

Staphylococcus aureus のL型に関する研究

— L型と親型との各種性状比較 —

佐藤平二・田井理一郎^{†1}・福元一幸^{†2}

望月雅美・清水 孜*

(家畜微生物学研究室・*家畜病理学研究室)

平成元年8月10日 受理

Studies on *Staphylococcus aureus* L-Forms

— Comparative Studies on L-Forms and Intact Forms —

Heiji SATO, Riichiro TAIT^{†1}, Kazuyuki FUKUMOTO^{†2}

Masami MOCHIZUKI, Tsutomu SHIMIZU*

(Laboratory of Veterinary Microbiology, *Laboratory of Veterinary Pathology)

緒 言

細胞壁を喪失した細菌である L-forms については、その生物学的存在意義について微生物学者の関心を引き、形態学はもとより、細胞質膜の性状、細胞内代謝、遺伝支配、病原的役割、免疫原性等について多くの研究報告があるが、実験的困難さのためか得られた見解は必ずしも一致していない。我々は前報^{26,27)}に述べたように *Staphylococcus aureus* の stable L-forms の誘導に成功し、その透析培養法を開発した。L-型の研究は完全に細胞壁を失い、親型に戻らないものを用いることが原則であるが、stable L-forms は病原性もなくなるので、病原性試験には unstable (或は transient) L-forms の方が目的に叶う事もある。本報では多くの *Staphylococcus aureus* の stable L-forms, unstable L-forms についてそれらの親株と L 型株相互の性状比較を前報²⁷⁾以外の項目についても試験を行い、興味ある成績を得たのでここに報告する。

実験方法

1. 供試菌株と使用動物

使用した *Staphylococcus aureus* 菌株は18株で、その内訳は教室保存3株 (2695, 2696, 74M), 分与株15株 (北見3-9-D, No. 1~14) 計18株であり、すべて coagulase 産生能, mannitol 分解能陽性であった。マウスは JCL-ICR SPF ♀, 6 週齢体重24~26 g, ウサギは日本白色種♂, 体重2.4~3.0kg のものを用いた。

2. L 型の誘導

L 型の誘導は、前報²⁷⁾同様であるが、爾後本実験で用いられた L 型はすべて透析培養²⁶⁾である。L 型 (以下 L と略す), 親型菌 (以下 P と略す) の生化学的性状は前報²⁷⁾のほかに、アピスタフキット (アスカ純薬 KK) を併用した。サンプル用の菌液は浸透圧調整のため 5% NaCl 濃度になるよう滅菌食塩水を加え、P に NaCl を加えないものも準備した。L の確認は寒天培地上のコロニーまたは懸濁液の 1% 高張サフラニン液 (0.34M 白糖液) および 1% ナイトロブルーテトラゾリウムで染色した。

3. L 型の抗生物質感受性試験

誘導された11株の L とその親株について 5 群11種の細菌感受性試験ディスク (昭和薬品 KK) を用いて行った。その詳細は Fig. 1 の通りである。培地は誘導剤を抜いた L 用基礎培地を用いた。

本研究は文部省科学研究費 (課題番号62560295) の補助により行われたものである。ここに付記して謝意を表明します。

^{†1} 後藤動物病院 272-01市川市相之川4-2-5

Goto Animal Hospital, 4-2-5 Ainokawa, Ichikawa 271-01

^{†2} 鹿児島県与論町産業課 891-93鹿児島県大島群与論町茶花32

Yoron Town Office, Chahana, Yoroncho, Kagosima

Prefecture 891-93

4. L型の菌体構造タンパクの分析

2695, 北見3-9-D, No. 8の各株のPとLおよびL化しないNo. 1株を用いた。2695Lはstable Lであり, ほかの2株のLはtransient Lである。Pは普通寒天平板で37°C 24時間培養菌を滅菌生理食塩水で集菌後, ライソザイム(最終濃度500 μ /ml, 37°C 3時間)またはリゾスタフィン(最終濃度100 μ /ml, 37°C 30分)で溶菌し, 超音波処理(20KHz, 60W 15分)した。この7,000 g 10分遠沈上清をアセトン塩酸(40:1)で濃縮し, 11,000 g 遠心沈渣をsolubilizing bufferを加えてよく混和し100°Cに1分間保ち, 泳動用サンプルとした。電気泳動は, 法¹⁴⁾のごとく行い, 試料20 μ l, 120 V 30mAで4時間泳動後直ちにCoomassie blueで染色を行い写真撮影した。

5. L型の核酸の定量とプラスミド

L型化することにより菌体DNAにどのような変化が起こるかを知らるため, 4株(2695, 2696北見3-9-D, 74M)のPとL菌についてDNAの定量を行った。また, 2695, No. 8の2株についてはプラスミドの検出を試みた。核酸の定量は前報²⁷⁾と同じ方法によった。プラスミド検出にはSmith B法²⁸⁾に従ってDNAを分離し, Dillonら⁸⁾に従いアガールローズゲルによる電気泳動を行った。アガールローズゲルは $\times 1$ TAE bufferに1% (pH 8.0)に溶かし12cm \times 14cmのスラブを作り, 試料は25 μ l, 70 V 3時間泳動し, 臭化エチジウム染色後UVランプ(302nm)透過光で撮影した。

6. L型の血清反応

2695, 北見3-9-D, No. 1, No. 8の4株のPとLにつきウサギを用いて抗血清を作った。Pは普通寒天培養を0.02% マーズニン死菌液(10⁸/ml)とし耳静脈より, 1週間隔4回免疫した。Lは5日間透析培養した菌液3mlと同量のEreund's complete adjuvantを混合し, 皮下接種を行い, 3週後に透析培養菌のみを3ml皮下に注射した。最終免疫の1週間後採血し血清を分離した。凝集抗原としては, Pはブイオン培養菌液を用い, Lは透析培養の5日培養を用いた。凝集反応は生菌発育凝集反応とマイクロプレート凝集反応を行った。生菌発育凝集反応は, 5%にNaClを加えた普通ブイオンを1mlずつ小試験管にとり, 滅菌の後第1管に抗血清を1ml加え, 以後段階2倍希釈を行い各管に0.05mlの抗原液を加えた後, 37°C 24時間培養し菌凝集により判定した。マイクロプレート法は希釈血清50 μ l, 凝集原

