

トリパノゾーマ・ガンビエンゼの孵化 鶏卵内培養法に関する研究及び同法を 応用した 2～3 の実験について

第 I 報 孵化鶏卵内培養法に関する研究

金沢大学医学部微生物学教室(主任 谷教授)

竹 多 外 志

(昭和32年4月10日受付)

Studies on the Fertile Egg Culture of Trypanosoma Gambiense and Some Experiments by This Method

Report 1. Study on the Fertile Egg Culture

Toshi Takeda

Department of Microbiology, School of Medicine, Kanazawa University
(Director : Prof. Dr. T. Tani)

第 1 章 緒 言

1900 年を前後として原虫学の勃興以来トリパノゾーマ(以下「ト」と略記)に関する幾多の業績が陸續として発表されているが、その基本となるべき人工培養法に関しては、或る種の「ト」を除き、なお未解決のまま今日に至っているので、著者はトリパノゾーマ・ガンビエンゼ(「ト・ガ」と略記)を用い孵化鶏卵内培養法につき基礎的研究を行い、ここにその成績を発表することにした。

1931 年 Woodruff & Goodpasture¹⁾ が痘毒の孵化鶏卵内培養を報告して以来、本法は種々の微生物並びに各種組織の移植等に応用され、近來極めて多岐に涉つて利用され、特にウィルス、リケッチア等の分野における本法の研究応用は殆んど余す所がない位である。

「ト」及び、これに近似するスピロヘータの孵化鶏卵内培養に関する今日迄の文献を網羅して見るに、1934 年奥川²⁾ は初めて「ト・レビジエ」を用いて実験し、田中³⁾ は 1935 年回帰熱スピロヘータ(「回・ス」と略記)・「ト・ガ」・「ト・エバンシー」等を以て培養に成功したと報じ、次いで 1941 年「回・ス」に関して詳細な報告⁴⁾ をしている。1935 年水口⁵⁾ は「回・ス」・「ト・ガ」、1938 年 Morrow et al⁶⁾ は黄痘性

出血症レプトスピラ、1939 年 Longley et al⁷⁾ は「ト・ロデシエンゼ」その他、1940 年 Hallauer & Kuhn⁸⁾ は「ト・ナガナ」・「回・ス」、1941 年新美・飯田⁹⁾ は「ト・レビジエ」を用いて孵化鶏卵内の増殖を見ている。1949 年井上¹⁰⁾ は「回・ス」・「ト・ガ」の化学療法の実験に本法を応用している。これらの報告を検討して見るに、多くは実験方法において理想的とはいいい難く、単に接種菌の孵化鶏卵内増殖を見たという程度であり、接種法の多くは適切でなく、明確を欠き、増殖の観察法においても、接種後時間毎に解卵して知り得た個々の卵の成績を総合して判定している状態である。独り田中³⁾ は「回・ス」につき考案工夫を加え、基礎的且つ系統的な実験を行い詳細に報告しているが同氏の「ト」に関する詳細な報告には未だ接していない。孵化鶏卵内実験法の発達した今日より見れば、氏の方法も孵化法、接種法においてまだ改良の余地があるものと考えられる。

以上の点から著者は本報告において、従来の方法を取捨選択し、些か創案も加え「ト・ガ」の孵化鶏卵内培養法に関する系統的な研究を行い、その基礎を確立せんとした。

第2章 実験材料及び実験方法

1. 使用菌株 マウス或いは家兎通過により当教室に保存された「ト・ガ」株を用いた。その菌力は微量の感染極期のマウス血液を毛細硝子管でマウス頸部皮下に接種すると、3~4日でマウスを死亡させるものである。

2. 接種材料 「ト・ガ」感染極期のマウス血液を1%クエン酸ソーダ加生理食塩水で適宜に稀釈したものをを用いた。採血法は心臓穿刺及び腋窩部の血管を切断して採取した。

3. 孵化鶏卵 卵重 50gr 内外の白色レグホン受精卵を型の如く 39° で孵卵したものをを用いた。

4. 漿尿膜接種法 原則として接種順序を3段階に分けて行つた。

(i) 前処置 39° 孵卵の卵の中央に約 1cm² の窓を開き、Burnet¹²⁾ の法に準じて人工気室を作り卵殻・卵殻膜を除き、その部をアラビヤゴムに浸したセロファン片で覆い孵卵器にかえて置く。セロファンは予め適当に切り、5~10%アラビヤゴム水溶液に浸し滅菌したものを、実験の都度摂子で開窓部に置けばよい。その大きさは窓の面積より僅かに広くてよく、大き過ぎると乾燥後卵の球面との間に隙間ができ、密着しない。

(ii) 次いで接種材料を作製する。この間にセロファン片は乾き卵殻に固着している。

(iii) 接種 以上の準備完了後直ちに卵をとりだし、よく絞つた酒精綿でセロファン面を消毒し、これをとおして窓の一隅から注射器或いは毛細硝子管を挿入して漿尿膜上に材料を滴下接種して行く。全卵に接種が終れば接種孔をパラフィンの小滴で封じ直ちに孵

