

## Leishman-Donovan 小體の培養と Leptomonas 型より同小體への試験管内移行實驗

大月 明

(京都帝國大學醫學部微生物學教室 主任 木村廉教授)

Kala-Azarの病原體 *Leishmania donovani* は、生體組織内では *Leishman-Donovan* 小體として存在するが、これを培養すれば鞭毛型となることは、Rogers (1904) の實驗以來我々のよく知るところである。

この鞭毛型は、形態が *Leptomonas* に一致するから屢々 **Leptomonas 型** とも呼ばれ、これに對して *Leishman-Donovan* 小體は、*Leishmania* が獨立した屬として承認せられてから **Leishmania 型** とも呼び慣はされてゐる。

Rogers (1904) の實驗後にも、本原蟲の培養に関する考案は相ついで報告せられ、今日までに記載せられた培養基は 10 數種に達してゐるが、<sup>1)</sup> それらのいづれも、培養型は *Leptomonas* 型を呈すると云ふ基礎事實の上では Rogers の實驗を一步も出ず、それと全く軌を一にする。

ここに於て培養型と云へば *Leptomonas* 型を意味する通念が生じ、*Leishmania* 型は生體組織内でのみ存在するものと看做されて今日に及んだのである<sup>2)</sup>。それではこの通念の域を脱して *Leishmania* 型の培養はできないものだらうか？

この問題に就て今日まで實驗がなされてゐない。

また一方 *Leishmania* 型が *Leptomonas* 型へ移行することは、上に

1) Nicolle (1908), Nöller (1917), Wenyon (1921), Pedroso (1923), Kligler und Noguchi (1924), Kligler (1924), 田邊(大正11), Noguchi und Lindenberg (1925), 春日(大正14), Salle(1931), Anderson (1932), 孟(昭和10), Bianchi (1936), Archetti (1938), Zambrano(1939), 久保(昭和16) 田村(昭和16)等。

2) 本原蟲は生體內でも或種の昆蟲の消化管腔液内では *Leptomonas* 型を呈するが、これは組織内にあるのではなく一種の培養液内にあるも同然と看做すを妥當とする。

述べたやうに、我々のよく知るところであるが、逆に一度培養によつて *Leptomonas* 型に變つたものを試験管内で再び *Leishmania* 型へ戻すことができないものだらうか？

この問題に就ても我々は充分な智見を持たない。

上にあげた2問題に關してつぎのやうな着想の下で實驗を行つた。

すなはち本原蟲は生體組織内では *Leishmania* 型として存するのであるから、適當な動物臟器を選んで組織培養法を講ずるならば *Leishmania* 型の培養は可能であらうし、また *Leptomonas* 型を動物に接種すれば感染が起り得るのであるから<sup>3)</sup>、*Leptomonas* 型を動物臟器片に接種して培養すれば *Leishmania* 型に戻りはしないだらうかと思つたのである。

そこで第一に問題となるのは、組織片として何を選ぶべきかであるが家兎辜丸が特殊親和性臟器として本原蟲に對してもまた感受性を有することを確認してゐるので<sup>4)</sup>、とりあへず家兎辜丸組織を用ひることとした。つぎに培養法に就ては一般に行はれる組織培養法、Li-Rivers法<sup>5)</sup>、Zinsser法<sup>6)</sup>等がいづれも用ひ得るかの如く考へられたが、豫備實驗の結果、一般の組織培養法や Li-Riverss 法のやうに液狀層の存在する場合には、液狀層内での *Leptomonas* 型の發育を免れ得ないから、たとへ培養組織内では *Leishmania* 型の増殖のみが起つてゐても、實際上は兩者が混同してくることを知つた。かやうな理由から Zinsser の寒天斜面組織培養法によることとした。

實驗は、(1) 辜丸内接種を行つて一定の日數を經過した感染家兎辜丸組織をそのまま培養して *Leishmania* 型原蟲の増殖の模様を檢査し、(2) 健全家兎辜丸組織に *Leishmania* 型原蟲を接種して培養を行ひ、(3) *Leptomonas* 型原蟲を健全家兎辜丸組織に接種して培養した場合に

3) *Leptomonas* 型の感染能に就ては様々な實驗成績が報告せられてゐるが、ある條件の下では感染能を有する (大月及び南保：末刊)。

4) Chu, H. J. and Zia, S. H.: *Leishmania* infection of hamsters and rabbits by the intratesticular route. *Chinese Med. J.*, 58: 677, 1940.

大月及び南保：末刊。

5) Li, C. P. and Rivers, T. M.: Cultivation of vaccine virus. *J. of Exp. Med.*, 52: 465, 1930.

6) Zinsser, H., Fitzpatrick, F. and Wei, H.: A study of *Rickettsiae* grown on agar tissue cultures. *J. of Exp. Med.*, 69: 179, 1939.