50 μ lを用い37°C 6時間の感作後反応を見た。免疫電気泳動用抗原としては, Pは新鮮培養菌の生理食塩水浮遊液にリゾスタフィンを, 最終濃度0.01mg/mlに加え, 37°C 30分間加温したものを菌体抗原とした。Lは透析培養菌液にSDSを0.5%に加えて溶菌させたものを抗原サンプルとした。免疫電気泳動は $\times 2$ バルビタール緩衝液で0.9% (W/V) アガールローズを作り, 20mA, 75分間電流電気泳動の後, 試料溝を作り抗血清を入れ37°C 1夜反応させた。

8. L型の病原性と体内でのL型誘導

病原性試験には2695, 北見3-9-DのPとLおよびL型化しなかったNo. 1株を用いた。

マウス30匹を接種経路別(sc. iv, ip)に3群に分け, それぞれの経路より2695 P (0.66 \times 10⁸/0.2ml), 2695 L (0.31 \times 10⁸/0.2ml) 北見3-9-DP (0.88 \times 10⁸/0.2ml), 北見3-9-DL (0.24 \times 10⁸/0.2ml), No. 1 intact (1.04 \times 10⁸/0.2ml)の所定菌数を接種し, 1週間後にと殺, 膿瘍の有無, 菌回収を指標として病原性の検討を行った。

マウスの免疫は, 2695 Pでは0.5 \times 10⁸/0.5ml (0.02% マーズニン死菌液), 1週間隔3回皮下接種, Lでは, 2695 L透析培養5日目の菌液0.5ml, 1週間隔で3回皮下接種を行った。菌攻撃は最終免疫後10日目に2695 P 2 \times 10⁸/0.5mlを腹腔に注射した。攻撃後は7日間観察したのち解剖して病変を調べ, 菌分離を試みた。

次に, マウス20匹を5群に分け, メトシリン-5を5段階に希釈した(0.01, 0.1, 1.0, 10, 100mg/ml)。2695および北見3-9-DのPを前項の菌数尾静脈より接種し, 1週間後, メトシリンを筋肉注射した。薬剤投与後1週間目にと殺, 解剖して病変を調べ, 腎臓を無菌的に摘出し乳剤をL型基礎培地に塗抹, 37°C 7日間培養してL型の検索を行った。残りのマウスには再度薬剤を投与し1週間後に同様の処置をした。

9. L型によるアジュバント関節炎に関する実験

関節炎のbiological response modifierとしてstaphylococcusのintact cellとL cellがどのような役割をもつかを調べるため, 以下の実験を行った。

菌は2695株と北見3-9-D株のPとLとを用いた。実験動物としてはDA系SPFラット♂, 7週齢, 体重140~160g 13匹を用いた。飼料としては滅菌固形飼料(ラボMR プリーダー, 日本農産工業KK), 飲み水は滅菌蒸留水を与えた。アジュバントはFreundのcompleteおよびincomplete adjuvant (い

ずれも半井化学薬品 KK) を用いた。アジュバント菌液は何れも菌体 1 mg を 2 ml の生理食塩水に浮遊させたものに incomplete adjuvant 2 ml を加え, water in oil エマルジョンの状態にし, ラットの右後肢蹠皮内 (foot pad) に 26 G ツベルクリン注射針で 0.05 ml ずつ注射した。注射後 15 日間注射側と非注射側の足の腫張の有無をマイクロメーターで計測した。15 日後に安楽死させて病理解剖を行い, 関節炎発症部の病理組織学的所見を観察した。投与群は以下の 7 群である。① complete adjuvant のみ, ② incomplete adjuvant のみ, ③ incomplete A. + 2695P, ④ incomplete A. + 北見 3-9-DP, ⑤ incomplete A. + 2695L, ⑥ incomplete A. + 北見 3-9-D, ⑦ 滅菌蒸留水のみで, 第 1 ~ 6 群はラット 2 匹ずつ, 第 7 群では 1 匹用いた。

実験成績

Staphylococcus aureus 18 株中 13 株がメトシリン S により L が誘導された。しかし, 前報²⁷⁾同様 stable L は 2695 株からのみで他は何れも unstable L (transient L) であった。生化学的性状比較では, P と L では概ね同様な性状を示すが, ただ 2695 と No. 8 では,

P は共にウレアーゼ陽性であるのに対し, L は陰性となった点のみが注目された。爾後の実験はこれらの誘導株につき行われた。

1. 抗生物質感受性

実験成績は Fig. 1 に示す通りで, L 型化にともない β ラクタム系とアミノグルコシド系薬剤には耐性となったが, TC, E, CI, C に対しては感受性の亢進が見られた。K, Xp は P, L 共に殆ど感受性が無かった。また, stable L と transient L との間には差を認めなかった。

2. 菌体構造タンパク

SDS-PAGE による L および P の菌体構造タンパクの泳動パターンは Fig. 2, 3, 4 に見られるように, 親株間による相違, L 化するもの (2,695 北見 3-9-D, No. 8) としないもの (No. 1) との間にも顕著な差は無かった。しかし, L に共通し, P と異なる点は, L ではバンド帯が 100 ~ 30kd と広範囲に亘り, P に見られた 58kd バンドの消失である。そして, Fig. 4 では 61 ~ 65kd バンドの存在が明らかに L に特徴的であった。北見 23-9-DL のバンドは 2695 L のそれとは少し異なった。

3. 核酸の定量とプラスミド

Fig. 1. Antibiotics sensitivity of staphylococcal L-forms

Strains	Antibiotics*1										
	Pb	S	ka	Gm	T	E	Ol	L	C	K	Xp
2695 L	○*2	○	○	○	●	△	●	○	○	▲	▲
Kitami L	○	○	○	○	○	●	●	△	○	▲	▲
2695 L	▲	▲	○	○	●	○	▲	▲	●	○	●
74M L	▲	▲	▲	△	●	●	▲	▲	●	●	●
No. 2 L	○	○	○	○	●	●	△	○	○	▲	○
No. 3 L	○	○	○	○	○	●	△	△	○	▲	▲
No. 4 L	○	○	○	○	△	●	○	○	△	▲	▲
No. 5 L	△	●	○	●	●	●	●	●	●	▲	▲
No. 6 L	○	○	○	○	●	●	●	●	●	▲	▲
No. 7 L	○	○	○	○	○	○	○	○	●	▲	▲
No. 8 L	○	▲	○	○	△	○	○	○	○	▲	○

*1 : Pb aminobenzyl penicillin Ol oleandomycin
 S streptomycin L leucomycin
 Ka kanamycin C chloramphenicol
 Gm gentamycin K colistin
 T tetracycline Xp polymixin B
 E erythromycin

*2 : ○ Resistance increased compared to parent strain.
 ● Sensitivity increased, compared to parent strain.
 △ No difference among the L-forms and parent strains.
 ▲ No inhibited zone were formed both L-forms and parent strain.