卵する。「ト・ガ」は食塩水中では急速に生活力が低下して行くので、上記の順序により迅速且つ正確に接種し得る。

5. 他部位への接種法 上述の開窓部より目的部位を肉眼で選定しながら確實容易に接種し得る。前処置を施さず卵殻外から接種する場合は従来¹²⁾ 13) 14) に従い行つた。

6. 卵の変化観察方法 如何なる方法で接種した時でも、観察は常に人工気室部の窓から行つた。貼布されたセロファン片は水滴等で曇ることなく充分乾き且つ緊張しているから、内部が明視でき、卵の生死・内部の変化等は瞭然たるものがある。観察は1日1回行い、死亡すれば直ちに開卵し「ト・ガ」及び雑菌を確めた。

7. 「ト・ガ」の増殖状況観察方法 観察は原則として接種後第3日より始め1日1回行つた。田中⁴⁾ の観察法を応用し、毛細硝子管をセロファンを通して挿入し、卵殻内膜と漿尿膜との辺縁部で小血管を選び、血管を殻壁に押しながら軽度の損創を与え、毛細管内へ吸引された血液を以て検査材料とした。採血部位及び血管の選定、並びに手技については細心の注意を要し、多量の出血で汚染される時は以後の観察、採血に不便を来し、時には卵の死亡を招く。他の卵液も上記の法に準じ、血管をさけて穿刺し検査した。なおセロファンを取除き実験する要ある時は、消毒をかねて酒精綿で充分浸せば容易に剝離する。「ト・ガ」の検査は暗視野法により鏡検し、その記載は分数式(「ト」の数/視野数)で表わした。

第3章 実験成績

第1節 孵化鶏卵内「ト・ガ」の増殖と温度の関係

一般に卵の至適孵卵温度は 38.8°~39.5° であり、ある種の「ト」は *in vitro* では 25°~28° の如き低温が適するとされている。田中⁴⁾ によれば孵化鶏卵内の「回・ス」は 39° 以上では増殖が抑制されるから「ト・ガ」においても同様のことが予想されるので、「ト・ガ」及び卵に至適な温度について実験して見た。

1. 第1表は8日卵を用い 25°, 30°, 35°, 38° で培養し第3日より観察した成績を示す。一般に早期孵

化卵は 25° の如き低温では次第に發育を停止し、遂に死亡するから、早急に比較成績を得るために、かなり大量を接種に用いた。第1表によれば、何れの温度でも第3日にはかなりの数の「ト」が出現し、その数及び以後の増殖状況も大差なく、「ト・ガ」の増殖と共に卵は死亡する。しかし 25°~30° では死亡迄の日数は比較的短かく、No. 64 においては「ト」の充分な増殖を見ないと思われる内に死亡している。これは低温による影響もあるものと考える。

2. 第2表は 40° 及び 41° で培養した場合の成績

第 I 表 孵化鶏卵内「ト・ガ」の増殖と温度 (25°~38°) の関係

8日卵使用, 「ト・ガ」: $\frac{6}{1}-0.1cc$
 漿尿膜接種, 検査材料: 血液, 分
 数式: 「ト・ガ」の数/視野数, 死:
 卵の斃死

卵 No.	培養 温度	「ト・ガ」接種後の経過			
		第3日	4	5	6
57	38°	$\frac{4}{1}$	$\frac{20}{1}$	死	
58	〃	$\frac{1-2}{1}$	$\frac{8}{1}$	$\frac{23}{1}$	死
59	35°	$\frac{10}{1}$	死		
60	〃	$\frac{2-3}{1}$	$\frac{10}{1}$	$\frac{30}{1}$	死
61	30°	$\frac{1}{1}$	$\frac{10}{1}$	死	
62	〃	$\frac{4}{1}$	$\frac{18}{1}$	死	
63	25°	$\frac{4}{1}$	$\frac{15}{1}$	死	
64	〃	$\frac{5}{1}$	死		

の一部を示す。実験 A では接種後直ちに 40° で培養すると (No. 148, 149) 遂に「ト」の出現を見ず, 8日後 35° に移しても陰性であった。(No. 148). 35° に培養し血中に「ト・ガ」を確認してから (第4日) 40° に移すと 40°, 24時間 (第5日) ではやや増殖を示したもの (No. 152, 156), 差異の見ないもの (No. 155, 157), やや減少し退行形も現われてくるもの (No. 154) 等が見られた。40°, 48時間 (第6日) 以後は「ト・ガ」は次第に減少し3~4日後 (第7, 8日) 血中より消失する。しかし消失後 (第8日) 35° に戻すと2日後 (第10日) より再び出現した。No. 155 では3日後も陰性であった。かかる再発「ト」に対して更に41° の培養を試みた所翌日大部の卵は死亡し判定は不能であったが, No. 156 では翌日陰性であった。実験 B は 41° の影響を見たものであるが, 40° に比して「ト」は速やかに消失するが35° で再発した (No. 246)。本表において大部分の卵が孵卵晩期で死亡しているが, 正常卵でも孵化直前に中絶率は最高となるものである。

