

# Entamoeba gingivalis の生存に対する 随伴細菌死菌体の影響

鈴木 啓之

慶応義塾大学医学部寄生虫学教室 (主任 松林久吉教授)

(昭和31年12月27日受領)

人体に寄生するアメーバとその随伴細菌との関係は、従来より研究されてをりアメーバの培養に際し随伴細菌群が、アメーバの増殖に必要な条件を維持することは、すでに多数の研究者に依つて明らかにされている事である。即ち培地内に於けるアメーバの増殖は、アメーバ、随伴細菌、培地自体の3者の相互関係に依り成立するので之等の主要条件を探究することにより、困難とされているアメーバの無菌培養の基礎が一段階づゝ進められて来ているのである。その進歩のうちで特に著しいものは Preconditioned medium の考案であり、これで随伴細菌の發育を阻止した状態でアメーバの培養に成功し、更に単一菌種の随伴でもアメーバの培養に成功した事は、Jacobs (1947), Shaffer (1948), 斎藤(1951), 能勢(1951)等により報告されているが、それ等は総て生菌に於ける関係であり、菌体自身が栄養素として役立つということも考えられるが、それ以上に細菌の代謝産物及び培地の物理化学的条件を好適にすると云う様な複雑な要素が重要な役割をしている事が想像される。以上の要素のうち細菌菌体自身の影響については Anderson (1952) が研究し、赤痢アメーバの生存に対しその随伴細菌の加熱死菌体が良好な影響を与えたことを報告している。

私も歯齦アメーバに於て、随伴細菌の死菌体を使用して、それがアメーバの生存の状態に好影響を与えることを知つた。又実験に使用した抗生物質 Colistin の歯齦アメーバに及ぼす影響についても観察を行つたので茲に報告する。

## 実験材料と方法

実験に使用した歯齦アメーバは Dobell-Laidlaw 培地に長期間継代培養しているS株であり、それは3種類の

随伴細菌を含んでいるものである。その同定は東京歯科大学微生物学教室に依頼した結果、*Aerobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus epidermidis* と決定した。その生物学的性質の詳細は第1表に示した。

第1表 *Entamoeba gingivalis* (S株)  
随伴細菌の同定

細菌種	<i>A. aerogenes</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M. epidermidis</i>
同定試験			
Gram 染色, 形態	G (-), 桿菌	G (+), 有芽胞大桿菌	G (+), 球菌時に双球
寒天平板に於ける Colony 形態	中等大 smooth	襲の有る拡大性發育	中等大 smooth
血液平板	非溶血性 (γ)	完全溶血 (β)	溶血稍弱 (β')
Bouillon.	強い混濁菌膜有り	清澄, 表面に厚い菌膜	強い混濁菌膜有り
Indol.	-	-	-
Methyl-red.	-	-	-
Voges-Proskauer	±	±	±
Citrate.	干	-	-
Katalase.	+	+	-
牛乳酸凝	+	+	+
硝酸塩	+	+	+
Gelatin	-	+	-

備考  
G (-), 固有 G (+) 大桿菌 M. *epidermidis* の性状を有しているが Katalase (-) という点で疑義を残す  
運動, Invic- 特異な集落, 及び Bouillon の液に厚い菌膜を作る点で A. *aerogenes* と同定  
とより, B. *subtilis* と同定

それ等の細菌を個別に寒天斜面培地に純培養として保存し、実験を行うにあたりそれぞれ寒天平板培地に通法の如く塗抹し、37°C, 24時間培養して増菌し、その集落を集めて実験に使用した。

KEISHI SUZUKI: Effects of heat-killed bacterial cells upon the survival of *Entamoeba gingivalis*. (Department of Parasitology, School of Medicine, Keio University, Tokyo).

実験に使用した基本培地は Dobell-Laidlaw 培地で直径 1.5 cm, 長さ約 12 cm の試験管に約 1.5 cc の滅菌健馬血清を入れ, 血清凝固器で 80°C 約 40 分加熱し斜面に凝固したものを固形部とし, 液体部は滅菌馬血清 1 に対し, リンゲル氏液 8 の割合のものを全量が 5 cc となる様に重層したものである。

実験方法としては, 上記の純培養した 3 種の随伴細菌を各々 1 白金杓量 (約 15 mg) 宛一緒に 3 cc のリンゲル氏液中に混入したもの (混合細菌種), 又は一種類の随伴細菌を 3 白金杓量を混入したもの (単一菌種) をそれぞれ 120°C, 15 ポンド, 約 20 分間高圧滅菌し, その液が冷却したら 1:8 の割合になる様に無菌馬血清を加え, 更に液体部 1 cc 中 penicillin 5,000 u, colistin 5,000 u の濃度に抗生物質を加えた。

又他の実験では, アセトン, ドライアイスを使用して 3 種混合した随伴細菌の凍結融解を行ひ, その液を細菌濾過器で濾過し, 菌体を含まないその濾液を使用した。

対照としては, Dobell-Laidlaw 培地に死菌体を加えず, 実験群と同濃度の抗生物質を加え, 全体の液体部が 5 cc となる様にしたものを使用した。又総ての実験に於て通法の如く滅菌米粉を加えた。

