

赤痢アメーバの培養に関する研究

第 1 篇 全血加培地の検討及び耐熱培地について

高 田 季 久*

大阪大学微生物病研究所寄生虫原虫学部 (部長 森下薫教授, 指導 猪木正三教授)

(昭和 33 年 2 月 28 日受領)

特別掲載

赤痢アメーバは、1924 年 Boeck 及び Drobohlov らによつて、細菌と共棲ではあつたが、初めてその継代培養が成功した。その後多くの研究者は、一刻も早く無菌培養を得たいものと、種々様々な方法によりその完成に努めたが、残念ながらそれ等の計画はすべて不成功に終り現在に至つてゐる。そのため赤痢アメーバの基礎的な研究、特にその代謝の研究は、他の純培養の可能な原虫類と比較して非常に遅れており、今まで得られた種々の成績は、常に共棲細菌の共存する条件を考慮して判定せねばならぬという弱点があつた。しかしながら、種々の共棲菌と共に培養しながら赤痢アメーバの色々な培養条件をさぐり、又その要求成分を追求することは、それ自体を直ちに赤痢アメーバ自身の生育条件又は発育要素と判定するには当を得ないとしても、赤痢アメーバの純培養を得るための一過程として歩まねばならない道である。すでに報告されている多くの業績、例えば、Jacobs (1947), Saffer *et al.* (1948, 1949), Delamater *et al.* (1947), Rees *et al.* (1946, 1945), Chang (1942, 1943, 1946), Nelson (1947, 1950), Snyder & Meleney (1943) Karlson (1952), Nakamura *et al.* (1951, 1952, 1955) 等々及びその他の数多くの興味深い研究報告は、すべて以上の観点の下に行われたものであつて、それ等は赤痢アメーバの培養研究に大いに進歩をもたらした。

著者もすでに早くから、以上の諸点に着目し主として赤痢アメーバの培養に関する諸種の要因について検討を加えているが、1950 年恩師猪木正三教授及び協同研究者と共に、旧来の培地に比較してアメーバの増殖が著しく

旺盛であつてしかも製法の簡単な三種の全血加培地を考案報告し、アメーバの培養及び大量採集を非常に容易ならしめた。その後この培地に増殖したアメーバについて種々の実験を進める一方、全血加培地についても更に分折改良を加え、それ等の培地における培養状況より、赤痢アメーバの培養に必要な条件の追求を試みた。

又従来から赤痢アメーバの培養に、しばしば鶏卵及び米澱粉(殆んど必須のものと考えられている)が用いられているが、その有効成分、特に卵黄に関しては殆んど知られていない。そこで卵黄の各種成分(主に脂質を中心として)、及び米澱粉の蛋白等を出来るだけ除去した成分について、赤痢アメーバの発育増殖に及ぼす影響を観察した。

本篇はその内、全血加培地の固型斜面部及び液体部の組成を種々改変した培地、並びに更に耐熱性の物質のみよりなる 13 種の所謂耐熱性培地を試作し、それ等における赤痢アメーバの生育状況を観察した成績について報告する。

実験材料及び方法

使用した赤痢アメーバは、主として Y 株(山神株)であるが、これと比較する意味において適時他の K, D, U, H, の 4 株をも用いた。これ等のアメーバは、すべて患者の糞便より分離し、最低一年以上専ら全血加培地をもつて継代培養を行つてきた株である。

培養実験は先ず、最も良く増殖する WB 2 培地(固型部: 人血清 1 部, ブイヨン 1 部, 液体部: phosphate buffer saline pH 7.4, 5% 家兎全血, 米粉)について、その固型部の血清量を増減し、アメーバの発育に要する最小必要量及び至適濃度を検討した。但し、10% 以下に血清を加える場合、斜面にするには血清量が少なすぎるため、更に 1.5% の割合に粉末寒天を加えて凝固斜面とした。

次いで、同じく WB 1 培地(固型部: 0.1% アスパラ

SUEHISA TAKADA: Studies on the cultivation of *Entamoeba histolytica* I. Further studies on the whole blood media and autoclaved media. (Department of Parasitology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University)

