赤痢アメーバの培養に関する研究

第3篇 ウマ血清及び鶏卵を含有しない赤痢アメーバの培養基について (I)

沢田 利 貞・瀬 理 忠 一

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]

赤痢アメーバの培養基はいずれも血清か鶏卵を使用したものであつた。Reardon (1939) その他は血清のない培養基に赤痢アメーバを継代培養したが、この培養基は斜面に鶏卵を用い、液体部にロック氏液と米粉を使用したものであつた。

石井氏(昭23. 寄生虫学会)は田辺千葉培養基の液体部を、1%クエン酸ナトリウム・リンゲル液にかえた培養基に、赤痢アメーバを継代培養したと報告をした。

吾々はこの石井氏培養基に3株の培養赤痢アメーバの継代培養を行つたところ、栄養型は継代するに従つてその数を次第に減少し、ついに消滅してつた。培養赤痢アメーバの発育の良否は、赤痢アメーバの株の種類、随伴細菌と培養基の種類に密接な関係を有するものであるから、ただ数回の実験成績のみによつて、培養基の良否を決定することは妥当ではないが、この石井氏培地が田辺千葉培地に匹敵する優秀な培地であるとは断定できなかった。石井氏培地中における、アメーバの栄養型の発育が継代するに従つて次第に悪くなつたのは、主にアメーバの発育に重大な関係をもっている随伴細菌が、次第に減少するために因るものと考え、石井氏培地に適当と思われる細菌の加熱死菌体を加え、培養赤痢アメーバを継代培養したところ、田辺千葉培地に劣らない良好な結果をえた。

吾々はこれ等の加熱死菌体の代りに、菌体凍結融解物質及びコレステリンを加え、培養赤痢アメーバの消長を観察した。

(I) 各種細菌々体の凍結融解物質加培養基に

における培養赤痢アメーバの発育について

黄色葡萄球菌寺島株、209株及び *B. Mycoides* の変異株の加熱死菌体が、培養赤痢アメーバの発育に良好な影響を及ぼし、ウマ血清の代用をすることを前報に報告した。

吾々は前記3株の細菌と *B. Mycoides* 菌の凍結融解物質を使用して、赤痢アメーバの培養実験を始めた。

方法と材料

細菌の18~24時間培養を10mgエーゼにてかきとり、

これを1%クエン酸ソーダリンゲル氏液で乳剤とし凍結融解(-70°+38°C)した。この凍結融解の操作を25~30回くり返し、ベルケフェルド濾過器N及びWで濾過し、濾液中に生菌のないことを確め、石井氏培地の液体部にこの濾液を加えた培地に発育良好な培養赤痢アメーバの栄養型を加えて実験をした。

石井氏培地の處方

固形部: アスパラギン1瓦, 寒天10瓦, 溜水1000cc

液体部: クエン酸ソーダ1瓦, リンゲル氏液100cc

米 粉: 1~2白金耳

菌体1mgの凍結融解物質を培地の液体部6cc中に含有する場合、これを「1mg濃度の培地」と記載した。

(イ) 黄色葡萄球菌寺島株について

寺島株の凍結融解物質で0.5mg~6mg濃度の培養基を作り、これらの培地に発育良好な培養赤痢アメーバを移植し、48~72時間毎に継代培養して、第1表に示す如き結果を得た。なお対照として田辺千葉培地に栄養型を継代培養して比較観察した。即ち0.5mgと1mg濃度の培地では、栄養型は培養第4代で消失してつた。2~6mg濃度の培地では栄養型の発育は良好であつて、対照の田辺千葉培地における栄養型の発育よりも良好な成績を示したが、第21代より5.0~6.0mg濃度の培地では、栄養型の発育は衰微の傾向を示し、ついに第23代第24代において栄養型は死滅してつた。2.0~4.0mg濃度の培地では、現在継代27代(培養期間2ヶ月余)に及ぶも栄養型の発育は良好であるが、ことに2mg, 3mg濃度の培地におけるアメーバの発育は対照の田辺千葉培地に劣らない好成績を示している。

(ロ) 黄色葡萄球菌209株について

寺島株と全く同様に菌体を処置し、同様培地に菌体の

SAWADA, Toshisada, and SERI, Chuichi: Studies on the cultivation of *Entamoeba histolytica*. III. On the culture medium without horse serum and egg Japan. J. Bact., 5 (6): 425-428, 1950.

