

Trichomonas vaginalis の純粋培養について

長崎大学風土病研究所病理部 (主任: 登倉 登教授)

松 尾 幸 子
まつ お さち こ

An Attempt to Obtain Pure Culture of *Trichomonas vaginalis*. SACHIKO MATSUO. Pathological Department, Research Institute of Endemics, Nagasaki University (Director: Prof. Dr. N. TOKURA).

(本編の要旨は、昭和37年11月3日(長崎)、日本寄生虫学会第15回南日本支部大会に於いて口演発表した。)

緒 言

Trichomonas の純粋培養については、従来理学的操作或は化学的処置により、*Trichomonas* 培養に随伴する細菌を除去しようとする幾多の方法が諸家によって実験されたが、遺憾ながら成功の域に達しなかった。しかるに、晩近に至って、sulfamine剤及び penicillin の出現を發端に相次ぐ抗生物質の発見により、化学的、生物学的、医学的応用についての業績の発表は、跡を絶つ事なく、眼醒ましい発展をなすとともに、*Trichomonas* の純粋培養についても抗生物質及び化学薬剤を利用して、*Trichomonas* 培養に随伴する細菌を培地から駆逐する実験が種々試みられた。抗生物質を応用しての *Trichomonas* 純粋培養の数々の実験のうち、ADLER & PULVERTAFT (1944) は septamide 及び penicillin (250u/cc) を併用して、*T. vaginalis* の無菌培養3例を得、TRUSSELL & JAHN (1945) は penicillin (500~1000 u/cc) を使用して、*T. vaginalis* の無菌培養8例に成功し、WILLIAMS & PLASTRIDGE (1946) は、同じく penicillin (100 Oxford u/cc) と streptomycin (100u/cc) を使用して、*T. foetus* の純粋培養を得ている。QUISINO & FOTEL (1946) は、streptomycin (25u/cc) と penicillin (10u/cc) を利用して、*T. vaginalis* の純粋培養に成功した。本邦に於いても、浅見 (1952) は、penicillin 及び streptomycin (2000u/cc) を用いて、*T. vaginalis* の純粋培養に成功した。山県 (1953) は、penicillin (1562u/cc)、streptomycin (6250 µg/cc)、aureomycin (3125 µg/cc) 及び homosulfamine (1:400) を用いて、*T. vaginalis* 及び *T. foetus* の純粋培養12例を得て

いる。浜田 (1953) は、penicillin 及び streptomycin (1000~2000u/cc) を用いて、*T. vaginalis* の純粋培養に成功している。又、成書によると、penicillin、streptomycin (1000~2000u/cc) で、*Trichomonas* の純粋培養が可能であることが唱われている。著者は、*Trichomonas* の研究の第一段階として、*T. vaginalis* の純粋培養を獲得する為に、諸家の追試を行ない、今回の成績を得た。

実 験 成 績

I *Trichomonas vaginalis* に随伴する細菌について

T. vaginalis 培養に伴う細菌を除去する目的で、抗生物質を利用した実験に着手した訳であるが、その随伴細菌の精確な同定及び性状は別として、細菌株数及びその性状の概略を知る必要があると考えられた。WB II 培養基 (処方後述) に、*T. vaginalis* の TK, TS, T3 株を約50代継代培養したものを使用して、それに随伴する細菌を普通寒天培地、血液寒天培地、heart infusion 変法培地 (林考案)、サブロー培地、肉汁ブイヨン等を用いて、好気性及び嫌気性 (ドライアイス法) に分離培養して検索し、表1の成績を得た。好気性及び嫌気性に分離せられた各細菌は、何れも G(+) 或は G(-) の桿菌及び球菌であって、しかも芽胞形成菌や真菌が1株も混在しなかったため、今使用せんとしている数種の抗生物質及び sulfamine 剤の単用又は併用によって除去されるであろうと思われる。実験の方針としては、*Trichomonas* 培養に抗生物質を単用せしめ、随伴細菌の消長を検索し、頑強に抵抗して生残する場合には、抗生物質の併用の処置を執る事

表 1 Trichomonas の 随 伴 細 菌 叢

	T K 株			T S 株			T 3 株		
好	G (+)	桿 菌	1 株	G (+)	桿 菌	1 株	G (+)	桿 菌	1 株
気	G (-)	"	2 "	G (-)	"	2 "	G (-)	"	2 "
性	G (-)	単球菌	1 "	G (-)	単球菌	1 "	G (-)	単球菌	1 "
菌	G (-)	双球菌	1 "	G (-)	双球菌	1 "	G (-)	双球菌	1 "
嫌 気 性 菌	G (-)	単球菌	1 "	G (-)	単球菌	1 "	G (-)	単球菌	1 "
	G (-)	双球菌	1 "	G (-)	双球菌	1 "			
計			7 "			7 "			6 "

備考：G (+)=グラム陽性， G (-)=グラム陰性

にした。実験計画の原則として、*Trichomonas* の発育を阻害することなく、しかもその薬剤濃度によって随伴細菌を殺滅する方法を講じた。

A 実験材料及び実験方法

1 *Trichomonas* 培養基：所謂重複系統に属する猪木 (1950) のWB II (Whole blood) 培地を使用した。固形部：Loeffler の血清培地を用いる。すなわち、56°C/30分間非働化したウシ血清200mlに滅菌した1%ブドウ糖ブイヨン (pH 7.4~7.6) 100mlを混和し、2 mlづつ中試験管に分注し、血清凝固器に収め、第1日70°C/1時間、第2日、第3日80°C/1時間にわたり3回加熱し、凝固と同時に滅菌を行なったものである。液体部：塩化ナトリウム加磷酸緩衝液を使用した。その組成は、 Na_2HPO_4 4.447g, KH_2PO_4 0.269g, NaCl 8.0g, 蒸水 1000ml (pH 7.6) で、120°C/15分高压滅菌を行なった後、家兎血液を5%の割合で加え、よく振盪した後、56°C/30分非働化を行なって、用に臨み先の固形部に重層する。米粉：玄米を乳鉢で微粒子に細砕き、試験管に入れ120°C/1時間乾熱滅菌を行なったものを半匙づつ (約0.03~0.05g) 実験に臨み栄養液と同じく各培養基内に加え、実験に供する。以上全て無菌的操作に基く。

2 *Trichomonas* 含有材料：*T. vaginalis* の膣炎患者の膣浸出液より上記のWB II培地に分離した細菌随伴培養で、37°C/48時間毎に継代を行なった。対照試験とする保存株は、*Trichomonas* 虫体の発育増殖最盛期 (37°C/48時間) には1視野(10×10)平均20~40個の虫体を観察する。

3 供試薬剤

実験に供した薬剤は下記に示すものである。

Crystalline Penicillin G. K. (明治)

Crystalline dihydrostreptomycin (明治)

Colimycin "Painless" (科研)

Erythrocin (abbott)

Achromycin V (Lederle)

Homosulfamine (武田)

Kanamycin sulfate (明治)

有効期限内の各薬剤は、重層する栄養液を溶媒として溶解及び希釈を行なって使用した。(濃度は後述。)

4 *Trichomonas* 虫体数の検査法：37°Cで一定時間培養した後、培養液を振盪均等化し、その1滴を載物ガラス上に採り、カバーガラスを被い、10視野 (10×10) 平均の1視野に含まれる虫体数を以て示した。

5 実験方法：まず、使用せんと準備した各薬剤単個の使用を試み、各薬剤の *T. vaginalis* に対する適量を求めるべく実験を行なった。各濃度の薬剤を含んだ培地を作り、予めWB II培地で、*T. vaginalis* の発育最盛時である48時間培養液0.5mlを採り、新鮮な培地へ静かに接種する。随伴細菌の消長を検索する為には、普通寒天培地、血液寒天培地、heart infusion 変法培地、肉汁ブイヨン等を用いて、好気性、嫌気性 (ドライアイス法) とともに次代移殖の都度、細菌の培養試験を行なった。

