Experimental Inoculation of *M. leprae* into the Hind Foot-pads of Guinea-Pigs

MICHIAKI MAEDA AND KAZUNARI NAKAMURA

(*National Institute for Leprosy Research*)

HIROO KATAYAMA

(*Tokyo Medical and Dental University*)

The multiplication of *M. leprae* in the foot-pads of mice had been recognized in 1965, as reported by C. C. Shepard. The remark of this multiplication, however, must be due to the counting of acid-fast bacillary number in the tissue of foot-pad. If guinea pigs are used for these experiments, the results of skin reaction will be used for the remark in the multiplication of *M. leprae*, because the skin reaction in the experimental infections with acid-fast bacilli can be observed only in guinea pigs. Therefore, the experimental inoculation of *M. leprae* into the foot-pad of guinea pigs has been investigated.

This multiplication in the foot-pads of guinea pigs was not recognized in the experimental inoculation of *M. leprae*, not only with the emulsion of leproma but also with the emulsion of mouse foot-pad tissue, contained *M. leprae*. In the skin reaction provoked by Dharmendra antigen, however, it was found that guinea pigs may be sensitized with *M. leprae* at 5 months after the inoculation.

The above results were discussed on the activity of phagocytosis of foot-pad tissue, and the phagocytosis in guinea pig was stronger than those of mouse.

It may be concluded from the results of this investigation that the successful transmission of *M. leprae* into the hind foot-pad of guinea pig could not be obtained unfortunately.

M. leprae のモルモットへの移植

前 田 道 明・中 村 一 成

(国立多摩研究所)

片 山 博 雄

(東京医科歯科大学)

(受付 1969年1月30日)

M. leprae はマウス足底部組織内において増殖しうることをわれわれはすでに確認しえたので¹⁻⁵⁾, モルモット足底部組織内への *M. leprae* の移植試験を試みた。

実 験 方 法

移植材料としては、結節らい患者のらい結節乳剤それ自身とマウス足底部内で 累代中の *M. leprae* とを用いた。すなわち前者の場合には、型の如く調製したらい結節乳剤をハートレイ系のモルモットの足底部皮下へ接種した後、5 カ月目に接種足底部の組織を乳剤としたもので、その中には 2.5×10^5 コの抗酸菌が含まれていた(これを Gp 株と称した)。後者の場合に使用した菌株は、われわれがマウス足底部接種法によって分離しえた4株および Shepard から分与をうけた2株であった。

調製された乳剤0.3~0.5 ml は、いずれも3~5匹のモルモット足底部皮下へ注射され、感染後4~12カ月の間に一定間隔で接種足底部組織内の抗酸菌が検査された。すなわち、マウスの場合と同様に足底部組織の乳剤が作られ、その塗抹標本中の抗酸菌が鏡検により検索されると共に、乳剤の過半量が小川培地へ接種されて培養試験がおこなわれた。

一方, Dharmendra 抗原および2,000倍希釈旧ツベルクリン液による皮内反応検査が感染後経過を追って数回行われた。

使用したモルモットは、大部分が体重250~350g のもので、雌雄の別なく使用され、また時には生後1週目のものも併用された。またマウスは ddN, SW/A 系のものです、生後4~6週目のものが雌雄の区別なく用いられた。

実 験 成 績

1) らい結節乳剤を移植した場合

らい結節乳剤0.5ml ずつをモルモットの足底部皮下へ

注射し、感染後4カ月目から8カ月目まで足底部組織内の抗酸菌をしらべた。感染後5カ月目に検査した1匹のモルモットに 2.5×10^5 コの Gp 株が鏡検されたが、他のモルモットではいずれの時期でも抗酸菌は証明されなかった。そこで抗酸菌が証明されたモルモットの足底部組織乳剤 Gp 株を健康モルモットの足底部皮下へ次代接種し、累代後4~9カ月間足底部組織中の抗酸菌を鏡検によって検索したが、抗酸菌は証明されなかった。