* (現在所属 大阪市立大学医学部医動物教室)

本研究は一部文部省科学研究費によつて行われた、ここに記して謝意を表する(猪木正三)。

ギン, 1%寒天, Ringer 液, 液体部: WB2培地と同様)における液体部の血液及び血球についてその必要量及び至適濃度を追求した。血球の場合は, 一定量の血液より得た血球を血液と同量の Buffer saline に浮遊せしめて原液として使用した。

最後に, WB2培地を基礎とし, 主としてその液体部の耐熱性物質のみを用いた培地及び, 更に肝エキス, プイオン等を加えて改変考案した13種の培地についてアメーバの培養状況を観察した。これ等はすべて二層性の培地であり, 滅菌には固型斜面部及び液体部共に15ポンド20分の高圧滅菌を行った。又液体部に用いた, "加熱全血"は, 5%の割合に Buffer saline に加えた家兎全血を, 100°Cの熱湯中で30分間振盪加熱し, その後ガーゼ及び濾紙によって濾過したものを用い, 同じく高圧滅菌を行った。

なお培地条件を変えるために, 流動パラフィン, 塩酸チスチン等を用いて培地の酸素分圧を下げ, 又共棲菌として新たに *Clostridium welchi* を加えたものについても培養実験を行ったが, いずれの培地についても3回以上実験を反復し, 各々48時間乃至72時間毎に継代培養を行い, 20代以上継代培養の出来たものをもって, 培養可能と判定した。

実験成績

1) WB2培地斜面部の検討

原法に従えば, プイオン1部に対して血清を1部乃至2部の割合に加えるのであるが, 血清量50%以上では, その濃度によって特にアメーバの増殖度に差を認めなかつたので, 主として低濃度の場合について検討した。

Y, K, D, の3株について行った成績は第1表に示したが, 表中の+は培養可能のものであり, ±は不定の成績

第1表 WB2培地斜面部血清量の検討 (液体部: Phosphate buffer saline+5%全血)

株名	濃度						
	3%	5%	10%	15%	30%	40%	50% (対照)
D	-	-	±	+	+++	+++	+++
Y	-	±	+	+	+++	+++	+++
K	-	+	++	++	+++	+++	+++

註 ±……一部継代培養不能であつたもの
 +……各視野(×100)原虫 1以下
 ++…… " " 1~10コ
 +++…… " " 11~50コ
 ++++…… " " 50コ以上

を示し培養可否の決定し難いものを指し, 一は継代培養不能のものである。

各株によつていささか差異は認められるが, 大体5%以下では赤痢アメーバの増殖は殆んど見られず, 10%以上では各株共確実にアメーバの増殖が見られた。しかし培養48時間乃至72時間後に最高の増殖を得るためには少なくとも40%以上の血清量が望ましく, 50%以上60%, 70%等では, 増殖度に大差を認めなかつた。

2) WB1培地液体部の検討

WB1培地の液体部は, Phosphate buffer saline に家兎の全血を5%の割合に加えるのであるが, 第2表に示した様に5%以下2%, 1%, 1/2%, 1/4%, 1/8%の割合に加えた場合について培養実験を行い, 更に全血に代え血球のみを用い, 上記の各濃度について, アメーバの増殖度を観察した。

第2表 WB1培地液体部血液量の検討 (斜面部: Asparagin-Agar-Ringer)

区分	株名	濃度					
		2%	1%	1/2%	1/4%	1/8%	5% (対照)
全血	Y	+++	+	+	±	-	+++
	K	++	+	+	±	-	+++
	D	++	+	+	±	-	+++
	U	++	+	+	±	-	+++
	H	+++	+	+	+	±	+++
血球	Y	+++	+	+	+	±	++
	K	++	+	+	+	±	++
	D	+++	+	+	+	±	++