II *Trichomonas* 培養における虫体及び随伴細菌に及ぼす各種薬剤の影響

Trichomonas 培養に随伴する細菌を除去して、その純

粹培養を得る事を目的として、抗生物質及びsulfamine剤を利用した実験を試みた。前述した如く、penicillin 又は penicillin と streptomycin との混合により随伴細菌の除去に成功している報告に鑑み、penicillin, streptomycin, 更に近年抗生物質界に於いて劃期的な役を為す achromycin colimycin, erythrocin, kanamycin を加え、又 sulfamine 剤として homosulfamine を利用して実験を行なった。

1 実験方法

WB II 培地の栄養液を溶媒として各薬剤を次の濃度に溶解希釈した。Penicillin は19200, 9600, 4800, 2400, 1200, 600, 300, 150 μ /ccに, streptomycin は25000, 12500, 6250, 3125, 1562, 781, 390, 195 μ g/ccに, erythrocin は30, 15, 7.5, 3.75, 1.87, 0.94, 0.47, 0.23 mg /ccに, colimycin は20000, 10000, 5000, 2500, 1250, 625 μ /ccに, achromycin は2.5, 1.25, 0.625, 0.317, 0.158, 0.079, 0.039, 0.019 mg /ccに, kanamycin は75.0, 37.5, 18.75, 9.37, 4.68, 2.34, 1.17, 0.58 mg /ccに, そして homosulfamine は20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62, 0.31 mg /ccの濃度を異にする培地を作り, 各濃度の薬剤を含有するWB II 培地の栄養液を5.0ml宛固形部に重積し, 米粉を添加し, 培地を準備する。これに予め WB II 培地で37°C/48 時間に保たれ, 發育最盛時にあるTK株の培養液を各0.5mlづつ接種し, 37°Cに保持し, 24, 48, 72時間の3回に亘って虫体の發育状況及び随伴細菌の消長を

表 2 Penicillin 加培養基内における
*T.v.*の發育状態及び随伴細菌の消長

所 見 u/cc	虫 体 発 育 状 態			随 伴 細 菌 叢	
	24h	48h	72h	好	嫌
19200	+	++	+	3	
9600	++	++	+	3	1
4800	++	++	+	3	1
2400	++	++	+	3	1
1200	++	++	+	4	1
600	+	++	+	4	1
300	+	++	+	4	1
150	+	++	+	5	1
Cont.	+	+	+	5	2

備考：虫体 1 視野 (10×10)

+

++ : 1~40 虫体

+++ : 41~100 "

++++ : 101~以上 "

表 3 Streptomycin 加培養基内における
*T.v.*の發育状態及び随伴細菌の消長

所 見 ug/cc	虫 体 発 育 状 態			随 伴 細 菌 叢	
	24h	48h	72h	好	嫌
25000	+	+	+	2	
12500	+	++	+	3	
6250	+	++	++	3	1
3125	++	++	++	3	1
1562	++	++	++	3	1
781	++	++	++	4	1
390	++	++	++	4	1
195	++	++	++	5	1
Cont.	+	+	+	5	2

備考：表2に同じ

観察した。各薬剤とも各濃度につき2通りの培養基を作り, 実験を行なった。

2 実験成績

Penicillin, streptomycin, erythrocin, colimycin, achromycin, kanamycin, homosulfamine の各濃度を含んだWB II 培地に *Trichomonas* を接種し, 虫体の發育状況及び随伴する細菌の消長を観察し, 表2~8の成績を得た。表に示される如く, penicillin の作用に於いては, 19200 μ /cc限界濃度は, 虫体に何ら悪影響を与える事なく, かえって虫体の發育に好条件を備え, 發育増殖している。然し乍ら, 随伴細菌叢に対しても絶体なる効果を示すことなく, 嫌気性菌が絶滅したのみで, 好気性菌はなおも3株の發育を認めた。

表 4 Erythrocin 加培養基内における
*T.v.*の發育状態及び随伴細菌の消長

所 見 mg/cc	虫 体 発 育 状 態			随 伴 細 菌 叢	
	24h	48h	72h	好	嫌
30	—	—	—	3	
15	—	—	—	4	1
7.5	+	++	++	4	1
3.75	++	++	++	4	1
1.87	++	++	++	4	1
0.94	++	++	++	4	1
0.47	++	++	++	4	1
0.23	++	++	++	4	1
Cont.	+	+	+	5	2

備考：表2に同じ

表 5 Colimycin 加培養基内における
T.v.の發育状態及び随伴細菌の消長

所 見 u/cc	虫 体 發 育 状 態			随 伴 細 菌 叢	
	24h	48h	72h	好	嫌
20000	+	+	+	1	
10000	+	+	+	1	1
5000	+	+	+	2	1
2500	+	+	+	2	1
1250	+	+	+	2	1
625	+	+	+	3	1
Cont.	+	+	+	5	2

備 考： 表2に同じ

Streptomycin の使用に於いては、25000 $\mu\text{g}/\text{cc}$ の高濃度でやっと虫体の發育を抑制しているにも拘らず、随伴細菌はなおも發育増殖を示している。12500 $\mu\text{g}/\text{cc}$ の濃度においてすら、随伴細菌は、約半数を殺滅したに過ぎない。Erythrocine の作用では、15mg/cc の濃度で、Trichomonas の發育を完全に阻害しているにも拘らず、随伴細菌叢は依然として旺盛な發育を示した。Colimycin の作用に於いては、20000u/cc濃度では、虫体の運動性はかなり弱まったが、發育することを認めた。随伴細菌に対しても強く作用し、嫌気性菌は絶滅し、好気性菌も1株が生存するのみである。然し乍ら、この薬剤の20000~10000u/cc の高濃度で継代を重ねると、虫体は絶滅し、実験の原則に合致しない。Achromycin による作用は0.317mg/cc濃度限界に於いて、虫体の發育が良好となったが、一方、随伴細菌の

表 6 Achromycin 加培養基内における
T.v.の發育状态及び随伴細菌の消長

所 見 mg/cc	虫 体 發 育 状 態			随 伴 細 菌 叢	
	24h	48h	72h	好	嫌
2.5	—	—	—	1	
1.25	—	—	—	1	
0.625	+	+	+	1	1
0.317	+	+	+	2	1
0.158	+	+	+	3	1
0.079	+	+	+	4	1
0.039	+	+	+	4	1
0.019	+	+	+	4	1
Cont.	+	+	+	5	2

備 考： 表2に同じ

表 7 Homosulfamine 加培養基内における
T.v.の發育状态及び随伴細菌の消長

所 見 mg/cc	虫 体 發 育 状 態			随 伴 細 菌 叢	
	24h	48h	72h	好	嫌
20.0	—	—	—	2	1
10.0	+	+	+	2	1
5.0	+	+	+	3	1
2.5	+	+	+	4	1
1.25	+	+	+	4	1
0.62	+	+	+	4	1
0.31	+	+	+	4	1
Cont.	+	+	+	5	2

備 考： 表2に同じ

表 8 Kanamycin 加培養基内における
T.v.の發育状态及び随伴細菌の消長

所 見 mg/cc	虫 体 發 育 状 態			随 伴 細 菌 叢	
	24h	48h	72h	好	嫌
75.0	+	+	+		
37.5	+	+	+		
18.75	+	+	+		1
9.37	+	+	+	1	1
4.68	+	+	+	1	1
2.34	+	+	+	2	1
1.17	+	+	+	3	1
0.58	+	+	+	3	1
Cont.	+	+	+	5	2

