

牛乳培地による膾トリコモナスの分離培養について

中 林 敏 夫・宮 田 彬

長崎大学熱帯医学研究所疫学部（主任：中林敏夫教授）

（昭和42年9月4日受付）

On the Isolation Culture of *Trichomonas vaginalis* with Milk Media

Toshio NAKABAYASHI and Akira MIYATA

*Department of Epidemiology, Institute for Tropical Medicine,
Nagasaki University (Director : Prof. Toshio NAKABAYASHI)*

Abstract

Numbers of serum-free media have been so far devised for the isolation culture of *Trichomonas vaginalis* (Tv) and employed generally for the diagnosis of human trichomoniasis. These media, however, still have such an inconvenience that the aseptic harvest and storage of animal serum may be difficult under certain circumstances.

An attempt was made of the isolation culture of Tv from vaginal secretion of patients with use of milk media, which contained cow milk but no serum, in order to examine on their capability of supporting the growth of this protozoa in comparison with a serum-containing medium, V-bouillon. Three media provided by the authors were derived from Samuels' C7 medium (1965) and called **TTM**, **TCM** and **FCM** in abbreviation. These were manufactured as described below: (1) **TTM**; 4.2g of trypticase, 1.2g of liver extract, 0.3g of yeast extract and 7.5mg of KH_2PO_4 were dissolved in 100ml of boiling distilled water. 8mg of citric acid, 20mg of thiomalic acid, 40mg of ascorbic acid and 0.5g of glucose were added to the solution after cooling. The solution was adjusted the pH to 6.0 with 1N NaOH and sterilized with a Seitz filter. It was further added with 0.8mg of cholesterol, which was dissolved in absolute ethanol at the rate of 20mg per ml, and 0.25ml of sterile milk, and distributed into sterile test tubes 5 ml per tube. (2) **TCM**; part A. 4g of trypticase, 1.2g of liver extract, 0.3g of yeast

extract, and 0.6g of NaCl were dissolved in 80ml of boiling distilled water and autoclaved after the pH was adjusted to 6.0. Part B. 0.5g of glucose, 100mg of cysteine HCl and 40mg of ascorbic acid were dissolved in 20ml of distilled water and sterilized with a Seitz filter after the pH was adjusted to 6.0. Then, 0.8mg of cholesterol and 0.25ml of sterile milk were added to the solution. Both solutions of part A and B were mixed aseptically and distributed into test tubes. (3) **PCM**; this was quite similar in constitution as **TCM** with only exception that 4g of peptone was used instead of trypticase.

In this experiment, a milk-free medium (**TC**), in which milk was omitted from **TCM** was used as a control. **V-bouillon** was a kind of modified **CPLM** medium and almost similar in constitution as **CPLM**, which was reported by Johnson, Trussell and John in 1945, and shortened as **VB** in this paper.

The outline of results obtained was summarized as follows:

1) The detection rate of **Tv** in the isolation culture from 74 patients was equally 24.3% (18/74) with any of three milk media and was 25.7% (19/74) with **VB**. From this result, no significant difference in detection rate was recognizable between any of milk media and **VB**.

2) In the isolation culture of **Tv** with the milk media and **VB**, 80 to 90% of positive cases were confirmed within 48 hours of culture and the growth of **Tv** in the media was kept in satisfactory condition more than 96 hours of culture.

3) Some of the strains newly isolated from patients were subjected to an examination on the serial cultivation. The successive cultivation until the 8th generation was easily attained with use of **TTM** and **VB**, and the fairly good growth of **Tv** was usually demonstrated in both media. It was also possible with **TCM** and **PCM** in most of cases but these media could not be regarded as an appropriate medium for maintaining **Tv**, since the growth of **Tv** was usually lack of stability in the media.

4) The milk free **TC** medium appeared to demonstrate no good result in the examination on the isolation culture and serial cultivation as well.

From the results described above, it was concluded that an indispensable component for the growth of **Tv** might be contained in milk and **TTM** medium would be practically usable either in the isolation culture or in the serial cultivation of **Tv**.

