

# 無菌的腔トリコモナスの孵化鶏卵内接種実験

## (4) ムチン其他の同時接種物の影響

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9日受領)

著者は前報 (1955a, b, 1957) に於て腔トリコモナス (以下略して T.v. と称す) を孵化鶏卵に接種して、生活条件特にその内の嫌気性について、又同時に接種した 2~3 の細菌の影響についてそれぞれ報告した。

今回はムチン其の他の添加物質がどの様な影響を及ぼすかを検討した。ムチンが微生物感染で感染助長的な影響を及ぼすことは知られて居り、種々の細菌での実験報告がある。又原虫についてもトリコモナスで山泉 (1954), バランチチウムでト部 (1956) の発表があり、何れも同時に動物体内に接種することによって増殖生存に好影響を及ぼしている様である。ムチンの斯様な作用機構について Olitzki (1948) は coatingeffect を重視しているが、若し之が正しければ T.v. の鶏卵培養に際しても好影響があろうことが、接種虫体数が多いと陽性率が高まるという著者の前報での実験からも想像される。又之は腔内に存在する粘液とも何等かの関係があるかも知れない。又ムチンが上述の如く推論されるなら培地内に於て重要な意味のある寒天と比較する事によって一層その結果が明らかになるとも考えられるので本実験を行った。こゝにその結果を報告する。

### 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た株で、著者の前報に於けるものと同一で 50 代以上継代し、形態的、生理的に特に異状は認められない安定した株である。この株は常にチョグリコロト培地にてその無菌的状态を確認してあつた。

(2) 孵化鶏卵: 実験に用いた鶏卵の種類、孵化法等  
Tetsuhei Kozu: Experimental inoculation of bacteria-free *Trichomonas vaginalis* into developing chicken embryos. (4) The effects of simultaneously inoculated mucin and other substances upon the growth of the trichomonad. Department of Parasitology, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan)

は前報と同様であつて、接種した部位は漿尿膜腔、羊膜腔、卵黄囊の3部で他の部位には行わなかつた。

(3) 添加接種物質: 添加接種する物質としてはガストリックムチン (C.M.C 製 Gastric mucin, 和光工業) と培養液とを試みた。培養液はチスティンブイオン血清培地から血清を除いたもの (以下略してチスティンブイオン培地と称す) である。すなわちムチンは、それを生理的食塩水、蒸溜水、チスティンブイオン培地から寒天をのぞいたものの夫々に 3% の濃度に加えた。之を作るにはムチンを乳鉢中で溶媒にて磨砕し充分均等なる液とし、之をオートクレーブ 115°C, 20 分の滅菌を行った。又培養液としては通常の 0.05% の寒天を含むものと、0.2% を含むものとして通常の方法により作製して用いた。この 0.2% のものは充分流動性を有している温度において接種をした。

(4) 実験方法: 無菌的 T.v. の最も盛んに増殖した時期のものを選び、無菌生理食塩水にて 2 回遠沈洗滌し、之を上述の接種液に混じて 1 cc 中に約 500 万の運動せる T.v. を含む如き 5 種類の懸濁液を作つた。この懸濁液を 0.2cc づつ孵化鶏卵の各部に接種したが、その際再び血球計算板にて正確な虫体数を算定した。各部への接種方法は前報に述べた様に、漿尿膜腔内、羊膜腔内へは Brunet の法、卵黄囊内には Cox の法である。

(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その生死を検査し、一定日後に之を無菌的に解卵し各接種部位の体液を直接鏡検して虫体の存否を調べた。又同一体液は T.v. の有無にかゝらずチスティンブイオン血清培地にうつし、37°C, 72 時間の培養を行つて更に T.v. の存否を調べた。

(6) 対照: 対照として同一部位に、0.2cc に 100 万の活動せる T.v. の存在する無菌生理的食塩水の T.v. 懸濁液を、同一の方法にて 0.2cc づつ接種し、同様に培養、検索を行った。

