

腔トリコモナスの培養における
牛乳培地の検討

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）

(Received for Publication February 15, 1968)

Examination of a Milk Medium
in the Cultivation of *Trichomonas vaginalis*

Toshio NAKABAYASHI and Akira MIYATA

Department of Epidemiology, Institute for Tropical Medicine, Nagasaki University

(Director: Prof. Toshio NAKABAYASHI)

Summary

In a majority of culture media hitherto devised for *Trichomonas vaginalis*(**Tv**), use of animal sera was inevitable to meet the nutritional requirement of this parasite. In this meaning, Samuels' **C6** and **C7** medium (Samuels, 1963, 1965), in which light cream or whipping cream was used for serum, was of much interest. This experiment was done to examine Samuels' **C7** and further to make up an improved milk medium. A serum-containing medium (**V-Bouillon**) was used in this experiment as a control.

The outline of results obtained was summarized as follows:

- 1) Subcultures of **Tv** with modified **C7** media in which various milk products were used in place of whipping cream were found impossible. It was, however, observed that fresh cow milk fairly stimulated the growth of **Tv** (Table 1).
- 2) As an improved **C7**, **TTM** medium (Trypticase-Thiomalic acid-Milk Medium) which was finally prepared through the quantitative examination of each medium component demonstrated an excellent capability of supporting the growth of **Tv**.

TTM medium was prepared as described below: 4.2 g of trypticase, 1.2 g of liver extract, 0.3 g of yeast extract and 7.5 mg of KH_2PO_4 were dissolved in 100 ml of boiling distilled water. 8 mg of citric acid, 20 mg of thiomalic acid, 40 mg of ascorbic acid and 0.5 g of glucose were added to the solution after cooling. The solution was adjusted the

pH to 6.0 with 1 N NaOH and sterilized with a Seitz filter. To the solution was further added 0.8 mg of cholesterol, which was dissolved in absolute ethanol at the rate of 20 mg per ml, and 0.25 ml of fresh milk which was sterilized by autoclaving at 120°C for 20 min. or by intermittent boiling at 100°C for 30 min. 3 times, and distributed into sterile test tube 5 ml per tube. (Tables 2 and 3).

3) The following substances were found to be essential for **Tv** cultivation in **TTM**: cow milk, cholesterol, ascorbic acid and thiomalic acid. From the fact that thiomalic acid could be replaced by cysteine HCl, it was assumed that these substances might play a role in lowering the oxidation-reduction potential of medium. (Tables 3, 4, 5, 6 and 7).

4) It was thought that trypticase and liver extract were the important sources of amino acids in **TTM**. Trypticase could not be completely replaced by polypeptone but by each 2 g of trypticase and polypeptone, the growth of **Tv** was satisfactorily promoted. (Tables 8,9 and 10)

From the results described above, it was concluded that **TTM** medium would be practically useable in the serial cultivation of **Tv**. The principal differences of **TTM** from **C7** medium were in; firstly the sterilization of medium with the Seitz filter apparatus, secondarily the addition of cow milk instead of whipping cream and lastly adjusting the pH to 6.0.

As to isolation culture of **Tv** from vaginal secretion of patients with use of **TTM** and other two milk media derived from **C7** medium, a report was previously published by the present authors (Nakabayashi and Miyata, 1967).

は し め に

膣トリコモナス *Trichomonas vaginalis* Donné, 1937 (以下 **Tv** と略す) の培養法に関しては、古くより数多くの研究報告が見出されるが、Johnson, Trussell & John(1945)らの **CPLM** 培地による **Tv** の純粋培養の成功によって、この分野の研究は画期的な進歩を示した。

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** 血清培地などが発表され、培養法による **Tv** 検出が盛んに行なわれるようになった。

しかし今まで発表された培地はいずれも、その組成の一部として約10%の血清を不可欠の要素としており、血清を欠くと **Tv** の増殖は減少し、継代維持できないことが知られている。そこで培地中の血清を他の物質と置換する試みや血清中の増殖促進物質の検討が行なわれて来た (Sprince, Kupferberg, *et al.* 1947-1948; 池内1959)。

