L-form に関する研究

第Ⅰ報 Proteus vulgaris をもつての研究

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32年5月14日受付)

Studies on the L-Forms of Bacteria

Report 1. Studies on the Proteus Vulgaris

Itiro Maikawa

Department of Microbiology, School of Medicine, Kanazawa University
(Director : Prof. Dr. T. Tani)

本研究の要旨は，第10回日本細菌学会北陸地方支部集会で発表した.

目 次

第1章 緒 言
第2章 実験材料及び実験方法
第3章 実験成績
第1節 ペニシリンの濃度
第2節 動物血清と牛心臓エキス
第3節 各種ペプトンの比較
第4節 燐酸塩の影響
第5節 pH の影響
第6節 半合成培地上の発育
第7節 L型集落の性状
第8節 L-Cyklus
第9節 L-form の電顕所見
第4章 総括並びに考按
第5章 結 論
文 献

第1章 緒 言

1953年 Klieneberger[1] は Streptbacillus moniliformis の純培養中に奇妙な微生物を分離した．彼女はそれを L_1 と名づけた．この微生物は，1898年 Nocard & Roux ら[2] によつて純培養された牛の Pleuropneumonia 病原体に極めて類似していたので，Klieneberger は，L_1 は S. moniliformis と共生する Pleuropneumonia group の1株であると考えていた.

L_1 発見の数年後 Dienes[3] らは S. moniliformis, Bacteroid, Proteus その他の細菌から非常に微細な L-form を誘導分離し，L_1 は S. moniliformis の L-form であると推断した.

Dienes[3] によれば L-form の研究は初期の段階であり，その発見は新しく，細菌の研究に対して有意な課題を提出するものであると述べている.

この L-form は細菌の濾過形態との関連性，Pleuropneumonia group 及び Pleuropneumonia like Organisms (PPLO) との関係，ウイルス及びリケッチアの発生学的意味において，更に細菌の生理及び各種微生物の発生学的研究に多大の貢献をするだろうといわれ，その研究が累積された暁には，今日の感染病理に関する概念を一変させる可能性をはらんでいる等，この方面の研究が望まれれているが本邦において未だその報告に接しない[5)6)]. 著者は新しく分離した Proteus 菌のH株2株より牛血清加培地を用い，L型集落を誘導発生せしめ得ることが出来たので，この菌株について L-form の培養の基本的条件につき研究し，更にフイルム培地[8] を利用して L-Cyklus を観察し，次いで L-form の電顕像について観察したので，以下その成績を報告する.

第2章 実験材料及び実験方法

第1項 使 用 菌 株

富山県立中央病院で新しく分離した Proteus vulgaris のH株2株について実験した．

第2項 培 地

基礎培地として本間遜 PPLO 培地[7]の変法を用いた．その処方は次の如くである．牛肉浸出液と牛心臓浸出液を等量加えたものにバクトペプトン1％，グルコーズ 0.4〜0.5％，可溶性澱粉 0.2％，第2燐酸ソーダ 0.2％，第1燐酸カリ 0.05％，馬血清20％，寒天 1.8％，pH 7.6〜7.8，培地の含むペニシリン 1,500u/cc.

第3項 実 験 方 法

培養温度を 37°C とし，基礎培地に各種濃度のペニシリンを加えて培養し，L型集落発生に関するペニシリンの濃度を決定し，次いで馬血清と牛血清の比較実験を行い，更に各種ペプトンの比較実験，燐酸塩の影響，pH の影響，半合成培地上の発育等につき実験を行い，L型集落の性状について観察し，フイルム培地[8]を利用して L-Cyklus を観察し，次いで L-form の電顕像について観察した．これらの実験方法はそれぞれの項にて記述する．

第3章 実 験 成 績

第1節 ペニシリンの濃度

牛血清20％を含む平板基礎培地にペニシリンの濃度が 1cc につき 200単位，400単位，800単位，1,000単位，2,000単位，3,000単位，5,000単位，1万単位の濃度を調製し，これに Proteus 菌の 37°C，20時間ブイヨン培養を 1,000培稀釈したものの 0.05cc 宛塗布接種し，37°C 培養，8日目と10日目に判定した．その実験成績は第1表に示した．

第 1 表　ペニシリンの濃度（初代）

培養日数	型＼u/cc	200	400	800	1000	1500	2000	3000	5000	1 万
8日	A	桿 菌	桿 菌	2	2	100	++	++	++	+++
	B			23	40	75	50	60	172	90
10日	A	桿 菌	桿 菌	2	2	102	++	++	++	+++
	B			23	41	78	51	63	173	96

註： 1）A＝Dienes の 3A 集落　B＝Dienes の 3B 集落
2）数字は発生L型集落数で平板3枚の平均値を記載した．
＋＝200〜500コ　++＝500〜1000コ　+++＝1000〜2000コ　++++＝2000〜4000コ
3）以下の表もこれに倣う．

これによると 800 単位以上いずれもL型集落の発生を認めたが，A型集落は1万単位で最も成績が良く，B型集落は 5,000 単位で最も良い成績を得た．次に 1,500 単位から 3,000 単位でA型もB型も良好な成績を示し，800 単位〜1,000 単位では成績がやや劣っていた．200〜400 単位では桿菌が発生した．

第2節 動物血清と牛心浸出液

動物血清がL型集落の発育を促進する[4]といわれているが，馬血清と牛血清について比較実験を行った．その実験成績は第2表に示した．

これによると牛血清を加えた培地では馬血清を加えた培地より良好な成績を示した．

第2表　牛血清と馬血清の比較

L型集落＼血清	20％牛血清	20％馬血清
初代（3日目）	550	60
22代（7日目）	30	3

次に牛血清濃度の比較実験を行つた．即ち基礎培地の牛血清の濃度を 5％，10％，20％，40％に調製し，初代培養は3日目に，22代培養は7日目に判定した成績は第3表に示した．これによると初代培養では牛血清40％を含む培地が最も良好な成績を示し，次は20％→10％→5％の順であつた．22代培養では牛血清20％

第3表　牛血清濃度の比較

L型集落 ＼ 牛血清%	5%	10%	20%	40%
初代(3日目)	17	220	410	650
22代(7日目)	18	34	50	4

を含むものが最も良好な成績を示し，次は10%→5%→40%の順であつた．

次に牛心臓エキス（牛心臓浸出液）の存在が必要かどうか牛心臓浸出液の濃度の比較実験を行つた．

基礎培地の牛心臓浸出液の濃度を第4表の如く調製した．

第 4 表　牛心浸出液の濃度の比較

牛心液%	0%		25%		50%		75%		100%		対照	
L型集落 ＼ 型	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
初代(3日目)	−	3	+	20	++	++	+	+	+	25	−	3
22代(7日目)	65	59	74	120	113	191	+	++	+	++	19	−

