

# 赤痢アメーバの培養に関する研究

## 第2篇 赤痢アメーバの培養に及ぼす卵黄及び米澱粉中の微量成分の影響について

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

赤痢アメーバの発育要素及び培養条件を知るために、多くの研究者が種々の方法により、その解明に努力している事はすでに述べたが、第1篇に報告した成績及びその他の実験成績より考え、培地組成のあまり複雑な培地による実験は、考えられる要素、因子があまりにも多いため、しばしばその判定に苦しむ場合が多い。そこで培地組成を出来るだけ少なく単純なものとし、アメーバの増殖に必要な最低量とした培地で培養し、その結果より発育要素、あるいは培養条件を追求するのが、より正しい結論を得る方法であろうと思う。そこで、従来赤痢アメーバの培地に比較的良く用いられている鶏卵、並びに米澱粉について、それ等の真の有効成分を知るために、主として卵黄中の有機溶媒に可溶な物質及び米澱粉中の水に可溶な微量成分等を中心として赤痢アメーバの培養に及ぼす影響を検討した。

### 実験材料及び方法

#### 1) 試供赤痢アメーバ:

全実験を通じて Y株を用いた。本株は1951年患者糞便より分離し、以後 WB1培地により継代培養を行っている株であり、5種の共棲細菌を持つている。

#### 2) 卵黄各成分とその抽出法:

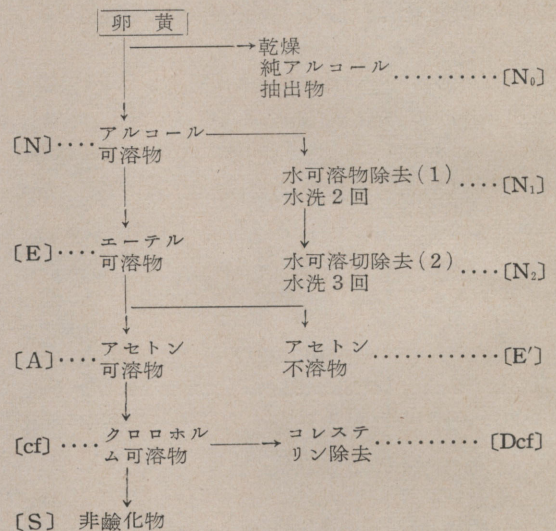
卵黄はその種類によりやゝ異なるので、成績の変動を少なくするために、著者の飼育した白色レグホン、ブリモース、名古屋コーチン及びその雑種より得た卵黄を混合し、出来るだけ新鮮なものを使用した。

SUEHISA TAKADA: Studies on the cultivation of *Entamoeba histolytica* II. The influence of several ingredients of egg yolk and rice starch on the cultivation of the amoeba. (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)

各成分抽出に用いた溶媒及び方法は一括して第4表に示したが、各成分について抽出の都度培養実験を行いつつ順次抽出を進めた。

第4表 卵黄分割抽出法(1)



(註) 最初卵黄 10 cc にアルコール 90 cc を加え 48 時間経過して使用する

先ず卵黄 10 cc に純エタノール 90 cc を加え充分混和その後時々振盪しながら 48 時間以上氷室に保存する。かくして得られる上清の黄色部を、“卵黄アルコールエキス”と名づけ、爾後の各成分の抽出にはすべてこの“エキス”より出発し、各分割による培地調製の場合の濃度の基準とした。

この“エキス” 20 cc を取り、そのアルコールを加温除去乾燥すれば、黄色粘稠な物質を得るが、これを N エキスと名づけた。この N エキスは、Nelson (1947) が、得て彼の培地に使用したものとほぼ同様のものと思う。

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)。

次いでNエキスにエーテルを約 20 cc 加え完全に溶解した後、3000 回、10 分間遠心沈澱した上清のエーテルを加温除去すれば、外見上全くNエキスと同様な物質Eエキスを得る。以下ほぼ同様な方法によつて順次温アセトン、クロロホルムへと移行せしめ、各々に於て得たエキスを表の様にA, cf, エキスと名付けた。この過程中Eエキスをアセトンにより抽出する場合、可成り多量の黄色の残渣E'エキスを得たが、その他の場合は殆んど使用に供し得る程のものを得なかつた。

さて、上記のcfエキスには、卵黄中の脂質の内、燐脂質を除いたもの、即ちステリン体を中心とした脂質の大部分が移行しているものと考えられるので、先ずこのcfエキスを10%のKOHアルコールで充分鹼化し、そのアルコールを除去した後、石油エーテル、エーテルに非鹼化物を移行せしめ、エーテルを加温除去する事によるSエキスを得た。更に又cfエキスに少量のアルコールを加え溶解し、1% Digitonin-alkohol を同量加えて、游離コレステリンを沈澱せしめ、その上清のアルコールを加温除去した後、再び冷アルコールを加えて残余の脂質を溶解しその上清を加温する事により D cf エキスを抽出した。

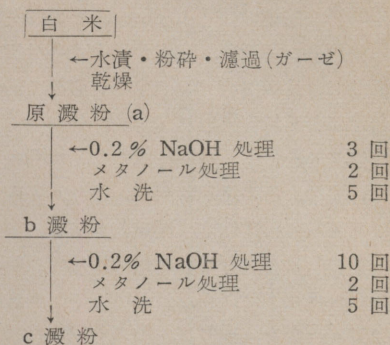
以上に述べた各エキスの内Nエキスは、最初の卵黄中に可成りの水分があるため、脂質と共に水に可溶性成分も混入されているものと考えねばならない、そこで、それ等の混入を避けるために、卵黄を充分乾燥して、これを純アルコールで抽出したN<sub>0</sub>エキスを得、又別に、Nエキスを充分水洗することにより表示した様に、N<sub>1</sub>、及びN<sub>2</sub>の各エキスを得た。

