----- Note -----

A Modified Tanabe-Chiba Medium for Detection of *Entamoeba histolytica*

Masumi YOSHIMURA and Michi EBUKURO

Central Institute for Experimental Animals, 1430
Nogawa, Miyamae, Kawasaki 213, Japan.

(Received 10 July 1987/Accepted 4 March 1988)

Tanabe-Chiba's (T-C) medium, which has been routinely used for detection of *Entamoeba histolytica* in feces in Japan, was modified by adding some commercially available enrichments to the liquid part and by eliminating the agar slant. This is tentatively called M medium. M medium and T-C medium were compared for their efficiency for detecting *E. histolytica* in the feces of monkeys. No significant difference in the detection rate was found between the two media. However the rate of multiplication of the amoebae in M medium was significantly higher than that in T-C medium within the limited time of 24–48 h of cultivation.

赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) 検出のための 田辺・千葉変法培地

吉村マスミ・江袋美知

(財) 実験動物中央研究所

わが国の実験用サル類は、大部分が海外からの輸入に依存している。それらのサル類は、ときに赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) を寄生しており、しかもそれらの多くは不顕性感染である [5, 7, 8]。したがって、外観上健康な感染サルが、実験使用によって発症する可能性がある。サル類の検疫や健康管理において、他の病原微生物同様、本原虫の存在もまた重視せざるをえない。さらに、本原虫は、人体にも感染してアメーバ性赤痢をひきおこす医学上重要な病原体でもある。

上記の理由から、当研究所においては、サル類における赤痢アメーバ感染の有無を速やかに把握する必要があり、その一つの方法として培養法による検出を検討した。

赤痢アメーバの検査は、糞便の直接検査、あるいは集嚢子法で確認できなかった場合に、培養検査をおこなうのが一般的であるが [4, 5, 6]、サル類は不顕性感染が多いことから、糞便内のアメーバ数は少ないと仮定し、われわれは培養による検査のみをおこなった。従来、わが国では、ヒトおよびサル類の赤痢アメーバの培養検査に田辺・千葉培地 (T-C 培地) が一般に用いられており [4, 5, 6, 9]、われわれもサル類の糞便検査に同培地を使用し、便宜上 48 時間培養で判定してきた。しかし、この培地では栄養源が乏しいために、赤痢アメーバの増え方がおそく、検出、判定に手間取るばかりでなく、短時間培養では陽性検体を見落とす危険性もあった。これらのことは、実験動物の飼育管理や実験使用の上で、赤痢

アメーバ感染の有無を早急に調べる必要がある場合には、障りとなっていた。そこで短時間培養でも増殖性の良い培地が必要と考え、T-C 培地をもとに、栄養源の組成は Diamond [2,3] の培地を参考にして液状培地を考案した。これを M 培地と仮称し、T-C 培地との間で比較検討をおこなった。

M 培地の調製は、T-C 培地の液状部であるオートクレーブ滅菌リンゲル液 (NaCl 9g, CaCl 0.2g, KCl 0.2g, 精製水 1,000ml) 80ml と 56℃, 30 分非 働 化 馬 血 清 (Gibco) 10ml の混合液にオートクレーブ滅菌した 10% Neutralised Liver Digest (Oxoid) 5ml とビスコン注 (山之内製薬) 5ml からなる液状培地に、抗菌剤としてペニシリン G 10 万単位とコリスチン 4 万単位を加えて混合した。この M 培地を、16×160mm の中試験管に約 8 ml 分注して使用した。尚、ビスコン注の成分は、5ml 中に塩酸チアミン 10mg, リン酸リボフラビン 6.833mg, アスコルビン酸 200mg を含むものである。T-C 培地は原法[9]に準じ、リンゲル液 100ml に寒天 1.0g, アスパラギン 0.1g を加えて加温溶解した。中試験管に約 8 ml 分注し、オートクレーブ滅菌後、斜面培地とした。滅菌リンゲル液 80ml と非働化馬血清 10ml を混合して液状培地とし、斜面部に約 80ml 注加し、使用時に乾熱滅菌した米粉を少量加えた。