斯様に調製された実験群並びに対照群に対し S 株の最増殖時の菌数アメーバ (培養後 48~72 時間経過したもの) を集めて, それを 37°C に保温した培地の液体部と同様の液で 1,000 回転, 約 1 分間で 2 回遠心沈澱器で洗滌し, その沈澱を良く混和して, それぞれの培地に 0.3 cc 宛移植し, 総ての培地にアメーバが均等に移植される様に特に注意した。

斯の如くすればアメーバと共に移植された随伴細菌は, 抗生物質の作用により増殖を抑制されアメーバのみが生存し, 対照と比較してアメーバの生存状態一つの培地で日時を追つて観察し, 両者間のアメーバ生存日数及び虫体の生活状態により, 加えた死菌体又は菌体融解物質の影響を検討しようとした次第である。(但し継代培養は行わず)。

又培地内にアメーバと共に移入された共棲菌が完全に増殖を抑制されたか否かを調べる目的で, 3 日経過した実験群及び対照群の培地底部の液を, 約 0.2 cc 宛チオグリコール酸培地に移植して約 1 週間細菌の発育の有無を観察した。

又随伴細菌を抑制する為に penicillin, colistin の両者を併用した理由は, 実験に使用した S 株の共棲細菌が私の以前に行つた実験で streptomycin に抵抗性を有

し, penicillin と streptomycin の併用では細菌の発育を阻止することが出来ないのので, 特にグラム陰性菌に作用する colistin に注目し, penicillin と併用した。之によつて共棲細菌の発育を阻止し, 且つアメーバに対し影響を与え無い colistin の濃度を確める事が出来たので予備実験としてそれを以下に記述する。

実験成績

〔予備実験〕

colistin の菌数アメーバに及ぼす影響

実験に使用した菌数アメーバ S 株の随伴細菌は, 前述の様に penicillin と streptomycin との併用では細菌の発育を阻止する事が出来ないのので, penicillin と colistin を併用することにした。

先ず colistin の適当な濃度を知る為に, colistin の各濃度に於ける培地中のアメーバの生存状態を観察し, 次に penicillin と併用してアメーバの随伴細菌の発育を阻止し, 且つアメーバに対し影響の少い濃度を確立する事が出来たのである。

a. colistin の各濃度に於ける菌数アメーバの影響

実験に使用した菌数アメーバは上記と同様の S 株で Dobell-Laidlaw 培地に長期間継代培養しているものである。又実験培地も Dobell-Laidlaw 培地で液体部を 5 cc とし, 液体部 1 cc 中に含まれる colistin の濃度を夫々 100,000 u, 50,000 u, 25,000 u, 10,000 u, 5,000 u, 25.00 u, 1,000 u の 7 段階とし, 更に colistin を含ま

第 2 表 colistin の各濃度に於ける

*E. gingivalis* の影響

日 数	fer cc. 濃度 万単位							
	10	5	2.5	1	0.5	0.25	0.1	対照
1	—	—	±	+	+	+	+	+
2	—	—	±	±	+	+	++	++
3	—	—	—	±	+	+	+++	+++
4	—	—	—	—	±	++	+++	+++
5	—	—	—	—	±	+++	+++	++
6	—	—	—	—	—	+++	++	++
7	—	—	—	—	—	++	+	±

ない Dobell-Laidlaw 培地を対照としてアメーバを均等にそれ等の培地に移植し, アメーバの増殖状況を観察した。その成績は第 2 表に示してある。

即ち 20 回の実験成績の結果は, 1 cc 中 100,000 単位の colistin を混入した培地では, 総ての実験群に於てアメーバの存在は認められず, 24 時間経過した培地

中でアメーバは変性壊死し、生存虫体はその後の経過に於ても全然認められなかつた。

1 cc 中 50,000 単位培地では、100,000 単位のそれと同様な状態でアメーバの生存は認められなかつた。

1 cc 中 25,000 単位混入培地では、実験群の大部分に於て 24~48 時間頃までは弱拡大視野中に 1~2 の球状を呈した未だ生存していると思われる虫体が認められたが、それ以上の経過ではアメーバの生存も認めず、又増殖して来るものは無かつた。

1 cc 中 10,000 単位混入培地では、25,000 単位混入の実験よりも、稍々アメーバの生存状況は好い様に見えるが、球状となつた虫体が少数 3 日目頃まで認められたが、その後には生存虫体は認められなかつた。

1 cc 中 5,000 単位混入した培地では、総てに於て少数ではあるが生存虫体が 4~5 日目頃まで認められており、又その後の経過中 20 例中 13 例はアメーバは死滅したが、残りの 7 例に於ては 4, 5 日目頃より虫体が運動を示し、以後少数ではあつたがアメーバの増殖が行われ 10 日を経ても依然として虫体が生存しているのが認められた。

1 cc 中 2,500 単位混入培地では、総てのアメーバの増殖が認められ対照と比較して、アメーバの増殖期の遅延があり、即ち対照では 2~3 日目頃より増殖して来るが、この実験群では 4~5 日目より増殖して来る状態であつた。

