

無菌的腔トリコモナスの孵化鶏卵内接種実験

(3) 細菌の同時接種による影響

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 31 年 7 月 5 日受領)

著者は前 2 報 (神津 1955 a, b.) に於て腔トリコモナス (以下 T.v. と略す) を孵化鶏卵の各部位に接種し増殖態度を検討した。今回の報告では数種の細菌を T.v. と同時に接種して T.v. の増殖状態を観察した。

人の腔トリコモナス症に於ては T.v. 自体の病原性と共に腔内細菌の或種のものが発症の一助因となつていであろうことは以前から考えられている (Asami & Nakamura 1955)。この細菌との関係を *in vitro* で検討したものに打越 (1936), Pray (1952), 久保田 (1954) 等のものがあり, T.v. の増殖に細菌の種により著しい影響の差があることが明らかとなつている。著者は此の細菌との関係を *in vitro* よりは更に一步人間感染の場合に近いと思われる鶏胎という生物内での細菌と T.v. の関係, すなわち 3 種の生物体の相互関係として観察する事を目的として本実験を行つた。

材料及方法

(1) T.v. 株: 実験に用いた T.v. 株は, 当教室にてチスティンブイオン血清培地に継代保存している株であり, 著者の前報におけるものと同一である。この株は形態的, 生理的に特に異状を認められず, 又チオグリコレート培地にて随時無菌の状態をたしかめてあつた。

(2) 孵化鶏卵: 実験に用いた鶏卵の種類, 孵化法等は前報と同様である。接種した部位は漿尿膜腔内, 羊膜腔内, 卵黄囊内の 3 部で他の部位には行わなかつた。

(3) 細菌株: 使用した細菌は

<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Staph. citreus</i>	
<i>Staph. albus</i>	

<i>Staph. epidermidis</i>	
<i>Streptococcus faecalis</i>	
<i>Strept. haemolyticus</i>	
<i>Strept. viridans</i>	
<i>Candida albicans</i>	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	

の 9 種であつた。この内 *Lactobacillus acidophilus* は東京鉄道病院細菌室, *Candida albicans* は本教室にて, その他 7 種は本学細菌学教室にて分離同定した株であつていずれも安定した株である。これ等細菌の保存にはブドウ球菌は普通寒天斜面, 連鎖球菌は血液寒天斜面, *Candida* はサブロー斜面培地を用いた。

(4) 実験方法: 無菌的 T.v. の最も増殖の進んだ時期のものを選び, 生理的食塩水にて 2 回遠心洗滌し, 0.5cc 中に 200 万の運動せる T.v. を含む懸濁液を作つた。別に各細菌固有の培地に培養せる細菌を 10cc の生理的食塩水に 2 白金耳浮遊せしめ, この T.v. 浮遊液と細菌浮遊液を同量に混合し, 更に 1.0cc に 2000 単位の割合にペニシリンを添加し之を孵化鶏卵の各部に接種した。各部への接種方法は前報に述べた様に漿尿膜腔内, 羊膜腔内は Brunet の法により, 卵黄囊内は Cox の法を用いた。

(5) 接種後の培養及検索方法: 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卵し, 各接種部位の体液又はその部位の洗滌液及び隣接部位の体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。又別に同時にその細菌固有の培地に一部をうつし細菌の存否を確認した。実験途中にて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。

(6) 対照: 対照としては同一部位に単純接種を行つた前報 (神津 1955 a) での感染率を採つた。

Tetsuhei Kozu: Experimental inoculation of bacteria-free *Trichomonas vaginalis* into developing chicken embryos. (3) The effects of simultaneously inoculated bacteria and fungi upon the growth of the trichomonad. (Department of Parasitology, School of Medicine, Keio University Tokyo, Japan)

