FUNDAMENTAL STUDIES ON THE SCREENING TEST OF CHEMICAL AGENTS FOR MURINE LEPROSY

PART 1. ON THE STRAIN, INOCULATED SITE AND DOSIS

Shinji Nishimura

Leprosy Laboratory, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

Kenji Iwasa

(Dermatological Department of Osaka University Medical School)

It is most desirable for the screening test of chemical agents to abbreviate the experiment process and to provide the simple standards to judge the results. The following experiments were carried out to find out the murine bacillus strain, inoculation site and dosis which can satisfy those conditions. All the experiments were done with mice.

1) Bacillus Strain: By subcutaneous inoculation, the virulences of Kumamoto, Hawaiian, Keishicho and Fukuoka strains were compared.

The results presented that Fukuoka strain is weaker, and the other three strains have the similar pathogenity. (Tab. 1, 2, 3, 4)

2) Inoculation Site: Subcutaneous inoculation produced leproma at the site in an early period which can be observed exactly. (Tab. 1, 2)

Intraperitoneal and intravenous injections give a rise to the disease in various organs after long while. The predilected organ can not be found and the results are shown by bacillus distribution index and not by a practical standard. (Tab. 5, 6, 7, 8)

3) Inoculation Dosis: 0.2ml of $10^2 \sim 10^4$ diluted leproma suspension gives a rise to the disease 2 or 3 months after subcutaneous inoculation. When the suspension decreases to $10^6 \sim 10^8$, the longer period is necessary to produce the disease.

By intraperitoneal injection, 0.5ml of $\times 50$ diluted suspension produced the disease after 3~4 months. 3 months after intravenous injection 0.2ml of 10^2 suspension gives a rise to visible changes in the 30% of the viscera. It will take longer period to recognize lesions in all cases.

The above results lead us to conclude that the most adequate experiment is to be carried out with Hawaiian strain on account of its international value by subcutaneous inoculation in the dosis of 0.2ml of $10^2 \sim 10^4$ diluted suspension, and to observe the development for 3 months.

鼠癩化学療法剤の Screening Test に関する

基礎的実験 (其の1)

鼠癩菌株の選択竝に接種部位と菌量の検討

大阪大学微生物病研究所癩研究部

西 村 真 二

大阪大学医学部皮膚科泌尿器科教室

岩 佐 賢 二

(昭和30年5月27日受稿)

鼠癩化学療法剤をマウスで Screening するには、実験の期間を出来るだけ短かく、そして簡単確実な基準のもとに、てきばきと判定して行くことが最も望ましいので、このような目的に合致した一つの実験方法を作り上げたいと考えて、その基礎的実験の一部として、先ず使用する鼠癩菌株の選択、接種部位、並に、接種菌量などについて検討を行った。

I 鼠癩菌株の選択

結核菌 H 37RV 株が、現在抗結核剤の実験に標準株として広く用いられているように、抗鼠癩剤の試験においても亦、標準株の選択が必要であることは言うまでもない。此の場合条件として最も重要なことは、Virulence の強いもの、即ち少量の菌によつて速かに発症するものでなければならないことである。

今回の実験に用いた菌株は、日本に於ける代表的菌株として、わが教室に継代保存していた3株と、最近アメリカより贈られた株、計4株で、その由来は次の通りである。

使用菌株の由来

熊本株：熊本市に於いて、太田原、市原が発見、ラットへ継代したもの、1942年北研渡辺義政博士を経て、当研究所へ分与されたもので、1952年4月以降マウスへ継代。

福岡1号株：福岡市にて、戸田、占部が検出、ラットへ継代したもの、1945年占部教授より当研究所へ分与された株、1952年10月以降マウスへ継代。

警視庁株：東京警視庁細菌検査所に於いて、内田(三)が発見、ラットへ継代したもの。東北大抗研佐藤教授のもとに保存された株を1953年、真山助教より分与され同年9月よりマウスへ継代。

ハワイ株：アメリカ合衆国及び、南米方面で多く用いられている株で、1952年11月、Harvard 大学 Hanks 博士からマウス継代のまま贈られたもの。爾来マウスへ継代。