又 1 cc 中 1,000 単位混入培地では、アメーバは対照よりも稍々増殖の延長を示しているが、その發育の状態は対照と大差ない。

次に各濃度に於ける培地中に發育して来た細菌を寒天平板培地に増菌してからグラム染色を行い、グラム陰性菌の状態を観察してみると 100,000 u, 50,000 u,

25,000 u, 10,000 u の colistin 混入した培地では、総てグラム陰性菌は認められず陽性菌のみの發育があつたが、その陽性菌でも colistin の高濃度になるに従つて發育が少ないことが、平板培地の細菌の集落の状態と培地液体部の混濁状態で認められた。然しながら 5,000 u colistin 混入培地では、大体に於てグラム陰性菌を阻止した状態でアメーバの生存時間が一番長かつた。併し中にはグラム陰性菌が増殖して来るものもあつた。又アメーバが単に生存したと云うだけでなく明らかに増殖を示したものでは、総てグラム陰性、陽性両菌とも發育していた。1 cc 中 2,500, 1,000 単位混入したものでは、アメーバも増殖を示す代りに、随伴細菌のグラム陰性菌も阻止することが出来なかつた。

以上の成績により 1 cc 中 5,000 u の colistin を混入した培地が、グラム陰性菌の發育を阻止し、且つアメーバに強い作用を与える事がないので之を penicillin と併用して完全に S 株の随伴細菌を阻止出来るかどうかを次の実験で行つた。

b. colistin と penicillin 併用に於ける菌叢アメーバとその随伴細菌の状況

この実験では、penicillin の濃度は 1 cc 中 5,000 u と定めておき、それに併用する colistin の濃度をそれぞれ 1 cc につき 10,000 u, 5,000 u, 2,500 u, 1,000 u の 4 段階とした。又一方 penicillin と streptomycin とを併用した実験も行い、之も上記と同様に penicillin の濃度は 1 cc 中 5,000 u で、streptomycin の濃度をそれぞれ 20 mg, 10 mg, 5 mg, 2.5 mg とし、兩者共に S 株の菌叢アメーバを均等になる様特に注意して移植した。そして日時を追つてアメーバの状況を観察すると同時に、移植後 3 日目に 0.2 cc の液体部をチオグリコレート無菌試験培地に移植して、細菌の發育の有無を検査した。

第 3 表 penicillin, colistin と penicillin, streptomycin の併用に於ける菌叢アメーバ及び随伴細菌の發育状況

抗生物質 液体部 1 cc 中 濃度	penicillin 5,000 u							
	colistin				streptomycin			
	10,000 u	5,000 u	2,500 u	1,000 u	20 mg	10 mg	5 mg	2.5 mg
アメーバ 生存日数								
1	±	+	+	++	+	+	++	++
2	±	±	+	+	±	+	+	++
3	-	-	±	+	-	+	+	++
4	-	-	-	+	-	±	+	++
5	-	-	-	±	-	±	+	+
細菌發育	(-)	(-)	(±)	(+)	(干)	(±)	(+)	(+)

実験 10 例に於ける総合的な成績は第 3 表に示してある。

以上の実験成績より penicillin と colistin とを併用した培地では、colistin の濃度が培地液体部 1 cc 中 10,000 u, 5,000 u の両者では、総ての実験群に於て随伴細菌の発育は阻止され、アメーバの生存状況は 2 日目頃までは球状に変性した極く少数の虫体が認められた。2,500 u のものでは、細菌の発育を完全に阻止出来ないものもあつた。即ち 10 例中 4 例に於ては無菌試験培地に軽度の混濁が 3~4 日目頃より現われた。又 1,000 u の colistin の培地では全例に於て細菌の発育が認められ、この濃度では随伴細菌の発育を阻止する事が出来なかつた。

次に penicillin と streptomycin との併用では、上記の表の如く相当大量に streptomycin を混入しても、総ての実験例に於てその随伴細菌の発育を阻止する事が出来ず、液体部 1 cc 中 20 mg を混入したのもでも 10 例中 3 例に於て、無菌培地が約 1 週間頃より混濁を示した。又それ以下の濃度では全く随伴細菌を抑制出来ず、アメーバも長期間の生存を認め、それには随伴細菌の軽度な増殖による影響とも考えられるので、本実験に際し正確な価を得る事は疑問と思ひ、penicillin と streptomycin との併用はさげ、penicillin と colistin 両者を併用することにした。

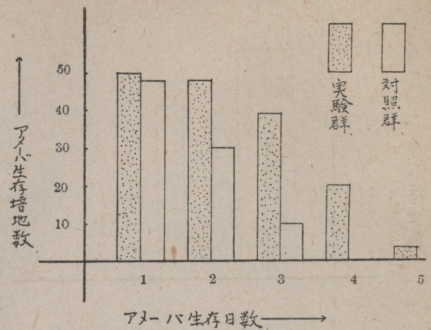
以上の実験成績より培地液体部 1 cc 中に、colistin 及び penicillin を夫々 5,000 u を使用した場合には、S 株の随伴細菌の発育を阻止し、歯齶アメーバに対する影響も少い事が分つたので、本実験に上記の濃度を使用する事とした。

