UEBER KULTUREN VON LEPRÖSEN GEWEBE IN VITRO. I. MITTEILUNG. GEWEBSKULTUREN VON HAUTKNÖTCHEN BEI MENSCHENLEPRA

VON DR. MASASUE SUWO

UND DR. SHOTAI KIN

Aus dem Leprosorium Koseien des Generalgouvernements Chosen auf Shorokuto, Japan. (Direktor: Dr. Masasue Suwo)

EINLEITUNG

Seitdem Armauer Hansen im Jahre 1873 in dem leprösen Gewebe den Leprabazillus entdeckte, sind Kulturversuche mit diesen Bazillen von vielen Autoren mit den verschiedensten Methoden gemacht worden. Eine einwandfreie Reinkultur von Leprabazillen ist bis jetzt jedoch noch nicht gelungen.

In neuerer Zeit suchten einige Forscher die Leprabakterien auf Gewebskultur zu züchten, da diese den Bakterien ein dem Organismus ähnliches Milieu bietet. Zinsser und Carey (10) züchteten 1912 im Milzgewebe junger Ratten den Bazillus der Rattenlepra, welcher dem menschlichen Bazillus ähnlich ist: Die Bazillen vermehrten sich in der Kulturen aber nicht und waren in 7-10 Tagen völlig aufgelöst. Später beobachteten McKinley und Verder (4, 5) sowie Soule (8) die Vermehrung der Menschenleprabazillen in fein zerstückeltem Hühnerembryonalgewebe, welches in Tyrode-Lösung suspendiert worden war. Salle (6) isolierte 1934 einen pleomorphen, in der Säurefestigkeit schwankenden, diphtheroiden Organismus aus vier erweichten Knoten von Menschenlepra und aus einem nicht ulzerierten Granulom von Rattenlepra durch die Explantierung der mit diesen Bazillen infizierten Gewebsstückchen von Hühnerembryonen, und er kam zu der Ansicht, dass Menschen- und Rattenlepra durch einen und denselben Bazillus hervorgerufen werden. Lowe beschrieb 1935 (2) dass es ihm nicht gelungen sei, die menschlichen Leprastäbchen nach dem Verfahren von McKinley und Verder zu züchten. Im selben Jahr prüften Walker und Sweeney (9) den Salleschen Versuch mit Rattenlepra nach, aber ihre Züchtungsversuche verliefen negativ. Hu (1) beobachtete 1936, dass die Menschenleprabazillen auf Gewebskultur, besonders bei Benutzung der Lymphdrüsen von weissen Ratten, sich vermehrten und Globi bildeten.

Diese Kulturversuche, wenn sie auch nur in sehr spärlicher Zahl vorgenommen worden sind, zeigen, dass sich auf diesem Investigationsfeld neue Möglichkeiten eröffnen. Anstatt die Leprabazillen in hetero- oder homogenem Gewebe zu züchten, ist es jedoch wichtiger und interessanter, das lepröse Gewebe selbst in vitro zu züchten, womit man die grösstmögliche Annäherung an die Verhältnisse in dem spontan infizierten Organismus erreichen kann. Wir haben daher Explantationsversuche mit Hautknötchen von Menschenlepra angestellt und sind dabei zu interessanten Ergebnissen gekommen.

MATERIAL UND METHODE

Als Versuchsmaterial dienten junge, gut wachsende Lepraknoten, die von den Extremitäten der Patienten steril reseziert wurden. Der zentrale Teil der Knoten wurde in Ringerlösung in kleine Stückchen, etwa von 1 mm. Durchmesser, zerschnitten, von welchen die meisten zur Explantation und die übrigen zur Kontrolle benutzt wurden.

Die Kulturen wurden auf gewöhnliche Weise in Carrelschen Flaschen von 4 cm. Durchmesser ausgeführt. Die Nährmedien wurden aus folgenden Bestandteilen zusammengesetzt:

Feste Phase:

Heparinplasma (1 ccm. Heparinlösung 1:1000 auf 10 ccm. Hühnerblut)	0,3 ccm.
5%iger Embryonalextrakt (aus 7-10 Tage alten Hühnerembryonen)	0,9 ccm.

Flüssige Phase:

Embryonalextrakt	0,15 ccm.
Ringerlösung	0,45 ccm.

Die eingepflanzten Stückchen wurden bei 38°C. aufbewahrt, und alle 5 Tage wurde ihr flüssiges Nährmedium erneuert.

Insgesamt sind 25 Versuche gemacht worden, und bei jedem stammte das Material von einem anderen Kranken. In jedem Versuch wurden 20-30 Kulturen hergestellt.

Die Kulturen wurden sowohl in lebendem Zustande als auch in fixierten Präparaten studiert. Als Fixierungsflüssigkeit dienten 2%ige Formalin-Ringerlösung und Orthsches Gemisch. Das in Formalin-Ringerlösung fixierte Material wurde als toto-Präparat mit Minkschem Hämatoxylin allein oder nach einer Vorfärbung mit Karbol-fuchsin von Ziehl gefärbt. Die in dem Orthschen Gemisch fixierten Kulturen wurden in Zelloidin eingebettet und in lückenlose der Oberfläche der Kulturen parallel geführte Schnittserien zerlegt. Bei den Schnittserien wurde entweder die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin, oder die Maximowsche Tuberkelbazillenfärbung (3) oder die Weigert-Palsche Markscheidenfärbung (7) angewandt.

