

Trichomonas hominis の無菌培養に於ける Carbamisin 及び *Escherichia coli* の影響

大 村 洸

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32年9月4日受領)

緒 言

Trichomonas hominis に対して薬物並びに細菌が如何なる影響を及ぼすかについては、現在までに数多くの実験的報告がなされている。即ち森岡 (1938) はエメチン、ヤトレン、ネオネオアーセミン、ステブナル、パンセブチン、マーキュロクロム、メチレンブラウ、硫酸マグネシウム、昇汞、クレゾール石鹼液、ホルマリン、石炭酸、大腸菌、アルカリ性糞便菌、葡萄状球菌、溶血性連鎖状球菌、腸球菌、酵母菌、緑膿菌について、石野 (1947) はカラダイワウの浸出剤について、嶋津 (1950) は各種食塩濃度、並びに大腸菌及び赤痢菌について報告を行つている。

之等の研究は何れも細菌を混入している培養 *Trichomonas* を用いて行われたものであり、このような細菌の存在が、実験成績の現われ方に大きな影響を与えるものであることは当然想像される所である。

最近 DeCarneri (1956) は無菌の *Trichomonas hominis* の培養を得て、それをを用いて大腸菌の影響を検査し、又我々の教室でも森口 (1957) が *T. hominis* の無菌培養を確立し、それをを用いて大腸菌、連鎖状球菌、葡萄状球菌の影響を研究した。

私は森口の確立した無菌培養の株を用いて、本原虫の治療薬である Carbamisin の作用効果を検し、又大腸菌が本原虫の増殖に及ぼす影響を検討した。

材料及び方法

T. hominis はチスティン・ブイオン血清培地に無菌的に継代培養されてきたものを用いた。種々の濃度の Carbamisin が *T. hominis* の發育に及ぼす影響を検討

KAN ŌMURA: On the effect of carbarsone and *Escherichia coli* upon the bacteria-free cultivation of *Trichomonas hominis*. (Department of Parasitology, School of Medicine, Keio University, Tokyo)

するため培地に Carbamisin を per cc 1.0mg, 0.4mg, 0.2mg, 及び 0.1mg 含有する4段階に就いて比較した。各試験管に同数の虫体を接種し、上記各濃度になるように Carbamisin を加え、24時間ごとに各試験管内を充分に攪拌して、Thoma 氏血球計算板にて虫体を算定した。虫体の算定に際し、各時間ごとに3本の試験管で、それぞれ2回宛計算しその平均値を以て虫体数とした。攪拌により培地の性状は変化し、その後の虫体の増殖が強い影響を蒙ることが考えられるので、一度攪拌した培地は破棄し、各時間ごとに常に新しい培地のものにて計算した。Carbamisin は加熱滅菌が不可能なので、per cc ストレプトマイシン (S. M.) 2 mg, ペニシリン (Pc) 2000u. を加えた。

大腸菌は Kauffmann の標準株 O₁ から O₂₅ までの25株で、半流動寒天培地に保存されたものを使用に際し、普通寒天培地に24時間培養したものを用いた。各試験管に同数の虫体を接種し大腸菌を一白金丸宛加え24時間ごとに観察した。虫体の算定方法は Carbamisin の場合と同様である。本実験に使用した接種虫体は継代培地中に含まれている S. M. 及び Pc の影響を考慮し、2代に亘り特にそれらを加えないで継代培養した虫体を用いた。

一方では対照の意味で無菌培地に細菌を加え同時にその細菌の發育を抑制するに足るだけの S. M. を加えた場合、S. M. を加えない場合に比して *T. hominis* の發育に如何なる差異があるかを観察した。虫体の算定法及び使用虫体は大腸菌の場合と同様である。

実験成績

I. Carbamisin の無菌 *T. hominis* に対する作用

実験1では Carbamisin の濃度を per cc 1.0mg, 0.2 mg, 及び 0.1mg, とし、接種虫体数は per cc 17.5万 (0.5cc) 宛とした (第1表)。実験2では Carbamisin の濃度は per cc 1.0mg, 0.4mg, 及び 0.2mg とし

第1表 Carbamisin の *T. hominis* の生存増殖に及ぼす影響 (その1)