この様にして得た合計10種の各エキスはすべて出来るだけ新鮮な内に使用した。

3) 米澱粉及びその精製 :

米澱粉はその殆んどが糖質であるが、その約8%の割に蛋白質が含まれており、他は少量の脂質、ビタミン、無機物その他であると云われている。そこで出来るだけ澱粉を純化するために、第5表に示した様な方法で、その蛋白、脂質、その他の水に可溶性物質の除去を試みた。即ち、充分精白した白米を数日間水室中で水漬し、これを乳鉢で粉碎する。その乳様液をガーゼで濾過し、遠心沈澱後乾燥すると、原澱粉aを得る。このa澱粉に0.2%のNaOHを加えて1時間以上振盪し遠心沈澱してその上清を捨てる。この操作を3回繰返し、最後にNaOHの入つたまま一昼夜室温に放置する。この沈渣にメタノールを加えて2回洗い、再び一昼夜メタノール

第5表 米澱粉の脱脂・脱蛋白法



中に放置し、最後に5回水洗を反復すると、ビウレット反応及びラッセニユ反応陰性であるが、ニンヒドリン反応陽性のb澱粉を得る。同様の操作を表の如く更に反復する事により遂には、少量の澱粉では、ニンヒドリン反応も陰性である様なc澱粉を得る事が出来る。

以上の各澱粉は、充分乾燥した後、120°C、1時間の乾熱滅菌を3回行い、各培地に10mg~20mgを加えて培養実験に供した。

4) 各エキスによる培地の製法 :

培地は、固型部と液体部とより成る二層培地であり、各エキスは、その固型斜面部に含まれる様に作る。その製法及び組成は第6表に示したが、先ず“卵黄アルコールエキス”10ccを基準として、これより得た各エキスに、2%寒天加 Phosphate buffer saline (pH 7.6) を20cc加え各エキスが均一と成る様に混和しながら中型試験管に約1.5cc宛分注、10ポンド30分間の滅菌を行つた後、冷却斜面とする。但しAエキス以下はその減量を考慮して、各エキス量を2倍の割合に加えた。

第6表 試供培地の製法

- [ I ] 液体部 (Buffer・食塩水) pH 7.6
  - M/30 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・12H<sub>2</sub>O……………88.0cc
  - M/30 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>……………12.0cc
  - NaCl……………0.5g
- [ II ] 固型斜面部
  - 各卵黄抽出物と20%寒天加 Buffer 食塩水とを充分混和、斜面とする。
  - 混合比率は、卵黄アルコール溶液 10cc に対し 20cc の割合を基準とする。
- [ III ] 米澱粉
  - 120°C 1時間滅菌 3回
  - 各培地に約 10mg 加える。

註 [I][II]の滅菌は10ポンド30分の高圧蒸気滅菌を行う。

液体部は、pH 7.6の Buffer saline のみを約2.5 cc 宛加え、米澱粉は前述の如く 10 mg~20 mg 加えた。

斜面部に使用した寒天は、海宝化学株式会社製の精製板寒天であつて、比較的夾雑物の少ない製品であつた。

5) 各培地による培養実験法：

一般に赤痢アメーバは、培地組成の非常に異なつた培地に移植した場合、その増殖は当初かなり不安定となる事が多い、それ故にWB培地に増殖したアメーバを用いて直ちに上述の各エキスをを用いた培地に移植試験を行うことは、適当な方法とは考えられない。そこでWB培地に増殖したアメーバを、一旦Nエキスをを用いたN培地に移植し、20代以上継代培養して充分培養可能なることを確かめ、この培地に増殖したアメーバを用いて、以下の各エキス及び米澱粉を用いた培地の培養実験を行つた。

又アメーバの移植継代には、ガラスピペットを用いるため、元の培地から持込まれた成分がかなり影響を与えるものと考えられるので、3日乃至4日毎の移植継代により、少なくとも20代以上の継代培養を行い、培養の可否を決定し、且時期を変えて、少なくとも3回以上同様の培養実験を反復しその成績を判定した。

実験成績

1) 卵黄各割分及び培地構成物質の蛋白質、有機窒素その他の二三の反応について

上述の各エキス及び澱粉は、その抽出法より見て、大部分の有機窒素成分、特に蛋白質系の成分が除かれているものと考えられる。そこでこれ等の全部及び培地に使用した寒天について予備検査として、ラッセニユ反応、ピウレット反応及びニンヒドリン反応を行い、蛋白、アミノ酸、及びその他の有機窒素の有無を検討し、更に一部については、サルコウスキー反応、アンモニア性硝酸銀反応等を行つて、ステリン体、糖質の有無についても検査した。

ピウレット反応、ニンヒドリン反応、アンモニア硝酸銀反応等の場合には、試料が少量で且水に不溶のものが多いため、適当な溶媒に溶かし、濾紙上に滴下して発色せしめる方法を併用した。

その成績は一括して第7表に示したが、N<sub>2</sub>、N<sub>0</sub>、A、cf、Dcf、Sの各エキス及びC澱粉、寒天等には、上述の各反応を陽性にする程の有機窒素その他が存在しないものと考えられる。(但し大量を用い濃縮した場合には陽性反応が見られた事があつた)。又N、N<sub>1</sub>及びE、E'等は完全に除かれなかつた少量の蛋白アミノ酸及び磷脂体等が各反応を陽性にしたものと考えられるし、a及びb