Bei der Vitalfärbung wurde der flüssige Bestandteil der Kulturen im Alter von 5-15 Tagen durch Tusche-, Lithionkarmin- oder Trypanblaulösung ersetzt. Die farbstoffgefüllten Explantaten wurden in 10-20%igem Formalin

gehärtet, und es wurden Total- oder Schnittpräparate angefertigt. Diese Präparate wurden entweder mit reinem Hämatoxylin oder Alaunkarmin gefärbt, oder ab und zu auch nach dem Gramverfahren behandelt.

Die Bearbeitung der Kontrollpräparate war dieselbe wie diejenige der Explantate.

BESCHREIBUNG DER KONTROLLPRÄPARATE

Die zum Auspflanzen benutzten Lepraknoten waren einzuteilen in zwei Formen: die jüngere war auf der Schnittfläche milchweisslich, besass gut zerschneidbare Härte und sonderte auf Druck einen milchähnlichen Saft ab, die ältere war auf der Schnittfläche gelblich, wachsartig, durchscheinend, sehr hart und zähe, und es war nur wenig Serum auspressbar. In den ersteren fanden wir mikroskopisch reichliche, dem leprösen Infiltrat eigene Zellelemente und Leprabazillen in grosser Menge (Fig. 1 und 2). In den letzteren liess sich die Entwicklung von fibrösem Gewebe beobachten, die eigentlichen Zellen wurden also sparsamer, und die Bazillenansammlungen waren nicht mehr so gleichmässig ausgebreitet, sondern mehr an einzelnen Stellen haufenartig zusammengeballt.

Unter den verschiedenen Zellformen in den Lepromen bildeten die fibroblastenähnlichen Zellen die Grundlage der Granulationsgewebe. Die Zellen enthielten in ihrem Protoplasma die Leprastäbchen in grösserer oder kleinerer Menge. Zwischen diesen Elementen lagen die epitheloiden Zellen verstreut oder in Anhäufungen, in denen viele von ihnen das Aussehen typischer Leprazellen besassen. Das Protoplasma der epitheloiden Zellen war von Bazillen in bedeutender Anzahl okuppiert. Ausserdem gab es Lymphozyten und Plasmazellen in den Lepromen, höchst selten waren Riesenzellen, Leukozyten und Mastzellen vorhanden.

Die in dem Auspflanzmaterial vorkommenden Leprabazillen waren alle säurefest und hatten die Neigung, sich in Klumpen zusammenzulagern. Die Bazillen lagen nicht nur innerhalb der Zellen, sondern eine grosse Menge von ihnen auch ausserhalb.

BEOBACHTUNGEN AN LEBENDEN KULTUREN

Die Stückchen des jungen Lepromgewebes zeigten in der Kultur ein gutes Wachstum, dagegen liess sich bei den meisten Explantaten von älterem Leprom keine Zellvermehrung beobachten.

Im Laufe der ersten 4-6 Tage nach der Auspflanzung sah man an der Peripherie des Explantats ein radiäres bindgewebiges Wachstum beginnen, welches sich im Laufe der folgenden Tage immer weiter entwickelte (Fig. 3 und 4). Die Wachstumszone

bestand grösstenteils aus spindel- oder sternförmigen, durch Verlängerung miteinander verbundenen Zellen. Ausser diesen fibroblastenähnlichen Elementen konnten in sehr kleinen Mengen auch Wanderzellen angetroffen werden, die meistens als grosse runde oder polygonale, mit homogenem Protoplasma versehene epitheloide Zellen auftraten. In einigen Kulturen waren in dem Wachstumshofe die Epitheloidzellen das überwiegende Element, ohne unter sich ein eigentliches Gewebe zu bilden (Fig. 5). In solchen Kulturen trat oft eine Verflüssigung des Kulturplasmas ein, wodurch eine Beobachtung über einen längeren Zeitraum sehr erschwert wurde.

Am 9-10 Tage zeigt das explantierte Gewebe das üppigste Wachstum, und bald darauf begannen in der Wachstumszone degenerative Veränderungen aufzutreten, wobei in dem Zellprotoplasma deutlich glänzende Fettropfen und Vakuolen zu sehen waren.

In 14-15tägigen Kulturen konnte man sehr haüfig eine Umwandlung der fibroblastenähnlichen Elemente in Zellen von grossen rundlichen Formen beobachten, deren Protoplasma schroff vakuolisiert wurde.

Die Zelldegeneration entwickelte sich im Laufe der Zeit immer weiter, und 18-20 Tage nach Explantation war die Aktivität der Kulturen völlig verschwunden. In diesen späteren Stadien war eine eigenartige Trübung des Nährmediums in der Wachstumszone und darüber hinaus zu bemerken. Dieses Phänomen scheint ein Zeichen für die Vermehrung der Leprabazillen zu sein, wie weiter unten aus anderen Untersuchungen gefolgert werden kann. Die ältesten der Kulturen wurden 40 Tage alt, doch zeigten sich niemals mit blossem Auge sichtbare Bakterienkolonien.

Die Stoffspeicherung der Zellelemente in den vital gefärbten Kulturen konnte man bei der Untersuchung lebender Kulturen nicht vollkommen verfolgen.