以上第1, 2表より「ト・ガ」は 25°~38° ではよく増殖し, その間に差異は認められないが, 40° 以上では増殖は抑制され次第に減少する。従つて「ト・ガ」の増殖及び卵の發育に適当な温度は 35° と考える。

第 II 表 孵化鶏卵内「ト・ガ」の増殖と温度 (40°~41°) の関係

実験 A……10日卵使用, 「ト・ガ」: $\frac{3}{1}-0.05cc$, 漿尿膜接種
 実験 B……14日卵使用, 「ト・ガ」: $\frac{2}{1}-0.05cc$
 検査材料: 血液

卵 No.	接種日	「ト・ガ」接種後の経過											
		第3日	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
実 験	148	40°	—	—	—	—	—	→ 35°	—	—	—	—	→ 死
	149	40°	—	—	—	—	—	→ 死					
	152	35°	→ 40°	→ 40°	→ 40°	→ 40°	→ 死						
			$\frac{1}{25}$	$\frac{4}{1}$	$\frac{10}{1}$	$\frac{5}{1}$							
	154	35°	→ 40°	→ 40°	→ 40°	→ 40°	→ 35°	→ 35°	→ 40°	→ 40°	→ 死		
		$\frac{1}{20}$	$\frac{5}{1}$	$\frac{3}{1}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{全}$	—	$\frac{1}{5}$	$\frac{3-4}{1}$			
155	35°	→ 40°	→ 40°	→ 40°	→ 40°	→ 35°	→ 35°	→ 40°	→ 40°	→ 死			
		—	$\frac{3-4}{1}$	$\frac{5}{1}$	$\frac{1}{3}$	—	—	—	—	—			

A	156	35°	—	→ 40° 1/2	3/1	4/全	—	→ 35°	—	2/全	→ 41° 1/10	—	→ 死
	157	35°	—	→ 40° 1~2/1	4/1	1/2	2/全	→ 35°	—	1/3	→ 41° 7/1	—	→ 死
	159	対 照	35°	1/15	4~5/1	16/1	→ 死						
	160	対 照	35°	—	1/2	8/1	25/1	→ 死					
B	246	35°	—	1/20	2/1	—	—	—	1/全	→ 死			
	247	35°	—	1/4	11/1	→ 死							

第2節 孵化鶏卵内「ト・ガ」の増殖と接種量との関係

第3表によれば、2~3/1, 0.025cc 接種では第5日、0.05cc では第3~4日、0.1cc では第3日、0.2cc、

0.4cc では第2日に「ト」が出現している。以後の増殖経過には何れも大差はない。大量接種のもの程早く死亡する。即ち接種量が大となれば「ト」は早く血中に出現するが、血中出现後の経過には著しい差異がな

第3表 孵化鶏卵内「ト・ガ」の増殖と接種量との関係

9日卵使用。「ト・ガ」： $\frac{2-3}{1}$ 漿尿膜接種、35° 培養

検査材料：血液

卵 No.	接種量	「ト・ガ」接種後の経過							
		第2日	3	4	5	6	7	8	9
30	0.025cc		—	—	1/3	5/1	23/1	死	
31	〃		—	—	1/15	1/2	8/1	21/1	死
33	0.05	—	—	1/20	1/1	10/1	死		
34	〃	—	2/全	1/4	8/1	20/1	死		
36	0.1	—	1/3	4/1	30/1	死			
37	〃	—	1/5	2-3/1	25/1	死			
39	0.2	1/13	1-2/1	10/1	35/1	死			
41	0.4	1/6	3/1	20/1	死				

く、微量の接種で充分な観察が可能であつた。

第3節 孵化鶏卵内「ト・ガ」の

増殖と接種部位との関係

第4表は普通用いられている接種部位につき比較した成績であるが No. 95, 96, 97 は2孔法¹⁴⁾により卵殻外より卵黄に接種し、翌日観察のため開窓したもので、他は全て著者の方法により開窓部より接種した。かなり大量接種した実験Aでは、漿尿膜接種(No. 89, 90)では第3日に既にかなりの「ト」が出現して

おり、尿膜腔内接種(No. 91, 92)でも第3日に認められるがその数は少ない。卵黄内接種では第4~5日に初めて出現している。少量接種の実験Bでは、漿尿膜では第3日、尿膜腔内では第5日に「ト」が現われ、両者の差は更に明らかとなつている。「ト」出現後卵死亡迄の経過にはいずれも大差は見られない。即ち漿尿膜接種法によれば最も迅速、確実に「ト」の血中出現を見、その手技も容易である。以下尿膜腔内、卵黄内の順であつた。