備 考： 表2に同じ

消滅も半数株に停どまる。Homosulfamine の作用に於いては、10.0~5.0mg/cc濃度中でも虫体は發育を示すが、その濃度における随伴細菌の除去は半数株である。Kanamycin の作用については、随伴細菌の發育を阻止する濃度75mg/cc、37.5mg/ccにおいては、虫体の發育は抑制されることなく培養がなされた。又それ以下の濃度中において、18.75mg/cc濃度では、嫌気性菌のみ發育を認め、好気性菌は全て殺滅した。9.37mg/cc濃度に於いては、更に、Trichomonas の發育は旺盛であり、且つ又、随伴細菌も嫌気性菌1株、好気性菌1株が生存するのみである。

各薬剤いずれの場合でも、薬剤の影響で随伴する細菌の一部が發育を抑制される濃度に於いては、Trichomonas 虫体の發育増殖は、対照試験に比較し、

非常に旺盛である。これは *Trichomonas* 原虫が、発育に有利な条件下に置かれたと解釈してよいものと思われる。

小 括

Trichomonas vaginalis 培養に随伴する細菌を除去して、その純粋培養を得る事を目的として、抗生物質及び sulfamine 剤を利用した実験を行ない、上述の如く、まず penicillin, streptomycin, erythrocin, colimycin, achromycin, kanamycin, homosulfamine の単個使用を試みた。その結果、penicillin では 19200u/cc の濃度において、虫体の発育は阻害されることなく、随伴細菌の半数株を殺滅することを認めた。Streptomycin では 25000 μ g/cc 濃度において、随伴細菌の 2 株を残し、他は消滅した。Erythrocin では、虫体の発育を阻止しない 7.5mg/cc 濃度に於いては、随伴細菌の 1 株が消滅したのみであった。Colimycin では、20000u/cc の濃度中でも、なお虫体は生存し、随伴細菌の 1 株も発育する事を認めた。Achromycin では、0.317mg/cc 濃度に於いて、随伴細菌の半数を消滅し、homosulfamine では、10mg/cc 濃度で、なお随伴細菌の半数株が発育することを認めた。Kanamycin では、虫体は発育し、随伴細菌が全く発育を示さないという最も望ましい濃度 37.5mg/cc を得る事ができた。又、18.75mg/cc 濃度限界に於いても、嫌気性菌 1 株を残すに過ぎない。先にも述べたように、文献に従えば、penicillin 及び streptomycin の単用で *Trichomonas* 培養に随伴する細菌の除去に成功している報告を見るが、著者の本実験に於いては、使用した薬剤のうち、kanamycin が最も良好な成績を示したが、*Trichomonas* の純粋培養が薬剤単個利用で簡単に成功する場合は稀有かと思われる。

Ⅲ Penicillin 及び Streptomycin の連続作用による *Trichomonas* 培養への影響

a) Streptomycin の連続作用

先の実験により、streptomycin 単個使用の際に、25000 μ g/cc 濃度限界に於いても尚、*Trichomonas* 培養に随伴する細菌 2 株の発育を認めた訳であるが、これは streptomycin の 1 回限りの作用であった。そこで、連続作用を行なって、その 2 株が絶滅しないものかどうかを試みて実験した。

1 実験方法

WB II 培地の栄養液で以って、streptomycin を溶解し、25000, 13600, 2940, 1480 μ g/cc 濃度になるべく希釈した。各濃度の異なる培地を作り、それぞれ米粉を加

え、実験に供する。予め 37°C/48 時間に保った WB II 培地に培養した *Trichomonas* 株の培養液を 0.5ml 宛 streptomycin を加えた濃度を異にする培地に接種する。37°C に保ち一定時間後、培養液を均等に混和し、虫体を計測し、随伴細菌の消長を検索した。細菌の検査には、普通寒天培地、血液寒天培地、heart infusion 変法培地、肉汁ブイヨン等を使用して、好気性、嫌気性（ドライアイス法）ともに培養試験を行なった。

2 実験成績

Trichomonas 培養に streptomycin の連続作用を行なって得られた成績（48 時間所見）は、次の表に示す

表 9 Streptomycin 加培養基に *Trichomonas* を継代した成績（48 時間所見）

継 代 ug/cc	1 代	3 代	5 代	7 代	10 代
25000	++	++	++	++	++
13600	++	++	++	++	++
2940	++	++	++	++	++
1480	++	++	++	++	++
Cont.	+	+	+	+	+

備考：表 2 に同じ

通りである。この結果から判断される如く、streptomycin を添加した培養基で *Trichomonas* を継代培養すると、対照に比し、明瞭なる発育増殖の差が認められる。詫摩（1959）は、700～1500 μ g/cc 濃度限界に於いて、*Entamoeba histolytica* の培養はむしろ発育を促進すると報告している。著者の実験に於いても、streptomycin 添加培養基内での *Trichomonas* の発育増殖は、対照に比して非常に旺盛であることを認めた。然し乍ら、随伴細菌は、継代を重ねても消失して減ずる株はなく、1 回限りの作用結果と同じであって、随伴細菌の一部を殺滅しただけであった。

b) Streptomycin 及び Penicillin の連続作用

Streptomycin 及び penicillin の 2 薬剤の併用で、先に述べた如く、*Trichomonas* 純粋培養に成功している若干の報告に鑑み、*Trichomonas* の随伴細菌の除去実験を行なった。

1 実験方法

培養基内の streptomycin 及び penicillin の濃度を次に示す濃度に栄養液で溶解希釈した。Streptomycin 及び penicillin をそれぞれ 10000u/cc : 10000u/cc, 5000u/cc : 5000u/cc, 2500u/cc : 2500u/cc, 5000u/cc :

2500u/CC, 2500u/CC : 5000u/CC の濃度及びその比を異にする培地を作った。これに予め 37°C/48 時間培養の *Trichomonas* 培養液を 0.5ml 宛接種し, 37°C に保ち 48 時間毎に移殖を行ない, 一定時間後, 虫体の発育状況及び随伴細菌の消長を観察した。細菌の検索は, 普通寒天培地, 血液寒天培地, heart infusion 変法培地, 肉汁ブイヨン等を用いて, 好気性, 嫌気性 (ドライアイス法) とともに培養試験を行なった。

2 実験成績

Streptomycin-penicillin 各 10000u/CC 濃度による連続作用は, 虫体に対して強い影響を与えるものと思われる。累代 4 代にして, 遂に虫体は絶滅する結果となった。Streptomycin-penicillin 各 5000u/CC 濃度による連続作用に於いても, 累代 5 代にして虫体は消失した。このように高濃度の連続作用に際しても, 随伴細菌は, 好気性, 嫌気性ともに発育を認め, 1 回限りの作用と大きな差異は認められなかった。その他の濃度による *Trichomonas* 培養の結果では, 虫体の発育増殖を認め, 且つ又, 随伴細菌の発育も認められた。Streptomycin-penicillin の併用による継代培養を重ねても, 容易に随伴細菌を殺滅する事は困難であることが判明した。

小 括

先に述べた如く, 文献に従えば容易に penicillin 及び streptomycin で *Trichomonas* 培養の随伴細菌の除去に成功し, *Trichomonas* の純粋培養を得ているが, 著者の経験から penicillin 或は streptomycin の単用又は併用により, *Trichomonas* の純粋培養を得ることは, 甚だ困難であると考えられる。これは *Trichomonas* の発育状態及び混在する細菌の発育が緩徐な場合等, *Trichomonas* 株による相違に基づくかもしれないが, 簡単に成功していた年頃の随伴細菌と今日のそれと, 抗生物質に対する抵抗性等に差異があるのではないかと考えられる。

IV Kanamycin による *Trichomonas* 培養の随伴細菌の除去実験

数種の抗生物質及び sulfamine 剤を単個に使用して, *Trichomonas* 培養の随伴細菌除去を企図したところ, kanamycin が最も良好な成績を示したので, 更に kanamycin 単用の一連の実験に着手した。