他方、動物血清の無菌的採取および保存は、時として、かなり困難な場合があり、血清に代る入手容易な培地成分を要求する声も少なくなかった。この点に関して Samuels (1962, 1965) の報告した **C6** および **G7** 培地は血清の代りに乳製品 (light cream, whipping cream) を用いたもので **Tv** をはじめ数種のトリコモナスの継代培養に好成績をおさめたことが報告され注目に値するものであった。

著者らは、製法の容易な無血清培地を作成することを目的に、Samuels の **C7** 培地について、製法および組成の検討を行なうとともに、各種の市販乳製品についても検討を加え、一種の牛乳培地 (**TTM** 培地) を作製した。さらに **TTM** を若干改変した培地をも作製し、これら牛乳培地を用いて患者材料からの **Tv** 分離培養を試みた (中林, 宮田1967)。

本研究は **C7** についての検討と **TTM** 培地を得るに至った諸実験成績について報告するものである。

実験方法及び材料

C7 培地の乳製品の部分 (whipping cream) を他の乳製品で置換して, **Tv** 増殖のための適当な乳製品およびその添加量の見当をつけた。

また **C7** を基礎に作成した牛乳培地を用いて, この培地の各成分量および他の物質との置換の可否, 製法の簡便化に努め, その結果, 最終的に得られた牛乳培地を **TTM** 培地と呼称した。なお **Tv** 培養実験においては常に対照として血清加 **V-Bouillon** を使用した。

1. Samuels' **C7** 培地の組成および供試乳製品

本研究の基礎となった Samuels' **C7** 培地の処法は下記の通りである。

Dist. water	100ml
Trypticase	4.2 g
Liver extract	1.25 g
Yeast extract	0.3 g
KH ₂ PO ₄	7.5mg
Citric acid H ₂ O	8 mg
Thiomalic acid	20 mg
Ascorbic acid	40 mg
Glucose	150 mg

以上を加温(50°C)溶解し, 以下を加える。Cholesterol 0.8mg (0.4 mlの無水 Ethanol に溶解したもの) 添加後, 1 N-KOH を用い pH 7.0 に調整し, 原法では whipping cream 0.01 ml を添加する。これを中試験管に 5ml ずつ分注後, 120°C, 20分高圧蒸気滅菌し, 冷蔵庫に保存した。使用に際しては, その直前に煮沸水中で約10分間加温後, 水道水で急冷し, 嫌氣的培養条件とした。

C7 培地の検討に当っては, まずその乳製品である whipping cream を入手の容易な市販乳製品に置換しえるかを検討した。

供試乳製品は, 牛乳 (雪印ホモナイズ牛乳), 生クリーム (雪印), スキム・ミルク (雪印), クリーム・パウダー (クリープ, 森永), 無糖煉乳 (エバミルク, ネッスル) の5種。

2. **TTM**培地(**Trypticase-Thiomalic acid-Milk**培地)

牛乳を主成分として使用した **C7**培地について, その培地成分の至適量を検討し, 最終的に得られた培地を **TTM** 培地と略称した, この培地の組成 および製法は次の通りである。

Dist. water	100ml
Trypticase	4.2 g

Liver extract	1.2 g
Yeast extract	0.3 g
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 H ₂ O	8mg
Thiomalic acid	20mg
Ascorbic acid	40mg
Glucose	0.5 g

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分高圧蒸気滅菌し, 0.25ml を培地100ml に添加し, 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。使用直前に加温, 冷却を加えるのは前述の通りである。

3. **V-Bouillon**培地 (以下**VB**と略す)

対照として用いた **V-Bouillon** 培地は, 血清を10% 含有するもので, その処法は既報の文献を参照された (浜田1953: 中林・宮田1967)。