一方、この Gp 株はマウス足底部へ接種されたが、接種後4~12カ月の間にはマウス足底部組織内に抗酸菌は鏡検法によって証明されなかった。またいずれの組織乳剤も累代時毎に小川培地へ接種され培養されたが、培養可能な抗酸菌は証明されなかった。

次に らい結節乳剤をモルモットの足底部皮下へ注射し、感染後4, 9, 17, 26週目に検査した皮内反応の成績をみると、表1に示す通りであった。モルモット2~3匹の24時間判定時における平均反応値は、Dharmendra 抗原による反応では硬結7.2 mm, ツベルクリン反応では硬結6.8mm が最高であった。

また一方, Dharmendra 抗原およびツベルクリン注射によるモルモット足底部組織内抗酸菌への影響を考慮し、皮内反応検査をおこなわなかったモルモットについて足底部組織内における抗酸菌を接種後3~9カ月の間に検索したが、いずれの時期にも抗酸菌は検出できなかった。

2) マウス累代中の *M. leprae* を移植した場合

いずれの接種材料中にも $10^4 \sim 10^6$ コの *M. leprae* が含まれていたが、感染後9カ月までにはいずれの接種モルモット足底部組織中にも抗酸菌は証明されなかった(表2)。そこで、モルモット足底部組織内でのらい菌の生存能を知るために、接種後4~12カ月目までの間検査毎にマウス足底部皮下へ還元接種をおこなったが、いずれもマウス足底部での増殖は認められなかった。しかし、同時にこれらのモルモットへの接種材料を健康マウスの足底

Table 1: Size of Skin Reaction Provoked by Dharmendra Antigen and Tuberculin in Guinea Pigs Inoculated with *M. leprae*

Weeks after Inoculation	Reading at 24hrs		Reading at 48hrs	
	Tuberculin	Dharmendra	Tuberculin	Dharmendra
4weeks	3.5(2.8)*	4.5(3.5)	2.2(0.5)	6.2(1.0)
9 "	6.5(4.8)	6.6(4.5)	2.3(1.5)	5.3(3.8)
17 "	9.8(4.0)	12.4(5.6)	3.5(2.8)	4.0(3.3)
26 "	16.8(6.8)	9.2(7.2)	2.0(0)	7.8(6.0)

* 3.5(2.8) means 3.5mm in redness and 2.8 mm in induration.

Table 2: Results of Acid-fast Bacilli in the Foot-pads of Guinea Pigs Injected Subcutaneously with *M. leprae*

Strain of <i>M. leprae</i>	No. of bacilli inoculated	Microscopical findings				
		3.0~3.4	4.7~5.0	5.5~5.8	6.7~7.0	8.0~9 Months
Kihara	1.0×10^5	—	—	—	—	—
Fujii-A	5.6×10^4	—	—	—	—	—
" -B	3.5×10^4	—	—	—	—	—
Suzuki	6.5×10^4	—	—	—	—	—
Urashima	1.3×10^5	—	—	—	—	—
SH-O*	5.6×10^4	—	—	—	—	—
SH-I*	1.0×10^5	—	—	—	—	—

* Isolated strain by C. C. Shepard.

Table 3: Size of Skin Reaction Provoked by Dharmendra Antigen and Tuberculin in Guinea Pigs Inoculated with *M. leprae*