第4表 孵化鶏卵内「ト・ガ」の増殖と接種部位との関係

実験A……9日卵使用、「ト・ガ」： $\frac{10}{1}$ 0.05cc 接種

実験B……10日卵使用、「ト・ガ」： $\frac{5}{1}$ 0.05cc 接種

35° 培養 検査材料：血液 ×……2孔法応用

	卵 No.	接種部位	「ト・ガ」接種後の経過					
			第3日	4	5	6	7	8
実 験 A	89	漿尿膜	$\frac{4}{1}$	$\frac{17}{1}$	死			
	90	〃	$\frac{5}{1}$	死				
	91	尿膜腔	$\frac{1}{1}$	$\frac{13}{1}$	$\frac{26}{1}$	死		
	92	〃	$\frac{1}{全}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{3}{1}$	$\frac{18}{1}$	死	
	93	卵黄	—	—	死			
	94	〃	—	$\frac{1}{5}$	$\frac{2-3}{1}$	$\frac{15}{1}$	死	
	95	〃 ×	—	—	$\frac{1}{7}$	$\frac{3}{1}$	$\frac{20}{1}$	死
	96	〃 ×	—	—	$\frac{1}{8}$	$\frac{2}{1}$	$\frac{15}{1}$	死
	97	〃 ×	—	$\frac{2}{全}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{7}{1}$	死	
B	223	漿尿膜	$\frac{1}{3}$	$\frac{4}{1}$	$\frac{30}{1}$	死		
	224	〃	$\frac{1}{5}$	$\frac{2-3}{1}$	$\frac{25}{1}$	死		
	225	尿膜腔	—	—	$\frac{1}{5}$	$\frac{8}{1}$	$\frac{20}{1}$	死
	226	〃	—	—	$\frac{1}{5}$	$\frac{3}{1}$	$\frac{20}{1}$	死

第4節 孵化鶏卵内「ト・ガ」の増殖と
種々の孵卵日数の卵との関係
漿尿膜が接種の対照となり得る如く充分発達するの

は大約孵卵第8日後であり、第12日頃より次第に卵殻
内膜との癒着が起り、孵卵の進んだもの程開窓に際し
その剝離に困難を加え、出血も多くなる。又一般に孵

第5表 孵卵8~11日卵における「ト・ガ」の増殖
「ト・ガ」：漿尿膜接種、 35° 培養
検査材料：血液
○……出血的刺戟をさけるため検査せず。

	卵 No.	孵卵日数	接種量	「ト・ガ」接種後の経過				
				第3日	4	5	6	7
実 験 A	170	8日卵	$\frac{8}{1}$ 0.05cc	$\frac{1}{4}$	○	$\frac{20}{1}$	死	
	171	"	"	$\frac{1}{2}$	$\frac{12}{1}$	死		
	172	"	"	○	$\frac{10}{1}$	死		
	173	"	"	$\frac{1}{1}$	○	死		
	174	10日卵	"	$\frac{1}{4}$	$\frac{6}{1}$	$\frac{20}{1}$	死	
	175	"	"	$\frac{1}{2}$	$\frac{10}{1}$	死		
	176	"	"	$\frac{1}{3}$	$\frac{7}{1}$	$\frac{25}{1}$	死	
B	192	9日卵	$\frac{4}{1}$ 0.05cc	—	$\frac{1}{1}$	$\frac{10}{1}$	死	
	193	"	"	—	$\frac{1}{2}$	$\frac{6}{1}$	$\frac{25}{1}$	死
	195	"	"	$\frac{1}{18}$	$\frac{4}{1}$	$\frac{15}{1}$	死	
C	218	11日卵	$\frac{5}{1}$ 0.05cc	—	$\frac{1}{2}$	$\frac{8}{1}$	$\frac{24}{1}$	死
	219	"	"	$\frac{1}{5}$	$\frac{2}{1}$	$\frac{14}{1}$	死	
	220	"	"	$\frac{1}{6}$	$\frac{2}{1}$	$\frac{22}{1}$	死	
D	352	10日卵	$\frac{3}{1}$ 0.05cc	$\frac{1}{25}$	$\frac{3}{1}$	$\frac{12}{1}$	$\frac{27}{1}$	死
	353	"	"	$\frac{1}{18}$	$\frac{5}{1}$	$\frac{18}{1}$	死	
	354	"	"	$\frac{1}{20}$	$\frac{6}{1}$	$\frac{20}{1}$	死	

