

# 赤痢アメーバ増殖に及ぼすウェルシ菌の影響に就て

山川 速水

慶應義塾大学医学部寄生虫学教室

## 緒 言

赤痢アメーバの培養には常に細菌が随伴し此の細菌を除く事は極めて困難であるばかりでなく、細菌はアメーバの食物となるものであつて、之を除いては、アメーバの増殖は不可能と考えられている。随伴する細菌の種類は、アメーバの増殖に重大なる関係がある。畑上氏(1938)、は田辺・千葉・培養基に培養した、25株の赤痢アメーバに随伴する細菌を検査して、それ等は、グラム陽性の球菌並に桿菌であり、グラム陽性の球菌は、腸球菌に相当し、グラム陽性の桿菌はデフテリー様菌に類似することを明らかにした。而してグラム陰性桿菌は総ての株に随伴し、随伴菌の大部分を占めるもので之等は悉く Coli-group 並に同類似菌に属している述べている。近年2、3の研究者が嫌気性菌が赤痢アメーバの脱殻増殖に好影響を興えると共に、その病原性をも高めて、組織への侵入を容易にすると報じている。齊藤氏は赤痢アメーバの随伴細菌で preconditioned medium を調製し、細菌の増殖を阻止した赤痢アメーバの培養に成功している。其の場合 *Clostridium welchii* を用いると初代及び継代培養に於ても、アメーバの増殖は良好であると云つてゐる。亦培養液中に還元剤を入れるか、窒素ガスを通ずるか、又酸素を吸収する物質を入れると、細菌なしでも脱殻した。而して之等は総て、培養基内の酸素の分圧を下げる事であり、この事は細菌を加えると同様の結果をもたらすものと思われる。私は最近赤痢アメーバの培養の際に、*Cl. welchii* を共棲せしめた場合に、アメーバの増殖に好影響を及ぼした事を経験したので、茲に報告する。

## 実験材料と方法

使用した培養基は次の5種類である。

1) K-培養基：Ringer 氏液に寒天を1%の割合にと

*Hayami Yamakawa*: On the influence of *Clostridium welchii* upon the growth of *Entamoeba histolytica*. (Department of Parasitology, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan)

かして、この500ccに対して鶏卵2個を混和して、分注後、80°C 1時間湯煎して斜面に凝固せしめ、液体部は Ringer 氏液 500 cc に対して卵白2個分を混和したもので、培養直前に滅菌米粉の1白金耳を加えたもの。

2) 卵-培養基：Ringer 氏液 50~100 cc に全卵4個を混和して、80°C 1時間加熱して、斜面に凝固せしめたもので、培養の直前に滅菌米粉を加える。液体部は Ringer 氏液のみである。(Ringer 氏液は滅菌に極めて好都合であるから特に用いた)。

3) R-S-R 培養基：馬血清7を Ringer 氏液3に稀釈し、80°C 1時間加熱、之を2~3回繰返して血清凝固器で斜面となしたもので液体部は Ringer 氏液のみにて、前と同様滅菌米粉を加える。

4) 肝肝ブイオン：液体培地となして上記の如くに米粉を加える。

5) バラムス液体培地

*Cl. welchii* は肝肝ブイオン、高層寒天地又は、zeissler の葡萄糖血寒天平板に培養して保存した。

## 予備実験

上記各種の培養基にアメーバを培養する際、*Cl. welchii* を同時に共存せしめる事によつて、アメーバの増殖が如何に影響されるかを検することが、本実験の目的であるが、それには予め之等赤痢アメーバ用の培養基に果して、*Cl. welchii* が増殖し得るか否かを知る事が必要である。この点を明らかにするために予備実験を行つた。予備実験としては先づ R-S-R 培地を用いた。之の液体部に還元剤として、塩酸 Cystein を 0.1%~0.01% の割合に加え、且つ還元状況の指示薬として 1% methylenblau 液を1滴の割合に加えた。この様に準備した培地に、肝肝ブイオン中の *Cl. welchii* の1白金耳を加え、その表面を流動パラフィンで封じたものと、封じないものとで、*Cl. welchii* の増殖の有無を検した。然して 24~48 時間の培養で、色素が脱色され、液体部が濁濁し、ガスの発生が顯著なる場合には、*Cl. welchii* が増殖したものとした。併し更に其の液体部の1白金耳

を、高層嫌気性培養に移して、ガスの発生並にガスによつて、高層培地に亀裂を生ずるか否かを検した。成績は第 1 表に示した。パラフィンを重ねた場合も、しない場合も、液体部は溷濁して、色素は脱色し、ガスは発生した。

