

L-form に関する研究

第Ⅲ報 L-form の血清学的研究

金沢大学医学部微生物学教室(主任 谷友次教授)

専攻生 前川一郎

(昭和33年12月5日受付)

Studies on the L-form of Bacteria

Report III Serological Behaviour

ITIRO MAIKAWA

Department of Microbiology, School of Medicine, Kanazawa University

(Director : Prof. Dr. T. Tani)

ABSTRACT

The serological behaviour of the L-form of *Proteus vulgaris* is reported in this paper. To study this serological behaviour, immune rabbit sera were prepared with the OH antigen, O antigen and L antigen of *Proteus vulgaris*, and the sera tested in cross-agglutination and cross-absorption experiments.

In this way the result is as follows :

The serological property of the L-form is the same as that of O antigen of the parent bacillary strain.

I. 緒言

L-form の血清学的研究は *Streptobacillus*, *Proteus*, *Salmonella* についてそれぞれ研究されているが、多くの菌株は L-form と原細菌は血清学的に同一性を示したが、ある菌株ではその差異は凝集価に現われ、L-form では幾分低い価を示した、といわれている¹⁾。

動物に対して病原性を有する菌株の L-form は非

病原性であるにも拘らず動物体内において免疫反応を惹起することは興味あることと思われる²⁾。

著者は第1報に報告した如く *Proteus* 菌より誘導発生せしめた L-form について¹⁰⁾ OH 抗原、O 抗原、L 抗原による家兎免疫血清を作製し凝集反応、吸収試験を実施し興味ある結果を得たので、ここにその実験成績を報告する。

II. 実験材料及び実験方法

1. 家兎免疫血清の製法⁴⁾⁵⁾
 1. OH 血清の製法
 抗原としては、Hx7 号株の菌を、ブイヨン培養 37°C 20 時間培養したものに 0.5% の割に局方ホルマリンを加え、37°C 24 時間、更に室温一夜放置した菌液を用いた。この菌液はそのまま氷室に保存し、免疫が終るまで同じ菌液を用いた。

第1回(第1日)上記抗原 0.5cc 静注

第2回(第5日) 1.0cc 静注
 第3回(第9日) 1.5cc 〃
 第4回(第13日) 2.0cc 〃
 一部採血(第20日)凝集価測定
 全採血(第22日)

以上の如く作製した免疫血清を 56°C 30分加熱し非働性にした後 0.5% の割に局方石炭酸を加え氷室に保存実験に供した。

2. O血清の製法

抗原として Hx7 号株菌を、寒天斜面に20時間培養した菌苔を、生理的食塩水 1cc 中 1mg の割に浮遊せしめ、100°C 2 時間半煮沸したものをを用いた。この菌液は氷室に保存し実験に供した。免疫方法、免疫血清の処置は OH 血清に準ずる。

3. L血清の製法¹⁰⁾

抗原として Hx7 号株の菌を、GMT 牛血清加培地 (牛血清 15%, ペニシリン 1500u/ml) に、14代~20代継代培養したL型菌株を7日~10日間、GMT 牛血清加培地に培養した菌苔を生理的食塩水 1cc 中に 1mg の割に浮遊せしめ、0.5%の割にホルマリン (局方) を加え室温に一夜放置し、氷室に保存し実験に供した。免疫方法、免疫血清の処置は OH 血清に準ずる。

2. 凝集反応術式^{4) 5) 6)}

1. 実験方法

1) 血清の稀釈

各免疫血清を生理的食塩水で、2倍稀釈法によつて稀釈し、小試験管にそれぞれ 0.5cc 入れた。

2) 菌液

OH 菌液は肉水製普通寒天斜面に 37°C 20時間培養した菌苔を、生理的食塩水 1cc 中 2mg の割に浮遊せ

しめた。

O菌液は寒天斜面20時間培養した菌苔を、生理的食塩水 1cc 中 2mg の割に浮遊せしめたものを 100°C 2 時間半煮沸した菌液。

L型菌液はそれぞれ GMT 牛血清加培地に 7~10 日間培養した菌苔を生理的食塩水 1cc 中 2mg の割に浮遊せしめた菌液。

3) 術式

以上の段階稀釈した各血清 0.5cc 入れた小試験管に、それぞれの菌液一滴宛を加えて振盪混和し、37°C 孵卵器内 2 時間保つた後、取出して氷室内に一夜放置後、取出して肉眼及び凝集鏡で成績を観察した。