第1表 209株及び寺島株の菌体凍結融解物質加培地における栄養型の消長

No.	濃 度	培養代	1代	2〃	3〃	4〃	5〃	6〃	8〃	11〃	12〃	14〃	16〃	18〃	30〃	26〃	27〃	30〃
1	6 mg		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	5 "		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	4 "		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	3 "		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	2 "		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	1 "		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	0.5 "		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	0 "		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	對 照		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

註 () は 209 株, + ++ 寺島株。

凍結融解物質を加え、培養赤痢アメーバの栄養型を継代培養して観察した。対照には田辺千葉培地を使用した。

0.5 mg と 1.0 mg 濃度の培地では、栄養型の發育は継代第5代迄は対照より良好であつたが、第6代より次第に不良となつて対照と殆ど同程度の成績が認められたが、第27代、第30代ではやゝ多数の栄養型が認められた(第1表参照)。菌体凍結融解物質を加えない培地における栄養型の發育は、本実験において比較的良好な成績を示し、継代第5代迄は田辺千葉培地における栄養型の發育より良好であつたが、第6代以後は、栄養型の發育は次第に衰え、第27代に至つてアメーバは絶滅してつた。

3 mg と 4 mg 濃度の培地における栄養型の發育は極めて良好であつて、現在培養2ヶ月半、継代培養第30代に及ぶも栄養型の發育良好であつて、対照における栄養型の發育より優れた成績を示している。5 mg 濃度の培

地においては、栄養型の發育は田辺千葉培地における栄養型の發育より常に良好であつたが、原因は明かでないが何等かの原因によつて、第26代で突然栄養型は消失してつた。

(ハ) *B. mycoides* の変異株について

寺島株と全く同様に操作して、各種濃度の菌体凍結融解物質加培基に赤痢アメーバを継代培養して観察した。即ち 0.1~0.5 mg 菌体の凍結融解濾過物質を加えた培基では、栄養型の發育は第1, 2代では良好であるが、第3代以後徐々に不良となり、第12代、第13代より栄養型は消失してつた(第2表)。

1 mg~3 mg 濃度の培基では、栄養型の發育は良好であつて対照の田辺千葉培基に優るとも劣らぬ成績が認められた。6 mg 濃度の培地では栄養型の發育は第10代迄良好であつたが、第11代より次第に不良となりついに第21代で栄養型は死滅した。

第2表 *B. Mycoides* の變異株の菌体凍結融解物加培地における栄養型の消長

No.	濃 度	代	1代	2〃	3〃	5〃	7〃	9〃	11〃	13〃	15〃	20〃	27〃
1	6 mg		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	3 "		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	2 "		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	1.0 "		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	0.5 "		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	0.3 "		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	0.1 "		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	0 "		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	對 照		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

第3表 B. Mycoides の菌体凍結融解物質加培地における栄養型の消長

No.	濃度	1代	2 "	3 "	4 "	5 "	7 "	9 "	11 "	13 "	15 "	17 "	21 "	24 "	25 "	27 "
1	6mg	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	卅	+
2	5 "	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	+	+	+
3	4 "	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	+	+	+	+
4	3 "	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	+	卅	卅	卅	+	卅	卅	+
5	2 "	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	卅	-	-	-
6	1 "	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	+	+	+	+	-	-	-	-
7	0.5 "	卅	卅	+	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	+	-	-	-
8	0 "	卅	+	+	+	+	卅	卅	+	+	卅	+	+	-	-	-
9	対照	卅	卅	卅	+	+	卅	+	+	+	+	+	+	+	+	卅

1.0 mg, 2.0 mg, 3.0 mg 濃度の培地では、栄養型の発育は良好であつて現在第 27 代に及んでいる。

(二) B. Mycoides について

B. Mycoides 菌を寺島株と同様に処置し、赤痢アメーバを継代培養して、それ等の消長を観察した。

B. Mycoides 菌体凍結融解物質加培地における赤痢アメーバ栄養型の継代培養実験は、第 3 表に示す如く、濃度の低い培地では成績不良であつて、濃度の高い培地では、栄養型の発育は良好であつた。即ち 2 mg 以下の濃度の培地では、栄養型は第 21 代以上継代不能であつた。3 mg 以上の濃度の培地では、赤痢アメーバの栄養型の増殖は顯著であつて、対照の田辺千葉培地における栄養型の発育より良好であつた。

菌体凍結融解物質を加えない培地では、栄養型は次第に減少し、第 10 代迄位の間に死滅するものが多いが、本実験では、比較的発育良好であつて、第 21 代迄継代

することができた。

(II) コレステリン加培養基について

従来コレステリンが培養赤痢アメーバの発育に良好な影響を及ぼすことは、Rees, Reardon, Meleney 等によつて唱えられている。石井氏培地に栄養型を継代培養するとき、第 4 代頃迄は栄養型は良好な発育を示すが、以後継代に従つて栄養型の発育は不良となつて、第 10 代～20 代の間に栄養型は絶滅することが多く、第 15 代以後において栄養型が良く発育しているのを認められなかつた。

吾々は、石井氏培地にコレステリンを液体部 1cc に対し、0.025 mg～1.0 mg の割合に加えた各種培地に、培養赤痢アメーバの栄養型を植え 24～72 時間毎に継代培養して、栄養型の消長を観察した。なお対照として、石井氏培地と田辺千葉培地に栄養型を継代培養して比較観察した。