第6表 孵卵12日以降の卵における「ト・ガ」の増殖

「ト・ガ」：漿尿膜接種，35° 培養，検査材料：血液

*：検査直後死亡，△：破殻中，□：接種2日前に前処置を施す

	卵 No.	卵の日数	接種量	接 種 後 の 経 過							
				第3日	4	5	6	7	8	9	10
実 験 A	325	12日卵	$\frac{5-6}{1}$ 0.05cc	$\frac{1}{2}$	$\frac{4}{1}$	$\frac{30}{1}$	死				
	326	"	"	$\frac{1}{4}$	$\frac{2-3}{1}$	$\frac{25}{1}$	死				
	329	16日卵	"	—	$\frac{1}{3}$	孵 化 $\frac{15}{1}$	ヒナ $\frac{4}{1}$	ヒナ $\frac{3}{1}$	ヒナ $\frac{1}{1}$	ヒナ $\frac{1}{1}$	死
	330	"	"	—	$\frac{1}{15}$	死					
B	303	15日卵	$\frac{5}{1}$ 0.05cc	$\frac{1}{2}$	$\frac{18}{1}$	死					
	304	"	"	$\frac{1}{2}$	$\frac{11}{1}$	死					
	307	12日卵	"	$\frac{1}{1}$	$\frac{8}{1}$	$\frac{23}{1}$	死				
	308	"	"	$\frac{1-2}{1}$	$\frac{15}{1}$	死					
	309	19日卵	"	△ —	△ $\frac{4}{1}$ 死*						
C	292	19日卵	$\frac{8}{1}$ 0.1cc	○	$\frac{5}{1}$	$\frac{25}{1}$	死				
	293	"	$\frac{8}{1}$ 0.05cc	○	○	$\frac{20}{1}$	死				
	294	"	"	○	$\frac{2}{1}$	$\frac{25}{1}$ 死*					
D	273□	13日卵	$\frac{5}{1}$ 0.05cc	$\frac{1}{8}$	$\frac{2}{1}$	$\frac{20}{1}$	死				
	274□	"	"	—	$\frac{1}{2}$	$\frac{6}{1}$	$\frac{25}{1}$	死			
	275	"	"	$\frac{1}{2}$	$\frac{5}{1}$	$\frac{27}{1}$	死				
	276	"	"	$\frac{1-2}{1}$	$\frac{10}{1}$	死					

卵早期及び孵化直前に最も多く中絶卵が出てくる。
又、水口⁵⁾は孵卵晩期の卵の中には「ト・ガ」に対し

て感性を示さないものがあるかなりあると報じている。以上
の点に鑑み、漿尿膜接種法を用い「ト・ガ」を培養

するには如何なる時期の卵を用いるべきかを検討して見た、その成績の一部を第5表(8~11日卵)及び第6表(12日以降の卵)に示す。

1. 第5表に示す如く、接種量の多少にもよるが、いずれも第3~4日に「ト」は出現し、次第に増殖して卵を死亡させる。死亡迄の期間は8日卵では幾らか短かく5日目で死んだものが多い。即ち8~11日卵では「ト・ガ」の出現及びその増殖状況には大差はないが、8日卵は幾らか抵抗が弱いものと考えられる。しかも8日卵は血管の発達は十分でなく、漿尿膜も脆弱なため採血等に不便である。

2. 第6表実験Aでは「ト」の出現は12日卵では第3日目、16日卵では第4日であり、実験Bでも12日卵では第3日に、15日卵に比しやや多く現われ、19日卵では第4日であつた。即ち「ト・ガ」の出現及び数において孵卵日数により差が見られる。実験Dは13日卵を用いて、2日前に前処置を施したもの(No. 273, 274)との比較である。前処置後直ちに接種したもの(No. 275, 276)においては「ト」の出現が早くその数も多い。これは接種漿尿膜の新旧の差によるものであろう。「ト・ガ」の出現より以後の増殖経過には著し

い差は見られなかつたが、孵化直前には死亡するものが多い。孵卵晩期でも「ト・ガ」に対する感性には変わりなく、19日卵(No. 309 及び実験C)でも高度の感染を示した。No. 329(実験A)の如く「ト・ガ」が雛に移行した場合も存在したがこれは更に後述する。

即ち漿尿膜接種では如何なる時期の卵も一様に感性をもっているが、10日前後の卵が最も適している。

第5節 孵化鶏卵内「ト・ガ」の増殖部位

「ト・ガ」は好んで流血中に増殖充満することは前述来の成績からも明らかであるが、他の部位として尿膜腔液について検討して見た。

第7表によれば、尿膜腔液内へ接種された「ト・ガ」は同液中では何ら増殖しておらず、血中に入り初めて増殖するものようである。(No. 225, 226)。又既に流血中に「ト」が出現増殖している時期でも尿膜腔液中では認められなかつた。しかしNo. 223(第5日)、No. 226(第7日)に見られる如く、血液中で「ト」がかなり多数となつた時には尿膜腔液にも僅かに認められる場合もあつたが、このような標本には多少とも血球が見られ、血球が殆んど見られないような標本では「ト」は常に陰性であつた。孵卵の進展に伴い血管は

