

赤痢アメーバの培地内被胞に対する 培地の栄養状態の違いの影響

上田 春人

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35年4月15日受領)

緒 言

赤痢アメーバが腸管内で被胞する原因については、未だ不明である。培地内で被胞することは時に経験されることであるが、この要因についても充分解明されていない。この原因を追求し、また実験に必要なときに任意にチステを入手する目的で、古くから多くの実験が試みられている。

これらの実験は培地内の栄養型に何等かの刺戟を与える方法で、その刺戟としては(1)温度の変化(Culter, 1918; Dobell & Laidlow, 1926; 山田, 1955), (2)水素イオンの濃度の変化(Dobell & Laidlow, 1926; Craig, 1936; 山岸, 1952), (3)滲透圧, 大気圧, 培地の塩類濃度の変化(Dobell & Laidlow, 1926; Zuckerman & Meloney, 1945), (4)培地へ化学的物質その他種々な物質の添加(Culter, 1918; Dobell & Laidlow, 1926; 山田, 1955), (5)種々異つた培地への移植あるいわ米粉の添加の変更(Dobell & Laidlow, 1926; Cleveland & Sanders, 1930; Stone, 1935; 谷口, 1939; Kessel *et al.*, 1944; Everitt, 1950; Balamuth 1951; 山田, 1955; 森口, 1956)等がある。

これらの実験であるものはチステの形成に成功し、あるものはその目的を達していない。特に培地の変更は比較的成績が良く、Balamuth は一度濃度の低い Balamuth 培地に移植して48時間培養の後、肝臓エキスを含んだ高濃度の培地に移植することにより常に50%以上のチステ形成を見ている。私も栄養状態の異なる培地の間で移植を行つているときにチステが形成されている事実を再三遭遇した。これらのことから培地の栄養状態の変化が赤痢アメーバの被胞に重要な役割を演ずるのではないかと想像された。然し前記の諸実験は培地の栄養状態の変化だけではなく、寒天、肝臓エキス等の添加により、成分の変化とゆう因子も加わつているので、厳密には培地の栄養状態の変化だけでは考え難い。そこで私

は Balamuth 培地を使い、その卵黄成分の濃度だけを変え、その組成は相似かよつた幾つかの培地を作り、その間に種々移植を行い、チステの出来具合を観察し、また Balamuth とほぼ同じ方法でチステを作りその出来方について比較した。

材料および方法

供用赤痢アメーバの株

H株およびS株で、いづれも古くから教室において継代培養されていたものである。

使用培地

次の様な培地を使用した。

1) Pepton 加 Balamuth 培地 (B+P)

普通の Balamuth 培地で、継代にもこの培地を使用した。製法の概略は、鶏卵4個を煮沸凝固させ、卵黄を取り出し粉末となし、これに0.8%の食塩水125ccを加える。これを80°C 20分間加温し、有効成分を浸出させる。次いで濾紙を通して吸引濾過し、濾液に更に0.8%食塩水を加えて全量を125ccとする。これを15ポンド20分間高圧滅菌して、1昼夜冷蔵庫に保管、透明部を吸引し、 $\frac{1}{15}$ Mol 燐酸緩衝液 (pH 7.5)を同量加え、さらに Pepton を0.5%の割に加えて後 pH を7.4に補正する。これを試験管に4cc宛分注し、再び滅菌して供用した。

2) Pepton 加 $\frac{1}{2}$ 濃度 Balamuth 培地 ($\frac{1}{2}$ B+P)

卵黄成分を2個としたほかはすべて上記と同じ様にし、それに Pepton を0.5%の割に加えたもの。

3) 2倍濃度 Balamuth 培地 (2B)

卵黄成分を8個とし、他はすべて1)と同様にして作つたもの。但し Pepton は加えない。

4) Pepton 加2倍濃度 Balamuth 培地 (2B+P)

上記2B培地に Pepton を0.5%に加えたもの。pH はやはり7.4に補正した。

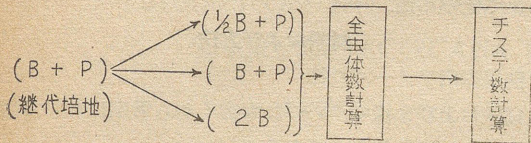
5) Balamuth の被胞培地 (2B+P+L)

