

黄熱の病因 — VI. *Leptospira icteroides* の培養, 形態, 毒性, および生物学的特性

Etiology of yellow fever - VI. Cultivation, morphology, virulence, and biological properties of Leptospira icteroides

Noguchi H*. *J Experiment Med.* 30:13-29,1919

培養

黄熱病原体の特性は未知であることから, 実験を開始するにあたってまず特別な培養方法を確立することが必要であった. この方法は *Leptospira icterohaemorrhagiae* の培養法として推奨されている方法 (Inada and Ido¹)[1] に類似するものである. 培養実験の初期には, ウサギその他の動物の血清やクエン酸加血漿の代わりに非免疫ヒト血清, 血漿を使用した. 主な培地は血清, リンゲル液 1:3 の混合物で, 液体培地および中性寒天 (0.3%) を溶かして加えた半固形培地を組み合わせ, スピロヘータ培養に使用するような細長い培養試験管に, 液体部分の半分 (8cc) を半固形部分の半分 (8cc) の上に流し込む [2].

培養の第一段階は, 患者の尺側皮静脈から採血したクエン酸加血液 0.5~1cc を, 培地の下部すなわち半固形部分がまだ液体の状態 (42°C) で混合し, 冷却して固形化する.

この半固形部分の上にリンゲル液稀釈血清を注ぎ, 同じ血液の 0.5~1cc をさらに追加する. 最後にパラフィン油層で培地の表面を覆う.

患者のクエン酸加血液で培養する場合, その血漿には疎なフィブリンを形成するのに十分な量の血漿が含まれているため, 培地の液体部分にヒトクエン酸加血漿は加えない.

しかし, その後の二次培養では, ヒトあるいはウサギのクエン酸加血漿 0.5~1cc を, 接種後の液体部分に追加する.

培地の疎なフィブリン網の存在は, ある種の微生物の増殖を助長するように思われる. このような培養条件では, 要求酸素分圧が異なる様々な微生物の増殖が可能となる.

後期には, 2 ないし 3 個の大きなフラスコ (50cc) に

これに応じた大量の培地 (25cc) を入れ, クエン酸加血液 2-3cc を使用した.

黄熱患者からの直接培養

11 例の黄熱患者から培養し, レプトスピラの分離に成功したのは 3 例のみであった. 最初の例 (症例 1) では, 暗視野鏡検では微生物を検出できなかった, 3 日後 (26°C) に, 少数の活動性レプトスピラが認められた. これを 4 匹のモルモットに接種したところ, 全例が典型的な実験感染症により死亡した. 1 匹には, 鼻出血, 黒色便, 高度黄疸, 肝の高度変性, 急性実質性腎炎, 肺, 胃, 腸の斑状出血が認められた [3]. この培養は, まもなく二次性真菌汚染により失われたが, これは研究環境の条件下では避けることが難しい状況であった.

2 例目の成功例は, 症例 4 の第 3 病日の血液から得られた. 5 日間 30°C の培養で微生物が検出された. 染色標本を慎重に鏡検すると少数のレプトスピラが血中に確認され, これをモルモットに接種すると, 8 日目に典型的な症状が現れ, 培養物がモルモットに病原性を示すことが証明された.

黄熱患者からの直接培養の成功第 3 例は, 死亡例 (症例 6) の血液から得たものである. 第 5 病日に採血した血液を, ただちに培地を入れた試験管 6 本に加えた (1918 年 10 月 19 日). 10 月 26 日, そのうちの 1 本に暗視野鏡検下にレプトスピラの存在が認められた. その培養物は, モルモット, 幼若モルモット, マーモセットに典型的な症状, 病変を来たすことが証明された.

実験動物からの培養

*Leptospira icteroides*² の培養法は, ヒト由来ではなく正常ウサギ血清とクエン酸加血漿を使用する以外は, ヒト血液からの直接培養法についての記述と同様である. 第一世代については必ずしも成功しなかったが, それでも試みた様々な方法の中で最も信頼性の高い方法であった. 後継世代では, クエン酸加血漿の添加は必須ではないが, 添加することにより増殖が改善される.

