

細菌細胞膜に含まれるカルジオリピンの 抗原性とその抗体の細菌に対する反応性

岡山大学医学部細菌学教室（主任：金政泰弘教授）

中 村 知 明

（昭和62年11月21日受稿）

Key words：カルジオリピン，抗カルジオリピン抗体，抗細菌細胞膜抗体，L型菌，
抗DNA抗体

結 言

カルジオリピン（CL）は細菌の膜においてグラム陽性菌、陰性菌をとわず広く分布しており、細菌がL型化した時にはその含量を大巾に増加する事が知られている。¹⁾²⁾しかし人の細胞においてはミトコンドリア内膜に低量含まれているのみである。このCLはもともと梅毒患者の血清と免疫反応を起こすリン脂質として発見されたもので現在も Serological Test for Syphilis (STS) において梅毒の診断に広く使用されている。そしてCLは単独ミセルでは抗体を産生せず、フォスファチジルコリン（PC）と混合ミセルを作成し、メチル化アルブミンと混和吸着させる事により抗体を産生する事が実験的に確認されている。³⁾

一方、梅毒の感染においてはCLに対する抗体価が上昇する（STS陽性となる）とともにその病原体である *Treponema pallidum* に対する特異抗体が上昇する。この両者が陽性となる事で梅毒の確定診断を行うが、梅毒以外にSTS陽性、つまりCL抗体が検出される症例が多く報告されている。この場合は *Treponema pallidum* に対する特異抗体の上昇はなく Biological False Positive (BFP) と呼ばれている。このBFPの症例はほとんど自己免疫疾患及びウイルス感染であって、CLを膜に有する細菌の感染症では癩を除いて多くはなく、慢性もしくは遷延化した感染症たとえば結核などで報告されているにすぎない。⁴⁾⁵⁾一般の細菌感染症（特に敗血症）に

おいてCL抗体価が上昇せず、梅毒の場合に抗CL抗体価がたやすくしかも高力価に上昇する理由は不確定である。又、先に述べたように単独ミセルでは抗体を産生しないCLが細菌細胞膜の中で有効な抗原として抗体を産生し得るかについては全く検討されていない。このため本報告では細菌細胞膜中のCLが抗体を産生し得るのかどうかについてCL混合ミセル、黄色ブドウ球菌と黄色ブドウ球菌L型菌を供試材料として検討した。又、産生された抗CL抗体が細菌及びL型菌とどのように反応するかについても検討した。さらに抗DNA抗体はCLと交叉反応を示す事が知られている⁶⁾⁷⁾ため抗CL抗体が逆にDNAと免疫反応をするかについても検討を加えた。

材 料 と 方 法

1 抗原の作成

CL混合抗原ミセルは井上らの方法³⁾に従って作成した。概要を述べるとまずCL 3mg、PC30mgを10mlのethanol solutionに溶解し、その後10mlの生食と急速混和しミセルを作成した。ついで吸引によりethanolを完全に除いた後に同量（10ml）の0.1%メチル化アルブミンと混和した。この溶液中にCLは0.15mg/ml含まれている。

抗原として供試した細菌は黄色ブドウ球菌209P FDA株(209P-P)、黄色ブドウ球菌209P FDA株より得られた安定L型菌(209P-L)である。細菌はbrain heart infusion broth (BHIB) (Difco U.S.A.)にて37°Cで培養を行い後期対数増殖期に集菌した。L型菌は5%NaCl加

BHIBにて同様の培養を行い集菌した。菌体はその後0.5%ホルマリンで一夜処理し抗原とした。黄色ブドウ球菌細胞膜(209P-P memb)は上記と同様に培養した209P-Pを集菌し、0.1mmのガラスビーズと混和し Vühler 型破砕器にて機械的に菌体を破壊した。これを10,000rpm20分間遠心し、その上清を30,000rpm 1時間遠心した沈渣を209P-P membとして回収した。その後0.5%ホルマリンで処理したものを抗原とした。

2 免疫スケジュール

CL混合ミセルはウサギに3mlずつを2日おきに耳静脈より投与した。計10回の投与後一週間に脱血し血清を採取した。

細菌抗原では、最初2回は Freund の imcomplete adjuvant (Difco U.S.A.) と等量混和したものを皮下に注射し、その後は CL 混合ミセルと同様に耳静脈より投与した。投与の日程は CL 混合ミセルと同様である。

抗原投与量はすべて概算で1回あたり CL 量で約0.45mgとなるように調整して行った。

3 抗血清の精製

得られたウサギ血液は血清を採取し、血清における抗 CL 抗体価を測定した。血清は50%硫酸塩析を2回くり返しその後 PBS に透析し、総 γ グロブリン分画を得た。

