SERIAL PASSAGE OF MURINE LEPROSY BACILLUS IN TESTICULAR TISSUE OF THE RAT AND MOUSE —FUNDAMENTAL STUDIES ON THE CULTIVATION OF HUMAN AND MURINE LEPROSY BACILLI (2)—

Shinji NISHIMURA, Tonetaro ITO, Tatsuo MORI and Kenji KOSAKA

*Department of Leprosy, Research Institute for Microbial Diseases,
Osaka University*

Though it is difficult to determine the generation time required for proliferation of the murine leprosy bacillus in the host because of the influence of complex inhibitory factors and growth factors of the host, it is possible to calculate a rough estimate of the number of days.

The authors inoculated the mouse and rat intratesticularly with a constant number of murine leprosy bacillus, resected the testes after a set interval, emulsified the material, prepared smears, counted the number of organisms microscopically and obtained the following results. As shown in Fig. 1. 7.7 days were required for 1 generation in the mouse testes and 4-5.5 days were required in the rat, as can be seen in Figs. 2 and 3.

マウス及びラットの睪丸組織における 鼠癩菌の世代日数

癩菌, 鼠癩菌の培養に関する基礎的研究 (2)

西村 真二・伊藤利根太郎
森 龍男・高坂 健二*

鼠癩菌の宿主体内における分裂増殖の様相はいまだ多くを知られていないが、宿主体内での発症経過が極めて緩慢でモルモットの結核などに比し更に長期を要する点から考えて、菌の増殖過程も甚だ緩徐であることは想像に難くない。従って今日までに多くの研究家が行なった癩菌, 鼠癩菌の培養実験においても、その観察期間に著しく長時日を費しているのはこれがためである。

鼠癩菌がその増殖にあたり、他の抗酸菌と同様の2分裂の形式をとるであろうことは、占部¹⁾の抗酸菌の分裂形式に関する研究並びに中村²⁾の組織内における鼠癩菌の初期増殖像所見より見てほぼ誤りないであろうが、生体内では宿主の抵抗その他菌の生理的現象に影響を与え

る多くの要素が潜んでいる結果として、その増殖相もまた複雑であろうことが推測されるのである。

著者らがこのような複雑な生体内増殖相のうちから一代に要する日時を推測しようとするゆえんのものは、菌培養への一連の資料を得るためであって、殊に組織培養法の導入による癩菌, 鼠癩菌培養では母細胞と播種菌の一代に要する日時をできるだけ接近せしめることが要求されているからである。以下マウス及びラットを使って試みた実験について述べたい。

実験材料および方法

マウス及びラットにおける菌増殖の好適組織については既に Hanks ら³⁾、中村⁴⁾らの基礎的実験があり、また

*大阪大学微生物病研究所癩研究部 (1962年1月8日受稿)

われらの日常の集菌法においても罌丸組織の勝れていることが明らかであり、更に実験目的から考えてもこの組織が最も好都合であるので、この臓器を選んで接種することにした。その他の条件は次の通りである。

マウス：ddS系 18-22g, ♂, 1群10匹に対し、マウス継代鼠癩菌 *Hawaii* 株の生菌量 0.01mg を生塩水乳剤として左側罌丸へ注射し、第5週までに1週毎に2匹ずつ殺し、接種罌丸を摘出して2個を併せて2mlの食塩水を加えて均等乳剤とした。また健常側の罌丸2個は接種側と同様濃度の乳剤とし、その都度これに0.01mgの菌を加え菌数計算の対照とした。

ラット：実験は2回に亘って行なった。第1回では雑種、150g, 28匹を1群とし、ラット継代鼠癩菌熊本株の新鮮な菌浮游液 0.05ml を両側罌丸に注射し、直後、24時間後及びその後1週間毎に5週まで4匹のラットから1個ずつの罌丸を切除し、1個に対し10%血清水 10mlの割合で少量ずつを滴下しながら乳鉢で充分磨砕し、4個分の乳剤をよく混和してこの均等乳剤について菌数計算を行なった。

第2回目はウイスター系、70g±10g, 8匹を1群とし、同様ラット継代熊本株鼠癩菌浮游液 0.1ml を両側罌丸に注射し、直後および2週毎に6週まで2匹ずつ罌丸を別出し、1個に蒸溜水 5mlの割合に加えて磨砕、乳剤にしたものについて菌数計算を行なった。

菌数計算法

2つの方法を試みた。その1つはブリード氏牛乳中の細菌数計算法の援用で、従来から私ども³⁾が用いている方法である。即ち適当な稀釈乳剤をマイクロピペットにて0.01ml吸取り、よく清拭したスライド上 10mm²の区劃内に平等に塗抹し、孵卵器 (37°C) で乾燥、チールネルセン法で染色、顕微鏡は視野の直径を100分の20.5mmに調節しておく、1視野当り面積が全フィルムの3,000分の1に相当するので、この拡大によって1視野中に見出される菌数を算え上げれば検体1ml中の菌数が次式によって簡単に算出できる。

1 視野平均数×3000×100=1ml中の菌数

この場合、一枚のスライド上3カ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びに塗抹を平等にかつ染色後の水染操作などを慎重に行なうことが誤差を少なくする上に大切な条件である。

いま1つは前法と原理は同じであるが、スメーアの面積を14mm²とし、接眼レンズ筒内に5mm²の枠を設置して1枚の染色標本につき1mm間隔で100視野の菌数を求めるようにした。この方法は一定濃度における一定視野内の菌数を比較するに便利であって、Table 1お

よび2の如く16枚の標本において平均菌数356個の場合、標準偏差は36.7であったから、1枚だけのカウント数を信頼することは危険であるが、標本4枚を1組とした平均値ではその標準偏差7.8であったから、常に4枚の平均数を求めることにした。

上記2つの方法はこれを同一材料に試み毎常殆んど同一の価値が得られた。

Table 1.