3. 吸収試験の術式^{4) 5) 6) 7)}

吸収抗原としての OH 型菌、O型菌、L型菌の各抗原は第2章第2節の如く作り、他方免疫血清は凝集反応に使用したものをを用いた。

OH 血清は25倍に稀釈し、O血清及びL血清は5倍に稀釈した各血清 1cc にそれぞれの菌苔を 100mg 以上を加え、濃厚乳剤とした。これを 37°C に3時間保つた後氷室内に一夜保存し翌日取出して毎分 12,000 廻転30分間遠心し、上清をとる。この各上清血清について、前述の定量的凝集反応に準じて凝集反応を行った。

III. 実験成績

1. 凝集反応

OH 型、O型、L-form の各抗原と OH, O, 及び L の各家兔免疫血清との間に交錯凝集反応を実施した実験成績は第1表より第4表に示した。

A. OH 血清に対しては、OH 抗原は 1:25,600 倍迄 (+), O 抗原は 1:800 倍迄 (+), 1:1,600 倍 (±), L 抗原は 1:800 倍迄 (+), 1:1,600 倍迄 (±) であつた。

B. O 血清に対しては、OH 抗原は 1:1,600 倍迄 (+), 1:3,200 倍 (±), O 抗原は 1:1,600 倍迄 (+), 1:3,200 倍 (±), L 抗原は 1:800 倍迄 (+), 1:1,600 倍 (±) であつた。

C. L 血清 (14代) に対しては、OH 抗原は 1:800 倍迄 (+), 1:1,600 倍 (±), O 抗原は 1:800 倍迄 (+), 1:1,600 倍 (±), L 抗原は 1:800 倍迄 (+), 1:1,600 倍迄 (±) であつた。

第1表 OH 血清の凝集反応

OH 血清 稀釈 抗 原	50x	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	K
OH	##	##	##	##	##	++	++	++	+	+	-	-
O	##	##	++	++	+	±	-	-	-	-	-	-
L (14代)	##	++	++	+	+	±	-	-	-	-	-	-
L (20代)	##	++	++	+	+	±	-	-	-	-	-	-

第2表 O血清の凝集反応

O血清 抗原	稀釈	50x	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	K
OH		++	++	++	++	+	+	±	-	-	-	-	
O		+++	+++	+++	+	+	+	±	-	-	-	-	
L (14代)		++	++	++	+	+	±	-	-	-	-	-	
L (20代)		++	++	++	+	+	±	-	-	-	-	-	

第3表 L血清 (14代) の凝集反応

L血清 抗原	稀釈	50x	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	K
OH		++	++	++	+	+	±	-	-	-	-	-	
O		+++	+++	+++	++	+	±	-	-	-	-	-	
L (14代)		+++	+++	++	+	+	±	-	-	-	-	-	
L (20代)		+++	+++	++	+	+	±	-	-	-	-	-	

D. L血清 (20代) に対しては, OH 抗原は 1:800 倍迄 (+), 1:1,600 倍 (±), O 抗原は 1:800 倍迄 (+), 1:1,600 倍 (±) であつた.

第4表 L血清 (20代) の凝集反応

L血清 抗原	稀釈	50x	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	K
OH		++	++	++	+	+	±	-	-	-	-	-	
O		+++	+++	+++	++	+	±	-	-	-	-	-	
L (14代)		+++	+++	++	+	+	±	-	-	-	-	-	
L (20代)		+++	+++	++	+	+	±	-	-	-	-	-	

以上要約すると OH 血清に対する OH 抗原の凝集価が遙かに高く, O血清に対するO抗原及びL血清に対するL抗原の凝集価は僅かに1本の差でL抗原が低い価を示した. 又 OH 血清, O血清, L血清は何れも OH, O, L (14代), L (20代) の4種抗原を凝集したので共通抗原が存在することが予想され凝集素吸収試験を実施した.

2. 吸収試験

1. OH 家兔免疫血清の吸収試験

第5表より第8表に示す如く, OH 血清を OH 抗原で吸収すると, 後次の凝集反応において OH, O, L

(14代), L (20代) の各反応抗原に対しても何れも 1:25 倍 (-) であつた.

OH 血清をO抗原で吸収すると後次凝集反応において OH 抗原に対し 1:2,800 倍 (+), 1:25,600 倍 (±), O 抗原に対して 1:25 倍 (-), L 抗原に対し 1:25 倍 (-) であつた.

