

無菌的腔トリコモナスの孵化鶏卵内接種実験

(1) 腔トリコモナスの單純接種の場合

神 津 鉄 平

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30年6月1日受領)

孵化鶏卵を利用して微生物を培養するという考えは古くから試みられていた。最初に之を行つたのは Rous¹⁾ で彼は鶏の肉腫細胞を鶏胎児及び羊膜腔内に接種したが無菌的でなかつた事及びその方法の拙劣さで十分な結果を得る事が出来なかつた。其の後鶏卵を培養に利用する事は Gay and Thompson²⁾ によつて試みられたが、受精卵を用いても技術的に一定していなかつた為満足な結果は得られなかつた。1931年に Woodruff and Goodpasture³⁾ が鶏痘の virus で Clark⁴⁾ の手技を用いて所謂窓孵化鶏卵培養に成功した。その後この培養法はそれ迄接種増殖の不可能であつた virus 及び Rickettsia 等の主として細菌学的方面に用いられ、又その接種部位も多岐にわたり数多くの業績は Goodpasture⁵⁾ 等や瀬戸氏⁶⁾ によつて詳細に説明されている。更に進んで現在ではこの培養法は原虫類・腫瘍細胞に迄応用範囲が拡大されその報告は著しく増加している。

Spirochaeta は田中氏⁷⁾ 井上氏⁸⁾ によつて、原虫類では Trypanosoma が Langley 等, Michell 等, Biocca, Chabard, Roukard, 大島氏¹⁰⁾ 井上氏によつて, Leishmania donovani が田中氏¹¹⁾ によつて, Plasmodium gallinaceum は Hass 等¹²⁾ によつて, Endameba historytica は Martha Grace¹³⁾ によつて, Trichomonas foetus は Nelson,¹⁴⁾ Hogue¹⁵⁾, Levine 等¹⁶⁾ McNatt et Trussel,¹⁷⁾ Pierce¹⁸⁾ 等によつて, Trichomonas vaginalis は McNutt and Trussell,¹⁷⁾ 山県氏¹⁹⁾, 浜田氏²⁰⁾, 森下氏²¹⁾ によつて報告されている。Trichomonas vaginalis (以下略して T.v. と称す) について之を稍々詳細に見ると, McNutt and Trussell¹⁷⁾

が無菌的 T.v. を漿尿膜腔内及び卵黄囊内に接種した報告があり, 山県氏は漿尿膜上, 漿尿膜腔内, 羊膜腔内, 卵黄囊内に, 浜田氏が漿尿膜上, 卵黄囊内に, 森下氏が漿尿膜腔内, 卵黄囊内にそれぞれ無菌的 T.v. を接種しているに過ぎない。之は比較的最近迄 T.v. が十分に増殖可能である培地がなかつた事と, T.v. が随伴細菌より完全に分離出来なかつた事によるものと思われる。しかるに戦後抗生物質に関する研究は著しく進歩し, 比較的容易にこの随伴細菌を抑える事が出来る様になり, 又各種の T.v. の培地が発表され無菌的 T.v. を得ることも出来る様になりその成功報告も多く発表されている。私はこゝに無菌的 T.v. を用いて孵化鶏卵の各部に接種し, T.v. の生存増殖状態を観察したので, その実験結果を茲に報告する。

実験材料及び方法

1) T.v. 株 実験に用いられた T.v. 株はトリコモナス陸炎の患者の白帯下中より得たもので, 白帯下を鏡検し, 運動せる T.v. を確かめたものを田辺・千葉培地にうつし, 更に之を浅見の考案せるチスティン・ブイオン・血清培地にペニシリン Per cc 4000 単位, ストレプトマイシン Per cc 5mg を加えたものに移植し, 同様培地にて 37°C 48 時間の継代を行つた。数代後に共存細菌の有無をチオグリコレート培地により検査し, 無菌的状态をたしかめ之を第1代とし以後はペニシリンのみの添加で 37°C 48 時間乃至 96 時間の継代を行つた。実験には約 30 代以上継代せる安定した株を用いた。

2) 孵化鶏卵 実験に用いた鶏卵は一定の業者より白色レグホーン受精卵を購入し, 購入時に約 36°C の温湯にて洗滌し更に 70% アルコールにて消毒した。之を 38.5°C の温度を保ち, 十分湿度を与えるために大型ジャーレに水を盛つたものを放置した孵卵器内に横位におさめた。卵は毎日 1 回横転を行い, 又孵卵器の換気は十分に行つた。4 日目に光を通して受精の有無をたしかめ,

