赤痢アメーバの培養に関する研究

第2篇 各種細菌の菌体又は加熱死菌体の培養赤痢アメーバの發育に及ぼす影響

沢 田 利 貞

東京大学傳染病研究所第六研究部 (部長 宮崎吉夫)

[受付: 7月8日, 1950年]

第1篇で培養赤痢アメーバの随伴細菌を完全に除去するとき、アメーバは継代できなかつた。

赤痢アメーバの培養には随伴細菌が必要であることは、Rees(1939~41)が述べている。以来赤痢アメーバの培養に種々の細菌を加える事が行われるようになった。Reesは Micro-isolation によつて無菌的に取出した嚢子に多種の細菌を各1種宛加え、嚢子が脱殻發育するかを檢したところ、Staphylococcus, Streptococcus, Salmonella, Subtilis, Actinomyces, Aplanobacter, Neisseria 等に属する細菌を加えた嚢子は脱殻發育したと報じている。その後 Jacobs(1947), は Clostridium perfringens と Shaffer(1948-49)は Streptococcus と共棲せる赤痢アメーバで、種々工夫して、これらの1種随伴細菌を取除き、赤痢アメーバの純粹培養を得ようと努力しているが、まだ満足な結果をうるには至つていない。

以上によつても明かなように、今日迄赤痢アメーバの継代培養には最小限度1種の細菌を随伴させることが絶対必要とされている。この1種の随伴細菌は赤痢アメーバの栄養、呼吸、その他理学的條件等あらゆる赤痢アメーバの發育に必要な條件を附與していることは明かである。これら細菌の培養赤痢アメーバに及ぼす影響を一つ一つ究明して行くことは純粹培養法の研究に重要な一段階と考え、この実験を始めた。

(1) 生菌の赤痢アメーバの發育に及ぼす影響について

方法: 普通寒天斜面培地に 37°C 18~24 時間培養した1斜面(中試験管)の菌体を取り、これを田辺千葉培養基の液体部に乳剤になるように加え、この中に赤痢アメーバの栄養型を移植し、継代培養して赤痢アメーバの消長を觀察した。

(イ) Coli 群に属する細菌について

E. coli communis に属する細菌3株、*E. coli communior* に属する細菌5株、*B. acid lactici* 1株、*B. cloacae* 2株、*B. lacti aerogenes* 2株、計13種の細菌を実験に供した。

これら細菌を入れた培養基に多数(4+)の栄養型を有するY株の培養赤痢アメーバを加えたところ、培養24時

間では、No. 3, 4, 6, 7, 13における栄養型の發育は対照より良好であつた。培養48時間における栄養型の發育は No. 8, 9は対照と同程度であつたが、No. 1, 5は対照より良好であつた。培養96時間においては、No. 1, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 13 においては対照と同様に多数の栄養型が認められた(第1表参照)。さらに、13種の細菌を加えた培養基にK株の培養赤痢アメーバの栄養型を加え、継代したところ、第1代48時間培養では、No. 9, 13 には対照よりも多数の栄養型を認めた。No. 4, 6, 7, 11 では栄養型の發育は対照と同程度であつた。第2代72時間培養では、No. 9, 11, 12 に多数の栄養型を認め、No. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 13 では対照と同様であつた。第3代72時間培養では No. 1, 2, 3, 9, 11, 13 では栄養型は対照と同数認めたが、他は対照より少数であつた。第5代18時間では、No. 3 へのみ対照より多数栄養型が認められた。

以上觀察するに、この実験では、多量の細菌を加えた爲に継代に際し栄養型と共に陳旧な菌体(死菌体と菌体融解物質)が移植されるため、充分な觀察をすることは困難であるが、細菌が培養赤痢アメーバの發育に有害な場合は、多量の細菌によつて、栄養型の發育は阻害され、栄養型は、その数を減少するか、絶滅するはずである。しかるに *Coli gr.* に属する細菌を多量に加えても、栄養型の發育は一般に良好であつて、何等の影響を被らないのみか、かえつて栄養型の發育良好なものが多く認められた。即ち、*Communis* に属するものと、*B. acid lactici*, *B. lacti aerogenes* に属する細菌は、培養赤痢アメーバに有益なものようである。