はじめに

陸トリコモナス *Trichomonas vaginalis* Donné, 1937, 以下 **Tv** と略す) は, 婦人の膣および近接臓器のみならず, 男女ともに尿道感染が少なくないことが知られている。トリコモナス症の診断には, 膣・尿道などの分泌物を鏡検して **Tv** の存在を確認すると同時に, 培養検査を行なうことにより, 一層正確を期することができる。

それゆえに, 本原虫の培養法については, 古くから

数多くの研究が行なわれて来たが, 培養法に新局面を開拓したのが, Johnson, Trussell & John (1945) によって発表された **CPLM** 培地による **Tv** の純粋培養の成功である。以来, わが国でも **CPLM** 培地を参考に浜田 (1953) の **V-bouillon** 培地や浅見 (1954) の **Cysteine bouillon** 血清培地などが提出され培養検査による **Tv** の検出がさかんに行なわれるようになった。

しかしながら、これらの培地はいずれも約10%の血清を不可欠の成分としており、そのために血清の人手および保存などの繁雑さのためもある、一般臨床医家の間では利用範囲が制限されざるをえない傾向があった。このような理由もあって、Tv 培地組成やその作製過程などの簡易化をはかる目的の研究や、血清中の増殖促進物質の検討を目指す研究も数多く試みられてきた (Sprince, Kupferberg et al., 1947-1948; 池内 1959)。

それらの研究の中で注目すべきものの一つは Samuels (1962, 1965) らによる血清を用いず、代って乳製品を使用する培地で、Tv を含む各種のトリコモナスの継代培養に良好な成績が報告されている。この培地は、血清の代わりに乳製品として、light cream あるいは whipping cream を培地 100ml に 0.01ml 添加するもので、滅菌方法も最終的にオートクレーブにかけ得るものであった。

著者らは Samuels らの C7 培地を基礎に各種の市販乳製品を用い Tv の継代培養を比較検討した結果、市販牛乳をそのまま用いた1新培地 (TTM 培地) で Tv がきわめて良く増殖し、長期間の継代培養も可能であることを認めた。そこで、さらにこの TTM 培地を簡易化する目的で TCM 培地、PCM 培地の2種培地を作成し、これら3種の牛乳培地を用いて、患者材料からの Tv の分離培養を試み、各培地の Tv 検出率を比較し、興味ある知見を得たので報告することとした。

実験材料および方法

1 供試培地の組成および作製法

使用した培地は、TTM, TCM, PCMの3種牛乳培地および TCM から牛乳のみを除去した無牛乳 TCM 培地 (TC と略す) で、これらの対照として従来広く用いられてきた10%血清加 V-bouillon (VB と略す) を併用した。いずれの培地も、材料接種の直前に煮沸水中で約10分間加温後、水道水中で急冷し、嫌氣的培養条件とした。以下簡単に各使用培地の組成および作製法を記す。

TTM 培地 (Trypticase-Thiomalic-Milk-Medium)

Dist. Water	100ml
Trypticase	4.2g
Liver extract	1.2g
Yeast extract	0.3g
KH ₂ PO ₄	7.5mg

以上を煮沸水中で加温溶解し、冷却後以下の物質を

常温で溶解する。

Citric acid	8mg
Thiomalic acid	20mg
Ascorbic acid	40mg
Glucose	0.5g

溶解後 pH 6.0 に調整し、ザイツ型 濾過器により濾過滅菌する。

これに市販牛乳 (雪印ホモナイズ牛乳) を100°C, 30分, 3回蒸気間歇滅菌または120°C, 20分高压蒸気滅菌し、0.25mlを培地100mlに添加さらに Cholesterol 0.8mg (あらかじめ 0.4mlの無水 Ethanol に溶解) を加える。完成した培養液を5ml ずつ滅菌試験管に分注し、冷蔵庫中に保存した。

TCM 培地 (Trypticase-Cysteine-Milk-Medium)