### 実験成績

本実験を行う前に予備実験的に培地に加えたムチンが T.v. の増殖に及ぼす影響を観察した。これは培地に加えたムチンの作用を寒天と同様に嫌気的条件生成にあるのか又は栄養物質として作用するかを決定する為である。その為に次の如き組合せを作った。(a)寒天を含めぬチスティブイオン血清培地のみ。(b)チスティブイオン血清培地で寒天を0.05%に加えたもの。(c)チスティブイオン血清培地に0.3%ムチンを加えたもの。(d)チスティブイオン血清培地に0.05%の寒天と0.3%のムチンを加えたもの。以上の4種で、この培地に135000匹の虫体を接種し、24時間毎に血球計算板で虫体数を測定した。之は各培地につき3本づつの試験管で行いその平均をとった。この結果は第1表に示す如くであった。これによるとムチンを添加しても寒天を含めぬ場合に限って軽度に増殖を促進せしめるのみで、寒天が適当濃度に存在すれば無影響であることが分った。

第1表 培地内に添加したムチンの T.v. 増殖に及ぼす影響 (数字は 0.1mm<sup>3</sup> 中の生 T.v. 虫体数)

培養日数	1	2	3	4	5	6
チスティブイオン血清培地	13.2	56.7	95.0	135.2	102.8	90.3
チスティブイオン血清培地+0.3%ムチン	20.2	96.9	198.5	218.0	135.1	29.3
チスティブイオン血清培地+0.05%寒天	27.8	209.8	266.2	201.8	128.0	10.5
チスティブイオン血清培地+0.3%ムチン+0.05%寒天	13.2	65.6	202.2	230.5	165.2	38.6

次に本実験の成績を添加物質別に見ると、

(1) 3%ムチン生理的食塩水の場合には、漿尿膜腔にて5日目にて3個、6日目にて3個、7日目にて5個解卵したが、いずれも T.v. は陰性であり、4個は羽化した。羊膜腔にては5日目に解卵した9個中5個、7日目の3個中1個陽性、羽化4個、であった。卵黄囊内にては3日目に5個中4個、4日目5個中5個、5日目3個中2個、7日目6個中3個それぞれ陽性であった。

(2) 3%ムチン無寒天チスティブイオン培地の添加では、漿尿膜腔にて4日目に解卵したものの5個中2個、6日目5個中1個、7日目2個中1個 T.v. は陽性であり羽化せるものは2個であった。羊膜腔にては3日目2個中2個、5日目5個中2個、7日目10個中6個それぞれ T.v. 陽性であり、卵黄囊内にては3日目に7個中4個、4日目6個中5個、5日目10個中3個、6日目5個中3個、7日目5個中2個陽性であった。

(3) 3%ムチン蒸留水添加のものでは、漿尿膜腔にて4日目5個中1個に T.v. 陽性であったが、5日目の3

個、7日目の7個には T.v. は見出されず又羽化したものは2個があった。羊膜腔に於ては4日目解卵の10個中6個、7日目には11個中6個に T.v. は陽性を示し羽化せるものは3個であった。卵黄囊内に於ては、4日目に7個中4個、5日目に3個中1個、6日目に3個中2個陽性であったが、7日目の1個には T.v. は見出されなかつた。

(4) 0.05%寒天チスティブイオン培地に T.v. を懸濁せしめたものでは、漿尿膜腔にて4日目の6個中1個に、5日目の6個中3個に T.v. は見出されたが7日目の6個では全部陰性であった。又羽化したもの4個があった。羊膜腔に於ては4日目7個中5個、5日目2個中2個、6日目7個中5個、7日目の1個中1個に T.v. は陽性を示し羽化せるものは1個であった。卵黄囊内に於ては、3日目に6個中4個、4日目4個中4個、5日目2個中2個、6日目3個中1個、7日目に1個中1個

陽性であった。

(5) 0.2%寒天チスティブイオン培地の添加では、漿尿膜腔にて3日目に5個中2個、4日目4個中2個、5日目5個中1個、6日目5個中2個、に T.v. は陽性を示したが、7日目の4個には T.v. は見出されず、羽化したものは5個であった。羊膜腔にては、3日目5個中4個、4日目3個中3個、5日目2個中2個、6日目3個中3個、7日目3個中1個に陽性を示し、卵黄囊内にては、3日目3個中3個、4日目5個中4個、5日目7個中5個、6日目3個中2個、7日目2個中2個に T.v. 陽性を示した。

