Experimental Transmission of *M. leprae* in Mice Treated with Anti-lymphocyte Serum

KIYO SUSHIDA and MARIKO WAKAI

(Department of Microbiology, Tokyo Women's Medical College, Tokyo)

Anti-mouse (C3H/He) ALS was used severally for immunosuppressing four different strains (C3H/He, IH-F, IB-F & ddy) of mice, and then leprosy bacilli taken from lepromatous patients were inoculated into their testes.

When the strain of mice was the same as in the ALS (C3H/He), they lived less than 6 months after the leprosy bacilli inoculation. Despite this, they lived for a long times on the skin graft transplantation (3, 4). That is, these ALS treated mice might be more wasting to these bacterial infection than the skin transplantation tests.

The positive data in the present examination were that the acidfast bacilli were found to be abundant intracellularly, as globi (+G). The effects of C3H/He-ALS were different as far as their mouse strains are concerned: The ddy mice injected with ALS and infected with leprosy bacilli had an antipodal reaction to that of C3H/He mice. However, both C3H/He and ddy mice were negative to infection (+G) of leprosy bacilli. In the hybrid mice, IH-F mice originated from C3H/He were similarly reactive to ALS and leprosy infection to C3H/He mice, and IB-F mice originated from C37BL/6 survived for 8 months longer than the C3H/He groups, and many AFB-loaded cells were observed in these testes.

抗リンパ球血清投与マウスへの人らい菌接種実験

須子田キヨ 若井真理子

(東京女子医科大学 微生物学教室)

(受付: 1979年1月19日)

抗リンパ球血清 (ALS) が移植免疫を抑制することはすでに知られている。また ALS を注射して動物へらい菌を接種した実験の報告もある^{1,2)}。かかる実験においては被検動物と同系統マウスリンパ球から得られた ALS が用いられている。異種動物からの ALS の利用は臨床の必要性から移植免疫に関する研究が多い。異種動物のリンパ球から得られた ALS の細胞性免疫の抑制力は同種からのものに比べてやや低下することはあっても充分利用し得ると報告されている^{3,4,5)}。従ってマウス

由来の ALS を同種の異系統マウスに用い、人らい菌接種実験を行うことは同系統マウスの場合とほぼ同様の結果が得られるであろうと考え、C3H/He マウスリンパ球由来の ALS を C3H/He マウスおよびこれと系統を異にするマウスに注射して、人らい菌接種実験を行った。

実験方法

抗リンパ球血清 (ALS) は C3H/He マウスの腸間膜リンパ節より採取したリンパ球を抗原とし、ウサギに注

射して得られた。製作日を異にする4つのALSが用いられた。即ち#65, 72, 73, 91で、単一或いは2種を混合して用いた（これらのALSは本学心臓血管研究所千葉智世教授より分与）。いずれのALSも同系統マウスに注射すると、末梢リンパ球数を約10%減少させ、C57BL/6マウスの皮膚片をALS投与C3H/Heマウスの背部に移植すると、移植皮膚片の生着日数は、無処置対照群の3倍以上の延長がみられる^{3,4)}。

ALS注射量および方法は、本実験の初期には、上記皮膚移植実験に倣い、菌接種前にALS 0.25ml 宛毎日数日間、背部皮下に注射した。人らい菌接種後は同量を、第1週目は隔日、第2週目は週2回、第3週以降は週1回宛を被検マウスの死亡するまで注射した。しかし皮膚移植実験においては成功であったこのようなALS投与方法では、同系統のC3H/Heマウスにおいては、人らい菌接種後早期に死亡したためその後の実験においてはALS量を減少し、1回注射量を0.2ml, 0.15ml および0.1ml とした。なお、途中から0.05ml とした例もあった。

被検マウスは同系統C3H/Heマウスの他、ddy, IB-F, およびIH-Fの4系統を用いた。IB-Fは(ICR♀×C57BL/6♂)の混血で、(兄妹交配で維持している)野生色マウスで約8交代配のものである。IH-Fは(ICR♀×C3H/He♂)の混血で同じく野生色のマウスである。いずれも当教室にて試作した雑種で、生後1.5カ月以上の成熟オスマウスを用いた。各組ともALS注射群と、非注射の対照群とに分けた。