即ち *Cl. welchii* はよく増殖した。比較のために従来から保存していたアメーバ (吉村株) を同様な R-S-R 培地に移植培養した所 (第 1 表 3) 脱色は起らず、ガスの発生も見られなかつた。

この株には *Cl. welchii* は含まれていない様である。

第 1 表 R-S-R medium に *Cl. welchii* の移植

條 件	時 間	24		48		72	
		濁	脱色	濁	脱色	濁	脱色
1 <i>Cl. welchii</i> 流パラ重疊		+	+	+	+	+	+
2 <i>Cl. welchii</i> 流パラ無		+	+	+	+	+	±
2 吉村株流パラ無		+	-	-	+	-	-

同様な実験を K-培地、卵培地、肝肝ブイオン、バラムス培地について行つたが、その結果は上記の R-S-R 培地と同様の成績となり、いつれの培地に於ても *Cl. welchii* は増殖しうることが明らかになつた。

本 実 験

1) R-S-R medium を用いた実験

R-S-R medium に前述したと同様に塩酸 Cystein と Mehtylenblau を加え、之れに *Cl. welchii* と、アメーバ (吉村株) を同時に移植した。4 本の培養基中、1 本には流動パラフィンを重ね、他の 3 本には重ねなかつた。対照としては同じ培地にアメーバだけを移植した。併し対照の 2 本のうち 1 本には塩酸 Cystein 及び Methylenblau を加えなかつた。

成績は第 2 表の如くである。*Cl. welchii* を入れた培地

第 2 表 R-S-R medium に *Cl. welchii*  
アメーバ同時培養 (吉村株)

培養条件	培養時間				
	24	48	72	96	高層
パラフィン無	+	+	+	+	(+)
〃	+	++	+	+	(+)
〃	+	+	±	±	
パラフィン重疊	+	+	±	±	
対 照 (1)	+	+	+	±	(-)
対 照 (2)	-	-	-	-	(-)

では、24 時間後から、溷濁とガスの発生が見られ、96 時間後嫌気性高層培地に移植した所、ガスの発生と培地の亀裂が見られ、*Cl. welchii* が 96 時間まで尙増殖していた事が明らかであつた。対照では 24 時間後から溷濁が起つたが、ガスの発生はなく、96 時間後高層培地に移植しても、嫌気性菌の増殖は認められなかつた。アメーバの發育状態は対照に比して著しい差は見られなかつた。

次に R-S-R medium に先づアメーバ (吉村株) を移植し、24 時間後に *Cl. welchii* を添加して、それがアメーバの増殖に如何に影響するかを観察した。この場合塩酸 Cystein は影響が少いので加えなかつた。*Cl. welchii* を添加しないものを対照とした。アメーバ株移植後 24 時間で培地の脱色がおこつたが、ガスの発生は認められなかつた。次いで *Cl. welchii* を添加する事によつて、その後はアメーバは対照に比較して可成よく増殖した。成績は第 3 表に示した。

第 3 表 R-S-R medium にアメーバ 24 時間培養後  
*Cl. welchii* を加える

種 別	24	48	72	96	
1 アメーバ	+	ウ エ ル シ 菌 を 添 加 す る	++	++	+
2 〃	±		++	++	±
3 〃	±		++	++	+
4 〃	±		+	++	+
5 〃	+		+++	+++	-
6 〃	-		+++	+++	±
1 対 照	+		+	+	+
2 対 照	-		+	+	±

R-S-R medium を用いた第 3 の実験として、先づ *Cl. welchii* を 24 時間増殖せしめ、次いでアメーバを移植する実験を行つた。対照としては初めからアメーバを移植して *Cl. welchii* を加えなかつた。成績は第 4 表に示した。即ち *Cl. welchii* を加えた培地では対照のものに比してアメーバの増殖は常に良好であつた。

次に小田株を用いて、前の実験と同様に *Cl. welchii* を先づ 24 時間培養後にアメーバを移植したものは、*Cl. welchii* を添加しない対照に比して著しく良好であつた。成績は第 5 表に示した。

