赤痢アメーバの培養に関する研究

第4篇 培養赤痢アメーバの發育と酸化還元電位の関係について

沢田 利 貞・大 島 智 夫・瀬 理 忠 一

東京大学傳染病研究所第六研究部 (部長 宮崎吉夫教授)

〔受付: 7 月 8 日, 1950 年〕

1種の随伴細菌 *paracolon* gr.) を有する培養赤痢アメーバに高單位のペニシリンとストレプトマイシンを同時に作用する時は1種の随伴細菌は消失するが、栄養型は包藏物を放出して小円形の前被胞期型となる、これを新鮮な培地に移植すると發育増殖することなく、ついには培養赤痢アメーバは絶滅して了つたことは前に報告した。

即ち田辺千葉培地中では、培養赤痢アメーバは少なくとも1種の随伴細菌なしには發育も増殖もできないことが明白となつた。

培養赤痢アメーバの發育増殖に必要な栄養及びその他の諸條件に関しては、純培養法の完成されていない現在においては不明の点が多い。

蛋白質、アミノ酸、澱粉、無機塩類、ビタミン等の物質が培養赤痢アメーバの發育に及ぼす影響に関しては数多の報告があるが、これらの物質と培養赤痢アメーバの増殖との関係については、漠然としている所が多い。これは従来の赤痢アメーバの培養法は数多の細菌を伴つていた爲に、細菌の種類及び培地の種類により條件が繁雜であつた爲と考えられる。

Cleveland & Collier (1936) は肝膿瘍からえた無菌のアメーバをもつて培養しようとしたが、失敗に終つた。Snyder & Meleney (1941) は無菌の嚢子を培養しようとしたが、嚢子は脱殻しなかつた。しかし Rees (1942) は、この無菌の嚢子に数種の細菌を選定して各1種宛加え嚢子を脱殻して發育させることに成功した。

従来の培地をもつて赤痢アメーバを随伴細菌なしに培養することは不可能であつて、少なくとも1種の適当な細菌が随伴することが必要であることが明白となつた。この随伴細菌は培養赤痢アメーバの發育増殖に必須の重大要素を附與していることは明かな事實である。なかんずく細菌によつて醸成される適当な理學的條件は赤痢アメーバの發育に最も深い関係を有するものと考えこの実験を始めた。

培養赤痢アメーバの發育増殖と酸化還元電位について
材料と方法: 培養基は田辺千葉培地を使用し、培養

赤痢アメーバはK株、Y株 (両者共随伴細菌多種) T株 (*Subtilis* の変異株 *paracolon* gr. に属する細菌1株を随伴する) の3株の培養赤痢アメーバを実験に供した。

酸化還元電位の測定は、甘汞半電池を用い、ポテンシオメーターによつて実施した。

(1) 酸化還元電位 (Eh) 測定位置について

培養赤痢アメーバは田辺千葉培地の斜面及び底部において多くの栄養型が認められる。即ち液体部の底部より上層部にわたつて赤痢アメーバは発見される、従つてまず上部と底部の Eh を測定して比較したところ、第1表に示す如く、底部と上層部の Eh は大差のないことを発見したので本実験にはアメーバの最も多く認められる底部のみの測定を実施した。

第1表 赤痢アメーバを培養せる培地の
上層部と底部の Eh

培養 株	培養 時間	調製直後	培養5時間	培養30時間
	上層部	+68	-68	-134
K 株 (随伴菌多種)	底部	+46	-62	-144

(2) 田辺千葉培地の酸化還元電位について

培地を調製し米粉を入れ 37°C に温め、まだ培養赤痢アメーバを移植しない培地 (液体部) の Eh を測定したところ、Eh+370 mv 及び Eh+46 mv の間であつた。

(3) 培養直後の Eh について

培地を調製して培養赤痢アメーバを移植した直後 (30分~60分) における培地 (液体部) の Eh は、急激な降下が認められ、Eh は -14, +166 の間の数値を示した。即ちこれらの Eh は移植した栄養型の数、液体の量、細菌の種類、細菌量等によつて差異を生じたものと考えら

SAWADA, Toshisada, OSHIMA, Tomoo, and SE-RI Chuichi: Studies on the cultivation of *Entamoeba histolytica*. IV. On the relationship between the growth of *E. histolytica* and the redox-potential. Japan. J. Bact. 5(6): 433-435, 1950.

れる。Eh+166 を示したのは1種の細菌を随半しているアメーバ株であつた。

(4) 培養 24~120 時間における Eh と栄養型の増殖状況について

培養 24 時間では Eh の急激な降下が認められ、Eh は Eh-19, Eh-164 の間を示し、栄養型の増殖の状態が認められた(第 2 表参照)。

第 2 表

培養時間 No.	24 時間	48 時間	72 時間	96 時間	120 時間
1	-19 (V+10)	-89 (V++20)	-78 (V++80)		
2	-84 (V++20)		-134 (V++30)	(P+10)	-194 (P++50)
3	-164 (V++20)		-134 (V++60)	(P+10)	-134 (P++30)

即ち No. 1 は随伴細菌を沢山有する 栄養型の Y 株について実験したのであるが、培養 24 時間後では 栄養型の発育は (+) であつて、Eh -19 mv であつた。48 時間後では 栄養型は (++) に増殖していた。この時の Eh は -89 mv であつた。72 時間後では 栄養型はさらに増殖しており (+++) を示していた。この時の Eh -78 mv であつた。その後においては培地濁濁して 栄養型は減少したため、Eh の測定をしなかつた。即ち 栄養型の増殖に適した Eh は -80 mv 前後ということになる。

