口腔トリコモナスの生物学的性状

—異物貪食作用, 低級脂肪酸産生および
EB ウイルス抗原誘導能—

浅井 昭 士 郎 中 村 義 則 中 谷 至 宏
佐 藤 勝 並 河 勇

朝日大学歯学部口腔細菌学講座 (主任 : 並河 勇教授)

〔受付 : 平成 3 年 3 月 10 日〕

Biological properties of oral trichomonads

— phagocytosis, production of short-chain
fatty acids and EB virus induction —

Shojiro Asai, Yoshinori Nakamura, Yoshihiro Nakatani,
Masaru Sato and Isamu Namikawa

Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Asahi University
1851 Hozumi, Hozumi-cho, Motosu-gun, Gifu 501-02 Japan
(Director : Prof. Isamu Namikawa)

〔Accepted for publication : March 10, 1991〕

Key words : *Trichomonas tenax* / *Trichomonas vaginalis* / Phagocytosis / EBV-antigens / *Staphylococcus aureus*

Abstract : In the present study, the phagocytosis of latex particles and *Staphylococcus aureus* by *Trichomonas tenax* was examined, and production of short-chain fatty acids and induction of EB virus antigen were also investigated.

Larger latex particles ($1.07\ \mu\text{m}$ in size) were enclosed sparsely by *T. tenax* and smaller size particles ($0.15\ \mu\text{m}$) were found to have accumulated within *T. tenax* cells. *T. tenax* began to enclose *S. aureus* into its cytoplasm after 10 minutes, and the action of phagocytosis of *S. aureus* by *T. tenax* declined within 24 hours. Electron microscopic findings indicated that phagocytosis had initiated within 10 minutes, followed by the degradation of bacterial cells within 24 hours.

Acetic acid of 2.6 mM as a short-chain fatty acid in 5 ml of cultured fluids was produced by *T. tenax* and 2.0 mM by *T. vaginalis*, respectively. In addition, 1.0 mM acetic acid was produced by the isolated accompanying bacteria. These cultured fluids did not induce the EB viral antigens in terms of early antigen (EA).

The result obtained in the present study disclosed that *S. aureus* was enclosed and digested in the cytoplasm within 2 hours, besides, the cultured fluids of these trichomonad species did not induce EA because the inducers such as n-butyric acid could not be yielded.

緒 言

口腔トリコモナス (*Trichomonas tenax*) は,

〒 501-02 岐阜県本巣郡穂積町穂積 1851

いまだ、純培養が確立されていないため、生物学的性状はほとんど明らかにされていない^{1,2)}。著者らは、従来から、*T. tenax* の純培養を試みてきたが、成功には至っていない³⁾。しかし、その研

究過程において、*T. tenax* は組織培養液を応用することにより、簡便、かつ、効率良く培養できることを見出した。また、著者らの分離した *T. tenax* は、口腔内の歯肉ポケットからの分離株で、混在する口腔細菌を排除するため、ペニシリン等の抗生物質で、長期に渡って処理してきた。その結果、随伴細菌は抗生物質感受性の低い、主として、*Xanthomonas maltophilia* (旧名 *Pseudomonas maltophilia*) などの *Pseudomonas* 属に分類される数種類のグラム陰性桿菌だけになったことを報告した⁴⁾。このように、純培養されるに至っていないが、随伴細菌の菌種が著しく減少した *T. tenax* 株を用いた以下の実験を行うことで、生物学的性状や口腔内における生物学的作用の一端を明らかにすることができると考えている。

今回は、*T. tenax* の異物貪食作用、低級脂肪酸産生およびEBウイルス関連抗原 (Epstein-Barr virus-associated antigens, EBV antigens) の早期抗原 (early antigen, EA) 誘導能について検討を加えた。

T. tenax によって貪食された随伴細菌の虫体内における動態は、培養液中および虫体内に常に随伴細菌が存在するため、いままで明確にされていない。そこで、随伴細菌がグラム陰性の桿菌のみであることに着目し、細胞壁構造が明らかに異なり、グラム染色性および電顕的識別が可能なグラム陽性菌のブドウ球菌を新たに培養液に加えて、*T. tenax* に貪食された後の細菌の動態を調べた。また、細菌以外の異物貪食能を解明するという観点から、ラテックス粒子についても検討を行った。一方、特定の随伴細菌混在下での *T. tenax* の産生する低級脂肪酸を測定した。併せて、腔トリコモナス (*Trichomonas vaginalis*) の産生する低級脂肪酸と比較検討した。