全血及び血球の場合共に, 5%以上の濃度では, アメーバの増殖に大した差は認められないが, 全血を用いた方が, 最高増殖度がより高い様であつた。

又全血を加える場合は, 少なくとも1/2%以上の割合に加えなければアメーバの増殖は認められず継代不能であつたが, 血球の場合は更にうすい1/4%でも継代培養可能であつた。この様に, 栄養物の量から見れば全く逆の様な成績を得たのであるが, この点については, 後に述べる様に共棲菌の増殖とアメーバの増殖との間のバランスの問題が関係するものと考えられる。しかし増殖する程度即ち最高増殖度の点を比較すれば, 5%以上ではやはり全血の方が明らかに良好であつた。

一般に加える全血又は血球の量が少なくなるにつれて増殖度も低下するが, それと同時に, 増殖に要する時間も長くかかる様子が見られた。

3) 耐熱性培地について。

従来報告されている各種の培地の内、その多くは一部に易熱性(Thermo-labile)の組成を持つており、完全な耐熱性の培地で且アメーバの良く増殖する培地は少ない。Inoki *et al.* (1950)は先に WB 2 培地の固型部及び液体部を 15 ポンド 20 分間高圧滅菌した耐熱培地を作成し、WB 2 培地に劣らぬアメーバの増殖が見られたと報告している。著者は更に改変を進めて、血液を除いた場合、培地を嫌気性にした場合、又新たに共棲菌として *Cl. welchii* を加えた場合等に、第 3 表に示した様な 13 種の耐熱性の培地について、主に Y 株アメーバを用いて培養実験を行つた。比較参考のために、WB 1, WB 2, 及び田辺千葉培地をも表に加え、その組成及び成績を記載したが、その結果表示の如く 8 種の継代培養可能な培地を得た。

一般にそれ等 8 種の培地は、WB 培地に比較してやゝアメーバの最高増殖度は劣る様であつたが、しかし田辺千葉培地における場合と比すれば、優るとも劣らぬ成績を示した。

表中で最も栄養分の少ないと考えられるのは、S. B., 及び B 培地であるが、アメーバは充分に増殖し且継代培

養が可能であつた。しかるにこれ等より遙かに栄養の高いと思われる、L. B., B. O., B. B., B. C., 及び A. C. P. の各培地ではアメーバの増殖も少なく、継代培養が不可能であつた。しかしながら、L. B., B. O., B. B. の各培地中に加えられたブイヨン、牛肝エキス等がアメーバの増殖を抑制したとは考えられず、又 B. C., 及び A. C. P., 等に加えられた塩酸チステイン及びパラフィン等が直接アメーバを死滅せしめたとも考えられない事は、ブイヨン、肝エキス等はアメーバの培養にしばしば用いられる成分であり、又チステイン、流動パラフィン等を加えた培地でも、A. C. P. W. の様に *Cl. welchii* を加える事によつて非常に良く増殖継代された事によつても理解される。

又 B. C. 培地のブドー糖についても同様である。

この様に見矛盾した様な現象は、前述の血球のみの培地における場合と同様、アメーバの培養の必ずつきまとう共棲菌に起因するものであらうと考えられる。

継代培養に成功した 8 種の培地の内、最も良くアメーバが増殖し且長期保存の出来たのは、A. W., 及び A. C. P. W. 培地であつて、A. W. 培地中では 37°C に保つて栄養型のまま 35 日間生存しつゞけた例があつた。又 A.

第 3 表 各種試供培地成分比較とその培養成績

区 分 培 地 名	培 地 組 成							成 績			摘 要		
	斜 面 部			液 体 部				米 澱 粉	其 他	継 代 可 否		最 増 殖 高 度	最 増 殖 時 高 間
	血 清	ブ イ ヨ ン	其 他	全 血	加 熱 血 液	PO ₄ Buffer	0.1 % チ ス テ イ ン						
W.B. 2	○	○		○	○				○	卍	48—72	既報培地	
S.	○	○			○		加熱血清	○		卍	48		
S.B.	○		NaCl 水		○			○		+	72		
A.	○	○		○	○			○		卍	48—72		
B.	○	○			○			○		卍	48—72		
B.C.	○	○			○	○	ブドー糖	○		×			
A.C.	○	○			○	○		○		卍	48—72		
A.P.	○	○			○	○	流 パラ	○		卍	48—72		
A.C.P.	○	○			○	○	流 パラ	○		×○			
A.W.	○	○			○	○	流 パラ	○	ウエルヒ菌	○	卍	72	35日生存
A.C.P.W.	○	○			○	○	流 パラ	○	ウエルヒ菌	○	卍	72	15日継代可
L.B.	○	○			牛 肝	ブ イ ヨ ン		○		×			
B.O.	○	○			ブ イ ヨ ン			○		×			
B.B.	○	○			PO ₄ , Buffer	ブ イ ヨ ン		○		×○			
田辺, 千葉	リンゲル, 寒天				血 清	リ ン ゲ ル		○		○	卍	48	既知培地
W.B.1	アスパラギン			○	○			○		卍	48—72	既報培地	