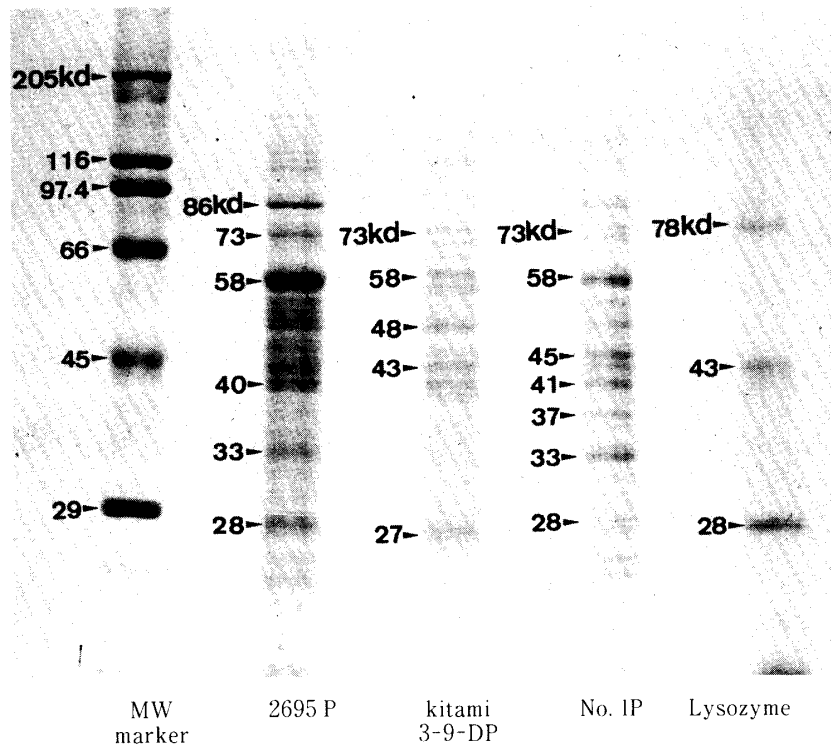


Fig. 2 SDS-PAGE of *Staphylococcus aureus* intact cell lysates

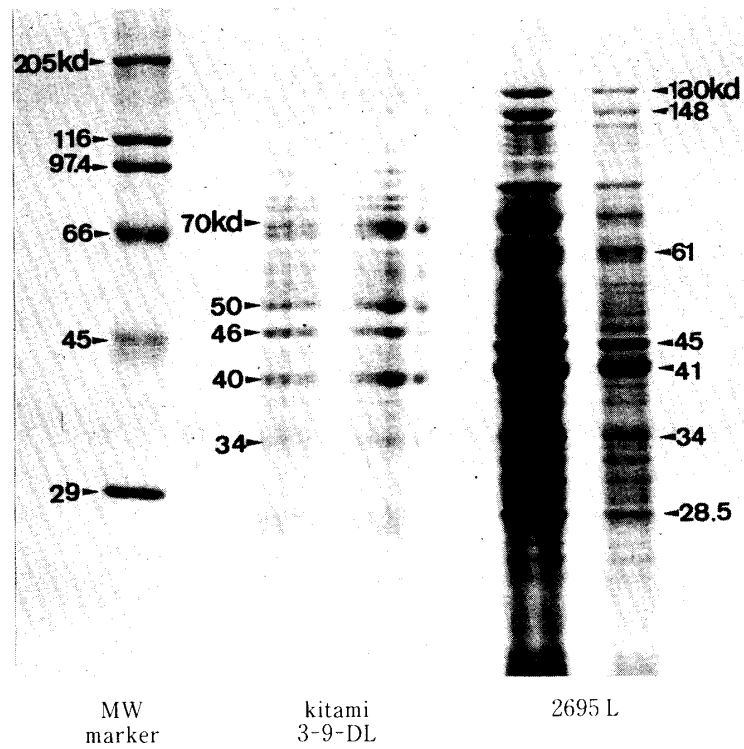


Fig. 3 SDA-PAGE of *Staphylococcus aureus* L-forms lysates

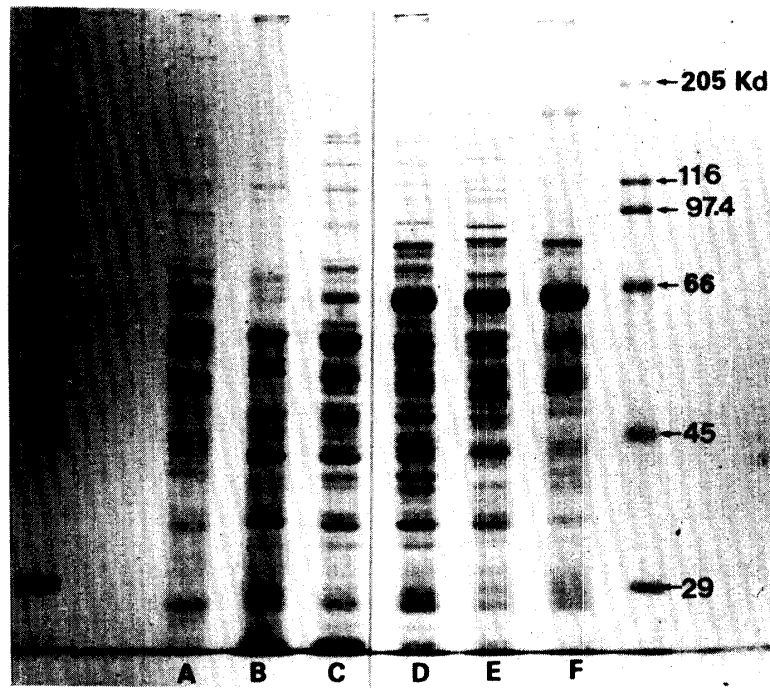


Fig. 4 SDS-PAGE of lysates of *Staphylococcus aureus* intact cell and L-forms

- A KITAMI 3-9-D P
- B 2695 P
- C No. 8 P
- D 2695 L
- E No. 8 L
- F 2695 L

Table 1. Nucleic acid contents of L-forms

Strains	Packed cell (mg)	CFU ($\times 10^7$)	DNA (mg)	RNA (mg)	Total NA (mg)	RNA/DNA	*1 $\mu\text{g}/\text{WPC}$
2695 P	160.1	3300	0.49 (<1%*1)	1.74 (<1%)	2.23	3.55	0.013
2695 L	60.3	2.7	0.02 (40%)	1.35 (38%)	1.47	11.25	0.024
Kitami P	155.3	4400	0.51 (<1%)	1.83 (<1%)	2.34	3.58	0.015
Kitami L	32.7	1.3	0.06 (10%)	0.73 (21%)	0.79	12.16	0.024
2696 P	122.4	7200	0.40 (<1%)	1.42 (<1%)	1.82	3.55	0.014
2696 L	71.5	32	0.16 (31%)	1.21 (27%)	1.37	7.56	0.019
74M P	135.8	7900	0.31 (<1%)	1.29 (<1%)	1.60	4.16	0.011
74M L	79.2	49	0.20 (29%)	1.36 (25%)	1.56	6.80	0.019