A 部

Dist. Water	80ml
Trypticase	4g
Liver extract	1.2g
Yeast extract	0.3g
NaCl	0.6g

以上を煮沸水中で加温溶解後、pH 6.0 に調整し、120°C, 20分高压蒸気滅菌する。

B 部

Dist. Water	20ml
Glucose	0.5g
Cysteine HCl	100mg
Ascorbic acid	40mg

以上を常温で溶解後、pH 6.0 に調整し、ザイツ型 濾過器により濾過滅菌する。

A部とB部を混合し、さらに TTM の場合と同様、滅菌牛乳 0.25ml および Cholesterol 0.8mg を加え、5ml ずつ分注する。

PCM 培地 (Peptone-Cysteine-Milk-Medium)

この培地は TCM 培地の Trypticase を Peptone 4g に置換したもので、他の組成、作製法は TCM 培地と同様である。

V-bouillon 培地 (以下 VB と略す)

CPLM 培地の一変法で、以下の組成のものを用いた。

Peptone	2g
Liver extract	0.2g
Yeast extract	0.2g
Cysteine HCl	0.2g
Glucose	1g
NaCl	0.9g
Dist. Water	100ml

第1表 牛乳培地による腔トリコモナスの検出成績

Positive case No.	Medium				Result of microscopic examination
	T T M	T C M	P C M	V B	
No. 1	≡	≡	≡	≡	—
2	—	—	+*	—	—
4	≡	≡	≡	≡	≡
11	—	—	—	+**	—
12	+	≡	≡	≡	—
16	+*	+**	—	+**	—
18	≡	≡	≡	≡	+
19	+	+	+	≡	—
26	+	+	≡	≡	—
28	+	≡	≡	≡	—
31	≡	≡	+	≡	—
33	+	+	≡	≡	—
34	≡	≡	≡	≡	—
53	≡**	+**	+*	+**	—
55	≡	≡	+	≡	—
57	≡	≡	≡	≡	—
76	≡	≡	≡	≡	≡
78	≡	≡	≡	≡	≡
80	≡	≡	≡	≡	≡
82	+	≡	≡	+	—
No. positive No. examined	18/74	18/74	18/74	19/74	5/74
Detection rate (%)	24.3	24.3	24.3	25.7	6.8
Detection rate of cases with ≡ and ≡ (%)	14.9 11/74	17.6 13/74	17.6 13/74	20.3 15/74	5.4 4/74

Table 1. Detection rate of Tv in the isolation culture from vaginal secretion of patients with milk media

* Tv was detected 72 hours after inoculation.

** Tv was detected 96 hours after inoculation.

Total detection rate: $20/74 \times 100 = 27.0(\%)$

— : No Tv in all microscopic fields (200x magnification)

+ : Less than one Tv in a field

≡ : 1~3 in a field

≡ : More than 4 in a field

加温溶解後 pH 6.0 に調整し、5ml ずつ試験管に分注し、120°C 20 分高圧蒸気滅菌する。この培地は使用直前に煮沸後急冷し、無菌牛血清を 0.5ml ずつ添加した。

TC 培地

この培地は TCM 培地と組成、製作過程は全く同様であるが、牛乳は加えられていない。

2 患者材料および培養方法

産婦人科医院を訪れた患者を任意選択し培養材料を採取した。生理食塩水 5ml を含む滅菌駒込ピペットで患者の腔分泌液を吸引し、1,000 r.p.m., 10 分間遠心沈澱し、上清部の大部分を除去し、残部を接種材料とした。ピペットで沈澱部を平等に混合し、各供試培地に等量宛接種し、37°C 恒温器内で培養した。以上の操作によって、ある一つの患者材料については各供試

培地には常に同一条件の接種材料が同量ずつ接種されたものと見なすことができる。なお、培地には雑菌の増殖防止の目的で結晶ペニシリンGカリウム(タケダ) 2,000 u/ml, 結晶硫酸ジヒドロ ストレプトマイシン(明治) 2mg/ml を添加した。

培養と同時に、材料の1部を直接検鏡し原虫の有無をしらべ比較対照とした。

3 判 定

Tv の増殖の有無判定は、接種後24, 48, 72, 96の各時間毎に計4回実施した。培地の底層部より滅菌毛細管ピペットで静かに1滴を採取し、200倍拡大で検鏡し、運動性を有する **Tv** の有無、数をしらべ、次の基準で記号表示した。