C.P.W. 培地では移植後15日目の培地より継代に成功している。この様な成績は普通全く望めない事であり、37°Cでアメーバは4~5日しか生存せず且継代には2~3日毎に行わねばならないのが通例である。従つてこの成績から、赤痢アメーバの増殖には、嫌気性の条件が必要であり、且 *Cl. welchii* が共棲菌として好適なものであるといえる。

考 察

赤痢アメーバの培養において、同一培地を用いても、使用する株が変わつた場合、又同一株でも培地組成のわずかな相違によつても、全く増殖しなくなる事は、しばしば経験する事であり、未だその理由については明快な解答を得ていない。古くから多くの研究者達は、独自の方法によつてその解明に努め、更に決定的な赤痢アメーバの培養条件の解決に努力している。著者も又それ等の点を少しでも知りたいものと、全血加培地(WB培地)を中心として、その培地組成を種々改変し、又培養条件をも変化させる事により、赤痢アメーバ増殖への影響を種々観察した。

全血加培地、特にWB1培地は、名の示す如く、従来の田辺千葉培地の液体部に血清のみでなく全血を加え、又Ringerの代りにPhosphate Buffer Salineを用いる事により、アメーバの増殖を非常に容易とし、更に固型斜面部を血清ブイオンに代えたWB2培地は一層の好成績を示したのであるが、斜面の血清量及び全血の必要量に関しては未だ充分な検討がなされていなかった。

実験1及び2はこれ等の点についていささか追求したものであるが、その成績の示す様に、液体部の最低全血必要量は1%であつた。しかしながら、最も良きアメーバの増殖を期待するならば、やはり原法の如く、家兎全血5%以上の注加が望ましい。

又一方血清斜面部の血清の最低必要量は、5%乃至10%であり、この場合も、アメーバを最高に増殖させるためには40%以上の血清を加える必要がある。

これを要するに全血加培地においては、液体部の全血は5%以上、血清斜面部の血清は40%以上が最適であると結論される。

血清蛋白や血球、特にその中のHämoglobinがアメーバの増殖を促進させる事は、かなり古くから認められていることであつて(Deschiem, 1933; 山本, 1938; 畑上, 1938)、それ等両者を共に含んだ全血が理想的である事は当然のごとであり、著者らの全血加培地の優秀性はこ

の点に起因するものであろう。

従来用いられている赤痢アメーバの培地は、その多くに、血清その他の易熱性(Thermo-labile)物質が加えられているが、それ等のために滅菌操作その他が繁雑となり、その上長期の保存等も困難であつたが、著者の考案した。8種の耐熱性培地は、上記の様な欠点が無く、培地作成も容易でアメーバの増殖も可成りの成績を示し、臨床的にも又集団検査その他にも好適なものと思う。

すでに著者等は、第3表中のB培地等を使用して、赤痢アメーバのみならず、他のアメーバ、原虫類等の検出に利用し好成績を得ている(片岡ら, 1956)。又A.W., A.C.P.W. 培地の様に、嫌気性条件及び *Cl. welchii* の応用によつて、アメーバを栄養型のまま長期間の保存が可能となつた事は、従来の報告にはあまり見られない成績であつて、赤痢アメーバの継代培養を一段と容易ならしめたものであると信ずる。