実験成績

この実験に於て先づ第一に考慮しなければならぬ点は細菌の各部位への接種によつて鶏胎が死亡することが無い、又それを防止して長く細菌を体内に止めながら鶏胎をも發育せしめる方法を見出す事である。本実験にはブドー球菌、連鎖球菌の多い関係にてペニシリンを添加して接種したが、予備実験としてペニシリンのみの接種、細菌のみの接種、ペニシリンと細菌の混合接種を各部位に行つて見た。その結果はペニシリンのみの接種にては殆んど死亡鶏胎なく完全に羽化した。又細菌のみの接種の場合は多くの細菌で接種後3日以内に鶏胎は死亡した。即ち4日以上生存したものは *Candida albicans* で漿尿膜腔にて8個中7個、羊膜腔にて8個中3個、羊膜腔にて3個中1個、*Staph. citreus* で漿尿膜腔にて11個中6個、羊膜腔にて5個中2個、卵黄囊にて3個中1個、*Staph. aureus* で漿尿膜腔にて4個中4個、卵黄囊内にて7個中5個のみであつた。細菌とペニシリンの混合接種にては細菌のみの接種に比較して著しくその生存日数を延長し羽化率も増大した。即ち各細菌共、接種卵数の50%以上が4日以上生存を示したが、*Strept. viridans*, *Strept. haemolyticus* では前者は羊膜腔、後者は漿尿膜腔、卵黄囊にて生存延長を見たに止まつた。以上の結果によりペニシリンを添加して本実験を行うことにした。

(1) 漿尿膜腔内接種の成績は綜括して第1表に掲げてある。

Staphy. aureus と同時接種の例では接種後2日、3日に死亡した卵4個中で細菌は3個に、T.v. は3個に陽性であり、7, 8, 9日後に検した5個では細菌は2個、T.v. は3個に陽性であつた。

Staphy. albus では接種後2日後迄に解卵したものの3個中細菌は2個に、T.v. は全部陽性であり、7日後までの4個中細菌は3個に、T.v. は2個に陽性であつた。

Staphy. citreus では4日後迄の8個中7個に T.v. は陽性、細菌は全部に陽性で、9日後の6個では細菌は全てに陽性であつたが T.v. は見られなかつた。

Staphy. epidermidis では2日後までの3個中2個に、7日後迄の3個中1個に T.v. 陽性であり細菌はそれぞれ3個、1個と陽性であつた。

Strept. faecalis では4日後迄の5個中 T.v. 細菌共に3個づつ陽性であり8日後の2個中1個細菌陽性であつたが T.v. は2個共陽性であつた。

Strept. viridans にては3日後迄の4個中細菌、T.v. 共に3個づつ陽性6日後迄の4個中細菌は3個、T.v.

は2個陽性であつた。

Strept. haemolyticus に於ては3日以内に4個が死亡したが4個全部に細菌は存在し、T.v. は3個陽性であつた。

Candida albicans は7日目迄の6個中に細菌は5個に陽性であつたが T.v. は全例陽性であり更に羽化せるものが2個あつた。

Lactobacillus にては3日目迄のもの4個中細菌、T.v. 共に3個づつ陽性であり、更に6日迄の2個は細菌、T.v. 共に2個共陽性であつた。

対照としての本部位への単純接種実験では T.v. 陽性例は全て接種後2日目までの卵に限られそれ以後のものでは1例も見出されていない。従つて細菌を同時に接種すれば、T.v. の接種初期の陽性率も上昇すると同時に生存増殖期が著明に延長していることが判る。

第1表 漿尿膜腔内接種

細菌名	接種卵数	死亡卵数	T.v. 陽性数	細菌陽性数	T.v. 細菌共存数
<i>Staphy. aureus</i>	9	7	7	5	4
<i>albus</i>	7	5	5	5	4
<i>citreus</i>	14	4	7	14	7
<i>epidermidis</i>	6	6	3	4	3
<i>Strept. faecalis</i>	7	6	5	4	2
<i>viridans</i>	8	6	5	6	4
<i>haemolyticus</i>	4	3	3	4	3
<i>Candida albicans</i>	6	4	6	5	5
<i>Lactobacillus</i>	6	6	5	5	4
対 照	30	4	3		