この総 γ グロブリン分画の一部は Sephadex-150 (Pharmacia, Sweden) を使用したゲル濾過カラムクロマトグラフィー (ϕ 27mm \times 1 m) により IgM 分画及び IgG 分画に分離精製し、それぞれの抗 CL 抗体価を測定した。

4 抗 CL 抗体価の測定

抗 CL 抗体価は VDRL 法 (ガラス板法)⁸⁾⁹⁾、及びワッセルマン反応 (緒方法)¹⁰⁾¹¹⁾ により常法に従って測定した。反応測定用の抗原は市販のガラス板法抗原 (住友化学)、ワッセルマン反応緒方抗原 (住友化学) をそれぞれ使用した。

5 各種抗血清と細菌及び DNA との反応性の測定

抗血清と細菌の反応は凝集法、間接蛍光抗体法、ニトロセルローズ膜上での EIA 法 (膜 EIA 法) で行った。DNA との反応はニトロセルローズ膜上での EIA 法により行った。

反応用 (抗原) として用いた細菌はすべて免

疫血清作成用抗原と同じ調整を行ったものを使用した。DNA はウシ胸腺 (Sigma, U.S.A.) 鮭精液 (Sigma, U.S.A.) 由来のものを使用した。

ここでまとめて反応用として用いた細菌及びその略名を記す。

黄色ブドウ球菌209P FDA 株	(209P-P)
化膿レンサ球菌124株	(124-P)
マイクロコカス ルテウス ATCC4698株	(M-P)
大腸菌 B 株	(EC-P)
緑膿菌3455株	(PA-P)
黄色ブドウ球菌 L 型菌209PL 株	(209P-L)
化膿レンサ球菌 L 型菌124L 株	(124-L)
大腸菌 L 型菌 ECL 株	(EC-L)

1) 凝集法

反応用細菌を PBS にてマックファーランド比濁標準#3 の濃度に調整し、これを150 μ l と抗体150 μ l を混和した。凝集反応用プレートにて30分間室温で反応させたのち凝集の有無により反応性を検討した。

2) 間接蛍光抗体法

スライドガラスに0.2% Poly-L-Lysin (MW4,000~15,000, SIGMA U.S.A.) を滴下し、室温で15分間静置した。これを PBS にて4回以上洗浄した。この処理スライドガラスに PBS に懸濁した菌体をのせ15分間室温にて付着させた。この後 PBS で洗浄し、Poly-L-Lysin の吸着力をブロックするため0.15M グリシン加 PBS にて15分間室温で処理した。これを PBS で洗浄したものを蛍光抗体用の試料とした。

菌体を付着させたスライドガラスを20倍希釈ヤギ血清で30分間室温で前処理を行った。PBS にて各10分間3回の洗浄を行い、その後一次抗体として50倍希釈抗 CL 混合ミセル抗体 IgM 分画 (VDRL 法 凝集価 \times 32) にて37 $^{\circ}$ C 30分間反応させた。これを PBS にて各10分間3回の洗浄後100倍希釈 FITC ラベル抗ウサギ γ -グロブリン羊 IgG (Behringer mannheim) にて37 $^{\circ}$ C 30分間反応させた。最後に PBS にて各10分間3回の洗浄を行いグリセリン緩衝液にて封入し、蛍光顕微鏡にて観察した。

3) ニトロセルローズ膜上の EIA 法 (膜 EIA 法)

ニトロセルローズ膜 (membranefilter, 0.45 μ m Schleicher & Schuell W. Germany) に適当な

濃度に希釈した抗原を 3 μ l スポットした。0.5%ウシ血清アルブミン(BSA)と0.05% Tween20を含むPBS (BSA-TW-PBS) で各10分間振盪しながら洗浄後2%ヤギ血清を含むPBSに10分間室温で反応させた。BSA-TW-PBSにて3回洗浄後、各一次抗体(抗CL混合ミセル抗体、抗209P-P抗体、抗209P-L抗体)を1,000~8,000倍に希釈したものと30分間反応させた。ついでBSA-TW-PBSで1回、PBSで2回洗浄しペルオキシダーゼ標識抗ウサギ(IgG+IgM+IgA)抗体(Cooper Biomedical, U.S.A.)の2,000倍希釈液に浸し室温にて30分間反応させた。これをBSA-TW-PBSで1回、PBSで2回洗浄し、基質(0.01%過酸化水素水、0.05% diaminobenzididnを含む50mM Tris-HCl pH7.6溶液)と反応させ発色させた。この方法では0.25 μ gの抗原量の検出が可能であり、非特異反応に対し充分に対照を選定すれば特異性が高いことが判明している。