Carbamisin 濃度	日数									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1.0mg/cc	3.5	1.8	0	0	0	0	0	0	0	0
0.2mg/cc	7.5	12.1	19.8	11.0	10.7	19.3	11.5	8.5	3.2	3.5
0.1mg/cc	12.7	18.0	16.3	10.7	11.7	7.5	7.2	3.2	0.3	0
対 照	12.8	20.8	17.7	19.0	23.0	13.5	10.3	3.3	0.5	1.0

第2表 Carbamisin の *T. hominis* の生存増殖に及ぼす影響 (その2)

Carbamisin 濃度	日数									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1.0mg/cc	1.3	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0
0.4mg/cc	6.2	7.6	1.5	0.3	0.2	0	0.3	0	0.2	0
0.2mg/cc	9.8	17.7	8.0	8.3	6.0	1.3	0.3	0.7	0.2	0.3
対 照	20.7	41.3	28.0	27.5	16.1	16.3	11.2	6.0	3.2	2.3

接種虫体数は per cc 43.5万 (0.5cc) 宛とした (第2表)。実験 1, 2, に於ける対照にはそれぞれ Carbamisin を加えないものを以てした。之等の表の数値は per cc の虫体数を万の単位をもつて示したものである。1.0mg/cc 即ち1,000 倍量では, *T. hominis* の増殖は完全に阻止せられ, わずかに残った虫体も3日目には消失した。0.4mg/cc 即ち2,500 倍量にても発育は阻止せられ, 残った虫体も漸次消失した。0.2mg/cc 即ち5,000 倍量及び0.1 mg/cc 即ち10,000 倍量ではわずかに増殖するも対照に比して, その増殖は少く, 発育を阻止される。

この基準でゆくと, Carbamisin は 1.0mg/cc で完全に殺虫的に作用し, 0.4mg/cc では発育阻止作用を示し, 0.2mg/cc, 0.1mg/cc ではわずかながらも虫体の増殖が認められた。

II. 大腸菌 Kauffmann 標準株の無菌 *T. hominis* に及ぼす影響

Kauffmann 標準株 O_1 より O_{25} までの25株を培地に添加し, 24時間ごとに *T. hominis* の増殖の状態を観察した。実験は大腸菌添加の都合上, 之を5回にわけて行い, 接種虫体は $O_1 \sim O_5$ までは15.5万, $O_6 \sim O_{10}$ までは17万, $O_{11} \sim O_{15}$ までは12.5万, $O_{16} \sim O_{20}$ までは9万, $O_{21} \sim O_{25}$ までは17.5万でその接種量は何れでも0.5cc, である。成績は第3表に示してあるが表中の数字は虫体数の増加率を示したものである。即ち培地内虫体の総数を求め, 之を移殖虫体数で除した数値をもつて示した。

従つて第3表に於て1以上の数値を示したものは, 移殖後その時間までに多少とも増殖したことを意味するものである。

第3表で見るに大腸菌の Kauffmann 標準株 $O_1 \sim O_{25}$ までを夫々添加した場合, *T. hominis* は移殖後2日までは添加した細菌株の半数又はそれ以上の例において多少とも増殖を示した。

3日後においてなおこの数値が1以上を示しているものは $O_5, O_6, O_{11}, O_{15}, O_{16}, O_{18}$ の6株であり, 5日後までなお虫体が生残つたのは O_5, O_{15}, O_{16} 及び O_{18} の4株を添加したものであつた。

以上の実験結果を正確に判断するためには, 対照実験として細菌を加えて, その増殖を S. M. で抑えた培地内で *T. hominis* がどのような増殖態度を示すかを知る必要がある。そのためには予め, この培地内で大腸菌の増殖を阻止し得る S. M. の最低濃度を明にしておかねばならない。この実験結果は第4表に示した。即ち O_5 では50 γ , O_{15} では250 γ , O_{16} では250 γ , O_{18} では250 γ , にていずれも一様に潤濁を示し, 細菌の発育を阻止することが出来なかつた。以上の実験により per cc 500 γ で細菌の発育を抑制し得る事を知つたので, 次に同量を細菌と共に培地に添加し, 虫体の発育状況を24時間ごとに観察し, その結果を第5表に示した。本実験に於ては, 実験3 (第3表) に於て第5日目まで原虫を生存せしめた, $O_5, O_{15}, O_{16}, O_{18}$ について行つた。表に見られるように4株とも第3表に示された数字と比較して遙

