

Trypanosoma gambiense の發育鶏卵培養について

長崎大学風土病研究所疫学部（主任：中林敏夫教授）

中 林 敏 夫 ・ 本 村 一 郎
なか ばやし とし お もと むら いち ろう

本論文の要旨は第18回日本寄生虫学会南日本支部大会（昭和40年11月2日，於鹿児島市）で口演発表した。

Studies on the Cultivation of *Trypanosoma gambiense* in Developing Chick Embryo

Toshio NAKABAYASHI and Ichiro MOTOMURA

Department of Epidemiology, Research Institute of Endemics, Nagasaki University
(Director : Prof. T. NAKABAYASHI)

ABSTRACT : Attempt was made of the developing chick embryo cultivation of *Trypanosoma gambiense* in order to ask whether the serial cultivation was possible and to examine any change would be produced in the virulence of parasites for mice during the period of serial cultivation.

The work was conducted with Wellcome strain of *T. gambiense* maintained by serial mouse-passage in this laboratory and fresh fertilized hen eggs.

Results achieved were summarized as follows :

- 1) Of various inoculation methods tested, allantoic method proved itself most superior, because the highest infection rate of eggs was given by this method and no complicated technic was demanded in the procedure of this method.
- 2) Ten-day-eggs demonstrated the highest susceptibility to *T. gambiense* and the infection of chick embryos inoculated with parasites resulted in death of eggs at the 7th day of infection.
- 3) *T. gambiense* inoculated into eggs appeared to invade the circulating blood of eggs, and multiply gradually until the 5th day of infection and promptly to a maximum degree up to the death of infected eggs at the 7th day.
- 4) It was demonstrated during the serial cultivation of *T. gambiense* that individual difference was appreciable in the susceptibility of eggs to parasites.
- 5) The serial cultivation of *T. gambiense* in developing chick embryos was possible for 11 generations taking 67 days. No remarkable change was recognized in the virulence of parasites for mice throughout the period of the serial cultivation.

はじめに

住血性鞭毛虫類に属するトリパノソーマ属原虫の発育鶏卵内培養に関しては、古くから多大の関心が寄せられている。したがって、それに関する報告も少なくないが、その中には Longley et al. (1939) のように、長期継代培養が可能であったとの報告もあり、他方、Rodhain et al. (1943) の如く、初代培養はできるが継代維持することはできなかったという報告もあり、いまだ統一的な見解がないのが現状ということが出来る。

また、これらの原虫は試験管内培養によって実験動物に対する感染性を喪失あるいは減弱することが知られているので、鶏卵培養によって同様の変化を来すか否かを検討することは興味あることと考えられる。

本研究では、睡眠病病原体である *Trypanosoma gambiense* の発育鶏卵培養を試み、原虫を継代維持することの可否、及びそれに伴って、原虫のマウス感染性に変化を来すかどうかの2点を主として検討した。

実験材料と実験方法

1. 実験材料

実験に使用した *Trypanosoma gambiense*, Wellcome strain (以下、*T. g.* と略す) は大阪大学微生物病研究所猪木正三教授より分与されたもので、当研究室ではマウスへの継代接種により維持してきた株である。この原虫株は腹腔内接種(接種原虫数100万個体)によってマウスを4日目に殺す毒力を保有している。

培養に用いた鶏卵は白色レグホーン新鮮受精卵である。これらの卵は、あらかじめ、微温湯で洗滌し、ガーゼでよく拭ってから38°Cの孵卵器内に納入された。通常、転卵は1日3回行った。原虫培養には10日発育卵をもっとも多く用いたが、実験目的に応じて6日乃至17日卵も使用された。

2. 原虫の接種方法

本研究では、主として尿液腔内接種法が用いられたが、接種方法の比較検討の目的で他の接種方法も採用された。それらの接種方法はすべて専門書記載の術式に準拠して行なわれたので、ここでは尿液腔内接種法についてのみ記すこととする。

検卵器で鶏胎児の生存を確認してから、尿液腔に近接した気室の辺縁部をヨードチンキと消毒用アルコール綿で十分消毒し、滅菌ピンセットの鋭利な尖端でその部に小孔をあける。つづいて、その小孔を通じて尿液腔の方向に皮下注射針を約2cm挿入し、原虫液の一定量を注入した。接種後は、直ちに加熱溶解しているパラフィンで小孔を封じ、38°Cの孵卵器内で培養

