ON THE IN VIVO SLIDE CELL CULTURE OF THE MURINE LEPROSY BACILLUS

Masahiro Nakamura

(Dept. of Bacteriology, Kurume Medical School)

The cover glasses were smeared with murine bacilli, put under skin of intact white rats and taken away at the desired intervals to examine the multiplication of the bacilli on the surface of them. In some favorable cases the fission of bacilli was recognized after a week, and globi were formed after four weeks. The multiplication was carried out in the same way as the other acid-fast.

白鼠における鼠癩菌の増殖態度 (其の3) 鼠癩菌の生体内 Slide culture 法の試み

久留米大学医学部細菌学教室 (主任 中川洋教授)

中 村 昌 弘

序

私はさきに白鼠における鼠癩菌の増殖態度①②として鼠癩菌の生体内における発育形式等についてのべるところがあつた。しかし常に自ら感ずるところは癩鼠を逐日屠殺して、鼠癩菌の増殖の状況を観察してみても、結局屠殺された癩鼠は、各鼠、その都度毎に別個であり、個体差も少くないところであるので、かく断片的に観察された所見をつなぎ合せたものが果して眞の所見か否か疑わしい。尤も、はなはだしい誤りをおかしているとは考えられないが、やはりわれわれとしてはその断片の間隙をうずめ、1コの菌を連続して観察しない限りは隔靴搔痒の感深く理論的にも精神的にも満足出来ない部分が残るのは致し方がない。しかし鼠癩菌においては純粋培養、フィルム培養共に不可能の現在、鼠癩菌の1コの発育状況を連続して観察することは望むべくもないことであるが何らかの方法によつてこれになるべく近い所見をえたいとは日頃から念願しているところである。さて私は今回その目的のために、Slide culture 法を試みることに思い至り、いささか実験を行つたのでここに報告したいと思う。Slide culture 法③そのものの採用の試みについてはすでに佐藤④が純粋培養の判定のために行つているが、私はこれを白鼠体内において行わんとしたのである。

生田⑤⑥、天野・山本⑦は Ziegler ⑧の創案になる硝子室、Maximow ⑨のその改良法を用いて異物巨細胞の研究を行つている。瀬川⑩⑪はそれに示唆をえて、カ

バーグラスに結核菌を塗抹して、それを家兎皮下に挿入し、結核菌の発育と共にそれに伴つて出現して来る細胞の状況を観察した。更に私は瀬川の実験に示唆をえて、培養不可能なる鼠癩菌を鼠癩菌の感受性動物たる白鼠の体内において前述の方法により発育せしめうるならば、いくらかでも劈頭の目的に近づく観察が出来るのではないかと考えたのである。

実験方法

供試菌種:

熊本株鼠癩腫 (接種後6ヵ月および3ヵ月) の約50倍生塩水菌浮游液。

実験手技:

予めカバーグラスを4大に切り、その小ガラス片の縁をガス焰で焼き、膨大した堤を作る。これらを滅菌したのち、この一方の面に鼠癩菌乳剤を塗抹し、37°C で30分間乾燥。その塗抹面を内側にして、他の同様のガラス (菌塗抹ガラスより少しく広い方がいい) を合せ、2枚とする。即ちこの2枚の間にすき間が出来る訳になる。

一方、健康白鼠をエーテル麻痺後、その背面に左右各々2カ所、計4カ所に縦に前上のガラス片の入るだけの大きさの切開を施し、無菌的に2枚のガラスを重ねたまま皮下鬆疎結合組織に挿入し、クレンメにて切開部はとめる。対照としては加熱した同乳剤を塗抹したガラス片を同様に挿入する。

本回は1週間毎にこのガラスを摘出し、Ziehl-Neelsen法を施して、鼠癩菌の発育状況を観察した。この方法によれば1頭白鼠について、挿入1週2週3週および4週後の4回に亘つて所見が観察されることになる。

実験成績

1) 接種後6カ月の鼠癩菌を用いて行つた実験群では菌の増殖像は認められず、特に3週間後の標本においては1視野0～5個の菌数でしかも単孤菌のみであり対照標本と全く同一所見を呈し成績は陰性に終つた。

肉眼的に標本を観察すれば、淋巴液の浸出が甚しく、標本面に1枚の層をなしているのがすでに1週後に認められ、3週、4週後になれば結合組織がガラスを覆つて包み、ガラスの摘出のために切開を施す要を生じた。2枚のガラスの間にも淋巴液等が入りこんで、4週後になれば両ガラスを離すのにやゝ困難を感じたことがあつた。