2) K-medium 並に卵培地を用いた実験

此の実験に於て、塩酸 Cystein は用いず Methylenblau のみ指示薬として用いた。成績は第 6 表に示した

第 4 表 R-S-R medium にウエルシ菌 48 時間培養後アメーバ移植

条件	時間	24	48	72	96
W.パラフィン重疊	(ウエルシ菌 48 時間培養後アメーバ移植)	+	+	+	
〃		+	++	+	
〃		++	++	+++	-
〃		++	+	+	
〃		++	+++	+++	±
W.パラフィン無		++	+++	++	+
〃		++	+++	++	+
〃		+++	+++	+++	±
〃	++	++	+		
〃	++	++	+		
対照 A パラフィン		++	++	++	+
〃		+++	+++	+	±
対照 A パラフィン無		++	++	++	±
〃		++	+	-	-

第 5 表 R-S-R medium にウエルシ菌 24 時間培養後アメーバ移植 (小田株)

時間条件	24	48	72	96	120	144	168	192
W (ウエルシ菌 24 時間培養後移植)	±	+	+++	+++	++	++	++	±
〃	±	+	+	++	+++	+++	++	+
〃	±	+	+	+++	+++	++	++	-
〃	+	+++	+++	+++	++	±	±	-
〃	+	±	++	+++	++	++	±	-
〃	±	+	+	++	+++	+++	±	-
〃	+	+	+	+++	++	++	+	-
〃	++	++	+	+++	+++	+++	++	±
対照 A	+	+	+	++	+	+	±	-
〃	±	-	-	+	+	+	±	-

様に R-S-R medium を用いた実験と殆んど同様な結果であつた。即ち *Cl. welchii* を 24 時間培養後アメーバを移植したものは *Cl. welchii* を加えない対照に比して常にアメーバの増殖は良好であつた。

アメーバ培養後 120 時間後嫌気性高層培地に移植した所 *Cl. welchii* を添加した培地のものはすべてガスの発生と培地の強い分裂を示した。

3) バラムス培地を用いた実験

塩酸 Cystein を用いず Methyleneblau を指示薬として、ウエルシ菌、アメーバを同時に移植した。即ち培地の還元は強く、ガスの発生状況は極めて盛んであり、

第 6 表 K-medium, 卵 medium に W 菌 24 時間培養後アメーバ移植 (吉村株)

種別	24	48	72	96	高層分裂	
K-medium	W アメーバ移植	++	++	+++	+++	(+++)
	〃	++	++	+++	++	(+++)
	〃	+	+++	++	++	(+++)
	〃	+++	++	++	++	
卵 medium	対照 A	++	±	±	-	
	〃	+	+	±	-	(-)
	〃	+	++	+++	+++	(-)
	〃	+	++	+++	+++	
卵 medium	W アメーバ移植	++	+++	+++	+	(+)
	W 1 植	+++	+	+	-	(+)
卵 medium	対照 A	+	+	-	-	(-)
	〃	+	++	+	±	

第 7 表 バラムス培地にウエルシアメーバ同時培養 (吉村株)

時間条件	24	48	72	96
WA	+	++	++	±
〃	+	+++	++	-
〃	+	++	+	±

アメーバの増殖は良好である。その成績は第 7 表に示した。

4) 肝肝ブイオンを用いた実験

肝肝ブイオンの液体を以て *Cl. welchii* とアメーバを同時に培養を行つた。指示薬として、前と同様に Methyleneblau を加えた。対照はアメーバのみである。この場合アメーバの増殖は全般的に余り良好ではなかつたが *Cl. welchii* を添加したものは対照に比較すると稍々良好な増殖を示している。96 時間にしてアメーバは全く死滅していたが前述の如く嫌気性培地に移植した所が *Cl. welchii* を添加したものは、ガスの発生と培地の高度の分裂を示している。成績は第 8 表に示した。

第 8 表 肝肝ブイオン液にウエルシ、アメーバ同時培養

時間条件	24	48	72	96	高層分裂
WA	-	+	+	-	(+++)
〃	+	+	+	-	(++)
対照 A	+	±	±	-	(-)
〃	-	-	-	-	(-)

5) R-S-R medium を用いて計数的にアメーバの増殖を観察した実験

次にこれまで記述した実験に於いてアメーバの増殖が他の培地に比して最も確実に安定し、且つ生存期間もよく長期に亘ると思われる R-S-R medium を使用して、個々の培地の条件をすべて一定にして、これにアメーバ小田株、吉村株を移植して、其の増殖率を Thoma Zeiss の計算室を用いて精査を行った。