した。

3. 接種原虫浮遊液

感染マウスからの接種用原虫浮遊液の作製は次のようにした。瀕死期の感染マウスから、心臓採血によって血液を無菌的に採取し、ヘパリンを加え凝血を防止し、これに約2倍量のTyrode液を加え、1000 r.p.m. 10分間遠心沈澱する。白濁した上層部は、ほとんど原虫のみからなり、マウス血球は大部分が沈澱部に沈澱する。この白濁上層部のみを採取し、3000 r.p.m. 20分間遠心沈澱すると、原虫は沈澱に集められる。上清部を棄て、沈澱原虫部に2mlのTyrode液を加え、混和したものを原虫浮遊液の原液とした。血球計算盤を用いて、原虫数を算定し、必要濃度に調製して接種材料とした。

4. 継代培養法

T. g. 接種卵は6日後に解卵し、原虫感染の判定に供した。被検鶏卵は卵殻をヨードチンキと消毒用アルコール綿で十分消毒して後、滅菌シャーレ中に解卵し、その際に破れた血管から湧出す血液及び小注射器で採取した胎児心臓内血液を検鏡し、感染の有無及びその程度を判定した。

継代培養のためには、感染卵中の原虫を採取し、先に述べた感染マウスからの接種材料の作製法と同じ方法で原虫浮遊液を作製した。ただ、この場合には雑菌混入の機会が少なくないので、雑菌の発育防止のため、原虫浮遊液にペニシリン(明治)400u/0.2ml及びストレプトマイシン(明治)2mg/0.2mlを添加し接種材料とした。

実験成績

1. 各種の原虫接種方法の検討成績

本実験では、漿尿管上、卵黄囊内、尿液腔内、羊膜内及び静脈内接種法を比較検討した。

その成績はTable 1に見られるように、いずれの接種方法によっても感染は成立したが、尿液腔内及び漿尿管上接種の場合がもっとも高い感染率を示した。

Table 1. Comparison of the infection rate of eggs inoculated with *T. gambiense* by various methods.

Method of inoculation	Incubation days of eggs before inoculation	*No. of parasites inoculated (ml)	No. of eggs inoculated	No. of eggs infected	Infection rate, %
Supra-chorio-allantoic membrane	11	107(0.5)	5	3	60
Yolk sac	6	4×10 ⁶ (0.2)	5	2	40
Allantoic	10	4×10 ⁶ (0.2)	5	3	60
Amniotic	12	4×10 ⁶ (0.2)	5	1	20
Intravenous	12	10 ⁶ (0.05)	5	1	20

* Parasite density in the suspension for inoculation was 2×10⁴ per mm³.

他の接種法は感染率も低いうえに、操作も難かしく、また雑菌混入の機会も多い様に思われた。特に、静脈内接種法は操作が困難で、血管の破壊を伴ない、そのために出血や接種液の漏出を来し、ひいては鶏胎児の死を招く場合が多く、正確な感染率を得ることが難かしかった。かかる事実から、以後の実験では、すべて尿液腔内接種を用いることとした。

2. 鶏卵の発育日数と原虫感染との関係について

孵化鶏卵の発育日数が原虫感染に与える影響を検討

するために、孵化6日、10日及び17日卵が実験に供された。原虫接種法は尿液腔内接種である。

その成績は Table 2 に見られるように、6日卵と10日卵では共に接種卵数5個のうち3個(60%)が感染したが、17日卵では全接種卵が不感染であった。この成績から孵卵日数の多い17日卵は *T. g.* 培養に不適当であることが判明した。また、10日卵は6日卵に比較して、感染胎児の観察には好都合であったので、以後の実験にはもっぱら10日卵を使用することとした。

Table 2. Relationship between the incubation days of eggs before *T. gambiense* inoculation and the infection rate of eggs inoculated by allantoic method.

Incubation days of eggs before inoculation	*No. of parasites inoculated (ml)	No. of eggs inoculated	No. of eggs infected	Infection rate, %
6	4×10 ⁶ (0.2)	5	3	60
10	4×10 ⁶ (0.2)	5	3	60
17	4×10 ⁶ (0.2)	5	0	0

* Parasite density in the suspension for inoculation was 2×10⁴ per mm³.