この方法において通常の菌体抗原やDNAのスポットは紫外線照射で確実に付着している事が確かめられたが、カルジオリピンのみによるミセルは付着性が弱くこの方法による検出はやや弱い。フォスファチジルコリンやコレステロールをスポットした場合には全くスポットの発色はなくどの抗血清とも反応しないことから本法による反応検出は可能であった。

結 果

1 各種抗原の抗CL抗体産生性(表1)

それぞれの抗血清の抗CL抗体価を測定したところ、CL混合ミセル(メチル化アルブミン吸着CL・PC混合ミセル)は井上らの報告と同様に高力価の抗CL抗体を産生した。黄色ブドウ球菌親株(209P-P)、及びそのL型菌(209P-L)でも抗CL抗体価は上昇し、その力価はCL混合ミセルの場合とほとんど同程度であった。一方、コントロールつまり免疫操作を行っていないウサギ血清では全く抗CL抗体価を検出しなかった。ただし209P-P memb.では抗CL抗体はVDRL法で $\times 2$ まで検出されたが、緒方法では検出されなかった。

2 抗血清のSephadex150による流出パターン

と抗CL抗体価

CL混合ミセルを抗原として免疫したウサギの血清の総 γ グロブリン分画を50%硫酸塩析にて採取した。これをSephadex G 150によるカラムクロマトグラフィーにかけた。この蛋白流出のパターンと抗CL抗体価(VDRL法)との相関を図1に示す。又、この流出フラクションを抗ウサギIgMヤギIgG、及び抗ウサギIgGヤギIgGを用いてOuchterony法で検出した結果を図2に示す。このOuchterony法により当然ながら最初のpeakはIgMによるものであり、2番目のpeakはIgGによるものであった。このため、フラクション#22~#25をIgM分画とし、フラクション#29~#35をIgG分画とした。

この流出パターンと抗CL抗体価との相関をみるとIgM分画に一致して最も高い。しかし蛋白量あたりではIgM分画に比べて非常に抗CL抗体価は低いもののIgG分画のpeakに一致して抗CL抗体価の第2のpeakが観察された。この事から抗CL抗体価はすべてIgMにあるのではなく弱いながらIgGにも存在していた。

このSephadex150による流出パターン及び抗

表1 各種抗原の抗CL抗体産生性

ウサギ No.	(抗 原)	抗 体 価	
		VDRL	緒方法
1	CL混合ミセル	$\times 64$	$\times 320$
2	CL混合ミセル	$\times 16$	$\times 40$
3	CL混合ミセル	$\times 32$	$\times 80$
4	209P-P	$\times 8$	$\times 20$
5	209P-P	$\times 16$	$\times 40$
6	209P-L	$\times 16$	$\times 20$
7	209P-L	$\times 32$	$\times 80$
8	209P-P Memb.	$\times 2$	(-)
9	209P-P Memb.	$\times 2$	(-)
10	control	(-)	(-)
11	control	(-)	(-)

抗体価は血清希釈培養で標示

CL 抗体価の相関は209P-P, 209P-Lを抗原として得られた免疫血清でも全く同一であった。

3 各抗体と細菌の反応性

1) 凝集反応 (表2)

抗 CL 混合ミセル抗体は IgM 及び IgG 分画を使用し, 抗209P-P 抗体, 抗209P-L 抗体は総 γ グロブリン分画を使用した。この結果, 抗 CL 混

合ミセルは, 209P-L ばかりではなくすべての L 型菌に対して凝集活性を示した。グラム陰性菌親株とは全く凝集活性を示さなかった。グラム陽性菌に対しては209P-P 以外には凝集活性を示さなかった。

抗209P-P 抗体, および抗209P-L 抗体との反応では供試した L 型菌はすべて凝集活性を示し

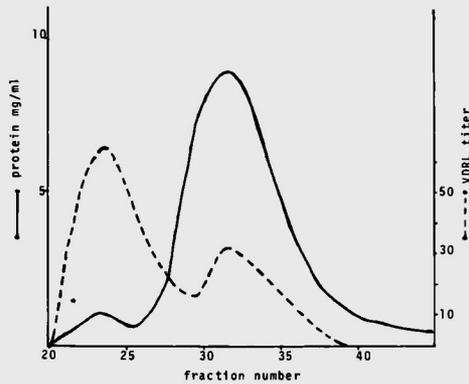


図1 抗 CL 混合ミセル抗体の Sephadex 150 による流出パターンと抗 CL 抗体価

表2 凝集反応における各種抗体と細菌の反応性

抗原	抗体	抗 CL 抗体 (IgM 分画)	抗 CL 抗体 (IgG 分画)	抗 209 P-P 抗体 (総 γ -グロブリン)	抗 209 P-L 抗体 (総 γ -グロブリン)	正 常 ウサギ (血清)
CL ミセル* (VDRL 抗原用)		×32	×8	×8	×16	(-)
209P-L		#	+	#	#	(-)
124L		+	+	+	+	(-)
EC-L		#	+	+	+	(-)
209P-P		+	#	#	+	#
124-L		(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
M-P		(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
EC-P		(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
PA-P		(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