(ロ) 連鎖球菌群の細菌について

非溶血性連鎖球菌4株、溶血性連鎖球菌7株の細菌を使用して、(イ) *Coli gr.* の細菌と同様の方法により実

SAWADA, Toshiada: Studies on the cultivation of *Entamoeba histolytica*. II. Influence on the growth of *E. histolytica* of living and heatkilled bacteria of Species. Japan. J. Bact., 5(6): 421-424, 1950.

第 1 表

Tube No.	培養時間 加えた細菌	Y 株			K 株			
		96 時間培養實驗			繼代培養實驗			
		24 時間	48 時間	96 時間	1 代 48 時間	2 代 72 時間	3 代 72 時間	5 代 48 時間
1	Communis type	+	+++	++	+	++	++	++
3	" I	+	+	+	+	++	++	++
3	" II	++	+	++	+	++	++	+++
4	Communion type	++	+	++	++	++	+	+
5	" I	+	+++	++	+	++	+	+
6	" II	++	+	++	++	++	+	++
7	" III	++	+	++	++	++	+	++
8	" IV	+	++	+	+	+	+	+
9	B. acidilactici	+	++	+	+++	+++	++	++
10	B. cloacae I	+	+	++	+	+	+	+
11	" II	+	+	++	++	+++	++	++
12	B. lacti I	+	+	++	+	+++	+	+
13	aerogenes II	++	+	++	+++	++	++	++
14	對 照	+	++	++	++	++	++	++

註 培養基底部の栄養型の最も多き所より 1 白金耳の栄養型をとり、之を 18 m/m の Cover-glass にて、壓平して栄養型の数を計算し 1~19 を (+), 20~49 (++)、50~99 (+++) とした。

驗を行つた。

結果： 溶血性、非溶血性の連鎖球菌の間には、何等赤痢アメーバの發育に及ぼす影響に差異を認めなかつた。いずれもアメーバの發育は良好であつて、第 1 代 48 時間で、非溶血性の菌体加培地 2 例において、アメーバの栄養型は顯著な増殖を示し、他は対照と同様の發育が認められた。培養第 2 代 72 時間では、非溶血性、溶血性細菌加培地各 2 例において、顯著な増殖を認めたが、他は対照との間に差異は認められなかつた。第 3 代と第 4 代 72 時間培養では、第 2 代培養よりやや栄養型は小型となつていたが、依然多数の栄養型が認められた。

これら多量の連鎖球菌を加えることに依つて、栄養型は發育に有害の影響を被ることなく、Coli gr. の細菌よりも有益な影響を受けるもののようである。

(ハ) 葡萄球菌群の細菌について

黄色葡萄球菌、寺島株、209 株を使用して Coli gr. の場合と同様の方法によつて實驗を行つた。培養赤痢アメーバは寺島株、209 株の 18~24 時間培養を加えた田辺千葉培養基中に好く増殖し、繼代培養するも良好な發育を示した。即ち、2 種の黄色葡萄球菌はいずれも培養赤痢アメーバの發育に有害な影響を與えることなく有益に

作用するものゝようである。

(ニ) 赤痢菌群の細菌について

志賀 (花房)、大野 (府中)、駒込 B_I、駒込 B_{III}、駒込 A、川瀬 (上)、大原 (熊 II)、中村 (傳研)、九大 x (箕田)、九大 y (居石)。

