

無菌的腔トリコモナスの孵化鶏卵内接種実験

II. パラフィンコーティングによる影響

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 8 月 8 日受領)

1837年 Donúe によつて *Trichomonas vaginalis* (以下略して T. v. と称す) が発見されてから、数多くの研究がなされ、特に近年抗生物質に関する研究が著しく進歩してからは、無菌的 T. v. が比較的容易に得られる様になつた為、形態的、生理的、生化学的の研究業績は増加している。しかし現在にても T. v. の本態の把握は十分でなく多くの問題が残されている。特に T. v. の in vivo に於ける実験は陰性報告が多く、わづかにマウス並に孵化鶏卵に接種して成功しているに過ぎない。マウスに於ては Schnitzer¹⁰⁾ 岩井⁹⁾ の如く膿瘍の形成した例もあるが、Inoki and Hamada⁵⁾ の如く若鶏洗条赤血球を、山県氏¹²⁾ の如くムチンを持つて前処置したマウスに接種した様な、マウスにある負荷をかけた場合に陽性報告が多い。孵化鶏卵を用ひた場合は、McNutt and Trussell⁸⁾ 以来山県氏¹¹⁾、浜田氏⁴⁾、森下氏⁹⁾、等によつて報告されているが、卵黄囊の場合には増殖可能の様であるが、他の部分ではその成績があまり一致していない。著者が第 1 報⁷⁾ に述べた様に孵化鶏卵に於ては接種部位の新陳代謝活動が T. v. の生存増殖に影響するのではないかと考えられ、一方 in vitro に於て浅見¹²⁾ は T. v. の無菌的培養には嫌気の状態が一つの要素として必要であると述べているのに基き、孵化鶏卵の各部に T. v. を接種後パラフィンコーティングを行う事により、外界からの酸素を断ち比較的嫌気の状態を作り、T. v. の生存及増殖状態を観察する実験を行つたが、こゝに結果を得たので報告する。

実験材料及び方法

(1) T. v. 株、実験に用ひた T. v. 株は、当教室にて

Tetsuhei Kozu: Experimental inoculation of bacteria-free *Trichomonas vaginalis* into developing chicken embryos. II. The growth of the trichomonad in the eggs coated by paraffin. (Department of Parasitology, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan.)

トリコモナス腔炎の患者の白帯下中より得たものを、ペニシリン、ストレプトマイシンを用ひて随伴細菌より分離した株で、第 1 報に引続き同じ株を使用した。継代に用ひた培地は浅見のチステインブイヨン血清培地で、之に継代時にペニシリン Per cc 4000 単位を加へたものであり、随時チオグリコレート培地により無菌の状態を検査した。使用時の継代数は 45 代以上で安定した株である。

(2) 孵化鶏卵、実験に用ひた鶏卵は一定した業者より購入した白色レグホーン受精卵で、之を 36°C の温湯、70% アルコールにて清拭の後、収納箱に横位に固定した。又孵卵器は 38.5°C に保ち、又飽和湿度を保つために孵卵器底に大型シャーレに水を盛つたものを放置した。収納箱を孵卵器に入れた後 4 日目に光を通して受精卵・不受精卵を区別し、受精卵と確認せるもののみを実験に使用した。なほ固定した卵は 1 日 1 回横転し發育鶏胚が卵殻に固着するのを防止した。実験に用ひた部位は漿尿膜上、漿尿膜腔内、羊膜腔内、卵黄囊内で他の部分には行はなかつた。

(3) 接種方法 T. v. の充分増殖せる時期のものを用ひ、無菌生理的食塩水に 2 回洗滌した。虫体数は血球計算板にて算定したが第 1 報同様虫体数を一定とする試みは行はなかつた。この T. v. 懸濁液をガラス製注射器にて 0.1cc づつ各部位に注入した。注入方法は前実験と全く同様で漿尿膜上は Goodpusture の法を用ひ、漿尿膜腔内、羊膜腔内は Brunet の法、卵黄膏には Cox の法を用ひた。以上の操作は何れも無菌的に行つた。

(4) パラフィンコーティング。融点 56°C のパラフィンをあらかじめ融解して置き、接種が終了したる卵に太き毛筆にて隙間なくパラフィンを塗布した。接種のためうがつた気室部の卵殻上の小孔は本操作前に更に融点の高いパラフィンにて閉じておいた。