## Leishmania 型に戻るかどうかをしらべた。

**實驗 1.** (a) 處方にならつて Zinsser の寒天斜面を製する。たゞしこの實驗では Phenolrot をはぶき、またあとの操作の便宜上寒天含有量を増量して 2% 弱になるやうにした。斜面上に凝固後直立して 2-3 日間放置し凝水が充分溢出するのを待ち、これを全く除いて使用に供する。培養する組織片は睾丸内接種により局所感染を惹き起した家兎睾丸を、接種後 4 週間後に無菌的に剔出し、鋏で細切して小組織片としたものである。これをそのまま、Zinsser の斜面の下部 2/3 の部分にバラバラと撒き、綿栓を施した上でゴム帽を被せて氣密となし水分の逸散を防いで 2 週間培養する。培養温度は 25°C と 27°C とに 2 別する。

(b) 培養後 1 週及び 2 週目に培養組織片をとり出し、注意して塗抹標本を作り、酒精固定、Giemsa 染色を施して鏡檢すると、培養前、すなはち睾丸内接種後 4 週の睾丸切面直接塗抹標本では 1 視野 1-2 個平均に平等に散在してゐた原蟲が、培養 1 週後には 1 視野平均 10 個内外に増殖し、2 週後には 1 視野平均 20-30 個(視野に於ける分布は平等ではなく多少局限性増殖の傾向はあるが)に増殖してゐるのを認めた。原蟲はすべて典型的な Leishmania 型であつて、染色性も良好である。またある視野では分裂像が明瞭に現れてゐる。以上のやうな所見は明かに培養後の増殖を物語るものと云へる。この Leishmania 型原蟲の生死を確めるために、培養組織片を磨り碎いて N. N. N. 培養基に植ゑ 25°C で培養すると Leptomonas 型の増殖を來すから、原蟲は確かに生きてゐることがわかる。

培養温度は 25°C, 37°C のどちらでも Leishmania 型の増殖を來すが、37°C の方が増殖程度は稍々優勢である。

**實驗 2** 上の實驗から感染睾丸組織を培養すれば、組織内で Leishmania 型原蟲が増殖することを知つた。そこで感染睾丸の代りに健常睾丸を用ひ、これに Leishmania 型原蟲を接種して培養を試みた。すなはち、睾丸内接種後 4 週の家兎睾丸を細挫摩碎して濃厚な乳劑をつくり、健常家兎睾丸組織片をこれに浸した上で實驗 1 と同じやうに Zinsser の斜面上に培養した。乳劑中の原蟲数は稀薄であつて直接塗抹標本では 2 視野に平均 1-2 個が散在する程度であつたが、培養 1 週後には 1 視野 5 個内外となり 2 週後にはやはり 1 視野 20-30 個に達した。これで健常家兎睾丸によつても Leishmania 型の培養ができることがわかる。

**實驗 3** Leptomonas 型から Leishmania 型への試験管内移行を試みた。透明培地<sup>7)</sup>に 1 週間培養した Leptomonas 型原蟲を遠心沈澱して集め 1 回洗滌した上で沈渣に Tyrode 液を加へて濃厚な原蟲浮游液をつくる。供試蟲株は Leptomonas

7) 大月及び南保: 組成は (I) 0.6% 食鹽水 3 容 + Bouillon 1 容, (II) 家兎脱纖維素血液 5 容 + 蒸溜水 2 容の遠心上澄, (I) 3 容 + (II) 1 容。

型累代培養期間の長短によつて *Leptomonas* 型から *Leishmania* 型への復歸性に難易の差が生ずるかどうかをしらべるために、(1) 累代培養約 6 年に亙る古い蟲株、(2) 累代培養約 2 年の蟲株、(3) 累代培養 3 代 7 週間の新しい蟲株の 3 株を用ひた。原蟲浮游液に實驗 2 と同様の操作で健常家兎辜丸組織片を浸した後 Zinsser の斜面上に培養する。

この浮游液は暗視野で鏡檢すると無数の活潑に運動する原蟲を含んでゐるから、組織片にも多数の原蟲が附着した管である。培養 1 週及び 2 週後に培養組織片をとり出して検査すると、兩回ともに全視野に無数の *Leishmania* 型が恰も純培養

實驗の通覽表。

培養組織	接種材料	培養前の所見	Leishmania 型の増殖				
			種別	25°C		37°C	
				1 週	2 週	1 週	2 週
1. 感染辜丸		1-2	a	10	20-30		
			b			10	30
2. 健常辜丸	感染辜丸乳劑 ( <i>Leishmania</i> 型)	1	a	5	20		
			b			5-10	20-30
3. 健常辜丸	培養原蟲浮游液 ( <i>Leptomonas</i> 型)	∞	a	∞	∞		
			b			∞	∞

數字は塗抹標本または暗視野に於ける 1 視野中の原蟲數を示す。

の像で認められ、これを N. N. N 培養基に移して培養すると再び *Leptomonas* 型の増殖を來した。この模様は供試 3 蟲株とも同様であつてその間に差を認めない。従つて累代培養期間の長短は *Leishmania* 型への復歸性に影響しないと云へる。

以上の實驗の要領と成績とをまとめて畧示すると表の如くなる。

すでに明かであるやうに、家兎辜丸組織を用ひ Zinsser 法で培養すると *Leishmania* 型の培養ができることを知つた。そこで培養型すなはち *Leptomonas* 型なる從來の通念は改められなければならない。また試験管内でも *Leptomonas* 型を *Leishmania* 型へ戻すことができるのを認めた。

[詳細は日本微生物學雜誌に發表する]

(受附：昭和 17 年 4 月 30 日)