- **Tv** が認められない場合
- + **Tv** が認められたが各視野平均1未満の場合
- ++ **Tv** が各視野平均1~3の場合
- +++ **Tv** が各視野平均4以上の場合

4 継代培養

患者材料から **Tv** の分離実験にひきつづき、原虫増殖を認めた場合の数例について、各供試培地による継代培養の可否を検討した。この場合も、各培地の中

下層部から数滴を採取し、新しい培地に移植した。

実 験 成 績

1 牛乳培地による検出成績

TTM, TCM, PCM の3種牛乳培地と血清加培地である **VB** を用いて患者材料からの **Tv** 検出成績の比較を行なった。検査数74例について、その成績を第1表に示した。

供試培地のいずれか一つにでも **Tv** を検出した場合を、その検査材料について陽性成績と見なすと、総検出率は27.0% (陽性例数20) で、検鏡による検出率6.8% (陽性例数5) をはるかに上まわった。牛乳培地は3種とも、検出率24.3% (陽性例数18)、**VB** は25.7% (陽性例数19) となり牛乳培地相互間、および **VB** との間には検出率の差を強調し得なかった。

表1に見られるように、陽性例の大部分は各供試培地に共通のケースであったが、ごく少数の例である種の培地では陽性で、他種培地では陰性の場合が認められた。このような場合については、接種材料中の原虫数がきわめて少数であったことが、その原因の一つになったものと考えられた。それを裏付ける一つの知見としては、検出し得た培地中での増殖原虫数がいずれ

第2表 牛乳培地 (TCM) と無牛乳培地 (TC) による陸トリコモナスの検出成績

Positive case No.	Medium			Result of microscopic examination
	T C M	T C	V B	
No. 88	+++	++	++	-
95	++	+	++	-
101	++	++	++	++
103	-	-	+*	-
110	++	++	++	++
116	+*	-	-	-
120	++	-	++	++
123	-	+	+	-
130	+	+	++	-
No. positive No. examined	7/44	6/44	8/44	3/44
Detection rate (%)	15.9	13.6	18.0	6.8
Detection rate of cases with ++ and +++ (%)	11.4 5/44	6.8 3/44	13.6 6/44	6.8 3/44

Table 2. Detection rate of **Tv** in the isolation culture from vaginal secretion of patients with a milk medium (TCM) and a milk-free medium (TC)

* **Tv** was detected 72 hours after inoculation.

Total detection rate: $9/44 \times 100 = 20.5$ (%)

も少ないことが注目された。ことに No. 2 の **PCM** 培地では、全視野中1ヶの原虫を検出し得たにすぎなかった。したがって、このような実験例に基く検出成績の差異を、直ちに培地性能の優劣に結びつけることはできないと思われる。

第1表中、**卍**または**卍**で表示した検出例は、増殖原虫数が比較的多く、培地の検鏡でほとんど各視野毎に原虫を確認し得た場合を示したものである。換言すれば、特に入念な検鏡を経ずとも、原虫を検出し得た陽性例とすることができる。そこで**卍**、**卍**の例数のみを陽性例として検出率を求めると、**VB** の20.3%に対し**TCM**、**PCM** はともに17.6%、**TTM** は14.9%となり、**VB** が牛乳培地に比し、やや優れ、牛乳培地中でも**TTM** がやや劣るかの成績となったが、**VB** と各牛乳培地間の陽性率の差は、有意なものとして採択することはできなかった。(危険率5%)。

2 牛乳培地と無牛乳培地の比較成績

先の実験の結果、3種の牛乳培地の **Tv** 検出率には優劣の差をつけ難い成績が得られた。本実験では、牛乳培地中の **TCM** を選び、これと無牛乳 **TCM** 培地 (**TC** と略す) との検出成績を比較した。この培地は **TCM** 培地と、組成、製作過程は全く同様であるが、牛乳は加えられていない。