4. 供試**Tv**株および培養方法

実験に用いた腔トリコモナスは当教室で **VB** を用い継代維持して来た5株である。いずれの株も **VB** 中できわめて安定した増殖をせしめ, また雑菌混入のないことを無菌試験によって確認したものである。原虫接種法は **VB** または **TTM** で継代中の原虫をその培地の中層部より滅菌毛細管ピペットで数滴吸引し, 供試培地に接種し, 37°C 恒温器で培養した。接種した **Tv** の数は時により異なるが大體100,000~200,000である。

5. **Tv**増殖の判定

Tv の増殖の有無判定は接種48時間後に行ない, 同時に新しい培地へ継代した。

すなわち試験管を軽く振盪し, 毛細管ピペットで中層部より数滴採取し, 継代に用いた。同時にトーマのヘモサイト・メーターを用いて各供試培地中の **Tv** 数を数え, 次の基準で記号表示した。原則として各表とも6代までの継代成績をしめしたが, いずれもその後さらに何代か継代を重ね, その成績を参考にした。

--	Tv が全く認められない場合
+	Tv 数 1~500/mm ³

卅	Tv 数501~1000/mm ³
卅	Tv 数1001~1500/mm ³
卅	Tv 数1501~2000/mm ³
卅	Tv 数2001以上

なおいずれの場合も運動性を有する生原虫のみを数えた。

表および本文中に出てくる培地成分は培地 100ml中の量である。

実 績 成 験

1 C7培地における各種乳製品の検討

C7 培地の whipping cream を他の種々の乳製品に置換し、**Tv** の増殖に及ぼす効果を検討した。その成績は第 1 表から明らかなように、用いた牛乳、生クリーム、スキム・ミルク、クリープ、無糖煉乳の 5 種のうち、どれを用いても **Tv** の長期継代は困難であった。ただスキム・ミルクおよび牛乳は、他の乳製品の場合よりも長く継代できるようであった。特に牛乳 2ml を添加した場合は、8 代まで継代することができたが、**Tv** の増殖は代を重ねるにつれて低下した。一方、対照として用いた全く乳製品を含まない培地では、**Tv** は殆んど増殖しなかった。また無糖煉乳の場合には、2 代までしか継代しえなかったが、初代における **Tv** の増殖はかなり良く、これらのことは乳製品中に **Tv** の増殖促進物質が存在することをしめしているように

思われた。

2 ITM 培地による **Tv** の培養成績

先の実験で乳製品としては牛乳がもっとも秀れた成績を示したので、以後牛乳を使用しつつ、C7 培地の各組成および製法について検討を続けた。その個々の検討成績に先だて、最終的に得られた ITM 培地における **Tv** の培養成績を述べることにする。

ただ、培地滅菌法に関しては C7 培地における 12[C° 20分、高圧蒸気滅菌が妥当でないとの考慮から、以後の滅菌法はすべて濾過滅菌法を基礎とした点を明記しておきたい。

培養および継代成績は第 2 表に示したように、対照とした VB 培地 (10% 牛血清加培地) と比較して、少しも劣らない成績を示したが株により成績にやや差があり、TS, MY 両株などは長期継代中に何度か増殖が

第 1 表 Samuels' C7 培地における **Tv** の増殖に対する各種乳製品の比較

Milk products	Quantity of addition (ml or g per 100 ml of medium)	Generation no. in subculture	Possible to maintain ?
Milk (Yukijirushi)	0.3 ml	7-8	No
	2	7-8	No
	1	8	Yes ?*
	5	6-7	No
Fresh cream (Yukijirushi)	0.01ml	3	No
	0.1	4	No
	0.5	4	No
	2	4	No
Skim milk (Yukijirushi)	0.1 g	3	No
	0.2	5	No
	0.3	5-8	No
Cream powder (Creap. Morinaga)	0.2 g	4	No
Sugarless condensed milk (Nestle)	0.01 ml	2	No
	4	2	No
Control (no milk product)	0	1-2	No

Table 1. Comparison of some milk products for the multiplication of **Tv** in Samuels' C7