*1 : total nucleic acid per 1 mg of wet packed cell

*2 : % of nucleic acid in supernatant fraction, Amount in intracellular nucleic acid is 100%

Table 1 に示したように、全核酸量は stable L, transient L 共に湿菌量 (WPC) に対する割合は親株より増加していた。その割合は約 2 倍であって、特に RNA 含量が著しく増加しており、DNA/RNA 含量比親株の 2 倍以上に達している。また、P, L の

培養上清に含まれる DNA RNA 含量を測定したところ、P では両核酸ともに菌体抽出量の 1% 以下であったが、L においては 10~40% にものぼった。stable L と transient L との間には差異は見られなかった。2695 株と No. 8 株の P, L のアガーローズ電気

Table 2-1. Agglutination test of L-forms
(Growth agglutination)

Antisera	Antigens 2695 P	2695 L	kitmi P	kitami L	No. 1
2695 P	2,048	32	8	8	16
2692 L	1,024	2,048	32	16	4
kitmi P	64	32	1,024	16	16
kitami L	16	32	1,024	2,048	4
No. 1	16	4	8	4	1,024

Table 2-2. Agglutination test of L-forms
(Micro-plate agglutination)

Antisera	Antigens 2695 P	2695 L	No. 8 P	No. 8 L
2695 P	1,024	4	8	4
2695 L	512	256	16	4
No. 8 P	4	4	2,048	16
No. 8 L	4	4	1,024	256

泳動によれば、試料のバンドは全て23130bps より上部に一様なバンドとして認められ、プラスミドの証明は出来なかった。

4. L型の血清反応

生菌発育凝集反応の成績は Tble 2-1 に、マイクロプレート凝集反応は Table 2-2 に明らかなように、抗P血清対P抗原、抗L血清対L抗原、抗L血清対P抗原との間には特異的凝集反応が認めれたが、抗P血清とL抗原との間には殆ど反応は見られなかった。

免疫電気泳動の結果は Fig. 5 に示したが、2695 P 抗原対抗2695 P 血清には弱いながらも沈降線が見られたが、抗2695 L 血清には明瞭な沈降線は見られなかった。2695 L 抗原に対しては抗2695 L 血清は明瞭な沈降線を示したが、抗2695 P 血清は反応を示さなかった。No. 8P 抗原対抗 No. 8P 血清および抗 No. 8 L 血清では共通の沈降線もあるが、抗P血清にのみに反応する沈降線があり、No. 8 L 抗原対抗 No. 8 P 型血清では No. 8 P に特有な坑原が2695 L には欠落していた。

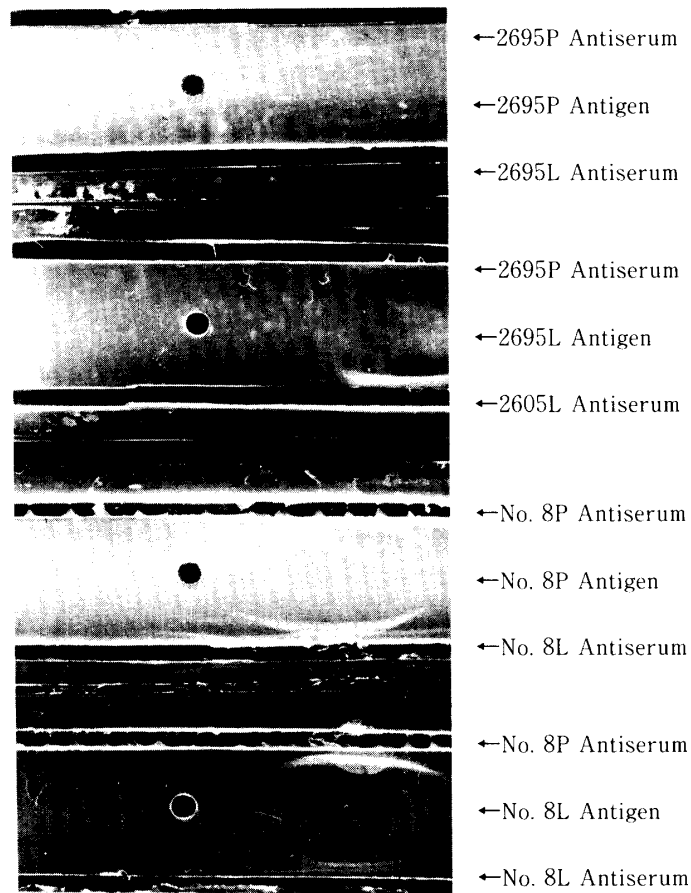


Fig. 5 Immunoelectrophoresis of staphylococcal L-forms and intact cell antigens

5. L型の病原性と体内でのL型誘導

マウスに対する病原性試験の結果は Table 3 に示す様に P を接種したものでは sc, ip に膿瘍形成が見られ、菌の回収も可能であったが、iv の場合は何ら病変が認められず菌の回収も出来なかった。膿瘍の形成は腎、腹膜、皮下、心臓等でみられた。

L 群では何れの場合も全く病変が認められず、菌の回収も不能であった。そこで、L を用いて感染防御試験を試したところ、2695 P で免疫したマウスは攻撃に対し、1 匹に皮下膿瘍と腎の僅かな腫大を認めたのみで他は病変が無く、すべてのマウスの腎、肝、脾からの菌の分離は認められなかった。これに対し、2695 L で免疫されたマウスでは、すべてのマウスの皮下に膿瘍が見られ、大小は異なるが腎、肝、脾の腫大が見られ、菌も回収され、2695 L には感染防御能は認められなかった (Table 4)。

Table 3. Pathogenicity of staphylococcal L-forms

Route of inoculation		2695 P	2695 L	kitami P	kitami L	No. 1
SC	Abscess	-	-	-	+	+
	Recovery of bact.	-	-	-	+	+
IP	Abscess	+	+	-	-	-
	Recovery of bact.	+	+	-	+	-
IV	Abscess	-	-	-	-	-
	Recovery of bact.	-	-	-	-	-

Table 4. Protection test with 2695 P and 2695 L in mice

	Vaccination		Control
	2695 P	2695 L	
Subcutaneous ulceration	1/6	5/6	6/6
Swelling of liver	0/6	6/6	6/6
Swelling of kidney	0/6	6/6	6/6
Swelling of spleen	0/6	6/6	6/6
Recovery of cocci	0/6	6/6	6/6

Note 2695 P: 0.2% merthiolate killed vaccine was subcutaneously inoculated 3 times at 7 days interval. Dose was 5×10^7 cells per 0.5ml.