その成績は第2表に示したが、検査総数44名中 **TC**

M では陽性数7名 (15.9%)、**TC** では6名 (13.6%) の成績となり、また対照とした **VB** では8名 (18.0%) であった。

検査数が少ないため、上の成績からは、検出率の差を強調することはできないが、先の実験の場合と同様に、**卍**、**卍**を与えた陽性数のみの検出率を求めると **VB** 13.6%、**TCM** 11.4%に比し、**TC** は6.8%となり **TC** が他2者に比しかなり低率に止まるように解釈された。このことは患者材料の直接検鏡によっても6.8%の検出率が得られている事実からも推測することができ、また培地中の原虫増殖度や増殖を示した期間などを総合すれば、無牛乳培地である **TC** が **Tv** 検出用培地としては明らかに他より劣るものと判断された。

3 培地中の原虫増殖と検出期間について

検査材料の培養後、はじめて原虫が検出された時期、および原虫の増殖期間を知るために、先の検出成績を再吟味した。

第3表にその成績をまとめたが、**TC** を除く4種培地ではいずれも培養24時間後の検査でほぼ60%の陽性例が検出され、48時間後の検査で約20~30%が新たに検出されることが示された。以後はこれら4種培地では少数の新検出例が加わったが、**TC** では72、および96時間後の検査で新しい陽性例が認められなかった。ただ **TC** に関しては、検出例が少ないことは考慮しな

第3表 牛乳培地による腔トリコモナスの培養各時間毎の原虫検出数

Time after inoculation	Medium									
	T T M		T C M		P C M		T C		V B	
	A*	B**	A	B	A	B	A	B	A	B
24 hours	12	12	15	15	11	11	5	5	17	17
	66.7%	66.7	60.0	60.0	61.1	61.1	83.4	83.4	63.0	63.0
48 "	4	16	7	22	5	16	1	5	6	23
	22.2	88.9	28.0	88.0	27.8	88.9	16.7	83.4	22.2	85.2
72 "	1	15	1	23	0	16	0	4	3	26
	5.6	83.3	4.0	92.0	—	88.9	—	66.7	11.1	96.3
96 "	1	15	2	25	2	18	0	3	1	25
	5.6	83.3	8.0	100.0	11.1	100.0	—	50.0	3.7	92.6
Total of positive cases	18		25		18		6		27	

Table 3. Number of positive cases in **Tv** detection at each time of examination in the isolation culture with milk media

* Column A indicates the number and percentage of new positive cases at each time of examination.

** Column B indicates the number and percentage of total positive cases at each time of examination.

ければならないであろう。

次に原虫の増殖期間を知る1指標として、各検査時間毎の総検出数を吟味した。その成績では、TCM、およびPCMは96時間目の検査で、ともに100%の検出率となり、それ以前に検出し得た培養例は、たとえ24時間目の検査で検出し得た例であってもすべて96時間まで増殖が維持されたことを示すものであった。他方、TTM および VB はそれぞれ83.3%、92.6%となりごく少数の検出例では96時間後に原虫増殖が確認できないことが示された。また TC では96時間後まで増殖を認めた検出例数が全数の半数となり、他の培地に比し、原虫増殖期間が短かく、比較的早く死滅するものではないかと推測された。

したがって、無牛乳培地は別として、牛乳培地では原虫の増殖もよくかつ増殖原虫も培養4日目までは十分維持されると考えて差支えなく、さらにごく少数例では培養3~4日目にはじめて検出し得る事実は、接

種原虫数がたとえ僅少の場合でも、よくその増殖を支持するものと理解された。

4 分離原虫の継代培養成績

第4、5表に分離原虫株の1部についての各培地による継代培養成績を示した。

牛乳培地および VB では、TCM の1例を除きいずれも8代までの継代培養が可能であったが、無牛乳培地 TC では試みた2例とも、初代または2代で継代培養が不可能となった。

一般に、どの培地においても、初期数代の間は原虫増殖が良好でなく、継代を続けるにしがたい増殖が著明となり、増殖速度も安定する傾向が観察された。また、原虫増殖が培地底層部に始まり、時間の経過とともに、中、上層部におよぶことが見られたが、このことは、嫌気性培養法による本原虫の増殖態度としては当然の姿と受け取られた。ただ、継代初期では培地底層部のみに増殖がおり、中、上層部に増殖の波及し

