

## Staphylococcus aureus L-Forms の生物学的性状および病原性に関する研究

佐藤平二・大宅辰夫\*

(家畜微生物学研究室)

昭和61年8月8日 受理

### Studies on Biological Characteristics of Staphylococcal L-Forms

Heiji SATO and Tatsuo OHYA\*

(Laboratory of Veterinary Microbiology)

#### 緒 言

細菌 L 型は、細菌の細胞生理、形態学的研究の面と医学的関心の両面から、多数の研究者により多くの菌株から L 型の誘導が試みられ、誘導された L 型の諸性状の検討がなされている。しかしながら、それらの実験成績から得られた見解は必ずしも一致しない。

細菌 L 型の病原的役割についての報告も多数見られるが<sup>2,6,9,10,17,20,26</sup>、病巣よりの L 型分離例が明らかであるにもかかわらず、培養 L 型の病原性を明らかにしている報告は少ない。近年 Shafii ら<sup>21</sup>や Belshheim ら<sup>11</sup>が、人の Crohn 病、潰瘍性大腸炎患者の腸粘膜の biopsy 材料から高率に L 型を分離し、Crohn 病患者血清と分離 L 型の復帰株との間に血清学的関連のあることを報告している。Buchanan ら<sup>22</sup>は動物の関節炎、胸水より L 型が分離されることを報告し、Linnemann ら<sup>10</sup>は *Staphylococcus aureus* L 型を兎の膝関節に頻回注射することにより、慢性関節炎とリューマチ様変化を起こさせることに成功している。このような報告は、原因不明疾患や持続性感染性疾患の病原として細菌 L 型の意義を考えようとする人々に勇気を与えるものである。著者は L 型の基礎的性状を知るため、*Staphylococcus aureus* より L 型の誘導を試み、誘導した stable L 型の透析培養により、培地中の高分子成分 free の濃厚液体培養を得ることに成功した<sup>19</sup>。今回は多くの *Staphylococcus aureus* 菌株より L 型誘導を試み、透析培養 L 型を用いて、その生物学的性状と病原性について調べ、興味ある成績

を得たので報告する。

#### 実験方法

1. 供試菌株：教室に保存されている 6 株と、動物の病巣より分離された 18 株計 24 株の *Staphylococcus aureus* 株を用いた。

2. 実験動物：マウスは日本クレア社生産の JCL-ICR 系 SPF 雌 4 週齢、体重 19~21 g を購入し、市販固型飼料と水道水で飼育した。ウサギは九州実験動物センターより購入した雄、体重 3 kg のもので、市販固型飼料と水道水で飼育した。

3. L 型の誘導：誘導法は、ほぼ前報<sup>19</sup>に準じた。すなわち Brain Heart Infusion (BHI) 寒天培地 (栄研化学) に食塩を 5% (w/v) に加えて 121°C 15 分間滅菌 (pH 7.2)、50°C に放冷後非働化馬血清を 10% (v/v) に添加したものを L 型用基礎培養として用いた。L 型誘導剤としてはメチシリン S、ペニシリン G ポタシウム (共に明治製薬社製) を、それぞれ最終濃度が 0.1~250  $\mu$ g、および 0.1~1000 単位になるように基礎培地に加えて誘導用培地とした。誘導培地平板に BHI broth に 18 時間培養した菌液 0.1 ml ( $10^9$  CFU/ml) を接種し、コンラージ棒でのばし、乾燥を防ぐため moist chamber に入れて 37°C 7 日間培養した。

動物体内での L 型の誘導は、48 匹のマウスに供試菌の BHI broth 24 時間培養菌液 (約  $10^9$  CFU/ml) 0.1 ml を、1 株当たり 2 匹ずつ尾静脈より注射し、1 週間間隔で 2 回メチシリン S 1 mg、ペニシリン G ポタシウム 5000 単位を 1 匹ずつに筋肉内投与した。菌接種後 3 週間目にマウスを殺して腎をとり、乳剤として L 型基礎培地に塗抹し、37°C 7 日間 moist chamber で培養した。

誘導された各 L 型について、培地中の食塩、血清の至適濃度を知るため、異なる条件下での培養状況を

本研究の一部は文部省科学研究費 (課題番号 056176) の補助を受けて行われたものである。

\* 農林水産省家畜衛生試験場九州支場

891-01 鹿児島市中山町 2702 Kyushu Branch Laboratory, National Institute of Animal Health, 2702 Chuzan, Kagoshima, 891-01, Japan