従来から、低級脂肪酸の *n*-酪酸は、EBV 抗原誘導剤であることが知られている⁵⁾。

そこで、しばしば口腔に見出される *T. tenax* および腔に寄生する *T. vaginalis* について、EBV 抗原誘導能があるか否かを、ヒトリンパ芽球細胞を用いて検討した。

材料と方法

1) 供試材料

供試ラテックス粒子 (Latex particles, 積水化学工業) は粒子直径のサイズが $1.07\mu\text{m}$ および $0.15\mu\text{m}$ を使用した。

2) 供試薬剤

低級脂肪酸検出用の標準試料として酢酸 (C_2)、プロピオン酸 (C_3)、イソ酪酸 ($i\text{C}_4$)、*n*-酪酸 ($n\text{C}_4$)、イソ吉草酸 ($i\text{C}_5$) および内部標準物質としてイソカプロン酸 ($i\text{C}_6$) を使用した。また、発癌プロモーターとして、12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) を使用した。

3) 供試抗体

一次抗体として、慢性活動性EBウイルス感染症の患者血清 (viral capsid antigen, VCA ; 1 : 10, 240, EA ; 1 : 10, 240) (北大医学部癌研より分与) を40倍希釈したものを、また、二次抗体として、FITC ラベル抗ヒトヤギ血清 IgG (カッペル社、米国) を20倍に希釈したものをを用いた。

4) 供試菌株

供試菌は *Staphylococcus aureus* 209P 株を使用した。菌株は brain heart infusion (BHI, Difco) で 37°C で24時間培養した。培養直後の *S. aureus* を生菌とし、さらに、10分間煮沸を施した菌を加熱死菌とした。

5) 供試口腔トリコモナス株

供試口腔トリコモナスは、本教室で分離した *T. tenax* N株であり、歯周疾患の進行した男性患者 (50歳) の歯肉ポケットから分離したものである。すなわち、歯肉縁下歯垢を5%馬血清とストレプトマイシン $100\mu\text{g}/\text{ml}$ およびペニシリン100単位を含有する卵黄培地 (EY) に接種し、 37°C で3日間培養した²⁾。その後、本教室において、約10年間継代培養している *T. tenax* を用いた。保存原虫株の *T. tenax* をSYS培地 (イーストエキス2g, ポリペプトン2g, グルコース1g, 塩酸システイン0.2g, 塩化ナトリウム0.5g) に10%牛血清 (阪大微研) を加えた培地で 37°C で5日間培養した⁶⁾。

6) 供試腔トリコモナス株

供試腔トリコモナスは、*T. vaginalis* ナカフジ

株（慶応義塾大学医学部寄生虫学教室から分与）を使用した。*T. vaginalis* は、市販のトリコモナス培地（日水製薬）で37°C、5日間培養した。*T. tenax* は、貪食作用の実験に供試した。さらに、両トリコモナス株の培養液は、それぞれ10,000rpmで30分間、遠沈し、虫体を除き、低級脂肪酸産生能およびEBウイルス抗原誘導能の検討のための供試液とした。

7) 随伴細菌

T. tenax のSYS培養液から、一部上清を取り、brain heart infusion (BHI) 寒天培地 (Difco) に塗抹し、37°Cで24時間培養した。さらに、*T. tenax* を取り除くため、形成された細菌のコロニーをかき集め、再度、BHI培地に塗抹し、24時間培養した。この培養菌を随伴細菌として、SYS培地に接種して、37°Cで5日間培養したものを、低級脂肪酸検出用の供試液とした。

8) *T. tenax* による *S. aureus* およびラテックス粒子の貪食

細菌数はSYS培養液で、 1×10^9 cells/ml になるように細菌算定板 (Petroff-Hausser bacteria counter) を用いて調製した。また、ラテックス粒子数は 1×10^9 個および*T. tenax* 数は 1×10^6 cells/ml になるように、血球計算板 (改良型 Neubauer) で調製した。これらの溶液を2mlずつ以下のように反応させた。