1 実験方法

WB II 培地の重積栄養液で kanamycin 18.75 mg/CC, 1.875mg/CC の濃度に溶解したもの各 5.0ml 宛を固形斜面に重積して, 米粉を添加し, kanamycin 含有濃度を異にする培地を作る。又, kanamycin を

含まない新鮮な WB II 培地をも準備する。初代には kanamycin 18.75mg/CC 濃度の培地を使用する。これに予め 37°C/48 時間培養された発育増殖最盛期にある *Trichomonas* 株の TK, TS, T 3 株の培養液をそれぞれ 0.5ml づつ接種し, 37°C に保ち, 24, 48, 72 時間の三回に亘って虫体の発育状況を観察し, 48 時間毎の転殖を行ない, 次代移殖の都度随伴細菌の消長を検索した。随伴細菌の検査には, 普通寒天培地, 血液寒天培地, heart infusion 変法培地, 肉汁ブイヨン等を用いて, 好気性, 嫌気性 (ドライアイス法) とともに培養試験を行なうと同時に, 細菌の染色及び顕微鏡による観察を行ない, これら三所見の欠如することを判定基準, 純粋培養成立の条件とした。

Kanamycin 含有培地による継代は, 初代 18.75mg/CC 濃度のものを使用し, 2 代以降はその 1/10 量 1.875mg/CC 濃度の培養基を用いて行なった。このように kanamycin を連続作用するものの場合の外に, 累代 2 代, 5 代, 10 代, 15 代と kanamycin 含有培地継代のものから, kanamycin 及び他の薬剤を含まない新鮮な培地へ転殖し, 継代を続けることによって, kanamycin の除去により虫体の発育及び随伴細菌の消長の状況並びにその変動を観察した。実験はすべて 2 通り行なった。

2 実験成績

前項の実験成績から kanamycin 37.5mg/CC 濃度限界に於いては, 初代で既に随伴細菌の培養基内での発育増殖は全く認められず, しかも虫体の運動性はやや衰えた程度であったが, 発育は阻止されるには至らなかった。しかし, この濃度による連続作用を試みたところ, kanamycin の及ぼす影響は強く, 3 代で虫体は絶滅した。又, 初代より薬剤除去培地へ転殖した場合も, 3~5 代で虫体は消滅した。尚, 18.75mg/CC 濃度の連続作用及び新鮮な培地への転殖も試みたが, この濃度に於いても, 虫体に与える影響は大きく, 4 代で虫体は消滅するに至った。初代 18.75mg/CC, 2 代以後はその 1/10 量 1.875mg/CC の濃度を作用させて継代可能となり, その結果は表 10 に示される。TS, T 3 株については, 初代に於いてもなお細菌は好気性菌, 嫌気性菌ともに発育を認めたが, TK 株では, 既に嫌気性菌 1 株を認めるだけで, 好気性菌は全く発育を示さない。1.875mg/CC を作用した 2 代目には, TK, TS, T 3 株とも虫体に対して悪影響を与えず, 対照試験に比して, はるかに虫体の発育は旺盛で, しかも運動性も大となり, 随伴細菌にしても, 好気性菌, 嫌

表 10 Kanamycin 加培養基に *Trichomonas vaginalis* を継代した成績

累代	mg/cc	T株			T K株			T S株			T 3株		
		所見											
		虫体	細菌		虫体	細菌		虫体	細菌		48h	好	嫌
		48h	好	嫌	48h	好	嫌	48h	好	嫌			
1	18.75	++	—	+	++	+	+	++	+	+	+	+	
2	1.875	++	—	—	++	—	—	++	—	—	—	—	
3	〃	++	—	—	++	—	—	++	—	—	—	—	
4	〃	++	—	—	++	—	—	++	—	—	—	—	
5	〃	++	—	—	++	—	—	++	—	—	—	—	
8	〃	++	—	—	+	—	—	+	—	—	—	—	
11	〃	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
15	〃	++	—	—									
20	〃	++	—	—									
22	〃	++	—	+									
25	〃	++	—	+									
30	〃	++	—	+									
35	〃	++	—	+									
40	〃	++	—	+									
45	〃	++	—	+									
50	〃	++	—	+									

備考: 1) 虫体については表2に同じ

2) 随伴細菌の検査に於いては、使用した4種の培養基のいずれにも培養不可能な場合を一に、一種でも培養可能な場合を+とした。

気性菌とも如何なる培養基を用いても発育は全く認められなかった。染色により不明瞭な細菌様菌体を観察した。これをフクシン及びメチレン青を使用した生菌と死菌の染色による判別法を応用したが、両者間の差を認め得なかった。3代へ移殖する際に、連続作用のものは2代と同じく kanamycin 1.875mg/cc 濃度を含む培地へ移殖し、一方、kanamycin を除去したもののへの移殖とに分けて実験を続けた。Kanamycin 2代作用後薬剤を除去したものについては、表11に示される結果を得た。これに依ると、転殖時には如何なる培養基内に於いても全く発育を認められなかった随伴細菌が、4代で好気性菌が、6代で嫌気性菌が発育を示すようになった。Kanamycin 連続5代作用について見ると、何ら虫体に悪影響を及ぼすことなく、かえて虫体の発育は旺盛で、しかも運動も活撥である。随伴細菌については、使用した培養基内での発育は全く認められず、染色は更に不良となり、顕微鏡所見でも細菌と思われる物は少なくなった。累代5代で転殖した場合の成績についてもこの表で判るように *Trichomonas* 株のTS、T3株については、次第に虫

表 11 Kanamycin 加培養基から薬剤除去培地へ転殖した *Trichomonas* 培養の所見

累代	所見 薬剤除去 継代	T株			T S株			T 3株		
		T	K	株	T	S	株	T	3	株
		虫体	細菌		虫体	細菌		虫体	細菌	
		48h	好	嫌	48h	好	嫌	48h	好	嫌
2		++	-	-	++	-	-	++	-	-
	1	++	-	-	++	-	-	++	-	-
	3	+++	-	-	+++	-	-	++	-	-
	4	+++	+	-	++	+	-	++	+	-
	6	+++	+	+	++	+	+	++	+	+
5		++	-	-	++	-	-	++	-	-
	1	++	-	-	++	-	-	++	-	-
	3	++	-	-	+++	-	-	++	-	-
	5	++	-	-	+	-	-	-	-	-
	7	+++	-	-	+	-	-			
	10	+++	-	-	-	-	-			
	13	+++	-	-						
	15	++	-	-						
	16	++	-	+						
10		++	-	-						
	1	++	-	-						
	7	+++	-	-						
	10	++	-	-						
	11	++	-	+						
15		+++	-	-						
	1	++	-	-						
	3	++	-	-						
	5	++	-	-						
	7	++	-	+						

備考: 表10に同じ

体の発育が不良となり、遂に7代、5代で虫体が消滅するに至った。これは kanamycin の作用に依るのか、*Trichomonas* の発育状態或はその他の原因に依るのか確かでない。残るTK株について継代を重ねて虫体の発育増殖の状態や細菌の検索を続けた。Kanamycin を除去した培地で継代を行ない、細菌の検索を行なったが、15代に亘って好気性、嫌気性ともに全く発育は認められなかった。染色に於いても不良であり、ただ所謂 ghost cell と思われるものが顕微鏡所見によってのみ観察されていた。しかもその量的関係は、転殖後よりだんだん減少し、7代〜9代頃が最も少なく、この頃は、顕微鏡所見でも殆んど純粹培養と思われる程であった。それが漸次数を増し、遂には染色も可能となり、又更には培養基内に於いても発育を認めるように