註：対照は普通寒天培地に牛血清20%を加えたもの．

これによると初代培養では牛心液の50%を含むものが最も良好な成績を得，22代培養では牛心液の濃度の高い程良好な成績を得た．

第3節　各種ペプトンの比較

バクトペプトン，プロテオーゼペプトン No. 2，同じく No. 3，ポリペプトンの各1%を含む培地について比較実験を行つた．ペニシリン 1,500u/cc，牛血清15%．4日目に観察した．その成績は第5表に示した．

第 5 表　各種ペプトンの比較（初代）4日目

型 ＼ ペプトン	バクトペプトン	プロテオーゼペプトン No2	プロテオーゼペプトン No3	ポリペプトン
A	++	+	+	96
B	480	320	240	30

これによるとA型集落もB型集落もバクトペプトンでは最も良好な成績を示し，次はプロテオーゼペプトン No. 2，同じく No. 3，次はポリペプトンの順であつた．

次にバクトペプトンの濃度を 1%，2%，3%，5% として基礎培地に加えて比較した．その成績は第6表に示した．

第6表　バクトペプトンの濃度(初代)

培養日数	型 ＼ %	1%	2%	3%	5%
3日目	A	−	+	+	+
	B	260	600	800	600
4日目	A	+	++	++強	++弱
	B	400	600	800	700
5日目	A	+	++	++強	++弱
	B	611	700	1,300	1,068

判定は3日，4日，5日目に行つたがいずれも3日目よりL型集落の発生を認めたが，A型集落の発生は2〜3%においてやや良好な成績を得た．

第4節　燐酸塩の影響

培地の組成を第7表の如く組合せて燐酸塩の濃度の影響を実験した．

実験第1：その実験成績は第8表に示す如く，A型もB型も No. 3 培地から No. 6 培地において良好な成績を得た．

実験第2：次に No. 3 培地と No. 5 培地はいずれも第二燐酸ソーダ 0.5%と食塩 0.3%を含んでいるので実験第2においては第二燐酸ソーダを 0.1%･0.2%･0.3%･0.5%･1%とこれに食塩 0.3%を加えて比較実験を行つた．

その実験成績は第9表と第10表に示した．

第9表では第二燐酸ソーダ 0.5%を含むものが最も良好な成績を得，次に 0.3%，0.2%，0%の順であつ

第 7 表 基礎培地成分

培地 / 成分の% / 成分	No 1	N o2	No 3	No 4	N o5	No 6
	%	%	%	%	%	%
牛肉水 牛心浸出液	} 等量	} 等量	} 等量	} 等量	} 等畺	} 等量
バクトペプトン	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
可溶性澱粉	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
ブドウ糖	0.4	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5
Na_2HPO_4	0.2	0.2	0.5	／	0.5	／
KH_2PO_4	0.05	0.05	／	0.2	／	0.2
NaCl	／	／	0.3	0.3	0.3	0.3
グルタミン酸ソーダ	／	0.1	／	／	0.1	0.1

註： 寒天2%，牛血清15%，ペニシリン 1500u/cc，pH 7.6

第 8 表 燐酸塩の影響（その1）初代

培養日数	培地 / 型	No 1	No 2	No 3	No 4	No 5	No 6
3 日	A	−	−	−	−	−	−
	B	61	42	146	523	170	410
4 日	A	+	+	+	+	+	+
	B	63	44	150	560	186	463
6 日	A	+弱	+弱	+	+	+	+
	B	69	45	152	603	200	484

第9表 Na_2HPO_4 の影響（実験2）初代

培養日数	Na_2HPO_4の% / 型	0%	0.2%	0.3%	0.5%
2日	A	−	−	−	−
	B	42	143	329	649
3日	A	−	−	−	−
	B	43	144	355	714
5日	A	−	+	+	+
	B	45	146	366	726

た.

第10表では第二燐酸ソーダ 0.5%と1%を含むものが良好な成績を得て，特にA型集落は1%を含むものが最も豊富に発育した.

実験第3： 新しく分離した Proteus 菌のH株岡本株と Hx (7) 株との比較実験した.

第10表 Na_2HPO_4 の影響（実験2）初代

培養日数	Na_2HPO_4の% / 型	0.1%	0.2%	0.5%	1.0%
3日	A	−	−	−	−
	B	90	155	150	207
7日	A	+	+	++	+++
	B	107	156	154	220

両株共第二燐酸ソーダの 0.5%と1%を含むものは良好な成績を得て，1%では特にA型集落が豊富に発育した.

実験第4： 第一燐酸カリの濃度

基礎培地（食塩 0.3%を含む）に第一燐酸カリ 0.1%，0.2%，0.5%，1%の濃度を含む培地について比較した．その成績は第12表と第13表に示した.

これによると第一燐酸カリの1%を含むものはA型

第 11 表　Na_2HPO_4 の影響（実験 3）初代

Na_2HPO_4 の%		0.2%		0.5%		1 %	
培養日数	菌株／型	Hx (7)	岡本株	Hx (7)	岡本株	Hx (7)	岡本株
4 日	A	−	−	−	−	−	−
	B	152	101	166	142	237	201
9 日	A	+	+	++	++	+++	+++
	B	160	112	170	148	262	242

第12表　KH_2PO_4 の影響（実験 4）初代培養

培養日数	KH_2PO_4 の%／型	0.1%	0.2%	0.5%	1 %
3 日	A	−	−	+	++
	B	22	23	35	260
4 日	A	−	−	+	++
	B	26	28	44	280

第13表　KH_2PO_4 の影響（実験 5）5 代培養

培養日数	KH_2PO_4 の%／型	0.1%	0.2%	0.5%	1 %
3 日	A	−	−	−	+
	B	−	−	−	312
4 日	A	+	+	+	++
	B	17	20	26	330