(2) 羊膜腔内接種の成績は第2表に示してある。

Staphy. aureus と同時接種の例では接種後3日以内のもの6個中細菌、T.v. 共に4個づつ陽性であり7日迄の2個は細菌は2個共陽性であるが T.v. は陰性であつた。

Staphy. albus の例では3日以内4個中細菌は3個 T.v. は2個陽性であつたが5日目解卵の1個には細菌のみにて T.v. は見出されなかつた。

Staphy. citreus にては3日後の6個中細菌は4個、T.v. は2個それぞれ陽性であり、6日後の6個中細菌、T.v. 共に4個陽性であつた。6日目の4個は生育卵であつた。

Staphy. epidermidis に於ては全てが4日以内に死亡

し 4 個であつたが細菌は 3 個, T.v. は 2 個陽性であつた。

Strept. faecalis に於ては 2 日目, 3 日目の死亡卵は 4 個で細菌は 3 個に T.v. は 1 個のみ陽性であつた。5 日目に解卵した 1 個の生卵は細菌, T.v. 共に陽性であつた。

Strept. viridans に於ては 3 日目迄の 4 個は T.v. は 3 個, 細菌は全例に陽性であり 6 日目の卵は 1 個で細菌 T.v. 共に陽性であつた。

Strept. haemolyticus は 3 日迄の解卵数は 3 個で T.v. は 3 個共, 細菌は 2 個のみ陽性であつたが 5 日目の 1 個は細菌のみ陽性で T.v. は見だされなかつた。

Candida albicans は接種後 4 日迄の 2 個には細菌のみ陽性で 6 日目の 1 個は細菌, T.v. 共に陽性であつた。

Lactobacillus には 3 日目迄の 4 個では細菌, T.v. 共に全部陽性, 4, 5 日目の 2 個では 1 個のみに細菌, T.v. が陽性であつた。

対照の単純接種の場合には卵の生存期間が長い為に分なる比較が出来ないが, 本実験の陽性率は明に対照を越えて高位にある。

(3) 卵黄囊内接種の結果は第 3 表に綜括して示した。

第 2 表 羊膜腔内接種

細菌名	接種卵数	死亡卵数	T.v. 陽性数	細菌陽性数	T.v. 細菌共存数
<i>Staphy. aureus</i>	8	5	4	6	4
<i>albus</i>	5	5	2	4	1
<i>citreus</i>	12	7	6	9	6
<i>epidermidis</i>	4	4	2	4	1
<i>Strept. faecalis</i>	5	5	2	4	2
<i>viridans</i>	5	4	4	5	4
<i>haemolyticus</i>	4	4	3	3	2
<i>Candida albicans</i>	3	3	1	3	1
<i>Lactobacillus</i>	6	5	5	5	5
対 照	37	6	14		

Staphy. aureus と同時接種の例では接種後 3 日以内の卵 3 個については細菌は 3 個共, T.v. は 2 個陽性。5, 6 日目のもの 2 個は細菌, T.v. 共に 2 個共陽性, 12 日目のもの 1 個は細菌, T.v. 共に存在しなかつた。又羽化せるもの 1 個があつた。

Staphy. albus には 3 日以内の解卵 4 個中細菌は 4

個共, T.v. は 2 個に陽性であつた。4, 5 日目のもの 2 個は細菌は 1 個, T.v. は 2 個共陽性であつた。

Staphy. citreus には 3 日以内のもの 6 個中細菌は全部に, T.v. は 5 個に陽性を示し 9 日目迄の生卵 3 個を含む 6 個では細菌は 5 個に, T.v. は 4 個陽性であつた。

Staphy. epidermidis に於ては 4 日以内の解卵 4 個に T.v., 細菌共全部陽性であつたが 6 日目解卵の生卵 1 個には T.v., 細菌共に見だされなかつた。