検討した。

4. 透析培養：方法は前報<sup>19)</sup>に準じたが、セロファンサック外側の培地には5% (w/v) 食塩加 BHI を用い、人血清の代わりに馬血清を10% (v/v) に加えた。メチシリン S の終末濃度は30  $\mu\text{g/ml}$  とした。stable L 型の培養にはメチシリン S を除去した。

5. 生化学的性状試験：誘導された L 型4株とその親株につき、カタラーゼ、マンニト分解、コアグララーゼ、色素産生、溶血性を調べた。カタラーゼと色素産生は基礎培皿平板上のコロニーの色素を検し、コロニーに直接過酸化水素水を滴下して発泡の有無を見た。マンニト分解は基礎培地にマンニト1% (w/v)、BTB 0.008% (w/v) を加えたのち5 ml ずつ小試験管に分注し、これに穿刺培養して37°C 3日間観察した。溶血性は3% (w/v) に食塩を減じた基礎培地に、兎または羊の脱線血を5% (v/v) に加えて平板とし、親株と L 型を穿刺培養して37°C 3日間観察し、次いで4°C に1日放置し溶血環を調べた。コアグララーゼは親株の BHI broth 1夜培養菌と L 型透析培養5日目の菌液各0.2 ml に兎プラズマ0.5 ml を加え、37°C 3日間観察した。実験に当たっては、unstable L 型は基礎培地の1代の培養では親株には復帰しないことを確かめている。

6. 抗生物質感受性試験：親株の BHI broth 新鮮培養および L 型透析培養菌液の0.1 ml を、それぞれ基礎培地平板に塗布してフラン器内で乾燥したのち、昭和薬品化学社製抗生物質感受性用 disc 9種類、すなわち、クロールテトラサイクリン (TC)、クロラムフェニコール (CP)、エリスロマイシン (EM)、ロイコマイシン (LM) オレアンドマイシン (OM)、ストレプトマイシン (SM)、カナマイシン (KM)、コリスチン (K)、ペニシリン (PC)、を置き、37°C 3日間培養して阻止円の直径を測った。disc の直径は8 mmであった。

7. 核酸の定量：菌体の全核酸の抽出、分離、定量は成書記載の STS 変法<sup>12)</sup>によった。親株は、Rouxビン内の BHI 寒天培養菌を生理的食塩水で集菌し、L 型は透析培養菌液を注射器により採取したのち、遠心沈殿を行い、沈渣を5 ml の1/20モル Tris 塩酸緩衝液 pH 7.5 ( $10^{-2}$ モル  $\text{MgCl}_2$ 含有) に浮遊させた。次にリゾチーム (Manheim 社製) 500  $\mu\text{g/ml}$  に加えて、37°C 3時間反応させたのち、超音波細胞破碎機 (Heat system Ultrasonic Inc. model W185) により、親株は20 KHZ 50 W 30分間、L 型は20 KHZ 50 W 10秒間の超音波処理を行った。L 型は、同時に上清

分画のクロロフォルム-イソアミルアルコによる脱タンパクを行い、それぞれ記載の操作により RNA、DNA の抽出を行った。RNA の定量はシステイン濃硫酸法により、酵母 RNA (和光純薬) を用いた標準曲線より測定し、DNA はインドール法により、ニシン卵 DNA (和光純薬) で作製した定量用標準曲線を用いて行った。

8. 交叉凝集反応：親株の普通寒天平板培養から菌をかき取り、洗浄して菌液をつくり、0.02% (w/v) にマサイオレートを加えて死菌としたのち、兎耳静脈より注射した。L 型は透析培養菌液と Freund complete adjuvant (Difco 社製) を等量に混ぜた乳剤を皮下に注射して免疫を行った。それぞれ4週後に採血して抗血清を分離した。凝集原としては、普通寒天培養菌、L 型透析培養 0.02% (w/v) にマサイオレートを加えて濁度を Macfarland No. 3 に調製した。反応術式は、マイクロプレートと毛細ピペットによるマイクロタイター法によった。各抗血清の2倍段階希釈列を作り、おのおのの穴に等量の凝集原液を滴下し、ローテーター (桜精機製 VP-10B) で50rpm 30分間振盪したのち、24時間室温に放置し、弱拡大鏡検により観察し、凝集疑陽性の1管前の希釈を凝集価とした。