小試験管に滅菌した2種類のラテックス粒子、それぞれに、*T. tenax* を混ぜた系、また、*S. aureus* の生菌と加熱死菌のそれぞれの浮遊液に、*T. tenax* を混和した系で10分間、2時間および24時間、37°Cで培養した。

9) 染色標本の作製

各試料の*T. tenax* による異物取り込み過程観察のため、時間ごとの培養液の一部を採取し、3回、リン酸緩衝液 (pH 7.4) で洗浄した後、遠沈を行った。その沈査について、グラム染色標本を作製した。

10) 貪食された細菌数の算定

グラム染色標本から、顕微鏡観察によって、*T. tenax* 1個当りに、付着あるいは取り込まれて、グラム陽性を示した細菌数を、100個以上の原虫について算定した。

11) 電顕用標本の作製

各培養物について、通法に従い、グルタルアルデヒドおよびオスミック酸でそれぞれ、2時間固定後、アルコール系による脱水を施した。その後、酢酸イソアミルで置換して、臨界点乾燥した。さらに、ゴールドコーティングし、走査型電子顕微鏡 (JSM-35, JEOL) にて、標本観察した。また、別に、アルコール脱水後の試料の一部をエポキシ樹脂 (Epon812) で包埋した。その後、ウルトラミクロトーム (LKB8800) で超薄切片を作成し、さらに、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で2重染色を施した。その試料を透過型電子顕微鏡 (JEM 1200 X, JEOL) で観察した⁷⁾。

12) トリコモナス培養濾液中の低級脂肪酸の検出および定量

T. tenax と *T. vaginalis* 培養物の上清5mlに10% HClを加えpH2.0に調整後、エーテル5mlを加え、振盪した。静置後、分離したエーテル層をガスクロマトグラフィーの供試材料とした。低級脂肪酸の同定は、供試した標準脂肪酸のピークを対照として行った。定量は、内部標準法で、クロマトパック C-R3A (島津製作所) で行った。内部標準物質はイソカプロン酸を用いた。ガスクロマトグラフは島津 GC-8Aを用いた。測定条件は、カラム：クロモソルブ W80/100 3mm×2m ガラスカラム、カラム温度：160°C、気化室温度210°C、検出器：FID、キャリアガス：N₂ 50ml/min, H₂O. 6 kg/cm², 注入量：10 μ lであった⁸⁾。

13) ヒトリンパ芽球細胞の P3HR-1 と Raji 細胞の調製

供試細胞はいずれも RPMI1640 培養液 (日水製薬) に10%牛胎児血清 (Gibco) を加えた培養液で培養した。EBV-EA 誘発実験の際には、細胞濃度 1×10^6 cells/ml で最終血清濃度を5%にしたものを使用した。

14) EBV-EA 誘導および検出

T. tenax と *T. vaginalis* をSYS培地で5時間培養した各培養物のpHを、中性付近に調整し、0.22 μ mのミリポアーフィルターで濾過した。濾液をRPMI1640培養液で5倍に希釈した0.5mlとP3HR-1細胞浮遊液 (1×10^6 cells/ml) の

Fig. 1 Micrographs of *T. tenax* containing latex particles or *S. aureus*.

- (A) Control without latex particles.
- (B) The trichomonad enclosed many particles in the cytoplasm after 2 hr of incubation.
- (C) The trichomonad enclosed many heat-inactivated *S. aureus* in the cytoplasm after 2 hr of incubation.

0.5ml を、混和した、また、同じ希釈原虫培養濾液の0.5ml と Raji 細胞の浮遊液 1×10^6 cells/ml の0.25ml および 100ng/ml の TPA (最終濃度は 25ng/ml) の0.25ml を混ぜて培養した。培養時間は48時間とした。その後、常法に従い、間接蛍光抗体法で EA の検出を試みた⁹⁾。P3HR-1 細胞は n-酪酸等の低級脂肪酸の単独処理で有意な EA を誘導する。しかし、Raji 細胞では n-酪酸や TPA 単独で処理してもわずかしき EA を誘導しないが、それぞれを組合せ処理すると、相乗的に抗原を著しく誘導することが認められている¹⁰⁻¹²⁾。この現象を利用して、抗原誘導の検出をより有意に行うため、P3HR-1 細胞は培養液単独で、Raji 細胞はそれらの培養液と TPA を組合せて検出した。間接蛍光抗体法による EA の検出には、供試抗体として 3 項で前述した一次抗体と二次抗体を使用