Strain of <i>M. leprae</i>	Months after sensitization	No. of guinea-pig	Dharmendra (mm)		Tuberculin (mm)	
			24 hrs	48 hrs	24 hrs	48 hrs
SH-I	1.5	3	4.3 (3.3)*	2.7 (2.0)	6.2 (4.8)	4.0 (3.0)
	2.9	3	6.7 (4.8)	7.2 (4.5)	6.8 (5.3)	4.0 (3.0)
	5.0	2	11.0 (10.0)	9.5 (5.8)	6.8 (6.0)	4.8 (4.0)
Kihara	1.5	4	3.5 (2.5)	2.3 (2.0)	4.0 (3.0)	2.9 (2.3)
	2.9	3	11.0 (8.5)	6.3 (2.0)	13.2 (11.0)	4.1 (3.3)
	5.0	2	13.8 (8.5)	10.8 (6.0)	14.8 (10.5)	6.0 (4.8)
Fujii	1.5	3	5.5 (4.3)	2.7 (2.0)	6.3 (5.3)	2.8 (2.7)
	2.9	3	8.5 (6.8)	8.4 (6.8)	10.3 (9.3)	5.4 (4.3)
	5.0	2	14.3 (12.3)	7.3 (6.5)	7.5 (6.5)	5.3 (4.5)
SH-O	2.9	3	4.7 (3.3)	1.7 (1.3)	8.2 (7.2)	5.8 (4.7)
	5.0	2	16.8 (15.0)	9.3 (7.8)	9.0 (8.0)	9.3 (1.5)
Gp	1.5	4	4.4 (3.5)	3.0 (2.5)	6.0 (4.3)	3.3 (2.5)
	2.9	3	5.3 (3.8)	2.7 (2.0)	9.3 (8.2)	4.0 (3.0)
	5.0	2	12.3 (10.5)	7.8 (6.3)	6.3 (5.3)	5.8 (5.0)

* 4.3(3.3) means 4.3 mm in redness and 3.3 mm in induration.

部皮下へ接種したが、マウス足底部ではいずれも接種後5~7カ月目に明かな菌の増殖が認められた。

一方、マウス累代中の *M. leprae* 含有組織乳剤をモルモットの足底部皮下へ注射した場合の皮内反応の成績をみると、表3に示す通りであった。感染後5カ月目における Dharmendra 抗原による反応の硬結値は8.5~15.0 mm であり、ツベルクリン反応の硬結値は5.3~10.5 mm であった。

3) 加熱死菌をモルモット足底部へ接種した場合

らい患者の結節乳剤を100°C、30分間加熱し、これをモルモット足底部皮下に1匹当たり 2.5×10^5 コずつを接種した。その結果、接種後4カ月目には足底部組織内に $10^4 \sim 10^5$ コの抗酸菌の残存が認められたが、接種後6カ月目の足底部には鏡検上抗酸菌を見出しえなかった。また接種後早期に検査した足底部組織乳剤の塗抹標本では、胞体内に菌がよくとりこまれており、あたかも増殖

像を思わせる所見がみられた。

さらに、マウス累代中の加熱死菌をモルモット足底部へ接種した場合には、接種後2カ月ですでに抗酸菌を認めえなかった。

考 按

マウス足底部組織内での *M. leprae* の増殖については、Shepard, Rees らが報告して以来、われわれも1965年これを確認することが出来たが¹⁻⁵⁾、マウスでの *M. leprae* 増殖の判定は足底部組織乳剤中の抗酸菌数の増減を指標とする以外にその方法が発見されていない現況である。そこで抗酸菌感染症において皮内反応検査をおこない易いモルモットを実験動物に使用しうるのは、菌数の増減以外に皮内反応の検査成績も判定の指標に加えることが考えられるので、モルモット足底部への *M. leprae* 移植試験を試みた。

らい患者結節乳剤を足底部皮下へ接種すると、大多数のモルモットでは接種部位での抗酸菌の増殖は認められなかったが、ただ1匹のモルモットに 2.5×10^5 コの抗酸菌を証明することが出来た。しかし、この Gp 株の累代は不成功に終り、モルモット足底部皮下接種法による *M. leprae* の分離は不成功におわった。一方、初代接種の場合に接種後7カ月目まで皮内反応試験を行ったが、Dharmendra 抗原によって現われた反応では7mm以上の硬結値は認められず、われわれがさきに報告した⁴⁾モルモットでの皮内反応成績から考えて、*M. leprae* の増殖が成立していると思われる所見ではなかった。