第3表 Kauffmann 標準株の *T. hominis* の生存増殖に及ぼす影響

株	日数				
	1	2	3	4	5
1	2.0	1.0	0.5	0.1	
2	0.2	0.2	0.4	0.3	
3	1.1	0.2	0.1	0.2	
4	0.2	0.6	0.1	0.1	
5	6.0	3.5	1.8	0.2	0.1
6	6.6	9.0	2.2	0.3	
7	4.4	2.8	0.2		
8	5.4	3.4	0.1	0.1	
9	2.8	1.9	0.3	0.2	
10	1.1	0.1	0.1		
11	4.6	5.9	1.5	0.4	
12	3.2	0.1	0.1		
13	5.4	1.6			
14	4.2	1.5			
15	4.8	6.9	2.7	0.8	0.1
16	3.8	2.3	3.5	1.3	0.5
17	0.9	0.1			
18	1.7	2.3	2.3	2.1	0.8
19	2.8	1.2	0.3	0.2	
20	0.5				
21	0.4	0.1			
22	0.3	0.1			
23	0.3				
24	0.8	0.1			
25	0.2				

第4表 培地内にて *E. coli* の発育を阻止する S.M. の量

株	S.M. 濃度			
	5	15	16	18
500γ/cc	—	—	—	—
250	—	+	+	+
100	—	+	+	+
50	+	+	+	+

表中 +は潤濁を示す。

に大きい数値を示した。即ち2日後には移植虫体数に比して数倍乃至十数倍の虫体数に達した。又6日後においてもなお移植虫体数より多く、7日後においても3株において生存虫体が見られた。これは第3表に示された結果とは著しい相違である。かくして細菌の増殖を抑える

第5表 *E. coli* の発育を阻止し得る S.M. を添加した場合の *T. hominis* の生存増殖に及ぼす影響

株	日数						
	1	2	3	4	5	6	7
5	9.2	16.5	9.9	5.5	4.4	1.8	
15	5.1	18.7	8.8	2.6	3.3	1.1	0.4
16	11.0	11.6	6.6	4.0	2.6	1.5	1.1
18	7.7	12.8	6.2	4.4	3.7	3.3	0.7

ことによつて原虫は長く生存することが明らかになった。

考 按

Trichomonas 感染に対する Carbamisin 治療について数多くの報告があるが、*in vitro* の実験的研究は比較的少ない。

Rakoff (1939) は acetarsone, carbarsone, aldarson, の3者の *T. vaginalis* に対する力価の比較を行つてゐるが、Löffler の乾燥血清培地で培養した *T. vaginalis* で carbarsone は75mg%で増殖を止めると云う。

赤痢アメーバに対する Carbamisin の *in vitro* の成績は我国でも報告があり、中村 (1950) はあるアメーバ株には500倍溶液を48時間作用させても尚生存しているものがあると云い、嶋津 (1950) は5,000倍溶液では死滅したと云つてゐる。これらの成績は何れも細菌を伴つてゐる培養虫体についてのもので、無菌培地での成績でないため、ある程度細菌の影響があると思われ私の成績より多量の Carbamisin を使用している。

T. vaginalis で無菌培地、又は無菌培養虫体に作用せしめた報告は、真柄他 (1953)、篠塚 (1954)、室岡他 (1954)、上野 (1956)、などがあるが、真柄 (1953) は2.5~5.0mg/cc、にて殺虫、篠塚 (1954)、室岡他 (1954) 等は30mg/cc、により運動性が障害され、次いで運動停止を来し、上野 (1956) は1.0mg/cc で完全殺虫、0.1mg/cc で発育阻止作用、それ以上では差はあれど増殖すると述べてゐる。