実験方法

a) 菌乳剤の作り方

各菌株ともマウス継代3代以上のもの、即ちマウス馴化株を使用し、皮下接種3〜4月の新鮮な Leproma を摘出して用いた。この場合マウスの個体によつて、Leproma 中の鼠癩菌数に多少の相違あることを考慮し、これを出来る限り均一にするため、各株とも3〜4四分の Leproma を摘出混合した。

脂肪組織や血液成分を除いた上、0.1g を厳密に秤量

し、滅菌乳鉢にて丁寧に磨砕し徐々に生理的食塩水を添加して、 10^2 乳剤を作り、滅菌ガーゼ4枚で濾過、これを原液とする。

そして此の際、菌株毎に乳剤中の菌数を計算しておくことにした。

b) Leproma 乳剤中の菌数計算法

スマヤーによる牛乳中の細菌数検査法を援用した。原理は、標本をマイクロピペットにて 0.01cc 吸取り、よく清拭したスライド上 1.0 cm^2 の広さに平等に塗布し、孵卵器 (37.0°C) にて乾燥後、チールネルセン法で染色。顕微鏡は視野の直径を $20.5/100 \text{ mm}$ に調節しておく、1視野の面積が丁度 $1/3000$ に当るので、この拡大によつて1視野中に見出される菌数を数えあげれば、検体 1 ml 中の菌数は次式によつて簡単に算出される。

平均数 $\times 3000 \times 100 =$ 可検液 1 ml 中の菌数

この場合、載物硝子上3ヶ所に塗抹し、各々について30視野以上の菌数を平均すること。

並に、塗抹を平等に、かつ、染色時の水洗などを慎重に行うことが誤差を少くする上に重要なことである。可検液の濃度は、 $10^3 \sim 10^4$ 液が適当で、 10^2 、 10^5 液は過多或は過少で計算には却つて不便である。

c) 使用マウスと接種部位

第1次実験では NA 1 系、NA 8 系、マウス計 120 匹を第2次実験では、NA 1 系、NA 2 系、S 417 系、雑系マウス計 357 匹を用い、♀ 8 共に体重 $18 \text{ gr} \pm 2 \text{ gr}$ のものを使用した。注射部位はこの場合、下腹部皮下に一定した。

d) 接種菌量

Leproma 乳剤が濃厚に過ぎる場合は、含菌量と共に組織成分も多量となるため、この様な菌体以外の成分による発症への影響を出来るだけ取除くためと、今一つは、発症力の比較に便利のように、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^7 、 10^8 、乳剤を 0.2cc づつ接種した。乳剤中の菌数を揚げると次のようである。

菌 株	第1次実験 $\times 1000$ 液 0.2ml 中の菌数	第2次実験 $\times 1000$ 液 0.2ml 中の菌数
熊 本 株	996,000	4116,000
ハ ワ イ 株	768,000	4122,000
福 岡 株	702,000	1668,000
警視庁株	702,000	3960,000

e) 成績判定法 (写真参照)

皮下接種の判定法としては、局所に生じた Leproma の拡がり、解剖時のリンパ腺、内臓の菌分布を指標とした。

Leproma の拡がりによる判定は次のように表示した。

拡がり 触 診 記号 指数
 1～10mm²……痕跡～粟粒大……+…… 1
 11～30 〳……半 米 粒 大……+…… 2
 31～70 〳……米 粒 大……+…… 3
 71以上 ……小 豆 大……+…… 4

淋巴腺は、左右の鼠蹊腺、腋窩腺、顎下腺を、内臓は、
 肺、肝、脾について病変の最も著しい部分の断面をスタ
 ムプスメヤーとし、チールネルセン染色を行つて鏡検し
 た。この場合弱拡大にて細胞内に増殖せる菌集団を目標
 に検索。全視野に於けるグロービー数を算え上げ、菌集団

を認めない場合は、強拡大を以て孤立菌を探索するよう
 にした。成績の表示は次の標準に拠つた。

菌集団数	記号	指数
孤立菌のみ	+	1
1～10	+	2
11～50	+	3
51～100	+	4
101以上	∞	5

実験成績

a) Lepromaの拡がりについて見た成績（表 1. 2）

Table 1. Comparative Development of Leproma-Strains in Subcutis
 (The 1st Experiment)

<div><div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div></div></div>		
--	--	--

* Suspension ** Number of mice *** Leproma

Table 2 Comparative Development of Leproma-Strain in Subcutia (The 2nd Experiment)