第7表 孵化鶏卵血液及び尿膜腔液における「ト・ガ」の増殖
12日卵使用、「ト・ガ」 $\frac{5-6}{1}$, 0.05cc 接種,
35° 培養

卵 No.	接種部位	検査材料	接 種 後 の 経 過					
			第3日	4	5	6	7	8
223	漿尿膜	尿膜腔液	—	○	$\frac{4}{全}$	—		
		血液	$\frac{1}{3}$	$\frac{4}{1}$	$\frac{30}{1}$	—		
224	"	尿膜腔液	○	—	—	—		
		血液	$\frac{1}{5}$	$\frac{2-3}{1}$	$\frac{25}{1}$	—		
225	尿膜腔	尿膜腔液	—	—	○	—	○	—
		血液	—	—	$\frac{1}{5}$	$\frac{8}{1}$	$\frac{20}{1}$	—
226	"	尿膜腔液	—	○	—	○	$\frac{2}{全}$	—
		血液	—	—	$\frac{1}{5}$	$\frac{3}{1}$	$\frac{20}{1}$	—

著しく発達し、同一の卵から血液及び尿膜腔液を繰返し採取すれば、血液による漿尿膜の汚染も免がれず両液の混入も考えられる。これらのことからして尿膜腔液中の「ト」は該部で増殖中のものではなく、血液に由来するものと考えられる。死亡卵の尿膜腔液でも「ト」は常に陰性であつた。その他の部（卵黄、漿尿膜）も同様に増殖は不適であつたが、接種部位としては充分役立つた。即ち「ト・ガ」は血管内に侵入し、新鮮な流血の存在のもとに増殖する。

第6節 孵化鶏卵内「ト・ガ」の増殖状況、性状及び形態

1. 血液中への出現 「ト・ガ」の血中出現の時期は約 5/1, 0.05cc を10日前後の卵の漿尿膜に接種すれば3~4日目であり、これは接種量の多少に応じて変化し、他部位への接種では更に遅延することは前述した。しかし如何なる場合でも初めて血中に出現した「ト」の数は通常、数個/全視野~1/2であつた。1/2以上は出現第2日のものと考えてよい。この時期の「ト」の形態・性状には特記すべき変化は見られない。

2. 増殖経過 いずれの卵においても「ト」の増殖経過及び卵の死亡迄の期間（「ト」の出現後3~4日）には著しい差は見られなかつた。増殖経過からは一定の法則的なものは導き出すことは出来なかつたが、卵の死亡は流血中の「ト」の数により予知される。即ち1/2前後では翌日死んでいる可能性があり、2/3以上では翌日には必ず死んでいた。最高増殖期には「ト・ガ」の形態には種々の分裂形がよく見られた。「ト」は多数出現している時でも常に個々に運動しており、凝

塊現象の如き状態は見られず、他の血中有形成分との纏絡も認められなかつた。

3. 卵の死亡 孵卵晩期の卵で「ト・ガ」の増殖経過中に孵化して雛となるものもあるが、一般に「ト・ガ」の増殖により卵は常に死亡する。「ト・ガ」は卵の死と同時に急速に消滅し、通常死亡卵の血液、卵液中には「ト」は認められなかつた。しかし開卵の時期により僅かに運動している種々の退行形のを少数認めた例もあつた。

なお本法により「ト・ガ」を18代継株したが、その間においてマウスに対する菌力及び形態には変化は見られなかつた。

第7節 雛の「ト・ガ」に対する感性

1. 「ト・ガ」の雛への移行 一般に鶏胎仔は孵化直前には一段と抵抗を減じ、「ト・ガ」の感染に対しても殆んど孵化直前に死亡する。しかし感染したままこの時期を耐過して雛となるものもある。第8表はかかる場合の種々の経過の一例を示す。雛は35°に飼育し、型の如く給餌を行つた。雛の採血は翼下静脈より行い、体温は1日1回直腸内で測定した。第8表に示す如く、辛うじて孵化した雛は血中にかなりの「ト・ガ」を保有したまま早急に死亡する（No. 1）。No. 2では雛は次第に衰弱し第5日には死亡するが、血中の「ト」は次第に減少している。No. 3では第2日後は「ト」は陰性となり雛は順調に發育して行つた。この間雛の体温と「ト・ガ」の増減の間には明らかな相関々係は見られなかつた。

即ち雛の血液中では移行した「ト・ガ」は進んで増

第8表 鶏胎仔より雛に移行した「ト・ガ」の増殖

雛： 35° 飼育 ○： 刺戟をさけるため検査せず
□： 「ト」退行形陽性 △： マウス感染試験陰性
K. T.： 雛直腸内体温

雛 No.	孵 化 2 日 前	孵 化 1 日 前	孵 化 第 1 日	2 日	3 日	4 日	5 日
1	○	孵化 8 間始 1	起立 25 不能 1 K. T. 37°	— 死			
2	1/3	15 1	4/1 □ K. T. 38°	3/1 □ K. T. 37.5°	1/1 K. T. 39.5°	衰弱 1/1 K. T. 37°	— 死
3	5/1	○	3/1 K. T. 38.2°	— K. T. 39°	— △ K. T. 38.5°	— K. T. 37.5°	— K. T. 39.5°

