

# 水棲スピロヘータ」屬ノ研究

## 第1編 假稱「水スピロネーマ」ニ就テ

金澤醫科大學細菌學教室(主任谷教授)

専攻生 杉 本 兵 太

(昭和10年6月8日受附 特別掲載)

### 目 次

- |           |                 |
|-----------|-----------------|
| 1. 緒 言    | 5. 免疫學の性状       |
| 2. 純粹分離法  | 6. 病原性          |
| 3. 形態學の所見 | 7. 結論及ビ所屬ニ對スル考察 |
| 4. 生物學の性状 | 文 獻             |

### 緒 言

抑モ Spirochaeta ナル微生物學上ノ一屬名ハ1835年 Ehrenberg<sup>(1)</sup> ガ水中ヨリ波狀ヲ爲セル一新微生物ヲ發見シ、Sp. plicatilis ト命名セルニ始マレル者ニシテ、此ノ點ヨリモ容易ニ推知セラル、ガ如ク實ニ水中ニハ多様多種ノ「スピロヘータ」遊棲ス。然ルニ Leptospira ノ一部ヲ除キ彼等ノ大部分ハ病原性未知ナルヲ以テ、其ノ研究ハ實ニ寥寥トシテ彼ノ寄生性スピロヘータ」類ノ微ニ入り細ヲ穿チタル研究ニ比ブ可クモ非ズ。稀ニ生物學の性状ノ檢索ニ觸レタル者アルモ多クハ形態學の研究ノ範圍ヲ出デザル状態ナリ。今文献ヲ涉獵シテ此所ニ列舉センニ、Saprospira granids (Gross)<sup>(2)</sup>, Sap. nana (Gross)<sup>(2)</sup>, Sap. flexuosa (Dobell)<sup>(3)</sup>, Spriochaeta agillis (Adelmann)<sup>(4)</sup>, Sp. aurantia (Vinzent)<sup>(5)</sup>, Sp. biflexa (Wolbach a. Binger)<sup>(6)</sup>, Sp. cytophaga (Hutchinson a. Clayton)<sup>(7)</sup>, Sp. daxensis (Cantacuzéne)<sup>(8)</sup>, Sp. elusa (Wolbach a. Binger)<sup>(9)</sup>, Sp. flexibilis (Nägler)<sup>(10)</sup>, Sp. fulgurans (Dobell)<sup>(3)</sup>, Sp. gigantea (Warming)<sup>(11)</sup>, Sp. graminea (Zuelzer)<sup>(12)</sup>, Sp. minima (Dobell)<sup>(3)</sup>, Sp. plicatilis-marina, Sp. eurystrepta (Zuelzer)<sup>(12)</sup>, Sp. plicatilis pallida, Sp. stenostrepta (Zuelzer)<sup>(12)</sup>, Sp. polyspira (Wolf)<sup>(13)</sup>, Sp. pseudogallinarum. Sp. pseudorefringens. Sp. pseudopallida. Sp. pseudorecurrentis (Zuelzer)<sup>(14)</sup>, Sp. pseudohebdomadis (Zuelzer)<sup>(12)</sup>, Treponema vivax (Dobell)<sup>(3)</sup>. 等ニシテ、寡聞未ダ精密ナル系統的研究アルヲ聞カズ、之レ余ノ本研究ニ着手セル所以ナリ。

先年本研究ノ一端トシテ Leptospirabilexa (略記水 L)ノ研究ニ從事中ソレト別種ノ Spirochaeta 3株ヲ分離スル事ヲ得タリ。其ノ形態ハ Sp. recurrentis ニ酷似シ形態學上 Spirochaeta Gattungニ類別シ得ラル可キ者ニシテ、從來ノ文献中本種ニ類似スル者トシテ Zuelzer<sup>(13)</sup>ニ Spirochaeta pseudorecurrentis ナル者ノ報告アルモ、形態學的研究ノミニ過ギザルヲ以テ、余ノ分離株ト果シテ同一種ナルヤ否ヤハ、鑑別シ得可クモ非ズ。故ニ余ハ之ヲ新種ト看

做シテ詳細ニ檢索シ、種々ノ性狀ヲ知り得タルモ、特ニ興味ヲ感ゼルハ、之ヲ水Lト比較シ（本論文中水Lニ關スル事項ハ總テ拙著水L<sup>(15)</sup>ノ研究參照）、兩者共通ノ新知見ヲ得タル事ナリ。今此所ニ暫ク本種ヲ「水スピロネーマ」ト假稱（略記「水sp」）シ詳細ノ研究成績ヲ報告セント欲ス。

### 純粹分離法

本水spノ3株共水レプトスピラ増菌ノ目的ニ使用スル Hindle<sup>(16)</sup>氏ノ糞便水中ニ發育シ來タルモノニシテ、實ニ糞便水中ニハ1—2週間餘ニシテ種々ノ波狀微生物ノ發育ヲ來タシ、其ノ多クハ細菌ニ屬スル Spirillen ナルモ亦、形態學的ニ Spirochaeta ニ屬スト認メラル可キ者アリ。之等ヲ純粹分離セント企テ Berkefeld 細菌濾過器Vヲ以テ濾過シ濾液ヲ10%家兎血清水中ニ移植シ25°Cニ培養セルニ、波狀微生物ノ大部分ハ失シタルモ約10日間ニシテ余ノ分離株3株ダケ試験管中ニ發育セシムル事ヲ得タリ。然レドモ其ノ全部ハ雜菌及ビ Leptospira ヲ混ジ居タルヲ以テ、更ニ Leptospira 純粹分離ニ使用セラル、由利<sup>(17)</sup>氏寒天平板法ヲ用ヒ、遂ニ純粹分離ノ目的ヲ達スル事ヲ得タリ。即チ2%中性寒天ニ10%家兎血清ヲ加ヘタル平板ノ中央ニ不純培養液1白金耳ヲ直線狀ニ塗抹スルニ、24時間ニシテ塗抹線ニ一致シ先ヅ雜菌ノ集落群發育シ、其ノ後チ2日餘ニシテ雜菌群ノ境界ヲ僅ニ越エテ雲狀ノ輕キ白濁發育ス。本白濁ハ水spノ集落ニシテ稍太キ線狀縁ヲ分化シ、漸次雜菌群ヲ遠ク離レテ全寒天面ニ發育擴大ス。故ニ此ノ雜菌群ヨリ遠キ部分ヲ白金線ニテ釣取シ、再ビ家兎血清水（血清5%内外）ニ移植セバ、水spノ純粹培養ヲ得可シ。而テ余ノ場合ノ如ク譬ヘ水Lト混在發育シ居ルトモ水spノ發育力ハ極メテ旺盛ナルヲ以テ、常ニ水spノ集落ハ水Lノソレヨリ遠ク離レテ擴大シ、且ツ水Lノ集落ニ於ケル線狀縁ハ極メテ明劃ナル爲メ、寒天面ニ一目瞭然ト兩集落ヲ區別シ得可シ。故ニ水Lノ集落ヲ混ゼザル部分ヲ釣取セバ、極メテ容易ニ水Lヨリ水spヲ分離スル事ヲ得。但シ水sp混在ノ培養ヨリ逆ニ水Lノ分離ハ水Lノ發育遅キヲ以テ容易ナラザル事ヲ附記ス。

水sp3株ノ分離細目ハ第1表ニ表記セルガ如ク、記載ノ便宜上本項ニ附記セリ。

第 1 表 「水sp」ノ分離細目

昭和6年9月ヨリ10月ニ及ブ

株 名	採集場所	水ノ清濁	Ph.	採集期日
I 號	水 田	微 濁	7.2	6. 9. 21
II 號	用 水	微 濁	7.2	6. 9. 27
III 號	下 水	濁	7.0	6. 10. 8

### 形態學的所見

1) 生體暗視野裝置所見：水spノ體ハ頗ル纖細ニシテ、且ツ光線ノ屈折率僅小ナルヲ以テ、懸滴標本ニテ明視野裝置下ニ檢像スル事能ハズ、暗視野裝置ヲ借リテ鏡檢スル事ヲ要