9. 実験動物に対する病原性：マウスに対しては2695株の親株、L 型、復帰株を用いて膿瘍形式と致死性の強さを調べた。すなわち、親株の18時間 BHI broth 培養菌、L 型の透析培養3日目の菌液および L 型より復帰した株の5% (w/v) 食塩加 BHI broth 18時間培養菌液を用いた。菌量等については Table 5-1, 5-2 に示した。

ウサギに対する攻撃は2695株の親株と L 型で行った。それぞれ2羽ずつ、ウサギ耳静脈より前述の菌液を親株は1 ml ( $2.1 \times 10^9$  CFU/ml)、L 型は3 ml ( $4.9 \times 10^9$  CFU/ml) 注射し、注射後1週間ごとに採血し、血清 BUN, GOT, GPT 値を調べて、臨床的に病気の進行を追跡した。菌接種後6週目に殺処分して病理組織学的検索と菌の回収を試みた。BUN 定量はユニグラフ法<sup>14)</sup> (小野薬品工業社製キット) により、GOT, GPT は Reitman-Frankel 法<sup>14)</sup> (和光純薬社製キット) により測定した。

10. 組織培養細胞に対する病原性：成書<sup>8)</sup>に従い Vero 細胞を Roux ビンに培養し、トリプシン-EDTA 液で分散浮遊させた細胞を MEM を基礎とする発育培地に約  $10^6$ /ml に調製し、この細胞液をカバースリップを入れた Leithon 管に1 ml ずつ分注、37°C 3日間培養後、199を基礎とする維持培地に代え、親

株菌液0.1 ml ( $2.8 \times 10^9$  CFU/ml), L 型菌液の0.1 ml ( $1.1 \times 10^9$  CFU/ml), 復帰株菌液0.1 ml ( $6.6 \times 10^9$  CFU/ml) を接種した. 4日間毎日, カバースリップを取り出し, ギムザ染色と抗 L 型蛍光抗体染色を行うと共に菌回収を試みた.

### 実験成績

1. L 型の誘導と発育条件: 培地上では24株より4株の L 型が誘導された. 誘導に用いたメチシリン S とペニシリン GK の有効濃度は, 前者では0.1  $\mu$ g-125  $\mu$ g/ml, 後者では50単位-300単位/ml と広い範囲にわたった. 至適濃度はそれぞれ30  $\mu$ g/ml と200単位/ml であることがわかったので, L 型継代用にはメチシリン S 30  $\mu$ g/ml を含む基礎培地を用いた. マウス体内での L 型誘導は, 24株中3株において認められたが, 培地での2代目以降の継代は何れの株においても成功しなかった. *in vitro* 誘導株である2695L 株は3代目以降, 74M5株は40代目以降 stable L 型となったが, 2696株, 2919株は40代をすぎても unstable であった. stable L 型の食塩の必要最低濃

度は2% (w/v) であるが, unstable L 型は1%でも発育がみられた. ウマ血清は L 型の発育には必須ではないが, 4%以上血清を含んだ培地での発育は良好となる. 固型培地上の L 型コロニーは, 初めは1-2mmの大きさであるが, 継代を重ねるに伴い大きさを増し, 培地への embedding の程度は小さくなる. コロニーは非常に粘稠である点がマイコプラズマと異なる. 透析培養のセロファンチューブ内での発育は, 粘稠性強く, セロファンに付着する形で増殖する. 発育は5日目に生菌数が最高に達し, 8日目以降は減少し, 10日目以降は粘稠性も減少し, 急速に死滅に向かう. この透析培養 L 型は, 少なくとも5年以上の凍結乾燥が可能である.

2. 生化学適性状: 5種類の性状比較は, Table 1 に示すように, stable L 型である2695L と74M5では性状の陰転が多く, unstable L 型である2696L, 2919L では欠落性状が少ない. 復帰株はほとんどが親株と同様であったが, 供試 L 型4株はすべてにおいて溶血性を失ったままで, 親株型に復帰しても溶血性は回復しなかった.

Table 1. Biochemical characteristics of staphylococcal L-forms

Tested items	2695			2696			2919			74M5		
	P*	L	R	P	L	R	P	L	R	P	L	R
Catalase	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
Manitol	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
Coagulase	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Pigment	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Haemolysis												
sheep blood	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
rabbit blood	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-

\*: Hereafter referred to as P for parent strain, L for L-forms and R for reverted strain.

3. 抗生物質感受性: L 型化に伴い, ペニシリン系抗生物質とは作用機序の異なる抗生物質に対して感受性の減少または耐性を示すようになったものが6種類の薬剤において見られた. また逆に, 感受性を増しているものもあった. 復帰株は親株同様の感受性を示した. (Table 2).