した。各試料について500個以上の細胞について、抗原陽性細胞を調べ、パーセントで表わした。

結 果

1) *T. tenax* によるラテックス粒子の貪食

2 時間の培養で、1.07および0.15 μ m のラテックス粒子は *T. tenax* の虫体内に貪食されていた (Fig. 1)。1.07 μ m の粒子は、単独で虫体内に貪食されて、また、同時に、複数の粒子が、別々の部位から虫体に貪食されていた (Fig. 2 A, 2 C)。一方、0.15 μ m の粒子は、それぞれ別個にはなく、一度に、多量の粒子が集合して虫体内に取り込まれていた (Fig. 2 D)。

2) *T. tenax* による *S. aureus* の貪食

T. aureus を加えていない、対照として用いた *T. tenax* の虫体内には、いくつかのグラム陰性細

Fig. 2 Transmission electron and scanning electron micrographs of *T. tenax* containing latex particles after incubation of 3 hr.

- (A) Cross-section of a cell actively phagocytosing 4 latex particles ($1.07 \mu\text{m}$).
- (B) Phagocytic vesicle in the process of formation around a latex particle ($1.07 \mu\text{m}$).
- (C) Scanning electron micrographs of *T. tenax* phagocytosed many latex particles ($1.07 \mu\text{m}$).
- (D) A phagocytic vesicle containing many particles ($0.15 \mu\text{m}$).

菌が取り込まれているのが認められた。また、同時に虫体内には、細菌が破壊されている所見も観察された (Fig. 3 A)。 *T. tenax* の培養液に *S. aureus* を混在させ、培養すると、10分間培養でその虫体内にグラム陽性細菌に特徴的な超微細構造を示す *S. aureus* が観察された (Fig. 3 C)。このような所見は 培養2時間後の加熱死菌の *S.*

aureus でも認められた (Fig. 3 F)。 *T. tenax* によって食食された *S. aureus* 数を生菌と加熱死菌で比較してみると、ほとんど有意の差はなかった。また、経時的にその食食された細菌数を、培養時間10分間と24時間と比較していると、後者では、その細菌数は半減していた (Table 1)。

Fig. 3 Transmission electron micrographs of *T. tenax* phagocytosed *S. aureus*.

- (A) Control without *S. aureus*. The trichomonad many accompanying bacteria and digested the bacteria in the cytoplasm.
- (B) A higher magnification of the boxed area in panel (a).
- (C) The trichomonad enclosed a *S. aureus* in the cytoplasm after incubation of 10 min.
- (D) *S. aureus* as control
- (E) A higher magnification of the boxed area in panel (d)
- (F) The trichomonad enclosed heat-inactivated *S. aureus* in the cytoplasm after incubation of 2 hr.
- (G) A higher magnification of the boxed area in panel (f).

Table 1 Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by *Trichomonas tenax*

Bacteria	Phagocytosis		
	Mean No. of <i>S. aureus</i> per <i>T. tenax</i> $\pm$ S.E. ^a		
	Time in culture		
	10min	2hr	24hr
<i>S. aureus</i>	7.6 $\pm$ 0.9	6.3 $\pm$ 0.5	3.0 $\pm$ 0.7
Heat-inactivated <i>S. aureus</i>	7.6 $\pm$ 0.6	— ^b	2.5 $\pm$ 0.3

^a S.E., Standard error^b not done.

Table 2 Effect of culture fluids of trichomonads on induction of EBV-EA in human lymphoblastoid cell lines

Trichomonads ^a	Conc. of short-chain fatty acids (mM) in culture fluids					Percentage of EA-positive cells	
	C ₂ ^c	C ₃ ^d	iC ₄ ^e	nC ₄ ^f	iC ₅ ^g	P3HR-1	Raji ^b
<i>T. tenax</i>	2.6	<0.1	— ^h	<0.1	—	0.8	0.1
<i>T. vaginalis</i>	2.0	<0.1	—	—	—	3.7	0.1
Accompanying bacteria	1.0	—	—	<0.1	—		
SYS medium	—	—	—	—	—	0.4	0.1
Trichomonas medium	<0.1	<0.1	—	—	—	0.4	0.1
n-butyric acid 5mM						53.5	24.1
none						0.1	0.1

^a The actual concentrations of short-chain fatty acids in the tissue culture medium were one tenth.^b Raji cells were incubated in the presence of TPA, while P3HR-1 cells without the drug.^c C₂, acetic acid ^d C₃, propionic acid ^e iC₄, iso-butyric acid ^f nC₄, n-butyric acid^g iC₅, iso-valeric acid ^h not detected.