実験としては試験管は、すべて小試験管を用いて、其の口径を 1 ㎝のものに一定した。

先づ前記の Ringer-serum 稀釈液 1.5cc をピペットに吸引して試験管内に注入し、血清凝固器を用いて、80°C 1 時間、を 3 回に亘つて滅菌し斜面を作つた。液体部は Ringer 氏液 0.3 cc として滅菌米粉の 1 白金耳を加えた。赤痢アメーバ移植の方法としては前述の如くに Ringer-serum 培地に 24 時間先づ *Cl. welchii* を培養してガスの発生を証した培地に、赤痢アメーバの栄養型を含む一定量 0.1 cc を移植して、24 時間～48 時間～72 時間～とアメーバの増殖数値を、上記の計算室を使用して測定した。一方対照として *Cl. welchii* を加えない普通の培養を行った。用いた株は共に Cyste より得た 2 つの株、即ち前述の吉村株と小田株で、吉村株は初め卵培地により培養し後に R-S-R 培地に移植して、継代したものであり、小田株は初めから R-S-R に継代し 100 代以上も続いたもので両者共に極めて安定した株である。計算室に表われた栄養型の数は 3 回の計算によつて其の平均値を求めた。而して予め被検液は、増殖液体部をピペットにて 10 回吸出を繰返して米粉もよく混和して、平等の溷濁となして、速かに其の液体部の中心部より取得して検査を行った。

先づ吉村株を用いて、肝肝ブイオンの *Cl. welchii* 液 0.03 cc を R-S-R medium にて 24 時間培養した後アメーバ培養液 0.1 cc を加え、対照としては *welchii* を添加しないアメーバ培養液 0.1 cc を移植した。又全く同様な実験を小田株についても行い、その成績は第 9、第 10 表に示した。即ち *Cl. welchii* を添加した場合、その対照に比して明らかに、アメーバの増殖率は良好である事を示している。又同様の実験を繰返している間に *Cl. welchii* を随伴しない対照のものには、虫体の増殖が極めて不活潑で、時として全然増殖の傾向を示さず絶滅せんとする場合にも遭遇するが、*Cl. welchii* を随伴しているものに於ては毎常アメーバの増殖は確実で、且つ良好である。一般に液体部の溷濁程度は対照と差異は認め

られず且つアメーバの生存期間も対照と略々同様と思われる。

第 9 表 ウェルシ菌 24 時間培養後アメーバ移植 (吉村株)

時間 条件	24	48	72	96
W (ア メ ー バ を 移 植 す る)	10	29	3	0
〃	10	45	2	0
〃	6	18	0	0
〃		16	2	1
〃		29	16	4
〃		30	7	1
〃		47	10	0
対照 A	5	29	3	0
〃	4	31	2	0
〃	2	7	0	0
〃		1	1	0
〃		3	12	4
〃		2	0	0
〃		5	0	0

註 ウェルシ菌液 0.03 cc  
アメーバ浮遊液 0.1 cc を用うる

第 10 表 ウェルシ菌 24 時間培養後アメーバを移植する (小田株)

時間 条件	24	48	72	96	120	144	168	192
W ア移	1	11	20	13	21	2	0	0
〃 メ	1	9	26	8	8	0	0	0
〃 植	1	15	20	15	21	5	1	0
対照 A	0	9	9	13	6	0	0	0
〃	0	8	6	4	4	5	0	0
〃	0	5	8	8	13	8	2	0

註 9 表に準ずる

考 按

*Cl. welchii* は土壤の中に広く分布して、動物及び人の腸内にも常在し得ることが多く、本菌は嫌気性の度合は弱いとされている。普通寒天培養基、ブイオン等にも發育し得ると云われている。本実験に用いたアメーバ培養基即ち血清の斜面 (R-S-R) 培地に於ても、又卵斜面培地に於ても、液体部は Ringer 氏液のみにて、アメーバは良好な増殖を示して、液体部に蛋白質の添加を必要としなかつた。液体部に蛋白質を含む場合には滅菌が極めて困難であるため雑菌が混入する恐れが多く、その点

Ringer 氏液は培養に用いる 都度滅菌が出来て雑菌混入を防ぐ上に於いて極めて好都合である。R-S-R medium, 卵斜面培地, バラムス液体培地等にはアメーバと *Cl. welchii* は共によく共棲し得るのである。而してアメーバ増殖に必要な細菌の作用というものは、既に論じられている如くに、