Leptospira icteroides 6 株 (症例 1~6) が, 現在にいたるまでモルモットで継代されている. 症例 2, 3, 5 の血液からは直接培養は得られなかったが, 最終的に継代株を接種したモルモットあるいはマーモセットから得ることができた. 患者からの直接培養, 動物への接種による間接培養, いずれにおいてもその性状は同じで, 数ヶ月にわたって培養できた. 黄熱症例から得られた

* ロックフェラー医学研究所 (The Laboratories of The Rockefeller Institute for Medical Research)

¹ 訳注: 九州帝国大学内科学教授 稲田龍吉 (いなだりょうきち, 1874-1950) と同助手の井戸泰 (いど ゆたか, 1881-1919) は, 1915 年に「ワイル病病原スピロヘータの発見」を国内で報告, 翌 1916 年に英文論文を発表し, この新しい病原微生物を *spirocheta icterohaemorrhagiae* とした (現在の *Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae* に相当) .

² 訳注: 本稿の最後で, 著者はこの黄熱の原因と考えられる病原体を *Leptospira icteroides* と命名している.

レプトスピラは、他の外来微生物の侵襲に著しく敏感で、培地に僅かな汚染があって生存できない。黄熱患者からの直接培養が得られなかった症例は、すべてこの二次汚染により説明しうる。

高度黄疸のため瀕死状態にあるモルモットの循環血中からレプトスピラを検出できることは稀であり、正常モルモットへの移入は不確実である。この血液による培養は、通常無菌状態であり、レプトスピラは肝、腎には検出されない。一方、実験的な感染性黄疸では、レプトスピラが検出されるのはほとんどの場合感染後期であった。動物への接種不成功、ならびに多くの黄熱症例で顕微鏡的に検出されないことは、黄熱レプトスピラの著しい脆弱性によるものと思われる。

形態学

グアヤキル (Guayaquil) の黄熱患者の血液や組織、および黄熱患者の血液や組織を実験的に感染させた動物の血液、組織に見られるこの微生物は、長さ約 4~9 μ 、中央部の幅 0.2 μ の非常に細い糸状体である。両端に向けて細くなり、その先は計測できないほど細い鋭端となる。糸状体は全体に平滑ではなく、短い一定の間隔で細く巻かれており、その各部分の長さは約 0.25 μ である。巻かれた部分は、連続する部分が 90° の角度で交互に向きを変えてジグザグ線を形成するように配置されている。

この微生物は、透過光では認識できないが、適切な暗視野照明の下では良く見えるようになる。活発な運動性を持ち、振動、回転、長軸方向の移動を示し、時に糸状体の一部にねじれが見られる。半固形物質に出会うと、穿孔運動によって半固形物質を貫通し、その通過時は蛇行の少ない蛇のような様相を呈し、基本的な巻き構造には変化がない。

この微生物は、半固形物質内では進行方向を変えながら、ほとんどあらゆる角度に著しい柔軟性を示す。液体内では、その動きは少なく、極めて特徴的である。通常、一端は滑らかな鉤状に曲がっており、直線状の先端を前にして急速に回転しながら進み、鉤状の先端は後部プロペラの役割を果たしているように見える。しかし、もつれた状態から脱出する際には、同じ鉤状の先端が飛行機の前部プロペラとして働くように見える。両端とも鉤状のものも多く、一方の鉤が他方より大きくプロペラとして強力でない場合は、生物は静止した状態で回転している。急速な回転により、微細な点が連鎖しているように見える。動的な観点から見ると、両端の何回か巻いている部分が、この微生物の運動器である。液体中では、中央部分で二重になった標本は見たことがない。運動性の末端部分は、スピロネーマやトレポネーマに見られる鞭毛や末端フィラメントに相当するものと考えられる。

この微生物は、通常のアニン色素では染色が難しいが、オスミウム酸固定とロマンフスキー染色の一種（ギムザ、ライト、ライシュマン）により明瞭となる。5% タンニン、1% フェノールで媒染後、フォンタナ染色あるいは石炭酸ゲンチアナバイオレット溶液で染色すると、あきらかな陥凹を伴わない、中等度に濃染する軽度波状の糸状体が認められる。C字型、S字型の形態が特徴的である。メチルアルコール固定標本では、このような基本的ならせん構造を見ることは稀である。暗視野照明で見られるような美しさは、たとえ最良の標本であっても染色標本では失われ、染色標本ではまったく別の生物のように見える。