ス。今液體培養(主トシテ5%家兎血清水)ノ1白金耳ヲ式ノ如ク、之ヲ暗視野装置下ニ鏡檢スルニ、sp體螺旋形ヲ呈シ、柔軟ニシテ屈撓性アリ。多クハ視野ニ個々ニ分散シ居ルモ、時ニ數條纏絡蠢動シ Agglomeration ノ像ヲ呈スル事アリ。培養ノ新舊或ハ Medium ノ種類ニ依リ、體長、旋轉ノ状態或ハ運動ノ速度等ニ大ニ差アリ。運動ノ緩徐ナルカ或ハ休止セル個體ニ就キ目測シ得タル所ニ依レバ體長8—12 $\mu$ 、幅員0.4 $\mu$ 、旋轉數2.5—3.5ノ間ニアル個體最モ多數ニシテ、旋轉ノ状態ハ其ノ大小不規則ナル者或ハ小ナル旋轉稍正規的ニ併列シ居ル者混在シ Sp. recurrentis ニ酷似ス。又例外的ニ旋轉頗ル大ニシテ顯微鏡ノ同一集點面ニテハ明割ニ其ノ全容ヲ解像スル事能ハザル者アリ。其他2%寒天ノ如キ中間體粘稠ナル場合ニハ固有旋轉ヲ示サズ半還狀又ハ1-2ノ不規則ナル大彎曲ヲ呈スル事アリ。無論之等相互ノ間ニ種々ノ移行型アリ、鞭毛、振動膜ノ如キ運動機關及ビ Kammer 様構造等ノ微細構造ヲ認ムル事能ハズ。

2) 塗抹標本所見 實驗方法トシテハ載物硝子上ニ塗抹スルヤ濕潤セルマ、直チニ「オスミューム酸蒸氣ニ投ジ15分間、後無水アルコール」ニテ15分間固定シ、Giemsa 氏染色法及ビ今井、日高氏鍍銀法ヲ用ヒタリ。又 Achsenfaden ノ染色ニハ塗抹後濕潤セルマ、昇汞—氷醋酸—「アルコール」液ニテ固定シ、ハイデナムイン鐵明礬ヘマトキシリン」染色法ヲ行ヒタリ。

sp體ノ計測方法ハ細菌ニ用フルガ如キ方法ニテハ迂餘曲折セル全長ヲ求ムル事能ハズ、故ニ Abbe 氏大型描畫装置ニテ畫カレタル投影像ヲ曲線計ニテ測リ、次ノ方式ニテ眞長ヲ算出セリ。Leitz 製顯微鏡、接眼鏡10X、接物鏡 $\frac{1}{4}$ 油浸装置、筒長18.5cmノ下ニ上記描畫装置ヲ附シ反射面ヲ水平面ニ對シ30°傾斜セシメ投影臺モ30°傾斜角ヲ有セシメ、反射像ヲ臺上何レノ部ニモ直角ナラシム。投影面ト反射鏡支點トノ距離約44cmナリ。本装置ニテLeitz 製 $\frac{1}{100}$ mmノ區劃ヲ有スル Objektmikrometer ヲ投影描畫セルニ其ノ10區劃即チ0.1mmハ19.3cmニ擴大投影セラレタリ。故ニ投影紙上1.0cmノ長サハ $100 \times 19.3 \mu = 5.18 \mu$ ニ等シ、即チ紙上曲線計ニテ計測シタル單位cmノ數ニ5.18 $\mu$ ヲ乘ズレバ實大ヲ得可シ(柄田氏<sup>(18)</sup>)。sp體ノ幅員ハ細菌ノ大サ測定法ニ從ヒタリ。5%家兎血清水中ニ培養セラレタルsp體ニ就キ所見ヲ述ブ可シ。Giemsa 氏染色法ニヨリsp體紫色ニ平等ニ染色シ、其ノ形態ハ兩端稍尖銳ナル螺旋體ニシテ、幅員0.4 $\mu$ 、長徑7—12 $\mu$ 、旋轉ノ數2—5ノ個體ヲ普通トシ、旋轉ノ大小不規則ナル型ト、稍小ナル旋轉規則正シク並行スル型ト、其ノ移行型トアリ。今sp體ニ於テ各旋轉ノ中心點ヲ結合セル線ヲ縱軸ト假定セバ、旋轉並列ノ型ニヨリ直線的ナルト、曲線的ナルトアリ、後者ニハ第一次旋轉ノ上ニ第二次旋轉ノ加フル結果ニシテ、視野ニハスル個體ヲ認ムル事多シ。而テ培養ノ新舊ニ依リ著シク長徑ニ差アリ、若キ個體ハ稍短ニシテ、熟スルニ從ヒ長徑ヲ増加シ、老ユレバ再ビ長徑ヲ減ズ。余ハ5%家兎血清水中ニ25°Cニ於テ3日間培養セラレタルsp體ニ就キ、個數30ヲ計測シテ平均數ヲ出シ、第2表ニ示セリ。尙本表ニハ平均數ヲ極度ニ外レタル者ヲ各項ニ就キ計測シ附記セリ。表ニ就キ稍説明ヲ加ヘンニ、長徑トハsp體ノ兩端ヲ結合セル假定線ノ長サニシテ平均數11.5 $\mu$ 、體長トハsp

第 2 表 s p 體 計 測 表

普通ニ見ラル個體30ノ計測平均數						
長徑 μ	眞ノ體 長 μ	體徑シ數 長ニタル ヲテ長係	幅員 μ	旋 轉 ノ 長 サ μ	旋 轉 ノ 振 幅 μ	旋 ノ 轉 數
11.5	13.6	1.19	0.4	3.2	1.0	3.5
各項ニ就キ平均數ヨリ極度ニ大ナル例						
42	48	1.43	0	4.0	1.5	14
各項ニ就キ平均數ヲ甚シク外レテ小ナル例						
3	3.2	0	0	2.5	0.5	0.5

平均數ハ同一個體ニ就キ各項全部ヲ計測シ割出セル者ナリ、平均數ヲ極度ニ外レタル例ハ同一個體ヲ計測セル者ニ非ズシテ各項別個ノ Sp. 體ニ就キ極端數ヲ例示セル者ナリ。 0 印ハ極端數ナキ者。

體ノ旋轉ニ一致シテ曲線計ヲ運ビ計測セル數ニシテ、平均 13.6、同時ニ sp 體ガ旋轉ノ爲メニ如何ニ其ノ體長ヲ屈曲スルカラ表サンガ爲メニ、兩者ノ比ヲ求メタリ。即チ平均係數（體長/長徑）1.19 ナルヲ以テ自己ノ體長ノ 2 割弱ヲ旋轉ノ爲メニ屈曲シ居ル者ト云フヲ得可ク、極端例ニ於テ係數 1.43 ナルアリ、其ノ體長ヲ 14μ ト假想セバ 10μ ノ間隔ニ自己ノ身體ヲ屈曲シ居ル者ナル事ヲ理解シ得可シ。

今井、日高氏鍍銀法ニ由リ Endofaden ヲ染色シ得タルモ鞭毛ヲ認メズ、ハイデンハイン鐵明礬ヘマトキシリンニテ軸索ヲ染色スル事能ザリキ。其他振動膜ノ存在ナシ。

### 生物學的性狀

1) 運動狀態 水 sp ハ頗ル高度ノ運動性ヲ有シ、主トシテ活潑ナル螺旋運動ニ由ル Lokomotive Bewegung ニシテ、變位運動ノ速力頗ル大ニシテ、其ノ速度増加ニ伴ヒ Windung 平坦トナル。而シテ個體ノ老若ニ依リ著シク運動ノ度ニ差アリ、若キ個體ニ於テハ變位運動頗ル大ニシテ旋轉平坦トナリ、其ノ經路ハ直線狀ニシテ前進及ビ後進、或ハ突然左右ニ方向ヲ轉換等シテ須臾ニシテ視野ヲ逸走ス。其ノ際ノ形態ハ恰モ旋轉無キ細長桿菌ノ如キ狀ヲ呈スルモ、運動停止、方向轉換或ハ相互ニ衝突シタル等ノ瞬間ニ於テ固有ノ螺旋形ヲ認メシメ、又輕ク覆蓋硝子ニテ被ハレタル場合ニハ彼等ハ水平位ノミナラズ垂直位ニ方向轉換ヲ爲ス事アリ。斯ル場合ニハ自己ノ縱軸ヲ廻轉スル螺旋體ナル事ヲ明瞭ニ辨別セシム。稍變位運動ノ速力ヲ減ゼル個體ハ數字 8 ノ數回連結セル如キ鎖狀ニ見エ、成熟セル個體ニテハ變位運動ノ速力益々緩徐トナリ、初メテ Spirochaeta 形ノ儘ノ運動狀態ヲ認メシム。即チ自己ノ縱軸ニ廻轉スル螺旋運動ニシテ、從ツテ穿ツガ如キ「マルク」抜キ運動ヲ爲シ、或ハ sp 體ヲ左右ニ屈曲シ蛇行運動ヲ營ミ、運動ノ方向ヲ轉ズル場合ニハ頭部ヨリ漸次柔ニ體ヲ直角ニ撓屈シ行ク可シ。又 Medium 粘稠ナル場合ニハ緩徐ナル匍匐運動ヲ營ム事アリ、2% 寒天平板上ニ發育セル集落ヲ檢スル時、斯ル例ニ良ク遭遇ス可シ。其他多數纏絡シテ Agglomeration