* CL ミセルとの反応は VDRL 法における最大希釈凝集値で表示している

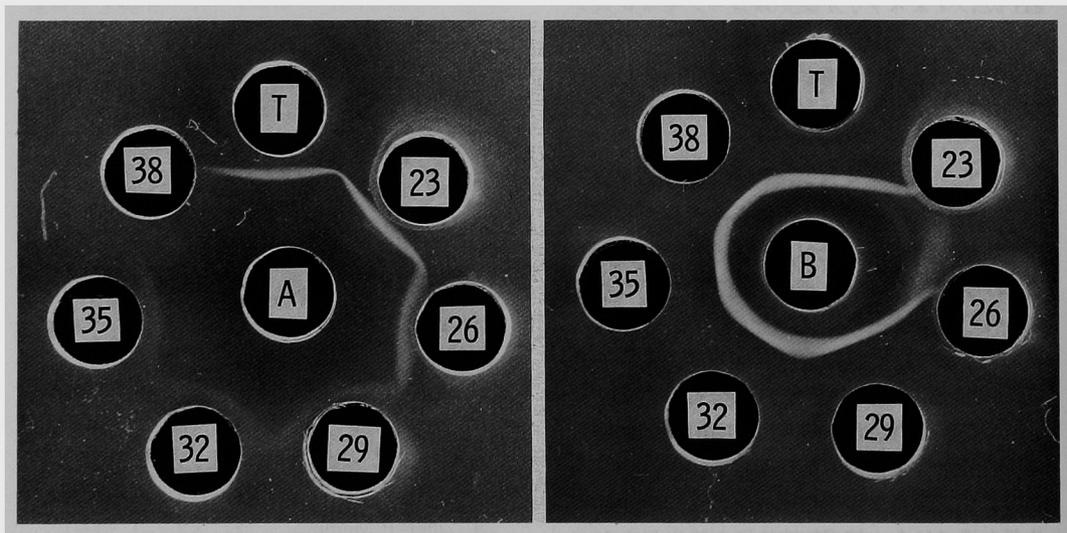


図2 Sephadex 150 による流出フラクションの IgM, IgG 分布 (Ouchterony 法)

A : 抗ウサギ IgM ヤギ IgG

B : 抗ウサギ IgG ヤギ IgG

T : 抗 CL 混合ミセル抗体 γ グロブリン分画

数字は図1の fraction number を示す

たが、209P-P 株以外の通常の栄養型細菌には凝集活性を示さなかった。

又、209P-P は control sera を含むすべての抗血清で凝集した。

2) 間接蛍光抗体法

L 型菌は菌体が粘調であるため前記の凝集反応では強い凝集を起こさないと判定が困難であった。そこで間接蛍光抗体法で検討した。

ここでは抗体として抗 CL 混合ミセル抗体総 γ グロブリン分画のみを使用した。この結果の 1 例として 209P-L 株でのものを図 3 に示した。

この間接蛍光抗体の結果、供試された L 型菌すべてから 209P-L 株と同様の強い蛍光が検出された。

グラム陰性菌 (*E. coli* B, *P. aeruginosa* 3455,) では全く蛍光は検出されなかった。しかし、グラム陽性菌 (*S. aureus* 209P-P, *S. pyogenes* 124) では L 型菌や膜分画に比べて非常に弱いものの蛍光を認めた。

3) ニトロセルロース膜上の EIA (図 4)

この実験においては抗 CL 抗体総 γ グロブリン分画, 抗 209P-L 抗体総 γ グロブリン分画, 抗 209P-P 総 γ グロブリン分画を使用し、いずれも総蛋白量を $2 \mu\text{g/ml}$ に調整して行った。

抗 CL 混合ミセル抗体は 209P-P, 209P-L, ECL, CL ミセルと反応し, *E. coli* などその他の栄養型細菌とは反応しなかった。反応したものでは 209P-P が最も強く, 209P-L, ECL はそ