以上の所見から、本菌がいわゆるスピロヘータと呼ばれる一般的な目に属することは明らかであるが、厳密な意味では細菌、スピロヘータ、スピロネーマ、トレポネーマのいずれでもなく、レプトスピラ属に属し、そのうち *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira hebdomadis*[5], *Leptospira biflexa* は既に記載されている[1]。

グアヤキルの黄熱患者から得た *Leptospira icteroides* 菌株を調べたところ、図 1~9 から容易にわかるように、手元にある *Leptospira icterohaemorrhagiae* の様々な菌株 (6 株) よりもやや小型である。この差異は両者の図を比較すると明らかで、特に *Leptospira icteroides* の第 6 株は他のどの菌株よりもかなり小さい。

グアヤキルの野生ラットから分離した *Leptospira icterohaemorrhagiae* を別に示す (図 10~13)。これらは図 5~9 に示す他の *Leptospira icterohaemorrhagiae* 株に類似しており、黄熱症例からの微生物にくらべて粗大である。

これら 3 葉の写真は、比較のために用意したもので、同一条件、同一拡大率である。

培養の性状

Leptospira icteroides は、酸素のない培地では増殖しない。高濃度の固形培地では、微量の酸素が透過する領域内あるいは層内ではよく増殖するが、それ以上の深さでは増殖しない。培地の表面に液体パラフィンを薄く塗布し、酸素の供給が過剰でない場合に最もよく増殖する。増殖には一定量 (10% 以上) の適当な血清が不可欠である。ペプトン、肉エキス、種々の炭水化物、あるいはこれらの組み合わせなど様々な細菌培養物質は不適で、血清含有培地中におけるこれらの存在は、増殖に対して発育に有利にも不利にも作用しない。培地中の塩化ナトリウムの比率は、2% という高濃度まで試したが、ほとんど影響を及ぼさないように見え、等張食塩水、リンゲル液、蒸留水などを稀釈液として使用できる。この菌は培地の性状に非常に敏感で、リトマス紙で微アルカリ性、0.025N 以下で最適な増殖が

得られる。中性の培地ではよく増殖するが、リトマス紙で酸性反応を示す培地では増殖しない。

フェノールレッド 0.0025% 溶液を培地 10cc に対して 1cc の割合で添加しても、*Leptospira icteroides* の増殖阻害効果は認められない。増殖は、フェノールレッドが pH6 から pH7.4 を示す試験管内で起こる。ウサギ血清を含む培養液の場合、フェノールレッドは徐々に脱色して微かなピンク色になる。

増殖は、25～26℃に比べて 37℃ではるかに速いが、前者でより長期に生存する。42℃以上、10℃以下では増殖しない。

培養液中に存在する赤血球は、増殖により特別な変化を受けず、ヘモグロビンも変化しない。血清蛋白質も全く変化せず、透明なままである。密に増殖した古い培養液において固形あるいは半固形培地の表面に灰色に曇った薄層が形成される以外、培養液の外的な変化は観察されない。

Leptospira icteroides は、寒天 (0.3%)、疎なフィブリンなど半固形培地を特に好むことが見いだされた。多数の菌は互いに交絡して、非常に活発に運動する。この種の培地では増殖が持続して、数週間後には培地の最上層が薄い灰色を帯びるほど密に増殖する。肝、腎のような実質性臓器に好んで寄生するのは、このような特性が一因と思われる。

Leptospira icteroides は、横分裂で増殖する。

毒性

Leptospira icteroides の様々な動物に対する病原性については、まだ十分に研究されていないが、ロバ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ネコなど多くの家畜が、この菌の注射にまったく不応であることが示されている。6、7 週以下の幼犬は、実験的感染で死亡した。これまで実験した鳥類で感受性を示したものはない。哺乳類ではモルモットが最も感受性が高く、マーモセットはやや低い。このため、*Leptospira icteroides* の様々な系統の病原性の研究にはモルモットを採用した。

接種方法は、2～3 週の培養液を段階的に腹腔内注射した。使用したモルモットは 300～350g であった。0.15% 寒天を加えた半固形ウサギ血清培地で培養した 2～3 週の培養液 (26℃) には、50～100 個 / 視野のレプトスピラが含まれている (Leitz 1/12 油浸レンズ、接眼レンズ 4)。異なる菌株の病原性を正確に判定するためには、同等の濃度で使用する必要がある。しかし、多数の個体が交絡したり、培養液の粒子の周囲に様々な個体数が集中する傾向を示す微生物の場合、これは極めて困難である。今回の一連の実験では、異なる菌株の培養液の乳濁液がそれぞれのほぼ同数の微生物を含むようにし、そこから高希釈度の液を調製した。各