2695 L: 0.5ml of dialysed culture (5 days culture) was inoculated likewise.

Table 5-1. In vivo induction of staphylococcal L-forms in mouse (Single administration of methocillin-S)

Dose*/mouse	2695 P				kitami P			
	0.01	0.1	1.0	10.0	0.01	0.1	1.0	10.0
Abscess formation	-	+	-	+	-	-	-	-
Isolation of L-forms	+	+	+	+	-	-	-	-

* : mg/mouse

Table 5-2. in vivo induction of staphylococcal L-forms in mouse (Two times administration of methocillin-S)

Dose*/mouse	2695 P				kitami P			
	0.01	0.1	1.0	10.0	0.01	0.1	1.0	10.0
Abscess	-	-	-	-	-	-	-	-
Recovery of L-forms	+	+	+	+	+	+	+	+

* : mg/mouse

マウス体内における L の誘導実験の結果は Table 5-1, 5-2 に示した。2695 P 接種群では 0.01~10mg の薬剤濃度においては、すべてのマウスから L が回収されたが、その継代は出来なかった。一部のマウスに腎、肝、脾からの菌の分離は認められなかった。これに対し、2695 L で免疫されたマウスでは、すべてのマウスの皮下に膿瘍が見られ、大小は異なるが腎、肝、脾の腫大が見られ、菌も回収され、2695 L には感染防御能は認められなかった (Table 4)。

マウス体内における L の誘導実験の結果は Table 5-1, 5-2 に示した。2695 P 接種群では 0.01~10mg の薬剤濃度においては、すべてのマウスから L が回収されたが、その継代は出来なかった。一部のマウスに腎膿瘍が認められたがそれ以外の病変はなかった。更に薬剤を追加投与した群では、全く病変は認められなかったものの L の回収は可能であった。北見 3-9-DP 接種群では、1 回の薬剤投与では病変も認められず、L の回収も出来なかったが、P の回収は可能であった。しかし、薬剤を追加投与した場合には、病変は認められなかったが L が回収された。この場合も継代は出来なかった。

6. L型によるアジュバンド関節炎に関する実験

ラットに Freund の complete adjuvant のみを接種したものは、注射側の蹠は注射後 24 時間までに急速に発赤、腫脹し paw volume も著しい増加を

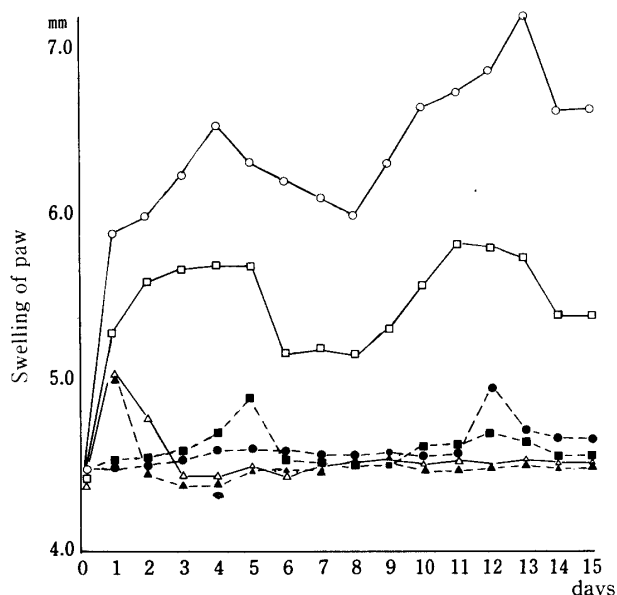


Fig. 6-1 Progress of adjuvant induced arthritis in FCA or FIA administrated rats

Notes

- : FCA injected paw
- : FCA not injected paw
- : FIA injected paw
- : FIA not injected paw
- △ : distilled water injected paw
- ▲ : distilled water not injected paw

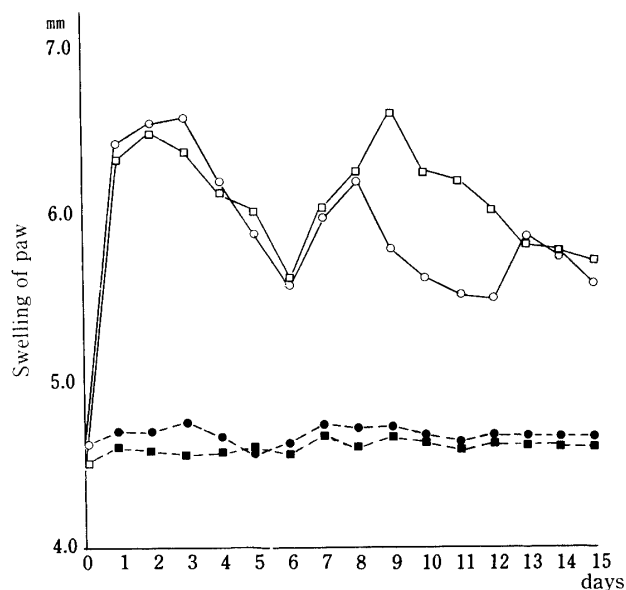


Fig. 6-2 Progress of adjuvant induced arthritis in FIA and intact cell administrated rats

Notes

- : FIA+Kitami 3-9-DP injected paw
- : FIA+Kitami 3-9-DP not injected paw
- : FIA+2695P injected paw
- : FIA+2695P not injected paw