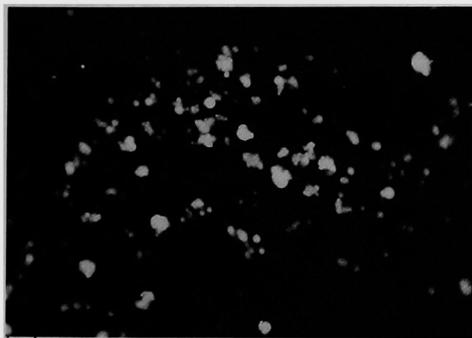


図 3 抗 CL 混合ミセル抗体を用いた間接蛍光抗体法例
(抗原: 黄色ブドウ球菌 L 型菌 (209P-L))

れに比べて弱いように見受けられた。

抗 209P-L 抗体, 抗 209P-P 抗体との反応を比較すると, 3 者の間に大きな差は認められず, 反応した 4 者 (209P-P, 209P-L, ECL, CL ミセル) に共通の反応性が認められ, その力価に

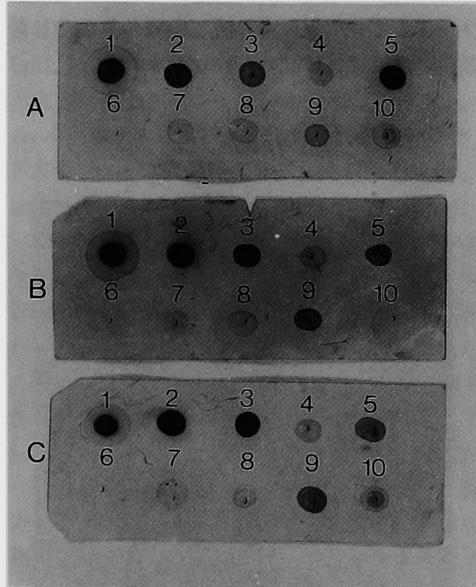


図 4 膜 EIA 法による各種抗体と細菌の反応性
一次抗体

- A: 抗 CL 混合ミセル抗体 (γ グロブリン分画)
B: 抗 209P-P 抗体 (")
C: 抗 209P-L 抗体 (")

二次抗体

ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG+IgM ヤギ抗体 (1,000倍希釈)

抗原 (各スポットは $3 \mu\text{l}$)

- 1: 209P-P (黄色ブドウ球菌) $1 \times 10^7 \text{cell/ml}$
2: 209P-L (黄色ブドウ球菌 L 型菌) 1.1mg protein/ml
3: EC-L (大腸菌 L 型菌) $0.53 \text{mg protein/ml}$
4: EC-P (大腸菌) $1 \times 10^7 \text{cell/ml}$
5: CL ミセル 1mg/ml
6: M-P (マイクロコッカス・ルテウス) $1 \times 10^7 \text{cell/ml}$
7: 124-P (化膿レンサ球菌)
8: 変形菌 $1 \times 10^7 \text{cell/ml}$
9: 正常ウサギ血清 (100倍希釈)
10: 正常ウサギ血清 (5000倍希釈)

著明な差はなかった。

4 抗 CL 抗体と DNA の反応性 (図 5)

抗 CL 混合抗体, 抗 209P-P 抗体, 抗 209P-L 抗体と DNA との反応性の有無について膜 EIA 法で調べた。この結果 DNA とは全く反応しなかった。二重鎖 DNA を熱変性 (90°C 20 分処理後急冷) し, 一本鎖 DNA を作成し同様の方法でしらべたが, 反応性は認められなかった。

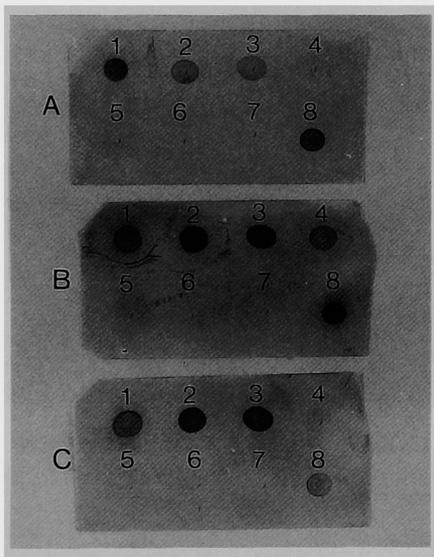


図 5 膜 EIA 法による各種抗体と DNA との反応性
一次抗体

A : 抗 CL 混合ミセル抗体
(γ グロブリン分画)

B : 抗 209P-P 抗体 (")

C : 抗 209P-L 抗体 (")

二次抗体

ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG+IgM+
IgA ヤギ抗体 (1000倍希釈)

