**Multiplication of *M. leprae* in the Hind Foot-pad of Golden Hamsters—
A Comparison with the Result of *M. leprae* in the Mouse Foot-pad**

KAZUNARI NAKAMURA and SHINJI HISAI

(National Institute for Leprosy Research)

In 1958, Binford claimed the successful transmission of *M. leprae* into the hamster. This work has since been confirmed by Convit et al, Waters et al and Burcart et al.

Therefore, we have investigated the multiplication of *M. leprae* in the golden hamster foot-pad using materials of the passages (isolated by ourselves) and a lepromatous patient (fresh strain). Furthermore, we have tested comparison of differences in the multiplication rate, sex in the hamster and the mouse, and the enhancing effect of cortisone in the hamster alone.

The inoculum was approximately 10^4 per each foot-pad, and the experimental methods were much the same as those reported for mice. Cortisone was given intramuscularly into each hind leg of the hamsters in the daily dosage of 7.0 mg for every 6 days, at the first or at 17th day and 11th week after the inoculation.

First passage in the hamster (i.e. fresh strain to hamster and mouse passage to hamster inoculation): the material examined at 5-40 week after the inoculation with fresh strain and mouse passage showed the counts of acid-fast bacilli similar to those seen in the mouse foot-pad at late stadium, but the number of *M. leprae* in the hamster was greater than that in the mouse at an early stage (approximately 20th week) after the inoculation.

Second passage (i.e. hamster to hamster and hamster to mouse inoculation): the material examined at 24th week after the transmission with the first passage in hamster showed the counts of acid-fast bacilli similar to those of the passage.

An attempt to cultivate the bacilli in Ogawa's medium gives negative result. In the case of the inoculation with *M. lepraemurium* into the hamster foot-pad, the sites of inoculation produced the nodular swelling with the inocula of different sizes growing to a swelling of between 7.5×10^8 and 5.0×10^5 bacilli per foot-pad. The details are shown in Table 3.

In addition, the number of *M. leprae* was occasionally greater in the male mouse than in the female, while it was less in the male hamster than in the female, the results being similar to those seen in thymectomized hamster and mouse, as reported elsewhere.

The number of *M. leprae* in the hamster foot-pad rose to a plateau level of approximately 10^6 bacilli. Therefore, they showed that it was in fact possible under these conditions to produce a limited multiplication resembling those in the mouse foot-pads. On the other hand, the number of bacilli in the cortisone-administered hamster rose to a plateau level at an early stage after the inoculation, the fact also being similar to that of the mouse, as described elsewhere.

ハムスター足底部へのらい菌接種

—マウス足底部における成績との対比—

中 村 一 成・久 井 伸 治

(国立多摩研究所)

(受付 1969年5月2日)

本邦でえられた *M. leprae* の野生株および, Shepard からの分与菌株を用いてマウス足底部への累代の可能性の有無を検討したところ, 累代が可能なことを, われわれは確認し得た^{5,6)}。そこで, 主として, これら累代菌株を用いて異種動物に接種し, らい菌により感受性の高い実験動物を現在開発中で, すでにその一部の動物の感受性の有無については報告してきたが³⁾, 本報では, ハムスター足底部へらい菌を接種した成績を, マウス足底部接種成績と対比しながら検討を加えたので報告したい。

実験方法

ハムスターはゴールデンハムスターの生後3週のものを用い, *M. leprae* 菌株接種後の菌数検査材料はかならず健康な生後4~6週の ICR, ddY-F マウスへの還元接種すると同時に小川培地を用いて培養可能な抗酸菌の有無を検討した。また接種方法・菌数計算法(平均菌数 $\times 2.5 \times 10^5$ コ = 1 足底組織中に含まれる総菌数)・飼育温度などはマウスの場合と同様の方法に従った⁵⁾。

そらい菌(ハワイ株)も同様ハムスター足底部皮下へ接種し対照とすると同時に cortisone を投与した群もにおいて, らい菌増殖増強の有無を検討した。cortisone は〔注射用 Solu-Cortefu〕を 7 mg/日ハムスター大腿部筋肉内に1週間に6日間連続投与した。

また, 死菌対照として接種材料の一部を加熱(100°C, 30分)したのを用いた。

実験成績

1) マウスで累代中の *M. leprae* 菌株をハムスターに接種した場合: 図1に示す鈴木株は接種菌数 1.2×10^4 コをマウスおよびハムスター足底部皮下に接種し, 対照として同一材料の一部を加熱し同様に足底部皮下へ接種した。さらに, cortisone を生菌接種群の一部ハムスタ