〔本 実 験〕

1. 3 種混合随伴細菌死菌体の影響

純培養した S 株の 3 種随伴細菌体を、それぞれ 1 白金樹量宛混合し、それを高圧滅菌して死菌体として、それを混入した実験培地と、死菌体を含まない培地即ち対照とに、アメーバを移植して、そのアメーバの生存状況及び生存日数を両者比較観察した。実験及び対照例夫々 50 例に於けるアメーバ生存培地数と生存日数との関係は第 1 図に示してある。

即ち死菌体を加えた実験群に於ては、50 例中大部分のものは 1~2 日目までアメーバは生存しており、3 日目に於ては 50 例中 39 例で、それ以後アメーバの生存培地は少くなり、5 日目まで生存していたものは 4 例でそれ以後アメーバの生存は認められなかつた。



第 1 図 3 種混合死菌体加培地と対照とに於けるアメーバ生存培地数と生存日数との関係 (各々 50 例)

これに対し対照例では、1 日目までは大部分アメーバは生存していたが、2 日目よりは少なくなつて行き 3 日目には 50 例中 8 例だけ生存しており、それ以後生存しているものはなかつた。

次に実験群と対照とに於ける培地中のアメーバ生活状況を観察してみると、死菌体を加えた方が対照よりも生存虫体数も多く、1~2 日目頃は 1 視野 (10×10) に 2~5 の主として球状となつた虫体を認め、中には少数ではあるが運動虫体も認められた。対照では 24 時間後にはすでに数視野に 1~2 の状態で数も少く、生存していても総て球状となり運動している虫体は皆無であつた。死菌体を加えた実験群でも 3 日目になると虫体数も少く、球状を呈し運動虫体は全然認められなかつた。4 日、5 日目には全視野に 2~3 の球状の虫体が生存していた状態である。

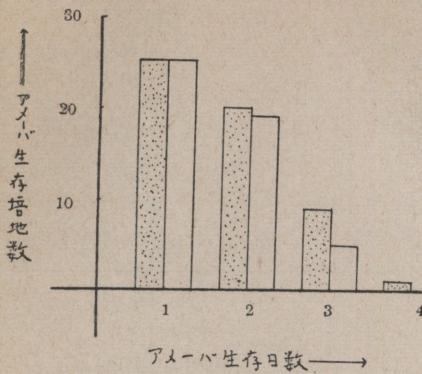
又実験群に於ける培地中のアメーバ平均生存日数は 3.2 日で、之に対し対照群の平均生存日数は 1.75 日である。両者間の生存日数の差は 1.45 日となり之は両者間に有意義の差を認め、3 種混合細菌の死菌体を加えた方が、歯齶アメーバの生存を延長せしめる事を認めた。

II. 3 種随伴細菌体分解物質濃液の影響

上記の実験では、細菌体自身を加え歯齶アメーバの生存に良い影響を及ぼす事が明らかとなつたので、次に菌体を加えず菌体融解物質が、アメーバにどのような影響を与えるかを確める為に、アセトン、ドライアイスを使用して随伴細菌の凍結融解液を作り、それを細菌濾過器で濾過し、その濃液を使用した。

実験群に対し添加した抗生物質の濃度、及び移植、観察の状態は上記と同様である、

実験例及び対照例夫々 25 に於けるアメーバの生存日



第2図 3種随伴細菌分解物質加培地と対照に於けるアメーバ生存培地数と生存日数との関係 (各々25例)

数と生存培地数との関係は第2図に示してある。

即ち実験例25例に於て1日目までは総ての例に少数なアメーバが生存していたが、2日目よりアメーバの生存培地数は少くなり、3日目には25例中10例、4日目まで生存していたものは2例しかなかった。これに対し対照例では1日目までは総てアメーバが生存していたが2日目より少くなり、一番長く生存していたのは3日目までで25例中4例であつた。

又両者に於けるアメーバの生存状況は、実験群に於ては1日目よりアメーバの数は少く球状を呈し、運動虫体は全然認められず、数視野(10×10)に2~3の生存虫体が認められ、此の状態は対照の1日目の培地中の生存しているアメーバと大差なく、僅かに実験群の方で虫体数が多いと思われる程で、以後の時間の経過と共に、両者の生存虫体数は減少して行つたが、実験群の方が稍々生存虫体が長く残つている様に思われた。

次に両者に於けるアメーバ平均生存日数は、実験群では2.45日、対照では1.92日で両者の生存日数差0.53日は有意の差とは認められなかつた。然しながら対照のアメーバよりは悪いことは無く、濾液の中にも極く少いけれども良好な物質の存在は認められると思われる。しかし此の細菌体物質の濾液を加えたものと、上記の死菌体を加えたものとを比較すると、アメーバの生存日数の延長、虫体の数及び生活状態より、明瞭に細菌体を加えた方が良好である事が認められた。