3) トリコモナス培養液中の低級脂肪酸の検出および定量

低級脂肪酸の標準試料と *T. tenax* と *T. vaginalis* 培養液中の低級脂肪酸のガスクロマトグラフィーの分析パターンを Fig. 4 に、さらに、Table 2 にその濃度を示した。

T. tenax, 随伴細菌および *T. vaginalis* では、培養液 5 ml 中、それぞれ、2.6mM, 1.0mM および 2.0mM の酢酸が検出された。しかし、その他の低級脂肪酸は、*T. tenax* ではプロピオン酸と n-酪酸で、0.1mM 以下の極微量であった。また、*T. vaginalis* では、0.1mM 以下のプロピオン酸および随伴細菌では、0.1mM 以下の n-酪酸の産生であった。

4) トリコモナス培養液による EBV-EA 誘導能

P3HR-1 と Raji 細胞で、それぞれのトリコモナスの培養液処理による EA の誘導を調べ、その結果を Table 2 に示した。

P3HR-1 では、標準試料の n-酪酸 (5 mM) では EA は 53.5% 誘導された。また、相乗効果を意図した TPA と n-酪酸との組合せ処理では、24.1% の EA 陽性細胞を誘導した。しかし、両トリコモナス培養液とも、P3HR-1 と Raji の両細胞においても、EA の誘導はほとんど検出できなかった。

考 察

純培養が確立されていない口腔トリコモナスは、常に随伴細菌が培養液や虫体内に混在しているため、その細菌の食食過程が明確でなかったが、随伴細菌と容易に識別のつく *S. aureus* を用

Fig. 4 Gas chromatographic assay of short-chain fatty acids in the culture fluid of two trichomonad species.

C₂, acetic acid; C₃, propionic acid; iC₄, iso-butyric acid; nC₄, n-butyric acid; iC₅, iso-valeric acid

いることで、その動態を知ることができた。

生菌でも死菌でも *S. aureus* は *T. tenax* に容易に、貪食されることが判明した。また、光顕的な観察による算定から、*T. tenax* に取り込まれた細菌は減少を示すので、供試 *S. aureus* は虫体内では堆殖できないと考えられる。また、今回の判定法では、異物を貪食させた後、緩衝液による3回の洗浄だけでは、*T. tenax* の表面に付着した異物が一部残留している可能性もあるから、10分間で *T. tenax* 虫体内に算定された *S. aureus* やラテックス粒子がすべて完全に貪食されたものかどうかは正確にできない部分があると思われる。しかし、*S. aureus* を貪食した後の *T. tenax* は、判定に用いた標本では細菌数が減少しているので、虫体内で消化されると推定される。

Francioli らは、*T. vaginalis* が *Neissera gonorrhoeae* を貪食し、虫体内で殺菌すると報告されている¹³⁾。この報告と今回の *T. tenax* における貪食実験は、用いた供試菌は異なるが、貪食した細菌を消化するという点で、同様の結果を示した。

Fig. 2 および 3 に示した電顕像から明らかに、*T. tenax* の随伴細菌も *T. tenax* の虫体内で分解しているのが認められたことから、貪食された随伴細菌は、容易に本トリコモナスに取り込まれ、その虫体内で消化されると考えられる。

また、ラテックス粒子のサイズが $1.07\mu\text{m}$ の場合は、*S. aureus* の貪食と、取込過程において類似していた。また、粒子のサイズが $0.15\mu\text{m}$ の場合は、一度に多量の粒子が集合して貪食された。このことは、本原虫においては 1.07 と $0.15\mu\text{m}$ のサイズの粒子で、貪食作用に、個別取り込みと大量取り込みという差があることを示していた。

$1.07\mu\text{m}$ のラテックス粒子は、虫体の多数の部位から、それぞれ別個に貪食されるのが認められたが (Fig. 2 A)、粒子が本原虫の表面のどの部位から、貪食されるかは明らかではない。しかし、Fig. 2 C に見られるように、虫体の表面を観察できる走査型電顕的観察によって、原虫の表面の広範囲の部位から貪食されるのが明確となった。