Strept. faecalis に於ては 3 日目迄のもの 3 個に細菌は全部, T.v. は 2 個陽性で 5, 6 日目の 4 個は細菌, T.v. 共に 2 個づつ陽性で 12 日目の 1 個は細菌は見だされなかつたが, T.v. は陽性であつた。又羽化せるものが 1 個あつた。

Strept. viridans には 3 日目迄の 8 個に細菌は 3 個のみ陽性であつたが, T.v. は 7 個迄陽性であつた。4, 5 日目解卵のもの 3 個中細菌, T.v. 共に 2 個陽性であつた。

Strept. haemolyticus には全てが 3 日以内に死亡し, その 5 個で細菌, T.v. 共 4 個づつ陽性であつた。

Candida albicans に於ては接種後 3 日迄のもの 4 個中 T.v. は 3 個陽性で細菌は検査しなかつたものがあるが 1 個は確実に陽性であつた。9 日目迄のもの 5 個中細菌は 1 個, T.v. は 2 個陽性であつた。

Lactobacillus には接種後 3 日以内の 3 個中, T.v., 細菌共に 2 個づつ陽性, 5, 6 日目のもの 3 個中細菌は 2 個, T.v. は 1 個陽性であつた。

第 3 表 卵黄囊内接種

細菌名	接種卵数	死亡卵数	T.v. 陽性数	細菌陽性数	T.v. 細菌共存数
<i>Staphy. aureus</i>	7	5	4	5	3
<i>albus</i>	6	6	4	5	3
<i>citreus</i>	12	9	9	11	9
<i>epidermidis</i>	5	4	4	4	4
<i>Strept. faecalis</i>	8	7	5	5	4
<i>viridans</i>	11	10	9	5	5
<i>haemolyticus</i>	5	5	4	4	4
<i>Candida albicans</i>	8	7	5	2+a	1+a
<i>Lactobacillus</i>	6	6	3	4	2
対 照	42	35	27		

総括及考按

細菌を孵化鶏卵内に接種する事に関しては数多くの業績があるが、この場合は主として特殊の細菌で普通培地に増殖せしめ難いものか、又は免疫学的研究にかぎられている様である。この原因は孵化鶏卵法を用いなくとも外に充分確実な培養法のある事と、細菌の接種により鶏胎の死亡又は接種部位の膜の融解等の為実験の不確実さを来す場合の多い事によるものと思われる。又他の原虫類の孵化鶏卵培養に於て無菌的狀態で成功したにもかゝらず、細菌との共存の接種実験の一例もない事は上述の理由の他に実験されている原虫では細菌との関係が必要なものがないからであろう。著者が本実験を行ったのは、予備実験に於て細菌が存在してもなお正常の孵化発育を遂げるものがある事が確認された事と、T.v. の自然感染に於ては大なり小なり共存細菌の影響があるのではないかと推論し試験管内でこの事実を証明した打越、Pray、久保田等の結果を見た事による。予備実験は諸種の事情により細菌の発育を抑制するためにペニシリンのみを用いたが或は他の抗生剤を用いたなら更に一層の効果を上げ得たかも知れない。

接種部位別に本実験の結果を見ると

(a) 漿尿膜腔内接種の場合には第1報に述べた単純接種の場合に比較して明に増殖又は生存期間の延長が行われている事を示している。接種後3日以内のものには殆どT.v. が生存していたが之も単純接種の場合に見られなかった現象である。接種後7日以上迄T.v. が存在したのは、*Staphy. albus*, *Staphy. epidermidis*, *Strept. faecalis*, *Candida albicans* でこの4種に於ては細菌と共存し明に増殖していたものと思われる。しかし直接鏡検にては発見し難かつた事を考えると、その増殖率は極めて小さいものと推察され、細菌を共存せしめても本部位はなおT.v. の増殖の至適部位でない事が明らかに示されている。