4. 核酸の含量: 全菌量に対する全核酸量は, 4株の何れにおいても, 親株の約2倍に達している. この増加は RNA の増量によるものであった. 注目されたことは, L 型透析培養の上清に多量の核酸が遊離されていることで, その量は, DNA, RNA 共, 菌体よりの抽出量の約25%ないし40%に相当する量であった. (Table 3).

5. 凝集反応: 抗親株血清と親株凝集原, 抗 L 型

血清と親株凝集原, L 型凝集原との間では, ほぼすべてにおいて特異的凝集がみられたが, 抗親株血清と L 型凝集原の間では反応が弱く, 明らかな特異的凝集は認め難かった. (Table 4).

6. 動物に対する病原性: マウスでの実験成績は Table 5-1, 5-2 に示すように, 親株と復帰株は, 膿瘍形成, 致死性など病原性が明らかであったが, L 型では全く病原性が認められず菌の回収も不成功であった. 復帰株の致死性は親株に比較してやや弱いようであった.

ウサギに対する病原性試験では, 親株接種ウサギに一過性に3-4週目に BUN 値の上昇がみられたが, L 型接種ウサギでは BUN 値の変化は見られなかった. GOT, GPT 値は親株接種ウサギでは4-6週の

Table 2. Antibiotic sensitivity of staphylococcal L-forms

Antibiotics	2695			2696			2919			74M5		
	P	L	R	P	L	R	P	L	R	P	L	R
Tetracycline (200 $\mu$ g)	29	②②* <sup>1</sup>	28	25	18	26	23	22	22	28	28	28
Chloramphenicol (100 $\mu$ g)	27	⑮	28	15	⑧	24	25	⑭	26	26	27	26
Erythromycin (100 $\mu$ g)	26	②②	26	26	⑮	26	27	②②	26	26	⑮	27
Leucomycin (30 $\mu$ g)	22	⑫	22	22	⑪	22	22	⑮	21	22	22	22
Oleandomycin (30 $\mu$ g)	25	③②* <sup>2</sup>	26	25	25	25	25	③②	24	27	25	28
Streptomycin (50 $\mu$ g)	11	8	12	11	11	10	8	⑮	8	12	⑧	11
Kanamycin (50 $\mu$ g)	11	8	11	8	8	8	8	⑮	8	12	⑧	12
Colistin (5 $\mu$ g)	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Penicillin (20 $\mu$ g)	33	⑧	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

Figures show diameter of inhibited zone. Diameter of disc is 8 mm.

\*1: decreased sensitivity

\*2: increased sensitivity

Table 3. Nucleic acid contents of *Staphylococcus aureus* and their L-forms

		Weight of packed cell (mg)	Total (mg)	DNA (%) <sup>*</sup>	per packed cell (mg)	Total (mg)	RNA (%) <sup>*</sup>	per packed cell (mg)	RNA/DNA
2695	P	166.1	0.434	<2	0.0026	1.693	<1	0.010	3.90
	L	58.2	0.144	39	0.0025	1.284	41	0.022	8.92
2696	P	114.8	0.389	<2	0.0034	1.420	<1	0.012	3.65
	L	60.1	0.171	29	0.0028	1.142	26	0.019	6.68
2919	P	182.8	0.503	<2	0.0028	1.901	<1	0.010	3.78
	L	62.2	0.201	24	0.0032	1.370	32	0.022	6.82
74M5	P	118.6	0.360	<2	0.0030	1.386	<1	0.023	3.85
	L	82.9	0.246	37	0.0030	1.673	31	0.020	6.80

\*: Ratio of nucleic acid in supernate. Amount of intracellular nucleic acid is 100%.

Table 4. Concavity slide agglutination titres of antisera to various staphylococcal L-forms and their parent cocci

Antisera		Antigens							
		Parent strain				L-forms			
		2695	2696	2919	74M5	2695	2696	2919	74M5
2695	P* <sup>1</sup>	2048	4	4	128	32	8	64	128
	P	256	2048	2	16	64	4	128	64
	P	16	16	1024	8	8	64	256	64
	P	16	32	2	512	128	4	16	64
2696	L* <sup>2</sup>	2048	64	64	16	2048	32	32	16
	L	2048	2048	128	256	32	1024	16	64
	L	256	128	1024	256	16	128	512	16
	L	128	32	64	1024	64	32	16	1024