菌株を連続的に 10 倍希釈し、モルモット 1～2 匹に各希釈液を 1cc ずつ接種した。モルモットの抵抗性には個体差があるため、後の実験ではすべて、各希釈度につき 2 匹ずつ使用した。

4 株の *Leptospira icteroides* をこの方法で検討した。結果は以下のプロトコルで記録した。

実験 1. 1918 年 8 月 10 日 (グアヤキル黄熱病院)。菌株 1. 第 2 世代培養 18 日。半固形ヒト血清寒天培地、30℃ (表 I)

実験 2. 1918 年 12 月 2 日。菌株 3. 第 3 世代培養 20 日。半固形ウサギ血清寒天培地、16℃ (表 II)

実験 3. 1919 年 1 月 2 日。菌株 5. 第 3 世代培養 3 週。黄熱死亡患者の血液接種後に典型的な感染症で死亡したモルモットの内臓乳濁液を使って実験的に感染させたマーモセットから分離。菌株 6 と同じ培地で増殖。26℃ (表 III)。

実験 4. 1919 年 1 月 2 日。菌株 6. 第 3 世代培養 20 日。ヒト血液から直接 (モルモットを経由せずに) 採取、半固形ウサギ血清寒天で増殖、26℃。もとの乳濁液には 25 株 / 視野の菌が認められた (表 IV)。

以上の実験から、*Leptospira icteroides* の菌株が、モルモットに対して全般に強い病原性を有することが示された。最小致死量は 2 例 (菌株 1, 6) で 0.00001cc、1 例 (菌株 5) で 0.0001cc、他の 1 例 (菌株 3) で 0.001cc であった。菌株 1, 3 の実験では、1cc あるいは 0.1cc という大量投与したモルモットの一部が一過性の発熱反応を示したただですぐに正常に復したが、一方でこの量の 0.0001 倍で死亡したモルモットもある。これは決して例外的なことではなく、より高い希釈率では、少量で致死的な感染を引き起こす一方で、多量では引き起こさない場合がある。致死的な例においても、感染の重症度と投与した培養液の量は平行しない。すなわち、モルモットの感受性は個体によってかなり異なるといえる。未報告であるが、別の一連の実験では、ある種のモルモットが *Leptospira icteroides* に対してほぼ完全な自然免疫を持つことがわかっている。このことは、ヒトからモルモットへの感染の成功率を考える上で重要な要因である。

培養による毒性の漸減

Leptospira icteroides の全菌株は、半固形ウサギ血清寒天培地上でグアヤキルからニューヨークに無事持ち込まれた。培地は移動中、常温に保たれた (熱帯地方では約 28℃、米国到着後は 15℃)。1918 年 10 月 26 日にグアヤキルで更新され、1918 年 12 月 2 日にニューヨークでモルモットに対する病原性を試験した。第 1, 3, 4, 5, 6 菌株をモルモットの腹腔内に 1cc ずつ接種し、これらの株による特徴的な通常の症状や病変が認められ、この状態で 37 日間毒性が持続した。

1918 年 12 月 9 日、培養から 4 ヶ月以上経過した古

表Ⅰ . *Leptospira icteroides* 菌株 1 の病原性試験

モルモット	培養量 (cc)	培養期間あるいは接種から発熱までの期間 (日)	結果
1	1	3	7 日後に死亡
2	0.1	4	生存. 黄疸なし
3	0.01	5	9 日後に死亡
4	0.001	3 1/2	8 日後に死亡
5	0.0001	4	9 日後に死亡
6	0.00001	5	10 日後に死亡
7	0.000001	発熱なし	生存

表Ⅱ . *Leptospira icteroides* 菌株 3 の病原性試験

モルモット	培養量 (cc)	培養期間あるいは接種から発熱までの期間 (日)	結果
1	1	3 1/2	8 日後に死亡
2	1	5	生存
3	0.1	4	9 日後に死亡
4	0.1	5	8 1/2 日後に死亡
5	0.01	5	生存
6	0.01	5 1/2	11 日後に死亡
7	0.001	4	9 日後に死亡
8	0.001	5	生存
9	0.0001	5	生存
10	0.0001	発熱なし	生存
11	0.00001	7	生存
12	0.00001	発熱なし	生存
13	0.000001	発熱なし	生存