3. 接種原虫数と感染との関係について

T. g. 感染マウスの血液から作製した原虫浮遊液(原液)を10倍段階稀釈法によって Tyrode 液で稀釈した。各稀釈液はそれぞれ10日卵4個に0.2mlずつ尿液腔内に接種された。接種後6日目の感染成績は Table 3 に示す通りである。

Table 3 に示した成績に関する限りにおいては、10日発育鶏卵に100%の感染率を与える原虫の最小必要数は 62×10⁴ となった。

しかしながら、Table 1, 2 の尿液腔内接種成績では、4×10⁶ 原虫でも、60%の感染率しか得られなかったこと、また、Table 3 の成績で、原液(62×10⁶)接種の場合に、感染率が75%に低下している事実が認められたことから、著者らは発育鶏卵の本原虫

Table 3. Relationship between the number of *T. gambiense* inoculated and the infection rate of eggs inoculated by allantoic method.

*No. of parasites inoculated (ml)	**No. of eggs inoculated	No. of eggs infected	Infection rate, %
62×10 ⁶ (0.2)	4	3	75
62×10 ⁵ (0.2)	4	4	100
62×10 ⁴ (0.2)	4	4	100
62×10 ³ (0.2)	4	2	50
62×10 ² (0.2)	4	0	0
62×10 ¹ (0.2)	4	0	0

* Parasite suspension was diluted with Tyrode's solution.

** Ten-day-eggs were used for inoculation.

に対する感受性には、かなりの個体差があるものではないかと考えるに至った。このことはその後の継代培養実験において、常に少数の不感染卵を検出し得たことから確認されたのである (Table 4 後述)。した

がって、この実験で得た 62×144 原虫数は必ずしも感染最小必要数として強調されるべき性質のものではないと解釈される。

Table 4. The number of uninfected eggs and the virulence of *T. gambiense* for mice demonstrated at each generation of serial chick embryo cultivation of parasites by allantoic method.

Generation number	Date of inoculation	No. of parasites inoculated (ml)	*No. of eggs inoculated	No. of eggs uninfected	No. of mice inoculated	No. of mice infected
1	June 11	$2 \times 10^6(0.2)$	9	1	3	3
2	17	$14 \times 10^6(0.2)$	7	1	3	3
3	23	$2 \times 10^6(0.2)$	8	0	3	3
4	29	$34 \times 10^6(0.2)$	10	2	3	3
5	July 5	$14 \times 10^5(0.2)$	8	1	3	3
6	11	$2 \times 10^6(0.2)$	7	1	3	3
7	17	$3 \times 10^6(0.2)$	8	0	3	3
8	23	$24 \times 10^6(0.2)$	10	1	3	3
9	29	$4 \times 10^6(0.2)$	7	1	3	3
10	Aug. 4	$92 \times 10^5(0.2)$	9	0	3	3
11	10	$28 \times 10^5(0.2)$	10	1	3	3

*Ten-day-eggs were used for inoculation.

4. 感染鶏卵中における原虫の増殖

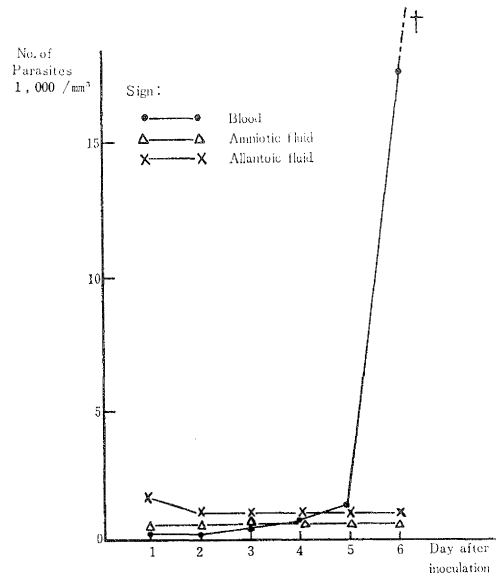
接種卵中の原虫の増殖を知るために原虫浮遊液 0.2 ml (原虫数 160万個体) を30個の10日卵に接種した。以後7日間、毎日4個ずつ解卵し、尿腔液、羊水、血液の各液体部について原虫数を算定し、さらにその平均値を求めた。接種後の日数、原虫検索部位毎の原虫数を示すと Fig. 1 となる。