変法培地の M 培地と T-C 培地を用いて、実験用サル類の赤痢アメーバ検索を行い、M, T-C 両培地それぞれの検出成績を比較した。

検体としては、1984 年 5 月から 1985 年 12 月にわたり、当研究所において検査をした実験用サル類の新鮮便であり、ほとんどが一見正常便であった。その内わけは、インドネシア由来のカニクイザルより延べ 369 検体、中国由来のアカゲザルより延べ 20 検体の合計 389 検体であった。

培養にあたっては、各ふん便に約 10 倍量の生理食塩水を加えて混和し、4 重のガーゼで 2 回ろ過した。ろ液を攪はん後、その約 0.5ml ずつを M 培地ならびに T-C 培地の各一本ずつに接種し、37℃ で培養した。24 時間および 48 時間後に、これらの培地から、培養沈さの一部をピペットでスライドガラス上にとり、18mm 角のカバークラスをかぶせ、37℃ の加温顕微鏡により、カバーガラスの全視野を倍率 100 倍で鏡検した。赤痢アメーバを認めた検体を陽性とし、全視野内のアメーバ数を算定した。

赤痢アメーバの形態学的な同定は、培養で得た栄養体をシャウジン液で固定し、ハイデンハイン鉄ヘマトキシ

Table 1. A comparison of M medium and T-C medium (Tanabe-Chiba medium) for detection of *Entamoeba histolytica* in fecal samples from monkeys

Species of monkey	No. of fecal samples	No. of fecal samples classified by the presence of <i>E. histolytica</i> in M and T-C			
		M+ T-C+	M+ T-C-	M- T-C+	M- T-C-
<i>Macaca fascicularis</i>	369	36	20	14	299
<i>M. mulatta</i>	20	6	3	0	11
Total	389	42	23	14	310

M: M medium

T-C: T-C medium (Tanabe-Chiba medium)

Table 2. Number of *Entamoeba histolytica* trophozoites M medium and T-C medium (Tanabe-Chiba medium) after 24- and 48-h cultivation of the cysts in feces of *Macaca fascicularis*

Cultivation time(h)	Medium	No. of fecal samples*	No. of trophozoites detected on a microscopic slide(av.)
24	M	21	1-2000 (138.10)
	T-C	21	0-4 (0.76)
48	M	55	0- 500 (53.91)
	T-C	55	0- 236 (16.76)

* The same fecal sample was used for M and T-C medium in each test, and the numbers of *Entamoeba histolytica* trophozoites in the two media were compared.

リン染色を施して作製した永久標本につき、Burrows [1], 小山 [6] および神谷 [4] などの記載を参考に、栄養体の大きさ、核膜内面のクロマチン粒の形態、カリオソームの大きさと位置、細胞質の疎密状態などの特徴を精査して行った。また、赤痢アメーバ以外のアメーバが両培地で増殖しないことを確認するため、一部の検体で培養前の糞便を直接塗抹検査した。糞便中に存在した赤痢アメーバ、大腸アメーバ、ヨードアメーバなどの消化管寄生アメーバの嚢子が、培養後は赤痢アメーバを除いてすべてが消滅した。

サル類における赤痢アメーバ陽性率は、培養法のみによる今回の検出成績では、Table 1 に示すように 79/389 (20%) であり、その内訳はカニクイザル 70/369 (19%)、

Table 3. Number of *Entamoeba histolytica* trophozoites in M medium and T-C medium (Tanabe-Chiba medium) after 24- and 48-h cultivation of the cysts in feces of *Macaca mulatta*

Cultivation time(h)	Medium	No. of fecal samples*	No. of trophozoites detected on a microscopic slide(av.)
24	M	6	2- 78 (26.83)
	T-C	6	0- 36 (6.17)
48	M	7	0- 300 (56.43)
	T-C	7	0- 36 (5.86)

* The same fecal sample was used for M and T-C medium ie each test, and the numbers of *Entamoeba histolytica* trophozoites in the two media were compared.