らい菌接種、使用菌はLL 38, LL 39, LL 46, LL 48, LL 49, LL 50, およびLL 55の7株で、いずれもらい腫瘍患者から採取されたものである。結節は乳鉢にて摺り、生食水にて乳剤とし、粗大組織片を除去した後、接種菌数が10⁴個の抗酸菌となるように希釈したものを左右の精巢に分けて接種した。また別に一部皮下に接種したものもあった。早期に死亡したものについてはらい菌接種成績から除外し、6カ月以上生存したマウスにおける成績を採用した。抗酸菌の検出法は従来行ってきた方法と同様に、菌接種部の精巢断面のスタンプ標本について、判定の基準としては細胞内に増殖とみられる抗酸菌(globi)のあるものを陽性とした。皮下接種したものでは同様に皮下組織の伸展標本について実験した。陽性の一部のものについては組織標本によって主として菌の増殖部位について検討した。

実験成績

ALSを注射し、らい菌を接種したマウスの生存日数を表1に示した。ALSと同系統C3H/Heマウスにおける生存日数は異系統マウスのそれに比べて早期に死亡するものが多く、同系統、異系統間に差のあることがみとめられた。

即ち実験1から5において用いられたC3H/Heマウスでは6カ月以上生存するものがなく、本実験成績を得る目的を達することはできなかったが、用いられたALSはそれぞれ#65, 73, 91, および65+73の混用、などがあり、また接種されたらい結節もそれぞれLL

Table 1 Survival Times of various Strains of ALS-treated Mice inoculated with *M. Leprae*

Mouse strain	No. of examin.	Survival day*	ALS (C ₃ H/He)		M. Leprae (LL)
			Dose/day	Batch	
C3H/He	1	19	0.2 ml	#65	48
	2	89	0.25	73	39
	3	165	0.25	91	46
	4	151	0.15	65+73	50
	5	168	0.1	65+73	49
IH-F	7	(60)240<	(0.1)0.05	73	55
IB-F	5	235	0.1	65+73	49
ddy	2	255<	0.25	73	39
	6	265<	0.25	65+72	38

*....The last survival day of the ALS-treated mouse inoculated with *M. Leprae*.

Fig. Comparison of the survival days in the mice, ALS-treated and injected with *M. leprae*: ---- C3H/He & ---- ddy mice injected ALS (#73, 0.25ml) and LL 39 of leprosy bacilli on the exp. 2; C3H/He & ---- IB-F mice injected ALS (#65+73, 0.1ml) and LL 49 on the exp. 5.

39, 46, 48, 49および50であって、生存日数の長短を比較することはできなかった。しかし No. 2 と No. 5 では同じ ALS と同じ菌株をそれぞれ同量注射したので、この際の C3H/He マウスと他の系統マウスとの生存日数の差異を図に示した。

図に示すように実験2では ddy と C3H/He マウスに #73 の ALS 0.25ml 宛注射し、同一菌株 (LL 39) が同量ずつ接種された。両者の生存日数を比べると、ALS と同系統の C3H/He マウスでは最も長期に生存したものは89日であったが、ddy は長期にわたり生存し255日目に屠殺した。実験5では (#65+73) ALS を0.1ml 宛注射し、LL 49株が接種された。C3H/He マウスでは

1匹のみが168日まで生存し、IB-F マウスでは235日まで生存した。

らい菌接種成績は、LL 38, LL 39株を接種した ddy 系マウスと、IB-F マウスの LL 49株を接種したものにおける成績を表2に示した。これらのマウスはいずれも異系統マウスのものである。LL 38株接種の ddy マウスでは ALS 注射群では11匹中6匹が265日目屠殺するまで生存した。接種部の皮下組織伸展標本中に抗酸菌のみとめられたのは ALS 群で6匹中1匹に少数の抗酸菌をみとめた。対照群では同じく皮下組織伸展標本中の細胞内に抗酸菌をみとめるものが11匹中1匹あった。

なお LL 38株は再燃未治療患者から採取された結節で、菌は染色性の良好な杆状の抗酸菌を多数検出されたものである。同じく ddy マウスで LL 39株接種実験では ALS 群では10匹中5匹、対照群では10匹中8匹が生存し、255日で屠殺し抗酸菌の検出を行ったがいずれも陰性であった。この LL 39株の結節は3年前かららいが発症していたが治療を行っていない、未治療患者からのものである。

LL 49株接種実験では ALS 量を0.1ml としたためか C3H/He マウスでも5.5カ月まで生存した。死亡マウスについてはすべて検査を行ったが抗酸菌は検出しなかった。IB-F マウスでは6カ月後に3匹が死亡し、そのうち1匹に globi を含む抗酸菌を証明したが、これら globi は未だ少数であった。7カ月後と、8カ月後にそれぞれ1匹ずつが死亡した。いずれも接種部に globi をみとめた。組織標本によって、精巣被膜下および間質に抗酸菌をみとめた。8カ月後に死亡したマウスでは写真に示ように抗酸菌の増殖により間質は増大し、精巣実質の圧迫崩壊を示す部分もみとめられた。8カ月に屠殺した5匹の対照マウスはいずれも陰性であった。LL 49株は以