この成績によれば原虫が血液中に出現するのは、接種後第3日目からで、徐々にその数を増すが、第5日目から第6日目にかけて原虫数は急増し $17,000/\text{mm}^3$ に達した。他方、羊水、尿腔液中の原虫数は接種翌日から第6日目に至る間、ほとんど増加することがなかった。これらの結果から、鶏卵胎児体内での原虫の主な増殖部位は流血中で、羊水、尿腔液での原虫増殖はきわめて乏しく、これらの部位に検出された原虫は血液中から遊出したものが主体をなすのであろうと考えられた。7日目に解卵した卵はすべて鶏胎児が死亡していたため原虫数の算定ができなかったが、これは原虫による感染死と考えるべきであろう。

5. 継代培養と鶏卵培養原虫のマウスに対する感染性

原虫接種時の機械的損傷や、細菌汚染による鶏卵の死亡及び不感染卵の生じる場合等を考慮して、毎回の継代培養には10日卵が10個内外使用された。各継代は

Fig. 1 The growth curve of *T. gambiense* in eggs



Note ; Thirty 10-day-eggs were inoculated respectively with 16×10^5 parasites on the day 0 and each 4 of the eggs were examined for counting parasite numbers each day after the inoculation. † indicates death of eggs.

6日目毎に定期的に行なわれた。本実験は鶏卵培養の継代接種を重ねることにより、*T. g.* のマウスに対する感染性、毒力が変化するか否かを検討する目的でなされたものである。

鶏卵培養の継代毎に原虫浮遊液は鶏卵接種と同時に3匹のマウスに皮下接種された。接種原虫数はTable 4に示す如く、各代数によって異なるが、鶏卵接種と同数であった。接種されたマウスはすべて3~4日後に原虫感染によって死亡した。この結果、*T. g.* は発

育鶏卵培養を11代67日間を経過しても、なお、マウスに対する毒力の低下を来さないことが判明した。

なお、この継代培養実験においては、表に記されたように、ほとんど各代毎に少数の不感染卵が検出された。このことは、先に述べた如く、もし原虫接種時に技術的不備を伴なわなかったとすれば、発育鶏卵の本原虫に対する感受性には、かなりの個体差があることを示したものと云うことができる。

考 察

Woodruff and Goodpasture (1931) によって開発された微生物の発育鶏卵培養法は、各種の微生物学研究領域に応用され、研究の進展に多大の貢献をなしつつある。病原性鞭毛虫類の発育鶏卵培養については、Biocca (1938) による *Trypanosoma brucei* の漿尿膜内接種を初めとして、Mitchell et al. (1939); *T. equiperdum*, Longley et al. (1939); *T. rhodesiense*, *T. equiperdum*, *T. evansi*, *T. hippicum*, *T. brucei*, Chabaud (1939); *T. rhodesiense*, *T. brucei*, *T. equinum*, Altire-Werber (1941); *T. equiperdum*, Van den Berghe (1941); *T. evansi*, Hood (1949); *T. equiperdum*, *T. brucei*, *T. hippicum*, Manso-Soto et al. (1950); *T. cruzi*, San Augstin (1952); *T. equiperdum*, Alawar et al. (1953); *T. evansi* 等の多くの報告がある。これらの報告は、いずれも鶏卵培養が可能であることを述べているが、これに反し、Roubaud et al. (1939); *T. cruzi*, Oag (1940); *T. brucei*, *T. congolense*, *T. equiperdum*, Biocca et al. (1942); *T. cruzi*, Rodhain et al. (1943); *T. brucei*, *T. evansi*, *T. gambiense*, *T. congolense*, Pipkin (1959); *T. cruzi* 等の継代不成功例の報告も見ることができ、必ずしも一致した見解に到達しているとは考えられないのが現状である。*T. gambiense* の発育鶏卵培養については、わずかに Rodhain et al. (1943) の報告をみるのみであって、それによると、初代培養は成功したが継代培養はできなかったということである。