UNTERSUCHUNGEN VON FIXIERTEN UND GEFÄRBTEN PRÄPARATEN

A. AUSGEPFLANZTES STÜCK

Schon im Laufe der ersten 3-4 Tage nach der Explantation, noch ehe die eigentlichen Wachstumserscheinungen beginnen, war es möglich eine sehr deutliche Veränderung im ausgepflanzten Stück wahrzunehmen. Das vor der Explantation hauptsächlich aus fibroblastenähnlichen Elementen gebildete Explantat zeigte in diesem Stadium in der Hauptsache rundliche, epitheloide Zellen, während die fibroblastenähnlichen Zellen bedeutend seltener

wurden. Die aus den fibroblastenähnlichen Zellen entstandenen Epitheloiden besassen das Aussehen typischer Leprazellen (Fig. 6 und 7). Ihr ganzes Protoplasma bestand aus einer Masse von Vakuolen verschiedener Grösse und Form und war buchstäblich mit Leprabazillen ausgefüllt (Fig. 8 und 9). Der Zellkern, an die Peripherie gedrängt, war geschrumpft und pyknotisch.

In der zentralen Bezirken der Explantate kam es schon zu mehr oder weniger entwickelter Nekrose, wobei die Lymphozyten und Leprazellen immer zuerst degenerierten, während die fibroblastenähnlichen Zellen und Gefässendothelien länger erhalten blieben.

In 5-7tägigen Kulturen breitete sich die Degeneration der zentralen Zone merklich aus, und an der Peripherie lagen haufenweise grosse Epitheloiden, zwischen denen einzelne fibroblastenähnliche Zellen zu sehen waren, die auch in ihrem Protoplasma eine bedeutende Anzahl von Leprabakterien enthielten. In den vital gefärbten Kulturen speicherten sowohl die Epitheloiden als auch die fibroblastenähnlichen Zellen die Farbstoffe in ausgeprägter Weise, wobei die Vakuolen freiblieben.

In 13-15tägigen Kulturen erstreckten sich die degenerativen Erscheinungen auf die Randzone des Explantats, und nur an einzelnen Stellen waren wenige am Leben gebliebene Epitheloiden sichtbar, in gespeicherten Objekten mit Stoffkörnchen beladen. Die endliche Nekrose des Explantats trat 18-20 Tage nach Explantation ein, und das Explantat war von Leprabazillen überschwemmt, die eine körnige Struktur zeigten.

B. WACHSTUMSZONE

In 5-6tägigen Kulturen bestand das um das Explantat wuchernde Gewebe aus fibroblastenähnlichen Zellen und Epitheloiden von verschiedener Grösse und Form. Die fibroblastenähnlichen Zellen charakterisierten sich durch ihre spindelförmige oder sternähnliche Gestalt, die mit zwei, drei oder mehr Fortsätzen versehen war, welche mit ziemlich breiter Basis vom Zellkörper entsprangen und fadenförmig endigten. Die meisten dieser Zellen besassen ziemlich grosse Protoplasmamassen, sie waren mit einem ovalen chromatinarmen Kern und 1-2 Nukleolen versehen. Häufig anastomosierten sie durch ihren langen Fortsatz miteinander und bildeten dann einzelne Stränge oder Retikulumgewebe. Ebenso wie in den Kontrollpräparaten enthielten diese Zellen Leprastäbchen, deren Zahl starken Schwankungen ausgesetzt war (Fig. 10 und 11). Die in der Wachstumszone erscheinenden Epi-

theloiden waren mehr oder weniger grosse Zellen von rundlicher oder polygonaler Form und enthielten gutfärbbare, bläschenförmige, zentrale Kerne. Diese Epitheloiden enthielten schon in den frühen Stadien grosse Mengen lepröser Bakterien, welche manchmal rund um den Zellkern in regelmässiger, radialer Ordnung gelagert waren.

In einigen Kulturen, wo die Auswanderung der Epitheloiden überwog, gelang es in der Wachstumszone verschiedene Uebergangsformen zwischen den runden Epitheloiden und den fibroblastenähnlichen Zellen nachzuweisen, die in ihrem Protoplasma grössere oder kleinere Mengen von Leprabazillen enthalten, je nachdem sie den Epitheloiden ähneln.

In den vital gefärbten Kulturen nahmen die Epitheloiden und die ihnen ähnlich gewordenen, fibroblastenartigen Zellen in mässigen Mengen die Farbstoffgranula auf, dagegen waren die typischen fibroblastenähnlichen Zellen, welche sich an der Peripherie der Wachstumszone orientierten, nicht damit versehen.

Nach 9-10 Tagen waren die Wachstumshöfe voll entwickelt, und in ihren fibroblastenähnlichen Elementen konnten auch Mitosenfiguren gefunden worden (Fig. 12 und 13). Dagegen wurde in den Epitheloiden keine Kernteilung gefunden. Zu diesem Zeitpunkt fanden sich auch in den fibroblastenähnlichen Zellen wie in den epitheloiden die Leprabazillen in so grosser Zahl, dass sie sich vermehrt haben mussten. In den ersteren lagen die Bazillen nicht nur im Zellkörper, sondern auch in den dünnsten Fortsätzen, und nur der Zellkern war frei davon. In den Epitheloiden waren die Leprabazillen in ausserordentlich reichlicher Menge eingeschlossen, und zwar bildeten sie einzelne Häufchen, was auf die Vermehrung der Bazillen im Zellprotoplasma hinweist.

An 14-15tägigen Kulturen beobachtete man alle Uebergänge von den fibroblastenähnlichen Elementen mit kleiner Vakuole bis zu den typischen Leprazellen. Die Mehrzahl der fibroblastenähnlichen Zellen enthielt dabei in ihrem Protoplasma kleinere oder grössere Vakuolen und eine grosse Menge von Leprastäbchen, welche gewöhnlich in einzelnen kleinen Bündeln lagen (Fig. 14). Die Epitheloidzellen wurden zu dieser Zeit schroff vakuolisiert und hydropisch, und dadurch erhielten sie das Aussehen von typischen Leprazellen, die mit Bazillen vollgestopft waren (Fig. 15). In einigen Kulturen sah man fast nur solche vakuolisierte Epitheloiden, die sich, wie bei der vitalen Beobachtung beschrieben, aus fibroblastenähnlichen Zellen entwickelten (Fig. 16 und 17). Sie

hatten die ausgesprochene Fähigkeit der Vitalspeicherung (Fig. 18 und 19).