Fig. 1 Growth curves of Suzuki strain of *M. leprae* in the right hind foot-pad

一大腿部筋肉内に菌接種後直ちに1日7mg ずつ6日間連続投与した。また, 足底部菌数検査時はハムスターは2匹, マウスは3匹を殺した場合の平均値をもって菌の増殖曲線を表示した。死菌の場合は各動物1匹ずつの成績でいずれの時期も鏡検上抗酸菌は見出されなかった。さらに, ハムスター足底部組織内から接種後20週目に得られた材料を健康なハムスターおよびマウス足底部へ還元し, 接種後24週目の各動物の足底部菌数を検討したところ, 1代目と同様 $10^5 \sim 10^6$ コの菌数が得られた。

cortisone 接種群は菌接種後20週前後では無処置群と明らかな菌数の差がみられた。いずれにしろ, マウス足底部へ菌を接種した場合とハムスター足底部へ菌を接種し接種後40週目の菌数ではほぼ同様の菌数が得られたが, 菌接種後20週目の成績ではややハムスターがよい成績であった。小川培地を用いて, 菌数検査時の材料の一部を還元培養したが, いずれの時期の材料からも培養可能な抗酸菌は得られなかった。

Fig. 2 Growth curves of Kihara strain of *M. leprae* in the right hind foot-pad

同様の実験を木原株を用いて検討した成績を図2に示してあるが、この場合の接種菌数は各動物 9.3×10^8 コで、前者の鈴木株との違いは、cortisone を菌接種後17日目から6日間とさらに11週後6日間投与した群をおいたことと、死菌対照をハムスターだけに限ったことで、この図からも明かなごとく菌接種後20週前後の成績はややハムスターの方がよい成績であったが、接種後30—45週目ではほぼ同様の成績であった。cortisone 投与群は2回接種したにもかかわらず、前者と同様接種後早期に接種菌数以上に達したが、接種後30週以降では他の群とほぼ同様の菌数であった。また、小川培地への還元培養は陰性で、接種後17週目の cortisone 投与群の材料を健康マウスおよびハムスターへ還元接種した場合、接種後24週の成績では各動物初代とほぼ同様 10^6 前後の菌数が得られた。

さらに、菌数を代えて SH-0 株 (接種菌数 1.1×10^4) で検討した成績が図3であるが接種後早期の成績だけは前2者よりややよい成績を得ることができ、ハムスターではマウスより菌接種後早期に接種菌数以上に達する成績を再確認した。

2) 治療中の患者材料、野口株を接種した場合：接種菌数は各動物 4.2×10^4 コで菌接種後24週目の成績ではマウスの場合 1.5×10^6 コ、ハムスターの場合は 5.8×10^5 コの菌が得られた。

3) 性別との関係：最近2年間に供試した無処置群マウスを菌株・系統などを区別することなく、らい菌接種後4～8カ月の足底部菌数について接種菌数以上に増殖

Fig. 3 Growth curves of SH-O strain of *M. leprae* in the right hind foot-pad

をみたもの総数 331例の性別差を検討することとした。

足底部菌数を雌雄別に対数変換をおこない、累積百分率値を確率紙上にプロットすることによって図4のように、ほぼ直線上にならび、対数正規型に極めて近似した分布を示した。ちなみに、雌雄の成績を総括した場合は、菌数の多いところで歪度が大きくなり、このような分布型はえられず、母集団を異にする宿主側の要因、すなわちマウスの性別によるらい菌感受性の差異が存在するものと推定された。また、これらの代表値は表1に示されるが、対数変換値について両者の標本分散 (s^2) ならびに平均値 ($\bar{x}$) を比較すると、雌の比較的安定した成績にくらべ雄の足底部菌数に変動が大きく有意差 ($P: 0.05$) が認められた。ただし、平均菌数では雄がやや高いものの、推計学的には性別による差がみられなかったが、このことは雄の場合に菌数の多いものと少ないものとの個体差が雌より大きく、これらの値が平均化されたためであろう。

さらに、SH-3 株 (接種菌数 1.7×10^4 コ) を用いてのマウスおよびハムスターの菌接種後24週目の性別・種別差では、表2に示すとおりでマウスの場合は雄の方がややよく、ハムスターの場合では雌が雄よりややよい結果をえた。また、種別では、実験(1)でも明らかにしたごとく、ハムスターの方がマウスよりややよい成績であった。

4) そらい菌を接種した場合：接種菌数は 7.5×10^8 コと 5.0×10^5 コの2種類を用いて、マウス (ddY-F) の雌

Fig. 4 Distribution of yield of *M. leprae* in foot-pad of male and female mouse plotted on the norml probability paper