なった。15代の間 (30days) , 細菌の培養試験及びその他の所見で随伴細菌陰性の成績を得たので、恰も随伴細菌の除去に成功し、*Trichomonas* の純粋培養を得たかの如き感を抱いたのであるが、更に続行した実験成績により、それは成功に達しなかったのである。再出現した随伴細菌については後述する。Kanamycin 連続作用10代及び15代から kanamycin を除去した培地へ転殖したものに於いても、虫体の發育増殖は旺盛で、しかも随伴細菌の検索の結果は陰性で、10代、6代と続いたものが、次第に虫体の發育は衰え、他方、随伴細菌も僅かであるが漸次培養基内に於いて發育を認めるようになった。

3 再現した随伴細菌の感受性 Disk test について

随伴細菌を除去する為に薬剤を連続的に作用した実験の結果、短期及び長期に亘り、随伴細菌の培養試験が全く陰性であったにも拘らず、後代に至って、随伴細菌が再出現して發育増殖を認めた。この再現した細菌が、使用した薬剤に対して耐性を有するか否か検索する必要があると考え、Disk test を行なってみた。常法に従い実験した結果は、再現した細菌の好気性菌、嫌気性菌ともに kanamycin 30mcg/disk に於いて耐性を獲得していることが判明した。再現した随伴細菌は、好気性菌は、Gram (－) の双球菌1株、嫌気性菌は、Gram (－) の単球菌1株であった。

小 括

既に述べた如く、*Trichomonas* の純粋培養を得る目的で、kanamycin を利用して随伴細菌の消滅を試み、実験したのである。初代 18.75mg/cc 含有培地に接種し、2代以降は、1.875 mg/cc 濃度を作用させた。虫体の發育状態及び随伴細菌の消長を検索した結果、5代連続作用後新鮮な薬剤除去培地へ転殖した場合が最も良好であった。虫体は対照より良好な發育状況であり、随伴細菌は、15代の間 (30 days) , 実験に供した培養基内に於いて全く發育が認められず、又、染色法に於いても認められず、ただ顕微鏡所見に於いてのみ、所謂 ghost cell かと思われるものが僅かに観察されていたに過ぎなかったのである。それが、漸次染色も可能となり、培養基によっても細菌の發育が認められるようになり、恰も *Trichomonas* の純粋培養に成功したかの如く観察されたものが、随伴細菌の kanamycin 耐性菌としての再出現により、*Trichomonas* の純粋培養は得られなかった。

V Kanamycin と他の薬剤との併用による *Trichomonas* 培養に於ける随伴細菌の除去実験

先の実験に於いて、kanamycin 単用の結果、長期に亘り細菌の培養が不能であったが、竟極の処、薬剤耐性となって再現し、結局、*Trichomonas* の純粋培養は得る事ができなかった。出来る限り、少数の薬剤によって随伴細菌を除去せんが為、最も良好な成績を示した kanamycin と他の薬剤1種を用いて、随伴細菌の除去実験を行なった。

1 実験方法

WB II 培地の栄養液で以て、kanamycin を 2.0 mg/cc 濃度に溶解し、それに penicillin 10000, 5000, 2500, 1250u/cc の濃度になるように溶解希釈する。Colimycin は、10000, 5000, 2500, 1250u/cc の濃度になるように、achromycin は、0.3, 0.15, 0.07, 0.04mg/cc の濃度になるように、又 homosulfamine は、0.4, 0.3, 0.2, 0.1mg/cc の濃度になるように、それぞれ kanamycin との混合液を作り、固形斜面に5.0ml宛重積し、米粉を添加して、各薬剤共含有濃度を異にする培地を作る。これに予めWB II 培地に 37°C/48時間保たれているTK株の培養液を各 0.5mlづゝ接種し、37°C に保ち、24, 48, 72時間の3回に亘って虫体の發育状況を観察し、48時間毎に転殖する。随伴細菌の消長は、次代移殖の都度、普通寒天培地、血液寒天培地、heart infusion 変法培地、肉汁ブイヨン等を用いて、好気性、嫌気性 (ドライアイス法) とともに培養試験を行ない検索した。又、培養による方法と同時に、染色及び顕微鏡所見を併せて観察し、判定の基準とする。薬剤併用による作用方法は、単個使用の場合と同じく、累代連続作用のもの、及び5代、10代、15代、20代作用のものから薬剤無添加培地へ転殖し継代を行なうものとに分けられた。*Trichomonas* 培養は、各薬剤各濃度とも全て2通り行なって実験した。

2 実験成績

a) Kanamycin と Penicillin の併用による随伴細菌の除去実験

Kanamycin 2.0mg/cc と penicillin 10000, 5000, 2500, 1250 u/cc との混合薬剤をTK株に作用させた結果は、表12に示される通りである。Kanamycin 2.0 mg/cc と penicillin 10000 u/cc 及び 5000 u/cc 濃度の連続作用は、若い代では、虫体の發育はかなり活撥であり、随伴細菌は、2代或は3代で既に培養基内における發育は全く認められない。然し乍ら、長期に及ぶ連続併用は、虫体に対して次第に悪影響を及ぼすのか、虫体の發育が緩かになり、遂には消滅するに至った。Kanamycin 2.0mg/cc と penicillin 2500u/cc 及び 1250u/cc 濃度による連続併用に於いては、好気

表 12 Kanamycin 及び Penicillin 加培養基に *Trichomonas vaginalis* を継代した成績

濃度 所見 累代	KM 2.0mg/cc P C 10,000u/cc			KM 2.0mg/cc P C 5,000u/cc			KM 2.0mg/cc P C 2,500u/cc			KM 2.0mg/cc P C 1,250u/cc		
	虫体			虫体			虫体			虫体		
	48h	好	嫌	48h	好	嫌	48h	好	嫌	48h	好	嫌
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	—	—	+	—	+	+	—	+	+	—	+
4	+	—	—	+	—	—	+	—	—	+	—	+
5	+	—	—	+	—	—	+	—	—	+	—	+
7	+	—	—	+	—	—	+	—	—	+	—	+
9	+	—	—	+	—	—	+	—	—	+	—	+
11	+	—	—	+	—	—	+	—	—	+	—	+
13	+	—	—	+	—	—	+	—	+	+	—	+
15	+	—	—	+	—	—	+	—	+	+	—	+
17	+	—	—	+	—	—						
19	+	—	—	+	—	—						
20	+	—	—	+	—	—						
22	+	—	—	+	—	—						
25	+	—	—	+	—	—						
30	—	—	—	+	—	—						
32				—	—	—						

備考：表10に同じ

性菌は消滅したが、嫌気性菌は、一旦培養試験陰性となったものが再び培養可能となるか、或は全く消失を観る事が出来なかったからである。次に、併用培地で連続継代を行なったものから、薬剤除去の培地へ転殖した場合の成績は、表13に示す如くである。これによると、薬剤無添加培地で最も長い期間随伴細菌の培養が陰性であったのは、kanamycin 2.0mg/cc と penicillin 5000 u/ccの組合せで連続 20 代作用したものから転殖した場合であって、4 代の間(8 days)に亘った。いずれの組合せに於いても、随伴細菌の培養試験は陰性で、しかも虫体の発育も退行するという場合と虫体の発育は良好であるが、随伴細菌が一時は培養不可であっても再現するという場合とに限られ、kanamycin と penicillin の併用によっても *Trichomonas* 培養の随伴細菌を除去することは出来なかった。

b) Kanamycin と Colimycin の併用による随伴細菌の除去実験

Kanamycin 2.0 mg/cc と colimycin 10000, 5000, 2500, 1250 u/cc との混合濃度による TK 株の培養成績は、表14に示される。Kanamycin 2.0mg/cc と colimycin 10000u/cc との連続作用においては、