Aus diesen Beobachtungen geht also hervor, dass unter dem Einfluss der sich vermehrenden Leprabazillen die fibroblastenähnlichen Elemente sich nicht nur ihrem Aussehen, sondern auch ihrem funktionellen Verhalten nach in Epitheloidzellen umwandeln, und dass die Leprazellen als eine weitere Entwicklungsstufe der Epitheloiden anzusehen sind.

In 18-20tägigen Kulturen verschwand der Unterschied zwischen der der äusseren und inneren Abteilung der Zellen vollkommen, und das Protoplasma zeigte überall eine alveoläre oder undeutliche, körnige Struktur. Die Leprabakterien waren aus dem zerfallenden Plasma in das umgebende Kulturmedium ausgewandert und fuhren fort sich darin zu vermehren (Fig. 20 und 21). In alten Kulturen wurde dadurch das Nährmedium deutlich getrübt und war von Bakterien überfüllt.

In der vierten Woche nach der Explantation zerfiel die Mehrzahl der Leprastäbchen zu Granula, und an Stellen, wo degenerierte Zellen vorhanden waren, konnte man manchmal eine mit Karbolfuchsin rosa gefärbte homogene Masse bemerken.

SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die Ergebnisse der Versuche lassen sich wie folgt zusammenfassen.

1. Stückchen von Hautknoten bei Menschenlepra zeigen in Gewebskultur ein gutes Wachstum.

2. Das wachsende Gewebe besteht hauptsächlich aus fibroblastenähnlichen Elementen und Epitheloidzellen.

3. Die fibroblastenähnlichen und Epitheloidzellen enthalten immer in ihrem Protoplasma Leprabazillen, deren Zahl in den letzteren viel grösser als in den ersteren ist.

4. Epitheloidzellen speichern die Vitalfarbstoffe in ausgeprägter Weise, dagegen nehmen die fibroblastenähnlichen Zellen keine oder nur wenige Farbstoffgranula auf.

5. Unter dem Einfluss der sich vermehrenden Leprabazillen wandeln sich die fibroblastenähnlichen Zellen in Epitheloidzellen mit speichernder Fähigkeit um, sowohl im Explantat selbst als auch in der Wachstumszone.

6. Die Leprazellen entwickeln sich in vitro aus den Epitheloidzellen.

7. Die Leprabazillen vermehren sich nicht nur im Zelleib, sondern, nachdem die Kultur zugrunde gegangen ist, auch im Nährmedium, ohne einzelne, mit blossem Auge sichtbare Kolonien zu bilden.

LITERATUR

(1) Hu, K. Studien über den Entwicklungsmodus der Bakterien bei Einzellkultur auf Nährbodenfilm. I. Mitteilung. Beobachtungen über den Entwicklungsmodus des Mycobacteriums sowie die biologische Bedeutung seiner Granula. Japanese Jour. Exp. Med. **14** (1936) 29-58.

(2) Lowe, J. A note on the application of tissue culture methods to leprosy research. Lep. India **7** (1935) 19-22; *abstract in* The Journal **4** (1936) 404.

(3) Maximow, A. A. Tuberculosis of mammalian tissue in vitro. Jour. Infect. Dis. **34** (1924) 549-584.

(4) McKinley, E. B. and Verder, E. Cultivation of *Mycobacterium leprae*. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. **30** (1933) 659-661.

(5) McKinley, E. B. and Verder, E. Further studies on cultivation of *Mycobacterium leprae*. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. **31** (1933) 295-296.

(6) Salle, A. J. Acid-fast organism from leprous lesions. Cultivation in tissue cultures and other mediums. Jour. Infect. Dis. **54** (1934) 347-359; *reprinted in* The Journal **2** (1934) 201-208.

(7) Samejima. Histologische Undersuchung des leprösen Bulbus. Acta Soc. Ophth. Jap. **36** (1932) 255.

(8) Soule, M. H. Bacteriology of leprosy, III. Cultivation of *Mycobacterium leprae*. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. **31** (1934) 1197-1199.

(9) Walker, E. L. and Sweeney, M. A. Embryonic and tumor tissues as culture media for the micro-organism of rat leprosy. American Jour. Trop. Med. **15** (1935) 507-514; *abstract in* The Journal **4** (1936) 404.

(10) Zinsser, H. and Carey, E. G. A contribution to the study of rat leprosy. Jour. American Med. Assoc. **58** (1912) 692.

ABSTRACT

Previous investigations of the behavior of bacillus-containing leprous tissues in tissue cultures having been few, but not without promise, the authors undertook such a study.

Young, growing nodules were resected under sterile conditions, the central parts were cut up in Ringer's solution, and the fragments were planted in a medium composed of chick-embryo extract in chicken plasma. These were cultivated at 38°C. in Carrel flasks, the fluid being renewed every five days. Altogether, 25 experiments were made, in each of which 20 to 30 cultures were prepared. The cultures were studied both fresh and in fixed preparations. Material fixed in formol-Ringer's was stained *in toto* in hematoxylin, alone or after carbol-fuchsin. Material fixed in Orth's mixture was embedded in celloidin and sectioned serially, parallel with the surface

of the culture. These sections were stained with hematoxylin-eosin, or for bacilli by Maximow's method, or by the Pal-Weigert method for myelin sheaths.