また、トリコモナスの培養液中の低級脂肪酸の

検出および定量を試みるためには、*T. tenax* の培養液が随伴細菌を混在しているので、*T. tenax* と随伴細菌はそれぞれ、別々に培養し、前者の培養液からの脂肪酸検出の種類および量から、後者の培養液のそれを差引く必要がある。*T. tenax* は、培養液 5 ml 中、酢酸 2.6 mM、プロピオン酸 0.1 mM 以下および *n*-酪酸 0.1 mM 以下の極微量濃度の低級脂肪酸を産生し、一方、随伴細菌は同様に、酢酸 1.0 mM と *n*-酪酸 0.1 mM 以下の濃度の低級脂肪酸を産生した。従って、単純に差し引くと酢酸 1.6 mM とプロピオン酸 0.1 mM 以下の濃度の低級脂肪酸になるが、それぞれ、別個に培養しているので、その差が全部の *T. tenax* の産生低級脂肪酸の量とはならない。しかし、両者の産生量に有意の差があることから、*T. tenax* は低級脂肪酸として、主として酢酸を産生すると推定された。

一方、純培養原虫である *T. vaginalis* は、同様な培養液量中、酢酸 2.0 mM とプロピオン酸 0.1 mM 以下の濃度の低級脂肪酸を産生することが認められた。また、未接種のトリコモナス培地でも、同量 0.1 mM 以下の極微量の酢酸とプロピオン酸を産生する。従って、本トリコモナスは約 2 mM の酢酸を産生すると言える。

石黒は、*T. vaginalis* はプロピオン酸やイソ吉草酸を産生することから、EBV 抗原の誘導を推察し、陰癌や子宮頸癌との関連を論じている¹⁴⁾。しかし、本実験で供試した *T. vaginalis* はそれらを産生しなかったので、低級脂肪酸の産生では一致しなかった。このことは、同じ *T. vaginalis* ではあっても、その株間や使用培地の相違等で産生される脂肪酸の種類も異なることを示していると思われる。

さらに、これらの培養液を用いて、ヒトリンパ芽球細胞の P3HR-1 および Raji 細胞を処理して、EA 誘導を調べたが、有意には検出されなかった。

n-酪酸を大量に産生する口腔常在菌の *Fusobacterium nucleatum* 等が EA を効率良く誘導することはよく知られている⁸⁾。また、最近、著者らは、口腔内にしばしば認められる、*Clostridium butyricum* が効率よく EA を誘発することを見

出した¹⁵⁾。本菌は *n*-酪酸以外には低級脂肪酸を産生しない菌株であるが、産生されたその *n*-酪酸の量だけでは、抗原誘導を完全に説明できないので、同時に産生される未知の代謝産物によって、EB ウイルスが活性化されている可能性が示唆された。

これらのことから、本実験に供試したトリコモナスはいずれも、このような未知の抗原誘導物質も産生していないと推定された。

EBV の感染と密接に関係していると考えられているバーキットリンパ腫 (Burkitt's lymphoma, BL) はマラリア汚染地帯で多発している。この理由は、そのマラリア感染によってヒトの免疫能が著しく低下し、そのため、EBV の感染やその他のいくつかの因子が組み合わされることによって、BL が発症すると考えられている^{16,17)}。このように、BL の発症には複雑な要因が絡んでいると推定されている。

著者らは、さきに種々の要因を調べる目的で、細菌とウイルス抗原誘導との関係を検討し、ヒトリンパ芽球細胞に *Yersinia enterocolitica* を侵入させて、EBV 抗原の誘導を試みた。その結果、細菌はそれらの培養細胞に容易に侵入し、細胞内で増殖するが、EBV 抗原の誘導は見られなかった¹⁸⁾。また、他に多数の EBV 活性化や抗原誘導の薬剤や刺激方法が、報告されている^{19,20)}。このように、BL の発症には複雑な因子が絡んでいるので、それぞれの、環境因子のなかの抗原誘導因子を検索することは意義があると考えられる。