\*1: Parent strain

\*2: L-form

間に、L型接種ウサギでは2-3週の間で若干の変動がみられた。(Table 6). 病理組織学的には親株接種ウサギで、肝細胞の原形質の顆粒化または空胞化がみられ、小葉間結合織の軽度の円形細胞浸潤、腎の間質結合織の増殖、円形細胞浸潤、糸球体および尿管

の腫大などの炎症後期像がみられた。L型接種ウサギにおいても、胆管周囲結合織の増殖、肝細胞原形質の空胞化、糸球体の消失、尿管腫大など若干の変化がみられた。

Vero細胞に対しては、親株、復帰株では接種後速

Table 5-1. Pathogenicity of *Staphylococcus aureus* L-forms for mouse

	Inocula* <sup>1</sup> and route of inoculation					
	Parent strain			L-forms		
	SC	IP	IV	SC	IP	IV
Abscess formation	2/2* <sup>2</sup>	1/2	2/2	0/2	0/2	0/2
Recovery of inoculum	2/2	1/2	2/2* <sup>3</sup>	0/2	0/2	0/2

\*1: Strains employed are 2695 P (original parent strain) and 2695 L (stable L-forms). Bacterial counts of inocula are  $1.7 \times 10^8$  CFU/0.2ml for parent strain and  $8.0 \times 10^8$  CFU/0.2ml for 2695 L.

\*2: Number of mouse, positive/number of mouse, inoculated.

\*3: One mouse died on 6th day after inoculation.

Table 5-2. Pathogenicity of *Staphylococcus aureus* L-forms for mouse

Dilution of inoculum	Inocula* <sup>1</sup>		
	P	R	L
$10^0$	3/3* <sup>2</sup>	2/3	0/3
$10^{-1}$	3/3	1/3	0/3
$10^{-2}$	1/3	0/3	0/3

\*1: Strains employed are 2695 P (original parent strain), 2695 R (reverted culture from L-forms) and 2695 L (L-forms). Mice were inoculated 0.2 ml of bacterial suspensions via iv route. Colony-forming units (CFU) of the 3 original inocula are  $8.2 \times 10^9$  CFU/ml in 2695 P,  $8.6 \times 10^9$  CFU/ml in 2695 R and  $2.4 \times 10^9$  CFU/ml in 2695 L.

\*2: Number of mouse, died/No. of mouse, inoculated.

Table 6. Serum GOT, GPT value in rabbits challenged with *Staphylococcus aureus* and its L-forms

Rabbit No. *	GOT and GPT value (Karmen unit) after challenge							
	0	1	2	3	4	5	6	weeks
GOT	1	23	20	45	36	132	102	81
	2	38	26	38	40	92	148	128
	3	22	24	42	88	97	120	62
	4	65	48	110	102	68	60	48
	5	46	18	59	17	77	44	37
	6	53	18	59	12	46	62	80
GPT	1	30	7	12	12	70	55	28
	2	34	26	35	18	59	67	51
	3	22	45	40	56	45	33	26
	4	24	18	66	37	35	7	37
	5	10	5	54	27	47	7	25
	6	30	23	60	37	36	13	28

\*: No. 1 & 2 were inoculated with 2695 parent strain ( $2.1 \times 10^9$  CFU/ml, iv)

No. 3 & 4 were inoculated with 2695 L ( $1.5 \times 10^{10}$  CFU/3 ml, iv)

No. 5 & 6 were not inoculated controls.

やかな細胞剥離が始まるのに対し、L型を接種された細胞培養は、ギムザ染色で見ると限り異常は認められず菌も回収されなかった。しかし蛍光抗体染色では、L型接種後4日目までのすべての標本において、L型に由来すると思われる蛍光が、細胞表面または細胞内に認められた。

## 考 察

培地上で誘導されたL型のうち、2695Lはメチシリン、ペニシリンの何れによっても誘導されたが、他の3株はメチシリンにより誘導された。マウス体内で誘導されたL型の1株は、どちらの抗生物質によっても誘導されたが、他の2株はペニシリンにより誘導された。*in vitro* 誘導4株と *in vitro* 誘導3株は全く

別個の株であった。また、*in vitro* 誘導株は誘導培地上でも次代への継代は不可能であった。これらのことから、L型発現の条件は、菌株によりそれぞれ微妙に異なるように思われ、また、それぞれ異なった条件で誘導された多様なL型のすべてに、共通する性状を期待すべきかどうか疑問に思われた。