2) 接種後3カ月の鼠癩菌を用いて行つた実験群では5頭の健康白鼠を供したが、実際に観察しえたのは3頭であつた。それらの所見は第1図として示す。

即ち、各頭共、挿入1週後では菌数極めて少く、開始時の標本と大差なく、或はかえつて少くて、菌形も短小なものが、開始時の標本より多く認められる。更に定型的所見においては2週後ではその所見が大幅異り、菌は一般にその数を増し、菌形は伸長している感のものが多くなつていた。そしてすでに一般抗酸菌の分裂像に等しい所見を呈しているものが認め始められた。

3週後は菌形は更に伸長しているものが多く認められ、顆粒を明瞭に認めるもの、分裂、分枝状を呈するものを多数に認めて来た。またその間にまじり、非常に繊細な菌も認められた。

4週後になると分裂、分枝の状態が殆んどあり、中には菌の集合形態も多数に認められはじめられたのである。たゞ、白鼠の個体差のためか、No. 1のが定型的の上述の所見を呈し、No. 2ではそれほど顕著な所見を示さず、No. 3においては3週後まで増殖所見が認められず4週後になつて、はじめて増殖所見を認めた例に遭遇した。

総括及び考按

現在培養不可能の癩菌がどのような増殖態度をとるものであるかについての一連の検討を行いつゝある私は今回、鼠癩菌を用いて生体内にカバーガラスを挿入し、所謂生体内 Slide culture 法 とも呼ばるべき方法により鼠癩菌の増殖態度を観察した。

本法のアイデアを得るに至つた動機は序にのべたので省略するが、培養の目的で癩菌乳剤を絹袋に入れて、動物の腹腔内に挿入した実験はすでに戸田・占部・山田^②が行つて陰性成績をえている。本法ではガラス面に塗抹された鼠癩菌が直接、感受性動物たる健康白鼠から生体内で栄養をうることが出来るために、健康白鼠に鼠癩菌を移植したと同様のことであり、唯それがガラス面にく

つついていることと、ガラスの異物としての反応が生じていることが、単に健康生体に移植された菌と異なる訳である。しかし、増殖状況を観察するためには一応、試みて然るべき方法であると思われた。これによれば、鼠癩菌は一般抗酸菌の増殖形式の例にもれず、分裂、分枝、および発芽等の形式の錯雑した状態を呈しながら増殖するものように思われる。たゞこの所見を観察すると日頃われわれが観察している生体内に増殖した鼠癩菌の形態および排列とはやゝ異つた所見であるように思われるのは、ガラスに塗抹された鼠癩菌がガラス上において増殖するためであろうか。たゞこの方法によつても菌の増殖を一貫して試みることが出来ないで、背側4個の標本を別個に観察するにとどまつて所期の目的を達するには、ほど遠いが全く別個の白鼠内の所見よりもやゝ目的に近づいていることにはなると思う。

尤も本法にはその実験理念にもその実験手技にも、なお、検討の余地が多分にあるし、また本法が確立すれば癩菌並に癩の生物学的性状のうちで明かにされていない問題を解決しうる将来も多々ある。今回は実験例が余り多くないために予報の域を脱しきれないうらみがあるが今後更に研究を重ねたいと思う。

結 論

カバーガラスに鼠癩菌を塗抹し、それを健康白鼠に挿入し、時日を追つて摘出しそのガラス上の鼠癩菌の発育を観察した。それによれば早いものでは挿入1週後に鼠癩菌はすでに分裂をはじめ、4週後には菌集団を形成するものもある。その発育形式は一般抗酸菌のそれに準ずるものようである。

〔瀬川^③が結核菌について本法を発表した席上、戸田忠雄教授はこれを Slide culture method in vivo とも呼んだらどうかと述べられた〕

(中川教授の御指導、御校閲並に戸田教授の御助言を感謝する)

文 献

- 1) 中村・新宮：レブラ，20巻，118—120，(1951)。
- 2) 中村・志方・新宮：レブラ21巻，230—232，(1952)。
- 3) Berry and Lowry：Amer. Rev. Tbc.，60，51，(1949)。
- 4) S. Sato：The science Reports of the Research Institutes Tohoku University，Vol. 3，269—273，(1951)。
- 5) 生田：日本血液学会雑誌，11巻，111—112，(1948)。
- 6) 生田：日本血液学会雑誌，13巻，1—13，(1950)。
- 7) 天野・山本：日本血液学会雑誌，12巻，14，(1949)。
- 8) Ziegler：Untersuchungen über die pathologische Bindegewebe und Gefäßneubildung. Würzburg，(1876) (③生田より)。
- 9) Maximow：Entzündlich: Neubildung, Zieglers B.V. Suppl.，(1932) (③生田より)。
- 10) 瀬川：第14回九州大学医学部細菌学教室集談会，(1950，12月)。
- 11) 瀬川：結核，27巻，309—313，(1952)。
- 12) 戸田・占部・山田：レブラ10巻，283—313，(1939)。

中 村 論 文 附 図

白風 週	No. 1	No. 2	No. 3
1
2
3
4