Tetsuhei Kozu: Inoculation experiments of bacteria free *Trichomonas vaginalis* into developing chick embryo. (Department of Parasitology, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan)

受精卵のみを使用した。実験に用いた部位は漿尿膜上、漿尿膜腔内、羊膜腔内、卵黄嚢内の 4 カ所で鶏体、血液その他の部分には行わなかつた。

3) 接種方法 T.v. の充分増殖せる時期のものを、無菌生理的食塩水にて 2 回洗滌した。虫体数は血球計算板にて算定して実験に用いたが、虫体数を一定とする試みは行わなかつた。この T.v. 懸濁液をガラス製注射器を用いて 0.1 cc づつ各部位に注入したが、その方法は、漿尿膜上は卵殻に 8 mm 平方の小孔を作り卵殻膜と漿尿膜を剝離の後膜上に注入しパラフィン及び 18 mm 平方のカバーガラスにて孔を閉じる Goodpasture の Window method を用い、漿尿膜腔内及び羊膜腔はそれぞれ漿尿膜上と同様処置後漿尿膜又は漿尿膜・羊膜を通して注入した。なお羊膜腔内注入の場合は注入液に小気胞を含ませ液の腔内に入った事を確認した。卵黄嚢内へは気室上に小孔をうがち卵殻内膜、漿尿膜を同時に 3 cm の長さの注射針にて貫通卵黄嚢内に注入する Cox²²⁾ の方法を用いて注入した。以上の操作は何れも無菌的に行った。

4) 接種後の培養及び検索方法 接種卵は再び接種前の孵卵器に横位におさめ、毎日一定時に卵の生死を検査し、一定日後に之を無菌的に解剖し、各接種部位の体液及び隣接部位の体液又はその部位の洗滌液を直接鏡検し、虫体の存在を調べた。又同時に虫体の存否にかゝわらずチスティン・ブイオン・血清培地にうつし 37°C 72 時間の培養を行い之を検査した。実験途中で死亡せる鶏卵は直ちに同様の処置を行いその結果を見た。

5) 対照 対照として実験群と同時に同様の技術で同一場所に生理的食塩水を 0.1 cc を接種し自由に発育せしめ羽化し得るか否かを検した。

実験成績

1) 漿尿膜上 解剖して検査すると漿尿膜上に体液はなく、更に膜は若干肥厚していたので、無菌生理的食塩水にて洗滌しその液を検査に用いた。接種卵 39 個中直接鏡検で全例 T.v. 陰性であり、培養したものの中で 3 個に於てのみ陽性であつたが、之等は何れも 14 日卵に 204×10⁴ という最多数の虫体を接種し 2 日後に解剖したものであつた。卵の死亡せるものなく途中で解剖せず発育せしめた 4 個は全て羽化した。同時に検査した漿尿膜腔内では T.v. 全例陰性であつた。又対照卵は全例羽化した。(第 1 表)

2) 漿尿膜腔内 接種卵 35 個で直接鏡検では全例陰性で、培養したものでは 4 個陽性であつた。解剖せず

第 1 表 漿尿膜上に接種の場合

卵数	接種日及 接種虫体数	検査日	卵生死		T.v. 鏡検	
			生	死	直接	培養
6	144×10 ⁴	12	2		0	0
		13	2		0	0
		15	1		0	0
		羽化	1			
1	9	17	1		0	0
8	122×10 ⁴	13	3		0	0
		15	3		0	0
		17	2		0	0
6	142×10 ⁴	16	4		0	0
		羽化	2			
10	204×10 ⁴	16	3		0	3
		18	3		0	0
		19	2		0	0
		羽化	2			
8	120×10 ⁴	17	2		0	0
		18	2		0	0
		19	4		0	0
対 照						
3	9	羽化	3			
3	15	羽化	3			

第 2 表 漿尿膜腔に接種の場合

卵数	接種日及 接種虫体数	検査日	卵生死		T.v. 鏡検	
			生	死	直接	培養
5	120×10 ⁴	11	3		0	1
		13	2		0	0
		11		2	0	1
		12	4		0	1
25	104×10 ⁴	14	5		0	0
		16	4		0	0
		17	4	1	0	0
		18	4		0	0
		羽化	5			
5	142×10 ⁴	15	2	1	0	1
		17	2		0	0
対 照						
1	9	羽化	1			
3	10	羽化	3			
3	13	羽化	3			