今回の *in vitro* 実験では、口腔や性器に検出されるトリコモナスの培養液と EBV 抗原誘導との関係は、証明できなかった。しかし、これらのトリコモナスと EA 誘導との関係を、さらに、調べるためには、今後、トリコモナス培養液の種類を変えたり、直接、*in vivo* のサンプルを用いて、検討する必要がある。

結 論

従来から、*T. tenax* は純培養が確立されていないため、原虫培養物中には随伴細菌が混在していた。そのため、生物学的性状についての報告が極めて少ない。しかし、随伴細菌の種類をできるだけ淘

汰することによって、その生物学的性状を調べる糸口が見出されるかもしれない。そこで、著者らが、長期に渡って抗生物質で *T. tenax* を処理することにより確立した *T. tenax* の培養系では、随伴細菌が数種類のグラム陰性菌であることから、この培養系に、新しくグラム陽性細菌のブドウ球菌を加えて、その細菌貪食を観察した。また、*T. tenax* と *T. vaginalis* の培養液中の低級脂肪酸の検出を試みた。さらに、これらの培養液による EBV-EA の誘導能を調べて、次の結論を得た。

1. *S. aureus* は、10分間以内に *T. tenax* に貪食された。
2. *S. aureus* は *T. tenax* 虫体内で増殖しなかった。
3. ラテックス粒子は、*T. tenax* によって、直径 $1.07\mu\text{m}$ のものでは単独で、 $0.15\mu\text{m}$ のものでは一度に多量が塊を形成して貪食された。

抄録： *Trichomonas tenax* によるラテックス粒子および *Staphylococcus aureus* の貪食、培養物中の低級脂肪酸産生および EB ウイルス (EBV) 関連早期抗原 (early antigen, EA) の誘導能を調べた。

大きいラテックス粒子 ($1.07\mu\text{m}$) は、個々に、小さい粒子 ($0.15\mu\text{m}$) は、多量にまとまって、虫体内に貪食された。*S. aureus* は、10分以内に、*T. tenax* の細胞質内に貪食された。また、24時間後には、その菌数は減少した。これらの現象は、顕微鏡および顕微鏡観察によって認められた。

各培養物 5 ml 中に産生された低級脂肪酸は、*T. tenax* では 2.6mM の酢酸、随伴細菌では 1 mM の酢酸産生がみられたことから、*T. tenax* は、酢酸を産生することが明らかとなった。また、*T. vaginalis* も 2.0mM の酢酸を産生した。

一方、これらの *T. tenax* と *T. vaginalis* の培養物は、EBV-EA 誘導が認められなかった。

これらの結果から、*S. aureus* は *T. tenax* によって貪食され、虫体内で消化されることが明らかとなった。また、*T. tenax* と *T. vaginalis* の培養物とも、EA を誘導しなかったのは、それらの培養物に、n-酪酸等の抗原誘導剤が産生されなかったことによると思われた。このことは、培養物中の低級脂肪酸検出の際、n-酪酸等の低級脂肪酸の抗原誘導剤がほとんど認められなかったことと一致している。

文 献

- 1) Diamond, L. S.: Axenic cultivation of *Trichomonas tenax*, the oral flagellate of man, 1. Establishment of cultures. J. Protozool. **9**: 442-444, 1962.
- 2) 沢見享子, 佐藤 勝, 平田健一, 高橋秀文, 辻英喜, 山本光人, 磯村公明, 新田 裕, 並河勇: 口腔トリコモナスに関する研究. 第1報, *Trichomonas tenax* の長期継代培養, 形態および増殖形式について. 岐歯学誌 **10**: 253-268, 1982.
- 3) 沢見享子, 佐藤 勝, 平田健一, 高橋秀文, 辻英喜, 磯村公明, 山本光人, 並河 勇: 口腔トリコモナスに関する研究. 第2報, *Trichomonas tenax* の純培養へのアプローチ. 岐歯学誌 **10**: 407-415, 1983.
- 4) Asai, S., Hayashi, A., Nakamura, Y., Kato, M., Nitta, H. and Namikawa, I.: Growth of *Trichomonas tenax* in tissue culture medium containing complement and antiserum to the accompanying bacteria. 歯基礎誌 **28**: 731-736, 1986.
- 5) Luka, J., Kallin, B. and Klein, G.: Induction of the Epstein-Barr virus (EBV) cycle in latently infected cells by *n*-butyrate. Virology **94**: 228-231, 1979.
- 6) 池内恵二: 口腔トリコモナスの培養に関する研究. 大阪市医学会 **8**: 853-867, 1959.
- 7) Asai, S., Namikawa, I. and Ito, Y.: Ultra-

