Intrajoint Inoculation of *Myc. leprae* and *lepraemurium* to the Mouse

MASAHIRO NAKAMURA AND YUTAKA MITSUFUJI

*Department of Microbiology, Kurume University
School of Medicine*

The fate of *Myc. leprae* and *lepraemurium* followed by the mouse-joint inoculation which had not been attempted before was observed and the results obtained demonstrated that *Myc. lepraemurium* developed well in the foot-joint cavity. The part of the bacillus multiplication was the joint-sack, not joint fluid. No additional effects of mucine, crystal violet, and trypan blue to the bacillary suspension for stimulating the development of the bacilli were observed.

In the case of *Myc. leprae* experiments, there were no increases of the bacilli in this part, when observed direct smear preparations. However, the further experiments should be needed for the determination of the increases of the bacilli, because, in this experiment, the number of bacilli in the materials was not mathematically calculated.

癩菌のマウス関節腔内接種実験

中村 昌弘・光 藤 坦

(久留米大学医学部微生物学教室細菌学講座・指導：中村昌弘教授)

(受付 1965年 8月10日)

種々なるルートにより鼠癩菌をマウスに接種した実験成績¹⁾の中で、足関節腔内接種において鼠癩菌の著明な増菌が認められたことを報告した。
今回は今まで試みられたことのないこの鼠癩菌の関節腔内接種成績の確認とそれに関連した実験、並に人癩菌を足関節内に接種した場合の成績について報告する。

実験材料並に方法

供試鼠癩菌株：ラット継代の鼠癩菌熊本株の接種後5カ月の皮下鼠癩腫より生塩水で菌液を作り、低速心後の上清を接種材料として用いた。この時の菌数は約 $3.7 \times 10^8/\text{ml}$ であった。
供試人癩菌株：国立療養所菊池恵楓園より分与を受けた江口株の結節を無処置のまま生塩水で乳剤とし、その遠心上清をトリプシン消化、デゾキシコール酸ソーダ法²⁾による精製を行って精製人癩菌として接種材料に用いた。菌数は約 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。
菌接種法：上記菌液の 0.01ml を ddマウスの足関節に外側より $\frac{1}{4}$ 針で接種した。正確に関節腔に材料を注入する為の技術の習得は予めレントゲン写真によって確めて

行った。(写真(1)(2)参照)
染色標本作製法：直接塗抹標本は関節周囲の皮膚等の組織を出来るだけ剥離し関節の接合面をハサミで二分し、接合面を直接スライドガラスに塗抹し、乾燥固定後 Ziehl-戸田法³⁾で染色した。
ホモジネイト標本は前者と同様関節周囲の組織を剥離したのち関節、接合面より離れたところより両端を切断し、関節部を残し、これを滅菌乳鉢中ですりつぶし、関節1個当り 0.5 ml の生塩水に浮遊させ、暫く静置し遠心することなく上清を標準白金耳でとりそのままスライドガラスに塗抹し、自然に附着した材料を乾燥させ、固定、Ziehl-戸田染色法を施した。
菌数計算法：菌数は50視野中の全菌数を数え、1視野当りの平均菌数で示した。
供試薬剤：トリパン青 (Merck 製)、クリスタル紫 (和光純薬) 及びグラヌラルムチン (和光純薬) はそれぞれ 0.2%, 0.00002% 及び 0.02% 蒸溜水溶液として使用した。滅菌は低温滅菌によった。

実験成績

第 1 表 鼠癩菌のマウス前肢関節腔内接種実験

接 種 部 位	標 本 作 製 法	マウス No.	接 種 後 の 日 数 (週)						
			0	2	4	6	8	10	12
右 前 肢 肘 関 節	ホ モ ジ ネ イ ト	1		0.3	0.3	3.1	26.3	∞	∞(++)
		2		0.4	0.5	3.7			
	直 接 塗 抹	1	1	2.6	0.8	1.5	1.2	2.8	80.3
		2		0.3	0.4	6.0		∞	
左 前 肢 肘 関 節	ホ モ ジ ネ イ ト	1		0.4	0.5	4.1	11.4	55.7	∞(++)
		2		0.2	0.8	2.3			
	直 接 塗 抹	1	5.3	0.5	0.2	1.0	7.7	∞	∞
		2		1.9	0.6	3.0		9.8	

本研究は昭和39年度・文部省科研 <細菌の動物移植> 総合研究費によった。記して謝意を表す。中村

1. 鼠癩菌のマウス前肢肘関節腔内接種実験

マウスの前肢肘関節腔に鼠癩菌を接種した際の実験成績は第1表の如くである。これによると左右いずれの肘関節腔にも経時的に菌の増殖が認められた。なお、菌の増殖判定には直接塗抹標本よりもホモジネイト標本の方がより規則正しい菌の増殖率を示した。概ね接種後10週目には菌数を数え得ぬ程に増殖する。

2. 鼠癩菌のマウス後肢足関節腔内接種実験

同様の実験を後肢足関節腔内接種によって行った成績は第2表の如くである。即ち、この実験でも足関節腔内において菌の経時的増殖が認められた。前実験と同様にホモジネイト標本の方が直接塗抹標本より菌数の増加が経日的に規則正しかった。