(6) 対照のものは、漿尿膜腔にて5日目3個、7日目の2個共に陰性であり、羊膜腔にては4日目3個中3個、7日目7個中4個に T.v. は陽性、卵黄囊内にては4日目に3個中3個、5日目2個中1個、6日目6個中4個、7日目1個中1個それぞれ T.v. 陽性で漿尿膜腔に羽化したもの2個があった。

以上で添加物質別による成績を述べたが、之を接種部

第2表 漿尿管腔内

	接種虫数 (万)	卵数	陽性卵数		陽性率 %
			直 接	培 養	
3%ムチン生理的食塩水	100—115	11	0	0	0
3%ムチン無寒天チスチンブイヨン培地	108—115	12	0	4	33.3
3%ムチン蒸溜水	104—112	15	0	1	6.6
チスチンブイヨン培地	92—106	18	1	4	22.2
0.2%寒天チスチンブイヨン培地	100—122	23	3	7	30.4
対 照	103	5	0	0	0

第3表 羊膜腔内接種

	接種虫数 (万)	卵数	T.v. 陽性卵数		陽性率 %
			直 接	培 養	
3%ムチン生理的食塩水	100—115	12	2	6	50.0
3%ムチン無寒天チスチンブイヨン培地	102—108	17	4	10	58.8
3%ムチン蒸溜水	104—112	21	5	12	57.1
チスチンブイヨン培地	92—106	17	6	13	76.4
0.2%寒天チスチンブイヨン培地	100—124	16	5	13	81.2
対 照	103	10	2	7	70.0

第4表 卵黄囊内接種

	接種虫数 (万)	卵数	T.v. 陽性卵数		陽性率 %
			直 接	培 養	
3%ムチン生理的食塩水	104—112	19	4	14	73.9
3%ムチン無寒天チスチンブイヨン培地	112	33	10	17	51.5
3%ムチン蒸溜水	110—115	14	4	7	50.0
チスチンブイヨン培地	103	16	8	12	75.0
0.2%寒天チスチンブイヨン培地	103	20	8	16	80.0
対 照	110	12	5	9	75.0

位別に綜合したものを第2表,第3表,第4表に示した。すなわち漿尿管腔に於ける接種には3%ムチン無寒天チスチンブイヨン培地,チスチンブイヨン培地,0.2%寒天チスチンブイヨン培地の添加で T.v. の陽性率が高く,羊膜腔にはチスチンブイヨン培地,0.2%寒天チスチンブイヨン培地が良好の結果を示し,卵黄囊内にはやはり羊膜腔と同様であるが,3%ムチン生理的食塩水が培養検査にて80%の陽性率を示しているものが注目される。

#### 総括及考按

ムチンの T.v. に対する作用については登倉 (1935), 県等の報告がある。その内登倉のものは,細菌を伴う培

養時に於ける培地内添加ムチンの影響を観察したものである故,ムチンのトリコモナスに対する一次的作用よりはむしろムチンが共存細菌の栄養物質となり,次に二次的にはトリコモナスの増殖に影響したと考えるのが妥当であろう。又山県は牛涎ムチン腹腔注入で前処置したマウスに1日後に250万の T.v. を接種し,対照に比べて感染の増加を見ているがその成績を検討すると,接種前にムチンという異物を注入したという事自体が感染を高める方向に働いたものの様に解釈される。つまり従来の実験ではムチンの T.v. に及ぼす影響は *in vitro* でも *in vivo* でも殆んど不明と考えて良いであろう。それで著者はムチンが T.v. に対し栄養物質として生化学

的に働くか又単にその粘調性の為外部からの影響に防禦的に働く物理的作用を呈するのみであるかを定める一助として上の実験を試みたのである。一方トリコモナスの培地中に加えられている寒天の意義は栄養としてではなく低酸素分圧の維持という物理的作用が主なものであることは知られている。予備実験として行つた *in vitro* の試験結果では寒天を全く含まぬ場合は、ムチンは軽度に増殖促進的に働くが、寒天を同時に加えて充分嫌気度を維持してある培地では何等ムチンの影響が表われぬ点からして特に栄養となつて増殖を助けるものとは思われず、粘調性が嫌気環境維持に幾分好影響を及ぼして増殖が促進されると解釈されよう。