アカゲザル 9/20(45%) あった。陽性検体についての培地別陽性率は、M培地において65-79(82%), T-C培地では56/79(71%)と、M培地はT-C培地より10%高率であった。しかし、McNemar法により、2種の培地の性能を比較したところ、カニクイザルの材料でも、アカゲザルの材料でも、また両者総合でも、5%の危険率で有意差が認められなかった。つまり、M培地とT-C培地の間に検出率の差のないことが判明した。また、M培地で検出、T-C培地で未検出の例が23例ある一方、逆にM培地で未検出、T-C培地で検出が14例あり、M培地がT-C培地の検出能を完全にカバーできるものではないことも明らかになった。

培養により増殖したアメーバの数の比較では、Table 2, 3に示すように、サルの種類、培養時間にかかわらず、一見してM培地ではT-C培地の場合よりアメーバの個体数が多くみえた。同一検体を両培地で培養した場合、それぞれの増殖アメーバ数を比較するためにt検定を行ったところ、カニクイザルの場合には、培養24, 48時間のいずれでも1%の危険率で有意差が認められた。それに対し、アカゲザルの場合は、培養24時間では5%の危険率で有意差が認められたが、培養48時間では、統計学的に有意差が認められなかった。しかし、以上を総合してみると、上記培養時間の範囲では、全体としてM培地のほうがT-C培地より増殖性において優れていると判断できた。ただし、M培地での24-48時間培養では、アメーバの生虫体数は最高に達するものの、以後は衰退し死虫体が増加した。これに対して、T-C培地では、始めの24-48時間の増殖性はM培地に比べて劣るものの、

アメーバの生存時間は長く認められた。

M培地は液状培地であり、固形部と液状部よりなるT-C培地より調製が容易である。また、T-C培地では液状部に添加する滅菌米粉をM培地では使用しないので、培地作製上の手間が省け、米粉の体内摂取によるアメーバの変形も起らず、同定も容易である。さらに上述のように、M培地では、アメーバがすみやかに増殖し、短時間で検出しやすい状態となるので、鏡検時の労力も軽減される。したがって、M培地は、赤痢アメーバの検出のためには、T-C培地よりさらに有用な培地と考えられた。しかし、上述のように、T-C培地で検出しながら、M培地で検出しない場合もあることから、この原因の解明と改良を行う必要がある。また、現状においては、両培地併用が望ましいと思われる。今回は、M, T-C両培地の比較検討のみであったが、今後は、簡易で優れた検出能力をもつ培地の改良と、糞便の直接塗抹染色、集嚢子法と培養法との比較検討を試みていきたい。

要 約

わが国で、糞便材料からの赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)の検出には田辺・千葉培地(T-C培地)が常用されている。そのT-C培地から斜面部と米粉を除き、液状部に、市販のNeutralised Liver Digestと複合ビタミン剤を添加することによって、同培地の変法を試みた。この変法培地をM培地と仮称した。T-C培地およびM培地で、サル糞便中の赤痢アメーバの検出率を比較した。その結果、検出率については、両者間で有意差は得られなかったが、培養後24-48時間の範囲に限れば、M培地でのアメーバの増殖率が、T-C培地でそれに優ることが判明した。

本稿の統計処理について御協力下さいました神奈川県衛生研究所細菌病理部の黒木俊郎氏に感謝いたします。

文 献

- [1] Burrows, R. B. (1965). Microscopic Diagnosis of the Parasites of Man. Yale Univ. Press, London, 105-127.
- [2] Diamond, L. S. (1968). Journal of Parasitology, 54, 1047-1057.
- [3] Diamond, L. S., Harlow, D. R., and Cunnik, C. C. (1987). Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 72, 431-432.
- [4] 神谷正男 (1985). 実験動物感染病学, pp. 268-276, 藤原公策編, ソフトサイエンス社, 東京.
- [5] 小山 力・熊田三由・町田昌弘 (1974). 人畜共通伝染病調査報告, 人畜共通伝染病調査委員会, p. 44-69.
- [6] 小山 力 (1977). 実験小動物の感染症, pp. 233-236, 298-304, 藤原公策, 中川雅郎, 石井俊男, 高垣善男編, ソフトサイエンス社, 東京.

- [7] 小山 力(1983). 霊長類と疾病, 京都大学霊長類研究所, pp. 36-37.
- [8] 榊原一兵・杉本泰子・小山 力・本庄重男(1982). 実験動物, **31**, 135-138.
- [9] 田辺 操・千葉英一 (1928). 東京医事新誌, **2586**, 1787-1790.