Table 1. Statistical difference of yield of *M. leprae* in the foot-pad by mouse sex

Sex	N	$\bar{x} + 2\sigma\bar{x}$	$\sigma^2(\log)$
male	202	$(5.7 \pm 0.22) \times 10$	*4.041
female	129	$(4.2 \pm 0.21) \times 10$	*3.857

* : $\Pr\{F > F_s = 1.414\} < P(0.05)$

およびハムスターの雌の足底部皮下に接種した場合の成績を表3に示した。表中の分母は観察匹数で接種後5週と14および40週目の分母の差は菌接種後死亡したためであるが、いずれにしろ、マウスよりハムスターの方がやや良好であるといえよう。なお、分子の方は明らかに足底部の腫脹のみられたもののみを記載した。また、マウスで40週目でも足底部腫脹のみられなかつた2匹中1匹は乳癌の併発、他はいわゆる Wasting 症候群類似の症状のものであつた。さらに、足底部腫脹の度合はマウスの場合は足底部の腫脹が進行すると足（趾）関節部の腫脹が必ずみとめられる様になり上向性へと病変が進展するマウスが多くみられたが、ハムスターの場合は足底部の腫脹のみに限定される場合が多かった。このことはそ

Table 2. Effect of sex and yield of SH-3 strain in mice and hamsters at 24 th week after infection

Sex	Name of animal	Yield of acid-fast bacilli in the right hind foot-pad
male	mouse	5.0×10^4 , less than 10^3 , 9.8×10^6 , 1.5×10^5 , 6.6×10^5 , 2.1×10^5 , 1.0×10^6 , 3.5×10^5 , 5.2×10^5 , 2.6×10^5 ,
	hamster	5.5×10^5 , 2.5×10^4 , 3.2×10^5 , 1.1×10^5 , 7.5×10^5 , 9.2×10^4 , 8.8×10^4 , 1.6×10^6 , 5.4×10^4 , 4.5×10^5 ,
female	mouse	9.1×10^4 , 7.5×10^4 , 5.8×10^4 , 4.2×10^3 , 1.4×10^5 , 7.2×10^4 , 5.7×10^4 , 2.3×10^5 , 1.0×10^6 , 7.8×10^5 ,
	hamster	8.1×10^4 , 1.3×10^6 , 5.8×10^5 , 1.5×10^6 , 2.5×10^6 , 3.3×10^6 , 1.0×10^5 , 1.0×10^5 , 1.0×10^6 , 7.0×10^5 , 2.1×10^5 , 3.9×10^6 ,

Table 3. Effect of nodular swelling of the right hind foot-pads in mice and hamsters by different inoculum (*M. lepraemurium*)

Name of animal	sex	inoculum	Weeks after inoculation			
			5	10	14	40
Mouse (ddY-F)	female	7.5×10^8	5/8	7/8	7/7	3/3
		5.0×10^8	0/8	1/8	5/8	*3/5
Hamster	female	7.5×10^8	3/3	3/3	3/3	—
		5.0×10^8	0/4	2/4	4/4	—

* No swelling 2 mice ;

I mouse-complication with mammary cancer.

I mouse-like a wasting disease.

らい菌に対する種属特異性とも考えられる結果であった。

考 按

Binford¹²⁾はShepardより以前に実験動物とくにハムスターの耳朶などへらい菌を接種し陽性の結果を報告した。彼はつぎのような作業仮説すなわち、らい菌は人の場合頸症部が低体温部であることから耳朶などを用いると成功するだろうという考えであつた。この陽性成績はConvitら⁴⁾、Watersら¹¹⁾、Bourcartら⁹⁾によりすでに確認された。また、ハムスター足底部への移植はWatersら^{4,11)}の報告もみられるが、これらの実験成績では接種後初期の成績の詳細な報告とマウス足底部接種後の初期の成績との比較がみられず、接種後後期の成績が多く報告されているようである。そこでわれわれは、これら諸報告の確認と接種後早期のマウス足底部接種方法との比較検討をも同時に加えたところ、明らかにハムスター足底組織内でもらい菌が増殖することを明確に示えたと同時に、ハムスター足底組織内増殖能はマウスの場合より早期に接種菌数以上に達することを知った。しかし諸報告^{4,11)}にもみられるように静止期後の菌数はマウスの場合とほぼ同様の成績であって、ハムスター足底部でのらい菌増殖はマウス足底部と同様一定限度の増殖と考えられた。また、これら菌数検査時の菌株は小川培地による培養を実施したが、確実に培養可能な抗酸菌は証明されず、足底部の肉眼的腫脹はみられなかった。さらに、*M. lepraemurium*接種では足底部の腫脹がみられたことおよびマウス足底部で得られた成績とを考えると、明らかに*M. leprae*と同定されよう。従つて、ゴールデンハムスターも*M. leprae*にマウスと同