いずれも赤痢アメーバの發育に有害な影響を及ぼさないが、葡萄球菌、連鎖球菌、Coli gr. の細菌に比べ、好影響を及ぼさないようであつた。

(ホ) B. mycoides の細菌について

この細菌を加えた培地では、赤痢アメーバの栄養型の發育は、良好な成績を示した。

以上を綜合すると大腸菌、連鎖球菌、葡萄球菌、赤痢菌は、培養赤痢アメーバの發育に有害な影響を與えることなく、むしろ好影響を有するもののように觀察した。

ことに葡萄球菌、B. mycoides の変株、連鎖球菌に属する細菌は、赤痢アメーバの發育に良好な影響を與えるもののようである。

(3) 加熱死菌体の培養赤痢アメーバの發育に及ぼす影響について

赤痢アメーバの發育に生菌が有害に作用することなく、むしろ好影響を與えることが判明したので、生菌の

代りにとくに培養赤痢アメーバの増殖に好影響を與えた細菌の加熱死菌体を使用した。即ち、209 株と前報で報告した *B. mycoides* の変種を實驗に供した。

方法：209 株、*B. mycoides* の変種の 18~24 時間培養を 80°, 40 分間(重湯煎)加熱して生菌なきことを確め、これらの加熱死菌体を培養基の液体部に 0.1 mg/cc から 1.0 mg/cc の割合に加え種々濃度の加熱死菌体加培養基を作り、それ等の培養基に赤痢アメーバの栄養型を継代培養した。

培養基の選定。本實驗には石井、久津見両氏が、昭 23、寄生虫学会で発表された培養基を使用した。

石井久津見氏培養基について

この培養基を 6 本用意して、培養赤痢アメーバの發育良好な栄養型を植え、これ等を 48 時間毎に継代培養したところ、第 1 代より第 2 代、第 3 代においては栄養型の増殖良好なるも、第 4 代以後継代と共に、栄養型は次第にその数を減少し、ついに第 6 代より第 8 代の間に栄養型は何等かの原因によつて消失してつた。その後さらに、7 本の培地に各種赤痢アメーバの發育良好な栄養型を移植継代培養したところ、2 本は第 4 代と第 5 代において、1 本は第 3 代より栄養型はわずかに認められたに過ぎず、第 11 代において栄養型は死滅してつた。他の 4 本中 3 本は、第 7 代頃より栄養型は少なくなつて、現在継代第 12, 15, 18 代に及ぶも、栄養型は僅少発見されるに過ぎない。残りの 1 本は、比較的栄養型の發育良好であつて、対照(田辺千葉培地)と殆んど栄養型の發育増殖に差異は認められない。

以上この培養について、少数例の觀察ではあるが考察すると、田辺千葉培養基に優るとは考えられなく、赤痢アメーバの培養基としては確実性が少いと考えられた。しかしこの培地は血清を含有していないために、雑菌の繁殖少く、赤痢アメーバの純粹培養の研究にはぜひこの培養基を活用したいと考えた。なおこの培地内では、栄養型の發育が、田辺千葉培地におけるより遅く不安定なのは、随伴細菌の増殖に適していないために起るのではないかと考え、加熱死菌体を加える實驗には、この培養基を使用することにした。

黄色葡萄球菌(209 株)について

209 株の加熱死菌体を、培養基の液体部 6 cc 中に 0.5 mg, 2.0 mg, 4.0 mg, 5.0 mg, 6.0 mg, の割合に加えた培養基を製作して、これらの培養基に赤痢アメーバの栄養型を 48~72 時間毎に継代培養した。対照として加熱死菌体を加えない培養基と田辺千葉培養基に栄養型を継代培養して觀察を便にした。(第 2 表)

第 2 表 黄色葡萄球菌 209 株加熱死菌体加

培地における培養赤痢アメーバの消長

繼代 死菌體	1 代	2 "	3 "	4 "	5 "	6 "	7 "	8 "	9 "	10 "
6 mg	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++
5 mg	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
4 mg	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++
2 mg	+	++	++	++	++	+	+	++	++	++
0.5 mg	+	++	++	++	++	+	++	++	++	++
0	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+
田邊千葉 培養基	++	+	+	++	++	++	++	++	++	++

(+) 1~19 (++) 20~49 (+++) 50~99 (++++) 100 以上

結果：2.0 mg, 4.0 mg, 5.0 mg, 6.0 mg の加熱死菌体を加えた培養基では、栄養型の發育は良好であつて、常に対照より良い成績であつた。0.5 mg 濃度の培養基では、栄養型の發育は対照に比し不良であつた。