い菌株 1 と 3 の一部を試験したところ、程度は様々であった。菌株 1 は依然として強毒性であったが、菌株 3 は致死的な感染を起こすには至らなかった。しかしその後の実験では、6 匹のモルモットの腹腔内にそれぞれ 2cc の培養液を接種したところ、うち 1 匹に致死感染を来した。このモルモットによって、培地の毒性は再び元のレベルまで上昇し、再び少量の培養液でモルモットに典型的な感染を引き起こすことができるようになった。

強度が減弱した菌株の接種により死亡または重篤な感染を免れたモルモットを、接種から約 14 日後に殺して内臓、特に肺を調べると、通常、肺に様々な程度の陈旧性出血が認められた。黄熱患者の血液を数匹のモルモットに接種し、10 日から 14 日目に肺を検索することは、感染の結果を確認するために有用な方法と思われる。こうすれば、外見的に明らかな症状がなくとも、接種の結果をより正確に追跡できる。残念ながら、当時はこの事実が知られておらず、この判断を致死的な感染症の発症に依存していた。

過去 4 ヶ月間、培地には、ウサギやヒツジの血清よりも安価で大量に入手可能なウマ血清を使用してきた。

表Ⅲ . *Leptospira icteroides* 菌株 5 の病原性試験

モルモット	培養量 (cc)	培養期間あるいは接種から発熱までの期間 (日)	結果
1	1	3	7 日後に死亡
2	0.1	3	8 日後に死亡
3	0.1	2 1/2	6 日後に死亡
4	0.01	3 1/2	7 日後に死亡
5	0.01	4 1/2	9 日後に死亡
6	0.001	5	10 日後に死亡
7	0.001	3 1/2	8 日後に死亡
8	0.0001	5	10 日後に死亡
9	0.0001	5	9 日後に死亡
10	0.00001	6	生存
11	0.00001	発熱なし	生存
12	0.000001	発熱なし	生存
13	0.000001	発熱なし	生存

表Ⅳ . *Leptospira icteroides* 菌株 6 の病原性試験

モルモット	培養量 (cc)	培養期間あるいは接種から発熱までの期間 (日)	結果
1	1	4	7 日後に死亡
2	0.1	3	10 日後に死亡
3	0.1	3 1/2	6 日後に死亡
4	0.01	4	8 日後に死亡
5	0.01	5(?)	7 日後に死亡
6	0.001	3	9 1/2 日後に死亡
7	0.001	5	10 日後に死亡
8	0.0001	4	10 日後に死亡
9	0.0001	疑問あり	生存
10	0.00001	3	8 日後に死亡
11	0.00001	6	生存
12	0.000001	4	生存
13	0.000001	発熱なし	生存

しかしこれは、*Leptospira icteroides* の培養には、ウサギ血清よりはるかに劣るヒツジ血清よりも更に劣る。最近、レプトスピラ菌のさまざまな菌株の病原性を試験したところ、病原性が急速に失われていることが判明した。ウサギ血清培地で培養したものは病原性が保たれ、ヒツジまたはウマ血清培地では急速に病原性が低下することがわかった。ウサギ血清とフェノールレッドを含む培地で菌株の発育の経過を観察したところ、試薬の元のピンク色は徐々に薄くなり、やがてほとんど消失する。リン酸二ナトリウムを加えると、より濃い色に戻ることもあるが、元のレベルに達することはない。培地にも指示薬と同様に、菌の増殖による変化が発生していると思われる。ヒツジやウマの血清を含む培地で培養した場合には、このような変化は観察されなかった。ウサギ血清を含む培地における菌の病原性の持続が、前述の現象と何らかの関係があるのか、それとも無関係な偶然の現象なのかは不明である。

抵抗性と活動性

Leptospira icteroides は、芽胞を作らず、熱、乾燥、腐敗、消毒薬にはほとんど抵抗性がない。

55℃ 10 分の加熱、凍結解凍により死滅し、完全に乾燥させると直ちにその活性を失う。

様々な細菌 (*Bacillus coli*, *Bacillus aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus pyocyaneus*, *Pneumococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus haemolyticus* など) の存在下では、短時間で破壊される。細菌の数が多いほど、レプトスピラの消滅は速やかである。従って、腐敗糞尿、汚水、溜水、汚染食物中では 24 時間以上存在しえない。