Strain		Days	60					90					120					150				
			—	—	+	+	++	—	—	+	+	++	—	—	+	+	++	—	—	+	+	++
Kumamoto Strain	10 ⁴	26	20	4	5	9	2			1	5	8	6			1	2	10				
	10 ⁶	20	20	18		1			8	6	2	1	2		1	5	1	2				
	10 ⁷	26	26	26					15	3	4	2	1	2	7	3	6	3				
	10 ⁸	21	21	21					19	1					4	5	2	1	1			
Hawaiian Strain	10 ⁴	19	19	5	5	3	4	1	2	2	6	6			2	1	3	6				
	10 ⁶	21	21	19		1			11	2	4	4			1	3	3	5	4			
	10 ⁷	26	26	23					17	2	2	1	1	7	6	2	5					
	10 ⁸	21	21	18					13	1	2				6	4	3		1			
Fukuoka Strain	10 ⁴	18	18	15	1	1	1	2	5	5	4	2				5	4	4				
	10 ⁶	18	18	18					16	1	1				3	5	4	2	1			
	10 ⁷	24	24	23		1			15	2	4				8	3	4	3	2			
	10 ⁸	20	20	20					18	1					11	7	1					
Keishicho Strain	10 ⁴	18	18	9	5	2	2	1	1	5	5	6				1	5	6				
	10 ⁶	20	20	16	1	2			10	1	5	2	1	1	2	7	5	1				
	10 ⁷	25	25	24					17	5	1	1			3	8	7	3	1			
	10 ⁸	19	19	19					17	1	1				5	7	4					

* suspension

** Number of mice

*** Leproma

この表で見られる如く、10²乳剤を接種したものでは、熊本、ハワイの両株が略々同等に、警視庁株もこれと大差なく、ただ福岡株のみが、かなりおくれて発症した。10⁴では、第1次、第2次実験を通じて、熊本>ハワイ>警視庁>福岡の順位を示したが、上位の3者間には、著しい差がみられなかった。10⁶は第1次実験では、ハワイ>熊本>福岡>警視庁、第2次では、警視庁>熊本>ハワイ>福岡となった。10⁸では警視庁>熊本>ハワイ>福岡の順位となった。以上のような発症度からみて、熊本、ハワイ、警視庁の3株間には、Virulenceに殆ど差を認めないが、福岡株はこれらに比較して少々弱株のようである。ただこのような慢性肉芽増殖を主徴とする鼠癩などでは、接種菌量が少量になればなる程、被接種マウスの個体差が、いよいよ強く現われ、その判定がむづかしいので、結局多数のマウスを使用して、その平均値を求め正鵠を期するようにした。

b) 菌の分布度から見た成績(第3, 4表参照)

このように接種菌量別に区分して表示したのは、菌接種量の多寡によつて既に当初から各臓器への菌分布数が違うので、その臓器内での増殖量や原発巣からの転移を比較するためには、どうしても接種菌量を一定にしておく必要があるからである。

第3表は4株の菌を接種菌毎に、10⁴、10⁶、10⁷乳剤に分けて、それぞれ淋巴腺と臓器の菌分布度を比較したもので、第4表はその成績の総括である。即ち、10⁴では、計54匹のマウスについて鼠蹊腺、腋窩腺、顎下腺、肺、肝、脾と6箇所から標本を作つて計324個を調べたところ、その内160箇所、平均49.4%に菌陽性であつた。そして、この指数が計402となり、マウス一匹当りの平均指数7.4を示した。ところで、この平均指数よりも上位にあるのは、警視庁、熊本、ハワイで福岡はそれ以下を示している。次に10⁶についてみるに、菌陽性数、平均

Table 3 Comparative Distribution of Bacillus-Strains in Various Organs (1)