第4表 牛乳培地による分離陸トリコモナス株の継代培養

Positive case No.	Medium	Generation No. in subculture								Possible to maintain?
		1	2	3	4	5	6	7	8	
No. 1	TCM	++	++	+	+	++	+	++	++	Yes?*
	PCM	+++	+++	+	+	++	+	++	+	Yes?
	TTM	++	+++	+++	+++	++	+	++	++	Yes?
	VB	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	Yes
4	TCM	+	++	+	+	++	++	+	+	Yes?
	PCM	+++	+++	++	+++	++	+++	++	+	Yes
	TTM	++	+	+	+	+++	+++	+++	+++	Yes
	VB	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	Yes
12	TCM	+++	+	+	+	++	+++	+++	+++	Yes
	PCM	+	+++	+++	+++	+++	+	+	++	Yes?
	TTM	-	-	+	+	++	+++	+++	+++	Yes
	VB	+	+	+	+	+	+++	+	+	Yes?
18	TCM	+++	+++	+++	+	+++	+	++	+	Yes?
	PCM	++	++	+++	+	++	++	++	+	Yes?
	TTM	+++	+++	+++	+++	+	++	+++	+++	Yes
	VB	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	Yes
19	TCM	+	+++	+++	+++	+	++	+++	+	Yes?
	PCM	++	+	+	+	++	++	+++	+	Yes?
	TTM	+	+	+++	+++	+++	++	+++	+++	Yes
	VB	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	Yes

Table 4. Examination on the serial cultivation of isolated Tv strains with milk media

* Yes? means that the serial cultivation was possible but the growth of Tv in the medium was not stable.

ない場合も多かった。また **VB** では原虫の凝塊がしばしば見られたが、おそらく使用した牛血清にその原因が求められるものであろう。

3種牛乳培地中、**TTM** ではもっとも原虫増殖が顕著で、**VB** をしのぐ様相を示すことが多かった。また同培地の No. 12 のケースでは第1, 2代で原虫検出ができなかったにもかかわらず、盲目継代を続けたところ、

第3代以後には原虫増殖が観察されたが、これらの事実から、**TTM** が継代用培地としても優秀であることを知った。

他の牛乳培地 **TCM**, **PCM** では注意深い観察と操作の元では8代までの継代培養が可能と考えられたが、**TTM** および **VB** に比し、原虫増殖が不安定で、継代用培地として推賞し難いものであった。

第5表 牛乳培地と (**TCM**) と無牛乳培地 (**TC**) による分離腔トリコモナス株の継代培養

Positive case No.	Medium	Generation No. in subculture								Possible to maintain?
		1	2	3	4	5	6	7	8	
No. 101	T C	+	-	-						No
	TCM	+++	++	+	+	-	-			No
	VB	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	Yes
110	T C	+	+	-	-					No
	TCM	+	+	++	+++	+++	+++	++	+++	Yes
	VB	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	Yes

Table 5. Examination on the serial cultivation of isolated **Tv** strains with a milk medium (**TCM**) and a milk-free medium (**TC**)

考 察

腔トリコモナス症の診断には、患者材料の顕微鏡検査のみならず、培養法を併用する方が、はるかに高い検出率が得られることは衆知の事実である。この目的のために、各種の分離用培地が考案されているが、培地の主成分である無菌血清の入手、保存が困難なことや培養操作の繁雑さなどのため、ひろく一般臨床医に使用されるには多少の難点を残すものであった。

著者らが血清の代りに乳製品を用いた培地の作製を試みた目的の一つは、これらの難点を打開することにあった。乳製品加培地に関しては **Samuels** らが提出した2, 3の培地があり、その追試を試みつつさらに改良を加え、当初の研究目的を満たそうと意図したものである。結論的には、著者らが得た牛乳培地は **Tv** の分離用培地としては秀れた能力を示したが、培地作製の簡易化の点では必ずしも初期の目的に沿うものとはならなかった。