ノ像ヲ呈スル時ハ變位スル事ナク不規則ニ蠢動ス蠕動運動 (Peristaltische Bewegung) ノ如キヲ認メタル事ナシ。個體老熟セバ運動休止スル者多ク、時ニ徐々ニ螺旋運動ヲ爲ス者ヲ混ズ。本 sp = 特異ナルハ個體ノ老若ニ依リ著シク變位運動ノ速度ニ差アル事ニシテ、又休止ノ状態ヨリ突然變位運動ヲ開始シ、又原位置ニ復シテ休息スル事ナリ。

2) 分裂 確實ナル分裂像ヲ認メタルコトナキモ、sp ノ形態ヨリ推測シテ2方向ニ營マル、者ノ如ク、極メテ長ク  $40\mu$  以上ニ達スル個體ヲ見ル事アリ、之ハ横分裂直前ノ像ナラント想像セラル。又暗視野視置下ニ2—3條長軸ニ纏絡シ、其ノ兩端離レテ蠢動スル者アリ、恰モ縦分裂直前ノ像ナルガ如ク推定セラル、同様所見ヲ塗抹染色標本ニ於テ見ルニ中央部極メテ太ク染色シ、兩端2—3條ニ分レ居ル像トシテ現ハル。即チ縦横兩分裂ニヨリ増殖スル者ナランカ。

3) 濾過性 特ニ實驗シタルニ非ラザルモ、分離株ハ總テ Berkefeld V ヲ濾過シテ發育セル者ナルヲ以テ、濾過性ヲ有スル者ト認ム。

4) 化學藥品ニ對スル關係 Saponin (Merck) ニ對シテハ室溫  $15^{\circ}\text{C}$  ニテ10%溶液中ニ於テ何等作用ヲ受ケズ。

膽汁酸曹達ニハ極メテ鋭敏ニシテ其ノ態度下記ノ如シ。

10%, 5%及ビ3%即時溶解 ( $15^{\circ}\text{C}$ )

1.5%, 5分後溶解 0.7%30分後溶解 ( $15^{\circ}\text{C}$ ) 0.3%1時間後不溶解 ( $15^{\circ}\text{C}$ )

其他ノ藥品ニ對スル關係ノ實驗ハ分類上ノ所屬決定ノ目的ノ爲ニハ意義ナシト考ヘタルモ、Zuelzer<sup>(19)</sup>ニ從ヒ下記實驗ヲナセリ。

1%硫酸水溶液 ( $15^{\circ}\text{C}$ ) 即時旋轉ヲ示セルマ、縮少シ、光線ノ屈折率増加シ暗視野照輝ニヨリ sp 體光輝ヲ増シ、其ノ後1時間餘ニシテ視野ヨリ消失ス。

2%苛性加里水溶液 ( $15^{\circ}$ ) 直チニ稍旋轉伸長、光線屈折率減少、解像困難トナルモ、1時間後ニモ不溶解。

5%苛性加里水溶液 ( $15^{\circ}$ ) 即時稍膨脹シ、直チニ溶解ス。

鹽酸ペプシン」中(0.3%鹽酸 150cc + Pepsin 0.1gr.  $15^{\circ}\text{C}$ )ニテハ直チニ溶解ス。

5) 培養基上ニ於ケル發育状態

A) 液體培地上ニ於ケル發育状態 家兔血清水(5—10%)ニ新培地ノ  $\frac{1}{10}$  量ノ水 sp 純培養ヲ舊培地ヨリ移植シテ  $25^{\circ}\text{C}$  ニ培養スルニ肉眼の所見トシテハ、48時間ヲ經テ、透明ナル培地ガ漸次極メテ輕ク乳濁色ヲ呈シ來タリ、4日後最モ乳濁高度トナリ、ソレヨリ漸次減色シ、1月餘ニシテ再び透明トナル。而テ本乳濁ハ水 L ノ者ヨリ稍強キモ常ニ平等ニ濁色ヲ呈シ、水 L ニ見タルガ如キ白輪ヲ發生シタル事ナシ。之ヲ暗視野裝置下ニ鏡檢スルニ、移植後既ニ12時間ニシテ増殖シ始め、視野ニ2—3條ノ盛ニ運動セル短キ個體ヲ認ム。ソレヨリ漸次増殖シ2—4日ニシテ極期ニ達シ、視野ニ無數ニ出現シ、6日後頃ヨリ漸次 sp 體ノ運動衰ヒ、減數スルニ至ル。其ノ發育状態ノ水 L ト稍異ナルハ、發育極メテ早く常ニ視野ニ平等ニ分散シ居ル事ニシテ、時ニ1—2ノ視野ニ10數條纏絡シ Agglomeration ノ像ヲ呈スル事ア

ルモ、水 L ノ分離當初ノ液體培地ニ見タルガ如キ甲ノ視野ニテハ L ノ大集團ニシテ、其ノ全視野ヲ被フモ、乙ノ視野ニテハ僅カ 3—4 條運動セルヲ見ルノミナルガ如キ極端ナル發育ノ不平等分散ヲ呈シタル事ハ、水 sp ノ分離當初ヨリ未ダ經驗シタル事ナシ。

水 sp ノ家兔血清水中ニ於ケル生命保持力ハ極メテ長ク、半年ヲ經タル古キ培地ヨリモ移植可能ナリ。

其他「ブイオン (ph7.4 内外) 及ビ 5%」ニ家兔血清ヲ加ヘタル「ブイオン」中ニモ 25°C ニテ良ク發育スルヲ得レドモ、上記血清水ヨリ發育稍不良ニシテ 3 週間内外ニテ消失ス。

B) 半凝固培地上ニ於ケル發育状態 野口氏半凝固培地ニ於テハ水 L ト同ジク上、下ノ 2 重輪ヲ發生ス。即チ 5—10% 家兔血清加 0.5% 「リソゲル・アガール」ノ表面ニ平板ヨリ集落寒天片ヲ移植シ、25°C ニ培養スルニ、24 時間内ハ肉眼的ニ變化ナキモ、次ノ 6 時間内ニ既ニ培地ノ上層部分ニ上下 2 條ノ白輪發生シ居ルヲ見ル可シ。第 1 輪(上輪)ハ稍太キ 1 條ノ白輪トシテ培地表面ヲ去ル 0.4—0.5cm ノ深サニ存在シ第 2 輪(下輪)ハソレヨリ、下方 0.3—0.5cm ノ深サニ又 1 條ノ細キ白輪トシテ存在ス。但シ水 sp ノ第 2 輪ハ水 L ト異ナリ頗ル菲薄ニシテ辨別ニ困難ヲ感ズ。而テ第 1 輪ハ或限界點ニ達セバソレヨリ深部ニ進ム事殆ンドナキモ、第 2 輪ハ速ニ進ミ試験管底ニ達シテ消失ス。時ニ第 3 乃至第 4 ノ數輪ヲ見ル事アリ。之等ノ白輪ハ水 sp ノ純集落ニシテ其ノ小片ヲ覆蓋硝子下ニ壓潰シテ暗視野装置下ニ鏡檢スルニ、小片ハ不規則ナル微細片ニ分タレ、其ノ微細片ハ無數ニ發育セル sp ノ集團塊ニシテ密集増殖ノ極微細片ノ中央部ハ顆粒狀ヲ呈シ、何者ナルヤヲ辨別シ難キ程ナルモ微細片ノ周縁ニ近ヅクニ從ヒ、纏絡蠢動シ居ル sp 體ヲ辨別セシム。而シテ集團ヲ遊離セル sp 體ハ運動頗ル早く、旋轉平坦トナリ、自由ニ視野ヲ逸走ス。

寒天濃度 0.5%、ph7.4 内外ノ營養寒天或ハ之ニ血清ヲ 5% ニ注加シ試験管ニ高層トナシタル半凝固培地ノ表面ニ集落寒天片ヲ移植スルニ、前記野口氏培地ト異ナリ 25°C ニ於テ數日間培養スルモ、白輪ヲ生ズル等ノ肉眼的變化ヲ來タスコトナク、之ヲ鈎取シテ暗視野装置下ニ鏡檢スルニ單ニ平等ナル分散發育ガ行ハレ居ル事ヲ認ム。即チ野口氏培地外ノ半凝固培地ニテハ集落狀發育ヲ爲サル者ト認ム。