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

第2表 TTM 培地および VB 培地による Tv 継代成績

Strain	Medium	Generation no. in subculture								Possible to maintain ?
		1	2	3	4	5	6	7	8	
TK	TTM	###*	###	###	##	###	##	##	##	Yes
	VB	+	+	+	+	+	###	###	###	Yes
TS	TTM	##	+	+	##	##	+	+	+	Yes
	VB	##	+	+	+	+	###	##	##	Yes
MY	TTM	###	###	##	##	+	+	##	+	Yes
	VB	+	+	+	###	###	+	###	###	Yes
TM	TTM	###	+	+	###	##	##	##	+	Yes
	VB	+	+	+	+	+	+	+	+	Yes

Table 2. Examination on the serial cultivation of Tv with TTM and VB

* The following signs were used for indicating the multiplication of Tv in a 48 hour culture.

- 0/mm³
- + 1-500/mm³
- ++ 501-1000/mm³
- ### 1001-1500/mm³
- #### 1501-2000/mm³
- ##### 2000</mm³

第3表 TTM 培地における牛乳量の Tv 増殖に対する影響

Strain	Quantity of milk (ml per 100 ml of medium)	Generation no. in subculture						Possible to maintain ?
		1	2	3	4	5	6	
TK	1	###	###	##	##	###	###	Yes
	0.5	###	##	##	##	###	##	Yes
	0.25	##	##	##	##	##	##	Yes
	0.125	###	###	##	###	##	##	Yes
	0.06	+	+	+	-			No
	0.03	+	+	+	+	+	+	Yes ?*
	0	+	+	-				No
MY	1	###	+	+	-			No ?*
	0.5	+	+	##	+	+	+	Yes
	0.25	##	##	+	+	+	##	Yes
	0.125	+	##	###	+	+	-	No
	0.06	+	-					No
	0.03	+	-					No
	0	-						No

Table 3. Influence of the quantity of milk on the multiplication of Tv in TTM

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

** No ? means that the serial subculture might be possible in some cases.

第4表 牛乳の滅菌方法の検討

Strain	Method of sterilization	Generation no. in subculture						Possible to maintain ?
		1	2	3	4	5	6	
TK	Autoclaving*	卍	卍	卍	卍	+	+	Yes
	Intermittent boiling**	+	卍	卍	卍	+	+	Yes
MY	Autoclaving	卍	卍	卍	卍	+	+	Yes
	Intermittent boiling	卍	卍	+	卍	+	+	Yes

Table 4. Examination on the sterilization method of milk

* 120° C for 20 min.

** 100° C for 30 min. 3 times (once daily)

低下し、一方TK, TM株は比較的安定した増殖を保った。しかしどの株も30代まで継代を続けることができた。

3 TTM 培地中の牛乳量およびその滅菌方法の検討

先の実験における添加牛乳量は0.25ml/100mlであったが、この牛乳量の決定は、具体的にはこの実験によって導かれたものである。第3表から明らかのように牛乳量は0.125~1ml/100mlであれば、大体似たような成績であった。しかし牛乳量が0.5ml以上であれば、培地は白濁し、原虫増殖の肉眼的判定などに支障を招くので0.25ml/100mlを採用することとした。

なお牛乳はザイツ濾過器を通過し難いので別の方法で滅菌し、培地に添加しなければならない。このため牛乳の滅菌方法として、100°C, 30分, 3回蒸気間歇滅菌と120°C, 20分高圧蒸気滅菌の二通りの方法を比較

検討した。その成績は第4表に明らかとなり、どちらの滅菌法を用いても、その成績には殆んど差が認められなかった。

4 TTM 培地中の Cholesterol 量の検討

第5表の通り、Cholesterolを全く欠く培地ではTvは増殖できない。0.4mg/100ml以上であれば、増殖を支持しえるように思われたが、十分な必要量を考えるために、C7 培地の場合と同様に0.8mg/100mlを添加することとした。