今回の実験に用いた牛乳加培地は **TTM**, **TCM**, **PCM** の3種であり、その中で **TTM** は当研究室保存の **Tv** 5株を用いて、長期間の継代培養ができることをあらかじめ確認したものであった。他2者は **TTM** を簡易化する試みで作製したものである。

これら3種の牛乳培地による **Tv** の検出率は対照とした血清加培地 **V-bouillon** の検出率との間に有

意差を認めることができなかった。それゆえに、牛乳培地はいずれも分離培養基としては、従来より賞用されてきた **VB** と同様に使用しえるものと考えられた。分離成績中には、同一検査材料の検出成績が供試培地によって相違するケースが少数観察された。このような検査例では培養材料中の原虫数がきわめて少数であったと考えられ、本実験の如く数種培地を併用し、同一条件下に分離成績を比較する場合には、ある程度、不可避の現象ということができよう。したがって、このようなケースに基づく検出成績の差を直ちに培地の優劣に結びつけることは困難であろう。

原虫の増殖度に関しても、牛乳培地は3種とも **VB** と同様にすぐれた性能を示した。すなわち、培養4日間の観察では、培養24, 48時間後の検査で全陽性例の85~90%が検出され、以後、少数の残部が検出されている。しかも初期に **Tv** が検出された培地では96時間後まで原虫増殖が持続されることを確認した。また少数例では72, 96時間目の検査で初めて原虫検出が陽性となったが、かかるケースは、少数の原虫接種の場合でもこれらの培地がよくその増殖を支持することを物語っている。

TTM, **TCM**, **PCM** 3種牛乳培地は以上の考察の如く、**Tv** の患者材料からの分離用としては、等しく有用なものであると解釈されたが、分離原虫の継代培

養についての比較検討では、かなり明瞭な優劣の差を示した。各培地とも、8代までの継代培養が可能と考えられたが、TCM、PCMの両者では、原虫の増殖度が不安定で、入念な観察の元に継代を続けねばならなかった。このことから、この両培地は継代用培地としては妥当なものとは考えられなかった。他方、TTMは対照としたVBと同様に、継代を重ねるにしたがい、原虫増殖度が安定した。またNo.12の如く、初期2代の盲目継代後、原虫増殖が確認された場合もあった。それゆえに、分離培養のみならず、Tvに対する一般培養基としても、TTMがきわめてすぐれたものといえよう。

無牛乳TCM培地(TC)は、分離実験はもとより、継代培養においても、良好な成績を示さず、牛乳添加の有無がTv培養に大きな意味を決定づけるものであることを知った。ただ分離培養ではTCにおいても直接検鏡を上回る検出成績が得られた。一般に患者材料中の原虫数が多く、また、原虫接種時に材料中の各種共存物が原虫と共に培地中に持ち込まれた場合には、たとえ培地の性能が不完全であっても、一時的に原虫増殖を観察することが少なくない。その意味からすれば、TCがある程度の検出率を与えたのも当然と考えられる。

牛乳加培地に用いた牛乳は、雪印ホモナイズ牛乳(120°C2秒殺菌)で、間歇滅菌またはオートクレーヴで滅菌したものを培地100mlに0.25mlの割合に添加した。培地は牛乳添加によって、僅かに白濁不透明となったが、使用上の不便さをもたらす程のもでなかった。この添加量は、予備実験において0.1mlないし0.5mlの範囲では、ほとんど同程度の原虫増殖をもたらすことや、培地の白濁度などから決定したものである。なおこの点については別に報告する予定である。

本研究で提出した3種牛乳培地は、いずれもその製法の簡易化の点では当初の目的に沿うものとはならなかったが、腔分泌液からの分離培地としては、有用度の高いものであることを認めた。ことにTTM培地

は、分離培養のみならず、原虫の維持継代用培地としてもすぐれた性能を持つことを知り得た。

結 論

腔トリコモナスの分離用培地として、製法の容易な無血清培地を作製する目的で3種の牛乳加培地TTM、TCMおよびPCMを考案し、これらの培地による患者材料からの原虫分離および継代培養について検討した。なお対照として、牛血清加培地V-bouillonを用い成績を比較した。得られた成績は次の通りである。