第4表 コレステリン加培地における栄養型の消長

コレステリン/cc	代	1代	2 "	3 "	4 "	5 "	6 "	7 "	8 "	9 "	10 "	12 "	15 "	17 "	18 "
0 mg		卅	卅	卅	卅	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
0.025 "		卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	+	+	+	-	-	-
0.05 "		卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅
0.1 "		卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	+	卅
0.15 "		+	+	卅	卅	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	+	卅
0.25 "		卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	卅	+	+	卅
0.4 "		卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	+	卅	+	卅
0.5 "		卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	卅	+	+	卅
0.75 "		卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	+	+	卅	+
1.0 "		卅	卅	卅	卅	+	+	卅	卅	+	卅	+	+	+	+
対 照		卅	卅	卅	卅	+	+	+	+	+	卅	+	卅	卅	卅

コレステリンはガラス球を入れた三角コルベンに、1%クエン酸ソーダ、リンゲル氏液と共に入れ振盪して乳剤として使用した。

コレステリン加培地では、培養赤痢アメーバは良好な発育をすることが判明した(第4表参照)。即ち培地の液体部1ccに対しコレステリン0.05mgから0.5mg加えた培地では、栄養型の発育良好かつ確実であつて、田辺千葉培地における栄養型の発育に優るとも劣らない成績が認められた。しかし液体部1ccに対しコレステリン0.025mg濃度の培地では栄養型の発育はコレステリンを加えない培地よりは良いようであつたが、継代第8代以後は次第に栄養型は発育不良となつて、第15代で培養赤痢アメーバはついに消失した。

總 括

(1) 黄色葡萄球菌209株の凍結融解物質を培養基に加え、培養赤痢アメーバを継代培養したところ、菌体量3~4mgの融解物質加培地では、栄養型の発育は良好であつて、田辺千葉培地に於ける栄養型の発育より好い成績が認められた。

(2) 黄色葡萄球菌寺島株の菌体2mg~3mgを凍結融解した物質を加えた培養基では、栄養型の発育は良好であつて、継代培養したが栄養型の増殖は田辺千葉培養基における栄養型の発育に匹敵する結果が認められた。

(3) *B. mycoides* の菌体3mg~6mgの凍結融解物質加培地における培養赤痢アメーバの発育は、継代第27代になつてもなお良好な発育を示している。

(4) *B. mycoides* の変異株の菌体1mg~3mgの凍結融解物質加培地に於ける培養赤痢アメーバの発育は、継代培養したところ、良好な結果が認められた。

(5) コレステリンを培地に加えたところ、最低量0.05mg/ccの濃度にコレステリンを加えたときは培養赤痢アメーバは継代培養可能であつた。

赤痢アメーバの培養基にはウマ血清と鶏卵を使用した

培地が一般に使用されてきた。このウマ血清の代りに肝臓、心臓鶏卵等の抽出物質が使用されたが、いずれも複雑なものであつた。石井氏培地は最も進歩した簡単な培地であるが、吾々の実験では田辺千葉培地以上の好成績をうることはできなかった。血清と鶏卵を用いない簡単でしかも赤痢アメーバの発育良好な培地を研究することは、赤痢アメーバの培養の研究に資するはもちろん、今日の血清入手困難な日本の現状では緊要なことである。吾々は本実験によつて菌体融解物質、或はコレステリンを石井氏培地に適当に加えることによつて、培養赤痢アメーバは容易に発育し、かつ継代培養も可能であつて、田辺千葉培地に劣らない成績がえられることを確かめた。

擧筆するに臨み御指導御校閲を賜つた部長宮崎吉夫教授に感謝いたします。

文 献

- 1) 田邊
- 2) 畑上良造：大阪醫學會雜誌。37, 2517, 昭13 (1938).
- 3) 畑上良造：大阪醫學會雜誌。37, 2533, 昭13 (1933).
- 4) 森田良雄：滿洲醫科大學雜誌。28, 429, 昭13 (1938).
- 5) 山本義男：滿洲醫科大學雜誌。25, 907, 昭11 (1938).
- 6) 山本義男：滿洲醫科大學雜誌。23, 937, 昭12 (1938).
- 7) 與世里盛夫：滿洲醫科大學雜誌。22, 467, 昭10 (1933).
- 8) Ress, C. W. & Bozicevich, G.: Am. G. J. Med. 24: 189-192 (1944).
- 9) Frye, W. W. & Meleney, H. E.: Science, 89: 564-535 (1939).
- 10) Ress, C. W.: Am. G. J. Med. 22: 137-146 (1942).
- 11) Reardon, L. V. & Ress, C. W.: J. Parasitol, 25: 13. Suppl. (1939).