発育を継続せしめた卵で死亡せるものは 4 個、羽化したものは 5 個であつた。同時に検査した羊膜腔内、卵黄嚢内に T.v. は認められなかつた。(第 2 表)

3) 羊膜腔内 接種卵 45 個中直接鏡検で 5 個、培養検査で 14 個陽性であつた。自由に発育せしめた卵で死亡せるもの 6 個であり、9 個は羽化した。同時に検査した漿尿膜腔内及び解剖後鶏体の各臓器につき検索したが

第3表 羊膜腔内に接種の場合

卵数	接種日及 接種虫体数	検査日	卵生死		T.v. 鏡檢	
			生	死	直接	培養
16	11 102×10 ⁴	14		2	0	2
		17	3		0	0
		19	3		0	0
		羽化	8			
14	13 106×10 ⁴	15	4		0	0
		17	4		0	2
		19	5		0	0
16	14 206×10 ⁴	16	4	2	3	4
		18	3	2	1	2
		20	5		1	4
		羽化	1			

第4表 卵黄囊内に接種の場合

卵数	接種日及 接種虫体数	検査日	卵生死		T.v. 鏡檢	
			生	死	直接	培養
5	4 252×10 ⁴	7		3	0	2
		8		1	0	1
		10		1	0	1
21	5 80×10 ⁴	7		4	1	2
		8	2	7	3	8
		9	4	3	4	6
		10		1	0	1
21	10 87×10 ⁴	13	2	6	0	4
		14		4	0	1
		16		1	0	0
		17		1	0	0
		19		1	0	0
		20		1	0	1
1	14 102×10 ⁴	羽化	5		0	
		16		1	0	0
対 照						
5	5	6		1		
		7		1		
		羽化	2		1	
5	10	12		1		
		15		1		
		17		1		
		羽化	2			

T.v. は何れの箇所からも見出されなかつた。又別に本部位に於ける継代実験を行つたが、14日卵を用いて第3代迄は増殖が明に認められたが、以後は増殖度が下り、7代目には増殖していると断定するのは困難となつた。しかし T.v. はチスチン・ブイヨン・血清培地に移植すると直ちに継代前と同様の増殖を示した。7代目のものでは形態的变化は殆ど認められないが、運動は十分でない様に思われた。よつて羊膜腔内にての継代は困難ではないかと思われる。(第3表)

4) 卵黄囊内 接種卵48個で直接鏡檢で8個、培養検査で27個陽性であつた。自由に發育せしめた卵で死亡したものは35個、5個は羽化した。同時に検査した漿尿管腔に T.v. は認められなかつた。対照卵は全例羽化した。又更に羊膜腔に於けると同様継代実験を行つたが、4~5日目卵にて96時間、38.5°Cの条件にて第8代迄は完全に継代出来た。それ以後は実験の都合により中止したが、第8代目に於ける増殖度及び形態はチスチン・ブイヨン・血清培地のものとの差異は少しも認められなかつた。よつて卵黄囊内にて継代は可能と思われる。(第4表)

総括及び考案

先づ実験方法の検討であるが、第一に卵に関する問題では白色レグホーンの卵を使用した事は卵の生死が判別し易い事と入手が容易である事によつた。白色レグホーン種も卵殻の厚さにより判別の困難である場合も生ずるのでこれは受精の有無を調べる時に出来るだけ除外する様にした。卵を購入時に温湯・アルコールで清潔にする点に関しては、孵化時は卵は可及的自然の状態におく事が好ましいが、実験が無菌的なる状態を強く必要とするものであるために止むなく使用した。鶏卵が水・アルコール等によりその孵化に強く影響しない事は市原等²⁾によつて示されている。又本実験の予備実験にては孵化率に差異は認められなかつた。したがつてこの処置をする事は実験に差支えないものと思われる。換気・卵の廻転について特に注目すべき点はない。孵化器内の湿度は孵化当初は大型シャーレにて十分であるが16日以後になると不足になり勝であるから注意すべきである。特に孵化に関しては所謂“スゴモリ”になる傾向がある。第二に T.v. についてであるが、現在 T.v. の培養基としては種々示されているが、要は充分なる T.v. の増殖である。この点チスチン・ブイヨン・血清培地で満足な結果が得られたものと思う。T.v. 虫体を無菌生理的食塩水にて洗滌する事は本実験に試みた如き短時間ならば虫体に大なる影響は見られなかつた。又 T.v. 虫体数測定の際は適當の温度の下に動いている虫体を算定した。増殖期の T.v. はその殆んどが運動して居り死虫体が数の中に入る事は虫体数測定の誤差の中に含まれ特に問題とする事はない。虫体の形態的变化は培地の粘度に左右される事が多いが、接種部位内特に卵黄囊内に於ける形態的变化は特に認むべきものはなかつた。又培地に加えたペニシリンの濃度は洗滌により著しく低くなり卵に対しても特に問題とする事はなかつた。第三に接種方法につ