(b) 羊膜腔内に於ては本部位が細菌の感染に対して極めて敏感であつて実験を完了出来た個数が少く、又接種後の生存日数は之又非常に短かく本実験の程度にては結論を出す事は極めて困難である。T.v. の単純接種に比べて細菌共存により総合的に陽性率が上昇していることは確かであるが、兎に角上述の理由で例数が乏しい為特別の意味づけを行うことは無理があると思われる。

(c) 卵黄囊内に於ては *Strept. haemolyticus* をのぞいては全てT.v. の増殖を示している。単純接種の3日以上T.v. 存在率56%に比べ59%を示し、特に *Staphy.*

albus, *Staphy. citreus*, *Staphy. aureus*, *Staphy. faecalis*, *Strept. viridans*, *Candida albicans* は60%以上を示し、この種の細菌の存在がT.v. の生存又は増殖に本部位に於ては好結果を示している事と解釈してよいであろう。卵黄囊内接種の場合は単純接種の際にも比較的死亡卵が多いのであるから本実験の死亡卵も細菌接種のためとは云い難い。

以上にて各部位別の検討は述べたが之を総合して見ると明にT.v. の増殖又は生存日数の延長を助長したと思われる細菌は *Staphy. aureus*, *Staphy. citreus*, *Strept. faecalis*, *Candida albicans* であつた。T.v. の陽性率は高いが卵が早期に死亡した為充分判らぬものは *Strept. haemolyticus* であつた。Pray はT.v. の増殖を助長する細菌は *Staphy. albus*, *Staphy. aureus*, *Strept. lactis* であると述べ、久保田は *Staphy. aureus*, *Staphy. citreus*, *Staphy. epidermidis*, *Strept. viridans* が助長したと述べ *Staphy. albus* は助長しなかつたと述べている。本実験の結果と上記二氏の試験管内実験と比較すると明に共通点が見出される。すなわち *Staphy. aureus*, *Staphy. citreus* は明にT.v. の増殖を助長する事である。

本実験を通じて考えられる事は、何がある細菌をしてT.v. の増殖を助長せしめるかと言う事であるが、久保田の述べる如く細菌の生成する嫌氣的環境もその因子の一つであると考えられる。之は著者の第II報に於ても強く考えられた事であるが、本実験の場合には更に細菌の感染により卵自体の新陳代謝が低下し平常孵化時より嫌氣度が増加しているかも知れないと言う事も考えられる。斎藤他(1954)等によれば細菌は漿尿膜上、漿尿膜腔、羊膜腔、卵黄囊、鶏胎と漸次感染が進むと述べているが、これにより鶏胎の死亡迄到らぬとしても新陳代謝が下る事は明らかに考えられる。

結 論

1. 無菌的T.v. と特定の細菌一種を同時に孵化鶏卵の各部(漿尿膜腔、羊膜腔、卵黄囊)に接種しT.v. の生存、増殖状態を観察した。

2. 使用した細菌は *Staphy. aureus*, *Staphy. citreus*, *Staphy. albus*, *Staphy. epidermidis*, *Strept. faecalis*, *Strept. viridans*, *Strept. haemolyticus*, *Candida albicans*, *Lactobacillus acidophilus* の9種であつた。

3. 漿尿膜腔内にてT.v. は単純接種に比べて増殖の傾向を示し、特に *Staphy. aureus*, *Staphy. citreus*, *Candida albicans*, *Staphy. epidermidis* と同時接種の場合は著明であつた。

4. 羊膜腔内にては *T.v.* に明により旺盛に生活したが、卵の死亡の速くなるため増殖は確認し得なかつた。

5. 卵黄囊内にては *Staphy. aureus*, *Staphy. citreus*, *Strept. faecalis*, *Candida albicans* との共存の場合には単純接種時よりも著明に *T.v.* は増殖した。

6. 各部位を通じて一般に細菌との同時接種で *T.v.* の陽性率は上昇するが、明に *T.v.* の増殖を助長する細菌は *Staphy. aureus*, *Staphy. citreus*, *Strept. faecalis*, *Candida albicans* で、確実に増殖を阻止する細菌は見出し得なかつた。