睡眠病病原体である *T. gambiense* 及び *T. rhodesiense* の培養法に関しては、Laveran et Mesnil (1904) 以来多くの研究がある。これらは試験管内培養をはじめとして、発育鶏卵培養や組織培養等各種の方法を包含しているが、その研究を通じて一貫した研究課題は、この原虫が培養しえるか否かの根本問題と、もし培養しえた場合、原虫が実験動物に対する感染性

を維持しているかどうかの2点であった。

現在、実験動物の継代接種によって維持した *T. g.* 及び *T. rhodesiense* は共に試験管内培養が不可能であるとされている。他方、患者からの原虫の分離培養については、Weinman (1960) の成功例が報告されているが、これに関してさらに興味深いのは、*T. rhodesiense* の継代培養において、培地にトレハロースを添加すれば原虫の感染性の保持に有効であると記載されていることである。(Weinman 1957, 1960)

また、組織培養については、Demarchi and Nicoli (1960) 及び Fromentin (1961) 等の報告を見ることができ、両者共に組織培養は可能であったが、維持された原虫をもって実験動物を感染させることは、できなかったと述べている。

本研究で検討した発育鶏卵培養は、先に述べた培養法とは異なり、鶏胎児の感染という動物感染に類似した現象を持つ培養法なので、特に感染性維持の点では興味を持たれたのである。先に Longley et al. (1939) は *T. rhodesiense* の他に *T. equiperdum*, *T. brucei*, *T. evansi*, *T. hippicum* も併用して鶏卵培養を試み、培養期間中にこれら原虫の実験動物への感染性は喪失しなかったことを認めているが、*T. gambiense* を用いた著者らの成績においても、11代67日間の継代培養期間中に原虫はマウスに対する感染性を失うことなく、かつ、常に、マウスによる継代原虫と同程度の毒力を示した。このことから、著者らは Longley らの研究成績を確認すると共に、こんど、*T. g.* の研究室内維持及び研究には、実験動物接種のみならず発育鶏卵培養法も使用できることを知りえたのである。特に、今後、発育鶏卵培養法は本原虫の病原性の解析や組織培養への応用等広範囲に及ぶ研究に利用することができるであろう。

次に発育鶏卵への接種方法についてであるが、本研究で検討した範囲では、著者らは尿液腔内接種、10日

卵使用がもっとも妥当な接種法と考えている。既述のように、鶏卵の感染率が高いこと、手技の簡単さ、雑菌混入や機械的損傷による鶏卵の死亡が少ないこと等が尿液腔内接種法の他法より秀れた点である。しかし、この方法によってもなお、細菌の混入や卵の事故死を完全に防止することは難かしく、また少数頻度ではあるが不感染卵を生じることから、常に実験所要卵数よ

り若干多くの鶏卵を準備しなくてはならなかった。不感染卵を生じることに対しては、鶏卵の *T.g.* に対する感受性の個体差を考慮して説明を試みたが、他の要因をも考えねばならないかもしれない。こんど、孵化鶏卵への接種方法の吟味と共に検討をつづけたいと考えている。

む す び

T. gambiense の発育鶏卵培養について、その培養方法と、培養原虫のマウス感染性とを検討し、次の成績を得た。

- 1) 尿液腔内、漿尿膜上、卵黄囊内、羊膜内及び静脈内の各接種方法を比較検討し、鶏卵の感染率の高いこと、手技の簡易さ等から尿液腔内接種法がもっとも適当と考えられた。
- 2) 発育6～10日卵が、原虫培養には最適で、鶏胎児は感染死を来したが、17日卵では原虫の増殖が認められなかった。
- 3) 発育鶏卵の *T. gambiense* 感染に対する感受性には、かなりの個体差が認められた。
- 4) 接種原虫は主として鶏卵胎児の流血中で増殖する。流血中の原虫数は、接種後第3日目頃から次第に増加し、第5日目以後は急激に増加する。
- 5) *Trypanosoma gambiense* を発育鶏卵培養によって、11代67日間継代維持することができた。この期間中、原虫のマウスに対する感染性はいささかも減弱することがなかった。