(5) 接種後の処置及検索方法 パラフィンコーティ

ングを終了した接種卵は再び収納箱に入れ 38.5°C の前と同じ孵卵器に横位におさめた。その後毎日パラフィンの着脱を检查し、又一部に体液の噴出せるものは細菌感染の可能性ある為之を除外した。接種卵は一定日後に之を無菌的に解卵し、解卵時に卵内の各膜の融解せるものは之又除外し、残りについて前実験同様直接鏡驗した。直接鏡驗で T. v. の有無にかゝらず、体液又は膜の洗滌液は無菌的にチステインピオン・血清培地にうつし 37°C, 72時間の培養を行ひ之を鏡驗した。

実験成績

(1) 漿尿膜上。解卵して检查すると漿尿膜は前実験と異なり肥厚は見られなかつた。しかし接種液は認められなかつたので無菌生理的食塩水にて洗滌し、その洗滌液を觀察に用ひた。

接種卵は50個で、直接鏡驗にて3個のみ陽性で、培養鏡驗では21個陽性であつた。同時に検査した漿尿膜腔内では T. v. は全例陰性であつた。(第1表)

(2) 漿尿膜腔内。接種卵は50個で、直接鏡驗にて14個陽性で、培養鏡驗では32個陽性であつた。特に接種後13日以後のものでも陽性例があつた。同時に検査した羊膜腔内、卵黄囊内に T. v. は全例陰性であつた。(第2表)

(3) 羊膜腔内。接種卵は19個で、直接鏡驗にて4個、培養鏡驗にて7個陽性であつた。同時に検査した漿尿

第1表 漿尿膜上接種

卵数	接種日に於ける孵化日数	接種虫体数	解卵日に於ける孵化日数	T. v. 鏡檢	
				直接	培養
13	11	156×10 ⁴	15	2	8
3	13	56×10 ⁴	24	0	0
10	14	91×10 ⁴	20	0	3
6			20	1	6
6	14	152×10 ⁴	27	0	1
12	16	162×10 ⁴	25	0	3

第2表 漿尿膜腔内接種

卵数	接種日に於ける孵化日数	接種虫体数	解卵日に於ける孵化日数	T. v. 鏡檢	
				直接	培養
15	11	102×10 ⁴	21	5	9
15			23	5	11
9	14	91×10 ⁴	20	2	5
5	14	152×10 ⁴	20	1	5
6			27	1	2

第3表 羊膜腔内接種

卵数	接種日に於ける孵化日数	接種虫体数	解卵日に於ける孵化日数	T. v. 鏡檢	
				直接	培養
9	13	122×10 ⁴	23	3	4
10	14	96×10 ⁴	23	1	3

第4表 卵黄囊内接種

卵数	接種日に於ける孵化日数	接種虫体数	解卵日に於ける孵化日数	T. v. 鏡檢	
				直接	培養
6	5	71×10 ⁴	9	3	6
6			17	1	6
15	5	201×10 ⁴	14	5	11
18			18	5	10
14	8	162×10 ⁴	18	1	4
12	8	72×10 ⁴	20	2	8

膜腔内に T. v. は全例陰性であつた。(第3表)

(4) 卵黄囊内。接種卵71個で、直接鏡驗にて17個陽性、培養鏡驗にて45個陽性であつた。同時に検査した漿尿膜腔、羊膜腔内に T. v. は全例陰性であつた。(第4表)

以上の実験の他に各部位につき継代実験を行つたが、漿尿膜上及び羊膜腔内に継代は困難であつた。漿尿膜腔内には5日目毎の継代で5代迄、卵黄囊内で5日目毎の継代で同様5代迄継代したが、いずれも5代目に於て T. v. が生存していた。6代目以降は実験の都合で中止した。

総括及び考按

T. v. を孵化鶏卵の各部に接種し、更にパラフィンコーティングを行つたが、T. v. は

(1) 漿尿膜上にては50個中21個培養陽性ではあつたが、全例中直接鏡驗にて検出されたのは僅に3例のみであり、又培養鏡驗で21例陽性ではあるが接種日以後の日数によつて之を見れば、4日後61%、6日後56%、9日後25%、11日後0%、13日後17%と6日目迄の陽性率とそれ以後の陽性率と比較して後者の陽性率は著しく低くなつてゐる。又14日目卵を使用して行つた実験で、同じ6日後に解卵した2つのグループがあるが、一方では T. v. を 91×10⁴ 匹接種し、一方には 152×10⁴ 匹を接種した。それによれば前者は30%、後者は100%の陽性率を示している。以上の6日以後の陽性率の低下、接種虫体数に比例した陽性率を考へると、T. v. は生存してい