The material used proved to be of two kinds. In the younger lesions the cut surface was milky white and less firm than in the others, and on pressure a milky juice exuded. In the older lesions the surface was yellowish, waxy, translucent and hard, and only a little serum could be expressed. Microscopically the former was richer in cellular elements and bacilli; the latter was more fibrous, the cells less numerous and the bacilli fewer and less generally distributed. In these lesions the basis of the granuloma were "fibroblast-like" cells which contained bacilli. Among them "epithelioid" cells were scattered or in aggregations, and many of them had the appearance of typical lepra cells; they, too, contained bacilli in considerable numbers. Bacilli also occurred in large numbers outside of cells. All were acid-fast.

The observations made of both the living material and of stained preparations at different periods of growth of the cultures, —these observations pertaining to both the transplant itself and the growth zone around it—are given in summary but in too much detail to be dealt with here, except as they are evidenced in the authors' conclusions and in the descriptions of the figures, which are given in translation. The conclusions are summarized as follows:

1. Small pieces of skin nodules of human leprosy grow well in tissue culture. 2. The growing tissue is composed chiefly of fibroblast-like elements and epithelioid cells. 3. Both of these elements always contain leprosy bacilli in their protoplasm, in much greater numbers in the epithelioid cells than in the others. 4. Epithelioid cells take up vital stains actively, while on the other hand the fibroblast-like cells take few or none of the pigment granules. 5. Under the influence of the multiplying leprosy bacilli the fibroblast-like cells are converted into pigment-storing epithelioid cells, both in the explant and the growing zone. 6. Lepra cells develop in vitro from the epithelioid cells. 7. Leprosy bacilli multiply, not only in the body of the cell but also in the nutrient medium, after the culture is gone, without forming colonies visible with the naked eye.

ERKLÄRUNG DER FIGUREN

TAFEL 1

FIG. 1. Schnittpräparat des Lepromgewebes, das als Explantationsmaterial diente. Verschiedene Zellelemente sind zu sehen. Färbung mit Hämatoxylin-Eosin.

FIG. 2. Der benachbarte Schnitt. Zahlreiche Leprabazillen liegen in Häufchen in bündelartiger Lagerung und auch einzeln. Die schwarzen Punkte und Flecke sind alles Bazillen. Weigert-Palsche Markscheidenfärbung.

FIG. 3. Übersichtsbild einer fünftägigen Kultur von Lepromgewebe. Intensives bindegewebiges Wachstum. Nach dem Leben.

FIG. 4. Dasselbe Explantat wie in Fig. 3. Mit langen Fortsätzen versehene fibroblastenähnliche Zellen. Nach dem Leben.

FIG. 5. Fechstägige Kultur von Lepromgewebe. Um das Keimstückchen herum überwiegen grosse Epitheloidzellen. In dem peripheren Teil des Wachstumshofes sind auch fibroblastenähnliche Zellen sichtbar. Nach dem Leben.

FIG. 1. Section of leprous granuloma tissue that served as explantation material. Different cell elements may be seen. Hematoxylin-eosin.

FIG. 2. A neighboring section. Numerous leprosy bacilli are accumulated in bundle-like groups, and also individually. The black points and spots are all bacilli. Weigert-Pal medullary sheath stain.

FIG. 3. General view of a five-day culture of a leproma tissue. Marked connective tissue growth. Living culture.

FIG. 4. The same explant as in Fig. 3. Fibroblast-like cells with long processes. Living culture.

FIG. 5. Six-day culture of leproma tissue. Around the germinal pieces large epithelioid cells predominate. Fibroblast-like cells are also visible in the peripheral part of the growing area. Living culture.