一方、*Leptospira icteroides* の培養液中には、ある種の真菌、非腐敗性、非酸産生の細菌 (桿菌、球菌) が増殖しているが、その生存に重大な支障をきたすことなく、レプトスピラは真菌、細菌の間を活発に運動している。このような汚染された培地で、これらの汚染菌は培地の各所にコロニー形成するものの、培地にあまり大きな影響を及ぼさない。

本菌の純粋培養液を滅菌蒸留水を入れた容器に注ぎ、空気、塵を遮断せずに放置すると、レプトスピラは数日間生き延びたが、栄養の不足、細菌の増殖によってついに消滅した。室温において糞便に大量に添加したレプトスピラは、数時間で消滅した。

シマカ (*Stegomyia calopus*) の幼虫に感染させるため、多くのレプトスピラを含む肝や腎の乳濁液と幼虫を同じ容器に入れる実験を何度か試みたが、2 時間後にこの混合液中にレプトスピラは発見されなかった。この点において、黄熱病原体は培養し得たすべての病原体の中で最も抵抗性が小さいもののひとつである。自験例では、この微生物の非粋純培養は稀である。

もうひとつ本菌について興味深い点は、速やかに死滅することである。感染モルモットから摘出した肝、腎の一部を約 10℃ に保つと、12 時間以内に死滅する。剖検の数時間前に典型的な実験的黄熱で死亡した数百例のモルモットの肝、腎、血液からレプトスピラが発見されたのはごく稀である。この点において、*Leptospira icteroides* は、死後一晩放置した動物から容易に検出される、日本やヨーロッパの感染性黄熱の症例から分離された *Leptospira icterohaemorrhagiae* とは異なっている。

様々な一般的な消毒薬に対する本菌の抵抗性に関する研究は未完である。しかし、2% フェノール、0.1% の二塩化水銀では、5 分以内に死滅する。10% タウロコール酸ナトリウム、グリココール酸ナトリウム、コール酸ナトリウムでは菌体は菌はただちに崩壊するが、サ

ポニンには傷害されない。ヒトあるいは動物の胆汁は、30% 以上の高濃度で急速に溶解する。

濾過性

Leptospira icteroides の特筆すべき特徴は、濾過器の孔を通過する能力である。この点を明らかにするため、初期に菌株 1 をヒトからモルモットへ感染させる実験を行った。Berkefeld 濾過器 V と N を使用し、水ポンプで吸引することにより、7 日前に実験的にこの菌株に感染させたモルモットの肝と腎の乳濁液を濾過することが可能である。細菌学的に無菌の透明な濾液を、1918 年 8 月 8 日に正常なモルモットの腹腔に 10cc ずつ接種した。2 匹は、それぞれ 7 日半後、8 日後に典型的な症状を示した。これらの動物の血中には、死の 24 時間前に少数のレプトスピラが認められた。肝と腎の乳濁液中にも菌が存在し、正常なモルモットにこれを投与したところ、感染性が証明された。

レプトスピラ・イクテロイデスの生活環に顆粒相が存在する可能性

スピロヘータ科のさまざまな細菌に顆粒相が存在する可能性は、研究者によって繰り返し示唆されてきた。バルフォア (Balfour)、ファンサム (Fantham)、リーシュマン (Leishman)、トッド (Todd)[6] は、人や家禽の再発熱病スピロヘータは、その生活環のある時期に顆粒期を経過するという考えを示した。以下の観察は、*Leptospira icteroides* の生活環においてもこの現象が起こる可能性を強く示唆するものである。

1918 年 10 月 26 日にグアヤクニルで作製された *Leptospira icteroides* の各種培養は、11 月 24 日に無事ニューヨークに持ち帰った。しかし調べてみると、菌株 5 の培養液を入れた試験管からは、いずれもレプトスピラが検出されなかった。菌株 5 の 11 本の試験管は、数日間にわたって詳細にしらべたが検出できなかった。