No. 2 は随伴細菌の多い 栄養型 (+) の K 株を使用した。培養直後の Eh は -14 mv であつたが、培養 24 時間後では Eh は -84 mv に急降下し、アメーバは (++) に増殖していた。72 時間後では Eh -134 mv になり、アメーバ数は (++) となつていた。その後次第にアメーバは衰へ、120 時間後では、Eh -194 mv であつたが、栄養型は認められず、前被胞期型が沢山認められた。即ち Eh -80 mv, -134 mv の間が 栄養型の増殖に適していることを示していた。96 時間以後で Eh -194 mv の数を示しながらアメーバは増殖せずして衰微して行つたのは、細菌の代謝産物或は有害物質の成生によるものと考えられる。

No. 3 は *B. mycoides* の変異株 1 株の細菌を随伴せる 赤痢アメーバ株を使用した。培養直後における Eh は +166 mv であつて、前例と比べ高い Eh を示したが、培養 24 時間後では Eh は急激に降下し、Eh -164 mv を示し、栄養型は (++) の良好な発育を示した。培養 72 時間後では Eh -134 mv を示し、栄養型はさらに増殖して (+++) を示していた。その後はアメーバは衰微の傾向

を示したが、120 時間後の Eh は -134 mv であつた。即ちこの実験によつて田辺千葉培地では Eh -130 mv, -160 mv の間がアメーバの増殖に適していることがわかつた。

以上綜合するに培地の Eh は培養直後急激に降下して最高 Eh +166 mv 最低 -14 mv であつて両者には相当の差異があつたが、培養 24 時間後ではかえつて最初高かつたものの Eh が最低となつた。即ちこれらの Eh の差異は随伴している菌の株と言によるものと考えられる。

栄養型の発育は Eh -80 mv, Eh -160 mv の間において盛に行われるように思われた。

(5) Aeration 実験について

前実験によつて培養赤痢アメーバは Eh の降下と共に増殖すること、Eh -80 mv, Eh -160 mv の間において最も好く増殖することが明となつた。もし Eh が -80 mv 以下に降下しないとき、赤痢アメーバは増殖を中止するや否やを明かにするためこの実験を実施した。即ち Eh の降下を防ぐ爲に培地の液体部に酸素を送入したところ、第 3 表に示す如き結果をえた。

第 3 表 Aeration した場合、培地の Eh

培養時間	培 地 調製直後	30分~60分	5 時間	30 時間
Eh	+353 mv	+112 mv	-4 mv	-54 mv
栄 養 型		u +		(-)

即ち培養 30 分~60 分では一般に 栄養型は一時的減少するものであるが、本実験でも若干の 栄養型が認められ対照と殆んど同様の成績を認めた。

しかし 30 時間後では 赤痢アメーバの 栄養型は全然認めることができず、Eh は -54 mv という比較的高い Eh を示していた。培養赤痢アメーバは Eh -54 mv 以上では増殖することも生存することも不能であつて、死滅することが明かとなつた。

(6) 田辺千葉培地において各種細菌の Eh の変化に及ぼす影響について

培養赤痢アメーバの増殖並に生存に関しては、Eh が重要な関係を有することが判明した。しかしこの Eh の降下が随伴する細菌によつて起るかどうかを検討することとした。実験には 赤痢アメーバに好影響を及ぼすと考えられている培養赤痢アメーバより分離した *B. streptococcus*, *B. subtilis* 及び *B. subtilis* gr. の変異株、及び好影響を及ぼさないと考えられている *E. Coli*, 以

第4表 共棲菌單獨の T. T. 培地に
於ける電位降下

上4株の細菌をもつて実験したところ第4表に示す如き結果をえた。

總 括

田辺千葉培地において培養赤痢アメーバの発育増殖は培地(液体部)の酸化還元電位と密接な関係を有し, Eh -80 mv, Eh -160 mv の間が栄養型の増殖に最適であつて, Eh -54 mv 以下に降下しないと, 即ち Eh -54 mv 以上においては赤痢アメーバは死滅する。これらの Eh の降下は培養赤痢アメーバに随伴している細菌

の作用によつて醸成されるものであることが明かとなつた。従つて赤痢アメーバの純培養法を案出するためには, まず従来培地の酸化還元電位を降下させることが必要であることが明白となつた。

撰筆するに臨み本研究に於て酸化還元電位測定に就いては予防衛生研究所小島研究室藤本氏の御懇切な御指導を賜り, また御校閲を賜つた部長宮崎吉夫教授に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Rees, C. W., Bozicevich, I., Reardon, L. V., Daft, F. S.: Amer. J. Trop. Med., 24, 189, 1944.
- 2) Rees, C. W., Reardon, L. V., Jacobs, L.: Amer. J. Trop. Med., 21, 00, 1941.
- 3) Frye, Meleney, H. E.: Science, 89, 564, 1939.
- 4) Chang, S. L.: 4th Internat. Congr. Trop. med. & Mal. Wasing. 19 S.
- 5) Chang, S. L.: J. Infect. Dis., 72, 32, 1943.
- 6) Snyder, T. L., Meleney, H. E.: Amer. J. Trop. Med., 21, 63, 1941.