殖を示さず、次第に減少、消滅して行くようであった。

2. 正常雛の感染試験 孵化後第1日、第2日、第4日の正常雛10羽を用い、「ト・ガ」6/I, 0.1~0.5ccを皮下及び腹腔内へ接種し、15日間血中の「ト」の検査及び体温の測定を行った。その結果は、体温は38°~41°を上下していたが、「ト」の検出はすべて陰性

に終つた。この間に3羽が衰弱瀕死の徴を示したが、それらの血液はマウスに対する感染試験でも陰性であった。

上述のことから一般に胎仔から移行した「ト・ガ」及び新たに接種された「ト・ガ」の増殖は、雛の体内では抑制され、時には早急に殺滅されるもので雛の「ト・ガ」に対する感性は著しく低い。

第4章 総括及び考按

本論文は「ト・ガ」の孵化鶏卵内培養に際し最も適切と思われる手技、方法を吟味した成績を記載したものである。以下その成果を要括し従来との報告と比較検討して見る。

1. 田中^{3,4)}は縦位に孵卵し気室部の窓より楔子を挿入し漿尿膜を露出して接種している。著者はBurnetの法²⁾に準ずる漿尿膜接種法で行つたが、手技上本法が遙かに迅速、容易、確実であつた。開窓部の被覆には一般にふたガラスを用い、Beveridge & Burnet¹⁵⁾はセロファン紙を10%卵白液で貼布しているが、私はアラビヤゴム溶液でセロファン紙を貼布した。この利点の一部は既に述べたが推奨するに足る試みであると考え。観察は田中^{3,4)}の法を応用したが、このようにして「ト・ガ」の増殖経過を1個の卵につき系統的に観察した報告にはまだ接していない。

2. 「ト・ガ」は比較的低温を好み、25°~38°ではよく増殖したが、40°では増殖を示さなかつた。既に血中に増殖していたものでも40°に移すと次第に減少し3~4日後に血中には認められなかつた。しかし40°、4日間では「ト・ガ」は完全に殺滅されず、35°に移せば再び血中に出現した。これらのことは、従来「ト」の試験管内培養研究で25°~28°が用いられて来たことと一致する。しかし孵化鶏卵内培養では卵の順調な発育も必須条件であるから、35°が最適培養温度と考えられる。40°培養の成績から、生体がこのような条件にある時は「ト・ガ」による感染、発症は著しく阻害されることが考えられる。成熟家鶏が「ト・ガ」に対して自然免疫性をもっているのは、その体温が常に40°~41°であることから当然と思える。又卵においては40°、4日間では「ト・ガ」を完全に殺滅し得なかつたが、人体での治療目的には実用価値は少ないと考えられる。

3. 「ト・ガ」の接種量は微量(数個/I, 0.05cc)で足り、潜伏期は接種量に応じて長短があるが、発症後

の経過には大差がない。

4. 「ト・ガ」は漿尿膜に接種された時、最も速く血中に出現し、以下尿膜腔、卵黄の順序であつた。しかし接種された「ト・ガ」はこれらの部位では増殖を示さない。なお尿膜腔内接種では、孵卵が進むに従い内容が著しく変化(PH、粘度の変化、水分の減少、排泄物の貯溜等)するから「ト・ガ」の接種には適当ではない。

5. 「ト・ガ」を漿尿膜に接種すれば、如何なる時期の卵も高度の感性を示したが、孵卵期間により多少の差異が見られた。孵卵12日以後の卵では漿尿膜と卵殻内膜とは次第に癒着し、晩期に至ればその剝離は困難となり、多量の出血とその凝固を伴い、これが「ト」の血管侵入に障礙となる。この癒着が起らないか、或いは軽度の時期では、剝離で生じた微小損創はかえつて「ト」の絶好な血管内侵入門となる。従つてこのような時期即ち孵卵10日前後の卵を用いるのが最もよい。

6. 「ト・ガ」の増殖により卵は必ず死亡する。その増殖経過の基本的な類型は次の如くである。即ち孵卵10日前後の卵の漿尿膜に微量(約5/I, 0.05cc)を接種し30°に培養すれば、「ト・ガ」は3~4日で血中に出現し、次第に増殖してその後3~4日にして死亡させる。死亡後「ト」は急速に消滅している。

7. 孵化鶏卵内では「ト・ガ」の形態、性状は特記すべき変化は受けない。経過中よく種々の分裂形が見られた。孵化鶏卵18代通過の間にもマウスに対する菌力には変化はなかつた。