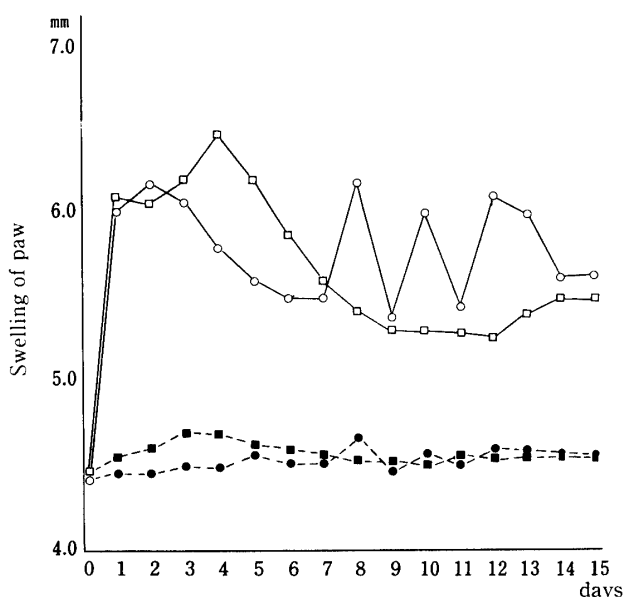


Fig. 6-3 Progress of adjuvant induced arthritis in FIA and L-forms administrated rats

Notes

- : FIA+Kitami 3-9-DL injected paw
- : FIA+Kitami 3-9-DL not injected paw
- : FIA+2695L injected paw
- : FIA+2695L not injected paw

見せた。その増加は注射後4日目にピークに達し、それ以後8日目までやや減少したが、9日目以降再び著しい増加を見せた。この際、注射しなかった側の paw volume もやや増加した。13日目のピークは4日目のピークより更に高いものになった。incomplete adjuvant のみを接種したラットでは、complete adjuvant を接種したものと同様の変化を示したが、腫脹の度合は complete adjuvant を接種したものの約半分であった。対照として蒸留水を接種したものでは、接種翌日やや腫脹したが、2日目からは注射側、非注射側ともに投与前と殆ど変化無かった (Fig. 6-1)。P 菌体を incomplete adjuvant に加えて接種したラットの変化は Fig. 6-2 に示した。第3群、第4群共8日目まではほぼ同様の変化を示した。注射後1日目で著しい発赤、腫脹を見たが、それは第1群より著しいものであった。注射後2~3日で腫脹は急激に減少し、6日目で最低となったが7日目から再び増加し始め、第3群は9日目にピークを迎えたが第4群では再び減少して12日目まで続き、13日目に再び増加したもののそれ以後は第3群と同様に一定の割合で減少している。この間、非注射側での変化は殆ど認められなかった。incomplete adjuvant にLを

加えたものを接種したラットでは Fig. 6-3 に見るように P の場合と異なり複雑な変化を示した。第 5 群では注射後 4 日目でピークに達した。この間の経過は親株の場合と同様であるが、その後 12 日目まで徐々に paw volume が減少した。この減少は他の群では見られなかったものである。第 6 群では 2 日目にピークを認めたが、その後 7 日目まで減少したが、その後は 1 日ごとに増減を繰り返し一定しなかった。しかし、14 日以降は第 5 群と同様に推移した。

考 察

細菌に対する抗生物質の作用機序については、不明な点が多いので、L 型菌を用いて研究することは有用であると思われる。しかし、一方 L に変化したことにより、菌の生理がどのように変るかに配慮する必要があり、transient L では誘導剤が無いと P に戻る可能性があるから実験には制限がある。今回の実験に用いた transient L は P に戻るのに 2~3 回の継代を要するものであったから一応の成績が得られた。実験の結果は前報²⁷⁾とやや異なるものもあったが、2695 L の成績は一致した。これまでの多くの報告では、傾向として L 型は β ラクタム系のような細胞壁形成阻害剤に対して耐性であり、細胞内代謝に作用する薬剤に対しては感受性の亢進が見られるとする報告が多い^{13,15,16,17)}。一方、L 型は細胞質膜に作用する薬剤に対しては耐性を獲得すると言われる^{28,33)}。今回の実験結果では、失張りアミノペニシリンに対しては耐性を獲得しているものが多かった。しかし、細菌のタンパク合成を阻害する薬剤に対してはかなり異なった反応が見られている。すなわち、アミノグリコシド系薬剤に対しては L は耐性を獲得しているが、テトラサイクリン系、クロラムフェニコール系およびマクロライド系のエリスロマイシン、オレアンドマイシンに対しては逆に感受性が増大している。この結果は Yamamoto ら³³⁾の *Ps. aeruginosa* の L で行った結果と良く似ている。このような現象の理由は不明であるが、薬剤の作用点に微妙な差異があると考える他に、L には P とは異なるタンパク合成系が用意されていることも考えられる。細胞質膜に作用するコリスチン、ポリミキシン B に対しては、L 型のみならず P も耐性であった。この両薬剤はグラム陰性菌に対してより有効であるが、Schmitt-Slomska²⁹⁾によると、グラム陽性菌の P および L に対しては両薬剤ともに MIC が 100 μ g であったが、陰性菌では P より L で著し

く感受性が亢進していたと言うから、cell wall の欠損は感受性菌にとっては感受性の増大につながるが、耐性菌にとっては cell wall の欠損は感受性には関係しないことを示している。

細菌の薬剤耐性を考えるとき、プラスミドについての考察が必要であると思ひ、PAGE によるプラスミド DNA の分離を試したが試験した 3 株ではプラスミドは証明されなかった。細菌 L が単に細胞壁を欠損しているのみとは考えられず、L 化に伴い細胞の代謝の変化が起こっていることは十分に想像されるところであり、菌体構成タンパクについて L と P の比較を行った報告が幾つかあげられる^{3,4,10,11,18,32)}。今回の実験では P と L とのバンドを比較すると菌株による差はあるがその間には L 化に伴う変化が認められる。すなわち、L ではバンドの出現する範囲は P に比べて広範囲に亘り、58 kd のバンドが消失し 61 kd バンドが濃厚に出現している等が注目された。King¹⁸⁾らは *Staph. aureus* の P, L およびプロトプラストについて PAGE を行い L のみが異なる泳動を示すことを報告し、また、Gilpin¹¹⁾らは *B. subtilis* を用いてプロトプラストと L を比較し、L のバンドはより高分子域にあることを述べている。我々の実験成績も一部に、例えば L に見られた 181kd, 148kd バンドのごときものがあつた。しかし、注意すべきことは、*Staph. aureus* での SDS-PAGE で菌体構成タンパクを調べると、液体培養と固形培地培養により菌体構成タンパクに差異があると言う報告もあり⁴⁾、この種の実験が極めて鋭敏なだけに結果の判断に慎重さが望まれることである。菌体全核酸量の比較では、ほぼ前報²⁷⁾と同様の結果であった。RNA 量が L で増大していることの意義についてはなお不明である。アガーロス電気泳動によるプラスミド DNA の検出は成功しなかった。Stable L については、Hoye ら¹²⁾は細胞壁合成酵素の遺伝子が stable L 型化に際して失われていると述べているが、我々が用いている 2695 株は極めて L 化しやすく、しかも容易に stable L となる点で他の株とは異なり、遺伝的に特異なものと思われる。此れまでの経過から、細菌の L 化は適応性の変化なのか或は突然変異なのかは必ずしも明らかではないが、今後これらの点について調べてゆきたい。次に、L に関する血清学的試験は、stable L の鑑別の面からも重要な問題である。更に、細菌における細胞壁が持つ病原的あるいは抗原的な重要性を考えると、L と P の抗原解析は L 研究の一つのアプローチと考えられるので、前報²⁷⁾同