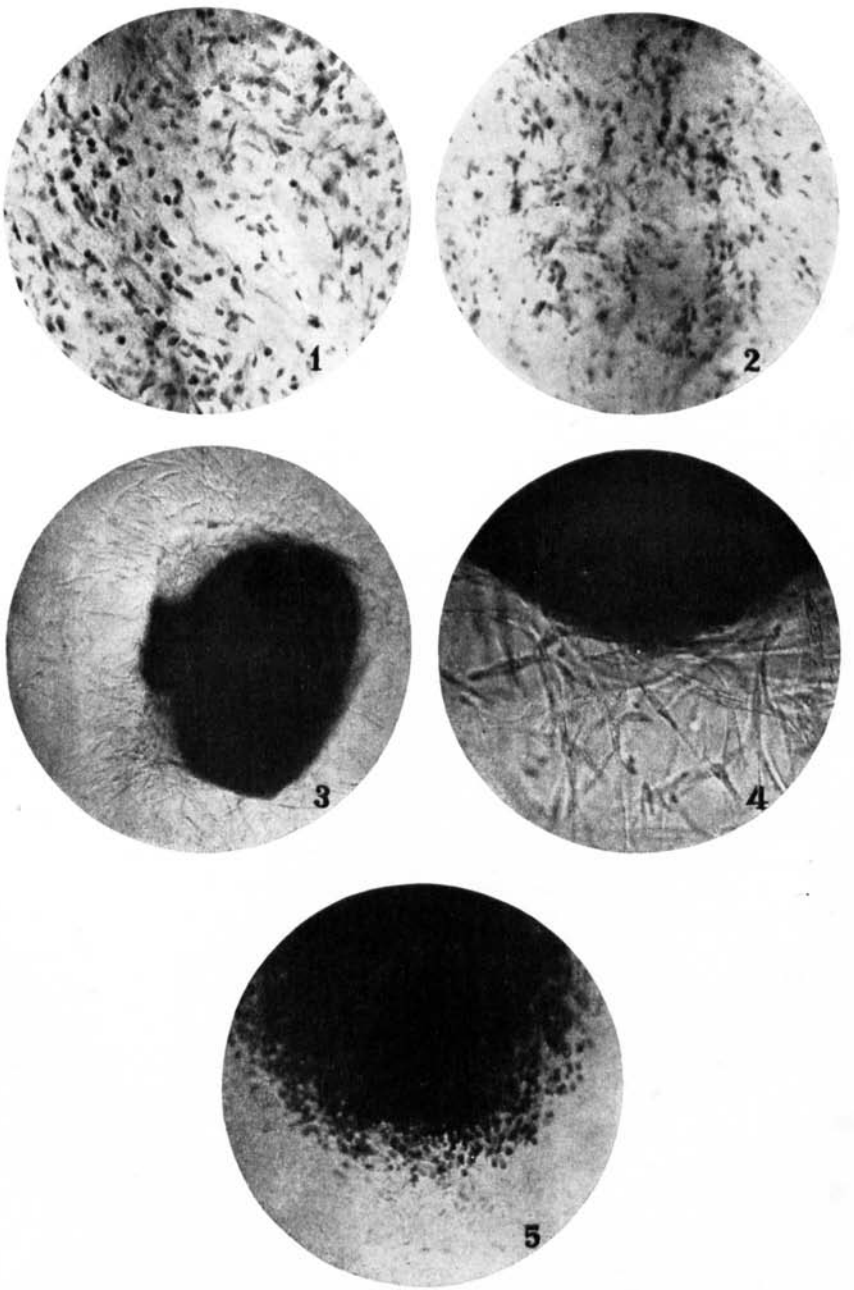


PLATE 1

Tafel 2

Fig. 6. Viertägige Kultur von Lepragewebe. Zentraler Teil des Keimstückchens. Zu sehen sind die aus fibroblastenähnlichen Zellen entstandenen Epitheloiden, die in ihrem Protoplasma Vakuolen und einen peripherisch liegenden Kern enthalten. In dem hellen Bezirk (×) sind nekrotische Massen bemerkbar. Schnittpräparat. Färbung mit Hämatoxylin-Eosin.

Fig. 7. Dasselbe Präparat bei stärkerer Vergrösserung. Epitheloiden aus fibroblastenähnlichen Zellen. Diese Epitheloiden besitzen das Aussehen typischer Leprazellen.

Fig. 8. Das benachbarte Schnittpräparat bei schwächerer Vergrösserung. Reichliche Vermehrung von Leprabazillen in den Epitheloiden, die sich aus fibroblastenähnlichen Zellen entwickelt haben. Die schwarzen Punkte und Häufchen stellen Leprabazillen dar. Weigert-Palsche Markscheidenfärbung.

Fig. 9. Stärker vergrösserte Stelle des Präparates, um die intrazellulären Bazillen zu zeigen. In der Mitte ist eine Epitheloidzelle mit Leprabazillen zu sehen, welche in einzelnen Häufchen liegen.

Fig. 10. Sechstägige Kultur von Lepragewebe. Basalgegend der Wachstumszone. Fibroblastenähnliche Zellen und Epitheloiden, welche in ihrem Protoplasma Leprabazillen enthalten. Stelle ×× Randteil des explantierten Muttergewebe. Schnittpräparat. Weigert-Palsche.

Fig. 11. Dasselbe Präparat stärker vergrössert. Peripherer Teil der Wachstumszone. Leprabazillen in fibroblastenähnlichen Zellen.

Fig. 6. Four-day culture of leproma tissue, central part of the germinal piece. To be seen are the epithelioid cells that have developed from the fibroblast-like cells and that contain in their protoplasm vacuoles and a peripherally located nucleus. In the clear region (×) necrotic masses are noticeable. Section, stained with hematoxylin-eosin.

Fig. 7. The same preparation, higher magnification. Epithelioid cells developed from fibroblast-like cells. These epithelioid cells possess the appearance of typical lepra cells.

Fig. 8. A neighboring section, lower magnification. Abundant multiplication of leprosy bacilli in the epithelioid cells that have developed from the fibroblast-like cells. The black points and masses are leprosy bacilli. Weigert-Pal medullary sheath stain.

Fig. 9. Higher magnification of the same preparation, to show the intracellular bacilli. In the center may be seen an epithelioid cell with leprosy bacilli that lie in separate masses.

Fig. 10. Six-day culture of leprosy tissue, basal region of the growing zone. Fibroblast-like cells and epithelioid cells that contain leprosy bacilli in their protoplasm. Place marked ×× is a peripheral part of the explanted mother tissue. Section, Weigert-Plant stain.

Fig. 11. The same preparation, higher magnification. Peripheral part of the growing zone. Leprosy bacilli in fibroblast-like cells.