抗原

1 : 209P-P (黄色ブドウ球菌)
 1×10^7 cell/ml

2 : 209P-L (黄色ブドウ球菌 L 型菌)
1.1mg protein/ml

3 : CL ミセル 1 mg/ml

4 : ds DNA (ウシ胸腺由来) 1 mg/ml

5 : ss DNA (") 1 mg/ml

6 : ds DNA (鮭精液由来) 1 mg/ml

7 : ss DNA (") 1 mg/ml

8 : 正常ウサギ血清 (100倍希釈)

考 察

細菌細胞膜のリン脂質は菌種により種類、量ともに異なるがこれらリン脂質の中ではカルジオリピン (CL)³⁾, フォスファチジルグリセロール²⁾とフォスファチジルイノシトール³⁾以外には抗原性があるという報告はない。CL は通常栄養型細菌では膜に 10%~20% 程度まで存在する。この CL に対する抗 CL 抗体価の上昇 (STS 陽性) は梅毒以外の種々の疾病で見られる。この中で細菌感染症では癩で 60%, マイコプラズマ肺炎・スピロヘータ性疾患 (レプトスピラ症, 回帰熱, 等)・発疹チフスで 10%~30% にみられ, 結核・肺炎球菌性肺炎・亜急性性心内膜炎・梅毒以外の細菌性性病で 10% 以下に検出されている。しかしウイルス性疾患, マラリア, 自己免疫性疾患でもかなりの頻度 (10%~40%) で検出される⁴⁾。この事より抗 CL 抗体価の上昇は, 体内の広範な組織破壊によって引き起こされる一種の自己抗体的な反応であろうとの考え方が強い¹⁴⁾¹⁵⁾。

しかしながら上記で述べたごとく細菌の膜にはかなりの CL を含有している。この細菌の膜内 CL が抗 CL 抗体価の上昇を引き起こす可能性は高いと思われるが, CL が単独ミセルでは抗体を産生せずフォスファチジルコリン (PC) と混合ミセルを作成しメチル化アルブミンに吸着させると抗体を産生する事を考えると判然としない。又これに対する検討は全くなされていない。このため CL 混合ミセル (CL, PC 混合ミセル・メチル化アルブミン吸着), 黄色ブドウ球菌 (209P-P), 黄色ブドウ球菌 L 型菌 (209P-L) を抗原としてウサギに免疫を行った。この結果 209P-P, 209P-L を抗原とした場合も CL 混合ミセルを抗原とした場合と同等の高い抗 CL 抗体価の上昇が観察された。従って細菌の膜に含有される CL は有効な抗原として抗 CL 抗体を産生し得る可能性が高い。しかしながらもう一つの可能性が存在している。抗 DNA 抗体が CL と交叉反応を引き起こす事が知られており⁶⁾⁷⁾, 209P-P や 209P-L のように全菌体を抗原として免疫した場合菌体内 DNA により抗 DNA 抗体が産生されこの抗 DNA 抗体が CL 混合ミセルと反応するため見か

け上抗 CL 抗体価が上昇したという可能性である。黄色ブドウ球菌細胞膜分画を抗原とした場合の抗 CL 抗体価上昇が弱いという結果もこの可能性を示している。この抗 DNA 抗体と CL との反応性については自己免疫性疾患特に SLE でよく知られている⁷⁾。自己免疫性疾患においては抗 CL 抗体価の上昇がかなりの頻度で検出される。この場合抗 DNA 抗体価が上昇しておりこの抗 DNA 抗体が CL と交叉反応を引き起こすため人体組織の破壊とともに抗 CL 抗体価の上昇を引き起こすといわれている。この可能性に対して抗 209P-P 抗体、抗 209P-L 抗体の DNA との反応性を調べた。この結果 209P-P 抗体と抗 209P-L 抗体は二本鎖及び一本鎖 DNA と全く反応しなかった。この事は二つの抗体には抗 DNA 抗体は含まれていない事を示している。従って抗 209P-P 抗体、抗 209P-L 抗体における抗 CL 抗体価の上昇は抗 DNA 抗体によるものではなく細胞膜内の CL が確実に有効な抗原として抗 CL 抗体を産生している事を示している。かなり多量のもしくは継続的な細菌感染症においては組織の崩壊によるものだけではなく細菌膜内 CL も抗 CL 抗体価上昇に関与しているものと考えられる。しかし多くの細菌感染症で抗 CL 抗体価が上昇せず、梅毒においてたやすく高力価に上昇する理由についてはさらに詳細な検討が必要であろう。黄色ブドウ球菌細胞膜分画を抗原とした場合抗 CL 抗体価の上昇が弱かったが、この理由は不明である。しかし通常の膜蛋白に対する抗体も膜分画を抗原とするよりは全菌体を抗原とした方が抗体価の上昇が良い事が経験的に知られており、この場合もこれに類似する現象ではないかと考えている。