Cl. welchii の応用及びその有効性に関しては、すでにChinn(1942)、Chang(1946)、斎藤(1950)、山川(1953)等々によつて報告されているが、著者も上記の如く、アメーバの共棲菌として好適なものである事を確認した。

A.C.P. 培地とA.C.P.W. 培地とを比較して考えられる事は、赤痢アメーバはJacobs(1941~1950)、Chang(1946)らの指摘した様に、好気性よりもむしろ嫌気性の条件を必要とし、普通の培養においては、共棲の好気性菌が先ず増殖して培地の酸素分圧を下げるものと考えられるが、当初より嫌気性にしておくと、共棲好気性菌の増殖がおこらず、ためにアメーバの増殖が見られなくなるが(A.C.P. 培地)、この培地に嫌気性菌 *Cl. welchii* を加えると(A.C.P.W. 培地)、その増殖によりアメーバに好都合な環境が作られ、アメーバの増殖が起るものと思われる。

興味深い事は、すでに述べた如く、L.B., B.O., B.B., B.C., 培地の様な栄養分の高い培地でアメーバが増殖せず逆に養分の少ない、S.B., A., B. 等の培地にアメーバが良く増殖した点である。これは結局共棲菌の異常な増殖、そのための培地条件の悪化(L.B., B.O., B.B. 培地)、又逆に共棲菌増殖抑制のため(B.C., A.C.P. 培地)、アメーバと共棲菌との間のバランスが破れたためであらう。その他種々の解釈が考えられるが、この様な場合には如何に高栄養の培地であつても、アメーバの増殖が見られない事は事実であつて、若し適当な共棲菌の増殖があれば、アメーバはかなり単純な、低栄養の培地においても充分増殖するものであろうと推定される。この点に

関しては、次の第二篇の成績により更に明らかにされたと思う。

結 論

1) 全血加培地を検討した結果、血清及び血球は赤痢アメーバの増殖を促進することを認めた。且これ等は別個に加えるよりも同時に加えた方が効果的である。

2) WB 1 培地の液体部に加える全血の最低必要量は $1/2\%$ であり、血球のみの場合は $1/4\%$ であつた。しかし増殖度は全血を加える方が優秀であり、最高の増殖を得るためには、全血を 5% 以上加える必要がある。

3) WB 2 培地の固型斜面部に加える血清の最低必要量は 10% であつた。しかし赤痢アメーバの最高の増殖を得るためには 40% 以上加える必要がある。

4) WB 2 培地を改良し、耐熱性物質よりなる 8 種の耐熱性培地を考案し、赤痢アメーバの培養を容易ならしめた。

5) 赤痢アメーバは嫌気性培養が望ましく、その場合 *Clostridium welchii* が共棲菌として好適である。

6) 赤痢アメーバは、その共棲菌との間に増殖の均衡が破れた場合は、如何に高栄養な培地においても増殖は見られない。

文 献

第 2 篇の部にまとめて記載する。

Summary

The author attempted to determine the best culture conditions and requirements for *Entamoeba*

histolytica by observing its growth behaviours in various mediums.

In this part of experiments, it was made further observations on the whole blood mediums (The WB mediums) reported by Inoki *et al.* in 1950, and the following results were obtained.

1) Either serum or erythrocytes can promote the growth of *E. histolytica*, but more luxuriant growth is observed when these two are used together.

2) The minimum effective dose of the whole blood or erythrocytes to be used for the WB 1 medium was found to be $1/2\%$ and $1/4\%$ of liquid part respectively, but in the case of the whole blood, it should be employed more than 5% to obtain the maximum growth of the amoeba.

3) The minimum effective dose of the serum to be added to the solid part of the WB 2 medium was 10% and it must be used more than 40% to expect the maximum growth.

4) It was devised eight new autoclaved mediums, which were all superior to the Tanabe-Chiba medium.

5) As others reported, it was found that the anaerobic condition is essential for the cultivation of *E. histolytica*, and *Clostridium welchii* is the most suitable associate bacteri under such a condition.

6) Even in any rich nutritional mediums, the amoeba cannot multiply unless the associate bacteria afford the good environmental condition.