初代で好気性菌が消滅し、5 代で嫌気性菌も消滅した。然し乍ら、薬剤の虫体に及ぼす影響も強く、一時は虫体の発育増殖は良好であっても、次第に退行現象を呈し、遂には絶滅する結果となった。Kanamycin 2.0 mg/cc と colimycin 5000 u/cc 以下の併用に於いては、colimycin の濃度が低い程随伴細菌の消失は遅く、又再出現も早い。Kanamycin 2.0mg/cc と colimycin 5000u/ccの併用では、虫体の発育増殖は非常に旺盛であり、好気性菌は初代で消滅し、嫌気性菌は7 代から培養不可能となり、18代に至るまで、その間11代の間(22 days)は、全く細菌の発育は認められなかった。然し、19代より僅かに、そして次第に細菌の発育を認めた。Colimycin の濃度が 2500u/cc 及び 1250u/cc の場合に於いても、随伴細菌の消失及び再現の時間的差はあっても、結果においては同じ成績である。次に、薬剤添加培地による継代のものから薬剤除去の培地へ転殖したものは、表15に示す成績を得た。この方法による *Trichomonas* 培養の結果、虫体は発育増殖し、随伴細菌の培養における消失が最も長期に及んだのは、kanamycin 2.0mg/cc と colimycin 10000 u/cc の濃度による併用で、15代連続作用の後転殖したもの

表 13 Kanamycin 及び Penicillin 加培養基から薬剤除去培地の転殖した
Trichomonas vaginalis 培養の所見

累代	薬剤除去 所見 継代	濃度			KM 2.0mg/cc P C 10,000u/cc			KM 2.0mg/cc P C 5,000u/cc			KM 2.0mg/cc P C 2,500u/cc			KM 2.0mg/cc P C 1,250u/cc		
		虫体			虫体			虫体			虫体			虫体		
		48h	好	嫌	48h	好	嫌	48h	好	嫌	48h	好	嫌	48h	好	嫌
5		+++	—	—	+++	—	—	+++	—	—	+++	—	—	+++	—	+
	1	++	+	—	+++	+	—	+++	+	+	+++	+	+	+++	+	+
	2	+++	+	+	+++	+	+	+++	+	+	+++	+	+	+++	+	+
10		++	—	—	+++	—	—	+++	—	—	+++	—	—	++	—	+
	1	++	—	—	++	—	—	++	—	—	++	—	—	++	—	+
	2	+++	+	+	+++	+	+	+++	+	+	+++	+	+	+++	+	+
	3	+++	+	+	+++	+	+	+++	+	+	+++	+	+	+++	+	+
15		++	—	—	++	—	—	++	—	—	++	—	—	+++	—	+
	1	++	—	—	++	—	—	++	—	—	++	—	—	++	—	—
	2	++	—	—	++	—	—	++	—	—	++	—	—	++	—	—
	3	++	—	—	++	—	—	++	—	—	++	—	—	++	—	—
	4	+++	—	+	+++	—	+	+++	—	+	+++	—	+	+++	—	+
	5	+++	—	+	+++	+	+	+++	+	+	+++	+	+	+++	+	+
20		+	—	—	++	—	—	++	—	—	++	—	—	++	—	—
	1	+	—	—	++	—	—	++	—	—	++	—	—	++	—	—
	2	+	—	—	++	—	—	++	—	—	++	—	—	++	—	—
	3	+	—	—	++	—	—	++	—	—	++	—	—	++	—	—
	4	—	—	—	++	—	—	++	—	—	++	—	—	++	—	—
	5				++	—	+	++	—	+	++	—	+	++	—	+
25		+	—	—	+	—	—	+	—	—	+	—	—	+	—	—
	1	+	—	—	+	—	—	+	—	—	+	—	—	+	—	—
	2	—	—	—	+	—	—	+	—	—	+	—	—	+	—	—
	5				+	—	—	+	—	—	+	—	—	+	—	—
	7				+	—	—	+	—	—	+	—	—	+	—	—
	9				—	—	+	—	—	+	—	—	+	—	—	+
30					+	—	—	+	—	—	+	—	—	+	—	—
	1				+	—	—	+	—	—	+	—	—	+	—	—
	2				+	—	—	+	—	—	+	—	—	+	—	—
	3				—	—	+	—	—	+	—	—	+	—	—	+

備考：表10に同じ

である。然し乍ら、この場合も虫体自体が次第に退行し、結局は絶滅した。随伴細菌を殺滅する濃度限界に於いては、虫体は一過性には發育良好であっても、連続作用させた場合は、何らかの影響が与えられるものと考えられ、次第に發育増殖が下降する。虫体が永続的に發育増殖の順調な薬剤濃度に於いては、随伴細菌が殺滅することなく發育増殖し、希望する好成績は得られなかった。

c) Kanamycin と Achromycin の併用による随伴細菌の除去実験

Kanamycin 2.0 mg/cc と achromycin の 0.3, 0.15, 0.07, 0.04 mg/cc の濃度の併用による TK 株の虫体の發育状況及び随伴細菌の消長を觀察した結果は、表16に示す如くであった。薬剤の連続作用に於いては、各濃度とも2代で好気性菌及び嫌気性菌の發育は全く認められなかった。然し乍ら、achromycin の濃度が

表 14 Kanamycin 及び Colimycin 加培養基に *Trichomonas vaginalis* を継代した成績

累代	濃度 所見	KM 2.0mg/cc C M 10000u/cc			KM 2.0mg/cc C M 5000u/cc			KM 2.0mg/cc C M 2500u/cc			KM 2.0mg/cc C M 1250u/cc		
		虫体			虫体			虫体			虫体		
		48h	好	嫌	48h	好	嫌	48h	好	嫌	48h	好	嫌
1		++	—	+	++	—	+	+++	+	+	+++	+	+
2		++	—	+	++	—	+	+++	—	+	+++	—	+
3		++	—	+	++	—	+	+++	—	+	+++	—	+
4		++	—	+	++	—	+	+++	—	+	+++	—	+
5		++	—	—	+++	—	+	+++	—	+	+++	—	+
7		+++	—	—	+++	—	—	+++	—	—	+++	—	+
9		+++	—	—	+++	—	—	+++	—	—	+++	—	+
11		++	—	—	+++	—	—	+++	—	—	+++	—	+
13		++	—	—	+++	—	—	+++	—	+	+++	+	+
15		++	—	—	+++	—	—	+++	—	+	+++	+	+
17		+	—	—	++	—	—						
19		+	—	—	++	—	+						
20		+	—	—	++	—	+						
22		+	—	—	+++	—	+						
25		—	—	—	+++	—	+						
30		—	—	—	+++	—	+						

備考：表10に同じ

表 15 Kanamycin 及び Colimycin 加培養基から薬剤除去培地へ転殖した *Trichomonas vaginalis* 培養の所見

累代	薬剤除去 継代	濃度 所見	KM 2.0mg/cc C M 10000u/cc			KM 2.0mg/cc C M 5000u/cc			KM 2.0mg/cc C M 2500u/cc			KM 2.0mg/cc C M 1250u/cc		
			虫体			虫体			虫体			虫体		
			48h	好	嫌	48h	好	嫌	48h	好	嫌	48h	好	嫌
5			++	—	—	+++	—	+	+++	—	+	+++	—	+
	1		++	+	—	++	+	+	++	+	+	++	+	+
	2		++	+	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+
10			+++	—	—	+++	—	—	+++	—	—	+++	—	+
	1		++	—	—	+++	—	—	+++	—	—	+++	—	+
	2		++	+	+	++	+	+	++	—	+	+++	+	+
	3		++	+	+	+++	+	+	+++	+	+	++	+	+
15			++	—	—	+++	—	—	+++	—	+	+++	+	+
	1		++	—	—	++	—	—						
	2		+	—	—	++	—	—						
	3		+	—	—	++	—	+						
	4		—	—	—	++	—	+						
20			+	—	—	++	—	+						
	1		+	—	—									
	2		+	—	—									
	3		—	—	—									
	4		—	—	—									