Suspension	Organs	Strain	Lymph nodes												Viscera																							
			Inguinal					Axillar					Submandibular					Lung					Liver					Spleen										
			-	+	++	+++	∞	-	+	++	+++	∞	-	+	++	+++	∞	-	+	++	+++	∞	-	+	++	+++	∞	-	+	++	+++	∞						
10 ⁴ 0.2ml	Kumamoto	17	0	0	6	5	4	2	0	2	5	4	3	3	10	3	3	1	0	0	15	2	0	0	0	0	14	2	1	0	0	0	12	2	2	1	0	0
	Hawaiian	12	0	1	4	3	3	1	0	1	5	3	2	1	7	2	0	1	2	0	11	1	0	0	0	0	10	2	0	0	0	0	8	3	0	1	0	0
	Fukuoka	15	3	0	4	2	5	1	0	2	6	2	5	0	9	1	5	0	0	0	14	0	1	0	0	0	14	0	1	0	0	0	13	1	0	0	1	0
	Keishicho	10	0	1	2	2	5	0	1	0	3	4	2	0	4	4	0	2	0	0	7	2	1	0	0	0	6	2	2	0	0	0	5	3	1	0	1	0
10 ⁶ 0.2ml	Kumamoto	15	3	4	5	3	0	0	2	2	7	2	2	0	13	0	1	0	1	0	13	2	0	0	0	0	15	0	0	0	0	0	15	0	0	0	0	0
	Hawaiian	17	1	4	6	5	1	0	2	2	9	2	2	0	13	2	2	0	0	0	16	1	0	0	0	0	14	2	1	0	0	0	14	1	1	0	1	0
	Fukuoka	15	7	3	2	1	2	0	8	2	4	0	1	0	12	1	2	0	0	0	15	0	0	0	0	0	15	0	0	0	0	0	15	0	0	0	0	0
	Keishicho	16	2	2	7	4	1	0	5	2	2	5	2	0	10	3	3	0	0	0	16	0	0	0	0	0	15	1	0	0	0	0	14	0	2	0	0	0
10 ⁷ 0.2ml	Kumamoto	21	7	5	9	0	0	0	9	3	6	1	2	0	20	1	0	0	0	0	20	1	0	0	0	0	21	0	0	0	0	0	19	1	1	0	0	0
	Hawaiian	20	8	3	6	3	0	0	10	1	5	2	2	0	17	1	2	0	0	0	20	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0
	Fukuoka	20	13	3	4	0	0	0	9	6	2	3	0	0	19	0	1	0	0	0	20	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0
	Keishicho	24	10	4	6	2	2	0	10	3	5	5	1	0	21	1	0	2	0	0	23	1	0	0	0	0	23	1	0	0	0	0	23	1	0	0	0	0

* Number of mice ** Bacilli

Table 4 Comparative Distribution of Bacillus-Strains in Various Organs (2)

Suspension	Strain	Number of mice	Number of sections examined	Number of Organs in which bacilli were found	Average number of positive sections	Index of average number of positive sections	Index of the average
10 ⁴ 0.2 ml	Kumamoto	17	102	51	50.0	131	7.7
	Hawaiian	12	72	35	48.5	90	7.5
	Fukuoka	15	90	37	41.1	99	6.6
	Keishicho	10	60	37	61.6	82	8.2
	Total	54	324	160	49.4	402	7.4
10 ⁶ 0.2 ml	Kumamoto	15	90	29	32.2	58	3.8
	Hawaiian	17	102	42	41.1	88	5.2
	Fukuoka	15	90	18	20.0	38	2.6
	Keishicho	16	96	33	34.4	75	4.7
	Total	63	378	122	32.3	259	4.1
10 ⁷ 0.2 ml	Kumamoto	21	126	30	23.8	54	2.6
	Hawaiian	20	120	25	20.8	54	2.7
	Fukuoka	20	120	19	15.8	32	1.6
	Keishicho	24	144	34	23.6	72	3.0
	Total	85	510	108	21.2	212	2.5

%並に平均指数が全体の平均より上位にあるのは、ハワイ、警視庁、熊本の順で、ここでも福岡株は下位であつた。更に 10^7 では、熊本、警視庁、ハワイが全体の平均指数より上位を示し、福岡は下位であつた。而して上位の3株はいずれの場合も、僅少の差で優劣を附し難い程であつた。

上記の如く *Leproma* の拡がり と 菌の体内分布 から見た4株の鼠癩菌の Virulence について云えば、熊本、ハワイ、警視庁の3株間には、特に著しい差がなく、福岡株は発症度並に菌の分布において、かなり劣勢であつた。この様に独り福岡株が劣つていたことは、先の接種菌量の項に示された如く、第2次接種時、既にこの福岡株では、1 ml 当りの菌数が他の菌株にくらべて甚だ少量であつたことに起因するのではなからうかとも思われる。然し菌の乳剤を作る場合には細心の注意を払つて3~5匹から *Leproma* を摘出、脂肪組織を厳密に除去して秤量しているにも拘らず、福岡株のみこのように菌数の少ないことは結局菌増殖力の弱いことを物語つているようにも考えられる。この菌数との関係については、更に機会を得て検討したいと思う。