集落もB型集落も最も豊富に発育し次に 0.5%が良好な成績を得て，0.2%，0.1%では成績は劣つていた．

第 5 節　pH の 影 響

初代及び11代培養について実験を行つた．

基礎培地として第 8 表の No. 4 培地を用い，これに牛血清20%，ペニシリンの濃度 1,500u/cc，各種の pH に修正した．

その実験成績は第14表から第17表に示した．

実験第 1 ：　初代培養及び11代培養

Hx (7) の斜面培養20時間のもの 1 白金耳を滅菌蒸溜水 5cc に浮遊混和均等となし 0.05cc 宛塗布培養した．

その成績は第14表に示した．

これによると pH 7.4 で最も豊富に発育し次は pH 7.6〜7.8，次は pH 6.8 の順で pH 8.8 では Hauch が発生した．

11代培養では10代L型集落を 1 白金耳とり，これを滅菌蒸溜水 1cc に浮遊混和均等となし，その 0.05cc

第 14 表　pH の 影 響（初代培養）

培養日数＼pH	6.8	7.4	7.6〜7.8	8.8
6 日	54 (0.3〜0.5)	690 (0.3〜0.5)	515 (0.3〜0.5)	桿菌発生
9 日	54 (0.3〜0.5)	690 (0.3〜0.7)	515 (0.3〜0.5)	桿菌発生

註：1）（ ）内はL型集落の直径 mm を示す．以下の表はこれに倣う．
2）Hx (7) 斜面培養 1 白金耳を滅菌水 5cc に浮遊し 0.05cc 宛塗布．

宛塗布培養した．その実験成績は第15表に示した．

11代培養でも pH 7.4 で最も豊富に発育し次は pH 7.6〜7.8→6.8 の順で pH 8.8 以上では O 型集落と思われる桿菌の集落の発生を見た．

実験第 2 ：　初代培養及び11代培養

実験第 1 と同様 No. 4 培地を用い pH 6.2，6.6，7.1〜7.2，7.6，8.0，8.2〜8.4，9.0 に調製し初代培養及び11代培養について比較実験を行つた．

その初代培養の成績は第16表に示した．

これによると pH 8.0→7.6→7.1→6.6→6.2→8.4→9.4 の順となるが pH 8.0 以上では桿菌が発生した．

11代培養の成績は第17表に示した．

第 15 表 pH の 影 響 (11代培養)

培養日数＼pH	6.8	7.4	7.6〜7.8	8.8
6 日	1000 (0.3〜0.5)	4000 (0.3〜0.5)	2500 (0.3〜0.5)	48 (0.3〜0.5)
9 日	1000 (0.3〜0.5)	4150 (0.3〜0.5)	2600 (0.3〜0.5)	桿菌発生 (2〜4)

註： 1) 10代L型集落1白金耳を滅菌水 1cc に浮遊し 0.05cc 宛塗布.

第 16 表 pH の 影 響 (初代培養)

培養日数＼培地 pH	6.2	6.6	7.1〜7.2	7.6	8.0	8.2〜8.4	9.0
5 日	91 (0.2〜0.3) mm	110 (0.2〜0.3) mm	120 (0.3〜0.3) mm	180 (0.2〜0.3) mm	140 (0.2〜0.3) mm	80 (0.2〜0.3) mm	80 (002〜0.3) mm
8 日	118 (0.5〜1.2) mm	116 (0.5〜1.2) mm	137 (0.5〜1.2) mm	186 (0.5〜1.2) mm	153 (0.5〜1.2) mm	85 (0.5〜1.2) mm	桿菌
13 日	118 (1〜1.5) mm	116 (1〜1.5) mm	137 (1〜1.5) mm	186 (1〜1.5) mm	桿菌	桿菌	桿菌

註： 1) Hx (7) 株斜面培養20時間1白金耳を 10cc の滅菌水に浮遊し 0.05cc 宛塗布.

第 17 表 pH の 影 響 (11代培養)

培養日数＼培地 pH	6.2	6.6	7.1〜7.2	7.6	8.0	8.2〜8.4	9.0
6 日	46 (0.3〜0.5) mm	47 (0.3〜0.5) mm	98 (0.3〜0.5) mm	75 (0.3〜0.5) mm	38 (0.3〜0.5) mm	4 (0.3〜0.5) mm	1 (0.5) mm
10 日	53 (0.3〜0.5) mm	56 (0.3〜0.5) mm	103 (0.5〜1.2) mm	96 (0.8〜1.2) mm	46 (0.5〜1.2) mm	7 (0.5〜1) mm	3 (0.8〜1.2) mm
13 日	53 (0.3〜0.5) mm	56 (0.3〜0.5) mm	103 (0.5〜1.2) mm	96 (0.8〜1.2) mm	桿菌	桿菌	桿菌

註： 1) 10代L型1白金耳を 5cc の滅菌水に浮遊し 0.05cc 宛塗布.

これによると10日目の成績では pH 7.1→7.2→7.6→8.0→6.6→6.2→8.2→8.4 の順となるが13日目では pH 8.0 以上で桿菌が発生した.

以上の実験成績より pH 6.2〜7.8 で発育し至適 pH は 7.4 であつた.

第6節 半合成培地上の発育

1953年 Dienes は Proteus の L-form は桿状形を養うところの合成培地上では発育しないだろうと述べた. しかるに 1954 年 Medilland & O'kane は合成アミノ酸混合液加固形培地は自然培地より桿状形もL-form も良好に発育することを発表した[9].

実験第1：

使用菌株 $Hx_{(K)}$ $Hx_{(1)}$ $Hx_{(2)}$ $Hx_{(3)}$ $Hx_{(4)}$ $Hx_{(5)}$ $Hx_{(6)}$ $Hx_{(7)}$ 大腸菌の9株について実験した.

基礎培地（第18表その1）にアミノ酸混合液（第18表その2）を1%加え, 培地のペニシリン濃度を 200 u/cc, 400u/cc, 800u/cc, 1200u/cc として実験した結果, $Hx_{(7)}$ 株では 400〜1200u/cc で L 型集落が4

日目に発生し 800u/cc で最も良好な発育状態を示した．第19表にその成績を示した．

第18表 （その1） 基礎培地

Glucose	1.0%
Sodium lactate	2.0
K_2HPO_4	0.9
KH_2PO_4	0.1
Nicotinamide	0.1μg
Salt mixture	0.2

註： Salt mixture

$MgSo_4 \cdot 7H_2O$	40.0g
Nacl	2.0g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	200g
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	8.0g
Aq desti.	1.00. ml

第18表 （その2） アミノ酸混合液

Glycine	0.2mg/10ml
L-Leucin	2.5 〃
L-Tyrosin	3.0 〃
L-Proline	4.0 〃
L-Histidine	1.0 〃
L-Arginine	2.5 〃
Dl-Alanine	1.0 〃
Dl-Serine	0.4 〃
DL-Valine	4.0 〃
DL-Phenylalanine	2.0 〃
DL-Aspartic	2.0 〃
DL-Lysine	4.0 〃
L-Glutamic	10.0 〃
DL-Methionine	2.0 〃