第7表 各培地成分に対する二三の呈色反応

反 応	ラッセニユ反 応	ピウレ ット反 応	ニンヒ ドリン 反応	其 の 他
N	+	±	++	アンモニア性硝酸銀反応 (+)
N <sub>1</sub>	±	-	+	同上 (-)
N <sub>2</sub>	±	-	±	
N <sub>0</sub>	±	-	±	同上 (-)
E	+	-	±	同上 (±)
E'	+	-	±	サルコウスキー反応 (+)
A	-	-	-	アンモニア性硝酸銀反応 (-)
cf	-	-	-	サルコウスキー反応 (±)
Dcf	-	-	-	サルコウスキー反応 (±)
S	-	-	-	サルコウスキー反応 (++)
a	+	+	++	
b	-	±	+	
c	-	-	±	
寒 天	-	-	±	

澱粉も又残存する少量の蛋白アミノ酸が陽性反応を示したもので、E'エキスは主としてその磷脂体が、ラッセニユ反応に関与したものと思う。E'及びAエキス以下の各エキスについて、コレステリンの反応である。サルコウスキー反応を試みたところ、E'及びDcfエキスは、弱陽性又は陰性であるのに比較して、他は強陽性であつた。この点よりE'及びDcf中には、游離のコレステリン等は殆んど無いか又は少量であつて、大部分は、A、cf、Sの各エキスに移行しており、一方磷脂体の大部分は、E'エキスに止まつているものと考えられる。

又糖質について行つた、アンモニア性硝酸銀反応は、表の如く、Nエキスのみ陽性で、A、cfの各エキス及びN<sub>0</sub>エキスには殆んど存在しない事を示している。

2) 卵黄各割分及び米澱粉による培養成績

あらかじめN培地に増殖せしめたアメーバを、他の各エキスを用いて作つたN<sub>0</sub>、N<sub>1</sub>…S培地と、3種の米澱粉とを種々に組合わせた20種類の培地に移植し培養を試みたが、第8表に示した様に、N<sub>0</sub>、N<sub>1</sub>、Dcf培地以外の各培地でa澱粉を用いた場合はすべて継代培養可能であつた。いずれの場合も培地組成が貧弱であるため、

第 8 表 各卵黄抽出成分培地と各種米澱粉を用いての培養成績

培地	米澱粉	a	b	c
N		++	+	±
N <sub>1</sub>		+	-	
N <sub>2</sub>		-	-	
N <sub>0</sub>		±		
E		++	+	-
E'		+	-	
A		++	-	
cf		+	-	
Dcf		-	-	
S		+	-	
WB2		+++	+++	+++

WB 培地に比較して増殖度が悪く最高増殖時間がやゝ遅れ、72 時間乃至 96 時間となる様であつたが、アメーバの運動その他は全く変わらず、各培地共に澱粉粒及び脂状の顆粒を摂取し、活潑に運動するアメーバが多数認められた。

ただ N<sub>0</sub> 培地での成績は、非常に不定であり、ある時は数代で継代不能となり、又ある時には 10 数代の継代が可能であつたのでかかる場合はその成績を表の如く ± と記載した。又 N<sub>2</sub> 培地でアメーバが増殖せず、他の培地によつて、継代培養が可能であつた点より、卵黄アルコール抽出物中に存在し、水に可溶性且一方 S エキスまで移行する様な極く微量のある成分が、赤痢アメーバの増殖に重要な役割を果すものと考えられたので、この点について、次節で更に詳しく検討を加えてみた。

この様に赤痢アメーバ Y 株は、a 澱粉を用いる事によつて、卵黄成分の内非常に微量な S エキスのみでも充分生育し、又一方主としてレチチン等を含むと考えられる E' エキスのみでも継代可能である事を認めた。ただし、Dcf 培地の成績が示す様に、これ等のエキス中より、コレステリンを除けば、アメーバの生育が見られなかつた点より、コレステリンは赤痢アメーバの培養に不可欠の要素と考えられる。

対照の目的で、培地斜面に各エキスを全く含まない寒天斜面のみの培地に、a 澱粉を加えてアメーバの培養を試みたが、アメーバは全く増殖しなかつた。

次に、脱脂、脱蛋白を行つた b 及び c 澱粉での成績は同じく第 8 表に表示したが、b 澱粉では、N 及び E エキス培地で培養が可能であつたが、他はすべて不成功であ

り、c 澱粉の場合は、すべての培地において培養に失敗した。これは、澱粉中に含まれる蛋白質ビタミン等の微量成分が、本実験の様な低栄養な培地では重要な要素と成るものと考えられる。対照として常に並行して行つた WB 2 培地では、各澱粉によつてアメーバの増殖に何等の差異をも認めなかつた。

cf 培地に各澱粉を加えた培地で、アメーバを 48 時間培養し、その培養液を 5000 回 20 分間充分遠沈してその上清を集め、この濃縮したものについて、ニンヒドリン反応を行つて見たところ、a 澱粉使用例では陽性であつたが、b, c 澱粉を使用した培地液では、弱陽性又は陰性であつた、これは後者の培地液には、アメーバの増殖に必要な程の蛋白アミノ酸等が含まれていない事を意味しそのために培養が不成功に終つたとも考えられる。