いてであるが、漿尿膜上には田中法、Brandy²³⁾法及びその変法、Goodpasture の法があるが、この実験の場合は卵の固定法により Goodpasture 法を用いたが、漿尿膜上のみを問題とする場合はむしろ田中法の方が確実ではないかと思われる。漿尿膜腔内の場合には Brunet 法及び田中法があるが之は Brunet 法がより確実である。又卵殻に直接注射針を用いて注入する法があるが之は細菌の汚染、漿尿膜上に入る気泡等により用うる事はさけた方がよいのではないかと思われる。卵黄嚢は殆ど全ての実験が Cox の法を用いているが、孵化の早期に用いるならば充分正確に注入し得るものと思われる。本実験にはこの法を用いてある。羊膜腔内には Brunet 法が一般的であり本実験もそれによつた。

孵化鶏卵に接種された T.v. については、(a) 漿尿膜上では培養で 3 個 T.v. 陽性であつたが、之は 3 個共接種日より 2 日目のものであり、更に同一グループでそれ以後検査したものでは直接法、培養法共に陰性である点から之は接種したものが生存在したのではないかと思われる。したがつて漿尿膜上には T.v. は増殖しないものと思われる。又接種したものは対照卵同様羽化する事から孵化には何等影響を与えないものと思われる。

(b) 漿尿膜腔内にてはやはり T.v. 陽性のものが 4 個あるが、之も漿尿膜上の場合と同じく接種 3 日以内のもので同一グループでそれ以後陰性である点よりして T.v. は漿尿膜腔内には増殖しないと考えられる。漿尿膜腔内で T.v. が増殖可能とする山県氏及び漿尿膜腔で T.v. が陽性であつたとする浜田氏、森下氏の報告があるが、山県氏の実験は接種後比較的短時間 (72 時間以内) に解卵しているので、或はこの残存した T.v. が実験結果として表われたのではないかという可能性もあり、浜田氏、森下氏のものもは詳報が発表されていないので論ずる事が出来ないが、Trussel が接種する虫体数が多ければ増殖するという結果と併せて考えると、漿尿膜腔内に T.v. は生存するかも知れないが、増殖するのは困難であると結論するのが適當ではないかと思われる。対照卵が全例羽化し、接種卵も放置すれば羽化する事、接種後死亡卵の少い点から T.v. の接種は羽化に何等影響を与えないと考えられる。

(c) 羊膜腔内では培養鏡検での T.v. 陽性例は増加し、特に 14 日目卵に接種した例では直接鏡検で接種後 5 日目に接種虫体数より増加していると思われる例や、16 個中培養検査で 10 個が T.v. 陽性である事からしても少くとも 14 日目卵に接種せる場合は T.v. は増殖している

ものと考えられる。しかしその他の日数の卵を使用した場合や直接鏡検々出率を併せて考えると著しい増殖ではない様に思われる。対照卵はとらなかつたが、11 日目、13 日目の卵に接種したとき羽化せるものがある事は羽化にそれ程大きな影響を与えない様に思われる。山県氏は体液が白濁し鶏体は死亡すると述べているがこの様な結果は見られなかつた。

(d) 卵黄嚢内では培養検査で T.v. の高い検出率を示し、又接種虫卵総数と解卵時の虫体総数の比較により、解卵時に増加していると思われる点から明に増殖しているものと考えられる。特に孵化開始後 4~5 日目卵に接種したものは増殖傾向が著しく強い。又接種卵で増殖率の高い日数の卵は死亡率が高く、10 日目卵では T.v. が検出される事少く、卵の死亡率が低い事と併せて T.v. の増殖は羽化に大なる影響を与えるものと思われる。