また次代へ累代をおこなった Gp 株は小川培地では培養されない抗酸菌であったが、次代接種時に 2.5×10^5 コの菌数が認められたのは、加熱死菌を接種したモルモット足底部組織内の菌数の動きにもみられたように、初代接種時の菌数が 10^8 コと言う大量であったため、累代時にはただ単に抗酸菌が組織内に残存していたものと考えべきであり、この菌の累代が不可能であったことは鏡検された菌が生活力の弱いものか或は死菌であったことを示すものと考えられた。

次に、マウス足底部組織内で累代中の *M. leprae* 6株を接種材料とした場合でも、これらの菌株はいずれもマウス足底部組織内では菌の増殖が確認されたにかかわらず、モルモット足底部組織内では菌の増殖が認められなかった。この実験において、4株の *M. leprae* 接種モルモットについて Dharmendra 抗原およびツベルクリンによる皮内反応を接種後5カ月までしらべた。ツベ

ルクリン反応の場合には明らかな傾向は認められていないが、Dharmendra 抗原による反応では接種後3カ月目より5カ月目の反応値がいずれも大きくなっており、その硬結値が15mmに達したのも認められたことは注目すべき現象であろう。この現象は Gp 株接種モルモットの場合においても認められたのでモルモットを実験動物とした場合、菌接種部位には抗酸菌が証明されないにもかかわらず、Dharmendra 抗原に対して反応を示すようになった事実は、モルモットがマウス組織乳剤を Adjuvant とした *M. leprae* で感作されたことを示すものと考えるべきであろう。

以上の成績からモルモット足底部組織内での *M. leprae* の増殖は不可能と推定されたが、その原因は何によるものであろうか。われわれはさきにマウス足底部に各種抗酸菌の死菌を大量接種すると、あるマウスでは接種後2カ年という長期に亘り抗酸性菌体が残存することを確認することが出来たが、モルモット足底部組織内では接種後6カ月目にはすでに抗酸性に染まる菌体の残存がみられず、接種後早期の像があたかも増菌を思わせる Globi 様の菌塊が食細胞の胞体内に取りこまれている像が認められた。これらの事実は、モルモットの足底部組織内の食細胞が有する食菌能がマウスのそれよりも大であることを示唆するものであろう。従って、菌の发育速度がおそい *M. leprae* は食菌能の大きいモルモットの足底部組織内では破壊されて増菌に至らないために、細胞内での菌の増殖が不可能となるものと推察された。

結 論

モルモット足底部内へ *M. leprae* の移植を試みたが、らい患者結節乳剤を直接用いた場合のみでなく、マウス累代中の *M. leprae* を用いた場合でも、足底部組織内での *M. leprae* の増殖は認められなかった。しかし Dharmendra 抗原に対する皮内反応では接種後5カ月目にモルモットが *M. leprae* によって感作されていることを思わせる成績がえられた。これらの成績について考察を加え、足底部組織の食菌能より考えてモルモットは *M. leprae* の移植動物としては不適当であることを認めた。

文 献

- 1) 丸山孝士：足趾に接種したらい菌に対するマウスの組織反応の特徴、国立多摩研究所研究業績集—創立10周年記念号、(1965)。
- 2) 中村一成・他2名：マウス足趾への人らい菌接種、

- レブラ, **35**(2) : 111-112 (1966).
- 3) 中村一成・他 2 名 : マウス足底への人癩菌接種,
レブラ, **36**(2) : 86 (1967).
- 4) 前田道明・他 3 名 : マウス足底部における *M.*
leprae の増殖, レブラ, **37**(1) : 25-32 (1968).
- 5) 中村一成・前田道明 : C. C. Shepard より分与
された人らい菌株のマウス足底部接種成績, レブ
ラ, **37**(3) : 239-243 (1968).