第19表 1%アミノ酸混合液培地(初代培養)

培養日数 / u	2日	3日	4日	5日	7日	9日
200	−	−	−	−	−	−
400	−	±	+	+	+	++
800	−	±	++	++	++	++
1200	−	±	+	+	+	++

註： 1）使用菌株 Hx (7) 以下の表もこれに倣う．

実験第2：

使用菌株 Hx(7) 株

基礎培地（第18表その1）にアミノ酸混合液（第18表その2）を10%加え実験第1と同様のペニシリンの濃度について実験した．その成績は第20表に示した．この場合は2日目に肉眼的に認め得るL型集落が 400u/cc→2,000u/cc において発生した．特に 1,200u/cc ではやや大なる集落が認められた．

第20表 10%アミノ酸混合液培地(初代培養)

培養日数 / u	1日	2日	3日	4日	5日
400	+	+	+	+	+
800	+	+	+	+	+
1,200	+	++	++	++	++
2,000	+	++	++	++	++

実験第3：

使用菌株 Hx(7) 株

基礎培地にアミノ酸混合液を1%とカザミノアシド(Difco) 0.5%を加えた培地について実験した．その成績は第21表に示した．この場合は3日目に 400u/cc →3,000u/cc にL型集落の発生を認め，特に 2,000 u/cc と 1,200u/cc で良好な発育を示したが，400u/cc では4日目に桿菌を生じた．

第21表 1%アミノ酸混合液 +0.5% カザミノアシド（初代培養）

培養日数 / u	1日	2日	3日	4日
400	−	±	+	桿菌
800	−	±	+	++
1,200	−	±	++	++
2,000	−	±	+++	+++
3,000	−	±	+	++

実験第4： 2代L型培養

1%のアミノ酸混合液を含む基礎培地に初代L型集落1白金耳を滅菌蒸溜水 1cc に浮遊混和均等となし，その 0.05cc 宛塗布した．その成績は第22表に示した．

この場合は2日目にL型集落が 800u/→3,000u/cc

第22表 1%アミノ酸混合液(2代培養)

培養日数 / u	1日	2日	3日
400	−	−	−
800	−	+	+
1,200	−	++	++
3,000	−	++	++

で発生したが 3,000u/cc では 1,200u/cc よりやや小なるL型集落を認めた.

第7節 L型集落の性状

培地が適当な場合は3〜5日目で肉眼的に認め得る大きさに達し10日目頃で充分な大きさに到達する. L型集落の特長は乳房状で中央部は隆起し, 中心の下部は寒天内に埋没し, 周囲の比較的明るい部分は寒天の表面上においても認められる. 又寒天の表面では径 0.1〜0.3mm 大の比較的小なる集落と径 1〜2mm 大の比較的大なる集落の2種が認められる.

Dienes [3) 4)] は小さいものを "3 A" 大なるものを "3 B" と命名した. 透過光線の弱拡大の顕微鏡所見ではB型集落は暗い円形部分と周囲の比較的明るい円形部分の二重の円が認められる. A型集落では中央部の暗い円形部分のみか或いは極めて狭い周囲を持つた二重の円が認められる.

A型集落は発育能力が遅く継代培養も比較的困難である. B型集落は発育能力も良く継代培養は比較的実施しやすい. B型集落は桿菌を発生しやすく, これに反してA型集落は桿菌を発生し難い. 又B型集落の培養中にしばしばA型集落の発生を見, 一方A型集落の継代培養中でもB型集落の発生を見ることがあつた.

Dienes [3)] はL型集落の特長の一つとして軽度の物理的障碍に対しても反応しやすく, 例えば白金耳で塗布標本を作つた場合細菌集落では個々の細菌の形が完全に残るがL型集落では個々の構成要素は破壊せられて不明瞭となる. この特長は Dienes の記載とよく一致している.

A型集落もB型集落も培養基上でメチレン青染色, Dienes 染色, ギムザ染色によつて染色せられ集落の形状が一層明瞭となる.

L型集落の構成要素として Dienes [4)] は, A型集落はその周囲は小数の large bodies があり中心の厚い部分は非常に小さな要素の small form (0.3〜0.5μ) によつて形成せられ, 集落の若いものでは small form は2個連結或いは短かい鎖状をなして bacillary の外観を呈している. B型集落では厚い中心部は small form を含みその周囲は大きさを増加する round form によつて囲まれ large round body 及び small granula から成立つていると記載した.

Tulasne はL型集落はその形状において球状である径 0.2〜7μ 或いはそれ以上の種々の要素を含みその最も小さいものを elementary bodies, 大なるものを large bodies と記載した.

中拡大の顕鏡所見では中央部は顆粒様物質を含み, 周囲は大小不同の円形物質と顆粒様物質と網の目のようなものの混在するのが認められた.

第8節 L-Cyklus

単桿菌よりL型集落形成迄の過程をフイルム培地を用い異相差顕微鏡で観察した.

培地上の桿菌は約30分頃より発育し始め約1時間で菌体の中間或いは端附近に顆粒の増大が認められ (位相差顕微鏡では輝閃性顆粒として認められる), これより小胞を菌体の外側に1個出現する, この小胞が次第に増大して large body となる (約3時間), その後 large body の内部顆粒が増加し, 約5時間位で顆粒物質が寒天内に穿孔し始め初期のL型集落の形成か始まるものと思われる. その後発育が非常に遅くなり約43時間でフイルム培地上で典型的なL型集落の形成が認められた.

原形復帰について観察では, L型集落をブイヨン 5cc に浮遊しこれを駒込ピペットで破砕し, この1滴をフイルム培地上に塗布し, 位相差顕微鏡で観察した.

Large body は時間の経過と共に増大し, 内部に顆粒を生じ, その顆粒から約3時間で不規則な小桿菌の集合したものを認めた.

Small form と思われるものはその大きさを増大し小楕円となり2個に分裂し, その両個にまたがつて桿状顆粒が次第に発達し, これが発育し分枝を行い桿菌の発生を認めた.

無晶形の網の目のようなものから樹枝状物が生じ, その所々に顆粒膨大部が発生し, その部から切れて桿菌を発生した.

第9節 L-form の電顕所見

初代と22代のL型集落より試料を作製した.