(本論文の要旨は昭和30年4月4日第24回寄生虫学会に於て発表した)。

終りに臨み御指導、御校閲をいたゞいた松林教授、浅見助教授に心からの御礼を申し上げます。又細菌学教室斎藤講師の御好意に深謝します。

文 献

- 1) 神津鉄平 (1955 a) : 無菌的腔トリコモナーナの孵化鶏卵内接種実験, 第I報, 寄生虫学雑誌, 4, 302-307. —2) 神津鉄平 (1955 b) : 無菌的腔トリコモナーナの孵化鶏卵内接種実験, 第II報, 寄生虫学雑誌, 4, 327-330. —3) Asami K. and Nakamura M. (1955) : Experimental inoculation of *T. vaginalis* into human vagina and its effect on the glyco-gen content of vagina epithelia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 4, 254-258. —4) 打越利行 (1936) : *Trichomonas vaginalis* の形態学的並に生物学的研究, 腔細菌との関係, 日婦会誌, 31, 1865. —5) Pray, E. G. (1952) : The effect of various bacteria and their metabolites on growth of *Trichomonas vaginalis* in vitro. *J. of Parasit.*, 38, 398-408. 6) 久保田一彦 (1954) : 培養腔トリコモナーナの増殖と腔内好気性菌の関係について, 産婦人科の世界, 6, 780-786. —7) 斎藤和久・橋本一男・秋山武久 (1954) : 孵化鶏卵を用いた細菌の実験的感染及び免疫の研究, 慶応医学, 31, 299-306.

Summary

The author reported in the former papers the growth of *Trichomonas vaginalis* in developing chicken embryos. In the present article *T. vaginalis* was inoculated into the developing chicken embryos together with a single species

of bacteria or fungus. The purpose of this study lies on the observation of the mutual relationships *in vitro* between *T. vaginalis* and other microorganisms which are often found in human vagina. The strains of *T. vaginalis* used have been maintained free from bacteria in cysteine-bouillon-serum medium serially. The sites of inoculation are chorio-allantoic cavity, amniotic cavity and yolk sac. The species of the microorganisms tested are *Staphylococcus aureus*, *Staph. citreus*, *Staph. albus*, *Staph. epidermidis*, *Streptococcus faecalis*, *Strept. viridans*, *Strept. haemolyticus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Candida albicans*. The *T. vaginalis* were washed and sedimented twice in sterile normal saline and 2,000,000 of the organism were suspended in 0.5 ml of the fluid. The bacteria was mixed with the trichomonas suspension and penicillin was added in 2,000 units per 1 ml of the mixture to avoid the bacterial overgrowth which often resulted in death of eggs. This bacteria-trichomonad mixture was inoculated into the developing eggs in amount of 0.2 ml. After the incubation of the eggs the detection of the trichomonad was carried out by the direct smear and cultivation of the fluid of the inoculated sites.

By the inoculation into chorio-allantoic cavity, the growth of *T. vaginalis* was much accelerated by the simultaneous inoculation of bacteria. The bacterial species such as *Staph. aureus*, *Staph. citreus*, *Staph. epidermidis* and *Candida albicans* were especially effective in this respect. In amniotic cavity *T. vaginalis* seemed to live actively, however, the effects of the inoculated bacteria upon the multiplication of the trichomonad were obscured by the early death of the eggs. Trichomonad inoculated into yolk sac with *Staph. aureus*, *Staph. citreus*, *Strept. faecalis* and *Candida albicans* multiplied more prominently than without bacteria. In general, infectivity of *T. vaginalis* to chorioallantoic-, amniotic- and yolk sac cavity of the developing chicken embryo was enhanced by the simultaneous inoculation of the other microorganisms, and above all *Staph. aureus*, *Staph. citreus*, *Strept. faecalis* and *Candida albicans* markedly accelerated the growth of the trichomonad.