1. 腔分泌物からのTv分離培養では、3種牛乳培地ともにVBに劣らぬ検出成績を示した。検出率は、検査材料74例中TTM、TCM、PCMはともに24.3% (陽性例数18)、VBは25.7% (陽性例数19)であった。

2. 原虫の増殖度および増殖維持期間についても3種牛乳培地はVBと同様の成績を示した。すなわち、いずれの培地においても、検出例の80~90%が培養48時間以内に検出され、かつそれらの原虫増殖は96時間日まで維持されることを認めた。

3. 8代までの継代培養を試みた結果TTMでは原虫増殖が良好で継代も容易であった。他方、TCMでは原虫増殖が不安定で継代は可能であったが、維持培地としては適当なものとは考えられなかった。

4. 無牛乳培地TCでは、分離培養成績が悪く、継代培養も不可能であった。

以上の成績から、3種の牛乳培地はTv分離培養に使用し得ることを、またTTMは原虫の継代培地にも応用し得ることを知った。

稿を終るに当り患者材料採取に関し、多大の御協力をいただいた原口医院、原口哲之博士に深謝する。

この研究は昭和40年度文部省科学研究費に負うところが大きい。附記し謝意を表する。

本論文に関する研究成績は第35回日本寄生虫学会総会(昭和41年、新潟大学)、第36回日本寄生虫学会総会(昭和42年、岐阜大学)および第19回日本寄生虫学会南日本支部会(昭和41年、久留米大学)で発表した。

文 献

- 1) 浅見敬三：高層培地による腔トリコモナスの深部培養について。慶応医学。31(9)：311-316, 1954.
- 2) Diamond, L. S. : The Establishment of Various Trichomonads of Animals and Man in Axenic Cultures. J. Parasitology, 43: 488-490,

1957.

- 3) 浜田義雄：T. vaginalisの生物学的研究。第1報純粋培養について。大阪大学医学雑誌, 5(5)：429-435, 1953.

- 4) 池内恵二：腔トリコモナスの培養に関する研究。

大阪市立大学医学雑誌, 8 (9): 853-867, 1959.

5) **Lwoff, M.** : The Nutrition of Parasitic Flagellates (*Trypanosomidae, Trichomonadinae*). Edited by Lwoff, A.: Biochemistry and Physiology of Protozoa I. 148-176, New York, 1951.

6) 松林久吉: 膾トリコモナス症. 40年度文部省研究報告集録 (医学及び薬学). 567-573, 1965.

7) **Samuels, R.** : Growth of Axenic Trichomonads in a Serum-free Medium. Progress in Protozoology, Abstract of Papers Read the Second International Conference on Protozoology. International Congress Series No. 91: 200, London, 1965.

8) **Samuels, R. and Beil, E. A.** : Serum-free Medium for Axenic Culture of Trichomonads. Abstract 15 Meeting of Society of Protozoology. J. Protozoology, 9(Suppl.) 19, 1962.

9) 佐々木林治郎: 牛乳・乳製品ハンドブック. 11版, 東京, 1965.

10) **Shorb, M. S.** : The Physiology of Trichomonads. Edited by Hunter, S. H. : Biochemistry

and Physiology of Protozoa III. 383-457, New York, 1964.

11) **Sprince, H.**: The Nutrition of Protozoa III. An Improved Procedure for Separating Human Blood Serum into the Two Fractions Essential for the Sustained Growth of *Trichomonas vaginalis*. J. Bacteriology, 55: 169-174, 1948.

12) **Sprince, H. and Kupferberg, A.B.**: The Nutrition of Protozoa I. A Simplified Medium for the Investigation of Unknown Factors in Blood Serum Essential for the Sustained Growth of *Trichomonas vaginalis*. J. Bacteriology, 53: 435-439, 1947.

13) **Sprince, H. and Kupferberg, A.B.** : The Nutrition of Protozoa II. The Separation of Human Blood Serum into Two Fractions, Both Essential for the Sustained Growth of *Trichomonas vaginalis*. J. Bacteriology, 53: 441-447, 1947.

14) **Trussell, R. E.** : *Trichomonas vaginalis* and Trichomoniasis. Oxford, 1947.