ムチンの微生物感染に於ける作用としては **Coating effect** が重視されているが、云われている如く寄生体にとって **Protective** に作用し、多数接種の場合と相似した結果となる為にはムチンで **Coat** された環境内でその微生物が増殖し得ることを要する。その意味ではトリコモナス感染の場合単純なムチン溶液に虫体を混ぜて接種してもそこで増殖が起り得ぬから感染率の増加には無影響であろうと想像される。而して **Coat** された環境で増殖し多数接種と同様な結果を期待するにはトリコモナスが十分に増殖し得る組成の培地に粘調性を与えてそこに虫体を混じて接種すれば良いと考えられる。

*in vivo* の実験はこの様な意図で行われたのだがムチンを単純生理的食塩水又は蒸留水に溶解させたものつまり無栄養環境に虫体を混じて接種した実験の成績は、卵黄嚢内における生理的食塩水溶液の例を除き他の例では全て対照と同一か、対照より劣る結果となつて表わされている。つまり **Coating** によつて保護しても之内でトリコモナスが増殖し得なかつたか、むしろトリコモナスの生存に不適当な条件になつて却つて感染し難なつたのであろう。之に対してチスティンブイオン培地を基調としたものに虫体を混じて接種した場合は一般に陽性率が高く、とりわけ 0.2%に寒天を加え半流動としたチスティンブイオン培地での例は著明な感染率の上昇を示した。この事は半流動のメヂウム内で保護されつつ虫体が増殖を続け、多数接種の例と同様になつたのであろうと考えられる。

本実験を通覧してムチンの添加接種により特に感染率が上昇したと認められる例が無いのであるが、Olitzki の云う様にムチンの作用の本態が主として単なる **Coating effect** であるとする上述の様に本実験の成績が比較的容易に解釈され得る。従つてムチンをその様に解

釈すると細菌よりも更に複雑な発育増殖因子を必要とする寄生原虫の純粋種を対照とした場合には一般に感染率の上昇を期待し得ぬのではないかと考えられる。

### 結 論

(1) 無菌的 T.v. と若干の添加物質を同時に孵化鶏卵の漿尿膜腔内、羊膜腔内、卵黄嚢内に接種し、T.v. の増殖状態を見た。

(2) 添加物質は 3%ムチン生理的食塩水、3%ムチン無寒天チスティンブイオン培地、3%ムチン蒸留水、0.05%寒天チスティンブイオン培地、0.2%寒天チスティンブイオン培地の 5 種であつた。

(3) 一般にムチンの影響で陽性率が上昇したと認められず、0.2%寒天チスティンブイオン培地を接種した場合は各部位で全て著明に陽性率が上昇した。

(4) 培地に加えられたムチンは栄養物として T.v. の増殖を促進することはない。

拙筆にあたり御指導、御校閲をいただいた松林久吉教授並に浅見敬三助教授に厚く御礼申し上げます。

### 文 献

- 1) 神津鉄平(1955a) : 無菌的腔トリコモナスの孵化鶏卵内接種実験, 第1報, 寄生虫学誌, 4, 302-307.
- 2) 神津鉄平 (1955 b) : 無菌的腔トリコモナスの孵化鶏卵内接種実験, 第2報, 寄生虫学誌, 4, 327-330.
- 3) 神津鉄平 (1957) : 無菌的腔トリコモナスの孵化鶏卵内接種実験, 第3報, 寄生虫学誌, 6, 25-29.
- 4) 山懸宏 (1954) : *Trichomonas (T. vaginalis)* 及び *T. foetus* 純粋培養のマウス感染試験, 長崎医学誌, 29, 375-377.
- 5) ト部謹也 (1956) : 大腸パラチジウムのマウス, ラッテにおける腹腔, 皮下接種実験, 寄生虫学誌, 5, 65-72.
- 6) Olitzki L. (1948) : Mucin as a resistance lowering Substance. *Bac. Rev.* 12, 149-172.
- 7) 登倉登(1935) : *Trichomonas* の生物学的及免疫学的研究, 医学研究 9, 817-908.