所見として内部に球状顆粒を含む Large body と思われるものと, Small form と思われる径 333〜416mμ の球状体の電顕像と不規則な無晶性物質の電顕像を得た.

第4章 総括並びに考按

第1節 ペニシリンの濃度

抗生物質の細菌細胞の形態に及ぼす影響については

既に多数の研究者の報告があり，著者も大腸菌の形態変化について観察しその実験成績は第8回日本細菌学会北陸地方支部集会で発表した．しかしながら発育阻止濃度以上においては菌体の縮少と不明化の他に如何なる運命をたどるかは不明であつた．

ここにペニシリンの細菌細胞に対する興味ある作用の一つは Pleuropneumonia like 集落（L型集落）が Proteus 菌からペニシリンの助けで発生せしめ得るということである．

著者はL型集落を発生せしめるに最も適当な培地の含むペニシリンの濃度について先ず実験した．

一般に Proteus 株はペニシリンに対して強い抵抗性を持つており，細菌型は10単位で発育が障碍され，50単位で発育が阻止される[3]．

しかし Proteus 菌のL型集落は著者の実験成績では200単位から1万位の間において発生したが400単位以下では時に Hauch の発生を見ることがある．

このL型集落発生濃度は各株により特異的であり，発育阻止濃度以上かなり広範囲に渡つて発生し得るものであることを認めた．

これを他の実験報告と比較して見ると1948年 Dienes[4] は20%馬血清と 100, 400, 1,600, 5,000 単位を含む寒天平板を用い，Proteus 株7株について実験を行つたが，それによると 100〜5,000 単位ですべての株よりL型集落が発生し，Strain 52 では 5,000 単位で最も大なる集落を発生したことを報告している．

又 Liebermeister[10] は 1,000 単位で，Bringmann[11] は800単位で，Höpken[12] は800単位で，Prittwitz[13] は 1,000単位で，H. Schellenberg[14] は 800 単位でそれぞれL型集落の発生を報告している．

以上の諸家の実験成績と著者の成績を比較考按するに Proteus 株のL型集落発生のためのペニシリンの濃度の範囲は発育阻止濃度以上かなり幅が広いものであり，各株により特異的であると考えられる．

第2節 動物血清及び牛心臓浸出液

L型発生の要件の一つとして Dienes[3] は動物血清の存在をあげているが馬血清を一般に使用し，人血清，腹水，家兎血清はある実験においては良い結果を与えたが一部に満足な結果を与えることは少なかつたと述べている．著者は馬血清と牛血清の比較実験を行つたが牛血清は馬血清より成績が良く，牛血清10〜40%において良好な成績を得た．

Dienes[4] は 3A 集落は動物血清を必要とするが 3B 集落は動物血清の存在で発育が促進せられるが必ずしも必要がないと述べている．Edward[15] は PPLO の発育には Cholesterin が必要であり，これに反して L-form は必ずしもその存在を必要としないことが PPLO と L-form の根本的な差異として述べている．次に牛心臓浸出液の存在であるが本間氏は膣より分離した PPLO について肉水と牛心臓浸出液の等量を使用しているが，著者はこれをL型培地に使用して比較実験を行つたところ，牛心臓浸出液の等量を含む培地が肉水のみの培地よりはるかに良好な成績を得た．牛心臓浸出液のどの成分が発育促進に役立つのか，又 Medill 等[9] のいう如く発育抑制物質の作用を弱めるのか今後の研究にまたねばならない．

第3節 各種ペプトンの比較

L-form の発育に対し各種ペプトンの比較実験を行つたが，バクトペプトンが最も成績が良く，次にプロテオーゼペプトン No. 2，同じく No. 3，次いで和製のポリペプトンの順であつた．

このペプトンの影響については A. Nells[16] は L-form はペプトンの附加物を必要とし，Witte は貧弱な発育を示し，メルクのカゼエンペプトンは豊富な発育を示し．バクトペプトンは余りよくないと述べている．

これらのペプトンの影響はペプトン中に含まれるアミノ酸によるものであるか或いは Medill 等[9] のいう inhibitor (s) の存在によるものか検討を要するものと考えられる．

第4節 燐酸塩の影響

燐酸塩の影響については第一燐酸カリと第二燐酸ソーダについて実験したが，0.5%から1%を含む培地が良好な成績を得た．

Tulasne[17] は L-form の Phosphorgehalt は55%で Normalform のそれは22%であつたと報告しているが上記の著者の実験成績と比較すると L-form の発育には燐酸塩が要因の一つと考えられる．

又 Medill 等[9] は Proteus 菌の L-form の合成培地の成分中には第二燐酸カリ0.9%と第一燐酸カリ0.1%を含むことを記載していることは注目に価することと思われる．

第5節 pH の 影 響

初代培養では pH 6.2〜7.8 で発育し至適 pH は7.4であつた．

11代培養では pH 6.2〜7.8 で発育し至適 pH は7.4であつた．

これを諸家の実験成績と比較すると，Liebermeister

[10]は pH 7.8, Bringmann [11]は pH 7.2, Höpken & Bartmann [12]は pH 7.0〜7.8, Nelles [16]は pH 7.8 で実験している.

第6節 半合成培地上の発育

半合成培地上の発育についての実験では基礎培地にアミノ酸混合液を1%加えたもの, 10%加えたもの, 及び基礎培地にアミノ酸混合液1%と casamino acids (Difco) 0.5%を加えた3種類につき実験を行つたが10%のアミノ酸混合液を含むものが最も良好な成績を示し, 次は 0.5% casamino acids (Difco) を含むもの, 次いで1%のアミノ酸混合液を含む培地の順であつた.

Medill & O'kane [9]はアミノ酸培地は Proteus 菌の桿状形及び L-form の発育を促進し, L-form の発育は自然培地より良好な成績を得たと報告しており, 更に自然培地上の貧弱な発育は自然物質中に含まれる抑制因子 (inhibitor) に対して L-form は感性を有しているためであり, この inhibitor はイーストエキスや水解カゼイン中に含まれるが casamino acids (Difco) 中に存在しないと述べている.

又血清及び Plasma による L-form の発育の促進は. 供給する栄養物よりむしろ自然培地中に存在する抑制物質の解毒によるものであろうと述べているが興味あることと思われる.

第7節 L型集落の性状

L型集落は乳房状であり, 中心は寒天内に埋没している. 又寒天の表面上では非常に小さい集落と比較的大なる集落が認められる.