Balamuth の被胞培地に準じて作ったもので肝臓エキスとしては、牛肝臓の浸出液を使用した。牛肝臓 100 g を 0.5% 食塩水で 1 時間浸出し、濾紙で濾し、この濾液に蒸発で減じた水分を補なわないうちに、 $\frac{1}{4}$ Mol $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ を 6.4 cc, 1 Mol K_2HPO_4 を 7.15 cc および 1 Mol KH_2PO_4 0.45 cc を加え、更に蒸留水を加えて 100 cc とする。これに 3% の割に寒天を加えて溶解し、pH を 7.4 に補正する。これを 3 cc 宛試験管に分注し 120°C 20 分間滅菌し、斜面にして固める。この上に上記の Pep-ton 加 2 倍濃度 Balamuth 培地 5 cc を加注したもの。

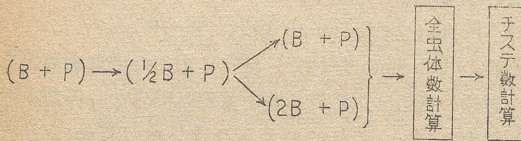
移植培地の組合せ

次の如く組合せた。

1) 継代培地よりの移植



2) 被胞前培地に移植の後高濃度培地へ移植



3) Balamuth 法に準じた移植

$(B + P) \rightarrow (\frac{1}{2}B + P) \rightarrow (2B + P + L)$

移植の際上記 2), 3) の $(\frac{1}{2}B + P)$ への移植の場合を除きすべて少量の米粉を添加した。

移植の方法

移植は 48 時間 37°C の孵卵器内で培養した後、培養液の上部約 2 cc をピペットで吸引して捨てた後、残部をよくピペットで攪拌し、その 0.5 cc を新しい培地に移植した。

全虫体数およびチステ数の計算

それぞれの培地に移植後 48 時間目に、その培地の全量を計算し、その後ピペットで良く攪拌し、その一部を血球計算板にとり、栄養型、チステの区別なく全虫体数を計算し、培養基中の全虫体数を算出した。次いで残りの培養基に栄養型虫体を破壊死滅させる目的で蒸留水を加えて 4~5 回洗滌する。これを氷室に入れ、2~4 日の後液量を一定にして、全虫体数算出の場合と同様にしてチステ数を算出した。

第 1 表 チステの陽性回数、陽性率

被胞前培地	被胞培地	H 株			S 株		
		実験回数	陽性回数	陽性率	実験回数	陽性回数	陽性率
		%					
(-)	$\frac{1}{2}B + P$	18	6	33.3	11	2	18.2
	$B + P$	15	13	86.6	11	7	63.6
	$2B$	10	2	20.0	10	8	80.0
$\frac{1}{2}B + P$ (米粉なし)	$B + P$	14	7	50.0	16	11	68.8
	$2B + P$	14	5	35.7	16	8	50.0
$\frac{1}{2}B + P$ (米粉なし)	$2B + P + L$	6	1	16.7	10	5	50.0

成績

出来たチフステの数とは関係なく試験管内にチステが見られた回数およびその率、すなわち陽性率は第 1 表に示した。

一般的に見て H 株、S 株ともに比較的よくチステの形成が見られ、最高 86.6% 最低 20% で平均 H 株 46.4%、S 株 56.2% の陽性率であった。Balamuth の方法では少々成績が悪く、H 株では 16.7%、S 株で 50% の陽性率であった。

被胞前培地 ($\frac{1}{2}B + P$) を経て被胞培地に移植した場合と、継代培地から直接移植したものとは陽性率は H 株で被胞前培地を経由したもの 42.8%、経由しないもの 48.8%、S 株では前者は 59.3%、後者 53.1% で大差は認められず、被胞前培地へ移植した効果は認められなかった。

被胞培地の濃度の違いの影響は、一般に前後の濃度の差異が少ないものが陽性率高く、違いが大きくなる程低くなる傾向にあった。継代培地 ($B + P$) より移植の場合は同じ ($B + P$) へ移植したものが最高で 86.6%、次いで低濃度 ($\frac{1}{2}B + P$) で 33.3% で、高濃度 ($2B$) へのもの 20% で最低であった。S 株では ($2B$) 80%、($B + P$) 63.6%、($\frac{1}{2}B + P$) 18.2% で、($2B$) へのものが良かったが、($B + P$) との差は少く、($B + P$) と ($\frac{1}{2}B + P$) との間にはかなりの開きが見られる。被胞前培地 ($\frac{1}{2}B + P$) より移植の場合は両株とも濃度の違うほど陽性率が悪く H 株では ($B + P$) 50%、($2B + P$) 35.7%、S 株では ($B + P$) 68.8%、($2B + P$) 50.0% であった。