1918 年 10 月 18 日、菌株 5 に重症感染させたマーマセット 4 の血液から得られ、10 月 26 日にかなり良好な増殖が認められた 6 本の培養試験管を試験したが、らせん型の微生物は菌は見られなかった。1 カ月前にレプトスピラが大量に存在していた培地には、多数の光屈折性の顆粒が沈着していた。これらの顆粒は変性したレプトスピラの遺残のようにみえた。この培地から菌株を回収する望みはほとんどなかった。最後の手段として、12 匹のモルモットにこれらの試験管の内容物をそれぞれ 1cc ずつ接種した。まもなく数匹が典型的な症状を発症した。これらの動物の血液、肝、腎から、様々な数のらせん型レプトスピラが検出され、培養菌株を再取得できた。

試験管内のらせん型レプトスピラの数少なく、顕微鏡で検出できなかった可能性はもちろんあるが、一定

の条件下で顆粒相として存在する可能性もある。

要約

好気性および嫌気性細菌，特にスピロヘータ属に属する微生物の増殖法を用いることによって，形態学的特徴からレプトスピラ属に属する繊細な微生物の純粋培養を得ることができた．11例の黄熱のうち3例から，これを直接培養した．これら3株はモルモットの実験において，特徴的な症状，病変を引き起こすことが示された．この菌を *Leptospira icteroides* と命名した．

Leptospira icteroides は，黄熱患者の血液または臓器乳濁液の接種後，感染で死亡したモルモットの血液からも純粋培養された．これらの培養物もまた，感受性のある動物に対して強毒性であることが証明された．

この微生物の形態学的特徴と，特定の生物学的特性について詳細に検討した．透過光照明下では視認できず，多くのアニリン染料では染色困難である．細菌の存在に非常に敏感で，ある種の他の微生物が存在する培地では速やかに破壊される．増殖には血液血清(ヒト，ヒツジ，ウマ，ウサギなど)の存在が不可欠と思われる．約25～26℃でよく増殖し，37℃ではより早く増殖するがこの場合は数週間で死滅する．25℃の好条件

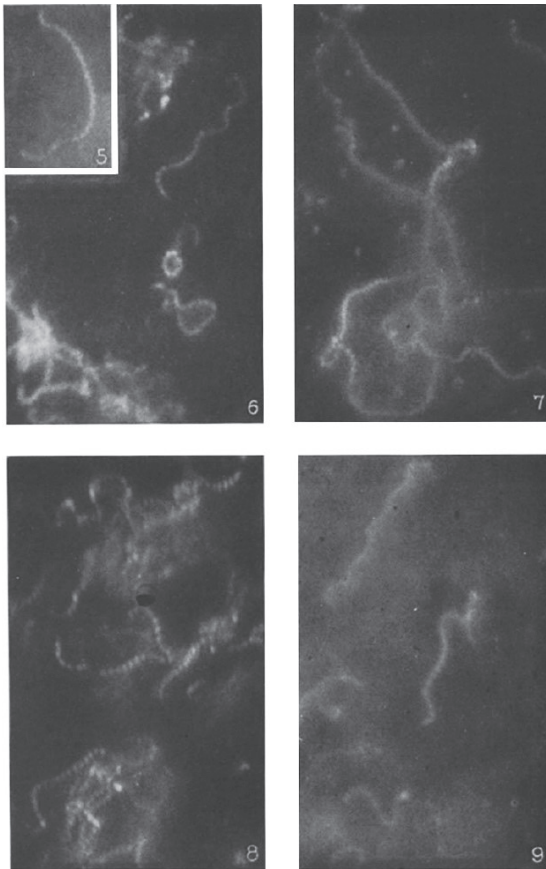


図1. 暗視野鏡検. 半固形ウサギ血清寒天培地, 2週間. *Leptospira icteroides* 菌株6 (症例6). 3,000倍

- 図2. 同前. 菌株4 (症例4).
- 図3. 同前. 菌株5 (症例5).
- 図4. 同前. 菌株3 (症例3).