5 TTM 培地中の Ascorbic acid 量の検討

第6表の通り、Ascorbic acid が欠けた場合もTvの増殖は認められなかった。実験成績から添加量として40mg/100mlが妥当と思われた。

第5表 TTM 培地における Cholesterol 量の Tv 増殖に対する影響

Strain	Quantity of cholesterol (mg per 100 ml of medium)	Generation no. in subculture						Possible to maintain ?
		1	2	3	4	5	6	
TK	1.6	+	卍	卍	卍	+	+	Yes
	0.8	+	卍	卍	卍	+	+	Yes
	0.4	+	+	卍	-			No
	0.2	+	+	-				No
	0	-						No
MY	1.6	卍	卍	+	+	卍	卍	Yes
	0.8	卍	卍	+	卍	+	+	Yes
	0.4	卍	+	+	卍	+	+	Yes
	0.2	卍	+	+	-			No
	0	+	-					No

Table 5. Influence of the quantity of cholesterol on the multiplication of Tv in TTM

第6表 TTM 培地における Ascorbic acid 量の Tv 増殖に対する影響

Strain	Quantity of ascorbic acid (mg per 100 ml of medium)	Generation no. in subculture						Possible to maintain ?
		1	2	3	4	5	6	
TK	80	++	++	+++	++	++	+++	Yes
	40	++	+++	+++	+++	+++	+++	Yes
	20	++	+	-				No
	10	-						No
	0	-						No
MY	80	++	++	+	++	+	-	No?
	40	+++	+++	++	++	+	+	Yes
	20	+	-					No
	10	-						No
	0	-						No

Table 6. Influence of the quantity of ascorbic acid on the multiplication of Tv in TTM

6 TTM 培地中の Thiomalic acid および Citric acid H₂Oの検討

第7表に示したように、この両者を欠く培地では、Tvの増殖および継代培養は不可能となる。しかしいずれか一方を欠く場合は、MY株でみられるように Thiomalic acid を欠けば、Tvの増殖を抑える場合が観察されたのに反し Citric acid を欠く場合は、殆んど影響がないようであった。また両方とも除き、代わりに Cysteine HCl 100mg/100mlを添加した場合は対

照と同じくきわめて好成绩であった。

7 TTM 培地中の Liver extract 量の検討

Liver extract の量を検討した成績は第8表の通りである。MY株の成績および表示しなかった他の株の成績を参考にすると、Liver extract 量は 1.25g/100mlが妥当のように考えられる。

8 TTM 培地中の Trypticase 量の検討

Trypticase は培地中の主要な蛋白源として使用されるので、他の成分に比し使用量はきわめて多いのは

第7表 TTM 培地における Thiomalic acid および Citric acid の Tv 増殖に対する影響

Strain	Quantity of addition (mg per 100 ml of medium)	Generation no. in subculture						Possible to maintain ?
		1	2	3	4	5	6	
TK	20 mg of thiomalic acid and 8 mg of citric acid (control)	++	+++	++	+++	+++	+++	Yes
	20 mg of thiomalic acid	++	+++	+++	++	++	+++	Yes
	8 mg of citric acid	++	+++	+++	+++	+++	+++	Yes
	100 mg of cysteine HCl	++	++	+++	+++	+++	+++	Yes
	None	++	+	-				No
MY	20 mg of thiomalic acid and 8 mg of citric acid (control)	+++	+	++	++	+	+	Yes
	20 mg of thiomalic acid	+	++	++	+++	+++	+++	Yes
	8 mg of citric acid	+++	-					No
	100 mg of cysteine HCl	++	++	++	+++	+++	+++	Yes
	None	++	+	++	-			No

Table 7. Influence of thiomalic acid or citric acid on the multiplication of Tv in TTM

第8表 TTM 培地における Liver extract 量の Tv 増殖に対する影響

Strain	Quantity of liver extract (g per 100 ml of medium)	Generation no. in subculture						Possible to maintain ?
		1	2	3	4	5	6	
TK	1.25	π	π	+	π	π	π	Yes
	0.6	π	π	π	π	π	π	Yes
	0.3	π	+	-				No
	0.15	π	+	-				No
	0	+	-					No
MY	1.25	π	π	π	π	π	π	Yes
	0.6	π	π	+	-			No
	0.3	+	+	-				No
	0.15	+	-					No
	0	-						No

Table 8. Influence of the quantity of liver extract on the multiplication of Tv in TTM