移植後 48 時間目に出来ているアメーバの数、チステの数およびチステの形成率を第 2 表に示した。アメーバの数はチステが見られた試験管に出来ていたアメーバの数の平均であり、チステ数は出来たチステの数の平均である。

第2表 培地内の全虫体数、チステ数および形成率

被胞前培地	被胞培地	H		株	S		株
		全アメーバ数 (平均)	チステ数 (平均)		チステ形成率	全アメーバ数 (平均)	
(-)	$\frac{1}{2}$ B + P	213,000	7,000	3.28%	215,000	150	0.07%
	B + P	367,000	149,000	4.05	382,000	5,400	1.41
	2B	920,000	7,700	0.84	800,000	3,500	0.44
$\frac{1}{2}$ B + P (米粉なし)	B + P	350,000	2,000	0.57	281,000	3,800	1.35
	2B + P	430,000	1,600	0.37	330,000	3,300	1.00
$\frac{1}{2}$ B + P (米粉なし)	2B + P + L	20,000	600	3.00	41,000	2,000	4.88

移植後48時間目に出来ているアメーバの数は両株とも明らかに移植された培地の濃度が高くなるほど多くなっている。また被胞前培地に移植して後被胞培地に移植した場合のアメーバの増殖は悪く、その平均値でH株では被胞培地を経ないもの500,000、経たもの390,000、S株では前者465,700、後者305,500であつた。Balamuthの方法ではアメーバの数は著しく少く、H株で20,000、S株で41,000で他の場合の $\frac{1}{10}$ 以下であつた。

出来たチステの数は何れの場合も比較的近い値であつたが、やはり移植前後の培地の濃度の差異の少ないものほど多く出来ていた。すなわち両株とも継代培地(B + P)より移植の場合は(B + P)へのものが多くH株では14,900、S株で5,400であり、次いで(2B)へのものH株で7,700、S株3,500で、低濃度($\frac{1}{2}$ B + P)への移植のものが最も悪くH株7,000、S株150であつた。被胞前培地($\frac{1}{2}$ B + P)より移植のものは(B + P)へのものH株1,600、S株3,300であつた。また被胞前培地経由の効果はH株は経由しないもの平均9,900、したも1,800で経由したものは相当に悪かつたが、S株では前者3,000、後者は3,550で著しい差はなかつた。

チステの形成率は以上の如く形成されたチステの数が比較的相似た値であつたので、出来たアメーバの数が多し程低い率となつている。然し形成率においてもやはり移植前後の栄養状態の変化が少ないほど高率となつており、H株の継代培地より移植のものでは(B + P)4.05%、($\frac{1}{2}$ B + P)3.28%、(2B)0.84%、S株のそれは(B + P)1.41%、(2B)0.44%、($\frac{1}{2}$ B + P)0.07%であり、($\frac{1}{2}$ B + P)より移植の場合はH株(B + P)0.57%、(2B + P)0.37%、S株(B + P)1.35%、(2B + P)1.00%となつている。Balamuthの方法では両株ともチステ形成率は高くなつているが、これは被胞培地に出来たアメーバの数が他に比して非常に少く、 $\frac{1}{10}$ 以下であつたので

チステ形成率は高くなつている。

考 按

被胞実験のうちでは Balamuth(1951)の方法は非常に高率のチステが形成されている。本実験をこれにくらべるとあまり満足すべき成績ではなく最高で僅かに4.05%であつた。Balamuthの方法に準じて行つた場合は多少チステ形成率はよくなつているが、出来たアメーバの数が少くチステの数も比較的少なかつた。山田(1954)、森口(1955)の成績に比較すれば大差はない結果であつた。

赤痢アメーバは一般に培地内では被胞しないが、時に何等の操作を加えないでも被胞していることがあることはすでに屢々報告されている(吉田, 1919; Dobell & Laidlow, 1926; 桑原, 1929)。本実験では何等操作を加えていない(B + P)より(B + P)への移植で、H株、S株ともにチステが認められ、然も陽性率、チステ形成率ともに高かつた。このことより両株は比較的チステ形成のおこりやすい状態にあり、またこの実験の終了後2カ月経つて再び種々操作を加えてチステの形成を試みたが、容易にチステの形成が見られなかつた点より、ちよつと実験の時期には比較的チステが形成されやすい状態にあつたのではないかと考えられる。