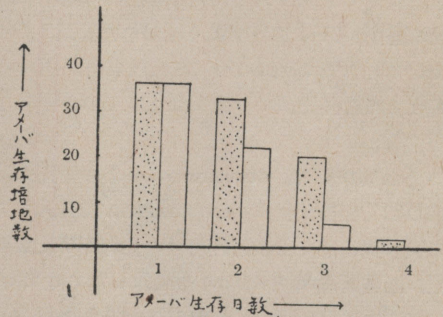
### III. 単一随伴細菌死菌体の影響

以上の実験成績より、3種混合細菌死菌体の影響が良好な事が明らかとなつたので、次にS株の随伴細菌である *A. aerogenes*, *B. subtilis*, *M. epidermidis* の3種を

それぞれ1種類宛3白金樹量高圧滅菌し、それを加えて如何なる死菌体がアメーバの生存に良好な影響を与えるかを検討した。

#### 1) *Aerobacter aerogenes* 死菌体の影響

*A. aerogenes* を高圧滅菌し、死菌体として加えた実験に於ける歯齶アメーバの生存培地数と、生存日数との関係は第3図に示してある。



第3図 *A. aerogenes* 死菌体加培地と対照に於けるアメーバ生存培地数と生存日数との関係 (各々36例)

実験群に於けるアメーバ生存培地数の状態は、1~2日目までは生存虫体を認められた培地が大部分で、3日目に於て36例中20例の生存培地があり、4日目には急に少なくなり2例のみ生存虫体の存在している培地があつた。これに対し対照では、前の実験例と大差なく生存虫体培地数は2日目には36例中22例、3日目には3例となり4日目まで生存しているものは無かつた。

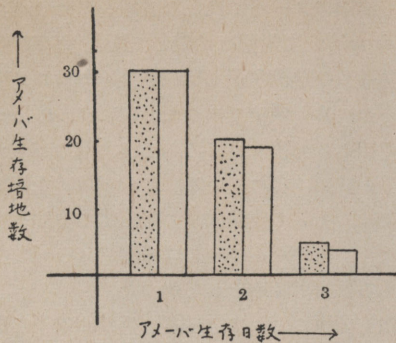
又実験群と対照とのアメーバの生活状態を観察してみると、実験群では1~2日目までは弱拡大(10×10)で1視野中1~3の生存虫体を認め、極く少数ではあるが運動虫体も認められた。それ以後はアメーバは総て球状を呈し、数も少く4日目まで生存していた虫体は少数で変性一步前の状態を呈していた。之に対し対照に於けるアメーバは、前記の実験の状態と同様で、1~2日目より球状を呈し、数も少く、実験群よりも不良であつた。

次に両者に於けるアメーバ平均生存日数は、実験例では2.56日、対照例では1.69日で両者の生存日数の差は0.87日であり、この差は有意義であり、*A. aerogenes* の死菌体は歯齶アメーバに良好な影響を与えた。

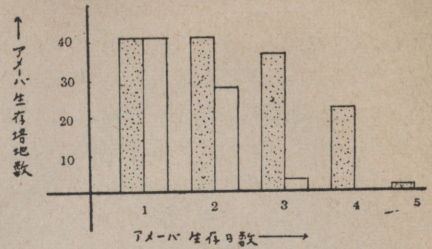
#### 2) *Bacillus subtilis* 死菌体の影響

此の死菌体の歯齶アメーバに及ぼす影響は、第4図に示してある。

此の死菌体を加えた実験例と対照夫々30例に於ける



第 4 図 B. subtilis 死菌体加培地と対照とに於けるアメーバ生存培地数と生存日数との関係 (各々 80 例)



第 5 図 M. epidermidis 死菌体加培地と対照とに於けるアメーバ生存培地数と生存日数との関係 (各々 41 例)

アメーバ生存培地数と生存日数との関係は、実験及び対照とも大差なく、即ち 1 日目までは両者共に総ての培地に生存アメーバを認めたと、2 日目には実験例 10 例、対照 13 例の培地中にアメーバが認められず、3 日目にはそれぞれ 4 例、2 例のアメーバ生存培地が認められたにすぎなかつた。

又培地中に於けるアメーバの生活状態を見るに実験群も対照群も 24 時間後には虫体数は少数となり球状を呈し、変性像が多く、此の死菌体を加えたのでは対照と比較してアメーバの生存に好影響を与えると云う所見は得られなかつた。

次にアメーバの平均生存日数は、実験群では 1.80 日、対照では 1.63 日で両者の生存日数差 0.17 日は有意の差と認められない。以上の事柄より B. subtilis の死菌体は菌齶アメーバの生存に対して認むべき影響を示さないことが判明した。

3) Micrococcus epidermidis 死菌体の影響

この細菌の死菌体は、他の 2 種 A. aerogenes, B. subtilis の死菌体よりも菌齶アメーバに対する影響が良好な成績を示したものである。実験及び対照夫々 41 例に於ける菌齶アメーバの生存日数と生存培地数との関係は第 5 図に示してある。