様の実験を行った。その結果は、生菌発育凝集反応、マイクロプレート凝集反応ともに全く同様で、抗L血清がP、L抗原双方に高い凝集価を示したのに対し、抗P血清はP抗原には高い凝集価を示したにもかかわらず、L抗原に対しては殆ど反応せず、また菌株間の交差凝集も弱いものであった。このことは、L菌体は免疫原として抗P、抗L両抗体を作る、ことが出来るのに対し、P菌体抗原はL抗原に対する抗体を作り得ない事になる。すなわち、PとLとは膜を含む細胞質が全く同質のものではないことを示している。免疫電気泳動の結果は必ずしも凝集反応の結果とは一致しなかった。2695 P抗原に対しP、L両抗体とも沈降帯が殆ど認められなかったが、これと同様な結果は前報²⁶⁾にも見られており、興味ある点であり今後検討したい。Lの病原性についての報告は多く^{2,5,7,9,27)}細菌はL化することにより病原性を失うとするものが多い。今回のマウスの実験でも否定的であった。しかし、体内感染菌が抗生物質によりL化したものがPに復帰した場合も考えるとき、体内でのLの誘導は興味がある。なぜなら、前項にも明らかなように、Lは抗P抗体の作用を免れる可能性があるからである。実験の結果は、薬剤によるLの体内誘導は以外に容易であって2度の薬剤投与により誘導は確実であり、しかも、病巣発現を伴わないものもあることは病巣感染または慢性感染症の発症にLが関わっているのではないかと想像させる。細菌細胞壁は、菌種を問わず基本的に類似した構造を持つペプチドグリカン部(PG)と菌属、菌種により化学的組成の異なる非ペプチドグリカン部とからなり、クラミジア、マイコプラズマを除くすべてに細菌に共通する構築成分である。この構築成分の生体機能を調節する多彩な生物学的活性物質(Biological response modifier: BRM)としての作用が、Freund's complete adjuvant (FCA)やIncomplete adjuvant (FIA)に菌体成分を加えたアジュバント関節炎モデルより研究されており^{19,20,24,25,30)}、その作用を持つ事が報告されている^{21,31)}。特に病原性菌、寄生細菌種のPGに関する構築単位であるN-アセチルムラミール-L-アラニール-D-イソグルタミン(MDP)がPGのBRM作用の大部分を担う最小単位であることが確認されるにおよび研究の飛躍的發展がもたらされた^{1,6,22)}。我々はFIAと*Staph. aureus*のPとLを用いてそのMDPの有無による関節炎発症の様相を調べたところ、FCA接種ラットでは関節炎を発症し、paw volumeの増加は2つの

ピークを示し、一次炎症、二次炎症によるものと思われた。二次炎症においては非注射側のpaw volumeも増加した。FIA接種群ではFCA接種群より程度は軽いが関節炎を発症した。FIAに2695 P、北見Pをそれぞれ加え接種したものはFCA接種群と同様の変化を示し、菌に含まれるPGによるものと思われた。FIAにLを加え接種したものでは、2695 Lを加えたものは一次炎症は見られたがpaw volumeは減少し続け二次炎症が認められなかった。stable LはPGを含まないから、BRM作用を示したものの実体は不明であるが、二次炎症を起こすことなく不完全に免疫を刺激するものである。これに対し北見Pを加えて接種したもののグラフは一次炎症が下がった後一日ごとにpaw volumeに増減を繰り返した。unstable Lである北見Lには不完全ながらも若干の細胞壁が残存しているからであろうと思われるが、このような複雑なパターンとなる理由は不明であった。

要 約

メトシリンとNaCl高張培地を用いて*Staphylococcus aureus*のL型を誘導し、その生物学的性状、細胞成分および病原性についてしらべ、以下のような知見を得た。

抗生物質に対する感受性はL型化により、細胞壁形成阻害性の薬剤に対して耐性となるが、タンパク合成阻害性の薬剤に対しては一樣な傾向を示さなかった。

菌体構成タンパクの比較ではL型は親株とは異なるバンドを示し、菌体構成、酸素作用等におい両者の間には相違があり、L型は単なる細胞壁欠損細菌ではないと思われた。

L型菌はマウスに対し病原性が極めて弱く、感染防御能も誘導しないが、抗体産成は刺激する。親株との交差凝集試験では特異な反応を示す、親株接種マウスをメトシリンSで治療すると、容易に体内でL型化するが、マウスより分離されたL型は培地上で継代出来なかった。ラットのアジュバント関節炎作出の際*Staphylococcus aureus* stable L-formsを用いると、二次炎症を生じせしめない特異な病性を示し、stable L-formsはbiological response modifierとして特異なものであることが明らかにされた。