生物学的性状のうち、L型の4株すべてが溶血能を失い、復帰株でも非溶血性のままであったことは、溶血性は他の性状とは異なるコントロールを受けていることを想像させる。Smithら<sup>23)</sup>は *Staphylococcus aureus* L型でのフィブリノリジン、溶血毒産生能の喪失、ペニシリナーゼの活性低下をのべており、Czop<sup>3)</sup>はエンテロトキシン産生の低下をのべているが、一方Smithら<sup>23)</sup>はカタラーゼ、コアグララーゼ、DNaseが

親株, L 株共に陽性であることをのべており, Flores ら<sup>4)</sup>は Streptococcus L 型で, 同定上重要なヘモリジン, 馬尿酸塩分解, CAMP Factor, 群, 型特異抗原などが親株と同様であることを報告している. このような実験結果の不一致は, 使用された L 型の L 型化の程度の差が関係するものと思われる.

抗生物質に対する感受性試験の成績は, 一般的には L 型化により, 親株以上の感受性を示すようになるという報告<sup>7,13,16,22)</sup>と趣を異にし, 細胞壁合成阻害性抗生物質のみならず, タンパク合成系阻害性の抗生物質に対しても感受性の低下を示したものが多かった. この種の実験は, Takahashi ら<sup>25)</sup>も指摘するように培地の滲透圧により影響を受けることから, 同じ様な条件下で, 親株, L 型, 復帰株について十分な実験をすることは困難であって, ある程度の成績の不一致はやむを得ないように思われる. 意外であったのは, 2695株以外の3株は親株の時点で PC 耐性で, 復帰株も依然, 耐性であったことであるが, 同様な成績は Kagan<sup>7)</sup>, Takahashi ら<sup>25)</sup>の報告にも見られており, このような株は動物または人より分離された時にすでに L 型からの復帰株で, 耐性を獲得していたことも考えられる. このような, メチシリンに寛容である細菌の L 型化のメカニズムは, 当然, メチシリン感受性の場合とは別であろうと想像され, 細菌の L 型化が単純なものではないように思われる.

親株と L 型の核酸の量についてみると, DNA は両者に差がないが, RNA 量では L 型が2倍の量を示した. これが何を意味するのかは明らかでないが, 細胞壁を欠損したことに対処するための代謝の変化に関係があるのではないかとと思われる. 注目すべきことは透析培養上清に多量の核酸が遊離していることで, こわれ易い L 型の破碎によるためとも考えられるが, 遊離した核酸が菌体の DNase, RNase の分解をうけ難いためと考えると, 細菌の幼若期(誘導期, 増殖促進期)のままの代謝を続けているのが L 型の発育ではないかとも想像される.

血清学的実験の成績は前報<sup>19)</sup>とやや異なり特異的凝集反応が見られたが, 抗親株血清は, L 型凝集原によく反応しなかった. また, 抗 L 型血清が親株凝集原に対して概して強い反応を示した. このような傾向は Lynn ら<sup>11)</sup>も A group streptococcus のラテックス凝集反応で観察している. Flores ら<sup>5)</sup>は, 継代を重ねた Streptococcus の L 型でも, 親株との間に, 多糖類, R タンパク抗原の共通性がみられることをのべているが, 齊藤ら<sup>18)</sup>は Streptococcus L 型で作った抗血

清が, ラテックス凝集反応は, *Staphylococcus aureus* L 型, *Escherichia coli* L 型ともかなり強く反応することをのべている. 細菌の血清学では, 細胞壁が特異性を示すよい抗原と考えられているが, 今回の実験で, 親株による血清が L 型抗原に反応性弱く, L 型により調製された血清が親株にも強く反応したことはどのように考えるべきか説明し難い. Takada ら<sup>24)</sup>は *Staphylococcus aureus* L 型から分離された細胞質膜には強い mitogen 作用があることをのべており, Flores ら<sup>5)</sup>は Streptococcus L 型の多糖類抗原は親株のそれと全く同じように反応するが, 免疫電気泳動では, はっきり区別されることを報告している. これらから推測すれば, L 型の細胞成分は親株のそれと完全に同質ではなく, 細胞壁の喪失も伴って, 生物学的反応原として異なった反応をひきおこすことも考えられる.