### Summary

In the former papers, the author reported the growth of *Trichomonas vaginalis* in developing chicken embryos, and the effects of the anaerobic condition produced by paraffin coating of the eggs and the species of bacteria simultaneously inoculated were discussed in detail. In the present article, the effect of the gastric mucin, which was inoculated together with *T. vaginalis* into developing chicken embryos, upon the growth of the trichomonad was investigated. The gastric mucin was mixed and emulsified with distilled

water, normal saline and cystein-bouillon without agar in concentrations of 3%. On the other hand, cystein-bouillon-serum media for the bacteria-free cultivation of *T. vaginalis* containing agar in 0.05 and 0.2% were tested as control. The trichomonad was washed and sedimented by sterile normal saline, and 5,000,000 of the organism were suspended in 1.0 ml. of the inoculation fluid. Inoculation was made with 0.2 ml. of the suspension into chorio-allantoic cavity, amniotic cavity and yolk sac. The growth of the trichomonad in the eggs were examined by the same methods as in the former reports.

In a preliminary experiment, it was revealed that the mucin added in the cultivation media has no effect on the multiplication of the trichomonad in vitro. In developing chicken

embryos, the multiplication of the trichomonad was not accelerated in any sites by the simultaneous inoculation of the mucin which was dissolved in normal saline or distilled water. However, inoculation with mucin dissolved in cystein-bouillon promoted the growth of the organism in chorio-allantoic cavity. On the other hand, infectivity of the trichomonad to the developing chicken embryo was markedly enhanced when the organism were inoculated together with the cultivation fluid, and especially, with semi-solid medium containing agar in 0.2%.

From the above described results, it is concluded that the high viscosity of inoculation media which allows the growth of the trichomonad is favorable to the establishment of infection of the organism to the developing chicken embryo.

### 寄贈文献目録(7) つゞき

- に就て. 広島医学, 9(7), 原4(7), 621~629.
263. 春田孝正, 難波穰, 鈴木三郎, 谷茂, 山内一長, 柳沢利善雄, 矢島ふき(1956): 都内電々公社職員の鉤虫感染とその疫学的考察. 通信医学, 8(11), 929~933.
264. 鈴木了司, 白取剛彦(1956): 宮城県一農村の鉤虫感染者の症状並びに血液所見. 臨牀の日本, 2(11), 830~836.
265. 鈴木了司, 田代暢子, 青木大輔(1956): ツビニ鉤虫の分布している宮城県一農村における寄生虫の疫学的調査. 日本公衆衛生雑誌, 3(11).
266. 松田鎮雄(1956): 広島県に於ける寄生虫の展望. 広島医学, IX: 11, 12.
267. 牟田口利幸(1956): 鉤虫感染経路の疫学的研究. 第4報鉤虫, 蛔虫および鞭虫の家族内集積状況. 医学と生物学, 38(4), 106~109.
268. 鄭然昌(1955): 海人草有効成分の分離に関する研究. 165頁.
269. 石井進, 石原忠雄(1949): 牛の小型ピロプラズマ病に対するトロポヒンの治療効果に就いて. 獣医学界, 21.
270. 石井進, 石原忠雄(1951): 小型ピロプラズマを媒介するダニに就いて. 日獣会誌, IV, 9, 289~292.
271. 石井進, 石原忠雄(1951): トロポヒン錠による牛の小型ピロプラズマ病の治療効果. 獣医学界, 27, 1~3.
272. 細田哲哉, 小田島政一(1951): トロポヒン錠による牛の小型ピロプラズマ病治療成績. 獣医学界, 27, 4
273. 石原忠雄, 橋口裕治(1952): スパトニン錠による牛のミクロフィラリア駆虫法. 東獣会報フィラリア特輯号, 13~17.
274. 石原忠雄, 上野計, 尾形藤治, 橋口裕治(1953): スパトニンによる緬山羊脳脊髓セタリア病(所謂麻痺)の治療試験. 獣畜新報, 114, 637~640.
275. 石原忠雄, 尾形藤治(1953): 犢のセタリアに就いて. 獣畜新報, 116, 754~758.
276. 石原忠雄, 尾形藤治, 上野計, 二宮正明, 川田史郎, 三木茂(1955): 牛体内セタリア駆虫によるめん山羊脳脊髓糸状虫病の予防について. 日獣会誌, VIII, 113~117.
277. 石原忠雄, 上野計(1955): 夏癩に関する研究—夏癩は発病体質が遺伝シアレルギー性皮膚炎と考えられる. 日獣会誌, VIII, 366~371.