培地を変化させて被胞させんとする試みとしていくつかの実験がある。Dobell & Laidlow(1926)は米粉を加えない二層のRES培地に1~2代培養して後米粉を加えることにより被胞したと報告している。Cleveland & Sanders(1930)は肝臓浸出液を含んだ寒天斜面およびLoefflerの血清斜面に血清食塩水を加えたものに移植して被胞させておる。Stone(1935)は小麦粉を加えたロック液に移植してチステ形成を見、Kessel *et al.*,(1944)はClevelandのliver mediumに米粉を加えず移植した後、Clevelandの肝臓浸出液を含んだ寒天斜面に、血清加食

塩水を加した培地で最もよくチステ形成を見た報告している。Everitt (1950), Balamuth (1951) も肝臓浸出液を含んだ培地に移植することによりチステの形成を見ている。

これらの実験では移植前後の培地の成分の相違、栄養状態の違いがチステ形成の要因の如く見られる。然し主として成分の濃度のみを変化させてその栄養状態を異にした本実験では、チステの陽性率、形成率とも、前後の栄養状態の相違が小さいものが最も成績よく、違いが大きくなるほど陽性率、形成率とも低くなる傾向にあり、栄養状態の変化は逆の効果となつてあらわれた。

本実験ではたまたま両株とも何か他の要因で被胞しやすい状態にあり、その様な要因があるときは、環境の栄養状態の変化は被胞には不利に働き、被胞に対しては環境の栄養状態の変化は出来る丈少い方がよいのか、又は以上の諸氏の実験では、被胞の要因は栄養状態の変化ではなく、それ以外の要因例えば成分の変化とか、米粉の有無等が要因であるのかは尚検討を要するものと考えられる。

Balamuth は上記の実験でチステの形成に大切なことは被胞前培地で培養してアメーバの増殖をおさえて後、栄養に富んだ還元物質の多い培地に移植することであると述べているが、本実験では被胞前培地に移植することにより、むしろ陽性率、チステ形成率とも悪く被胞前培地の必要性ないし効果は認められなかつた。

Everitt (1950) (山田, 森口による) はチステの数は培地内に出来たアメーバの数に對数的に比例して増加すると述べており、森口 (1955) も同様なことを観察しているが、山田 (1954) は必ずしもその様な結果は得られなかつたことを報告している。本実験では培地の栄養状態が良くなるほどアメーバの増殖は良好であつたが、出来たチステの数は比較的相近い値であつたので、増殖のよいものほどむしろチステの形成率は悪く、Everitt の観察とは逆の成績となつている。

Balamuth に準じた方法では両株ともやゝおもむきを異にし、チステの形成率は比較的高かつたが、アメーバの増殖は著しく悪く他の場合の $1/10$ 以下であつた。これは肝臓エキスを含んでいるために、随伴細菌が著しく増殖しアメーバの増殖に不適当な状態になつたものと考えられ、随伴細菌の増殖状態もチステ形成に関係ある要因と考えられる。

チステを任意に作ることは仲々困難なことであり、同一方法で処理しても必ずしも同じ結果は得られず、また

同一研究者でも時期によりその成績に相違のあることは、環境の物理的变化、化学的变化、栄養状態ないし成分の変化、随伴細菌の影響等は単に間接的に、二次的要因であつて、その奥に更に何らかの重要な直接的要因があるのではないかと想像させる。

総括ならびに結論

赤痢アメーバの被胞化に対して、環境の栄養状態の変化が如何なる影響を有するかを検討するため、赤痢アメーバの2種の株を用い、卵黄浸出液を主成分とする Balamuth 培地で、その卵黄成分の濃度の違いを主とするいくつかの培地を作り、その間を種々移植し、48時間目に培地内にアメーバの見られた率、出来たアメーバ数、チステ数を観察し比較した。又 Balamuth の方法に準じて肝臓エキスを含んだ培地で同様な操作をして、その成績を比較した。

1. 本実験に使用した株は2種の株とも比較的良好に被胞した。特に何等の操作を加えなくとも被胞が見られたので、本株は特にチステが形成されやすい状態にあつたのではないかと考えられた。

2. 培地の栄養状態の変化が少いほどチステが見られた回数(陽性回数)が多く、従つて陽性率も高かつた。低濃度への移植と高濃度への移植とでは、株により相反する成績でどちらがよいか不明であつた。また培地の栄養状態の差異が大きくなるほど陽性率は低下した。