興味あるのは、a 澱粉を用いて、E 及び S 培地と、各エキスを全く含まない、寒天斜面と液体部のみの培地に N 培地中の Y 株の共棲菌のみを加えて 24 時間培養したが、その混濁度のみの比較では三者は全く差を認めなかつたが、それ等に一定量のアメーバを加えて更に 72 時間培養したところ、S 及び E 培地ではアメーバの増殖が見られたが、寒天斜面 a 澱粉のみの培地では、アメーバは増殖しなかつた。これは、各エキスは共棲菌の増殖には大した影響を与えないが、アメーバの増殖には必ず必要なものである事を示唆するものであろう。

### 3) 各割分の水可溶微量成分について

前節の成績より、卵黄アルコールエキス中に存在し、水に可溶性且 S エキスにまで移行する様な極く微量の成分が、アメーバの発育に重要な役割を演じている可能性があるが、著者の行つた様な抽出法では、最初の卵黄に多量の水分が存在するため、それ以後の分割に用いる各溶媒中に多少とも水と共に微量の水可溶性の物質が移行する事が考えられる。そこで、第 4 表に示した各エキスの内、N, E, E', A, cf, S の 6 種のエキスについて、更に水に可溶性成分と不溶性成分とに分け、特にその水可溶割分について、アメーバの発育及び培養に及ぼす影響を検討した。

6 種の内 N エキスは、“卵黄アルコールエキス” 40 cc より得た N エキスに水 50 cc を加え 4~5 時間よく振盪し、遠沈と濾過により上清と沈渣とに分ける。この操作を 5 回反復し、上清を全部集め (250 cc) 加温吸引により 5 cc にまで濃縮してその液を WN と名づけた。沈渣は第 4 表に示した N<sub>2</sub> に相当するものである。

他の 5 種は、一旦 10 cc のエーテルに溶解し、分液漏

斗は入れ水 50 cc を加えて充分振盪し分離せしめる。この操作を3回繰返えし、水層とエーテル層に分け、水層を集め (150 cc) 濃縮して 5 cc とし、エーテル層は加温によりエーテルを除き、第9表に示した様な、12種の分割

第9表 卵黄分割抽出法(2)  
各エキスの水による分割

卵黄エキス	水可溶物	水不溶物
N	WN	N <sub>2</sub>
E	WE	RE
E'	WE'	RE'
A	WA	RA
cf	Wcf	Rcf
S	WS	RS

を得た。これ等の分割を用いて前節と同様に培地を作成しその培養成績を検討した。使用した澱粉はすべて a 澱粉であつて、又水可溶成分を培地斜面に加える場合は、抽出操作中の減量を考慮して元のエキスに対して2倍の割合になる様にした。

以上の様にして得た12種の培地、及び水可溶部分と対応する水不溶部分とを混合して作成した6種の培地、計18種の培地によりアメーバの培養を行つたが、前者の12種の培地では、長くても数代でアメーバの増殖は停止し、培養が不成功に終つたが、後者6種においてはいずれもアメーバは増殖し各回共継代培養が可能であつた。

以上の成績より、アメーバは、水可溶成分及び不溶部分のいずれを欠いても増殖しないものと考えられる。

そこで、この水可溶部分について更に追求するために特に Wcf 部分を選び、これを更に濃縮して1ccの液とし、それについて、ニンヒドリン反応、ビウレット反応、アンモニア硝酸銀反応、モリシュ反応を行つたが、ニンヒドリン反応及びビウレット反応が陽性であつたが、他は陰性であつた。この点より、この水可溶部分は、蛋白アミノ酸が主体であると考えられる。そこでこの液を更に濃縮して一部を、一次元フェノール・水(4:1)、二次元ブタノール・水・醋酸(2:4:1)により二次元ペーパークロマトグラフィを行つたところ、三つのニンヒドリン陽性のスポットを得た。(Rf. は各各一次元0.81, 0.73, 0.36, 二次元0.204, 0.29, 0.31)。

この3種の物質の、アメーバ増殖に及ぼす影響を更に検討するために、残余の液を全部同様の操作によつて濾紙上に展開し、充分に乾燥した後各々に対応する部分を

広く切り取り、再び水に溶解して集め、それ等3種の成分を別個に、又は3種を混合して種々の濃度に Rcf 培地の斜面部に加えて培養実験を試みたが、すべて培養不成功に終つた。この結果より、アメーバの増殖には、水に可溶性、且蛋白アミノ酸、糖質以外の何かの成分が必要な様に考えられる。

又前述のcfエキスよりコレステリンを除いた Dcf エキス培地に、Wcf を加えて培養を試みたが、アメーバの増殖は見られなかつた。

なおSエキスについて、更にクロマトグラフ吸着法を応用して有効物質の分離を試み、それ等によりアメーバの培養を行つて見たが、すべて成功しなかつた。

#### 4) コレステリン、レチチン加培地の検討

著者の抽出した卵黄各エキス中特に cf, S エキスには主としてステリン体、リポクローム、脂肪酸、溶脂ビタミン類が含まれ、その内コレステリンがアメーバの発育に不可欠である事は、Dcf 培地での成績より想像される。

他方E'エキスには、主としてレチチンが含まれ、その他少量のコレステリン等が存在するものと思われる。コレステリンについては、Synder & Meleny (1943), Rees *et al.* (1944), Hansen & Anderson (1948), Griffin *et al.* (1949), 田辺(1931)らがアメーバの増殖に必要であろうと想定しており、又レチチンに関しては Nelson (1950) が 20 mg Percent の濃度がアメーバの増殖に最適であると報告している。