C) 固形平板培地上ニ於ケル發育状態 2% 中性寒天ニ 5 乃至 10% ニ家兔血清ヲ注加シ平板ト爲シタル培地ノ中央ニ純液體培養(家兔血清水)ノ 1 白金耳ヲ直線狀ニ塗抹シ、25°C ニ培養スルニ、既ニ分離法項下ニ記載セルガ如ク 2—3 日ニシテ塗抹線ニ一致シ雲霧狀ノ輕キ白濁ヲ生ジ、次デ其ノ周縁ニ線狀縁ヲ分化シテ速ニ全寒天面ニ發育擴散シ、極メテ輕度ノ白濁ヲ殘シテ線狀縁消失ス。之ヲ同組成培地上ニ於ケル水 L ノ集落發生状態ト比較スルニ、L ニテハ白濁ノ度弱ク線狀縁細クシテ明劃ナルモ、sp ニテ線狀縁稍幅廣クシテ明劃ヲ缺キ、白濁ノ度強シ。而テ未ダ集落全寒天面ニ擴散セザルニ先ダチ室溫(3 日 10°C 内外)ニ放置スルニ擴大極メテ僅小トナリ、再ビ 25°C ノ孵巢ニ納ムルニ原線狀縁ニ對シ更ニ新線狀縁ヲ分化シテ發育擴大ス。斯クノ如ク培養溫度ノ變化ニ由リ數輪ヲ生ゼシムル事ヲ得可シ。又舊培地ノ集落寒天片ヲ新培地ニ移植スルニ(移植ニハ切り取ラレタル寒天片ヲ新培地ノ表面ニ靜置

セバ足ル), 25°C = 於テ24時間乃至36時間ニシテ, 移植寒天片ノ周圍ノ新培地ニ僅ニ白濁ヲ來タシ, 輪狀縁ヲ分化シテ漸次圓形ニ發育擴大ス. 之等ノ白濁ハ sp ノ純集落ニシテ寒天中ニ穿入發育シ, 細菌ノ如ク寒天ノ表面ニ邊フテ發育スルモノニ非ズ. 從ツテ肉眼的ニ白濁アルモ寒天表面ハ平滑ニシテ何等ノ變化ナシ. 故ニ釣菌ニハ白金耳ヲ以テ白濁ノ表面ヲ細菌集落ニ爲スガ如ク觸ル、ノミニテハ目的ヲ達セズ, 必ラズ寒天片ト共ニ集落ヲ切り取ルコトヲ要ス. 切り取ラレタル白濁寒天片ノ暗視野装置所見ハ略ボ半凝固培地項下ニ記サレタルガ如キ密集 sp 塊ナリ.

寒天平板中ニ於ケル sp ノ生命持續力ハ甚グ長ク, 室温ニ放置セラレテ1ヶ月餘ヲ經タル者ヨリモ移植可能ナリ.

普通營養寒天(濃度3% pH7.4内外)及ビ之ニ5%ニ家兎血清ヲ加ヘタル血清寒天平板培地ニモ集落寒天片移植ニ由リ集落狀發育ヲ爲ス. 本集落ハ輪狀縁細ク擴大發育度小ナルモ, 白濁度強ク, 極メテ薄キ黃綠色ヲ帶ビ, 稍鱗光ヲ放テルガ如キ感ヲ有ス.

#### 6) 生活要件

水Lト同ジキ自然水ヨリ同方法ノ下ニ分離セラレタルヲ以テ, 略ボ同様ノ生活條件ヲ要スト豫測セラレ, 諸實驗ヲ重ネタルニ, 發育度ノ強弱ニ由ル差ハ存シタルモ, 本質的ニハ格段ナル差ヲ見出ス事能ハズ, 以下之ヲ詳述ス可シ.

#### A) 營養素ノ要求状態

pH7.2ノ滅菌水道水 10.0c.c = 5%家兎血清水純培養 0.2c.c ヲ移植セルニ, 48時間後ニ sp 體頗ル細ク運動小ナル個體ノ1—2條1視野ニ現ハレ, 3日後ニ1視野4—5條位マデニ増殖セリ. 又前述ノ如ク5%血清加「ブイヨン」中ニモ良ク發育スルヲ以テ, 頗ル廣範圍ニ亙リ培地營養素量ニ適應發育スル者ノ如シ. 水Lハ「ブイヨン」中ニハ發育セザルモ, pH7.2ノ滅菌水ニ發育シ(加賀谷<sup>20)</sup>)又30%家兎血清加寒天平板ニ僅カナガラモ白輪ヲ結ブラ以テ, 水Lモ亦良ク廣範圍ニ亙リ營養素量ニ適應シ發育スト云フヲ得可ク, 此ノ點兩者共多分ニ雜菌性性状ヲ具有スルモノト思考セラル.

次ニ培養ニ際シテノ注加血清ノ適量ヲ, 水L實驗ニ際シ用ヒタル平板培地發育徑測定法(實驗方法ノ詳細ハ拙著水Lノ研究第2編ニ譲ル)ニ依リ決定セリ. 被檢培地ノ寒天濃度ヲ2%トナシ, 之ヲ1%ヨリ30%マデ種々ノ度ニ血清量ヲ注加シテ平板ト爲シ, 舊培地ヨリ正確ニ3mm<sup>2</sup>ヲ切り取りテ移植シ, 發育スル白輪ノ直径ヲ Schale 裏面ヨリ計測シ, 單位mmニテ計上シテ, 發育度ヲ判定比較セリ. 其ノ成績ハ第3表ノ如ク25°C48時間後ニ於ケル直径ハ各%共概シテ良ク發育シテ, 20%ハ平均24.7mmニシテ最大, 10%ト30%トハ平均21.0mmト21.3mmトニシテ大差ナク, 以下5%, 3%, 1%ノ順位トナリ, 集落ノ白濁度モ20%ニ於テ最大ナリ. 之ヲ水Lノ成績ト比較スルニ水Lニテハ各%ノ發育徑ハ差大ニシテ3%以下ニテハ白輪ヲ結バズ, 斯ル點ヲ思考スルニ, 水 sp ハ營養素量ヲ無視シテ良ク發育スル者ノ如ク, 血清適量ハ前記ノ如ク20%ナルモ, 血清經濟ノ關係上平板培地ニハ10%ト爲シ血清水ニハ單ニ sp 株保存ノ目的ニハ5%ヲ注加使用シ居レリ.

第 3 表 平板培地注加血清量ニ依ル發育差異  
25°Cニテ48時間培養セル發育直徑

株名 注加血清	I 號 株	II 號 株	III 號 株	平 均
1%	17.0mm	16.0mm	5.0mm	12.7mm
3%	18.0mm	19.0mm	16.0mm	17.7mm
5%	18.0mm	19.0mm	17.0mm	18.0mm
10%	22.0mm	20.0mm	21.0mm	21.0mm
20%	26.0mm	25.0mm	23.0mm	24.7mm
30%	23.0mm	21.0mm	20.0mm	21.3mm

B) 發育溫度 平板集落發育徑計測法ニ依リ種々ノ溫度ニ於ケル發育差異ヲ檢シタリ。溫度ハ 37°C 30°C 及ビ 25°C トシ、同時ニ余ノ實驗時期ハ 3 月ナリシ爲メ特ニ孵巢ヲ 15°C ニ調節シ室温ヲ模シテ實驗ヲ爲セリ。其ノ成績ハ第 4 表ニ記スガ如ク、37°C ニ於テハ發育徑

第 4 表 培養溫度ニ因ル發育差異 2 日後ニ於ケル  
發育直徑ヲ單位 mm ニテ計測セリ

株 名 培養溫度	37°C	30°C	25°C	15°C
I 號 株	26.0	25.0	23.0	5.0
II 號 株	26.0	25.0	20.0	±
III 號 株	22.0	18.0	17.0	6.0
平 均	24.7	22.7	20.0	5.0

(±) ハ被檢培地ニ於テ移植集落寒天片ノ周圍ニ微ニ白濁アル者ニシテ、約 4 mm ナリシヲ以テ同數ヲ以テ平均ヲ算出セリ。

平均 24.7mm ニシテ最大、30°C ニテハ 22.7mm、25°C ニテハ 20mm、15°C ニテハ 5 mm ニシテ遙ニ劣レルモ尙ホ相當發育シ。又發育セル者ヲ 10°C 内外ノ室温ニ放置セルニ僅ニ増徑ノ傾向アリタリ。故ニ 37°C ヲ適温トナシ室温ニテモ相當發育スルモノナリ。而テ 37°C ニテハ發育ハ餘リニモ迅速ニシテ諸種ノ比較實驗ノ觀察ニハ不便ナリシヲ以テ生物學の性状ノ檢査ニハ 25°C ヲ用ヒ、免疫原性及ビ病原性研究ニノミ 37°C ヲ使用セリ。

C) 培地水素イオン濃度ノ關係 Sørensen 氏ニ從ヒ第 1 及ビ第 2 燐酸鹽ニテ 0.2 飛ビニ pH6.0 ヲリ 8.0 マデノ緩衝液ヲ作り。之ニ寒天ヲ 2% ノ割ニ溶解シ 30 分 1 回蒸氣滅菌後、家兔血清ヲ 10% ニ加ヘテ平板培地ト爲シ、前記測定法ニ依リ培地ニ於ケル水素イオン濃度ノ好適度ヲ檢シタリ。其ノ成績ハ第 5 表ノ如ク、全體ニ於テ燐酸鹽ノ存在ノ爲メカ發育稍不良ナリシモ、弱アルカリ性ノ範圍内ニテハ各 pH 共良ク發育セシム。水 L ヲリ白輪發育範圍廣ク pH7.8 ヲ以テ好適度トス。