また、対照として後肢外側皮下に接種した場合の菌の増加状況を観察した。鼠癩菌は勿論、皮下組織で増殖したが、増殖度は関節腔内接種の方がすぐれていた。

後肢関節腔内接種と前肢関節腔内接種との良否は第1表と第2表を比較すると、明かに後肢足関節腔内接種の方が菌の早期増殖とその後の増殖度の進展性に関してはまさっていた。これは接種に際して、後肢の方が菌を関節腔内によく注入出来るためであろう。

3. 鼠癩菌の関節腔内増殖

関節腔内に接種された鼠癩菌が関節腔のいずれの部位で増殖するかを見るために切片標本作製して観察した。切片標本は法に従い、ホルマリン固定、脱灰（イオン交換樹脂脱灰法）、脱水、パラフィン包埋後、6μの

厚さの切片標本作製し、染色はZiehl染色後マイヤー染色を行った。なお材料は接種後6週目、10週目の前肢肘関節、後肢足関節を用いた。

第3、4、5、及び6図に示すように、6週目の前肢肘関節においては、菌は骨端部の硝子軟骨部には存在せず、関節囊とりわけ滑膜層と思われる所に多くの抗酸菌を認めた。また関節囊の一部は肥厚しており、同部位に多くの抗酸菌の存在を認め、炎症性変化を呈しているものと思われる。なお観察の結果からは関節腔内の液（滑液）中に抗酸菌が存在したと思わせるような所見は認められなかった。

第7及び8図に示すように、10週目の後肢足関節の切片標本でも、6週目の場合と同様の所見を得た。即ち、関節囊を形成する一部に多くの抗酸性菌を認めるとともに、同部位組織においては、軽度のセンイ化、即ち結合組織の増殖が見られ、楕円或は類円を呈するセンイ芽細胞と組織球、少数のリンパ球、単核細胞、また一部では桿状核白血球の浸潤も認められ、明らかな炎症性反応を示していた。これに反して外側の骨格筋には炎症性変化も菌の集団も認めなかった。また、内側では関節部骨端には抗酸菌、病的変化は全く見られなかった。

4. 発育促進物質の添加効果

発育促進物質としてムチン⁴⁾及び既報⁵⁾において鼠癩菌の発症を促したクリスタル紫を用いた。ムチン或はクリスタル紫を鼠癩菌液に等量を加え、前肢、後肢関節腔内に接種した。対照としては生理的生塩水を用いた。なお

第2表 鼠癩菌のマウス後肢関節腔内接種実験

接種部位	標本作製法	マウス No.	接種後の口数(週)						
			0	2	4	6	8	10	12
右後肢 足関節	ホモジネイト	1		0.1	0	0.4	9.5	∞	∞(++)
		2		0.7	0.3	0.9			
	直接塗抹	1	2	1.5	0.3	3.4	33.8	16.9	33.3
		2		0.3	0	0.6		∞	
左後肢 足関節	ホモジネイト	1		0.3	0	0.3	3.4	87.2	∞(++)
		2		0.1	0	0.4			
	直接塗抹	1	1.6	0.8	1.2	3.7	41.9	48.0	83.7
		2		0.8	0.4	22.7		1.7	
両後肢 外側皮下	ホモジネイト	1		2.6	0.3	0	3.0	∞	∞(++)
		2		0.1	0.3	0.5			
	ホモジネイト	1		1.5	0.4	0.2	21.8	51.2	∞
		2		0.2	0.3	0.1			

第 3 表 鼠癩菌のマウス関節腔内接種

接種部	菌 液 + 等 量 の 下 記 液	接 種 後 の 日 数 (週)						
		0	2	4	6	8	10	12
前肢足関節	Na Cl	0.15	0.1	0.1	0.2	28.6	43.6	∞
	0.02 % ム チ ン	0.2	0.3	0.3	0.8	30.8	12.3	∞
	0.00002 % ク リ ス タ ル 紫	0.18	0.1	0.2	1.0	39.6	∞	∞
後肢足関節	Na Cl	0.22	0	0	0.2	11.8	25.6	31.9
	0.02 % ム チ ン	0.15	0.1	0.3	0.6	4.8	12.5	∞
	0.00002 % ク リ ス タ ル 紫	0.16	0.1	0.4	1.2	3.8	79.4	30.9
足 蹠	Na Cl	0.15	0.2	0.5	3.0	21.1	70.8	45.0
	0.02 % ム チ ン	0.26	0.2	1.2	3.2	38.6	∞	31.6
	0.00002 % ク リ ス タ ル 紫	0.95	1.0	0.3	1.9	7.5	6.3	14.7

対照として足蹠皮下接種も試みた。標本作製はホモジネイト標本を染色した。その成績は第3表の如くである。この成績によると、発症促進物質として加えたムチン及びクリスタル紫は対照に比して著明には菌の増殖を促さなかった。しかし、強いていえば、関節腔内接種ではクリスタル紫の添加は菌の増殖を促進したようであった。そして足蹠内接種ではムチン添加が良好な成績を示した。