動物に対する L 型の病原性に関する報告では, 細菌は L 型化により病原性を失うとするものが多い<sup>6,9,10,26)</sup>. 今回の実験でもマウスでは否定的であったが, ウサギでは臨床化学的検査, 病理組織学的検査で, 親株接種ウサギと同様に, L 型接種にも若干の変化が見られた. L 型と病気との関連を考える場合, 病巣からの L 型の分離と L 型の動物感染実験の両方からのアプローチがある. しかし, 病巣よりの分離は, その L 型が病気の原因なのか, 病気の結果なのかははっきりしない. また, L 型については, Koch の postulates を完全に満足するような報告が乏しいこともあって, 細菌 L 型の病原的役割は依然推測の域を出ない. 最近, L 型のマクロファージ内での生残期間が長いことが報告され<sup>15)</sup>, 持続感染原としての L 型の役割が考えられるとすれば病気との関連が一層強くなるであろう.

家畜においても, 心内膜炎, 関節炎, 潰瘍性腸疾患, ヒナ白痢などの病原病理を考える上で, L 型の役割を考えることは甚だ興味がある.

## 要 約

*Staphylococcus aureus* の L 型を誘導し, その生物学的性状および病原性を調べ, 以下のような成績が得られた.

1. メチシリン S またはペニシリン GK を誘導剤として, 供試24株より, 培地上で4株, マウス体内で3株の L 型を誘導した. 培地誘導株のうち2株は stable L 型となった. マウス体内で誘導された L 型は2代目以降の培地継代は出来なかった.

2. L型の生物学的性状は、親株の性状を失うものが多かった。stable L型は、unstable L型にくらべて喪失する性状が多い。L型からの復帰株は親株の性状を回復するが、溶血性は全4株共、L型化により陰転したままで、復帰株も陰性であった。