抗 209P-P 抗体、抗 209P-L 抗体は DNA と反応しなかったが、抗 CL ミセル抗体も又 DNA と全く反応を示さなかった。抗 DNA 抗体が CL と交叉反応するのは DNA と CL が分子立体構造で非常に似かよっているためであると考えられている⁹⁾。抗 CL 抗体が DNA と全く反応しない事はこの理論に矛盾していると考えられる。しかし抗 CL 抗体が弱いながらも DNA と反応するという報告¹⁰⁾もありさらに詳細な検討が必要であろう。

抗 CL 抗体における IgM 抗体価および IgG 抗体価の分布を検討した。この結果抗 CL 抗体は IgM 分画にその力価が高かったが IgG 分画にも力価が存在していた。抗 CL 抗体価の分布パターンは抗 209P-P 抗体、抗 209P-L 抗体の場合も同様であった。通常梅毒においては抗 CL 抗体(抗脂質抗体)、抗トレポネーマ特異抗体双方において IgM、IgG 抗体が検出される¹⁷⁾が、一般の感染症と同様に感染初期には IgM 抗体が主に検出される。本実験における抗 CL 抗体、抗 209P-P 抗体、抗 209P-L 抗体における抗 CL 抗体価の IgM、IgG パターンは梅毒早期のものに似かよっていた。

作成した抗体と細菌との反応性は種々の方法で検討した。この結果抗 CL 混合ミセル抗体、抗 209P-P 抗体、抗 209P-L 抗体いずれも 209P-L 株だけでなくすべての L 型菌と反応した。これらの抗体に共通に含有されているのは抗 CL 抗体であるから抗 CL 抗体が種々の L 型菌と反応していると考えられる。L 型菌は細胞壁が欠落しており細胞質膜が直接外界と接している。その上膜内 CL 量が増加している。このため抗 CL 抗体が細胞質膜と容易にしかも強く結合できると考えられる。一方細胞壁を有する通常の栄養型細菌では黄色ブドウ球菌 (209P-P) 以外は化膿レンサ球菌 (124-P) が蛍光抗体法で非常に弱い反応を示したのみで抗 CL 抗体とは反応しなかった。グラム陰性菌においては最外層は外膜であるが、この外膜の outer leaflet はほとんどが LPS で占められており CL はほとんど存在しない。その上抗体は外膜を通過できず CL を含有している内膜に到達できないため抗 CL 抗体と反応しないと考えている。又グラム陽性菌は厚い細胞壁を有しており抗体がこれを通過できず反応しないのであろう。黄色ブドウ球菌 (209P-P) は正常ウサギ血清を含むすべての抗体と凝集法及び膜 EIA 法で反応した。これは明らかに非特異反応であるが、この反応を引き起こすものとしては Protein A が考えられる。しかし蛍光抗体法では弱い蛍光しか検出しなかった点や IgM 分画でも IgG 分画に対してそれほど反応の程度がさがる点など Protein A のみでは説明がつかず本態は不明である。このように抗 CL 抗体と細菌との反応を検討すると黄色ブドウ球菌 (209P-P) 以外の

栄養型細菌は抗 CL 抗体と反応せず、L 型菌は検討したすべての菌で反応した。又黄色ブドウ球菌膜分画も蛍光抗体法で抗 CL 抗体と強く反応していた。従って抗 CL 抗体を用いた検出法は L 型菌及び細菌の膜片の検出に利用できると考えられる。凝集法は感度の低いため難点が多いが、蛍光抗体法と膜 EIA 法はこの方面に利用し得る。特に蛍光抗体法は形態的に黄色ブドウ球菌を判別できるため有用と考えられ、さらに検討を行いたい。

結 論

CL 混合ミセル、黄色ブドウ球菌及び黄色ブドウ球菌 L 型菌を用いて細菌の膜内カルジオリピンが有効な抗原として抗体を産生し得るかを検討した。さらに産生された抗カルジオリピン抗体と細菌及び DNA との反応性を検討し以下の結果を得た。