B. mycoides 菌について

209 株の場合と同様に、加熱死菌体を各種濃度(0.5 mg ~ 6.0 mg) に培養基の液体部に加えた培養基にアメーバを継代培養した。(第 3 表)

第 3 表 *B. mycoides* 變異株の加熱死菌體

加培養基における培養赤痢アメーバの消長

繼代 死菌體	1 代	2 "	3 "	4 "	5 "	6 "	7 "	8 "	9 "	10 "
6.0 mg	+	++	++	++	++	+	++	+	++	++
5.0 "	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
4.0 "	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++
3.0 "	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++
2.0 "	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
1.0 "	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++
0.5 "	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
0 "	++	++	+	+	+	±	+	+	+	±
田邊千葉 培養基	++	+	+	++	++	+	++	++	++	++

結果：*B. mycoides* 加熱死菌体加培養基における栄養型の發育は、いずれの濃度でも、対照の田辺千葉培養基における栄養型の發育よりも遙かに良好であつた。とくに 3.0 mg, 4.0 mg, 5.0 mg 濃度の培養基では、赤痢アメーバの發育増殖は極めて顯著であつた。

以上觀察するに、本實驗に使用した血清なき石井氏培地に赤痢アメーバを継代培養するときは、一般に栄養型の發育不良にして、継代第 5~第 10 代の間に、アメーバ

は消失することが多かつた。私は、これは培養基中に血清がないために細菌の発育が、赤痢アメーバの発育に適当なる速度で行われないうえに起因するものと考えた。本実験では、この欠点を補うために、死菌体を加えたところ、良好な成績をうることができた。

總 括

Coli gr. に属する細菌 13 株、連鎖球菌に属する細菌 11 株、葡萄球菌に属する細菌 2 株、赤痢菌に属する細菌 10 株、*B. mycoides* 変異菌 1 株の細菌の 18~24 時間培養を、田辺千葉培養基の液体部に加え、培養赤痢アメーバを継代培養したところ、いずれも培養赤痢アメーバの発育に有害な影響を及ぼすことなくむしろ好影響を與えるもののように観察した。とくに *B. mycoides*、葡萄球菌 309 株、寺島株、連鎖球菌は培養赤痢アメーバの発育に良好な影響を及ぼすものゝようである。

石井、久津見氏培養基に培養赤痢アメーバを継代培養するも一般に栄養型の発育不良であつて、第 10 代以上継代培養できたものは少数例であつた。

209 株、*B. mycoides* 変異菌の 18~24 時間培養を、80°C、40 分加熱した死菌体を、石井、久津見氏培養基に

加え、赤痢アメーバを継代培養したところ、栄養型の発育は極めて良好であつて、現在培養第 12 代に及ぶも何れも栄養型の発育は良好である。

文 献

- 1) 山本義男：満洲. 25, 907, 昭 11 (1936).
- 2) 山本義男：満洲. 26, 937, 昭 12 (1937).
- 3) 森田良雄：満洲. 28, 429, 昭 1 (1938).
- 4) 森田良雄：満洲. 28, 387, 昭 13 (1938).
- 5) 畑上良造：大阪. 37, 2517, 昭 13 (1938).
- 6) 畑上良造：大阪. 37, 2533, 昭 13 (1938).
- 7) 松林久吉：赤痢アメーバ. 1947.
- 8) Chinn, B. D., Jacobs, Reardon, L. V., Rees, C. W.: Amer. J. Trop. Med., 22, 137, 1942.
- 9) Reardon, L. V. and Rees, C. W.: J. Parasit., 25, Sup., 13, 1939.
- 10) Frye, W. W. and Meleney, H. E.: Science, 89, 564, 1939.
- 11) Nelson, E. C.: Amer. J. Trop. Med., 27, 545, 1947.
- 12) Rees, C. W., Bozicevich, J., Reardon, L. V. and Daft, F. S.; Amer. J. Trop. Med., 24, 189, 1944.
- 13) Phillips, B. P.: Science, 111, 8, 1950.