以上のうち羊膜腔内と卵黄嚢内に接種した場合に、T.v. の増殖は孵化開始後の日数により著しい差がある事が判るが、この点は特に注目すべきであろう。McNutt and Trussel は pH の関係によるものと述べているが、それ以外に多くの原因があるものと思われる。卵黄嚢内によく増殖する 4~5 日目は羊膜腔が形成される時期で特に卵の新陳代謝の急激に強くなる時期であり又羊膜腔内によく増殖する 14 日目は大体各器官は完成し卵自体としては新陳代謝のやゝ減少する時期である。この様な卵の新陳代謝の変化が T.v. の増殖率と何等かの関係があるのではないかという事は、T.v. が培養に際して嫌気的狀態を必要とする事と考え合せて興味深いものがある。又卵黄嚢内に増殖する時期は卵白中の水分が卵黄に移行するため卵黄嚢内に粘度及び蛋白の減少があり、羊膜腔内に増殖する時期は卵白が羊水中に移行する為蛋白の増加、粘度の上昇、pH の酸性への変化がある時期である。よつて一定の粘度又は蛋白が T.v. に何等かの関係があるのではないかも考えられる。以上の考え方は漿尿膜上は別として、漿尿膜腔内に接種せる時期は、漿尿膜腔液は粘度は低く、蛋白量少く、アルカリ性に近く鶏体の新陳代謝の著しい点などと併せて考えると、T.v. の増殖にはこのうち 1, 2 のものが必要である事を暗示している様に思われる。

各実験を通じて接種部位の隣接部位に T.v. を認めなかつた事は、T.v. が膜を通過する事が困難である事と実験中膜の破損及び溶解はなかつた事を示しているものである。これは細菌が本培養法を行つたとき多く膜の隔

解を来す事が報告されているのや、Virus, Rickettsia が膜を透過する報告があるのと比べて興味があると思われる。

本トリコモナスと極めて近縁な位置にある牛の生殖器に寄生する *Trichomonas foetus* を孵化鶏卵に接種した実験は前掲の如くに幾つか見られるが、それ等の成績を概観して見ると漿尿膜腔、羊膜腔、卵黄囊の3部位では容易に確実に増殖していると思われる成績が多い。特に問題となり易い接種虫体数に就ても著者の実験と略と同数の100万前後を接種して、厳密によくコントロールされた実験を行つている Pierce 等の成績でも極めて高率に増殖している事は、*Trichomonas foetus* が本トリコモナスより遙に孵化鶏卵中で増殖し易い性状を有しているものと考えられるがその原因の1, 2として *Trichomonas foetus* の方がより好氣的である事及びより中性に近い pH で至適増殖を起すこと等が考えられる。

結 論

- (1) 無菌的 T.v. を孵化鶏卵の漿尿膜上、漿尿膜腔内、羊膜腔内、卵黄囊内に接種し、T.v. の生存又は増殖状態を検査した。
 - (2) T.v. は漿尿膜上、漿尿膜腔内には増殖せず、勿論羽化に何等影響を与えない。
 - (3) T.v. は羊膜腔内にて生存又は増殖の傾向が見られるが、この部位での継代培養は困難である。14日卵への接種が至適であろう。羽化に若干の影響を与える。
 - (4) T.v. は卵黄囊内に増殖し、継代培養は可能である。5日目卵への接種が至適である。羽化に影響を与える。
- (本論文の要旨は昭和28年4月5日第22回日本寄生虫学会に発表した。)

拙筆にあたり、御指導御校閲を賜つた松林久吉教授並に浅見敬三講師に厚く御礼を申し上げます

参 考 文 献

- 1) Rous, Peyton and Murphy, J. B. (1911): Tumor implantations in developing embryo. Experiments with a transmissible sarcoma of the fowl. J. Am. Med. Assoc., 56~57, 741. —2) Gay, F. P. and Thompson, R. (1929): Attempts to cultivate vaccine virus in the growing chick embryo. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 26, 554. —3) Woodruff, A. M. and Coodpasture, E. W. (1931): The susceptibility of the chorio-allan-