たのみで、新たな増殖はしていない様に考へられる。第 1 報に述べた如くに単純接種の場合に 39 個中接種後 2 日目に 3 個のみの陽性であった事に比較するとその生存期間は著しく延長している。これはパラフィンコーティングを施す為、酸素の供給がなく、又卵が死亡する為漿尿膜上に接種された虫体と同時に注入された若干の水分が吸収される事なく残置するのがその原因であらうと推察される。

(2) 漿尿膜内にては 50 個中 32 個培養鏡検陽性であり、直接鏡検にても 14 個の陽性卵を見ている。漿尿膜上と同様に之を接種後の解卵日迄の日数で陽性率を見ると、6 日目 67%、10 日目 60%、12 日目 73%、13 日目 33% と大体一定の数値を示している。特に 13 日目のもので 33% の陽性率と直接鏡検にても 1 例の陽性例のある事は、接種時の残存せる *T. v.* のみでなく、新たな増殖が起つている事を示しているものと思はれる。パラフィンコーティングを施行しなかつた場合には残存せるものと思はれる *T. v.* を 35 個中 4 個のみに見た事に比較すると、パラフィンコーティングを行つた為に通常にては生存、増殖し難い本部位に増殖が可能になつたと思はれ、本実験中特に注目される。解卵時に於て漿尿膜腔液はわづかの混濁を示す外特に所見がなかつた。又他の部位に *T. v.* を認めなかつた事は膜の破損のなかつた事を示している。

(3) 羊膜腔にては解卵時に膜の破損が多く、例数が少く確実に確認し得たのは 19 例に過ぎなかつた。此の膜の破損は他の部位に (特に漿尿膜腔) 接種した場合に羊膜の破損は極く少かつたことからして一応鶏胎の死亡による変化と思はれるが、*T. v.* 接種による何等かの不明の原因があるのかも知れない。*T. v.* の陽性率は 10 日目で 44%、9 日目で 30% を示している。直接鏡検にても 3 例陽性例があり、10 日目で 44% の陽性率を示す事は残置のみではなくわずかな増殖はあるのではないかと思はれる。全例平均の陽性率は 38% であり、パラフィンコーティングを行はなかつた場合の 31% と比較すると大差は見られない。

(4) 卵黄囊の場合には 71 個中 45 個陽性であり陽性率を見ると 4 日目 100%、9 日目 73%、10 日目 21%、12 日目 78%、13 日目 55% を示している。10 日目の陽性率の低いのは、接種に 8 日目卵を使用した時であり、12 日目のものは 5 日目卵と 8 日目卵を使用してあるが 5 日目卵のみにては 100%、8 日目卵のみにては 69% の陽性率を示している。直接鏡検にても 17 例の陽性があり 13 日目にてもなお 55% の陽性率を示す事は、明に増殖している事を示して

いる。パラフィンコーティングを行つた事はやゝ単純接種に比較して増殖率をあげてはいるが特に著しくは思はれない。しかし単純接種の場合も同様であつたが卵黄囊内接種の場合には 8 日目卵と 5 日目卵の陽性率の差、すなはち孵化日数により *T. v.* は著しく増殖する時期と増殖せぬ時期とがある事は明かである。

以上でパラフィンコーティングを行つた場合に、通常の接種との比較では、新に漿尿膜腔内にも増殖する事と、*T. v.* の生存が各部位共著しく延長している事が注目される。漿尿膜腔内の増殖への変化は種々の原因が考へられるが、やはり第一に考へられるのはパラフィンコーティングによつて酸素の供給がたゞれた為ではないかという事である。比較的外界との影響の多い本部位に、普通の接種に比較してこの様な変化がある事は、内部に位置する卵黄囊、羊膜腔に於ける変化が著明でない事と併せ考へると、この考へ方はある程度正しいと推察される。漿尿膜上の *T. v.* の生存期間の延長も前述の如く鶏胎死亡のため接種液が残存するのにもよるかも知れないが、接種液は主として生理的食塩水なる事を考へれば、やはりパラフィンコーティングによる酸素の供給がたゞれた事が主なる原因である事が推察される。Beardmore 等⁹⁾は孵化鶏卵に *Treponema pallidum* (Reiter strain) を接種し、其の後低温又はパラフィンコーティングによる後処置を行ひ *Treponema* の増殖の態度を見た報告をしたが、*T. pallidum* は陸トリコモナスと同じく嫌氣的生物である点で興味深い。それによると接種後放置せるもの及低温処理をしたものが増殖率 0% なるにかゝらず、パラフィンコーティングを行つたものは 100% の増殖率を示している。これによつてもパラフィンコーティングは鶏卵内の状態を著明に変化させる事がうかゞはれる。卵黄囊内、羊膜腔内には普通の接種と比較して成績は左程の変化はないが、やはり生存期間は延長している。次に接種日の相異による変化であるが、本実験は大體前実験によつて最良の結果が得られた日を中心として接種したが、接種直後パラフィンコーティングを行つたとしてもやはり接種日により成績が左右されるのが明かな事は卵黄囊の場合に特に著しい。すなはち略同数の *T. v.* を接種して 5 日目のものは 12 日後 100% の *T. v.* 陽性を示し、8 日目ではやはり 12 日後に 67% の *T. v.* 陽性率を示す如くである。これはやはり粘度、pH、蛋白量等の多くの複雑な原因によるものと思はれる。

