染的细胞菌株进行培养时，其病毒常常不能繁殖生长。又有某种枝原体由于能改变细胞的形态，用以研究癌毒时，往往在生癌的判定效果上导致误诊。总之，进行病毒—细胞系的实验时，必须掌握病毒—枝原体—细胞系的实验，其实验结果十分复杂（关于从细胞菌株内检出和除掉枝原体的方法可参照本书技术篇）。

《嗜热好酸性枝原体》

(*Thermoplasma acidophilum*)

前面已经指出了它的名称（图1.1，表1.2），最近在美国印地安那州的佛尔特克(Friar Tuck)矿山从燃烧的

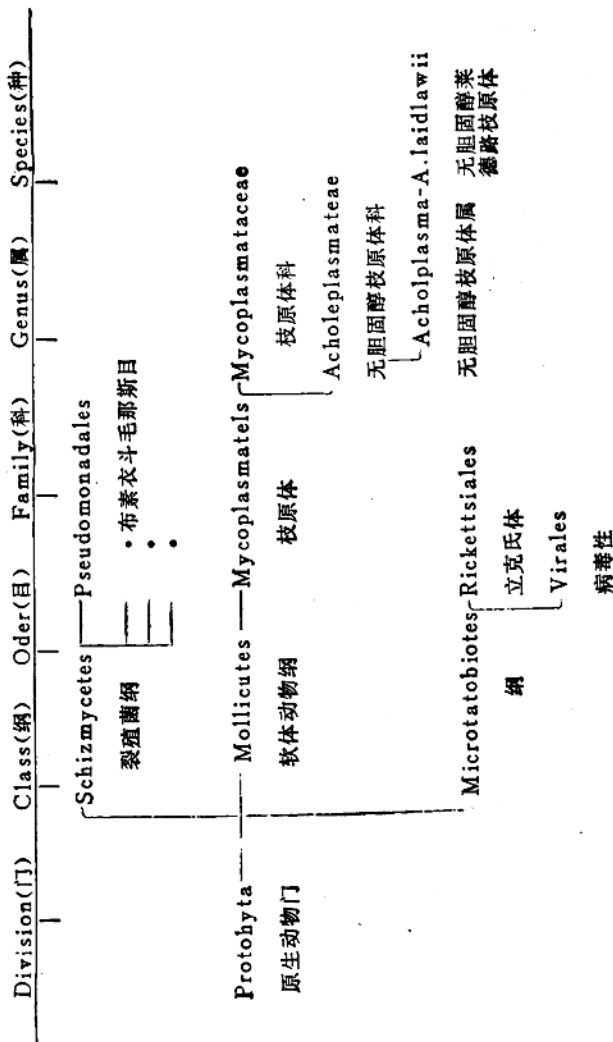


图1.1 枝原体的分类位置

表1.2 主要枝原体的性状

菌 原 名	种		宿 主	寄 生 部 位	疫 病 关 系
	译 名	名			
<i>M. pneumoniae</i>	肺炎枝原体		人	肺	原发性异型肺炎
<i>M. hominis</i>	人枝原体		人	咽头、阴道、尿道	
<i>M. salivarium</i>	唾液枝原体		人	口腔、咽头	
<i>M. fermentans</i>	酵素枝原体		人	阴道	
<i>M. orale type 1</i>	口腔枝原体 1		人	咽头	
<i>M. orale type 2</i>	口腔枝原体 2		人	咽头	
<i>M. orale type 3</i>	口腔枝原体 3		人	咽头	
<i>M. lipophilum</i>	好脂性枝原体		人	咽头	
<i>M. primatum</i>	灵长目枝原体		猴、人	口腔、生殖器	
<i>M. mycoides subsp. mycoides</i>	枝原体亚种菌		牛	呼吸道、肺	牛 肺 疫
<i>M. bovis/ovitalium</i>	牛生殖器官枝原体		牛	阴道、乳房	乳房炎、阴道炎?
<i>M. bovirhinis</i>	牛鼻炎枝原体		牛	鼻腔、肺	乳房炎 (实验的)
<i>M. agalactiae subsp. bovis</i>	牛无乳症枝原体亚种菌		牛	乳房、关节	乳房炎、关节炎
<i>M. dispar</i>	异种枝原体		牛	肺	

(续)

菌 种		宿 主	寄 生 部 位	疫 病 关 系
原 名	译 名			
<i>M. bovoculi</i>	牛眼科枝原体	牛	眼	结膜炎?
<i>M. alkalescens</i>	微碱性的枝原体	牛	鼻	
<i>M. agalactiae</i> subsp. <i>agalactiae</i>	牛无乳症亚种无乳症枝原体	山羊、绵羊	乳房、关节	无乳症、关节炎
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i>	山羊枝原体亚种菌	山羊	肺、关节	胸膜肺炎
<i>M. arginint</i>	精氨酸枝原体	山羊、绵羊	脑、关节	
<i>M. conjunctivae</i>	连接的枝原体	山羊、绵羊	眼	
<i>M. oculi</i>	眼科枝原体	绵羊	眼	
<i>M. hyorhinis</i>	鼻枝原体	猪	鼻腔、肺、关节	多发性浆膜炎
<i>M. hyopneumoniae</i> (<i>M. suis</i> pneumoniae)	猪肺炎枝原体	猪	肺	关节炎、肺炎?
<i>M. hyosynoviae</i>	猪滑液枝原体	猪	呼吸道、阴道	流行性肺炎 关节炎
<i>M. canis</i>	犬属枝原体	犬	气道、阴道	
<i>M. spumans</i>	泡沫枝原体	犬	气道、阴道	
<i>M. maculosum</i>	有斑枝原体	犬	气道、阴道	
<i>M. edwardsii</i>	爱德华枝原体	犬	气道、阴道	

(续)

菌 种		宿 主	寄 生 部 位	疫 病 关 系
原 名	译 名			
M. cynos	犬枝原体	犬	肺、包 咽 头	
M. molare	臼齿状枝原体	犬		
M. felis	猫枝原体	猫	阴道、眼、口腔	
M. gateae	猫枝原体	猫	口腔、鼻腔、阴道	
M. feliminutum	猫科枝原体	猫	口 腔	
M. pulmonis	肺枝原体	小白鼠	鼻腔、肺	肺 炎
M. neurolyticum	神经组织溶解枝原体	小白鼠	脑、鼻腔、眼	Rolling disease (实验鼠)
M. arthridis	关节炎枝原体	鼠	关 节	关节炎、陈腐
M. caviae	天竺鼠枝原体	海 猪	脑、阴道	
M. gallisepticum	禽腺毒性枝原体	禽	气管、气囊	慢性呼吸器病
M. incers	钝性枝原体	禽	气 管	
M. synoviae	滑液膜枝原体	禽	关 节	滑 膜 炎
M. gallinarum	禽枝原体	禽	气 管	
M. meleagridis	黑吐症枝原体	禽	气囊、副鼻腔	副鼻腔炎