即ち此の死菌体を加えた実験 41 例に於ては、1, 2 日目までは総ての培地中にアメーバは生存しており、3 日目に於ては生存培地数は 37 例となり、4 日目には 24 例、5 日目 1 例となり比較的アメーバは長く生存をしていた。之に対し対照では上記の実験の対照例と大差なく、1 日目は総て少数のアメーバが認められたが、2 日目より生存培地数は少くなり、3 日目まで生存していた

ものは僅か 2 例にすぎなかつた。

又培地中に於けるアメーバの生存状況も、対照と比較して明らかに良好で、1~2 日目までは 1 視野中 (10x10) に 3~5 位の生存アメーバを認め、なかには運動している虫体も少数ではあるが認められた。3 日目頃よりアメーバの数も少くなり球状を呈し、4 日目には少数の球状の変性しかゝつたアメーバの存在を認め、5 日目までは 1 例のみアメーバの存在を認めたと、それは全視野に 2 つだけの変性した球状のアメーバである。

対照では、前の実験に於ける対照例と大体と同様で、アメーバの数も少く球状を呈し、此の死菌体を加えたものよりも遙かにアメーバの状態は不良である。

次に実験群と対照とに於けるアメーバの平均生存日数は、実験群では 3.44 日で、対照では 1.73 日である。そして両者の生存日数の差は 1.71 日で有意の差を認めた。

考 按

アメーバに随伴する細菌自体の栄養素としての役割に關しては、Shaffer (1948), Balamuth (1951) 等により報告されているが、熱処理した死菌体を加えてその影響を検討しているのは、Rees (1941) で、彼は赤痢アメーバに於て streptococcus NIH 563 の死菌体を使用してアメーバの發育を認めたと、対照と大差ないと報告している。Anderson (1952) は赤痢アメーバの生存に対し死菌体の影響を更に詳細に観察し、死菌体中にアメーバを生存せしめる要素があり、細菌培養の滲液、乾燥細菌の種々な薬物の抽出物中には、その要素を証明することは出来なかつたと報告している。沢田 (1950, 1953) は、培養赤痢アメーバに於て、大腸菌に属する株 13 株、連鎖球菌属 11 株、葡萄球菌属 2 株、赤痢菌属 10 株、B. mycoides 変異株 1 株を使用して、それを生菌として各

々田辺千葉培地に加え、アメーバを移植してアメーバの随伴細菌の発育を阻止しないで観察を行つたが、総てアメーバの発育に良好な成績を示し、次に特別に良かった *B. mycoides*, 葡萄球菌 209 株寺島株、連鎖球菌を夫々加熱死菌体 (80°C 40 分) 及び凍結融解物質として石井久津見培地に混入し、継代培養した所、血清を含んでいる田辺千葉培地と同様な成績を得たと報告し、生菌としてアメーバの発育に良い影響を及ぼす細菌は、死菌体及び融解物質としても良好であると言っている。又当教室の篠原は、口腔トリコモナス及び腸トリコモナスの随伴細菌死菌体の影響を研究し、極く軽度な良い影響を示したと報告している。

そこで私の上記の実験より歯齦アメーバの随伴細菌死菌体の影響を検討してみると、それは Anderson の研究と同様な成績を得た。即ち歯齦アメーバの随伴細菌熱処理死菌体が、アメーバの生存に対し、良好な影響を与へ、その死菌体中にアメーバを対照よりも長く生存せしめる要素の存在することが認められた。然しながらその死菌体を加えた培地に於て、アメーバが増殖して行くことは全く無く、対照と比較してアメーバの生存時間の延長、生存虫体数、運動の状態は良好であるが、これだけの培地で継代培養を試みても恐らく不可能であろう。

次に随伴細菌の凍結融解した物質の濾過液を使用して、菌体を含まないもので実験した成績では、以前に Rees (1941) が、*Escherichia coli communis* NIH 413 と *streptococcus* NIH 563 の種々の凍結融解の無菌濾液を添加して実験したが失敗したと報告している。

私も随伴細菌の凍結融解の濾液を使用して実験を行つたが、その成績は対照よりも僅かに良いと思われるが、培地中に於けるアメーバの状態は虫体数も少く、運動している虫体は殆んど認められず、総て球状を呈しており単に対照より生存日数が少し延長する程度で、死菌体を加えたものと比較すると明らかに培地中のアメーバの状態が悪いのである。この事はアメーバが細菌を摂取する事に深い意義があり、菌体を含んでいないものの方がアメーバの生存に良好な影響を与えることが少いと云う成績は Anderson の成績と一致している。即ち菌体を入れた場合のみにアメーバはよく増殖し、菌体の抽出物を加えたのではアメーバは良く増殖しなかつたと云う結果と同様である。

次に随伴細菌の単一菌即ち、*A. aerogenes*, *B. subtilis*, *M. epidermidis* の各々を死菌体として加えた実験を行つたが、その成績は各種の菌体により異なつた成績を示し