II 接種部位とその菌量

鼠癩病巣の好発部位は、皮下の鬆疎な結合組織並に淋巴腺であるが、又内臓殊に脾、肝など網内系組織に富む臓器にも屢々顕著な病変が現われる。従つて、かような組織へ直接に適量の菌を定着せしめることが、発症を早めるに最適であろう。而して、その病変が肉眼的にも確実に、且容易に判定出来ることが、望ましい条件である。

鼠癩菌は、マウスのいずれの部位へ接種しても、よく発症するが、通常行われている接種法は皮下注射である。然し、目的によつては、腹腔、辜丸実質、静脈、前眼房、脳膜下等への接種法が試みられている。著者は、これ等の接種法の中から、手技が比較的簡単確実に、判定に便利な皮下接種、腹腔接種、静脈内接種を選び、この三者について発症の速度、判定の確実、且容易さを目標として比較を行うことにした。

皮下注射法

皮下組織と云つても、背部、下腹部、腋下など、その部位に依つて組織抵抗性或は鼠癩肉芽の発症に適應する条件が必ずしも同一ではない。これは、既に西村等がラットについて実験せる処である。そこで、この場合は発症の速かなこと、*Leproma* 観察の容易な点、菌の体表淋巴腺分布等を考慮して、下腹部皮下注射に一定した。

下記の成績は、前項の菌株選定実験に皮下注射法を採用したので、この動物457匹に就いて、その成績を援用検討したものである。

1) 接種菌量と局所に於ける癰腫の発生速度(第1~2表参照)

比較的濃厚な 10^2 から極めて稀薄な 10^8 まで数段階に亘る菌液を接種した局所の発症状態即ち肉眼的に確実に癰腫を認め得るのは、各菌株を通じ大体下記の様であつた。

10^2	0.2 ml	30~60日
10^4	0.2 ml	60~90日
10^6	0.2 ml	90~120~150日
10^7	0.2 ml	120~150~180日
10^8	0.2 ml	150日以上

此の様に、 $10^2 \sim 10^4$ では、ほぼ3ヶ月以内で確実に発症させることが出来るが、 10^6 以上では90~180日を要するから、この様な稀薄な菌液を用いることは、短い期間内に判定を下す上から適当でないことが判る。結局、この成績から見れば、 $10^2 \sim 10^4$ のものをを用いるのが良いと思う。

2) 局所以外の病変

下腹部皮下接種の場合は、皮下の淋巴腺殊に鼠蹊腺及び腋窩腺が最も強く侵され、肉眼的には腫脹、結節、壊死が認められる。又長期経過の場合には、内臓殊に脾、肝、肺に結節病巣を作るものが多い。然しこの様な肉眼的病変は、具体的にその程度を表わす客観性のある記載法がなかなか困難で、これに依つて判定の基準を立てることは、至難である。

3) 体内の菌分布(第3、4表参照)

各菌株の Virulence 比較の項で既に述べた様に、皮下注射では表在淋巴腺に最も多く、内臓には甚だ少ない。ただし濃厚な乳剤を接種した場合には、初期に於いて内臓にも頻回菌を証明することが出来る。

要するに皮下接種では、 $10^2 \sim 10^4$ 、0.2 ml で局所に *Leproma* が短期間に発生し、且つ体表淋巴腺には、 10^2 で大部分に、 10^4 では約半数に菌を証明し、これ等はその程度を具体的に記載することが出来る。但し淋巴腺及び内臓の肉眼的変化をとらえることは、短期間の観察では困難である。

腹腔内注射法

この方法については、146匹のマウス NA1 系を使用し、2回実験を繰返した。即ち第一次実験では $\times 50$ 、及び 10^2 乳剤を0.2 ml 注射後、30日~150日に亘り、毎月解剖、肉眼的変化と菌の分布について調べ第2次実験で

Table 5 Macroscopic Findings of the Viscera of Animals inoculated intraperitoneally