D) 酸素張力ニ對スル關係 普通好氣性培養ニテ極メテ良ク發育スルヲ以テ、好氣性ナ



第5表 水素イオン」濃度ニヨル發育差異平板培地ニ於テ發育徑計測

培日 培養數	株名	Ph							
		6.0	6.6	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8	8.0
2日	I 號	—	—	—	5	6	10	10	9
	II 號	—	—	8	10	10	12	12	10
	III 號	—	—	—	—	±	8	10	10
	平均						10.0	10.7	9.7
3日	I 號	—	—	6	6	8	8	10	9
	II 號	—	—	10	12	12	15	16	13
	III 號	—	—	7	8	10	12	12	11
	平均			7.7	8.7	10.0	11.7	12.7	11.0
4日	I 號	—	—	16	18	18	20	28	22
	II 號	—	—	20	20	28	34	38	36
	III 號	—	—	17	18	20	21	30	26
	平均			17.7	18.7	22.0	25.0	32.0	28.0

(±)ハ移植セシ集落寒天片周圍ニ微ニ新培地ニ白濁シ來タレル者、

3株共發育セル者ノミ平均數ニ計上セリ、

リト認めラル、モ、酸素缺乏ニ對シ如何ナル關係ヲ有スルカヲ檢セリ。純培養液ヲ5%家兔血清水ニ移植シ、嫌氣培養壺内ニ内壓20mm水銀柱ニテ25°Cニ於テ4日間培養シ、開壺セルニ既ニ壺外ニ培養セラレタル對照ハ肉眼的ニ輕キ乳濁ヲ示シ盛ニ發育セルヲ認メシメタルニ、壺内ニアリシ者ハ何レモ培養液透明ニシテ、暗視野裝置ニ鏡檢セルニ僅ニ1視野2—3條ノ普通ヨリ稍細ク感ゼラル、sp體ノ輕ク運動セルヲ認メタリ。即チ水spハ水Lト同ジク好氣性ナルモ、極メテ高度ノ酸素缺乏ニ耐エテ發育スル者ナリ。

7) 溶血現象 水spハ水Lト異ナリ、平板培地ニ溶血現象ヲ認メ難シ。余ハ2%「リンゲル寒天100.0c.cニ對シ、血球ト血清トヲ1:9, 3:7, 5:5及ビ10:0ノ比ニ混合シタル者10.0c.cヲ加ヘ、從ツテ血球濃度1%, 3%, 5%及ビ10%ト爲シタル平板培地ニ2%「リンゲル寒天平板上ニ發育セル集落寒天片ヲ移植シ、種々實驗ヲ繰リ返ヘセルモ遂ニ確實ニ溶血現象ヲ見ル事能ハザリキ。

8) 血色素ニ對スル作用 水spハ水Lノ如ク還元血色素化生作用ヲ有ス。即チ血色素水道水寒天高層培地(0.5%水道水寒天+血清5%+血球2%)液柱ノ表面ニ集落寒天片ヲ移植セバ、36時間乃至48時間ニシテ2重輪ヲ發生シ、第1輪ト表面トノ間及ビ第2輪ヨリ下部試験管底マデハ赤色ナルモ、中央部第1輪ト第2輪トノ間ハ紫色ニ變化シ、恰モ赤色圓柱ガ中央紫色帶ニテ上下ニ分タレタルガ如キ觀ヲ呈ス、之ヲ分光器ニテ檢スルニ、上、下赤色部分ハ酸化血色素吸收線ナルモ、紫色部分ハ還元血色素吸收線ヲ示ス。而テ本紫色層ハ正確ニ2重輪ヲ以テ區劃圍繞セラレタル部分ニ一致ス。

半凝固培地以外ノ培地ニ於テ實驗セルニ普通氣壓下ニ培養セラレタル固形平板培地集落ニテハ本現象ヲ發生セズ。又液體培地ニ於テモ本現象ヲ認メタル事ナシ、恐クハ水 sp ノ酸化血色素還元作用ハ白輪形成ト不離ノ關係ニアリ、液體培地ニ於テ本「スピロヘータ」ハ白輪形成ヲ營マザルガ爲メナル可シ。

#### 9) 紫色層幅員及ビ深度ニ對スル溫度及ビ酸素張力ノ關係

實驗方法 其ノ詳細ハ拙著水 L 研究第 2 編ニ譲リ、要點ノミヲ記セバ、5%血清及ビ 2% 血球加 0.5% 水道水寒天 10.0c.c ヲ 18mm 口徑ノ試験管ニ注入シテ、液柱ノ高サ 52mm ト爲シ、集落寒天片移植ニ由リ發生スル 2 重輪ノ第 1 輪ハ表面ヨリ、第 2 輪ハ第 1 輪ノ部ヨリ各々其ノ間隔ヲ計測シ、第 1 輪マデノ間隔ヲ紫色層深度、第 1 及ビ第 2 輪ノ間隔ヲ紫色層幅員トシテ各々ノ成績ヲ判定セリ。

A) 溫度トノ關係 33°C 及ビ 22°C ノ兩溫度別ト爲シ紫色層深度及ビ幅員ヲ計測セルニ第 6 表ノ如キ成績ヲ得タリ。(先キニ平板培地ニ於テ 37°C、30°C 及ビ 25°C ノ 3 溫度別ニテ發育度ヲ檢シタル實驗ニ準ジ、本實驗モ 3 溫度別ニ爲ス可キ筈ナリシモ 37°C ニ於テハ往々「異性ヘモグロビン」化生ヲ營ム事アリ、爲メニ 37°C ヲ實驗外ニ措キ、可及的溫度別ハ差ヲ大ニスル

第 6 表 培養溫度差ニヨル紫色層位置及ビ幅員ノ關係

株名	溫度 培養 日數 紫色層	22°C				33°C			
		1½日		2日		1½日		2日	
		深度	幅員	深度	幅員	深度	幅員	深度	幅員
I 號		4	3	5	28	3	30	3	49
II 號		5	4	6	29	3	23	3	49
III 號		5	2	5	30	3	12	3	49
平均		4.7	3.0	5.3	29.0	3.0	21.7	3.0	49.0

爲メ 33°C 及ビ 22°C ト爲セリ)。本成績ニ依レバ sp ノ 2 重輪發生ハ既ニ 36 時間ニシテ完全ニ營マレ、2 日後ノ紫色層深度ハ 22°C ニテ平均 5.3mm、33°C ニテ平均 3mm、其ノ差 2.3mm ナリ。紫色層幅員ハ 22°C ニテ平均 29.0mm、33°C ニテ平均 49mm、其ノ差 20mm ナリ。之ト同時ニ移植シ 3 月ノ候、室温ニ放置セルモノハ約 2 週間後ニ紫色層深度平均 10mm、幅員ハ 42mm ニ發育シ居タリ。又 22°C ニテ發育セル者ヲ 24 時間室温ニ放置セルニ深度 10mm マデ下降セリ。要スルニ水 sp ノ紫色層ハ培養溫度ノ上昇ト共ニ發育良好トナリ、幅員増大シ、爲メニ其ノ上面ハ表面ニ近ク、下面ハ早ク下降スルモノナル可シ。

上記ノ關係ハ水 L ト略ガ同様ナルモ發育力ノ差ニヨル相違點アリ、即チ水 L ニテハ紫色層ノ相當發育セル者ヲ室温ニ放置スルニ、1—2 時間ニシテ第 1 輪未ダ原位置ニ留マリ居ル間ニ、上方赤色層ニ連ナリ紫色層ノ大部分酸化シ赤變センメラル、モ、水 sp ノ場合ニハ室温放置ノミニテハ斯ル現象ナク、特ニ 0°C 附近ニ放置シタル時ノミ、2 時間餘ニシテ本現象ヲ呈シ、紫色層ノ大部分上方ヨリ酸化セラレ赤色ニ變ゼリ。恐ラクハ水 sp ハ室温ニ於テモ

良ク發育シ得ルガ爲メナル可シ。如上ノ培養試験管ヲ引キ續キ 0°C 附近ニ數日間保テタルニ、白輪消失シ、I 號株及ビ II 號株ハ全部赤變シ、III 號株ノミ試験管底ニ僅ニ紫色部分ヲ殘セリ。之等ノ全部ニ尙ホ僅ニ運動セル數條ノ sp 體アルヲ認メタリ。

斯ル關係ヨリ考察スルニ、水 sp ノ酸化血色素紫變現象ハ生活機能旺盛度ニ伴フ 1 ツノ生活現象ニシテ、生活機能低下ニヨリ赤變スルハ還元セラレタル血色素ガ再ビ大氣中ノ遊離酸素ニヨリ酸化セラレ、ガ爲メナル可シ。