3. アメーバの増殖は培地の栄養状態が良くなるほど多くなつたが、チステの形成率はやはり栄養状態の変化がすくないほどよく、相違が大きくなるほど低下した。高濃度と低濃度とへの移植の場合のチステ形成率は両種株により相反する成績であつた。

4. 以上により培地内でのチステ形成に対して培地の栄養状態の変化は逆の効果があるものと判断された。

5. 被胞前培地の使用は陽性率、チステ形成率に対して悪い影響を与えた。

6. Balamuth の方法に準じて処理した実験ではアメーバの増殖は著しく悪く、形成されたチステの数も他に比して少なかつたが、形成率は比較的高かつた。

稿を終るに際し御指導、御校閲を戴いた松林久吉教授並びに浅見敬三助教授に深謝します。尙本論の要旨は第27回日本寄生虫学会総会にて示説した。

文 献

- 1) Balamuth, W. (1951): Biological studies on *Entamoeba histolytica*. III. Induced encystation

- in several mediums, including on account of a new procedure. *J. Inf. Dis.*, 88(3), 230-236.
- 2) Chang, S. L. (1942): Study on the *Entamoeba histolytica*. 1. Effect of hydrogen-ion concentration on encystation of *Entamoeba histolytica* in culture. *Am. J. Trop. Med.*, 22, 471-485.
 - 3) Craig, G. M. (1936): Relation of hydrogen-ion concentration to growth and encystment of *Entamoeba histolytica* in culture. *Am. J. Hyg.*, 23(1), 114-131.
 - 4) Dobell, C. & Laidlow, P. (1926): On the cultivation of *Entamoeba histolytica* and some other entozoic amoeba. *Parasitol.*, 18(3), 283-318.
 - 5) 桑原直徳 (1929): 培養赤痢アメーバの観察特に培養基内に於けるチステ形成並に発芽について, 朝鮮医学会雑誌, 19(10), 1259-1279.
 - 6) 森口千賀年 (1956): 赤痢アメーバの培地内被胞化の一方法と被胞におよぼす水素イオン濃度の影響, 日新医学, 43(10), 571-575.
 - 7) 谷口栄 (1939): アミーバ赤痢に関する研究, 第19, 培養基内に於ける赤痢アメーバ嚢子形成に関する知見補遺, 満洲医学雑誌, 30(4), 553.
 - 8) 山田英幸 (1955): 赤痢アメーバの培地内チステ形成 I. 種々なる培養条件がチステ形成におよぼす影響, 慶応医学, 32(6), 241-251.
 - 9) 山岸芳雄 (1952): 培養赤痢アメーバの被胞に関する実験的研究, 北里実験医学, 25(1), 55-60.
 - 10) 吉田一毅 (1919): 試験管内に於て赤痢アメーバ大形栄養期形より嚢子を形成せしむることに就て, 東京医学会雑誌, 33(5), 241-279.

EFFECTS OF NUTRIENTS UPON THE *IN VITRO* ENCYSTATION OF *ENTAMOEBA HISTOLYTICA*

HARUHITO UEDA

(*Department of Parasitology, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan*)

Encystation *in vitro* of *Entamoeba histolytica* has been studied by many investigators. A method reported to be successful by an investigator, however, does not give always the same successful results when tried by other investigators. Problems upon the encystation remains still to be solved.

In this study, Balamuth's medium was used as a basic medium in which some modifications were made as follows:

- 1) Balamuth + 0.5% pepton (B + P).
- 2) One half conc. of Balamuth + 0.5% pepton (1/2B + P)
- 3) Two folds conc. of Balamuth (2B).
- 4) Two folds conc. of Balamuth + 0.5% pepton (2B + P)
- 5) Two folds conc. of Balamuth + 0.5% pepton + liver extract (2B + P + L).

Amoebae growing in the stock cultures (B + P) were transplanted into each of these media and the number of tubes in which cysts were produced was counted and percentages were compared. Generally speaking, the transplantation from (B + P) to (B + P) gave the highest frequency of cyst production in one strain and the transplantation into (2B) gave the highest frequency in another strain.

The number of cysts produced in each tube was largest in the transplantation from (B + P) to (B + P) in both strains. The transplantation into media of different concentration seemed to give not good effects on cysts production, contrary to the report of Balamuth. The higher concentration of media usually gave better yields of trophozoites. The number of cysts, however, was not proportional to the number of trophozoites produced. The ability of cysts production seems to be much influenced by the strain of amoebae concerned and especially to the associated bacterial flora.