OH 血清をL抗原 (14代及び20代) をもつて吸収すると後次の凝集反応において OH 抗原に対し 1:2,800 倍迄 (+), 1:25,600 倍 (±), O 抗原に対し 1:25 倍 (-), L 抗原 (14代及び20代) に対し何れも 1:25 倍 (-) の成績を示した.

第5表 OH 血清を OH 抗原で吸収

血清稀釈 抗 原	25x	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200
OH	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
O	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L (14代)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L (20代)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

第6表 OH 血清をO抗原で吸収

血清稀釈 抗 原	25x	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200
OH	卅	卅	卅	++	++	++	++	+	+	+	±	—
O	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L (14代)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L (20代)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

第7表 OH 血清をL抗原(14代)で吸収

血清稀釈 抗 原	25x	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200
OH	卅	卅	卅	卅	++	++	++	+	+	+	±	—
O	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L (14代)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L (20代)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

第8表 OH 血清をL抗原(20代)で吸収

血清稀釈 抗 原	25x	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200
OH	卅	卅	卅	卅	++	++	++	+	+	+	±	—
O	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L (14代)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L (20代)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

2. O型家兔免疫血清の吸収試験

第9表より第11表に示す如くO血清をO抗原で吸収すると後次の凝集反応においてOH, O, L(14代及び20代)の各反応抗原に対して何れも1:25倍(—)で

あつた。

O血清をL抗原(14代及び20代)で吸収すると後次の凝集反応においてOH, O, L(14代及び20代)の各反応抗原に対して何れも1:25倍(—)の成績を示

第9表 O血清をO抗原で吸収

血清稀釈 抗 原	25x	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200
OH	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
O	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L (14代)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L (20代)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

第10表 O血清をL抗原(14代)で吸収

血清稀釈 抗 原	25x	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200
OH	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
O	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L (14代)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L (20代)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

第11表 O血清をL抗原(20代)で吸収

血清稀釈 抗 原	25x	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200
OH	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
O	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L (14代)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L (20代)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

した。

3. L-form 家兔免疫血清の吸収試験

第12表より第17表に示す如くL血清(14代及び20代)をO抗原をもつて吸収すると後次の凝集反応はOH, O, L(14代及び20代)各反応抗原に対し何れも1:25

倍(—)であつた。

L血清(14代及び20代)をL抗原(14代及び20代)をもつて吸収すると後次の凝集反応はOH, O, L(14代及び20代)の各反応抗原に対して何れも1:25倍(—)の成績を示した。

第12表 L血清(14代)をO抗原で吸収

血清稀釈 抗 原	25x	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200
OH	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
O	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L (14代)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L (20代)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

第13表 L血清(20代)をO抗原で吸収

抗 原	血清稀釈	25x	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200
OH		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L (14代)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L (20代)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

第14表 L血清(14代)をL抗原(14代)で吸収

抗 原	血清稀釈	25x	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200
OH		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L (14代)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L (20代)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

第15表 L血清(14代)をL抗原(20代)で吸収

抗 原	血清稀釈	25x	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200
OH		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L (14代)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L (20代)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

第16表 L血清(20代)をL抗原(14代)で吸収

抗 原	血清稀釈	25x	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200
OH		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L (14代)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L (20代)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

第17表 L血清(20代)をL抗原(20代)で吸収

血清稀釈 抗原	25x	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200
OH	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
O	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L (14代)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L (20代)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

以上第2節の吸収試験を要約すると

(1) OH血清をO抗原で吸収しても、L抗原で吸収してもH凝集反応のみ残るから、O抗原もL抗原もH抗原を有しない。

(2) O血清をO抗原で吸収しても、L抗原で吸収

しても凝集反応が残らない。又L血清をO抗原で吸収しても、L抗原で吸収しても凝集反応が残らない。故にO抗原とL抗原は同一である。

(3) 継代培養14代と20代のL-formの間には血清学的差異が認められなかつた。

IV. 総括並びに考按

L-formの血清学的研究に関しては Dawson & Hobby は *S. moniliformis* と L₁ は血清学的関係は同一であり両者間に血清学的差異が認められなかつた、と述べた。同様の見解を Oerskow & Heilman は凝集素吸収試験の結果支持した¹⁾。