Dienes [3) 4)]は小さい集落を 3A 型, その約10倍位の直径の大形の方を 3B 型と名づけた. この2者はその構造も形態も本質的に同一であるが発育養素要求と発育能力に相異があり, 即ち 3A 型はやわらかい寒天にだけ生えて動物の血清がなければ生えないし, 又血清の種類が発育に影響し, うえつぎを重ねるにしたがつて細菌の出現がますます遅くなる.

3B 型[4)]は培地の表面上に発育し, 馬血清はそれらの発育を促進するが必須要素でなく, 又硬い寒天培地でもやわらかい寒天培地にも生え, この集落をペニシリンを含まない培地にうつすと数時間で細菌を生じ, このことはペニシリン含有培地で数カ月間培養したものでも起る.

以上 Dienes [3) 4)]の記載と著者の成績はよく一致しているがA型もB型も寒天 1.8〜2%で良好な発育を示し, 3%寒天培地ではA型は発育せずB型のみが発育した.

又A型は初代培養では細菌型のブイヨン培養6〜12時間目のものを接種した場合に多く発生しやすく, B型はブイヨン培養18時間以上のものを接種した場合に多く発生する傾向があり, 更に燐酸カリ塩を含む培地ではB型が多く, 燐酸ソーダ塩を含む培地ではA型が多く発生する傾向があるように思われるが更に検討を要するものと考えられる.

第8節 L-Cyklus

単桿菌よりL型集落形成迄の過程をフイルム培地上で位相差顕鏡で観察した成績は次の如くである. 培地上の桿菌は時間の経過と共に発育し, 菌体の中央或いは端附近で小胞を外側に出し, この小胞が次第に増大して Large body となり, Large body の内部顆粒が増加し, 顆粒物質が寒天内に穿孔し約5時間でL型集落の形成が始まり43時間でL型集落の形成が認められた.

ペニシリン平板上のL型集落形成過程については Dienes [3) 4)]が記載している. 即ペニシリン平板は移植せられた細菌は2〜3時間で large round bodies に腫脹し, これが発育し続け24時間以内に多く崩解し, small round granules 或いは bacillary granules の増殖によつて小集落を形成することを記載した.

Bringmann [11)]は Proteus 菌の L-form の形成過程を電顕的に観察した. 同様に Schellenberg [14)]は位相差顕微鏡で, Huertos [18)]は光学及び電子顕微鏡で, Höpken & Bartmann [12)]は位相差顕鏡で L-Cklus を観察している. 更に Taubeneck & Müller [19)]はペニシリンによる Proteus 菌の形態変化を観察し, Stempen [20)]は Proteus vulgaris の large body について Taubeneck [21)]はペニシリンによる形態変化の Plasmolyse について観察し, Bartmann & Höpken [22)]は不完全 L-Cyklus についてそれぞれ観察した.

原形復帰については著者は3種の型を観察した. Large body, Small form 及び無晶性物質のそれぞれより桿菌を発生した.

この原形復帰に関する諸外国の研究を見ると Bringmann [23)]は電子顕微鏡で観察し, Medill & Hotchinson [24)]は Proteus mirabilis について観察し, Dienes [3) 4)]も Proteus 菌の L-form より原形復帰について観察している.

Höpken & Bartmann [12)]は位相差顕微鏡で, Taubeneck [19)]等は groβe Körper より桿菌発生について, Bartmann & Höpken [22)]は Bact. faec. alcaligenes

株についてL型から桿菌の発生について観察している．

Bringmann[23] はペニシリンを含む寒天平板上に L-Formen を発生せしめ，この平板上にペニシリナーゼを滴下滲透せしめ，減少したペニシリンの濃度に従つて L-Formen から桿状形への復帰のすべての時期を観察した．

Medill & Hutchinson [24] は Proteus mirabilis の L-form より位相差顕微鏡で桿菌への復帰を観察したが，それによると球状の L-form は伸長し，分岐し，small rods に分裂すると述べている．

Dienes [3) 4) 5)] の記載によれば a) 細菌から詳導された large body の segmentation によるもの，b) 3B 集落の large body の segmentation によるもの，c) 3A 集落から不明な態度によるものと3者について記載している．

Höpken & Bartmann [25] によれば 1～4μ 大の球状体が発生し，これが分裂して典型的な桿菌になる場合と奇抜な分枝形を作りそれが更に分裂することにより細菌に変化したと記載している．

第9節 L-form の電顕像

L 型集落の初代と22代のものより試料を作製した．電顕所見として内部に球状顆粒を含む large body と思われるものと，small form と思われる径 333～416 mμ の球状体と無晶性物質の電子像を得た．

Smith, Hillier & Mudd [3] は電子顕微鏡で PPLO 及び L-form について研究したが，細菌とこれらの主要な差異は細胞膜にあつて，その細胞膜はデリケートで明確な細胞膜を欠いているけれども small form 及び large body とも電顕所見上細胞としての区劃は認められると述べている．

Bringmann [11] は電子顕微鏡で B. proteus を用い高濃度のペニシリン影響下で L-Formen の発生過程を電顕的に呈示した．即細胞分裂の抑制と核様物質の強度の分裂によつて糸状引或いは球状形の細胞が発生し，母細胞の細胞膜障碍によつて核様物質が遊離し，核様物質は適当な条件のもとでは独立した生活体即 L-Formen として後培養せられ電顕的にこれを呈示した．

Huertos [26] は Pseudomonas, B. proteus 及び Rhizobium の L-Formen の電顕的研究を行つた．それによると 1) Große L-Formen は径 1～1.5μ 大の平らな円盤状であり，それは細胞膜と顆粒と非常に少量の原形質を有している．2) Kleine L-Formen は径 0.1～0.4μ の球形体で電子不透過性である．と述べている．

Cuckow & Klieneberger [27] は1955年 Pleuropneumonia group の液体培養したものを電顕的に呈示した．そしてこれらの微生物は径 100mμ でありやわらくて強固な細胞膜を有しなかつた．と記載している．

Ratting & Buse [28] は H. influenzae の L-Formen 形成迄の過程を電顕的に呈示した．

第5章 結論

新しく分離した Proteus 菌の H 株2株より牛血清加培地を用い，L 型集落を発生せしめ，フイルム培地上の L-Cyklus を観察し，更に L-form 電顕像について観察した．成績は次の如し．