- toic membrane of chick embryos to infection with the fowl-pox virus. Am. J. Path., 7, 209~222. —4) Clark, E. R. (1920): Technique of operation on chick embryos. Science, 51~53, 371. —5) Goodpasture, E. W. and Buddingh, G. J. (1948): Viral and rickettsia infections of man. J. B. Lippincott Co. Phil. 99~113. —6) 瀬戸勇美(1953): 結核菌孵化鶏卵内接種法による細菌血清学的知見(1)長崎医学誌, 28, 225~232. —7) 田中継男(1941): 諸種微生物の孵化鶏卵内培養に関する研究(1), 再帰熱スピロヘータの孵化鶏卵内培養に関する研究, 実験医学, 25, 797~827. —8) 井上幸子(1949): 孵化鶏卵を用いた実験化学療法の研究(1), 日本細菌誌, 4, 73~76. —9) 井上幸子(1950): 孵化鶏卵を用いた実験化学療法の研究(2), 日本細菌誌, 5, 113~117. —10) 大島康夫・赤沢笹雄(1943): 發育鶏卵内に於ける *Trypanosoma equiperdum* の培養について, 日本獣医誌, 5, 421~422. —11) 田中継雄・森下哲夫(1938): *Leishmania donovani* の鶏卵培養について, 日本寄生虫学会記事, 10, 70. —12) Hass, V. H. and Ewing, E. M. (1945): Inoculation of chick embryos with sporozoites of *Plasmodium gallinaceum* by inducing mosquitoes to feed through shell membrane. Pub. Health Rep., 60, 185~188. —13) Martha Grace, E. Sadan, E. H. and Garacea, G. M. (1953): Cultivation of *Endamoeba histolytica* in the chick embryo. Exptl. Parasitology, 2, 141~146. —14) Nelson, P.M. (1939): Cultivation of *Trichomonas foetus* in the chick embryo. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 39, 258~259. —15) Hogue, M. J. (1939): Infections of *Trichomonas foetus* in chick embryos and young chicks. Am. J. Hyg., 30, Sec. C 65~67. —16) Levine, N. D., Brandly, C. A. and Graham, R. (1939): The cultivation of *Trichomonas foetus* in developing chicken eggs. Science, 89, 2303~2304. —17) McNutt, S. H. and Trussell, R. E., (1941): Comparison of growth of *Trichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis* in chick embryos. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 46, 489~492. —18) Pierce, A. F. and Morgan, B. B. (1950): Chemotherapy of *Trichomonas foetus* in the chick embryo. (I) Cultivation technique. J. Inf. Dis., 87, 93~95. —19) 山根 宏(1953): *Trichomonas* の研究, 実験医学, 23, 205. —20) 浜田義雄(1953): *Trichomonas vaginalis* の生物学的研究(3), 阪大医学誌, 5, 551~557. —21) 森下哲夫・永田二郎(1953): 各種原虫の鶏卵内培養について, 寄生虫学誌, 2, 88. —22) Cox, H. R. (1938): Use of yolk salk sac of developing chick embryo as medium for growing Rickettsiae of rocky mountain spotted fever and Typhus groups. Pub. Health Rep., 53~56,

2341. —23) Brandly, C. A. (1935): Some studies of infectious laryngotracheitis. The continued propagation of the virus upon the chorio allantoic membrane of the hen's egg. J. Inf. Dis., 57, 201~203, —24) 市原鶴雄・石田弘(1950): 鶏卵培養に関する研究, I. 各種消毒剤が鶏卵孵化能に及ぼす影響, 日本獣医誌, 14, 299~310.

Summary

An attempt was made to cultivate bacteria-free *Trichomonas vaginalis* within developing chick embryos by the window technique which has been recommended by many investigators in the cultivation of viruses and rickettsiae. The strains of trichomonad used in the present experiment have been maintained in cystein-bouillon-serum medium without accompanying bacteria over 30 subcultures. Four- to fourteen-day-old embryos were inoculated with 80×10^4 to 200×10^4 tricho-

monads on chorio-allantoic membrane and into allantoic cavity, amnionic cavity and yolk sac.

Trichomonas vaginalis did not grow when they were inoculated on the chorio-allantoic membrane and in allantoic cavity. The development of the embryo was not affected by these inoculations. By the amnionic inoculation, slight multiplication and prolongation of survival of the organisms were demonstrated and the 14-day old embryo inoculated with as many as 206×10^4 trichomonads gave the best result in this group of inoculation. Serial transfer in this site was impossible. Inoculation of trichomonads into yolk sac supported good growth of the organisms and they were detected from 27 out of 48 embryos. About 85% of the embryos inoculated died. Inoculation into 5-day-old embryo gave the best result in the yolk sac group, and the serial transfers of the organisms were successful.