た。最も歯齦アメーバに良好な成績を示したものは、*M. epidermidis* で対照と比較して総て生存時間が延長し、虫体数及び運動状況も比較的良く、他の2種の菌体より明らかに良い成績であつた。次には *A. aerogenes* で之は対照よりも稍々良好であるが、*M. epidermidis* と比較すると成績は劣つている。*B. subtilis* を死菌体としたものでは、上記の実験成績に示してある如く対照と全く差はなく、その死菌体中には歯齦アメーバの生存を延長せしめる要素が認められなかつた。

斯の如く菌種によりアメーバの生存に対する影響が異なるのは、死菌体だけとは限らず生菌体に於ても、随伴細菌の単一菌の種類でアメーバの発育の異なることを、Balamuth (1951), Shaffer (1949), 斎藤 (1951), 能勢 (1954) 等が報告している。そこで死菌体として良好な影響を及ぼす随伴細菌が、生菌体として使用した場合に良好であるかということは、必ずしも簡単に定めることは出来ない。それは生菌体の場合には菌体自身の栄養のみでなく、その代謝産物、培地との関係等複雑な要素があり、その良好な死菌体が生菌の時に其等の諸条件を総て満足する事が出来るか否かという事が問題点である。それ等の条件を十分に満足する作用をしなければ、いかに死菌体として作用が良好でも、生菌の場合にはアメーバの発育は維持されないとされる。然しながら沢田 (1950, 1953) は、アメーバの発育に生菌として良好な成績を示した菌種は、死菌体及び凍結融解物質としても良好であつたと報告しているが、それはアメーバの随伴細菌の発育を完全に阻止した状態で行つた実験成績ではないので、その随伴細菌の影響のことも相当大きな問題として取上げねばならないと思われる。

又死菌体として良好であつた *M. epidermidis*, *A. aerogenes* の2者を培地に混入した場合、培地の液体部は均等に混濁したが、*B. subtilis* の場合には混入した死菌体が培地の底部に密に沈澱し上層部の液体部は透明となつていた。

この事柄は両者死菌体の影響の差を説明する1つの要素となるのではなからうか。

## 結 論

私は *A. aerogenes*, *B. subtilis*, *M. epidermidis* の3種を随伴細菌として培地培養した歯齦アメーバS株に、それら随伴細菌を熱処理死菌体とした後に混入し、アメーバの生存状況を観察すると共に、colistin の歯齦アメーバに及ぼす影響をも検討した。

1. colistin の菌齧アメーバに対する影響は、高濃度では amoebicidal に作用し、低濃度では、アメーバ増殖期の遅延及び生存の延長を認め、アメーバに影響を及ぼさなかつた。

2. 培地液体部 1 cc 中に colistin 5,000 u, penicillin 5,000 u の混入で S 株の随伴細菌の発育を阻止し得た。

3. 3 種混合随伴細菌死菌体の菌齧アメーバに及ぼす影響は、比較的良好で実験群の平均生存日数は 3.2 日で、対照 1.75 日より良く、両者の生存日数の差は有意義と認められた。

4. 3 種混合随伴細菌の凍結融解した無菌濾液は、菌齧アメーバの生存日数を延長せしめる点で、死菌体よりもその作用は劣っているが、対照に比較すればなお軽度ながらその作用が認められた。

5. 単一随伴細菌死菌体の菌齧アメーバの生存に及ぼす影響を検討した。

その結果 *M. epidermidis* が最も良好でアメーバの平均生存日数は 3.44 日であり、*A. aerogenes* の死菌体が之に次ぎ平均生存日数 2.56 日で両者共に対照とに於けるアメーバの生存日数の差は有意義と認められた。*B. subtilis* の死菌体の影響は、菌齧アメーバに対し全然影響が認められず、対照に於けるアメーバの生活状況と大差なかつた。

御指導、御校閲を賜つた松林教授、浅見助教授に深く感謝すると共に、細菌学方面の研究に御援助を賜つた東京歯科大学微生物学教室米沢教授、森山講師に謝意を表する。

## 文 献

1) Balamuth, W., Wieboldt, M. L. (1951): Comparative growth cycle of *E. histolytica* with different combination of bacteria. *Am. J. Trop. Med.*, 31, 192-205, —2) Bergey, D. H. (1939): *Manual of determinative Bacteriology*. The William & Wilkins Company., Baltimore. —3) Jacobs, L. (1947): The elimination of viable bacteria from culture of *E. histolytica* and subsequent maintenance of such cultures. *Am. J. Hyg.*, 46, 127-176, —4) Korlsson, J. L., James, M. B. and Anderson, H. H. (1952): Studies on nutritional principles for *E. histolytica* in autoclaved bacterial cell. *Exp. Parasit.*, 1, 347-352, —5) 松林久吉 (1947): 赤痢アメーバ, 東西弘版社, —6) 松林久吉 (1947): 原虫性腸疾患, 学術書院, —7) 森政和 (1955): 口腔原虫について, 口腔細菌学の進歩, 永末書店, 157-179, —8) 能勢好夫 (1954): 二核