すでに述べた著者の実験成績からも、これ等2者の必要性は充分推定されるので、各報告を参考として、固型部又は液体部に種々の量のコレステリン、レチチン(卵黄製)等を加えた6種の培地を作り、更にコレステリンを除いた Dcf エキスに再びコレステリンを加えた培地等、第10表に示した7種の培地について培養実験を行つたが、最後の Dcf+C 培地以外はすべて培養不能であつた。

この結果より、アメーバはコレステリン、レチチンのみではその増殖は不可能であつて他の何等かの物質が必要である様に考えられる。又 Dcf+C 培地においても、アメーバの増殖は悪く、継代が非常に困難であつた。これは、加えるコレステリンの量も問題となるが、加えられたコレステリンがどの様に培地内で分散しているかという点も大いに関係しているのではなからうか。

5) 各培地におけるY株アメーバの共棲菌と嫌気性培養について

第 10 表 各種コレステリン・レチチン加培地と培養成績

培地名	固 型 部			液 体 部		成 績 及 び 備 考
	Buffer	食塩水	+	Buffer	食塩水 +	
Ch <sub>1</sub>	Buffer	食塩水	+	Buffer	食塩水 +	1~2 代
Ch <sub>2</sub>	同	上	+	Buffer	食塩水	1~2 代
L <sub>0</sub>	同	上	+	Buffer	食塩水	1~2 代
L <sub>1</sub>	同	上	+	Buffer	食塩水 +	1~2 代
L <sub>2</sub>	同	上	+	Buffer	食塩水	Nelson 氏等の報告によると(+)
CL	同	上	+	Buffer	食塩水 +	1~2 代
Dcf + C	同上 +	Dcf +	+	Buffer	食塩水	± 10~18代

第 1 篇において述べた様に、赤痢アメーバの培養にはその共棲菌が問題になるのは当然である。そこで実験に用いた Y 株アメーバの WB 培地における共棲菌と、各卵黄成分培地において 20 代以上継代した後の共棲菌とを、それぞれ、ブイヨン、血液寒天、T. G. C. 培地により分離し、その各菌について検討した。

その結果、Y 株は元の WB 培地に継代されている場合常に 5 種の菌を随伴し、それ等は各々仮称 Y<sub>1</sub>(グラム陽性桿菌)、Y<sub>2</sub>(グラム陰性桿菌)、Y<sub>3</sub>(グラム陽性球菌)、Y<sub>4</sub>(グラム陽性小球菌)、Y<sub>5</sub>(グラム陰性小桿菌)であるが、卵黄抽出成分による培地、特に cf 及び S 培地では Y<sub>3</sub>、Y<sub>4</sub>、Y<sub>5</sub> の 3 種は消失し、Y<sub>1</sub> 及び Y<sub>2</sub> の 2 種のみと成っていた。

実験の都合上、後者の Y<sub>1</sub>、Y<sub>2</sub> の 2 種について、各種の解糖試験、インドール産生、メチレンブラウ還元、M. R. 試験、Voges-proskauer 反応、カタラーゼ産生等について検査を行い同定を試みたが、各種の成書を参照しても適確に概当する菌株が見当らず、強いて近似の性状を示すものを探せば、Y<sub>1</sub> 菌は Alkaligenes 属に、又 Y<sub>2</sub> 菌は Paracoli 属に各々近似している様に思える。

この 2 種の菌について興味ある点は、Y<sub>1</sub> 菌はペニシリン及びストマイ共に感受性を示し、1 cc に各々 1000 単位及び 1 mg 位でその増殖が抑えられたが、Y<sub>2</sub> 菌はストマイに対してはかなり抵抗を示したことである。そこで Y<sub>1</sub> 菌をストマイで抑制し、Y<sub>2</sub> 菌のみの共棲する培養を得たいものと考え N 培地の液体部 1 cc に対してストマイ 1 mg を加えて培養したが、アメーバは増殖しなかつた。元来アメーバはストマイ、ペニシリン等に対しては

かなり抵抗性を有するものであつて、ストマイがアメーバに作用したのでは無く、Y<sub>1</sub> 菌が抑制されたためにアメーバが増殖しなかつたものと思える。この点より、アメーバ Y 株の増殖には、Y<sub>1</sub> 菌又は Y<sub>1</sub>、Y<sub>2</sub> 菌の共棲が必要であるものと考えられる。

さて、第 1 篇において、赤痢アメーバ Y 株は嫌気性の条件が望ましく、且共棲菌としては *Cl. welchii* が好適である事を明らかにした。そこで、N 培地で 2 種の共棲菌を有するのみとなつたアメーバを、更に N 培地の液体部に 0.1% 塩酸チステイン及び流動パラフィンを加え嫌気性とし、且肝肝ブイヨンに増殖した *Cl. welchii* を充分水洗して加える事により嫌気性培養を行つたが、各回共 24 時間目には、かなり増殖したアメーバが見られたが、48 時間以後には全くその姿を消し、継代培養はすべて不成功に終つた。これは、本実験に用いた様な低栄養の培地で且嫌気条件では、Y<sub>1</sub>、Y<sub>2</sub> 菌及び *Cl. welchii* がアメーバの生育に必要な程度の増殖が起らなかつたためであろうと考えられる。この事より、赤痢アメーバの培養には、嫌気性条件は必要ではあるが、しかし常に活潑に増殖する様な菌の存在が必要であり、且共棲菌は多くの研究者の主張する如く、ただ培地の酸素分圧を下げるのみならず、アメーバの増殖に何等かの役割を演じている事を改ためて確認した。

考 察

第 1 篇においては、WB 培地を中心として、主に栄養価の高い培地について赤痢アメーバの培養条件及び発育要素を検討したが、本篇は逆に極度に培地成分を単純化した状態で発育要素等を推定するため、卵黄より得られ