私の実験成績では、1.0mg/cc で完全に殺虫、0.4mg/cc. では発育阻止作用を示し、0.2mg/cc, 0.1mg/cc. ではわずかながらも虫体の増殖が認められ、上野 (1956) の成績とほぼ一致した。

T. hominis に大腸菌を添加した実験では、森岡 (1938) は田辺培地に於ては各株に於て殆んど同様の増殖度を示したと云い、嶋津 (1950) は遠沈処理の *T. hominis* 浮

游液を滴下した場合生存状態は不良であり、遠沈処理を加えないものでは良好であつたと述べているが大腸菌が大量に存在する medium が特に悪影響を与えると云う決定的な所見は得られなかつたと述べている。

Balamuth 培地に於ては、DeCarneri (1956) は *Escherichia coli* 120 の 1 株を使用して 4 カ月虫体は生存し、良好なる増殖を示したと述べており、森口 (1957) も大腸菌は一般に *T. hominis* の増殖を支持すると述べている。

又、DeCarneri (1956) は馬血清斜面培地で、無菌の *T. hominis* を移植しそれに *Escherichia coli* 120 を加えて培養することにより虫体は 136 日間生存したと云い、森口 (1957) もこれを追試し 30 日間生存した株のある事を認めている。

以上は何れも細菌を必要とする培地を用いた実験であるが、無菌培地に於ける成績では、DeCarneri (1955) が C. P. L. M. 培地で細菌を共棲せしめた *T. hominis* の培養は 48 時間で虫体は全く消滅し、森口 (1957) もチステン・ブイオン血清培地に大腸菌を添加し、わずかに増殖虫体を認めたが 48 時間では全く虫体を認めないと報告している。

私の場合でも、わずかに増殖を示す株もあるが、大部分の株に於ては増殖を示さなかつたが、最高 5 日間生存した。

これに対して添加の *Escherichia coli* の発育を抑制し得る S. M. を加えた場合には明らかな増殖を示し、7 日目に到るもほぼ生存せる虫体を認めた。

今回の実験により無菌培地に於て虫体に作用する Carbamisin の量は細菌を含む培地のそれに比してはるかに少量で作用し、薬剤そのものが直接に虫体自身に作用すると考えられる。

無菌培地に於て、*Escherichia coli* を加えるとそれを加えない培地に比較して、*T. hominis* の増殖に悪い影響を及ぼすことが明らかになった。

森口 (1957) は 48 時間にて虫体が全く認められないと報告しているが、私の使用した虫体は、それより約 90 代も継代培養を経ているので虫体が、培地に馴れたためか、森口の場合よりもかなり長く生存した。

茲に注意すべきことは、従来の培地では *T. hominis* の培養には細菌が同時に増殖することが *T. hominis* の増殖には絶対必要なことであり、この様な培地を用いて行われた過去の多くの実験では、大腸菌は確かに本原虫の増殖を促進するものであることが知られていた。然る

に無菌にて *T. hominis* を増殖せしめ得る培地が出来て見ると、その中に大腸菌を増殖せしめれば却つて、それが *T. hominis* の増殖を阻止すると云う結果になった。こゝに一つの矛盾があるように見えるが、実際にはこのことは一つの新しい事実を示すもののように思われる。即ち細菌を必要とする従来の培地で、大腸菌が有効であつたことは、その増殖によつて培地の諸条件を *T. hominis* の増殖に有利なように変えることであつたのであろう。細菌を必要としない培地内では、大腸菌の増殖によつて不利な条件が醸成されると考える可きであり、このことは唯培地成分の相違によつて生ずる差異と考える可きであろう。このように考えると細菌の菌体そのものはこの場合 *Trichomonas* にとつて特に大きな利用価値はないものと思われる。

結 論

T. hominis の無菌培養に於ける Carbamisin 及び *Escherichia coli* の影響を検討した。

1) 無菌培地に於ては、Carbamisin は 1.0mg/cc で完全に殺虫、0.4mg/cc では発育阻止、0.2mg/cc 0.1mg/cc ではわずかながらではあるが、増殖をゆるした。

2) *T. hominis* を無菌的に培養し得る培地に *Escherichia coli* を添加した場合は、その添加菌株によつては培養 2 日目までは *T. hominis* は多少の増殖を示すが 3 日後には虫体数は激減し、5 日後まで生存したのは 4 株にすぎなかつた。