1) 細菌の膜内カルジオリピンは有効な抗原と

して抗体を産生し得た。

2) 抗カルジオリピン抗体は IgM, IgG 双方に抗体価を有していた。

3) 抗カルジオリピン抗体は DNA を全く交叉反応しなかった。

4) 抗カルジオリピン抗体は各種 L 型菌及び細菌膜分画と反応し通常の栄養型細菌とは黄色ブドウ球菌を除いて反応しなかった。このことから抗カルジオリピン抗体を用いた検出法 (蛍光抗体法, 膜 EIA 法) は L 型菌及び細菌膜片の検出に利用し得ると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導と御校閲を賜りました金政泰弘教授に深甚なる感謝の意を表します。また本研究の遂行に際して終始温かい御指導を戴きました平井義一講師、多大なる御協力、御助言を戴きました細菌学教室の諸先生に厚く御礼申し上げます。

文 献

1. Okabe A, Hirai Y, Hayashi H and Kanemasa Y : Alteration in phospholipid composition of *Staphylococcus aureus* during formation of autoplast. *Biochem Biophys Acta* (1980) 617, 28—35.
2. 金政泰弘 : ブドウ球菌表層の適応現象。臨床と微生物 (1987) 14, 350—351.
3. Inoue K and Nojima S : Immunochemical studies of phospholipids III production of antibody to cardiolipin. *Biochem Biophys Acta* (1967) 144, 409—414.
4. Moore JE and Mohr CF : The incidence and etiologic back ground of chronic false-positive reactions in serologic test for syphilis. *Ann Intern Med* (1952) 37, 1156—1162.
5. 松橋 直 : 梅毒トレポネーマ。微生物検査必携 (厚生省監修) 第 3 版, 財団法人日本公衆衛生協会, 東京 (1987) H20—H29.
6. Lafer EM, Rauch J, Andrzejewski C, Mudd D, Furie B, Furie B, Schwartz RS, and Stollar BD : Polyspecific monoclonal lupus autoantibodies reactive with both polynucleotides and phospholipids. *J Exp Med* (1981) 153, 897—909.
7. Schwartz RS and Stollar BD : Origin of anti-DNA autoantibodies. *J Clin Invest* (1985) 75, 321—327.
8. Harris A, Rosenberg AA and Del Vecchio ER : The VDRL slide flocculation test for syphilis. *J Ven Dis Inform* (1946) 27, 169—174.
9. 松橋 直 : 梅毒血清反応 (ガラス板法)。微生物検査必携 (厚生省監修) 第 3 版, 財団法人日本公衆衛生協会, 東京 (1987) H47—H53.
10. 緒方富雄 : 緒方法と梅毒凝集法とガラス板法。南山堂, 東京 (1951) 29—36.
11. 徳永栄一 : 梅毒血清反応 (緒方法)。微生物検査必携 (厚生省監修) 第 3 版, 財団法人日本公衆衛生協会, 東京 (1987) H61—H74.

12. Schiefer HG, Gerhardt V and Brunner H : Immunological studies on the localization of phosphatidylglycerol in the membrane of *Mycoplasma hominis*. Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem (1975) 356, 559—565.
13. Kataoka T and Nojima S : Immunochemical studies of phospholipids VI Haptenic activity of phosphatidylinositol and the role of lecithin as an auxiliary lipid. J Immunol (1970) 105, 502—511.
14. 野口義園：VDその新しい診療。南山堂，東京（1969）63—64.
15. 郷路 勉，広瀬崇興，熊本悦明：早期梅毒；STDの現況と問題点，熊本悦明編，ライフ・サイエンス，東京（1987）97—117.
16. Rauch J, Tannenbaum H, Stollar BD and Schwartz RS : Monoclonal anticardiolipin antibodies bind to DNA. Eur J Immunol (1984) 14, 529—534.
17. 富沢孝之：TPHAの特異性について。検査と技術（1981）9，545—548.

**Antigenicity of bacterial membrane-cardiolipin and reactivity
of anti-cardiolipin antibody with bacteria and DNA**

Tomoaki NAKAMURA

**Department of Microbiology, Okayama University Medical School,
Okayama 700, Japan**

(Director : Prof. Y. Kanemasa)

I investigated the possibility of production of antibody to bacterial membrane-cardiolipin using cardiolipin micelles, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and L-form of *S. aureus*. I also investigated and the reactivity of anti-cardiolipin (CL) antibody with bacteria and DNA.

I confirmed that the bacterial membrane-cardiolipin induced the production of anti-CL antibody, which was present mainly in the IgM fraction, but also in the IgG fraction.

The anti-CL antibody reacted with L-form of bacteria and bacterial membrane fractions, but it did not react with the vegetative form of bacteria other than *S. aureus* nor with DNA. On the basis of these findings, I considered that the L-form of bacteria or fragments of bacterial membranes can be detected by immunofluorescence antibody technique or nitro-cellulose membrane-enzyme immunoassay using the anti-CL antibody.