る少量の脂質を中心に培地を作成し、その中の発育要素について考察を行い、他方米粉中の水に可溶な微量成分の効果についても追求した。

卵黄中には、赤痢アメーバに対する多くの促進物質が含まれている事は考えられるが、特に溶脂性の物質に関しては、ただ Nelson (1947, 1950) らが二三の検討を行っているのみで、他にあまり詳細な実験を行つた例は見られなかつた。本編の実験はこの点を更に詳しく追求したもので、純培養の出来ない赤痢アメーバの性質上その実験手技の困難から、その成績は未だ完全とは云えないが、しかしこの実験によつて一応所期の目的を達し得たものではないかと思う。

卵黄の溶脂成分中赤痢アメーバの発育増殖に必要な物質又は促進すると思われる物質は、アルコール、エーテルに可溶で、アセトンに不溶な物質E'エキスと、アセトンにも可溶で更にクロロホルムに移行する成分内の非鹼化物Sエキスに多く含まれる事を確認した。この内前者E'エキスには主としてレチチン及び少量のステリン体その他が含まれるものと考えられ、他方Sエキスには、多くのステリン体、リポクローム、脂肪酸その他を含むものと推定される。これ等の点より、他の寄生原虫類で明らかにされている発育要素を参考として一応コレステリン、レチチン並びに少量のリポクローム等がアメーバの発育を促進する物質ではないかと想像される。特にコレステリンが不可欠の物質である事は、コレステリンを除いた Dcf 培地で全くアメーバが増殖せず、これに適量のコレステリンを加えた場合のみ増殖が見られた点より充分理解されるものである。

このコレステリンについては、Synder & Meleny (1943) が最初に赤痢アメーバの培養に重要な役割を果す事に注目し、これに続いて、Reest *et al.* (1944) らは、コレステリンのみでは、アメーバを増殖させる作用はないが、ビタミン、卵白等の附加によつてアメーバの増殖が旺盛となり、その培地からコレステリンを除けば増殖が見られなくなると報告している。コレステリンの作用については種々の意見があり未だ定説はないが、Lwoff (1951) は彼の綜説において、培地中に出来る有害な脂肪酸を中和するものであろうと推論しており、又逆に Griffin *et al.* (1949) らは、一定の脂肪酸を加える事によつて、コレステリンの作用が強化されるとも述べている。しかしいずれもコレステリンが直接アメーバの栄養を司るものとは考えていない様であつて、コレステリン以外に更に何等かの栄養物が必要であらうと推定している。

著者の得たSエキスは勿論コレステリン以外にリポクロームも可成り含まれ、その他の微量成分と共に、アメーバの増殖に重要な役割を果しているものと推定されるが、しかし卵白中の成分は何等含まれず、Rees (1944) らの云う様に、卵白中のある成分(決定されていない)が必要とする成績とはやゝ異なり興味のある点である。

レチチンに関しては、Nelson が1950年、卵黄中のアメーバ増殖促進物質であると指摘し、20 mg percent の濃度が至適であらうと報告した。本篇の成績においてもその有効性は充分認められ、コレステリンの如く不可欠の物質ではないが、レチチンを除いたA培地でのアメーバの増殖度は、レチチンを含むE培地に比較して明らかに不良であつた点からも推察される。

いずれにしても、コレステリン、レチチン、リポクローム等のみではアメーバの増殖に決して見られず、これ等に更に米粉及び適量の蛋白アミノ酸、ビタミン類の共存が必要である事は諸家の一致した意見であつて、著者の実験成績とも一致するところである。

更に興味のあることは、実験3に示された成績であつて、各エキスを充分水洗し、水可溶物と不溶物とに分けると、そのいずれの一方を欠いても、アメーバが増殖しなかつた点である。その上水可溶物中、ニンヒドリン反応及びモリシユ反応陰性の劃分、即ち、蛋白アミノ酸、及び糖質以外のものと考えられる微量の成分が、アメーバの増殖に重要な役割を果している様に思われた。これは従来の報告に見られなかつた事であり、この微量成分を同定するため種々の試みを行つたが、残念ながら今のところ全く不明であつて、この点今後に残された大切な問題であらう。

赤痢アメーバの培養には、本来嫌気性の条件が必要である事はすでに述べたが、本篇の実験5における嫌気性培養はすべて失敗している。この理由として考えられる事は、嫌気性の条件が直接赤痢アメーバの増殖を抑制したのではなく、共棲細菌 Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub> 菌が嫌気性では十分に増殖をしめさず、又 N培地の様な低栄養の培地は、*Cl. welchii* の発育に不適当であつたため、アメーバの発育増殖を誘起するまでに至らなかつたものと考えられる。故に若し低栄養でも十分に増殖する様な適当な嫌気性細菌を加えるならば、アメーバの増殖も可能であつたかも知れない。

以上の成績はすべて培地に無処置のa澱粉を用いて行つた場合であるが、このa澱粉を脱蛋白したb及びc澱粉を使用した場合は、実験2の第8表に示された様に、

殆んどすべての培養において失敗している。これは、培地を構成する各種の卵黄劃分及び寒天には殆んど窒素源が無く、培地に増殖するアメーバ及び共棲菌は、その窒素源及び糖質等はすべて米澱粉より得ているものと考えられる。従つてこの重要な成分の一部を除かれたb及びc澱粉ではアメーバの増殖が見られなかつたのであろう。