B) 酸素張力ニ對スル關係 前實驗ニ於ケルガ如ク紫色層深度ガ溫度ニ關係ヲ有ストセバ、又酸素張力ノ影響ヲモ免ガル、事能ハズト思考シ、嫌氣壺内ニ於テ氣壓ヲ變化シ紫色層深度ノ關係ヲ實驗セリ。其ノ培養條件ハ 5% 家兎血清 2% 血球加 0.5% 水道水寒天培地、内壓 40mm 水銀柱 25°C ニテ、3 日後ノ培養成績ヲ觀察セリ。其ノ成績ハ第 7 表ノ如ク、之ヲ普

第 7 表 紫色層嫌氣培養成績

成績 單位 mm	嫌氣壺内壓 40mm 水銀柱				普通氣壓ニ於ケル對照			
	I	II	III	平均	I	II	III	平均
紫色層深度	2	2	2	2.0	4	4	5	4.3
紫色層幅員	28	35	31	31.3	48	48	47	47.7

通氣壓下ノ對照ト比較スルニ、平均數ニ於テ減壓ノ方、紫色層表面ニ近ク深度 2 mm ニシテ、其ノ上面ハ普通壓ノ方ヨリ 2.3mm ダケ表在性(普通壓深度 4.3mm)ナリ。而テ紫色層幅員ハ減壓ノ方、發育悪ク 31.3mm ニシテ普通壓ノ者ヨリ 16.4mm ダケ小ナリ。即チ酸素張力小ナル時紫色層ノ發育不良ニシテ表在性ナリ。尙ホ本事實ヲ追證スル者トシテ次ノ實驗ヲ附加ス可シ。上記平壓培養ノ者ヲ 48 時間減壓培養(40mm 水銀柱壓)セルニ紫色層幅員ハ引キ續キ増大セルガ紫色層深度上行シテ約 3 mm ノ邊ニ止マリ。又減壓培養セル者ヲ 48 時間平壓ニ培養セルニ 5 mm 深度ニ紫色層表面下行シ、幅員ハ増加シ、紫色層下面消失シ居リタリ。

平板培地上ニ於ケル減壓培養 普通氣壓下ノ平板培地ニ於テ、決シテ集落内還元血色素成生現象ヲ見タル事ナシ。故ニ 5% 血清 2% 血球加 2% 水道水寒天ヲ厚サ約 3 mm ノ平板培地ト爲シ、之ニ他ヨリ集落寒天片ヲ移植シ内壓 300mm 水銀柱トシテ 25°C ニ於テ 4 日間培養セルニ本現象ヲ發シ、赤色平板ノ中央ニ紫色圓盤アリ白キ稍太キ輪狀縁ニテ兩者ヲ界セリ(但シ時ニヨリ輪狀縁不鮮明ニシテ辨別セラレザルコトアリ。此ノ點水 L ト稍趣ヲ異ニス)。本紫色圓盤ハ sp ノ純集落ニシテ本平板ヲ室溫(3 月 10°C 内外)ニ 2 時間放置セルニ紫色部分消失シテ全部赤變シ居リタリ。

普通氣壓下培養ノ半凝固培地ニ於ケル紫色層ノ位置ハ表面ヨリ 25°C ニテ 4 mm 以下ニ存在ス、然ルニ普通平板培地ハ厚サ 3 mm 内外ナルヲ以テ深サニ於テ紫色層發生ノ餘地ナク、且酸素ノ流通一層自由ナルニ由リ紫色圓發生ヲ見ザルモ、之ヲ減壓シテ紫色層ノ位置ヲ高ムレバ厚サ 3 mm ニテ充分ナルヲ以ツテ、初メテ本現象ヲ見ル者ナラン。

上記諸成績ニヨリ、水 sp ノ還元血色素化生作用ノ本態ヲ考フルニ、其ノ發生ニハ集落狀

發育ヲ必須トシ、溫度下降シ、 $0^{\circ}\text{C}$  附近ニ近ヅクト共ニ其ノ機能ヲ失シ、且減壓培養下ニ於テ表在性ナル等ノ點ヨリ見テ、spノ呼吸作用ノ旺盛度ト密接ナル關係ニアルモノト考ヘラル。

### 免疫學的性狀

實驗方法 1) 菌株單一法、免疫學的性狀ノ檢索ニハ總テ菌株ノ單一ナルヲ要スルハ言フ俟タザル所ナルヲ以テ、平板培地(2%水道水寒天+10%家兎血清)ニ孤立集落ヲ作り、其ノ1ヲ鈎取シ5%家兎血清水ニ移シ、發育ヲ見ルヤ直チニ(普通24時間内)再ビ全組組成平板培地ニ孤立集落ヲ作ラシメ、更ニ其ノ1ヲ鈎取シテ血清水ニ移植シ、斯ル操作ヲ3回反覆シテ、最後ニ10%家兎血清水ニ移植シ、斯クシテ菌株ヲ單一ニ爲セリト信ジ之ヲ初發株トシテ免疫學的檢索ヲ爲セリ。2) 免疫血清作製法 吉岡<sup>(21)</sup>氏肺炎菌血清作製法ニ倣ヒ、2000gr 内外ノ雄性家兎ノ耳靜脈内ニ10%家兎血清水 $37^{\circ}\text{C}$  2日間培養ノ新鮮 sp 液(以下ノ實驗使用 sp 液ハ全部之ナリ) 1.0c.c 宛ヲ毎日1回宛7日間注射シ、1週間ノ休止後同様ナル處置ヲ施シ、更ニ1週間ノ休止後同様反覆シ、合計3巡回ノ免疫處置後2週間目ニ給食ヲ斷チタル家兎ノ頸動脈ヨリ全採血ヲ行ヒ、血清分離後 $56^{\circ}\text{C}$  30分間ノ非働處置ヲ1回施シテ、防腐藥等ノ何等藥品ヲ混入スル事ナク氷室ニ保存シ、用ニ臨ミ使用セリ。

A) 凝集反應 免疫血清ハ滅菌生理的食鹽水ニテ25倍ニ稀釋シテ、夫ヲ基準ト爲シ、大體倍數遞減の稀釋ヲ行ヒ、對照ニハ同様稀釋ニヨル健康家兎非働性血清ヲ用ヒ、之等ノ0.1c.c ト水 sp 新鮮培養液 0.1c.c (特ニ Agglomeration 無キ者ヲ選ベリ) トヲ混和シ(從ツテ血清稀釋度ハ更ニ倍數トナル)、 $37^{\circ}\text{C}$  ノ孵巢ニ2時間納メタル後、約20時間室溫ニ放置シテ檢セリ。本術式ハ「レプトスピラ」凝集溶菌反應試驗術式ニ倣ヒタルモノニシテ詳細ハ拙著水L研究第3編ニ讓ル<sup>(22)</sup>。勿論反應ノ經過觀察ハ暗視野裝置下ニ鏡檢スル事ヲ要シ、反應陽性ナル場合ニハ濃厚ナル血清稀釋度ニ於テ sp ノ凝集ハ甚シキ大塊トナリ、遊離運動セル sp ヲ認メズ、從ツテ某視野ニハ全然 sp ノ片影スラモ認メザルニ、他ノ視野ニハ無數ニ、運動ヲ失シタル sp ノ纏絡凝著セル大塊ヲ見ル可シ。稀薄ナル血清稀釋ニテハ凝集塊小ニシテ運動ヲ失セル sp 體10數條纏絡凝著セルヲ認ム、成績陰性ナレバ sp ハ視野ニ平等ニ分散シ運動盛ニシテ寧ろ増殖セルヤノ感アリ。凡ソ2000倍ノ「チーテル」ニテ免疫價ノ限界ニ達シ、視野ニ1—2條ノ小凝著塊アルモ亦遊離運動セル個體アルヲ認メ(±)ト判定セリ。而シテ水Lニハ特ニ補體ヲ附加セザル非働性免疫血清中ニ於テ溶スピロヘータ」現象ヲ發スル事アリテ、上記術式ニテ檢索中全部ノ視野ニL體ノ片影スラモ認メザル事アルモ、本 sp ニハ全然斯ル現象ナシ。此ノ事實ハ水 sp トL屬ト免疫學的ニ根本的ナル相違ヲ見ル點ナリ。

余ノ水 sp 3株ヲ以テ全部ノ交錯凝集反應試驗ヲ行ヒタルニ、全部ガ「チーテル」1:1000倍迄陽性ニ反應シ、3株ノ間ニ免疫學的相違ヲ認メザリキ。凝集反應試驗成績表ハ3株共同様ナリシヲ以テ手數ヲ省略シ、1例ノミ第8表ニ例示セリ。