アメーバの培養に及ぼす影響, 4. 単一細菌ならびに種々の細菌の実験的菌群構成によるアメーバの培養, *日新医学*, 41: 425-434, —9) Rees, C. W., Reardon, L. V., Jacobs, L., and Jones, F. (1941): Problems encountered in *E. histolytica* in cultures developed by microisolation. *Am. J. Trop. Med.*, 21, 567-578, —10) Saito, M. (1951): On the influence of bacterial flora upon the excystation and subsequent multiplication of *E. histolytica* in culture media. *Kitasato Arch. Exp. Med.*, 24, 87-96, —11) Saito, M. (1953): Cultivation of *E. histolytica* without actively growing bacteria. 1. Cultivation in the preconditioned medium added with antibiotics. *Kitasato Arch. Exp. Med.*, 25, 245-252, —12) 沢田利貞 (1950): 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発育に及ぼす影響, *日本細菌学雑誌*, 5 (6), 421-424, —13) 沢田利貞・瀬田忠一 (1950): 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), *日本細菌学雑誌*, 5 (6), 425-428, —14) 沢田利貞・瀬田忠一 (1950): 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 (II), *日本細菌学雑誌*, 5 (6), 426-431, —15) Sawada, T., Suzuki, I. & Oka, T. (1953): Bacterial cell components as a substitute for serum in the culture medium for *E. histolytica*. *The Gunma, J. Med. Sciences.*, II, 2, —16) Shaffer, J. G., and Frye, W. W. (1948): Studies on the growth requirements of *E. histolytica* 1. Maintenance of a strain of *E. histolytica* through out 100 transplant in the absence of an actively multiplying bacterial flora. *Am. J. Hyg.*, 47, 214-221, —17) Shaffer, J. G., Ryden, F. W., and Frye, W. W. (1948): Studies on the growth requirements of *E. histolytica*. III The growth and multiplication of two strains of *E. histolytica* in a transparent medium without the addition of rice flour or other particulate matter and without demonstrable bacterial growth. *Am. J. Hyg.*, 47, 345-350, —18) Shaffer, J. G., Ryden, F. W. (1949): Studies on the growth requirements of *E. histolytica*. IV. Further Observations on the cultivation of *E. histolytica* and other intestinal protozoa in a clear medium without demonstrable bacterial multiplication. Some modifications and simplifications of the medium. *Am. J. Hyg.*, 49, 127-133, —19) 篠原隆 (1956): *T. elongata* と *T. hominis* の生存に対する随伴細菌死菌体の影響, 第 25 回日本寄生虫学会総会発表. —20) Spingarm, C., Edelman, M. (1948): The use of streptomycin in the cultivation of *E. histolytica* from stools. *Am.*



J. Trop. Med., 28, —21) 鈴木啓之(1954): *E. gingivalis* の培養に就いて, 歯科学報, 54, 100-104, —22) 米沢和一(1952): 口腔細菌学, 永末書店,

### Summary

An experiment was carried out to elucidate the utility of bacterial cells as a food of *Entamoeba gingivalis in vitro*. The living bacteria are indispensable for the growth of *E. gingivalis in vitro*. They seem to provide food and some physico-chemical conditions favourable for the amoebae. In the present study, several species of heat killed bacteria were suspended in a sterile culture medium in which *Entamoeba gingivalis* were inoculated. Before the inoculation, amoebae were washed repeatedly by centrifugation to get rid as much of the associated bacteria as possible. Antibiotics (penicillin and colistin) were added in an amount which was sufficient to stop the growth of bacteria introduced with amoebae, but not harmful for the survival of the amoebae.

Three species of bacteria were used in this experiment: *Aerobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis* and *Micrococcus epidermidis*. These bacterial species were added separately or together to the medium. Bacterial substance freed from bacterial cell by freezing and melting method was also examined instead of bacterial cells. Control experiment was always carried out with the same medium without the addition of bacterial cells or substance. In these media, amoebae do not

multiply as the bacteria do not grow. The days of survival of amoebae were observed in test and control experiments and the effects of bacteria were estimated.

In control experiment, amoebae survived in only 8 out of 50 tubes after 3 days and none remained alive after 4 days. In tubes containing three species of bacteria amoebae survived much longer: in 39 tubes after 3 days and in 4 tubes after 5 days among 50 tubes examined. None remained alive after 6 days. Number of living amoebae in experimental tubes was much larger than in control tubes in every day of the examination.

In tubes containing lysed substances of the three species of bacteria, amoebae were likely to live a little longer than in control tubes. But the difference was not significant.

When each of the bacterial species suspended separately into the medium, *Micrococcus epidermidis* exerted the most favourable influence upon the survival of the amoebae. With this species of bacteria amoebae survived in 37 out of 41 tubes after 3 days, in 24 tubes after 4 days and in 1 tube after 5 days. With *Aerobacter aerogenes*, amoebae survived in 20 out of 39 tubes after 3 days and in only 2 tubes after 4 days. With *Bacillus subtilis*, amoebae survived in only 2 out of 30 tubes after 3 days and disappeared in all tubes on the next day. Therefore, *B. subtilis* were likely to have had no favourable effect upon the survival of the amoebae.