米澱粉は、Dobell & Laidlaw (1926) らによつて初めて赤痢アメーバの培養に利用されて以来、1, 2の例外を除いては、すべての培地に使用され、まさに必須の培地成分であるとされている。そうして、若し澱粉の代りに可溶性の含水炭素、例えばグルコース、マルトース等を用いた場合は、アメーバよりも先に共棲菌がそれらを消費増殖し、そのため培地条件が不利になつて、アメーバの増殖が見られなくなる。これに反して澱粉は不溶であるため細菌に摂られるより前にアメーバの体内に取込まれ、アメーバに必要な含水炭素は充分供給され且培地条件の悪化も来さないであろうと考えられて来た。この推定は一応もつともな考ではあるが、本篇に述べた成績から、更に米澱粉は、ただ単なる含水炭素の供給源のみならず、重要な蛋白質の提供者となつている事がわかる。この様な事は従来の高栄養培地では全く問題にされなかつたことであつたが、本篇における様な低栄養の培地における培養実験においてはじめて明らかにされた点であり、赤痢アメーバの発育要素研究に一新知見を加えたものであると考える。

## 結 論

1) 本来5種の共棲菌を有する赤痢アメーバ山神株を卵黄抽出成分による培地に長期継代培養することにより3種の菌は消失し、2種の桿菌のみとなつた。

2) 卵黄の各種成分中、赤痢アメーバの増殖に必要な物質は、アルコール、エーテル、アセトンを経てクロロホルムに移行する部分の内、非鹼化物に多量に存在することを確認した。

3) コレステリン、レチチン、リポクローム等は赤痢アメーバの増殖を促進する作用を有する様であり、その内、特にコレステリンは赤痢アメーバの培養には不可欠の要素であると考えられる。

4) 赤痢アメーバは、コレステリン及びレチチンをそれぞれ多量に含むと考えられる卵黄劃分と米澱粉の存在により増殖するが、コレステリン、レチチン及び米澱粉

のみでは生育しない。

5) 上記卵黄抽出成分中、水に可溶な物質で且ニヒビリン反応及びモリシユ反応陰性の成分が特に赤痢アメーバの増殖に必要と考えられる。

6) 米澱粉は、赤痢アメーバに対する単なる含水炭素の供給源のみならず、重要な蛋白質その他の供給源でもある。

終りに臨み、御校閲を賜つた森下薫教授並びに終始御指導と御校閲を賜つた猪木正三教授に対して深く感謝すると共に、実験を進めるに当り、種々の御助言と御援助を御与え下さつた、大阪大学医学部薬学科川崎近太郎教授、熊本大学医学部生化学教室内田教授（元阪大医学部生化学教室）及び奈良医科大学細菌学教室北浦講師に対して厚く感謝します。

本論文要旨は、第6回及び第9回日本寄生虫学会近畿支部会、第21回及び第22回日本寄生虫学会総会において発表した。

## 文 献

- 1) Boeck, W. C. and Drbohlav, J. (1925): The cultivation of *Entamoeba histolytica*. Am. J. Hyg., 5, 371-407. —2) Cang, S. L. (1942): Studies on *Entamoeba histolytica*. I. Effect of hydrogen-ion concentration on encystation of *E. histolytica* in culture. Am. J. Trop. Med., 22, 471-485. —3) Chang, S. L. (1943): Studies on *Entamoeba histolytica*. II. Observations concerning encystation, mutation, and excystation of *E. histolytica*, and on the longevity of culture induced cysts in various fluids and at different temperatures. J. Infect. Diseases, 72, 236-241. —4) Chang, S. L. (1946) Studies on *Entamoeba histolytica*. IV. The relation of oxidation-reduction potentials to the growth, encystation and excystation of *E. histolytica* in culture. Parasitology, 37, 101-112. —5) Chinn, B. D., Jacobs, L., Reardon, L. V. & Rees, C. W. (1942): The influence of the bacterial flora on the cultivation of the *Entamoeba histolytica*. Am. J. Trop. Med., 22, 137-146. —6) Delamater, J. N. and Hallman, F. A. (1926): Studies on the culture of *Entamoeba histolytica*. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 65, 26-29. —7) Deschiens, D. (1933): Influences hématies et de l'hémoglobine des mammifères sur les culture d'amibes dysentériques. Bull. Soc. Path. Exot., 26, 999. —8) Dobell, C. and Laidlaw, P. P. (1926): On the cultivation of *Entamoeba histolytica* and some other entozoic amoeba. Parasitology, 18, 283-318. —9) Griffin, A.