第9表 TTM 培地における Trypticase 量の Tv 増殖に対する影響

Strain	Quantity of trypticase (g per 100 ml of medium)	Generation no. in subculture						Possible to maintain ?
		1	2	3	4	5	6	
TK	4.2	π	π	π	π	π	π	Yes
	2	π	π	+	-			No
	1	+	+	-				No
	0.5	+	+	-				No
MY	4.2	π	π	π	π	π	π	Yes
	2	π	π	π	-			No
	1	π	-					No
	0.5	-						No

Table 9. Influence of the quantity of trypticase on the multiplication of Tv in TTM

当然である。ここでは最小必要量を知る目的でその添加量を検討したが、第9表から明らかなように、その量は C7 培地におけると同様 4.2g/100ml 量が妥当であると思われた。

9 TTM 培地中の Trypticase と Peptone (Polypeptone, 和光) の置換

Trypticase を Peptone で置換する実験を行なった。その成績は第10表の通りで全量を Peptone に置

換してもなお Tv の継代は可能であった。しかし表示しなかった他の株での成績も総合すると、全量置換の場合の Tv の増殖はやや悪くまた Peptone 3g と Trypticase 1g を加えた場合の成績も全量置換と似て原虫の増殖が不安定であった。しかし両者を同量の 2g ずつ加えた場合の成績は Trypticase 4g 添加の場合と同じく、原虫増殖は良好で長期継代も容易であった。

第10表 TTM 培地における Trypticase の Peptone による置換の影響

Strain	Quantity of trypticase or peptone (g per 100 ml of medium)	Generation no. in subculture						Possible to maintain ?
		1	2	3	4	5	6	
TK	Trypticase 4 (control)	+++	+++	+++	+++	++	++	Yes
	Trypticase 2+Peptone 2	+++	++	+++	+++	++	++	Yes
	Trypticase 1+ Peptone 3	++	++	++	++	++	++	Yes
	Pepton 4	++	++	++	++	++	++	Yes
MY	Trypticase 4 (control)	++	++	++	+++	+++	+	Yes
	Trypticase 2+Peptone 2	+	++	+++	++	+++	+++	Yes
	Trypticase 1+Peptone 3	+	++	+	++	++	-	No ?
	Peptone 4	+	+	++	++	++	++	Yes

Table 10. Influence of replacement of trypticase with peptone on the multiplication of *Tv* in TTM

考 察

臍トリコモナスの診断には、尿・尿道などの分泌物を直接検鏡するとともに、適当な培地に材料を接種して、増殖する *Tv* を確認する方法が最も確実である。そのため種々の培養法が提出されているが、それらの培地はいずれも不可欠の要素として約10%の血清添加を必要としている。

しかし血清の入手、滅菌、保存などの操作はきわめて繁雑で、そのため臍トリコモナス症の診断に培養法を併用することは一般臨床医家にとって必ずしも容易なことではなかった。

そのため培地中の血清をより入手容易で滅菌しやすい物質に置換する試みや血清中の増殖促進物質の分析などが行なわれている(Sprince, Kupferberg, et. al. 1947-48; 池内1959)。

またトリコモナス類の栄養要求性の研究という立場から、合成培地の研究も行なわれ、血清を組成の明らかな物質と置換する試みもなされている(Shorb, 1964)。

しかし全く血清を含まない *Tv* 培地の作成は容易でなく、常時使用できる培地についての報告は乏しい。それゆえ Samuels らの乳製品を使った C6, C7 培地は注目に値するものといえよう。著者らはまずこの C6, C7 培地について追試を重ねたところ、*Tv* の長期継代培養に成功しえなかった。ただこの一連の実験を通じて、各種乳製品、特に牛乳に *Tv* の増殖を促進

する働きがあることを知り、この点に注目して培地作成方法を再検討した。

まず、C6, C7 培地の原法では培地全体を高圧蒸気滅菌しているが、これをザイツ濾過器による濾過滅菌に改めることにより *Tv* の長期継代が可能であることを知った。