Bacteroides の L-form の血清学的研究は未だ実施されていない¹⁾。

Proteus では Dienes, Weinberger & Madoff ら *Proteus* 菌3株とそのL型菌の家兔免疫血清を作り検査した結果、2株は原細菌とL型菌とは凝集反応が同一であつたが他の1株は原細菌とL型菌は互いに他の血清で僅かしか反応しなかつた、と述べている。又凝集素吸収試験の結果は、原細菌は原細菌血清及びL血清の両者の凝集素を吸収するが、L型菌は原細菌血清中の凝集素の一部を吸収しない、と述べている。

Tulasne はL型菌中にはH抗原が存在しないが他の細菌性抗原が存在する、と述べている¹⁾。

Salmonella については細菌及びL型菌で作られた家兔免疫血清は両方等しく反応した、と Dienes, Weinberger & Madoff らは報告している^{2) 3)}。

1955年 Prittwitz & Gaffron は *Proteus* 菌のL型家兔免疫血清の力価の高さはOH家兔免疫血清のそれより低い価を示した、と報告している²⁾。

1957年 Poetscheke et al は fluorescein-markierte Antikörper法を利用して *Proteus* 菌とL型菌の血清学的関係について研究しているが、それによると鏡検上、桿菌は表面上に着色し、labile L-Phase は large

bodyの表面上及びその周囲の small form の部分が着色され、stable L-phase も同様に着色された、と述べている²⁾。

以上諸家の報告と著者の実験成績を比較考按するに、著者は *Proteus* 菌の OH 抗原、O 抗原、L 抗原(14代)及びL抗原(20代)のそれぞれの家兔免疫血清を作製し、交錯凝集反応を施行した実験成績では当該家兔免疫血清は当該抗原を凝集した。その力価の高さはOH血清に対するOH抗原の凝集価は遙かに高く、次にO血清に対するO抗原及びL血清に対するL抗原の凝集価は僅かに1本の差でL抗原が低い価を示した。次に4種家兔免疫血清は何れもそれぞれOH, O, L(14代), L(20代)の4種抗原を凝集したので4種抗原中には共通抗原が存在することが予想され、凝集素吸収試験を行つたがその実験成績ではOH血清をO抗原で吸収しても、L抗原で吸収してもH凝集反応のみ残つた。次にO血清をO抗原で吸収しても、L抗原で吸収しても凝集反応が残らない。更にL血清をO抗原で吸収しても、L抗原で吸収しても凝集反応が残らなかつた。以上の実験成績より次の如く結論することが出来ると考えられる。

L-formはO抗原複合体を所有し、かつH抗原を所有しない。又継代培養14代のL-formと継代培養20代のL-formの間には血清学的差異が認められなかつた。

以上の著者の実験成績は、Dienes, Weinberger & Madoff, Tulasne, Prittwitz & Gaffron らの見解とは

ば一致するものである。

V. 結 論

1) *Proteus* 菌の OH 抗原, O 抗原, L 抗原 (14代, 20代) は何れも当該家兔免疫血清によつて凝集された。

2) 4種抗原に対する当該家兔免疫血清との交錯凝集反応の結果は何れも類属凝集反応が認められた。

3) O 抗原は4種家兔免疫血清中のH凝集素を吸収せず, その他の凝集素を吸収した。

4) L 抗原は4種家兔免疫血清中のH凝集素を吸収

せず, その他の凝集素を吸収した。

5) L 抗原はO抗原と同一で, かつH抗原を所有しない。

6) 継代培養14代のL型菌と継代培養20代のL型菌の間には血清学的差異が認められなかつた。

拙筆するに臨み、恩師谷教授の御懇篤なる御指導並びに御校閲に対し深く感謝します。

文 献

1) Dienes : Bact. Reviews, 15 (4) : 245~333 (1951).

2) Prittitz & Gaffron : Zbl. Bakter., 163 : 313~318 (1955).

3) Poetschke et al : Z. Imm. 114 (4) : 406~415 (1957).

4) 伝研学友会 : 細菌学実習提要 (昭31) : 226~258, 丸善, 東京.

5) 谷 : 医学微生物学 (昭29) : 第4版, 331~334, 南山堂.

6) 鮎谷 : 十全医学会雑

誌 52 (1・2・3) : 363~372 (1949).

7) 鮎谷 : 十全医学会雑誌 52 (10・11・12) : 565~573 (1950).

8) Dienes et al : J. Bacter. 59 : 755~764 (1950).

9) Weinberger et al : J. Bacter. 59 : 765~775 (1950).

10) 前川 : 十全医学会雑誌 59 (9) : 933~945 (1957).