- M. and Maccarten, W. R. (1949) : Sterols and fatty acids in the nutrition of entozoic amoebae in culture. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 72, 645-648. —10) Hansen, E. L. and Anderson, H. H. (1948) : An essentially synthetic liquid for *Entamoeba histolytica*. Parasitology, 39, 69-72. —11) 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, 37, 2533. —12) 猪木正三・永井光・高田季久・北浦敏行 (1950) : 赤痢アメーバの培養に関する研究. 第1報 余等の所謂全処加培地に就て. 阪大医誌, 2, 71-84. —13) Inoki, S., Nagai, A., Kitaura, T., Takada, S. and Nakabayashi, T. (1950) : Studies on the new culture method of *Entamoeba histolytica*. Med. J. Osaka Univ., 2, 53-72. —14) Inoki, S., Takada, S. and Nakabayashi, T. (1953) : New culture mediums for *Entamoeba histolytica*. Am. J. Clin. Path., 23, 197-199. —15) Jacobs, L. (1941) : Oxydation-reduction potentials in relation to the cultivation of *Entamoeba histolytica*. J. Parasitol., 27, (suppl) 31. —16) Jacos, L. (1947) : Further studies on the maintenance of culture of *Entamoeba histolytica* without viable bacteria. J. Parasitol., 33 (suppl) 20-21. —17) Jacobs, L. (1950) : The substitution of bacteria in culture of *Entamoeba histolytica*. J. Parasitol., 36, 128-130. —18) Jacobs, L. (1950) : Oxidation-reduction potential in the cultivation of *Entamoeba histolytica*. Am. J. Trop. Med., 30, 803-815. —19) Karlsson, J. L. (1952) : Studies on the physical properties of growth factor for *Entamoeba histolytica*. Am. J. Trop. Med Hyg., 1, 548-551. —20) 片岡猛, 中林敏夫, 高田季久, 尾形義人 (1956) : 口腔内原虫の疫学的研究, 大阪大学歯学雑誌, 1, 280-285. —21) Lwoff, A. (1951) : Biochemistry and physiology of protozoa. Academic Press Inc., VI. New York, 548-551. —22) Nakamura, M. and Anderson, H. H. (1951) : Effect of heat-treatment on the respiration of *Trypanosoma cruzi* used for the cultivation of *Entamoeba histolytica*. Am. J. Trop. Med., 31, 438-441. —23) Nakamura, M. (1952) : The significance of oxidation-reduction potentials in the cultivation of *Entamoeba histolytica*. Kitasato Arch. Exptl. Med., 25, 47-50. —24) Nakamura, M. (1953) : Nutrition factor for *Entamoeba histolytica*. Bact. Rev., 17, 189-212. —25) Nakamura, M. (1955) : Growth factor for *Entamoeba histolytica*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 89, 680-682. —26) Nelson, E. C. (1947) : Alcohol extract medium for the diagnosis and cultivation of *Entamoeba histolytica*. Am. J. Trop. Med., 27, 545-552. —27) Nelson, E. C. (1950) : Substance testing and the physical composition of *Entamoeba histolytica*. J. Parasitol., 36 (suppl) 20. —28) Phillips, B. P. (1950) : Cultivation of *Entamoeba histolytica* with *Trypanosoma cruzi*. Science., 111, 8-9. —29) Phillips, B. P. and Rees, C. W. (1950) : The growth of *Entamoeba histolytica* with live and heat-treated *Trypanosoma cruzi*. Am. J. Trop. Med., 30, 185-191. —30) Rees, C. W., Bozicevich, J., Reardon, L. V. and Daft, F. S. (1944) : The influence of cholesterol and certain vitamins on the growth of *Entamoeba histolytica* with a single species of bacteria. Am. J. Trop. Med., 24, 189-193. —31) 斎藤誠 (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. —32) Shaffer, T. G. and Frye, W. W. (1948) : Studies on the growth requirements of *Entamoeba histolytica*. I. Maintenance of a strain of *Entamoeba histolytica* through one hundred transplants in the absence of an actively multiplying bacterial flora. Am. J. Hyg., 47, 214-221. —33) Shaffer, T. G., Walton, T. G. and Frye, W. W. (1948) : Studies on the growth requirements of *Entamoeba histolytica*. II. Preliminary observation on the cultivation of *E. histolytica* in a modified theioglycolate medium. Am. J. Hyg., 47, 222-225. —34) Shaffer, T. G., Ryden, F. W. and Frye, W. W. (1948) : Studies on the growth requirements of *Entamoeba 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. —35) Shaffer, T. G., Ryden, F. W. and Frye, W. W. (1949) : Studies on the growth requirements of *Entamoeba histolytica*. IV. Further observation 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. —36) Snyder, T. L. and Meloney, H. E. (1943) : Anaerobiasis and cholesterol as growth requirements of *Entamoeba histolytica*. J. Parasitol., 29, 278-284. —37) 田辺操・千葉英一 (1928) : 赤痢アメーバの一新培養法に就て. 東京医事新誌, 2586, 1787-1790. —38) 田辺操・桑原直徳 (1931) : 培養基内に於ける大腸アメーバの發育に関する研究, 東京医事新誌, 2709, 8-16. —39) 山川速水 (1953) : 赤痢アメーバ増殖に及ぼすウエルシ菌の影響に就て. 寄生虫学雑誌, 2, 40-44. —40) 山本義男 (1938) : アメーバ赤痢に関する研究. 第5, 赤痢アメーバの培養に就て. 其3, 諸種物質の赤痢アメーバに及ぼす影響, 満洲医誌, 26, 937.

### Summary

In this part of experiments, several growth factors for *Entamoeba histolytica* were followed up in both egg yolk and rice starch. Consequently, the following results were obtained.

1) Y-strain of *E. histolytica* used for this series of experiments was accompanied by five different species of bacteria, but three of these could not grow in the modified alcohol-extracted egg yolk medium.

If the other two species capable of growth in that medium were eliminated addition of antibiotics, the amoeba stop their growth.

2) Several fractions of egg yolk were extracted by using alcohol, ether, acetone and chloroform in series. After tested them, it was revealed that

the growth factors were moved into the final unsaponified and the acetone-insoluble parts either.

3) It was considered that cholesterol, lecithin and lipochrom stimulated the growth of the amoeba, and cholesterol was indispensable for it. However, cholesterol or lecithin alone has no such effect.

4) Some constituents of the alcohol extract of egg yolk, which are soluble in both organic solvents and water, are indispensable for the growth of the amoeba. Further experiments disclosed that they were neither protein nor carbohydrate.

5) It was known that rice starch supplies not only carbohydrate but also protein and vitamins towards the amoeba.