備考：表10に同じ

表 16 Kanamycin 及び Achromycin 加培養基に
Trichomonas vaginalis を継代した成績

濃度 所見 累代	KM 2.0mg/cc A C 0.3mg/cc			KM 2.0mg/cc A C 0.15mg/cc			KM 2.0 mg/cc A C 0.07mg/cc			KM 2.0 mg/cc A C 0.04mg/cc		
	虫 体			虫 体			虫 体			虫 体		
	48h	好	嫌	48h	好	嫌	48h	好	嫌	48h	好	嫌
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
3	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
4	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
5	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
7	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
9	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
11	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-
13	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-
15	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+
17	+	-	-	+	-	-	+	-	-			
19	+	-	-	+	-	-	+	-	-			
21	-	-	-	-	-	-	+	-	-			
23							+	-	-			
25							-	-	-			

備考：表10に同じ

表 17 Kanamycin 及び Achromycin 加培養基から薬剤除去の培地へ
転殖した *Trichomonas vaginalis* 培養の所見

濃度 所見 累代	薬剤 除去 継代	KM 2.0mg/cc A C 0.3mg/cc			KM 2.0mg/cc A C 0.15mg/cc			KM 2.0mg/cc A C 0.07mg/cc			KM 2.0mg/cc A C 0.04mg/cc		
		虫 体			虫 体			虫 体			虫 体		
		48h	好	嫌	48h	好	嫌	48h	好	嫌	48h	好	嫌
5		+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	1	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10		+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	1	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15		+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+
	1	+	-	-	+	-	-	+	-	-			
	2	+	-	-	+	-	-	+	-	-			
	3	-	-	-	-	-	-	+	-	-			
	4							-	-	-			
20		+	-	-	+	-	-	+	-	-			
	1	+	-	-	+	-	-	+	-	-			
	2	-	-	-	-	-	-	+	-	-			
	3							-	-	-			

備考：表10に同じ

高い程早期に虫体の退行が現われ、遂には虫体が消滅した。Kanamycin 2.0mg/cc と achromycin 0.04 mg/cc の併用に於いては、虫体の消滅に至らぬうちに、随伴細菌の再出現を認めた。薬剤作用の *Trichomonas* 培養を薬剤無添加の培地へ転殖して得られた成績は、表17に示す如くであった。薬剤作用10代以内の転殖については、各濃度ともに移殖後3代にして随伴細菌の発育が認められ、15代、20代連続作用した後転殖したものでは、3代乃至4代で虫体が死滅するに至り、求める結果は得られなかった。

d) Kanamycin と Homosulfamine の併用による随伴細菌の除去実験

Kanamycin 2.0mg/cc に homosulfamine 0.4, 0.3, 0.2, 0.1mg/cc の濃度を併用したTK株の虫体の発育状況及び随伴細菌の消長について観察した成績は、表18に示す如くであった。この表に示される如く、homosulfamine 0.4mg/cc の場合には、随伴細菌は2代で殺滅され、虫体の発育増殖は一時には順調であっても次第に退行して絶滅した。Homosulfamine 0.3mg/cc濃度以下の連続併用に於いては、虫体の発育増殖はかなり旺盛であるが、一方、随伴細菌の消失が最も長い場合で20代の間(40 days)しか続かず、結局、随伴細菌の再現により、*Trichomonas* の純粋培養は得

られなかった。

3 再現した随伴細菌の感受性 Disk test について

Kanamycin と他の薬剤とを混合し、薬剤併用による *Trichomonas* 培養の随伴細菌の除去実験を行なったのであるが、先の kanamycin 単用による随伴細菌除去実験の成績より優れた結果を得る事が出来ず、kanamycin 単用の場合と同じく、一旦培養試験で発育を認めなかったものが、再び培養が可能となり、発育増殖を認めた。そこで、再現した細菌の使用した薬剤に対する感受性を検する必要があると考え、Disk test を行なった。その結果は、kanamycin に対しては、再現した好気性菌、嫌気性菌ともに 30Mcg/diskにおいて耐性であることを認めた。Penicillin に対しては、好気性菌は 2.0u/disk において耐性であり、嫌気性菌は、0.5u/disk において耐性であることを示した。Colimycin では、再現した好気性菌、嫌気性菌ともに 300u/disk に耐性となっていた。一旦消失して再出現し、発育増殖を認められた随伴細菌は、好気性菌は Gram (－) の双球菌であり、嫌気性菌は Gram (－) の単球菌であった。再出現した細菌については、更に検討の余地があると考えられ、機会を得て追究したいと思われる。

表 18 Kanamycin 及び Homosulfamine 加培養基に *Trichomons vaginalis* を継代した成績

累代	濃度 所見	KM 2.0mg/cc			KM 2.0mg/cc			KM 2.0mg/cc			KM 2.0mg/cc		
		H S		0.4mg/cc		H S		0.3mg/cc		H S		0.2mg/cc	
		虫 体	細 菌	虫 体	細 菌	虫 体	細 菌	虫 体	細 菌	虫 体	細 菌	虫 体	細 菌
		48h	好 嫌	48h	好 嫌	48h	好 嫌	48h	好 嫌	48h	好 嫌	48h	好 嫌
1		+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—
2		+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—
3		+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—
4		+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—
5		+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—
7		+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—
9		+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—
11		+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—
13		+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—
15		+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—
17		+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—
19		+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—
20		+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—
22		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
25		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

備考：表10に同じ

表 19 Kanamycin 及び Homosulfamin 加培養基から
薬剤除去培地へ転殖した *Trichomonas* 培養の所見

濃 度 薬剤除去 累代	所見	KM H S			2.0mg/cc 0.4mg/cc			KM H S			2.0mg/cc 0.3mg/cc			KM H S			2.0mg/cc 0.2mg/cc			KM H S			2.0mg/cc 0.1mg/cc		
		虫 体			細 菌			虫 体			細 菌			虫 体			細 菌			虫 体			細 菌		
		48h	好	嫌	48h	好	嫌	48h	好	嫌	48h	好	嫌	48h	好	嫌	48h	好	嫌	48h	好	嫌	48h	好	嫌
5		++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-
	1	+	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	+	-
	2	++	+	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+
10		++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	+
	1	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	+
	2	++	-	+	++	-	+	++	-	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+
	3	++	+	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+
15		++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	+	++	-	+	++	-	+	++	+	+
	1	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	2	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	3	+	-	-	++	-	+	++	-	+	++	-	+	++	-	+	++	-	+	++	-	+	++	-	+
	4	-	-	-	++	-	+	++	-	+	++	-	+	++	-	+	++	-	+	++	-	+	++	-	+
20		+	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-
	1	+	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-
	2	+	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-
	3	-	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-
	5	+	-	-	++	-	+	++	-	+	++	-	+	++	-	+	++	-	+	++	-	+	++	-	+

備考：表10に同じ

総 括 及 び 考 察

FLEMING (1928) が penicillin を発見し、DOMAGK (1932) が Prontosil を創造して以来、抗生物質及びサルファ剤の研究は俄然進展し、幾多優秀な薬剤が相次いで登場しつつ今日に至っている。しかし、これらの薬剤の大部分は、細菌性疾患に対しては戯曲的な効果を発揮するに拘らず、原虫性疾患に対しては余り効がないという事実が知られたので、原虫培養の随伴細菌を除去することに応用され、例えば、ADLER & PULVERTAFT (1944) が septamide 及び penicillin を併用して *T. vaginalis* の無菌培養に成功して以来、*Trichomonas* の純粋培養も比較的容易に得られたという若干の報告に接するに至った。しかし、山県(1953)、浜田(1953)の報告以来、10年を経過した今日、これらの諸薬剤に対する耐性菌——雑菌を含めて——も殖えた筈なので、penicillin 或は streptomycin の単用或は併用によって随伴細菌を除去することは不可能となったのではないかと考えられる。著者の実験によれば、penicillin に於いては、19200u/cc 濃度によっても尚随伴細菌は3株生存し、streptomycin では