B) Rieckenberg 氏現象試驗

第8表 凝集反應試驗 sp I 號株家兔免疫血清

血清稀 釋度	1:50	1:100	1:200	1:500	1:1000	1:2000	1:5000
免疫原株							
I 號 株	+	+	+	+	+	±	-
II 號 株	+	+	+	+	+	±	-
III 號 株	+	+	+	+	+	±	-
健康家兔血清 ニテ I 號株ヲ 試驗セル對照	-	-	-	-	-	-	-

a) Maus ヲ使用セル實驗 Maus 3 頭ヲ 1 列トナシ其ノ腹腔内ニ新鮮 sp 液 1.0c.c 1 回注射ノ者, 1 週ノ間隔ニテ 2 回注射ノ者及ビ同様 1 週ノ間隔ニテ 4 回注射ノ者ヲ用意シ, 最終注射ヨリ 1 週間目ニ豫メ 2% 枸橼酸曹達加生理的食鹽水 0.5c.c ヲ吸引セル注射器ニテ腋窩ヨリ 0.5c.c ノ血液ヲ採リ, 良ク筒内ニテ混和シテ其ノ 1 滴ヲ載物硝子上ニ滴下シ, 更ニ之ヨリ白金耳ヲ以テ 2 倍及ビ 4 倍ノ稀釋液ヲ作製シ, 之等 3 種ノ血液稀釋列ニ sp 液 I 白金耳宛ヲ混和シ, 覆蓋硝子ニテ被ヒ「ワゼリン」ニテ閉鎖シ, 25°C 20 分放置後暗視野裝置下ニ鏡檢セルニ, 何レモ載物硝子上ニテ凝集シ 10 數條纏絡シテ充分 Maus 血液内ニ免疫物質ヲ保有スル事ヲ認メシメタルニ係ラズ, R 氏現象ニ於テハ 1—2 ノ血小板ガ帶荷セルカノ如キ状態ヲ呈シタル事アルモ, 之ヲ以テ血小板帶荷現象陽性ナリト斷定スル事能ズ, Maus ヲ使用シテ實驗セル本反應ノ成績ハ不明瞭ニ終レリ.

b) 家兔免疫血清ヲ以テセル試驗 先ニ凝集反應試驗ニ使用シ充分ナル凝集價ヲ有スル事ヲ確メタル家兔免疫血清ヲ生理的食鹽水ニテ 1 倍, 5 倍及ビ 10 倍ノ「チーテル」ニ稀釋シ, 之ニ家兔血小板(井上<sup>23</sup>氏)ヲ附加シ, 載物硝子上ニテ新鮮 sp 液トヲ混ジ, 20 分後ヨリ鏡檢セルモ遂ニ血小板ノ帶荷ヲ見ル事ヲ得ザリキ.

## 病 原 性

水ニ感染因子ヲ有シ形態本 sp ニ類似スル病原性スピロヘータ」ヲ證明セル例ハ, 今日ノ智識ニテハ存在セザル者ト見テ差支ヘナカル可ク, 從ツテ本 sp ニハ毒力アリトハ考ヘザリシモ, 檢索ノ完全ヲ期シ, 其ノ病原性ニ就キ下記諸實驗ヲ爲シタリ.

實驗方法 1) 使用動物ハ 200gr 内外ノ幼弱海猿及ビ 15gr 内外ノ Maus, 2) 使用 sp 液ハ 10% 家兔血清水中ニ 37°C, 2 日間培養セル者ナリ.

### 實 驗 成 績

1) 發病試驗 海猿ヲ各株ニ 3 頭宛ト爲シ, 新鮮 sp 液 10.0c.c 宛ヲ其ノ腹腔内ニ接種シ約 20 日間觀察シタルモ發病シタル者ナク, 皆生殘セルヲ以テ屠殺剖見セルニ何等病の所見ヲ認メタル者ナシ. 又後述ノ血液内移行試驗ノ目的ニ 200gr 内外ノ海猿腹腔内ニ新鮮 sp 液 10.0c.c 宛ヲ接種シ, 種々ノ間隔ニテ數日間採血セルニ約 10 日間内外ニシテ全部斃死セリ. 故ニ斃死ノ都度剖見セルモ病的變化ト認メラル可キ所見ヲ示サズ, 依リテ本結果ヲ以テ急性貧血ニ因

ル衰弱状態ノ動物ヲモ發病セシムル事能ハズト主張シ得可ク、全然水 sp = ハ毒力無キモノト認ム。

2) 腹腔内滯溜試験 海狸(200gr)腹腔内ニ新鮮 sp 液 5.0c.c ヲ接種シ1時間後ニ毛細管「ピペット」ニテ腹腔液ヲ採取シ暗視野装置下ニ鏡檢セルニ、sp I 號株ノミニ運動ヲ失シタル個體ヲ1視野ニ2—3條ヲ認メタルモ、他ノ2株ハ全然消失シ居リタリ。且ツI號株ハソレヨリ30分後ニハ全然腹腔液ヨリ消失シ居リタリ。此ノ成績ヲ水 L ノ成績<sup>(29)</sup>ト比較スルニ水 L 10株(腹腔内滯溜試験ニハ10株ノミ試験セリ)中3株ニ於テ1時間目ニ運動減弱シ、稍減セル者アリシモ、全然消失又ハ運動停止セル者ナク、水 sp ハ水 L ヨリ遙ニ動物體內ニ於テ抵抗力小ナル事ヲ知レリ。

3) 動物血清ニ對スル抵抗力新鮮働性健康家兎血清ノ稀釋セザル者ト、生理的食鹽水2倍稀釋ノ者トニ各同量ノ純 sp 液ヲ混ジ 37°C = 2時間放置セルニ1倍液ニ於テハ暗視野装置下ニ視野ヨリ消失シ、2倍液ニ於テハ運動活潑ナル sp 體アリ、尙ホ24時間放置セルニ1倍液中ニハ依然トシテ sp 體無ク2倍液中ニハ稍増殖セルヲ認メタリ。本成績ニ由リ水 sp ハ血清ニ對スル抵抗力極メテ弱ク  $\frac{1}{4}$  濃度ノ健康血清ニハ犯サレザルモ  $\frac{1}{2}$  濃度ノ健康血清内ニ於テハ容易ニ殺滅セラル、事ヲ知レリ。

4) 動物血液内移行試験 海狸(200gr)1頭宛ニ各株ノ新鮮 sp 液 10.0c.c 宛腹腔内ニ接種シ2—6—10—14—24時間後及ビ2—4—8日間後ノ間隔ニテ心臟ヨリ1回 = 0.2c.c 宛採血シ5%家兎血清水ニ移植シ 25°C = 約20日間培養シテ、時々鏡檢セルニ遂ニ發育シ來ラズ、之ニ因リテ水 sp = ハ全然血液内ニ移行循環スル能力無キ事ヲ知レリ。之ニ反シ水 L ノ或ル株ニハ24時間内ニ限ラレタルモ此ノ能力ヲ證明セル者アリタリ。

5) Maus 臟器内ヘノ侵入試験 水 L 株ニハ一時的ニセヨ、海狸及ビ Maus ノ臟器内ヘ侵スル能力ヲ有セル者アリ、余ハ水 sp = モ此ノ能力ナキカヲ疑ヒ、下記實驗ヲ爲セル者ニシテ、成熟 Maus ノ腹腔内ヘ各株ノ新鮮 sp 液 1.0c.c 宛ヲ接種シ(各株 = 4匹宛合計12匹ヲ要セリ)、4—10—18—24時間目ニ各株1匹宛屠殺シ行キ、其ノ肺臟、肝臟、脾臟、腎臟及ビ骨髓ノ各片ヲ5%家兎血清水中ニ投入移植シテ、25°C = 20日間培養シ、時々鏡檢セルモ遂ニ發育シ來レル者ナク、全部陰性ニ終レリ。

以上ノ諸實驗ヲ綜合スルニ水 L = ハ譬ヘ海狸ニ毒力ヲ認ムル事能ハザリシモ、暫定的ニ Maus、海狸ノ血液及ビ臟器内ヘ侵入スル能力アル者アリシガ、水 sp = ハ僅3株ダケノ實驗ナリシガ、何等スル作用ナク、動物體ニ對シ全然無力ナル事ヲ認メ得タリ。

### 結論及ビ所屬ニ對スル考察

- 1) 形態學上 Spironema-Gattung = 類別シ得可キ水スピロヘータ」3株ヲ分離セリ。
- 2) 本種ハ其ノ形態 Sp.recurrentis = 酷似ス。
- 3) sp 體ハ螺旋形ニシテ柔軟、屈撓性ニ富ミ、平均幅員  $0.4\mu$ 、長徑  $11.5\mu$  ナリ。
- 4) Giemse 氏染色法ニヨリ平等ニ帶紫色ニ染色ス。