Table 2 Experimental Transmission in ALS-treated Mice with *M. Leprae*

Mouse strain	No. of examin.	M. Leprae (LL)	Survival months	AFB(+G) in Testes of Mice	
				ALS-treat.	Non-treatment
IB-F	5	49	6 died	1/3	
			7 "	1/1	
			8 "	1/1	0/5 (killed)
ddy	6	38	9 killed	*1/6	*1/11 "
	2	39	8.5 "	0/5	0/8 "
IB-F	7	55	8 "	0/2	0/4 "

* AFB (+G) were found in subcutaneous tissue of mice by spread tissue preparations.

前に治療したことはあるが結節採取前6カ月間は無治療という患者からのものであった。

LL 55株接種の IH-F マウスは5匹中3匹が、2カ月で死亡したので ALS 量を0.1ml から0.05ml 宛に減量したところ、8カ月目屠殺するまで生存し得た。しかし抗酸菌をみとめることはできなかった。また対照の4匹中1匹は11カ月で死亡、12カ月まで生存したものを屠殺したがいずれも陰性であった。LL 55株は再燃未治療患者由来の菌であるが、接種に用いた抗酸菌の染色状態は

悪く、ほとんど顆粒状のものが大半をしめていた。

考 察

細胞性免疫抑制の目的で抗リンパ球血清を用いることは基礎研究の目的のみならず、臨床移植免疫の抑制法としてすでに応用されている。らい菌は細胞内感染増殖 (globi) を特徴とするので、ALS をマウスに注射してらい菌接種を行った。用いた ALS は C3H/He マウスリンパ球由来のものであったが、同系統マウスを用いた

Fig. 1 & 2 Acid-fast bacilli (globi) in the stamp-smear sample of testis of ALS-treated IB-F mouse 8 months after inoculation with LL 49 leprous bacilli; 1-100x & 2-1000x magnification. Ziehl-Neelsen stain.

Fig. 3 & 4 Lesion in the testis of above mouse; 3-35x & 4-1000x magnification.

Fig. 5 Skin transplantation on the IB-F mouse, survived over 90 days.

実験では前述の如く6カ月以上の生命を維持することができず、らい菌接種実験における結果は得られなかった。参考として6カ月以内に死亡したマウスについてもすべて抗酸菌の検索を行ったが、散在性の少数の菌をみとめることはあっても増殖像とは考えられず従ってすべて陰性とした。ALSを注射し、皮膚移植をほどこしたものの⁹⁾、およびALS非注射でらい菌のみを接種したC3H/Heマウス(LL39株接種では9カ月で、LL50株では8カ月で屠殺した。LL46, 48, 49株ではALS注射群死滅後屠殺した)では長期に生存し得たので、らい菌接種の場合に6カ月以前に死滅した理由は明らかではないが、強い免疫抑制をうけているので、少なくともヌードマウスに準じた無菌飼育を行うならば長期の観察が可能となりよい成績が得られるかも知れない。

これに比べて異系統マウスでは、同系統マウスに比べて恐らくは免疫抑制作用がそれ程強くなく、従って上記接種材料による毒作用も弱く、ほどほどに抵抗性を低下できたIB-Fの如きマウスではらい菌の増殖に必要な程度の期間長命を得、陽性成績を得たものとする。しかしdd系ではこれより更に延命し得たが、このことは有効な免疫抑制作用が得られなかったと考えられ、実験結果もすべて陰性であった。IH-FマウスはALS0.1ml宛注射して実験を初めたが早期に死亡し、その傾向は同系統のC3H/Heマウスのそれに類似の様相を示した。このIH-FはC3H/Heをオスとして交配して得られたもので色も野生色であったので同様の因子を持っているのではないかと推定された。それ故、実験の途中からではあったが、ALS量を0.05ml宛として減量したところ、その後死亡するものなく、240日で屠殺するまで生存した。しかしこの量では免疫抑制をうけるには充分でないと思われ、その実験成績もすべて陰性であった。

異系統マウスのうちglobiをみとめたのはIB-Fのみであった。新たに兄妹交配を行いIB-F3代目のマウスを得て、これにC3H/Heマウスの皮膚移植を行ったところ、移植皮膚片の生着日数は90日以上に及んだ(Fig. 5)。