1) 培地のペニシリンの濃度は 800～10,000u/cc が良い．

2) 培地に加える血清は馬血清よりも牛血清の方が良好な成績をあげた．

3) ペプトンの種類についてはバクトペプトンが最も良く，次にプロテオーゼペプトン No. 2，同じく No. 3，ポリペプトンの順であつた．

4) 第一燐酸カリ又は第二燐酸ソーダの 0.5～1.0% を含む培地が成績が良いように思われた．

5) pH 6.2～7.8 で発育し，至適 pH は 7.4 であつた．

6) アミノ酸培地上においても良好な発育を示した．

7) L 型集落の性状について述べた．

8) 細菌は large body となりその内部に顆粒が増殖して寒天内に穿孔し，更に増殖して初期のL型集落を形成した．

9) Large body, small form, 無晶性物質のそれぞれより桿菌を発生した．

10) 電顕所見として内部に球状顆粒を含む large body と思われるものと small form と思われる径 333～416mμ の球状体と，無晶性物質の電顕像を得た．

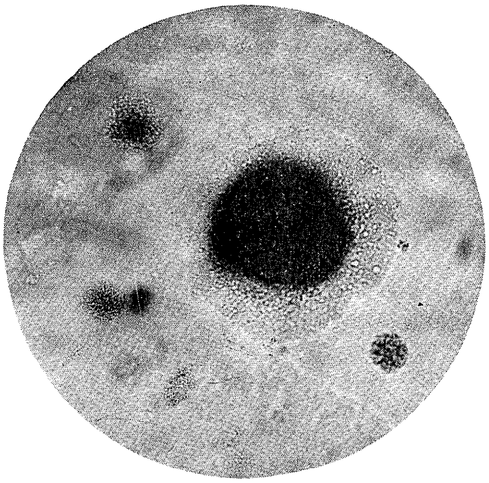
終りに御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜わりたる恩師谷友次教授に深甚の謝意を表すると共に色々とお世話になつた病院長多賀一郎博士，検査科長鯨谷喜兵衛博士，高村孝技師に対し謝意を表します．

文 献

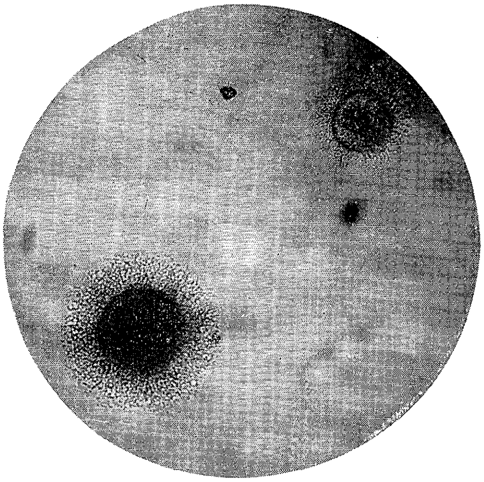
1) **Klieneberger** : J. Path. & Bact. **40** : 93～105, (1935). 2) **Nocard etc** : Ann. Inst. Pastdur. **12** : 240～, (1898). 3) **Dienes, L.** : Bact. Reviews **15** (4) : 245～283, (1851). 4) **Dienes, L.** : J. Bact. **57** (5) : 529～546, (1949). 5) **本間遜** : 医学のあゆみ, **14** (2) : 95～110 (1952). 6) **本間遜** : 医学のあゆみ, **21** (2) : 101～105, (1956). 7) **本間遜** : 日本細菌学雑誌, **9** (12) : 1121～1122, (1954). 8) **吉池一郎** : 十全医学会雑誌, **51** (4) : 112～128, (1948). 9) **Medill & O'kane** : J. Bact. **68** (5) : 530～533, (1954). 10) **Liebermeister** : Zbl. Bact. **160** (1－5) : 250～256, (1953). 11) **Bringmann** : Z. Hyg. **135** (6) : 557～565, (1952). 12) **Höpken** : Zbl. Bact. **162** : 361～404, (1955). 13) **Prittwitz** : Zbl. Bakt. **163** : 313～318, (1955). 14) **Schellenberg** : Zbl. Bakt. **161** (7/8) : 433～456, (1955). 15) **Liebermeister** : Z. Hyg. **140** (5) : 423～432, (1954). 16) **Nelles** : Zbl. Bakt. **164** : 78～79, (1954). 17) **Vendrely & Tulasne** : Nature, **171** (4345) : 262～, (1953). 18) **Huertos** : Zbl. Bakt. **162** (5/6) : 24～31, (1955). 19) **Taubeneck & Müller** : Zbl. Bakter. **163** : 309～312, (1955). 20) **Stempen** : J. Bact. **70** : 177～181, (1955). 21) **Taubeneck** : Zbl. Bakter. **163** : 477～483, (1955). 22) **Bartmann & Höpken** : Zbl. Bakter. **166** (1) : 30～42, (1956). 23) **Bringmann** : Zbl. Bakter. **160** : (7/8) : 507～510, (1954). 24) **Medill & Hotchinson** : J. Bact. **68** (1) : 87～92 (1954). 25) **Höpken & Bartmann** : Zbl. Bacter. **162** : 372～385, (1955). 26) **Huertos** : Zbl. Bakter. **162** (5/6) : 24～31 (1955). 27) **Cuckow & Klieneberger** : J. gen. Microbiol. **13** (1) : 149～154 (1954). 28) **Rattig & Buse** : Zbl. Bakter. **164** : 458～465 (1955).

前 川 論 文 附 図 (1)

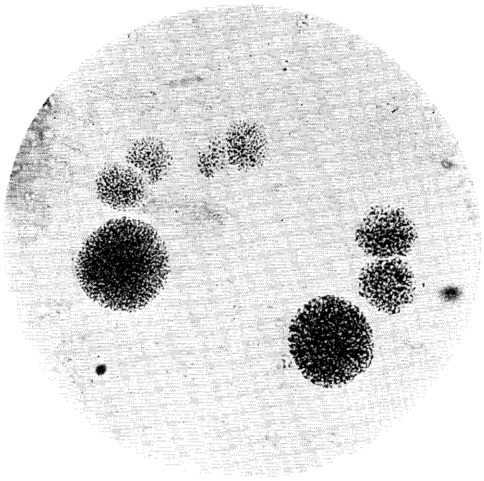
(1)