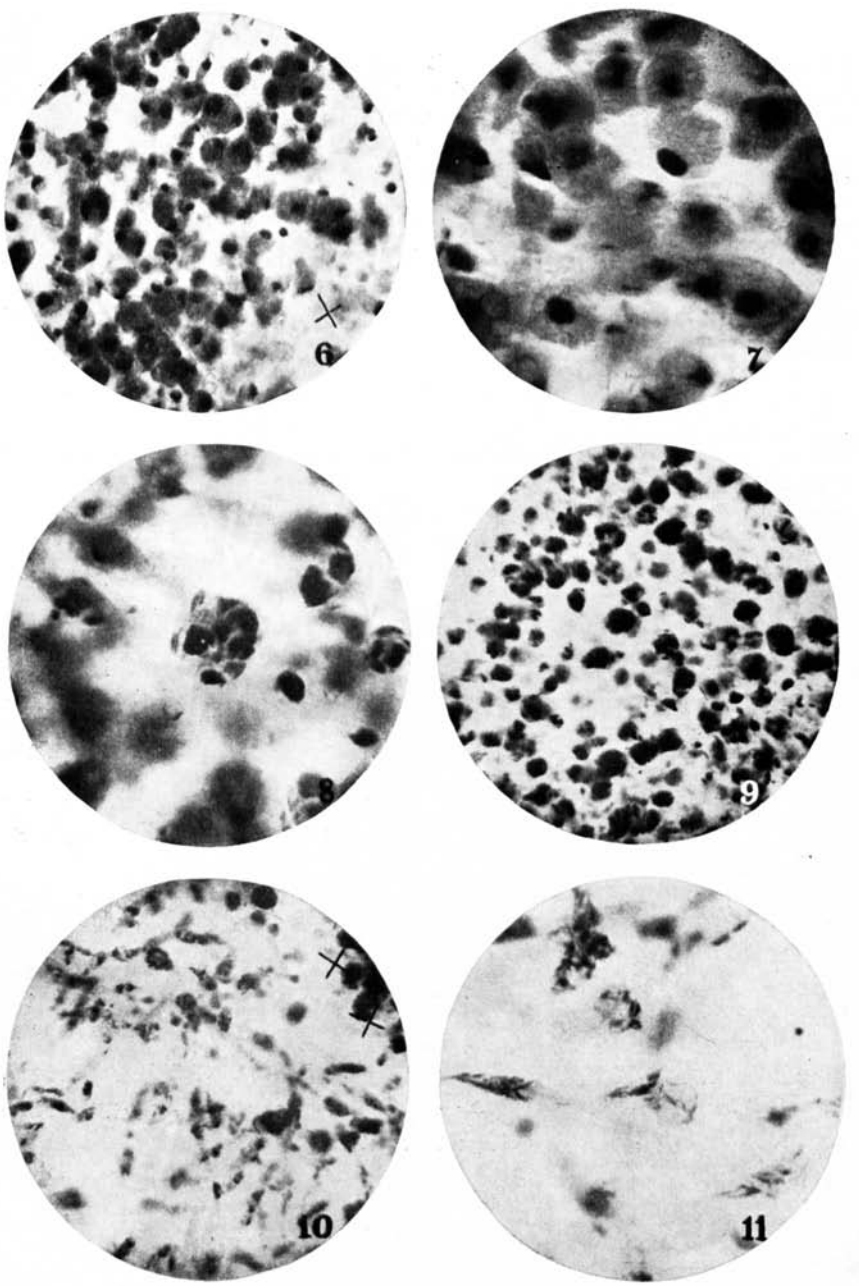


PLATE 2

TAFEL 3

FIG. 12. Zehntägige Kultur von Lepragewebe. Zu sehen ist ein Teil des eingepflanzten Ursprungsstückes mit üppigem Wachstum der fibroblastenähnlichen Zellen. Die Anzahl der epitheloiden Zellen ist nicht gross. Totalpräparat. Färbung mit Minkschem Hämatoxylin.

FIG. 13. Dasselbe Präparat stärker vergrössert. Ein Teil der Washstumszone. Zu sehen its Mitose in einer fibroblastenähnlichen Zelle.

FIG. 14. Fünfzehntägige Kultur von Lepragewebe. Eine fibroblastenähnliche Zelle, gefüllt mit Leprabazillen, welche in einzelnen kleinen Bündeln liegen. Schnittpräparat. Weigert-Palsche.

FIG. 15. Dasselbe Präparat. Basalstelle der Wachstumszone. Das Protoplasma der Epitheloidzellen ist von Bazillen völlig okkupiert. Die Stelle $\times\times$ zeigt die Randzone des Keimstückchens.

FIG. 16. Fünfzehntägige Kultur von Lepragewebe. Ein kleiner Bezirk der Wachstumszone. Zu sehen sind Gruppen von Epitheloidzellen, die sich aus fibroblastenähnlichen Elementen entwicklet haben. Die Stelle $\times\times$ zeigt den peripheren Teil des Keimstückchens. Schnittpräparat. Hämatoxylin-Eosin.

FIG. 17. Das benachbarte Schnittpräparat. Fibroblastenähnliche Zellen und aus diesen umgewandelte Epitheloiden sind mit Leprabazillen ganz vollgestopft. Stelle $\times$ Keimstückchen. Weigert-Palsche.

FIG. 12. Ten-day culture of leprosy tissue. A part of the implanted original piece, with abundant growth of fibroblast-like cells, but rather few epithelioid cells. Whole preparation, Mink's hematoxylin.

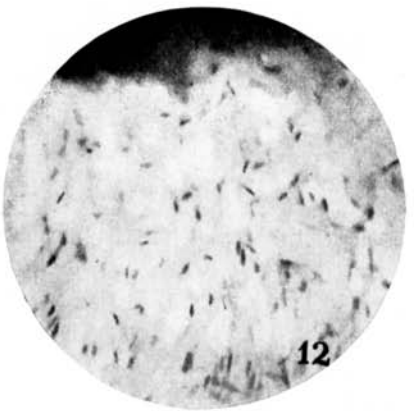
FIG. 13. The same preparation, higher magnification. A portion of the growth zone. Mitosis in a fibroblast-like cell is seen.