3) *Escherichia coli* 添加培地に、その細菌の発育を抑制し得る量の S. M. を加えた培地に於ては、S. M. を加えない場合に比して著明な虫体の発育増殖を示した。

稿を終るに臨み、終始御懇切な御指導並びに御校閲を賜つた、松林教授並びに浅見助教に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) DeCarneri, I. (1955) : *Trichomonas hominis* cultured without bacteria, Nature, 24, 605. —2) DeCarneri, I. (1956) : Conservation of trichomonas in monobacterial cultures, Am. J. Trop. Med. Hyg., 4, 677~680. —3) 石野鉦三 (1947) : カラダイワウの浸出剤が培養赤痢アメーバ及び二、三腸管寄生鞭毛虫に及ぼす作用について, 医学と生物学, 10, 73~75. —4) 真柄正直他 (1953) : 脛トリコモナスに就いて特にこれの一新培養法及び本虫に対するトリコマイシンの作用, 産婦の実際, 2, 1260~1265. —5) 森口智賀年 (1957) : 腸トリコモナスの

増殖におよぼす細菌の影響, 日新医学, 44, 266~271. —6) 森岡広一 (1938): トリコモナス・ホミニスの生物学的性状に関する実験的研究, 台湾医誌, 37, 215~231, 504~514, 635~677, 838~869. —7) 室岡一・他 (1954): トリコモナス並びにカンディダ発育阻止物質の効果と腔内 pH との関係, 臨婦産, 8, 17~24. —8) 中村保夫 (1950): 赤痢アミーバの国内株と国外株との生物学的性状の比較, II, 培養赤痢アミーバの薬物に対する試験管内抵抗性に就いて, 慶応医学, 26, 137~140. —9) Rakoff, A. E. (1939): Inhibitory effects of pentavalent arsenicals upon *Trichomonas*. Comparative efficacy and toxicity of acetarsone, carbarsone and aldarson in laboratory studies, Am. J. Obst. Gynec., 37, 265. —10) 嶋津優 (1950): 培養 *T. hominis* の各種食塩濃度に対する態度並びに大腸菌及び赤痢菌との関係について, 慶応医学, 27, 167~171. —11) 嶋津優 (1950): 種々なる合成砒素剤の培養アミーバに対する作用, 最新医学, 5 (9), 1~9. —12) 篠塚昭夫 (1954): トリコマイシン腔錠に依るトリコモナス腔炎の治療効果と本虫の形態学的変化, 臨婦産, 8, 17~24. —13) 上野統一 (1956): 腔トリコモナスの培養と治療とに関する実験的研究, 臨婦産, 10, 170~176, 219~227.

Summary

Moriguchi (1957) has established a bacteria-free cultivation of *Trichomonas hominis* in the cystein-bouillon-serum medium. The present study was carried out with this strain of trichomonad. Car-

barsone was added into this medium in several different concentration ranging from 0.1 mg/cc to 1.0 mg/cc. The growth of the trichomonad was almost arrested in the concentration above 0.4 mg/cc and only a poor growth was observed in the 0.2 mg/cc and 0.1 mg/cc concentration of the drug. Carbarsone seems to have a direct effect upon the organisms.

Kauffmann's standard strains of *Escherichia coli* which were numbered from O₁ to O₂₅ were added to the medium. Trichomonads when accompanied with these strains either showed only a poor growth or did not grow at all. Each strain of *Escherichia coli* seemed to have somewhat different effect upon the trichomonad. Anyhow, the growth of trichomonad was always hindered by the addition of bacteria as compared with the bacteria-free cultivation of the organism. The bad effect of bacterial growth upon the trichomonad was clearly demonstrated when streptomycin was added to the medium to check the growth of bacteria. In these media, trichomonad grew quite as well as in the bacteriafree medium.

It is noteworthy that *Escherichia coli* support the growth of trichomonad when added into older type of medium in which trichomonad cannot grow without bacteria while the same bacteria hindered the growth of trichomonad when they are added into newer type of medium in which trichomonad can grow without bacteria.