8. 孵卵晩期の卵も「ト・ガ」に対してすべて感性を有し、多くは孵化直前に死亡するが、この時期を耐過して雛となるものもあつた。雛に移行した「ト・ガ」は卵内と異なり早急に消滅して行く。正常雛に感染させた実験もすべて陰性に終つた。即ち雛の「ト・ガ」に対する抵抗性は孵化後早急に獲得されるものと考え

る。鶏の体温は孵化直後は外界に左右され易く、 $37^{\circ}\sim 41^{\circ}$ を上下し、次第に $40^{\circ}\sim 41^{\circ}$ に安定する。このような温度は「ト・ガ」の増殖を阻害することは既に述べた。田中⁴⁾は「回・ス」における実験で、本現象を専ら体温上昇によつて説明している。私の実験では体温のみでは説明し難い場合もあり、生体の自然免疫獲得は更に複雑な機構を有するものであり、体温等の条件はその大きな要素の一つであると考え。水口⁵⁾も孵卵晩期の卵が「回・ス」「ト・ガ」に対して感染し難いとし、かかる時期に卵は既に自然免疫性が現われるものと説明した。氏の晩期孵卵の「ト・ガ」に対する感性に関しては私の成績と全く相反しているが、

第5章 結 論

1. 「ト・ガ」は孵化鶏卵内では比較的低温を好み、 $25^{\circ}\sim 38^{\circ}$ でよく増殖する。 40° では増殖は阻害され消滅する。至適培養温度は 35° である。

2. 「ト・ガ」の孵化鶏卵内培養には1視野中数個の「ト・ガ」材料、0.05cc内外の接種で足り、潜伏期は接種に応じて長短があるが、発症後の経過には大差が見られない。

3. 「ト・ガ」の孵化鶏卵内培養には漿尿膜接種により迅速、確実に成果が見られ、以下尿膜腔、次いで卵黄の順である。

4. 如何なる孵卵時期の卵でも「ト・ガ」に対する感性に大差は見られないが、種々の点より孵卵10日前後の卵を用いるのが適当である。

これは実験方法の相違による。氏の接種方法は、孵卵晩期で尿膜腔液が著しく変化し「ト・ガ」接種に不適となっている時期に、同液内へ行つている。従つて感染の有無、緩急は当然起り、感染率も低下するものと考え。

9. 「ト・ガ」の孵化鶏卵内培養法は株保存にも応用されるが、マウスに比し特に秀れているとは認められなかつた。しかし「ト」は勿論、他の原虫、スピロヘータ、特に試験管内実験の困難な微生物の研究に本報に述べられた諸点を基とし、本法を適宜応用すれば、その実用的意義は更に大となるものと考え。

5. 「ト・ガ」の孵化鶏卵内増殖部位は新鮮流血中であり、卵の死亡後早急に消滅する。

6. 上述の諸条件のもとに培養すれば、「ト・ガ」は通常3~4日で卵血中に出現し、次第に増殖しその後3~4日にして卵を死亡させる。

7. 「ト・ガ」は孵化鶏卵内では形態、性状に変化を受けず、18代通過の間にもマウスに対する菌力は変らなかつた。

8. 雛の体内では「ト・ガ」の増殖は阻害され消滅に向う。かかる雛の抵抗力は孵化直後急速に具備される。

(拙筆するに臨み、終始、御懇篤な御指導と御校閲を賜つた恩師谷教授に深く感謝致します。又種々御教示を載いた当教室池野博士に深く感謝致します。)

文 献

- 1) Woodruff & Goodpasture : Am. J. Path., 7 : 209 (1931). 2) 奥川 : 日微生物病理誌, 28 : 1329 (1934). 3) 田中 : 実験医学雑誌, 19 : 936 (1935). 4) 田中 : 実験医学雑誌, 25 : 797, 939, 1069 (1941). 5) 水口 : 日微生物病理誌, 29 : 1475 (1935). 6) Morrow et al : Science, 88 : 384 (1938). 7) Night Oag : J. Path. Bact., 49 : 339 (1939). 8) Longley et al : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 41 : 365 (1939). 9) Hallauer & Kuhn : Z. Hyg. Infkht., 122 : 406 (1940). 10) 新美・飯田 :

- 日微生物病理誌, 35 : 1132 (1941). 11) 井上 : 日本細菌学雑誌, 4 : 73 (1949). 12) Burnet : Handbuch d. Virusforsch., herausgeg. Von Doerr & Hallauer : I Teil 419 (1938). 13) 伝研学会編 : 細菌学実習提要, 第4版 : 360頁(昭28年). 丸善. 14) 池野 : 十全医誌, 56 : 732 (昭29年). 15) Beveridge & Burnet : Spec. Rep. Series, Med. Res. Council, London, No. 256 (1946). T. M. Rivers 編 "Viral & Rickettsial Infections of Man" P 97 より引用.