3. L型化に伴い、抗生物質に対する感受性も変化したが、今回の実験では親株に比較して感受性が低下する傾向がみられた。

4. L型では親株にくらべて、菌体核酸の量が増加するが、それはRNAの著明な増加によるものである。透析培養を行ったL型菌液の遠心上清には多量の核酸が遊離していた。

5. 親株とL型による交叉凝集反応の結果では、概ね特異的反応がみられたが、抗親株血清はL型凝集原に対しては反応性が弱く、特異性も低かった。

6. L型のマウスに対する病原性は認め難かったが、L型を接種されたウサギでは、若干の臨床的变化と病理組織学的変化がみられた。

## 文 献

- 1) Belsheim, M. R., Darwish, W. C., Watson, W. C. and Shieven, B.: Bacterial L-form isolation from inflammatory bowel disease patients. *Gastroenterology*, **85**, 364-369 (1983)
- 2) Buchanan, A. M., Davis, D. C., Pedersen, N. C. and Beaman, B. L.: Recovery of microorganisms from synovial and pleural fluids of animals using hyperosmolar media. *Vet. Microbiol.*, (Netherland) **7**, 19-33 (1982)
- 3) Czop, J. K.: Synthesis of enterotoxin by L-forms of *Staphylococcus aureus*. *Infection & Immunity*, **1**, 169-173 (1970)
- 4) Flores, A. E. and Ferrieri, P.: Biochemical markers of the penicillin-induced L phase of a group B, type III Streptococcus sp. *J. Clin. Microbiol.*, **18**, 961-967 (1983)
- 5) Flores, A. E. and Ferrieri, P.: The type specific polysaccharide and the R protein antigens of the L-phase from group B, type III streptococcus. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.*, [A] **259**, 165-178 (1985)
- 6) Jackson, G. G. and Petersdorf, R. G.: Role of protoplasts, spheroplasts and L-forms in disease. p. 345-494, In Guze, L. B. (ed) *Microbial protoplasts, spheroplasts and L-forms*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore (1968)
- 7) Kagan, B. M.: Antibiotic sensitivities of staphylococcal L-forms. p. 314-318, In Guze, L. B. (ed) *Microbial protoplasts, spheroplasts and L-forms*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore (1968)
- 8) 国立予防衛生研究所学友会編: ウイルス実験学総論. 407-422, 丸善, 東京 (1973)
- 9) Linnemann, C. C. Jr., Watanakunakorn, C. and Bakie, C.: Pathogenicity of stable L-phase variants of *Staphylococcus aureus*: Failure to colonize experimental endocarditis in rabbits. *Infection and Immunity*, **7**, 725-730 (1973)
- 10) Linnemann, C. C. Jr., Watanakunakorn, C. and Bakie, C.: Pathogenicity of stable L-phase variants of staphylococcus: Reaction of rabbit synovium to intra-articular inoculation. *Arthritis and Rheumatism*, **17**, 603-607 (1974)
- 11) Lynn, R. J. and Haller, G. J.: Bacterial L-form as immunogenic agents. p. 270-278, In Guze, L. B. (ed) *Microbial protoplasts, spheroplast and L-forms*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore (1968)
- 12) 水野重樹著: 核酸の一般的分離定量法. 16-90, 東大出版会, 東京 (1971)
- 13) Montgomerie, J. Z., Kalmanson, M., and Guze, L. B.: The susceptibility of protoplast and bacterial forms of *Streptococcus fecalis* to antibiotics. p. 300-310, In Guze, L. B. (ed) *Microbial protoplasts, spheroplasts and L-forms*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore (1968)
- 14) 中村良一著: 臨床家畜内科診断学. 224-237, 養賢堂, 東京 (1973)
- 15) Neustroeva, V. V., Vul'fovich, Iuv., and Churilova, N. S.: Streptococcus group A L-form survival in mouse peritoneal macrophages. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, No. **12**, p. 45-46 (1983)
- 16) 岡崎則男・明間鯉一郎・宮本 泰: A 群溶レン菌 L-form の誘導と細菌学的性状. *日本細菌学雑誌*, **36**, 695-702 (1981)
- 17) Rosner, R.: Isolation of protoplasts of *Staphylococcus aureus* from a case of recurrent acute osteomyelitis. *Americ. J. Clin. Path.*, **50**, 385-390 (1968)
- 18) 斎藤史子・高橋豊三・田所一郎・江田 享: グラム陽性球菌 L-form の血清学的研究. *日本細菌学雑誌*, **28**, 109 (1973)
- 19) 佐藤平二: *Staphylococcus aureus* stable L-form の透析培養について. *鹿大農学術報告*, No. **29**, 127-131 (1979)
- 20) Schmitt-Slomska, J., Carvano, R., Anol, M., Gay, B. and Roux, J.: Isolation of L-form from the spleens of *Brucella suis*-infected, penicillin-treated mice. *Annal. Microbiol.*, (Paris) **132**, 253-265 (1981)
- 21) Shafii, A., Sopher, S., Lev, M. and Das, K. M.: An antibody against revertant forms of cell-wall deficient bacterial variant in sera from patients with Crohn's disease. *Lancet*, August 15, **2** (8242) 332-334 (1981)
- 22) Smarda, J. and Schumann, E.: Studies of colicin action on wall-less stable L-forms of *Escherichia coli*. II. Growth inhibition of complete and wall-less (L-form) cells of *E. coli* by basic colicin type. *J. Basic Microbiol.*, **25**, 451-456 (1985)
- 23) Smith, J. A. and Willis, A. T.: Some physiological characters of L-form of *Staphylococcus aureus*. *J. Pathol. Microbiol.*, **25**, 359-365 (1967)
- 24) Takada, H., Hirachi, Y., Hashizume, H. and Kotani, S.: Mitogenic activity of cytoplasmic membranes isolated from L-form of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. and Immunol.*, **24**, 1079-1090 (1980)
- 25) Takahashi, T., Tadokora, I. and Adachi, S.: An L-

form of *Staphylococcus aureus* adapted to brain heart infusion medium without osmotic stabilizers. *Microbiol. and Immunol.*, **25**, 871-886 (1981)

26) Young, R. M., and Dahlquist, E. H.: Pathogenicity of L-forms of *Staphylococcus aureus*. *Americ. J. Clin. Pathol.*, **48**, 466-473 (1967)

### Summary

Inductions of L-forms were attempted from 24 strains of *Staphylococcus aureus* on the artificial inducing media and in mice. Four strains of L-forms were induced on inducing media and 3 strains were induced in mice. Two strains of L-forms induced on media were established as stable L-forms, however, 3 strains isolated from mice were incapable of continuous passage on inducing media.

Several important characteristics for the identification of *Staphylococcus aureus* were made to turn into negative when intact cocci were converted to L-forms. However, the lost reactions were recovered by reverted strains from L-forms excepting of haemolysis which was not to be reverted.

Unlike other reports, it was shown that L-forms were prone to decrease sensitivity to various antibiotics in this test.

Quantitation of nucleic acid of intact cells and L-forms revealed that L-forms contained almost double amount of RNA, comparing to intact cocci.

Favorable immunological reactions between the intact cocci and L-forms were demonstrated by the method of cross agglutination. However, anti-intact cell antisera did not react specifically with L-forms antigens even with homologous combinations.

Pathogenicity of L-forms in mouse was not demonstrated, while several changes were ascertained by clinical and histopathological examinations.