Bacillary Counts per 100-fields	Average	Standard Deviation	Bacillary Counts per 100-fields (Average of 4 Slides)	Average	Standard Deviation
397	356	36.7	372	356	7.81
427					
374					
289					
351			355		
379					
332					
359					
276			353		
408					
394					
333					
310			342		
398					
292					
368					

Table 2.

Bacillary Counts per 100-fields	Average	Standard Deviation
361	361	9.66
345		
367		
370		

実験成績

マウスの場合: Fig. 1 に示したように接種直後で1視野6個であったものが1週間後では11.5個, 2週間で

Fig. 1. Changes in the number of murine leprosy bacilli inoculated into the testis of mice

17個に上昇, 6週間で135個を示した。これを log で表わすとはば一直線をなし, 1世代に要する日数を次式によって算出したところ 7.7であった。

$$K = \frac{\log_2 a - \log_2 b}{t}$$

$$\text{Generation time} = \frac{1}{K}$$

K = 発育定数

a = 最高数

b = 最低数

t = 日数

ラットの場合: Fig. 2. では接種直後112個であったものが, 24時間後に約 $\frac{1}{8}$ 強の41個に減じた。これは注射された菌が刺入点より睪丸実質外へ流出したり, または遊走性細胞によって貪喰され睪丸外へ運び去られた結果と考えられる。従って41個という数値は睪丸内へほぼ定着した数をあらわすもので, 以後1週間目では104個を示し, その後毎週対数的な増加を示した。即ち4日以後はほぼ一直線をなし, 2倍増加に要した期間はほぼ4日に相当した。

Fig. 2. Change in the number of murine leprosy bacilli inoculated into the testis of rats

Fig. 3. Changes in the number of murine leprosy bacilli inoculated into the testis of rats

Fig. 3. では出発菌15個のものが2週で109個となり, 6週では4,374個と対数増加を示し, この場合には1世代に5.5日を要した。

考 案

鼠癩菌の生体内増殖曲線は動物の状態、接種の方法、組織の種類並びに菌の Virulence など影響を与える要素が多だけに、これを一概に論ずることはむづかしい。この点に関し林⁶⁾はマウスを使って詳細な研究を行ない、他の臓器に較べて睪丸組織が菌発育に最適で、1世代に要する期間を凡そ7～10日と算定している。Hobby ら⁷⁾は化学療法剤のスクリーニングを行なう上にマウスの腹腔内へ接種した鼠癩菌が脾臓組織内で増殖する標準曲線を求め、これによって薬剤の影響を評価しているが、それによると無処置の場合1世代に要する日数は14.7日を示している。Chang⁸⁾もまた腹腔内へ接種された菌が脾臓に侵入してここに増殖した場合の世代日数を10.7日と算定している。以上の報告に見られる世代日数は、今回私どものマウス睪丸組織で認めたものよりはるかに長時日を要しているが、これは初めに述べたような実験条件の相違に帰着するものであろう。しかしながら鼠癩菌が好適の条件下ではマウスで7.7日、ラットで4～5.5日という比較的短かい世代日数を示したことはこれからの培養実験その他に対して有利な手掛りを得たものといってよいであろう。

結 論

マウスおよびラットの睪丸へ、それぞれマウス継代、

ラット継代鼠癩菌を接種して菌が1世代に要する日時を調べたところ、マウスでは7.7日、ラットでは4～5.5日であることがわかった。

文 献

- 1) 占部 薫：抗酸菌の生物学的研究（その9）
福岡医誌 29, No. 12, 231-255 (1936)
- 2) 中村昌弘：白鼠における鼠癩菌の増殖態度（その1）
レプラ 20, 118-120 (1951)
- 3) Hanks, J. H. and T. Backerman: The tissue sites most favorable for the development of murine leprosy in rats and mice. Internat. J. Leprosy. 18, 185-207 (1950).
- 4) 中村昌弘・志方弘之・新宮正久：白鼠における鼠癩菌の増殖態度（その2）レプラ 21, 231-233 (1952)
- 5) 谷村忠保編・鼠癩, 40 (1953)
- 6) 林喜久夫：人癩菌及び鼠癩菌の動物接種に関する研究 第1報 接種鼠癩菌のマウス体内組織における消長 レプラ 28, 17-23 (1959)
- 7) Hobby, G., J. H. Hanks, M. A. Donikian and T. Backerman: An evaluation of chemotherapeutic agents in the control of experimental infections due to *Mycobacterium leprae* murium. Am. Rev. Tuber. 69, 173-191 (1954)
- 8) Chang, Y. T.: Evolution of murine Leprosy. Am. Rev. Tuber., 79, 805-809 (1959).