患者材料からのらい菌をマウスに接種する場合には、菌の側のマウスに対する感染力に差のあることを著者らは発表したが⁷⁾、ALSを用いる場合にはマウスの系統によって免疫抑制の程度に差があつて、免疫抑制力の強いと思われた同系統C3H/Heマウスでは長期に生存し得ず、逆に生存し得たdd系マウスではほとんどその影響がみられないという結果であった。IB-Fはその中間

で、好結果を得たものとする。しかし適当なALSと被検マウス、そして感染力のあるらい菌という3つの組合せを容易に得るといふことは困難なことかも知れない。しかしそのうちいずれかを一定にすることができれば実験目的によっては有効な方法と考える。

ALS注射によるらい菌感染のマウスの組織における増殖像は、従来著者の行つて来たらい菌に対するマウスの抵抗性を抑制する方法、即ち¹³¹I注射^{8,9)}、放射線照射¹⁰⁾処置等の感染陽性マウスのそれは、ALSの場合とほぼ同様であつて、抗酸菌は接種部の精巣被膜および被膜下、更に間質へと拡がり、菌増殖による間質の拡大に伴い、精細胞の圧迫崩壊がみとめられた。胸腺欠損のヌードマウスの如く、精巣接種により全身感染をみとめるもの¹¹⁾はなかったが、リンパ節、脾臓、精巣部の脂肪体中に抗酸菌を貪食した単細胞を多数みとめるものはあつた。

結 論

抗リンパ球血清(ALS)をこれと同系統(C3H/He)マウスおよび異系統マウス(IB-F, ddy, IH-F)に注射し、らい菌接種を行い、6カ月以上生存したものについてらい菌感染の有無を、主として細胞内増殖(globi)を基準として判定した。

その結果、C3H/Heマウスでは皮膚移植実験に使用可能であつたALS注射量(0.25ml)および減量(0.1ml)、いずれの場合も6カ月以上生存できず、従つて実験結果は得られなかった。

ddyマウスでは0.25ml注射量でも9カ月以上生存するものがあつたが、反面免疫抑制が示されず、らい菌の感染は陰性であつた。IH-FマウスはC3H/Heをオス親とするせいか、C3H/Heと同様の傾向を示し、陽性成績は得られなかった。IB-Fマウスは菌接種後8カ月に死亡したマウスの接種部精巣に多数の抗酸菌(globi)を証明した。

本研究費の一部は昭和52年度日米医学研究協力、らい部門研究費によつた。本研究要旨は昭和52年5月18日、第50回日本らい学会総会(仙台市)にて発表した。らい菌結節を分与下さいました国立全生園の各位に感謝致します。

文 献

- 1) Gaugas J. M.: Enhancing effect of antilymphocytic serum on mycobacterial infections, *Nature*, **219**: 408, 1968.

- 2) Fieldsteel A. H. and S. Gartner: Effect of thymectomy and antilymphocyte serum on mycobacterium leprae infection in mice, *Infect. Immun.*, **12**: 733, 1975.
- 3) 千葉智世, 泉二登志子: 移植免疫抑制剤としての抗リンパ球血清, 東京女子医大誌, **41**: 405, 1971.
- 4) 泉二登志子: 抗リンパ球血清作製における異種リンパ球利用の可能性について, 東京女子医大誌, **45**: 948, 1975.
- 5) Winn J. Henry and G. Daddi: Properties of antimouse lymphocyte sera produced in various species, *Federation Proceeding*, **29**: 104, 1970.
- 6) 福土勝成, 森山昌樹, 林 芳孝, 須子田キヨ: ALS 処置マウスへの人らい菌接種実験(2), 日本らい学会誌, **46**: 202, 1977.
- 7) Sushida K. and H. Nakano: Infectiousness of human leprous bacilli in mice, XI Congreso Internacional De La Lepra, Ciudad de México, 13-18 de Nov., 1978.
- 8) 須子田キヨ, 平野憲正: 放射性ヨウ化ナトリウム (^{131}I) 注射マウス精巣における人らい菌接種試験, レプラ, **40**: 183, 1971.
- 9) 須子田キヨ: 妊娠中に ^{131}I を注射したマウスから生れた仔マウスへの人らい菌移植実験, レプラ, **43**: 234, 1974.
- 10) 須子田キヨ, 種村睦子: 妊娠中に放射線(^{60}Co)を照射して生れた仔マウスの人らい菌接種実験, 日本らい学会誌, **48**: 120, 1979.
- 11) 中野壽夫, 須子田キヨ: ノードマウスへの人らい菌接種実験, 第51回日本らい学会総会(沖縄), 6月24日, 1977.