さらに若干の検討を加え到達した培地は、牛乳を用いていること、pH が *Tv* の最適である6.0であること (C7 培地は 7.0)、滅菌法が濾過滅菌であること、Glucose量が0.5g/100mlであること (C7では0.15g/100ml)を除けば C7 培地と同様のものではあったが、これを TTM 培地 (Trypticase-Thiomalic acid-Milk-Medium) と呼称することとした。この TTM 培地による *Tv* の増殖度および長期継代の可否を検討した結果、対照とした血清加 VB 培地に劣らぬ優秀な培地であることを知った。

TTM 培地の各組成の添加量に関してはあらかじめ定量的な吟味を加えて決定した。また、一部組成については、置換実験を試みてその必要性を検討した。その成績はそれぞれの実験成績の項に詳述したが、主な点を総括すると次のようである。

牛乳量は0.25mg/100mlの少量でよく、この牛乳の滅菌は120°C20分蒸気高圧滅菌または100°C、30分、3回蒸気間歇滅菌のいずれでもよかった。Thiomalic

acid, Ascorbic acid, Cholesterol は不可欠の培地成分と思われた。ただし Thiomalic acid は Cysteine HCl で置換しえることから、Thiomalic acid は培地の酸化還元電位の低下に役立つものと考えられる。Trypticase を Peptone で置換すると、原虫の増殖は相当低下する。しかし Trypticase, Peptone を共に2gずつとした場合、原虫増殖は顕著であった。これらことから、もし Peptone に置換した場合 Yeast extract, Liver extract あるいは何か他の物質の増量または添加によって、その欠点を補充しえるのでは

結

腔トリコモナス用培地として製法の容易な無血清培地の作成を目的に、Samuels の C7 培地に若干の改良を加え、新たに牛乳加培地 (TTM 培地) を作製し、培養成績を吟味した。

1. TTM 培地による Tv 原虫の増殖はきわめて良好であり、かつ長期継代培養も容易に達成できる。
2. 牛乳はこの培地成分としては不可欠のように理解された。その添加量は 0.25ml/100ml でよく、牛乳滅菌法は 120°C 20 分高圧蒸気滅菌、または 100°C、30 分、3 回蒸気間歇滅菌のいずれでも支障を認めなかった。
3. その他の培地組成についても、その添加量について若干の検討を加えた。

文

- 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 純粹培養について 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：腔トリコモナス症 40年度文部省研究報告集録 (医学及び薬学) 567—573, 1965.
- 7) 中林敏夫, 宮田彬：牛乳培地による腔トリコモナ

ないかとの推察を得た。以上の考察をさらに進めて、TTM 培地を改変した培地を考案し、Tv の分離培養成績を検討した (中林・宮田 1967)。

結論的に、今回著者らが提出した TTM 培地は Samuels' C7 培地を、その滅菌法や組成においてわずかに改変したものであるが、入手容易な市販牛乳を用いたこと、原虫増殖が著明であることなどから、広く応用しえる可能性を持つものと思われる、このような見解のもとに、さらに検討を加えたい。

論

4. TTM 培地の C7 培地と異なる主要点は、牛乳を用いたこと、Glucose 量が 0.5g/100ml であること、濾過滅菌であること、および pH を 6.0 に調整したことであった。

稿を終るに当り Tv 株の分離のため材料採取に御協力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。附記して謝意を表する。

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。

献

- スの分離培養について 熱帯医学 9(2)：79—88, 1967.
- 8) 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.
- 9) 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, 1952.
- 10) 佐々木林治郎：牛乳、乳製品ハンドブック 11版 東京, 1965.
- 11) Shorb, M. S. : The Physiology of Trichomonads. Edited by Hutner, S. H. : Biochemistry and Physiology of Protozoa III. 383-457, New York 1964.
- 12) Sprince, H. : The Nutrition of Protozoa

III. An Improved Procedure for Separating Human Blood Serum into the Fractions Essential for the Sustained Growth of *Trichomonas vaginalis*. J. Bacteriology. **55** : 169-174, **1948**.

13) **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**.

14) **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**.

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