The Findings Exp. * **						Number of positive Bacilli	%	Tracheobronchial nodes	Portal nodes	Paravertebral nodes	Omentum	Lung	Liver	Spleen
The 1st Exp.	× 50	30	6	2	33						2			
		60	7	6	85	2			1	6	1	1	2	
		90	6	5	83	2				4		1	4	
		120	9	8	89	5	2	1	8			5	6	
		150	7	3	43	2	2	1	3			2	3	
	× 100	30	7	1	14						1			
		60	7	4	57	2				4			2	
		90	6	5	83	3	1		5			2	2	
		0.2 ml	120	6	4	67	1	1	1	4		1	1	
			150	6	3	50	2			3				2
The 2nd Exp.	× 50	60	19	12	63	7	2	1	10			1	3	
	0.2ml	90	20	17	85	6	4	2	12	1	4	8		
	× 100	60	20	8	40	5			1	5			1	
	0.2ml	90	20	12	60	7	1	1	10			6	6	

* Suspension ** Days

は、同様に×50及び10² 乳剤接種後60日と90日に解剖した。この場合皮下注射よりも、接種菌量を多量に用いたのは我等の従来の経験から見て、少量の菌を接種したの

では、2～3ヶ月で確実に内臓病巣を作り難いことを知っていたからである。

1) 接種菌量と肉眼的病変の発生時期並びに必発臓器 (第5表)

第1, 第2実験とも濃厚な50倍液接種の方が強い病変を現わした。経過別にみると, 30日で肉眼的に明らかに鼠癩病巣をみたものは極めて少ないが, 60日～90日～120日と日のたつにつれて顕著となった。然しこの表では150日の例は却つて減少を示した。各器官を通じ最も屢々病変の現われるのは大網で, これに次ぐは気管支淋巴腺及び脾臓である。大網は灰白半透明の小結節が密発し, 気管支腺は腫大と結節が現われ, 脾臓も亦多くの場合腫大して結節を密発した。肝臓も顕著な病気では小結節密発, 褪色, 実質脆弱化が見られた。肺臓には肉眼的病変を示すこと一般に少く, 漸く2例に於いて, 半透明灰白色の小結節少数を認めたに過ぎない。

これを要するに全臓器を通じ, 大網が最も良く病変を現わしたが, 然しこれとても必発とは云い難く, 第1次実験では×50液, 0.2 ml 接種後60日～120日で22匹中18匹, 第2次実験では, 39匹中22匹に認めた程度であつた。そして10²液接種組では, 一層少数であつた。

2) 腹腔内注射に依る菌の体内分布 (第6,7表参照)

Table 6 Distribution of Bacillua after Intraperitoneal Inoculation

Organ **** ** *** *			Tracheobronchial nodes					Portal nodes					Paravertebral nodes					Omentum					Lung					Liver					Spleen																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
			-	+	+			-	+	+			-	+	+			-	+	+			∞	-	+	+		-	+	+			-	+	+																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
Exp.																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
The 1st Exp.	×50	30	6	4	1	1		5	1		5	1		4	1	1		6		5	1		4		2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				