結 論

(1) 孵化鶏卵に無菌的 *T. v.* を接種し、接種直後に

パラフィンコーティングを行ひ、其の後の T. v. の生存、増殖状態を検査した。

(2) T. v. が膀胱膜腔内、羊膜腔内、卵黄囊内で増殖の傾向を示す点は単純接種実験の成績と変わらないが、膀胱膜腔内では前実験に比べ著しく陽性率が増加した。

(3) 膀胱膜上には比較的長時日生存はするが増殖はしない。

(4) 単純接種に比較して増殖の傾向が強くなり、生存期間が延長するのは、接種後パラフィンコーティングにより酸素の供給が断たれ、嫌気的環境が生成され、本原虫の生活条件が満足されるからではないかと思はれる。

(本論文の要旨は昭和28年11月12日第33回慶応医学総会に発表した。)

終りに臨み御指導、御校閲をいただいた松林教授、浅見助教授に心からの御礼を申し上げます。

文 献

- 1) 浅見敬三(1952): 脛トリコモナスの細菌を伴わない培養。臨床婦人科産科, 36, 6-7. — 11) Asami, K. (1952): Bacteria-free cultivation of *Trichomonas vaginalis*. Kitasato Arch. Exptl. Med., 25, 149-150. — 3) Beardmore, W. B. and Dodd, M. C. (1950): The growth of the Reiter strain of *Treponema pallidum* in the chick embryo. J. Bact., 60, 5-7. — 4) 浜田義雄(1953): *Trichomonas vaginalis* の生物学的研究(3). 阪大医学誌, 5, 551-563. — 5) Inoki, S. and Hamada, Y. (1953): Experimental transmission of *Trichomonas vaginalis* into mice. J. infect. Dis., 92, 1-3. — 6) 岩井澄雄(1955): 脛トリコモナスの小動物への接種実験。第24回日本寄生虫学会発表。— 7) 神津鉄平(1955): 無菌的脛トリコモナスの孵化鶏卵内接種実験。第1報。寄生虫学雑誌, 4, 302-307. — 8) McNutt, S. H. and Trussell, R. E. (1941): Comparison of growth of *Trichomonas foetus* and *T. vaginalis* in chick

embryo. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 40, 489.—9) 森下哲夫, 永田二郎(1953): 各種原虫の鶏卵培養について, 寄生虫学誌, 2, 88.—10) Schmitzer, R. J., Kelly, D. R. and Leiwant, B. (1950): Experimental studies on trichomoniasis. I. The pathogenicity of trichomonads species for mice. J. Parasitol., 30, 343-349, 19.—11) 山県宏(1953): *Trichomonas* の研究。医学研究, 23, 1341-1379. — 12) 山県宏(1954): *Trichomonas* 純粹培養のマウス感染試験。長崎医学誌, 29, 375-379.

Summary

Bacteria-free *Trichomonas vaginalis* was inoculated into developing chicken embryos which were coated by paraffin just after the implantation of the protozoa. The survival and growth of the trichomonads were observed by direct smear and cultural examination, comparing with the result of the author's previous experiment which was made after routine method without any treatment on embryos. Multiplication of the trichomonad occurred in chorio-allantoic cavity, amniotic cavity and yolk sac. On chorio-allantoic membrane, the organism survived longer in this experiment than in the previous experiment. It seemed, however, no multiplication occurred. Marked difference of the result between the present and the previous experiment was observed in the case of chorio-allantoic cavity inoculation: thirty two of fifty embryos were positive in the present experiment, while only four of thirty five embryos were positive in the previous inoculation experiment without paraffin-coating.

In general, the trichomonads multiplied more actively and survived longer in every site of inoculation as compared with the previous inoculation. It seems that the anaerobic condition in the eggs caused by paraffin-coating favours the survival of *Trichomonas vaginalis*.