4. $1.07\mu\text{m}$ の粒子は、*T. tenax* に同時に、虫体表面のいくつかの部位から、複数個貪食された。

5. 随伴細菌を含む *T. tenax* N株は、培養液 5 ml 中、酢酸 2.6mM を産生した。

6. 随伴細菌は、培養液 5 ml 中、酢酸 1.0mM を産生した。

7. *T. vaginalis* ナカフジ株は、培養液 5 ml 中、酢酸 2.0mM を産生した。

8. 供試した両トリコモナスの培養液とも、EBV-EA を誘導しなかった。

謝辞： 本稿を終えるにあたり、*T. vaginalis* を快く分与していただいた慶応義塾大学医学部寄生虫学教室竹内勤教授および貴重な EBV 抗血清を分与していただいた北大医学部癌研の水野文雄助教授に深く感謝の意を表します。

なお、本研究は昭和63年度宮田研究奨励金 (A) による。

- structural studies on human lymphoblastoid-cells treated with *n*-butyrate and 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Eur J. Cancer Clin. Oncol.* **20** : 1533-1542, 1984.
- 8) Ito, Y., Kishishita, M. and Yanase, S. : Induction of Epstein-Barr virus antigens in human lymphoblastoid P3HR-1 cells with culture fluid of *Fusobacterium nucleatum*. *Cancer Res.* **40** : 4329-4330, 1980.
- 9) Henle, G. and Henle, W. : Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J. Bacteriol.* **91** : 1248-1256, 1966.
- 10) Ito, Y., Kawanishi, M., Harayama, T. and Takabayashi, S. : Combined effect of the extracts from *Croton tiglium*, *Euphorbia lathyris* or *Euphorbia tirucalli* and *n*-butyrate on Epstein-Barr virus expression in human lymphoblastoid P3HR-1 and Raji cells. *Cancer Lett.* **12** : 175-180, 1981.
- 11) Ito, Y., Yanase, S., Fujita, J., Harayama, T., Takashima, M. and Imanaka, H. : A short-term *in vitro* assay for promoter substances using human lymphoblastoid cells latently infected with Epstein-Barr virus. *Cancer Lett.* **13** : 29-37, 1981.
- 12) Kawanishi, M. and Ito, Y. : Effect of short-chain fatty acids on Epstein-Barr virus early and viral capsid antigen induction in P3HR-1 cells. *Cancer Lett.* **11** : 129-132, 1980.
- 13) Francioli, P., Shio, H., Roberts, R. B. and Muller, M. : Phagocytosis and killing of *Neisseria gonorrhoeae* by *Trichomonas vaginalis*. *J. Infect. Dis.* **147** : 87-94, 1983.
- 14) 石黒達也 : 陰トリコモナス培養液中のプロピオン酸, 酪酸および吉草酸に関する研究 日産婦会誌 **36** : 363-368, 1984.
- 15) Asai, S., Nakamura, Y., Yamamura, M., Ikezawa, H. and Namikawa, I. : Quantitative analysis of the Epstein-Barr virus-inducing properties of short chain fatty acids present in the culture fluids of oral bacteria. *Arch. Virol.* in press.
- 16) Facer, C. A. and Playfair, J. H. L. : Malaria, Epstein-Barr virus, and the genesis of lymphoma. *Adv. Cancer Res.* **53** : 33-72, 1989.
- 17) 水野文雄 : EB ウイルス関連腫瘍一日和見B細胞リンパ腫, バーキットリンパ腫, 上咽頭癌—日本臨床 **47** : 241-246, 1989.
- 18) Asai, S., Namikawa, I. and Ito, Y. : Invasion of Burkitt's lymphoma cell lines by *Yersinia enterocolitica*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **172** : 243-249, 1983.
- 19) 高田賢蔵 : EB ウイルスの潜在化と活性化の分子機構. 蛋白質核酸酵素 **34** : 823-834, 1989.
- 20) 浅井昭士郎, 並河 勇 : 口腔微生物と EB ウイルス抗原誘導. 岐歯学誌 20周年特集号 : 322-334, 1990.