様感受性ある動物であることを示唆している。

一方、cortisone投与群では、すでにマウスを用いての実験でみられたごとく^{5,6)}、接種後早期に、ゴールデンハムスター足底部組織内に、接種菌数以上の*M. leprae*がみられたことから、*M. leprae*を増強させる一方法であることが判明した。加えて、宿主側の諸因子を究明するために、現在種々検討中であるが、本報では、性別についてやや詳細に推計学的に検討したところ、明らかにマウスの場合では雄の方が雌よりも個体差は大きい足底部菌数の多いマウスがみられた。ハムスターの場合は逆にやや雌の方がよいようであった。このことはすでに明らかにした⁹⁾ごとく、胸腺摘出ハムスターに男性ホルモンを投与した足底部菌数は顕著に増強されていた成績からもうなづけよう。また、同時にそらい菌を用いた場合でもマウスの場合は雄の方がややよい成績が得られ、かつ、乳癌併発マウスが人らい菌およびそらい菌接種に関係なく多くの場合菌数が少なかったことより、性別も重要な因子と考えられた。また、Wasting症候群類似の症状を呈したマウスでは菌数のバラツキが顕著であつたことより、今後さらに免疫生物学的研究が必要であることは論を待たないが、これらの点を現在鋭意検討中⁹⁾でこの成績の一部については別報で詳細にしたい。いずれにしても、“実験的らい症”ともいえる全身的病変を呈しうる実験動物をReesら¹⁰⁾の胸腺摘出・X線照射マウスで得られた成績を考慮しながらハムスターを用いて開発中であるので、この実験成績もその機作を明らかにするであろう。

結 語

ハムスター足底部の*M. leprae*を移植すると明らかに一定限度の増殖がみられたことよりハムスターもマウスと同様らい菌にやや感受性の高い動物であることを再確認した。また、cortisone投与により、足底部菌数が接種後早期に接種菌数以上に達したことにより、らい菌増殖増強の一方法であることを知った。さらに、ハムスターはマウスよりも接種後早期に静止期にはいることも判明した。一方、そらい菌をも併用して、宿主側の要因の一部について検討を加えたところ、マウスの場合は個体差はあるが雄の方が足底部菌数が多く、ハムスターの場合は雌の方がややよい結果を得たのでその一部について考按を加えた。

(なお、本論文の要旨は第17回日本癩学会東部地方会にて口演した。)

文 献

- 1) Binford, C. H. : Histiocytic granulomatous mycobacterial lesions produced in the golden hamster (*Cricetus auratus*) inoculated with human leprosy, *Internat. J. Leprosy*, **26**, 318 (1958).
- 2) Binford, C. H. : Transmission of *Mycobacterium leprae* to animals, Nerve involvement in the ears of hamsters, *Internat. J. Leprosy*, **33**, 865(1965).
- 3) Bourcart, N., Destombes, P. et al. : Experimental transmission of human leprosy of the golden hamster, *Internat. J. Leprosy*, **34**, 351(1966).
- 4) Convit J., Lapenta, P. et al. : Experimental inoculation of human leprosy in laboratory animals. I. Clinical, bacteriologic and histopathologic study, *Internat. J. Leprosy*, **30**, 239(1962).
- 5) 前田道明・中村一成他 2 名 : マウス足底部における *M. leprae* の増殖, レブラ, **37**, 15(1968).
- 6) 中村一成・前田道明 : C. C. Shepard より分与された人らい菌のマウス足底部接種成績, レブラ, **37**, 239(1968).
- 7) 中村一成・久井伸治 : ハムスター足底部の人癩菌接種—マウス足底部における成績との対比—, レブラ, **37**, 351(1968).
- 8) 中村一成・久井伸治 : マウスおよびハムスター足底部におけるらい菌増殖増強法の検討(続報), 第42回日本癩学会総会, (1969).
- 9) 中村一成・久井伸治 : ハムスター足底部におけるらい菌増殖増強法の検討—胸腺摘出後テストステロンを投与した場合—, レブラ, **38**, 45(1969).
- 10) Rees, R. J. W., Waters, M. F. R., et al. : Experimental lepromatous leprosy, *Nature*, **215**, 599(1967).
- 11) Water, M. F. R. and Niven, J. S. F. : Experimental infection of the golden hamster with *Mycobacterium leprae*, *Internat. J. Leprosy*, **33**, 297(1965).