* Doses of bacilli

** Suspension

*** Number of mice

**** Degree of bacilli

Table 7 Index of Bacillus Distribution after Intraperitoneal Inoculation

Exp.	Organ	****					***					**					*							
		Tracheobronchial nodes			Portal nodes			Paravertebral nodes			Omentum			Lung			Liver			Spleen				
		Number of positive Bacilli	The Index	The Average Index	Number of positive Bacilli	The Index	The Average Index	Number of positive Bacilli	The index	The average Index	Number of positive Bacilli	The Index	The Average Index	Number of positive Bacilli	The index	The Average Index	Number of positive Bacilli	The Index	The Average Index	Number of positive Bacilli	The Index	The Average Index		
The 1st Exp.	×50 0.2 ml	30	6	2	3	0.5	1	1	0.17	1	1	0.17	2	3	0.50	0	0	0.00	1	1	0.17	2	6	1.00
		60	7	6	9	1.30	4	6	0.86	5	8	1.14	7	18	2.57	1	2	0.29	3	6	0.86	4	6	0.86
		90	6	3	5	0.83	3	5	0.83	2	2	0.33	5	16	2.67	0	0	0.00	1	1	0.17	4	10	1.67
		120	9	7	19	2.11	6	15	1.67	4	9	1.00	7	25	2.78	4	4	0.44	6	13	1.44	6	16	1.78
		150	7	4	10	1.43	4	8	1.14	2	4	0.57	5	20	2.86	1	1	0.14	3	8	1.14	3	8	1.14
	×100 0.2 ml	30	7	7	0	0.00	0	0	0.00	0	0	0.00	2	4	0.57	0	0	0.00	0	0	0.00	0	0	0.00
		60	7	4	7	1.00	2	4	0.57	3	4	0.57	7	17	2.43	1	1	0.14	2	3	0.43	3	5	0.71
		90	6	5	9	1.50	4	7	1.17	2	2	0.33	6	18	3.00	0	0	0.00	1	1	0.17	3	8	1.33
		120	6	3	7	1.17	3	5	0.83	1	2	0.33	5	15	2.50	1	1	0.17	1	3	0.50	3	6	1.00
		150	6	3	7	1.17	3	6	1.00	0	0	0.00	6	14	2.33	0	0	0.00	1	1	0.17	2	3	0.50
The 2nd Exp.	×50 0.2 ml	60	19	9	33	1.74	4	120	6.3	3	4	0.21	13	41	2.16	1	1	0.05	5	7	0.37	6	16	0.84
		90	20	11	35	1.75	10	231	1.15	4	9	0.45	13	45	2.25	4	7	0.37	8	18	0.90	12	29	1.45
	×100 0.2 ml	60	20	11	29	1.44	2	5	0.25	1	3	0.15	7	17	0.85	0	0	0.00	3	3	0.15	2	4	0.20
		90	20	9	25	1.25	7	140	0.70	2	5	0.25	12	36	1.80	1	2	0.10	9	20	1.00	9	20	1.00

* Suspension ** Days *** Number of mice **** Index

前記のマウスに就いて淋巴腺（気管支，肝門腺，腰部腺，大網）と，臓器（肺，肝，脾）に於ける菌の分布度を調べた。標本の作り方は総て皮下注射の場合と同様にした。成績は表の通りで，第1，第2次実験を通じ肉眼的病変を認めないものに於いても，塗抹標本中に菌を見出した例が可成りあつて，淋巴腺各臓器ともその陽性数は肉眼的変化に比して一段と高率を示したが，大体に於いて，臓器例の成績は肉眼的所見と一致し，陽性数と平均指数から云えば，大網>気管支淋巴腺>脾臓>肝臓=肝門腺>脊柱腺>肺臓の順序であつた。そして最高の大網に於ても60日～120日の経過で全例に菌を証明すると云うわけにはいかなかつた。

以上の如く，腹腔内注射では，50倍の如き極めて濃厚な菌液を接種しても病巣必発の臓器を見出し難く，又検鏡でも大網に於いてさえ100%に菌を証明出来なかつた。此の様な成績から考えると，腹腔内注射法では，よほど濃厚な菌液を用いない限り，2～3ヶ月で全例に発症せしめることはむづかしく，又その判定法も肉眼的変化，

菌の分布所見を併せ，しかも多数のマウスを使用して，その平均値を求めるような方法でなければ，正鵠を期し難いように思われる。

静脈内注射法

この方法で濃厚な乳剤を用いると，エムボリーを起す恐れがあるので，10²液，0.2mlを尾静脈から注射することにした。用いたマウスの数は，NA1—20匹である。成績は第8表の通り。

肉眼的に定型的病変の認められたのは，60日目で，肝臓，脾臓共に2例づつ，あとの1例は腫脹だけであつた。90日では脾に小結節病巣を示したものの4例，肝には2例であつたが，単に腫大せるのみの例が各1例あつた。淋巴腺には変化少く，腰部腺，肝門腺の腫大したものの各1例にすぎなかつた。

菌分布は肝臓，脾臓，気管支淋巴腺が最も顕著であつて，肉眼的病変の無いものにも屢々見出した。従つて，菌分布度は肉眼的変化よりも一層高率であつた。然し，病変必発臓器のないことは，腹腔接種の場合と同様であ

Table 8 The Bacillus Distribution and Macroscopic Findings after Intravenous Injection