1) 細菌の代謝物質, 又は細菌によつて生ずる培地の分解産物の影響。2) 細菌がそれ自体アメーバの栄養物となること。3) 細菌がアメーバの増殖に適當なる物理化学的狀態を絶えず維持する事等にて、特に第3の條件に関しては、Snyder, Meleney, Balamuth, Chang, 齊藤, 沢田, 等の述べた嫌気性環境と密接な関連にある培地の低い酸化還元電位と考えられている。又 Chinn は1種類の細菌随伴よりも嫌気性菌を伴つた2種以上の細菌の随伴した場合の方がアメーバの増殖が良好であると云い、且つ最もよく増殖せしめたものは *Leptotrichia bucalis* と *Cl. welchii* であつたと云つている。そして其の増殖の狀態は、アメーバが初めて現われる時から差異が見られ *Leptotrichia bucalis* と *Cl. welchii* を入れたものでは他を入れた場合よりも初めから多くのアメーバが見られると云つている。且つ *Cl. welchii* を随伴せしめた場合には、常に規則正しく Cyste の形成があつたと云つている。これに関して私も既述の各種培地に、*Cl. welchii* を随伴せしめてアメーバを培養したのであるが Cyste の規則正しい形成を経験する事は出来なかつた。これは他の随伴細菌の種類、使用したアメーバ株の性質の差異に基づくものと考える。又 Chang は培地の酸化還元電位に注目して嫌気性の条件下にて (*Cl. welchii* 使用) 醸成された条件を温存して、細菌の増殖を阻止した培地にてアメーバの培養に成功している。又齊藤は嫌気性菌特に *Cl. welchii* がアメーバの培養条件を満す細菌であることを示すと同時に、アメーバそれ自体が嫌気性環境に順應したものである事を示している。又他の観点からアメーバ培養随伴菌の中で好気性菌以上に嫌気性菌の機能的作用に注目する必要が生じて来る。

Bradin and Hansen (1950) は随伴菌と抗生物質並に抗アメーバ剤の試験管内の試験に於いて、アメーバの増殖と酸化還元電位との関係を論じている。即ちアメーバ生存に対する随伴細菌の組成の意義は完全には分つて居らず、併しその一つの要素として培養基の速やかな烈

しい還元が考えられると報じている。而して細菌の発育が阻止されるならば、培養基は空気の接触とアメーバの死によつて酸化されて来ると報じ、酸化は電位測定によつて決定される事が出来て以来アメーバの死は酸化還元電位が陰性から陽性に変化する事に関係していると云つている。

## 結 論

- 1) 赤痢アメーバの2種の株 吉村株, 小田株は之れに *Cl. welchii* を随伴せしめて培養した場合、良好なる増殖状態を示した。
- 2) *Cl. welchii* は赤痢アメーバの増殖を確実にして増殖率に常に好影響を興えている。
- 3) *Cl. welchii* はアメーバの増殖開始の時期とアメーバの生存期間に対して大なる影響を示していない。
- 4) *Cl. welchii* の影響によつて規則正しい Cyste の形成は認められなかつた。

稿を終るに臨み御指導御校閲下された松林教授に深く感謝の意を表する。

## 文 献

- 1) Balamuth, W. & Hauard, B. (1946): The growth cycle of population in a mixed bacterial flora. *Am. J. Trop. Med.*, **26**, 771~782
- 2) Bradin, J. L. & Hausen, E. L. (1950): Indirect in vitro action of antibiotics in comparison with activity of accepted amebicides. *Am. J. Trop. Med.* **30**, 27~41.
- 3) Chang, S. L. (1948) Experimental physiology of amebiasis. *Proc. 4th. Int. Cong. Trop. Med. and Malaria. Washington.* 1065~1074.
- 4) Chinn, B. D., Jacobs, L., Reardon, L. V. & Rees, C. W. (1942): The influence of the bacterial flora on the cultivation of the *Endamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med.* **22**, 137~146.
- 5) 畑上良造 (1938): 赤痢アメーバの随伴細菌に関する研究. *大阪医学会雑誌*, **37**, 2517.
- 6) 畑上良造 (1938): 赤痢アメーバの増殖を促進する物質に関する実験. *大阪医学会雑誌*, **37**, 2533.
- 7) 松林久吉 (1947): 赤痢アメーバ. 東西出版社, 東京.
- 8) 齋藤誠 (1950) 赤痢アメーバ培養に及ぼす細菌の影響. *北里実験医学*, **23**, 1.
- 9) 沢田利貞 (1950): 赤痢アメーバの培養に関する研究. *日本細菌学雑誌*, **5**, 413~435
- 10) Snyder, J. L. & Meleney, H. E. (1943): Anaerobiosis and cholesterol as growth requirement of *Endamoeba histolytica*. *J. Parasit.* **29** 278~284.