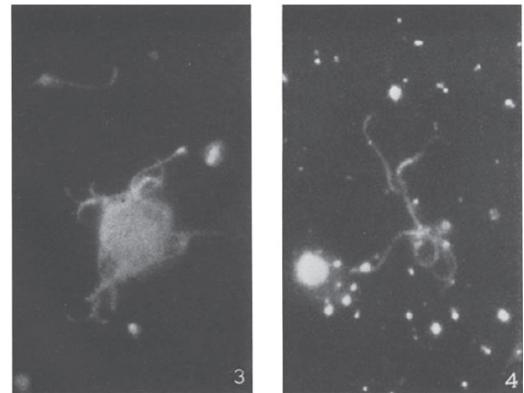
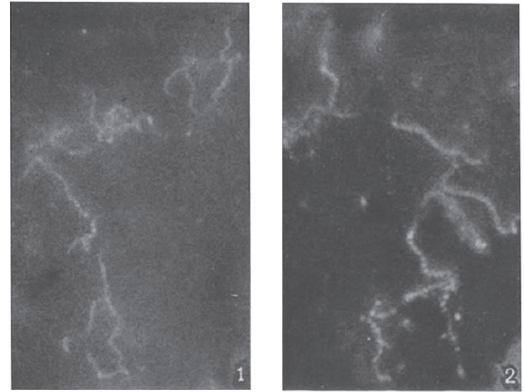


図5. 暗視野鏡検. 半固形ウサギ血清寒天培地, 2週間. *Leptospira icetrohaemorrhagiae*. 日本菌株. 3,000倍

- 図6. 同前. 英国菌株.
- 図7. 同前. 仏国菌株.
- 図8. 同前. 米国菌株1.
- 図9. 同前. 米国菌株2.

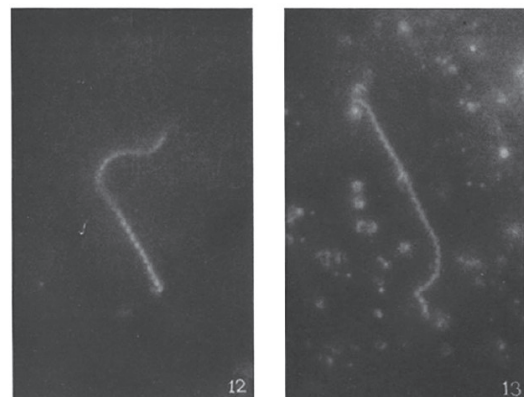
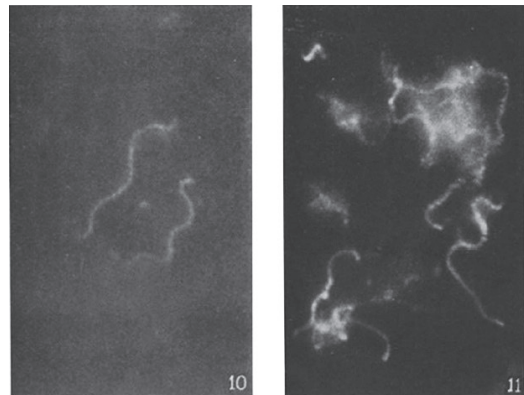


図10. 暗視野鏡検. 半固形ウサギ血清寒天培地, 2週間. *Leptospira icetrohaemorrhagiae*. グアヤキルの野生ラットから採取した菌株8. 3,000倍

- 図11. 同前. 菌株11
- 図12. 同前. 菌株30
- 図13. 同前. 菌株30

下，適切な培地では病原性を失うことなく数カ月間生存する。 *Leptospira icteroides* は横分裂で増殖する。

一部の菌株の病原性は，0.00001cc の培養液でモルモットに典型的な致死感染を引き起こすほどであった。 *Leptospira icteroides* に対する感受性はモルモット間でかなり差がある。

本菌は，55℃，10 分以内に死滅し，完全乾燥や凍結解凍でも死滅する。胆汁，胆汁酸塩では一定の濃度で融解するが，サポニンでは融解しない。

Leptospira icteroides は，Berkefeld 濾過器 V，N の濾過孔を通過し，一定の条件下では顆粒相を持つ可能性がある。

【参考文献】

1. Noguchi, H., J. Exp. Med., 1918, xxvii, 575.
2. Noguchi, H., J. Exp. Med., 1912, xvi, 199.
3. Noguchi, H., J. Exp. Med., 1919, xxix, 565.
4. Noguchi, H., J. Exp. Med., 1919, xxix, 585.
5. Ido, Y., Ito, H., and Wani, H., J. Exp. Med., 1918, xxviii, 435.
6. Balfour, A., Internat. Congr. Med., 1913, xxi, 275. Fantham, H. B., Ann. Trop. Med. and Parasit., 1914, viii, 471. Leishman, W. B., Internat. Congr. Med., 1913, xxi, 282. Todd, J. L., personal communication.