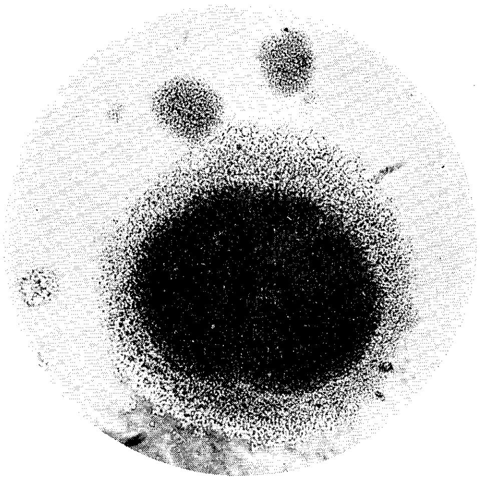
(2)



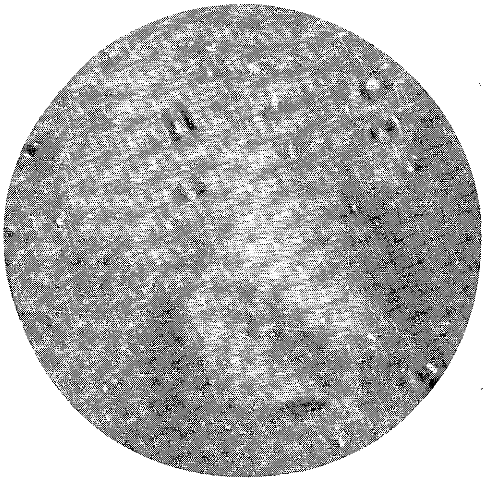
(3)



(4)



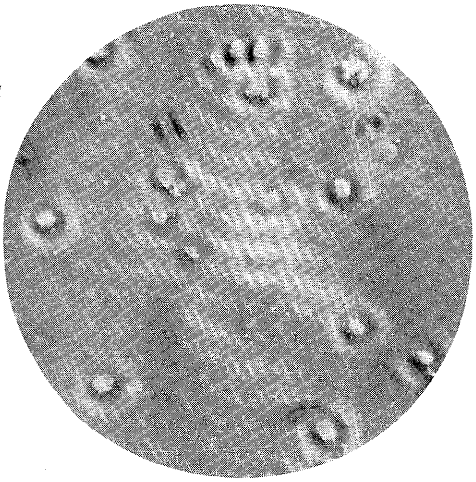
(5)



(6)

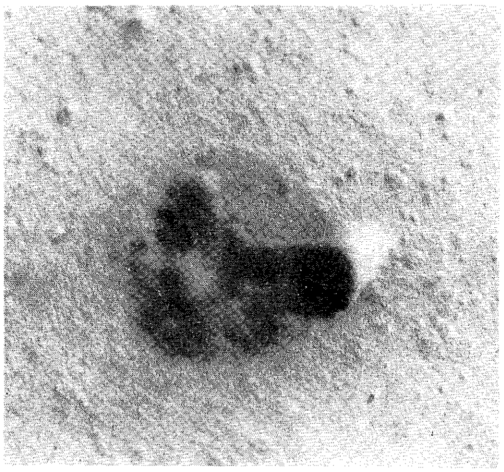
前 川 論 文 附 図 （ 2 ）

（ 7 ）

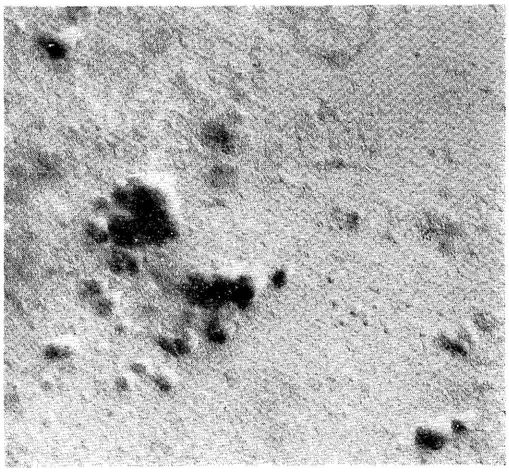


（ 8 ）

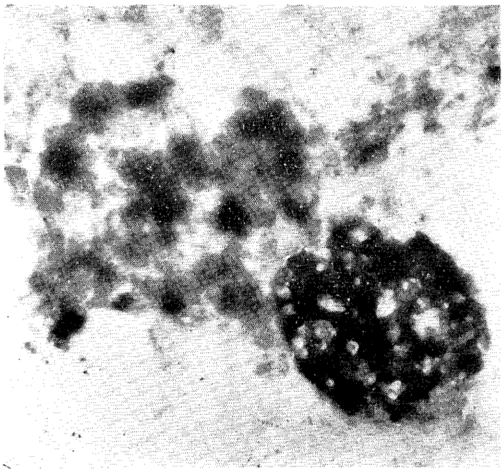
（ 9 ）



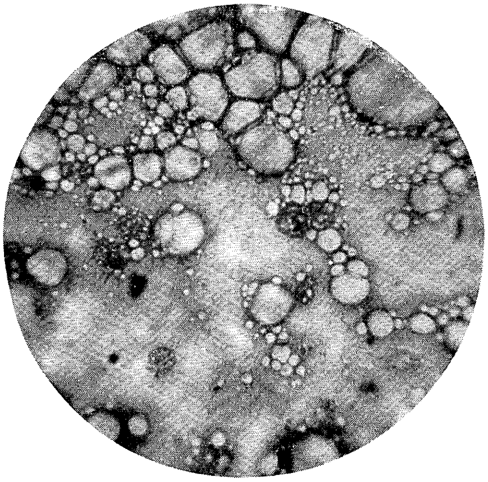
（ 10 ）



（ 11 ）



（ 12 ）



写 眞 說 明

写真 (1) L型巣落 (初代8日目) ×76.8 (小集落はA型, 大集落はB型)
写真 (2) L型集落 (38代3日目) ×76.8 (B型集落)
写真 (3) L型集落 (7代4日目メチレン青染色) ×76.8 (A型集落)
写真 (4) L型集落 (7代4日目メチレン青染色) ×76.8 (小集落はA型, 大集落はB型)
写真 (5) フイルム培地上の Proteus 菌 ×384 (位相差)
写真 (6) フイルム培養 1.5 時間目の Proteus 菌 ×384 (位相差)
写真 (7) フイルム培養3時間目の large body ×384 (位相差)
写真 (8) フイルム培養24時間目の初期L型集落 ×384 (位相差)
写真 (9) Large body の電顕像 (初代5日目) ×12,000
写真 (10) Small form の電顕像 (初代5日目) ×12,000
写真 (11) Large body の電顕像 (30代液体培養6日目) ×6,000
写真 (12) Large body (30代液体培養6日目のメチレン青染色) ×864