Animals	Development	Body-weight	Weight of the Liver (mg.)	Weight of the Spleen (mg.)	Visceral Changes	Distribution of Bacilli												
						Inguinal nodes	Axillar node	Submandibular nodes	Tracheobronchial nodes	Mesenteric nodes	Portal nodes	Paravertebral nodes	Omentum	Lung	Liver	Spleen	Kidney	
1	2 (M.)	19	995	35	liver ; slightly anemia, spleen ; swoleen with many tubercles	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
2		21	726	45		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
3		20	1395	435		—	—	—	—	—	—	—	—	++	+	—	—	
4		24	1122	155		—	—	+	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—
5		22	1025	42	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	
6		27	1575	380	liver, spleen ; swollen with many tubercles	—	—	—	—	—	+	+	—	—	++	+	+	—
7		25	1350	370	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8		23	1380	285	liver & spleen ; slightly swollen	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	+
9		24	1485	125	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	—
10		24	1325	178	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
11	3 (M.)	23	1360	60	liver ; slightly swollen	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12		20	790	80	spleen ; many tubercles	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	++	—
13		25	1200	120	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—
14		21	1100	90	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—
15		23	1100	140	—	—	—	—	+	—	—	+	—	—	—	++	—	—
16		25	1100	360	liver & spleen swollen with many tubercles ;	+	+	—	—	++	—	++	—	—	—	++	++	—
17		28	1260	200	liver ; tubercles	+	—	—	+	—	+	—	—	—	—	++	+	—
18		24	990	120	spleen ; small tubercles	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	++	—
19		26	1000	180	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—
20		22	1000	190	spleen ; swollen, portal nodes ; swollen	—	—	+	—	—	++	—	—	—	—	—	—	—

る。我々はこの静脈内注射法では臓器の病変と菌分布が一層顕著であることを期待したが、結果はこれに反した。

さて Screening Test には、どの様な接種法が適当であるか。上記三つの方法についてこれを比較表示してみた。

部 位 - 別	皮 下 接 種	腹 腔 接 種	静 脈 内 接 種
注射法の難易	最も容易	容易	熟練を要する
接種菌量	10 ² —10 ⁴ , 0.2 ml	×50—10 ² 0.2ml	×100 0.2ml
発症までの日数	10 ² , 0.2ml=1~2月 10 ⁴ , 0.2ml=3月	×50, 0.2ml=3月 10 ² , 0.2ml=4月	10 ² 0.2ml 3月~4月
肉眼的病巣	局所 100%	大網約 50%	肝臓約 30%
菌体内分布	皮下、淋巴腺最多	大網、気管支腺、脾、肝に多し	肝、脾に最多
確実な判定法	局所のLepromaの肉眼的観察	大網、脾、肝の病変観察と菌分布調べ	肝、脾の病変と菌分布の検索

総 括

- 1) 鼠類菌熊本株, ハワイ株, 警視庁株, 福岡株の4株に就いて, 純系マウス皮下注射法に依つて, その Virulence を比較した所, 福岡株のみ少々弱く, 他の3株は殆んど同等の発症力を示した。
 - 2) 注射部位に就いて, 発症が早く, 確実且簡便に判定出来ることを目標として, 皮下, 腹腔, 静脈の3方法について検討した所皮下注射法は, 早期に局所へ Leproma を必発し, 肉眼的に容易に確実に観察できた。
- 腹腔注射, 静脈内注射では, 早期に病変必発の臓器を見出し難く, 比較的長い経過後に全臓器に病変を発生するので, その判定法も菌分布指数で表わし得る外は, 肉眼的病変を客観性のある具体的な指標に基いて, 表示することが困難であつた。
- 3) 接種菌量は皮下注射では $10^2 \sim 10^4$ Leproma 一乳

剤0.2mlで, 2~3ヶ月で発症するが, $10^6 \sim 10^8$ と菌量が減少するに従つて, 発症に長時日を要する。腹腔内では×50乳剤0.5mlの大量を接種しても3~4ヶ月を要する。静脈内では, 10^2 液0.2 ml, 接種3ヶ月後には約30%に臓器に肉眼的病変を認めた程度であるから, 全部に病巣を証明するまでには更に長期の観察を必要とするであろう。

以上の実験成績より見て, 菌株は同等の Virulence を有する3株の内, 国際性のあるハワイ株を選び, 皮下へ $10^2 \sim 10^4$ 液 0.2ml 接種して3ヶ月間観察するのが最も適当であると思う。

本実験は文部省科学研究費並に大阪結核研究会の援助に依る。終りに佐谷, 谷村両名誉教授の御指導と御鞭撻を深謝いたします。

(文献後掲)