5. 人癩菌のマウス足関節腔内接種実験

人癩菌江口株の精製菌乳剤に等量の生塩水、トリパン青⁶⁾、クリスタル紫及びムチンを加えて足関節腔内に接種する実験を試みた。実験成績は第4表の如くである。この際は接種して屠殺するまで150日以上経過した。標本は直接塗抹法による。

これによると散在性抗酸菌がいつれの標本にも見られたが、そのうちのあるものには表示のように非抗酸性桿菌が混在しているものもあった。散在性抗酸菌の量は少く、増菌として判定出来る程度ではなかった。

考 察

ある病原体に対して元来非感受性であるといわれている動物個体の中に感受性組織がかくされている可能性は否定出来ない。適当な方法でその組織に直接、その病原体を到達させ感染を試みることににより、病原体の増殖が行われることがある。神経親和性ウイルスといわれている脳炎ウイルスのマウス脳内接種がその最も良い例である。癩菌の動物実験においてもこの着想は意義なしとは思われぬため、今回は今まで試みられたことのないマウ

第4表 癩菌のマウス足関節腔内接種実験

ライ菌+ 等 量 の 下 記 溶 液	供 試 マウス 数	屠 殺 ま だ の 日 数	剖 検 所 見	増 菌 判 定
生 塩 水	10	171	散在性抗酸菌, 2匹に非抗酸性桿菌	—
0.2 % トリパン青	10	170	散在性抗酸菌, 同時に 多数の非抗酸性桿菌	—
0.00002 % ク リ ス タ ル 紫	11	155	散在性抗酸菌, 5匹に非抗酸性桿菌	—
0.02 % ム チ ン	8	170	散在性抗酸菌, 4匹に非抗酸性桿菌	—

スの関節腔内接種法を試みた次第である。

実験成績によれば鼠癩菌は関節腔内接種により比較的規則正しい増殖を示し、対照として行った皮下接種よりも良好であった。ただこの場合、標本作製にはホモジナイズ標本がのぞましく、直接塗抹では増殖した菌のすべてを把握することは出来なかった。

関節腔内の増殖部位は関節嚢であって、骨端部の硝子軟骨及び滑液中には菌の増殖はなかった。これは癩菌が増殖をするためには、一定の組織に寄生し増殖することの要求を示すものであろう。

次に接種すべき関節腔は後肢足関節の方が前肢肘関節よりすぐれているようである。それは恐らく菌を接種する場合、前者の方がより容易であり、菌が関節腔に直接注入されたものと思われる。

発育促進物質としてクリスタル紫、ムチン、及びトリパン青を用いたが、いずれも期待したような著明な効果

はなかった。鼠癩菌で得た成績を参考にして、人癩菌を用いて同様の実験を行ったが見るべき結果は得られなかった。しかし、この成績判定は単に直接塗抹標本によるのであるので、Shepard⁷⁾が行ったような菌数計測法によれば或は何らかの結果が得られたかもしれず今後の検討にまちたいと思う。

結 論

鼠癩菌を今まで試みられたことのないマウスの関節腔内に接種して、菌増殖の状況を観察した。その結果、鼠癩菌は関節腔ことに足関節腔内においてよく増殖した。増殖した部位は関節嚢の部分であって、滑液中には菌を認めなかった。発症促進物質としてムチン、クリスタル紫及びトリパン青を用いたが見るべき効果はなかった。

同様の実験を人癩菌を用いて行ったところ人癩菌では増殖像を認めなかった。しかしこの判定に際して、菌数計算を試みたわけではないので今後の検討にまちたい。

文 献

1. 光藤坦・中村昌弘：マウスの鼠癩好発部位についての実験，レプラ 34, 287~289, 1965
2. 中村昌弘・上野由恵：鼠癩菌の簡便且つ無菌的集菌法，日本細菌学雑誌，18, 75~79, 1963
3. 戸田忠雄：結核菌及び癩菌染色液の改良と簡易化，東京医事新誌，3064, 3362, 昭和12
4. Wood, W. B. : Studies on the cellular immunology of acute bacterial infections, in The Harvey Lectures 1951-52. P. 87, Academic Press.
5. 中村昌弘：鼠癩菌の生物学的性状に関する研究，第7報 化学的処理の鼠癩菌感染力に及ぼす影響，レプラ 34, 274~278, 1965
6. 太田正雄・日戸修一：人癩及び鼠癩の動物実験，レプラ，13, 120, 1942
7. Shepard, C. C. : The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice. J. Exp. Med. 112, 445-454, 1960

中 村 ・ 光 藤 論 文 附 図

写真1 鼠癩菌，人癩菌のマウス足関節内接種

写真2 癩菌のマウス足関節内接種（レントゲン写真）

第3図 鼠癩菌のマウス前肢肘関節腔内接種による
接種後6週目の増菌所見

第4図 左図組織切片標本の説明図（黒色部菌集団）

第5図 (A)の部の拡大所見

第6図 (B)の部の拡大所見

第7図 鼠癩菌のマウス後肢足関節腔内接種による
接種後10週目の増菌所見

第8図 左図組織切片標本の説明図（黒色部菌集団）