文 献

- 1) Altire-Werber, E. : Cultivation of *Trypanosoma equiperdum* in the yolk sac of developing chick embryos. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 48 : 91—92, 1941.
- 2) Alwar, V. S. and Ramanujachari, G. : Observations on the behavior and transmissibility of *Trypanosoma evansi* in infected hatched-out chicks. Indian Vet. J., 29(5) : 1—5, 1953.
- 3) Biocca, E. : Studi sull'infezione sperimentale di embrioni di pollo e di polli adulti con *Trypanosoma brucei*. Annali d'Igiene, 48 : 532—547, 1938. (Cited from Pipkin's publication (1960))
- 4) Chabaud, A. : Infection de l'embryon de poule par quelques trypanosomes pathogenes. Bull. Soc. Path. Exot., 32 : 489—496, 1939. (Cited from Pipkin's publication (1960))
- 5) Dermarchi, J. and Nicoli, J. : La multiplication des agents des trypanosomiasis humaines Africaines en culture de tissues. Ann. Inst. Pasteur, 99 : 120—130, 1960. (Cited from Tobie's publication (1964))
- 6) Fromentin, H. : Entretien de *Trypanosoma gambiense* sur cultures de tissu. Bull. Soc. Path. Exot., 54 : 1046—1053, 1961. (Cited from Tobie's publication (1964))
- 7) Hood, M. N. : *Trypanosoma equiperdum*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma hippicum* infections in avian hosts. Am. J. Trop. Med., 29 : 379—387, 1949.
- 8) Laveran, A. and Mesnil, F. : Trypanosomes et trypanosomiasis. Paris, Masson, 1904.
- 9) Longley, B. J., Clausen, N. M. and Tatum, A. L. : Cultivation of various species of trypanosomes in the developing chick embryo. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 41 : 365—366, 1939.
- 10) Manso-Soto, A. E., Loretti, G. A. and Rispoli, J. A. : Cultivo de *Trypanosoma cruzi* en embrion de polo. Mission de Estudios de Patologia Regional Argentina Buenos Aires Ano., 21(78) : 23—32, 1950. (Cited from Pipkin's publication (1960))
- 11) Mitchell, C. A., Walker, R. V. L., Heath, L. M. and McKertcher, D. J. : Preliminary note on the growth of *Trypanosoma*

- equiperdum* in the developing chick embryo. Can. J. Com. Med. Vet. Sci., 3(8) : 223-224, 1939.
- 12) **Oag, R. K.** : Attempts to cultivate trypanosomes in the developing eggs. J. Path. Bacteriol., 51 : 137, 1940.
- 13) **Pipkin, A. C.** : Avian embryos and tissue culture in the study of parasitic protozoa. II. Protozoa other than Plasmodium. Exp. Parasitol., 9 : 167-203, 1960.
- 14) **Rodhain, J. and Van den Berghe, L.** : Inoculation de spirochetes et de protozoaires sur membrane C. A. poulet. Ann. Soc. Belge. med. trop., 23 : 141-155, 1943. (Cited from Pipkin's publication (1960))
- 15) **Roubaud, E. and Romana, J.** : Infection de l'embryon de poule par *Schizotrypanum cruzi*. Bull. Soc. Path. Exot., 32 : 874-875, 1939. (Cited from Pipkin's publication (1960))
- 16) **San Augstin, F.** : Cultivation of surra trypanosome (*T. evansi*) in the developing chick embryo. Philippine J. Animal Ind., 13(1/4) : 25-32, 1952.
- 17) **Tobie, E. J.** : Cultivation of Mammalian trypanosomes. J. Protozool., 11(3) : 418-423, 1964.
- 18) **Van den Berghe, L.** : Trypanosomose d'un poussin eclos apres inoculation chorio-allantoidienne. Ann. Soc. Belge. med. trop. 23(2) : 113-139, 1943. (Cited from Pipkin's publication (1960))
- 19) **Weinman, D.** : Cultivation of the African sleeping sickness trypanosomes from the blood and cerebro-spinal fluid of patients and suspects. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 54 : 180-190, 1960.
- 20) **Weinman, D.** : Infection of mice with two cultures of *Trypanosoma rhodesiense* maintained in a medium of trehalose. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 51 : 560-561, 1957.
- 21) **Weinman, D.** : Trehalose metabolism of trypanosomes. Nature, 186 : 166, 1960.
- 22) **Woodruff, A. M. and Goodpasture, E. W.** : The susceptibility of the chorio-allantoic membrane of chick embryos to infection with fowl pox virus. Am. J. Path., 7 : 209-221, 1931.