25000ug/cc の濃度中に於いても随伴細菌の2株は發育し、erythrocin では7.5mg/cc 濃度限界で随伴細菌の2株を駆逐したのみであり、achromycin では0.317mg/cc 濃度限界で、homosulfamine では10.0mg/cc 濃度限界で半数株の随伴細菌を消滅しただけで、colimycin では20000u/cc 濃度で尚も好気性菌の1株の發育を認めた。ただ kanamycin では37.5mg/cc 濃度限界に於いて随伴細菌の全てを駆逐する事に成功したが、薬剤は虫体にも影響を及ぼし、*Trichomonas* の継代は永続しなかった。Kanamycin の単用で、初代18.75mg/cc、2代以降1.875mg/cc 濃度による5回連続作用の後、薬剤無添加培地へ転殖して、16代(32 days)に亘って培養基内に於ける随伴細菌の發育は全く認められず、しかも、顕微鏡観察の際も所謂 ghost cell と思われるものが極く僅かに認められたに過ぎなかったので、恰も *Trichomonas* の純粋培養に成功したかの如く観察されていたが、結局、随伴細菌が薬剤耐性となって再出現し、随伴細菌を完全に殺滅することは出来なかった。Kanamycin と他の薬剤との併用による実験においても同じ結果を得た。Kanamycin 2.0mg/cc と penicillin 2500u/cc 濃度による併用で

は、4代で一旦随伴細菌は消失したが、再び13代で出現して発育を認めた。Kanamycin 2.0mg/CC と colimycin 5000u/CC濃度の併用は、7代で一旦随伴細菌を消滅したが、再び19代に至って培養を認めた。Kanamycin 2.0mg/CC と achromycin 0.07mg/CC 濃度の連続作用により、2代で随伴細菌の全てを殺滅したが、25代に至って虫体自体が絶滅した。Kanamycin 2.0mg/CC と homosulfamine 0.3mg/CC 濃度の連続併用は、3代で一旦随伴細菌を消失したものの再び22代に至って、培養可能となり発育を認めた。

従って、抗生物質の単用或は併用により、*Trichomonas*

培養に随伴する細菌は、強度にその発育力、生活力を抑制されるものの、完全なる駆除には達しないものと考えられる。今日では、抗生物質の利用により簡単に *Trichomonas* 培養の随伴細菌を殺滅することは、甚だ困難になったのではないと思われる。これは、*Trichomonas* 株の差異に由るとも思われるが、一般に随伴細菌が抗生物質に対する抵抗性を獲得した為と考えられる。

稿を終るに臨み終始御懇篤なる御指導御校閲を賜わった登倉教授に深甚の謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) ASAMI, K. : Bacteria-free cultivation of *Trichomonas vaginalis*. Kitasato Arch. of Exp. Med., 25 : 149~156, 1952.
- 2) 浅見敏三 : 膣トリコモナスの細菌を伴わない培養。臨床婦人科産科, 6 (1) : 36~37, 1952.
- 3) DECARNERI, I. : Isolation of *Trichomonas vaginalis* from bacteria. Am. J. Trop. Med. Hyg., 5 : 210~212, 1956.
- 4) 浜田義雄 : *Trichomonas vaginalis* の生物学的研究。大阪大学医学雑誌, 5 (6) : 429~435, 1946.
- 5) 原 泰彦 : 実験的球菌性内眼病膿症の細菌学的追及、特に生死菌判別染色法の適用。長崎医学会雑誌, 32 (12) : 1526~1541, 1957.
- 6) 石井次男, 林 公健 : 膣トリコモナスの培養的研究。日本産科婦人科, 5 (3) : 56, 1953.
- 7) 猪木正三, 永井 光, 高田季久, 北浦敏行 : 赤痢 Amoeba の培養に関する研究。(1) 余等の所謂全血加培地。大阪大学医学雑誌, 2 : 71, 1950.
- 8) Magara, M., Amino, E. and Yokouti, E. :

One metaode for the pure culture of *Trichomonas vaginalis*. Am. J. Trop. Med., 2 : 267~270, 1953.

- 9) 森口智賀年 : 膣トリコモナスの無菌培養。日新医学, 44 (3) : 152~154, 1957.
- 10) Quisino, R. A. and Fotel, M. J. : The use of streptomycin in the purification of cultures of *Trichomonas vaginalis*. J. Bact., 51 : 404, 1946.
- 11) 詫摩一郎 : *Entamoeba histolytica* の呼吸代謝に及ぼす諸種薬剤の影響に就いて。長崎大学風土病紀要, 1 (1) : 19~37, 1959.
- 12) Trussell, R.E. : *Trichomonas vaginalis* and Trichomoniasis. Thomas Pub. Co., Springfield, Ill., 1947.
- 13) Williams, F. and Plastringe, N. : Use of antibiotics substance for freeing *Trichomonas foetus* from bacteria. J. Bact., 51 : 127, 1946.
- 14) 山県 宏 : *Trichomonas* の純粋培養の12例の報告。長崎医学会雑誌, 28 (9) : 991~994, 1953.
- 15) 山県 宏 : *Trichomonas* の研究。医学研究, 23 (7) : 1341~1379, 1953.

Summary

This is a report of an experiment which had been carried out in order to get pure culture of *Trichomonas vaginalis* by using some antibiotics and a sulfonamide to get rid of associated bacteria. Stock cultures of *Trichomonas* were maintained in the double medium of liquid and solid, that is, whole blood medium described by Inoki (1950). The liquid part consisting of NaCl 8.0 gm, Na₂HPO₄ 4.447 gm and KH₂PO₄ 0.269 gm in 1000 ml of water had rabbit blood at the rate of five per cent addet to. The solid part contained 100 ml of 1 per cent glucose-bouillon and 200 ml of cattle serum coagulated to a slant. Materials containing *Trichomonas*

were cultivated in the medium, every 48 hours at 37°C by turns successively. The cultivation of the bacteria was observed under the aerobic and anaerobic conditions at 37°C, taking use of enrichment medium such as heart infusion medium, every time by turns successively.

For the purpose of obtaining a bacteria-free *Trichomonas* culture, the authoress employed penicillin 5000 u. per ml and streptomycin 5000 u. per ml, each of which was separately added to WB medium, but it led to no result. Then, kanamycin was employed. At the first generation *Trichomonas* culture was inoculated into WB medium containing kanamycin 18.75 mg per ml and then 1,875 mg per ml. Growth of bacteria of the *Trichomonas* strain was not observed from the second to the twenty-second generation (40 days), but thereafter they certainly appeared again at last. When the *Trichomonas* strain was inoculated into WB medium in absence of antibiotic after the fifth generation, associated bacteria were not cultivated throughout fifteen generations (30 days), but they reappeared thereafter. Kanamycin 2.0 mg per ml mixed with penicillin 2500 u. per ml, colimycin 5000 u. per ml, achromycin 40 µg per ml and homosulfamine 300 µg per ml, each of which was separately added to WB medium, proved ineffective to continue any longer than seventeen generations (34 days). Though bacteria of the *Trichomonas* strain were impossible to have a growth in any medium for a fairly long time, no everlasting pure-culture of *Trichomonas vaginalis* was obtained.

As of this date it seems as difficult as impossible to make entirely free from bacteria of contaminated *Trichomonas* culture by application of antibiotics and sulfonamides. This is ascribed to the fact that vaginal bacteria have been drug-fast unawares in the last ten years.

(Authoress)

Received for publication February 4, 1963.