- 5) 鞭毛, 振動膜及ビ Achsenfaden ハ染色シ得ザリシモ, Endofaden ノ如キヲ有スル個體ヲ見タルコトアリ.
- 6) 變位運動頗ル活潑ニシテ速力増加ト共ニ旋轉平坦ト成リ, 經路ハ直線的ナルモ速力緩徐トナレバ蛇行運動或ハ匍匐運動ヲ營ム. 蠕動運動ヲ認メズ.
- 7) 増殖ハ縱横兩分裂ニ由リ營マル、モノノ如シ.
- 8) 濾過性ヲ有ス.
- 9) 5%家兎血清水培養ノ發育盛ナル時微ニ乳濁色ヲ呈ス. 普通「ブイヨン」及ビ血清加「ブイヨン」中ニモ増殖シ得ルモ生存期間短シ.
- 10) 野口氏半凝固培地上ニ2重輪ヲ發生ス.
- 11) 固形寒天平板培地上(血清加水道水寒天)ニハ輕ク白濁セル集落ヲ生ジ太キ縁ヲ分化シ輪狀ニ擴大ス. 3%普通營養寒天上ニハ帶黃綠色集落ヲ發生シ鱗光ヲ放ツ.
- 12) 發育ニハ培地營養素量ノ多寡ニ影響セラル、コト少ナシ.
- 13) 37°Cヲ發育適温トス.
- 14) 培地ニ對スル注加血清適量ハ20%トス.
- 15) 培地水素イオン濃度ハ pH7.8ヲ最適トス.
- 16) 好氣性ナルモ高度ノ酸素缺乏ニ耐ヘテ僅ナガラモ發育ス.
- 17) 溶血現象不明瞭ナリ.
- 18) 還元血色素化生現象アリ, 家兎血液加半凝固培地ノ2重輪間紫變ス.
- 19) 還元血色素層ノ位置ハ培養温度好適ナル時及ビ酸素張力小ナルトキ表在性ナリ. 之ニ反スレバ深在性ナリ.
- 20) 還元血色素層幅員ハ培養温度良好ナル時及ビ酸素張力大ナル時大ニシテ, 之ニ反スレバ小ナリ.
- 21) 酸素張力小ナルトキ家兎血液加寒天平板培地上ニ於テモ集落紫變ス.
- 22) 本 sp 7家兎靜脈内ニ接種スレバ最高「チーテル」1:1000ノ凝集價ヲ有スル免疫血清ヲ得. 而テ3株共ニ凝集反應上 identisch ナリ.
- 23) 本 spニハ水Lト異ナリ補體ヲ附加セザル非働性免疫血清中ニ於テ溶スピロヘータ」現象ヲ見ズ.
- 24) Rieckenberg氏現象ハ Maus 及ビ家兎免疫血清ニ於テ證明シ得ザリキ.
- 25) Maus 及ビ海猿ニ對シ病原性ヲ認ムル事能ハズ.
- 26) 「水L」ト比較シテ共通ナル性質ハ次ノ如シ.
  - (1) 半凝固培地上ニ於ケル2重輪發生.
  - (2) 固形培地上ニ於ケル輪狀集落.
  - (3) 好氣性ニシテ且ツ極度ノ酸素缺乏ニ耐ユル性状, 及ビ(4)還元血色素化生現象等ナリ.
- 27) 「水L」ト比較シ相違セル點ハ次ノ如シ.
  - (1) 形態.
  - (2) 發育力大ナル點.
  - (3) 補體ヲ附加セザル非働性血清内ニ於ケル溶スピロヘータ」現象ナキ事.
  - (4) 血小板帶荷現象ヲ認メザル事.
  - (5) 「水L」ニ比較シ動物體ニ

對シ抵抗力小ナル點等ナリ。

28) 余ハ上記諸檢索ノ成績ヲ以テ本微生物ヲ Spirochaeta ナリト考察シ、其ノ Gattung ヲ Spirochaeta = 屬セシム可キモノト信ズ。即チ Bakterien = 屬スル Spirillen ヨリハ柔軟屈撓性アリ、類脂肪體溶解物質(膽汁酸鹽)=易溶性ナル點ヲ以テ、容易ニ區別シ得可ク、且ツ形態及ビ其ノ他ノ性質ニ於テ(余ハ野口<sup>(25)</sup>氏ノ記載ニヨリ第9表ヲ作製セリ)、Sp. recurrentis = 酷似シ、他ノ Gattung ヨリ區別シ得可シ。然レドモ Saponin = 對スル關係ニ於テ尙ホ一致セザルモノアリ、水スピロネーマト假稱シ報告セル者ナリ。

第 9 表 「スピロネーマ」及ビ分離株ノ比較  
(野口氏ニ依リ作表セリ)

Gattung	例	長さ ( $\mu$ )	幅員 ( $\mu$ )	旋ノ 轉數	長旋 轉ノ サ	兩端 ノ 狀	軸 索	胞構 窩造	Membran 暗視 野 染色 抹色	鞭 毛	分 裂	病原 性	ギザ ム氏 法	膽酸 汁鹽	サニ ボン	
Spirochaeta	再 歸 熱 スピロヘータ	8-16	0.35-0.5	5	不正規	尖 銳	多 分 十	(-)	二 重 輪 廓	辨 別 不 能	(-)	縱 橫	(+) 或 ハ (-)	紫 色 染 色	完 全 溶 解	三 十 分 解
	分 離 株	平均 11.5	平均 0.4	平均 3.5	不正規	尖 銳	染 色 セ ズ	(-)	(-)	(-)	(-)	縱 橫	(-)	紫 色 染 色	完 全 溶 解	犯 サ レ ズ

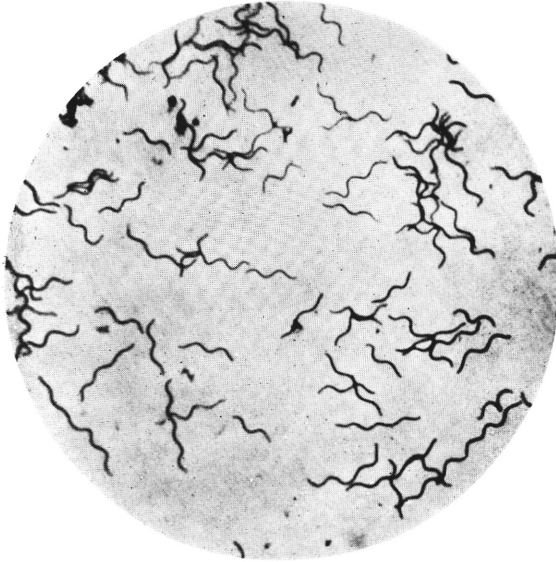
欄筆ニ臨ミ恩師谷教授ノ御懇篤ナル御指導及ビ御校閲ニ對シ滿腔ノ謝意ヲ表シ且教室員各位ノ御援助ヲ感謝ス。

文 獻

1) Ehrenberg, z. n. Handbuch von Kolle, Kraus u. Uhlenhuth. 3 Aufl. Bd. 8, S. 813. 2) Gross, ebenda. 3) Dobell, Arch. f. Prot. Bd. 26, S. 117. (1912). 4) Adelmann, Zbl. f. Bakt. Bd. 88, S. 401. (1922). 5) Vinzent, C. R. Soc. Biol. Bd. 95, S. 1472. (1922). 6) Wolbadch a. Binger, J. of med. R. Bd. 30, S. 9. (1926). 7) Hutchinson u. Clayton, z. n. Handbuch von Kolle, Kraus u. Uhlenhuth. 3 Aufl. Bd. 8, S. 813. 8) Cantacuzène, ebenda. 9) Wolbach a. Binger, J. of med. R. Bd. 30, S. 23. (1914). 10) Nägler, Zbl. f. Bakt. Bd. 50, S. 445. (1909). 11) Warming, z. n. Handbuch von Kolle, Kraus u. Uhlenhuth. 3 Aufl. Bd. 8, S. 813. 12) Zuelzer, ebenda. 13) Wolf, ebenda. 14) Zuelzer, Zbl. f. Bakt. Bd. 85, S. 154. (1921). 15) 杉本, 十全會雜誌, Bd. 40, S. 2432. (1935). 16) Hindle, Brit. m. J. V. 2, P. 57. (1925). 17) 由利, 日本微生物學會雜誌, Bd. 22, P. 1369. (1928). 18) 梶田, 十全會雜誌, Bd. 40, S. 139. (1935). 19) Zuelzer, Arch. f. Prot. Bd. 24, S. 1. (1929). 20) 加賀谷, 實驗醫學雜誌, Bd. 13, S. 626. (1929). 21) Yoshioka, Zeits. f. Hyg. Bd. 97, S. 248. (1923). 22) 杉本, 十全會雜誌, Bd. 40, S. 2627. (1935). 23) 井上, 同誌, Bd. 33, S. 119. (1928). 24) 杉本, 同誌, Bd. 40, S. 2655. (1935). 25) Nogucshi, J. of E. M. 27, P. 575. (1918).



杉本論文附圖



オスミューム蒸氣固定

ギームザ氏染色法

Zeiss, Apochromat 90 × Homal III.