文 献

- 1) Adam, A., and Lederer, E.: Muramylpeptides: immunomodulators, sleep factors, and vitamins, *Med. Res. Rev.* **4**, 111-152 (1984)
- 2) Butler H. M., Blakey, J. L.: A review of bacteria in L-phase and their possible clinical significance. *Med. J. Aust.*, **2**, 463-467 (1975)
- 3) Cheung, A. L., Bayer, A. S., Peter, J., and Ward, J. I.: Analysis by gel electrophoresis, Western Blot, and peptide mapping of protein A heterogeneity in *Staphylococcus aureus* strains. *Infect. Immun.*, **55**, 843-847 (1987)
- 4) Cheung, A. L., and Fischetti, V. A.: Variation in the expression of cell wall proteins of *Staphylococcus aureus* on solid and liquid media. *Infect. Immun.*, **56**, 1061-1065 (1988)
- 5) Charache, P.: Cell wall-defective bacterial variants in human disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **174**, 903-911 (1970)
- 6) Chedid, L., Audibert, F., and Johnson, A. G.: Biological activities of muramyl depeptide, a synthetic glycopeptide analogous to bacterial immunoregulating agents. *Prog. Allergy*, **25**, 63-105 (1978)
- 7) Clasener, H.: Pathogenicity of the L-phase of bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, **26**, 55-84 (1972)
- 8) Dillon, J. R., and Nasim, A. (eds.), 岡田吉美, 猪飼輝子訳: 組み換え DNA 実験, p. 9-35, 東京化学同人, 東京 (1987)
- 9) Feingold, D. S.: Biology and pathogenicity of microbial spheroplasts and L-forms. *New England J. Med.*, **20**, 1159-1169, (1969)
- 10) 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)
- 11) Gilpin, R. W., Young, F. E., and Chatterjee, A. N.: Characterization of a stable L-form of *Bacillus subtilis* 168, *J. Bact.* **113**, 486-499 (1973)
- 12) Hoyer, B. H., and King, J. R.: Deoxyribonucleic acid sequence losses in stable L-form state to intact bacterial cell. *Nature*, **244**, 505-507 (1973)
- 13) Hubert, E. G., Kalmanson, G. M., Montgomerie, J. Z., and Guze, L. B.: Activity of methacycline, related tetracycline, and other antibiotics against various L-forms and their parent bacteria in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2**, 276-280 (1972)
- 14) 泉 美治, 中川八郎, 三輪谷俊夫編: 生物化学実験のてびき 2. タンパク質の分離・分析法, p. 21-35, 化学同人, 京都 (1985)
- 15) Kagan, B. M., Zolla, s., Busser, R., and Liepnieks, S.: Sensitivity of coccal and L-forms of *Staphylococcus aureus* to five antibiotics. *J. Bact.*, **88**, 630-632 (1964)
- 16) Kagan, B. M.: Antibiotic sensitivities of staphylococcal L-forms. in Guze, L. B. (ed.), *Microbial protoplasts, spheroplast and L-forms*. p. 314-318, Willams & Wilkins, Baltimore (1968)
- 17) Kalvodova, D.: L-forms of *Listeria monocytogenes*. Induction in vitro and sensitivity to antibiotics. *Cs. Epidem. Mikrobiol., Immunol.* **23**, 276-281 (1974)
- 18) King, J. R., Theodore, T. S., and Cole, R. M.: Generic identification of L-forms by polyacrylamide gel electrophoretic comparison of extract from parent strains and their derived L-forms. *J. Bact.*, **100**, 71-77 (1969)
- 19) Kohashi, O., Kuwata, J., Umehara, K., Takahashi, T., and Ozawa, A.: Susceptibility to adjuvant-induced arthritis among germ-free, specific pathogen free and conventional rats. *Infect. Immun.*, **26**, 791-794 (1979)
- 20) Kohashi, O., Takahashi, T., Uemura, F., Aoki, Y., and Ozawa, A.: Adverse effect of Gram-positive and Gram negative bacteria on BCG-induced polyarthrititis in germfree rats. in Sasaki, S. Ozawa, A., and Hashimoto, K. (eds.), *Recent advances in germ-free research*. p. 751-754, Tokai Univ. Press, Tokyo (1981)
- 21) 小谷尚三: 細菌細胞壁ペプチドグリカンおよびその構築単位の生物学的活性, 特に免疫強化作用, 生化学, **48**, 1081-1107 (1976)
- 22) 小谷尚三, 高田春比古: 細菌細胞壁ならびに関連する合成標品 (ムラミルペプチド) の免疫薬理作用, 薬学雑誌, **103**, 1-27 (1983)
- 23) 日本化学会編: 生化学実験講座 2 核酸の化学 I. p. 49-50, 東京化学同人, 東京 (1987)
- 24) Pearson, C. M.: Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvant. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.*, **91**, 95-101 (1956)
- 25) Pearson, C. M., Wood, F. H., McDaniel, E. G., and Daff, F. S.: Adjuvant arthritis induced in germ-free rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **112**, 91-93 (1963)
- 26) 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, **29**, 127-131 (1979)
- 27) 佐藤平二, 大宅辰夫: *Staphylococcus aureus* L-forms の生物学的性状および病原性に関する研究, 鹿大農学術報告, **37**, 167-174 (1987)
- 28) Schmitt-Slomska, J.: L-forms as models for the study of antibiotic activities. in Madoff, s. (ed.), *The Bacterial L-forms*. p. 229-262, Mercel Dekker, New York (1981)
- 29) Schmitt-Slomska, J.: L-forms as model for the study of antibiotic activities. in Madoff, s. (ed.), *The Bacterial L-forms*. p. 229-262, Marcel Dekker, New York (1986)
- 30) Sofia, D., knobloch, L. C., and Vassar, H.: Inhibition of the primary lesion of adjuvant induced polyarthrititis in rats (18-hour-arthritis test) for specific detection of clinically effective antiarthritic drugs. *J. Pharm. Exp. Therap.*, **193**, 918 (1975)
- 31) Stewart-Tull, D. E. S.: The immunological activities of bacterial peptidoglycans. *Ann. Rev. Microbiol.*, **34**, 311-340 (1980)
- 32) Theodore, T. S., Tully, J. G., and Cole, R. M.: Polyacrylamide gel identification of bacterial L-forms and Mycoplasma species of human origin. *Appl. Microbiol.*, **21**, 272-277 (1971)
- 33) Yamamoto, A., and Homma, J. Y.: L-form of *Pseudomonas aeruginosa* II. Antibiotic sensitivity of L-forms and their parent forms. *Jap. J. Exp. Med.*, **48**, 355-362 (1978)

Summary

In methicillin contained hypertonic inducing media, 14 strains of L-forms were induced from 18 *Staphylococcus aureus* strains. Comparative tests were performed with stable L-forms and intact parent bacterial strains. Resistance to the drugs disturbing cell-wall-formation increased in both stable and unstable L-forms, on the other hand, inhibitory effect of the drugs disturbing the cytoplasmic protein synthesis was not similar to the case of L-forms. SDS-PAGE analysis of structural protein detected a remarkable difference between L-forms and intact cells. This fact indicate the fact that the structural component and or metabolism of L-forms are not the same one as those in their parent intact cells. In spite of the successful antibody induction no pathogenicity or protective effect was proved by L-forms. Concerning in vivo induction of L-forms, methicillin could readily induce L-forms in the intact cocci inoculated mice. However, isolated L-forms on L-form media, or the depleted methicillin did not succeed the passage generation on to the artificial media. Staphylococcal stable L-forms participated a peculiar role in adjuvant-induced arthritis in rats. When the stable L-forms cells were inoculated with Freund's incomplete adjuvant into a rat foot-pad, it caused an atypical adjuvant-induced arthritis lacking in secondary inflammation, while the intact cocci, instead, made typical double peaked arthritis. By this result it is suggested that stable L-forms cells may harbour a special biological response modifier substance.