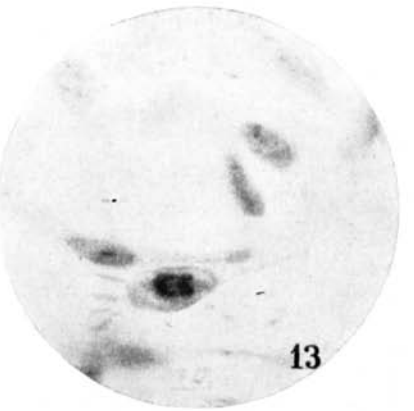
FIG. 14. Fifteen-day culture of leprosy tissue. A fibroblast-like cell filled with lepra bacilli, which lie in separate small bundles. Section, Weigert-Pal stain.

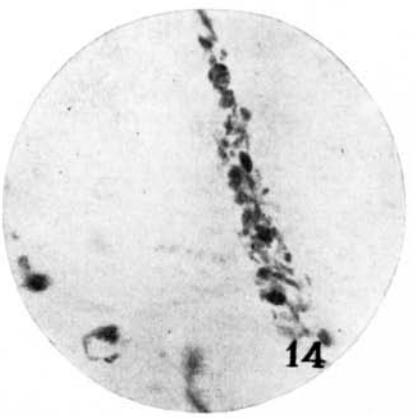
FIG. 15. The same preparation, basal part of the growing zone. The protoplasm of the epithelioid cells is completely filled with bacilli. The place marked $\times\times$ shows the principal zone of the germinal piece.

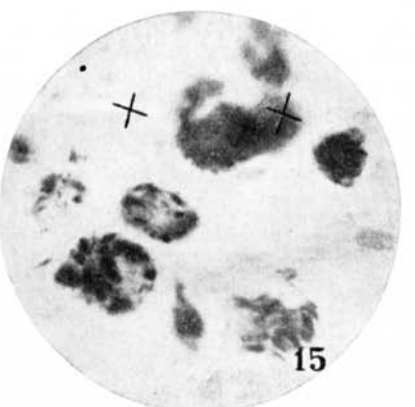
FIG. 16. Fifteen-day culture of leprosy tissue, a small region of the growth zone. A group of epithelioid cells that have developed from the fibroblast-like elements is seen. The place marked $\times\times$ is the peripheral part of the germinal piece. Section, hematoxylin-eosin stain.

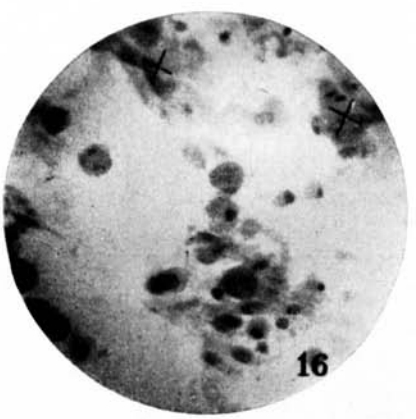
FIG. 17. The neighboring section. Fibroblast-like cells and epithelioid cells developed from them, completely filled with leprosy bacilli. Place marked $\times$, germinal piece. Weigert-Pal stain.











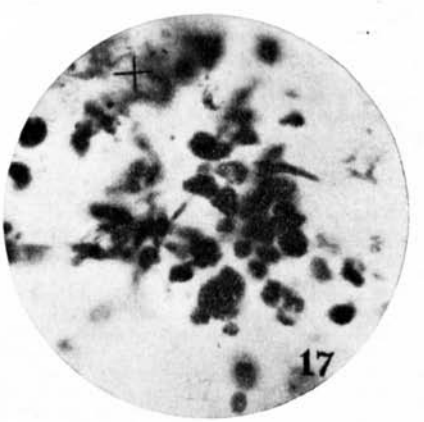


PLATE 3

Tafel 4

Fig. 18. Vierzehntägige Kultur von Lepragewebe mit Karminspeicherung. Ein kleiner Bezirk der Wachstumszone. Mit feinen Karmingranula beladene fibroblastenähnliche Zellen, welche den Epitheloiden ähneln. Die Vakuolen im Zellkörper sind freigeblieben. Schnittpräparat. Färbung mit Hämatoxylin.

Fig. 19. Ein ähnliches Präparat wei in Fig. 18, aber mit Tusche vital gefärbt. Ein Teil der Wachstumszone. Unten mit phagozitierten Tuschekörnchen beladene fibroblastenähnliche Zelle. Schnittpräparat. Färbung mit Hämatoxylin.

Fig. 20. Zwanzigtägige Kultur von Lepragewebe. Zu sehen sind die in das umgebende Kulturmedium ausgewanderten Leprabazillen. Unten Keimstückchen. Schnittpräparat. Färbung nach Ziehl-Neelsen.

Fig. 21. Ein anderer Teil desselben Präparates. Die Mehrzahl der Bazillen bilden Globi. Unten Keimstückchen.

Fig. 18. Fourteen-day culture of leprosy tissue, with storage of carmine. A small region of the growth zone. Fibroblast-like cells loaded with carmine granules that look like epithelioid cells. The vacuoles in the cell bodies have remained free. Section, hematoxylin stain.

Fig. 19. A similar preparation to that in Fig. 18 but stained vitally with India ink. A portion of the growing zone, with fibroblast-like cells loaded with phagocytized India ink granules. Section, hematoxylin stain.

Fig. 20. Twenty-day culture of leprosy tissue. Bacilli that have wandered out into the surrounding culture medium are seen. Section, Ziehl-Neelsen stain.

Fig. 21. Another part of the same preparation. The majority of the bacilli are in globi. Below, germinal pieces.

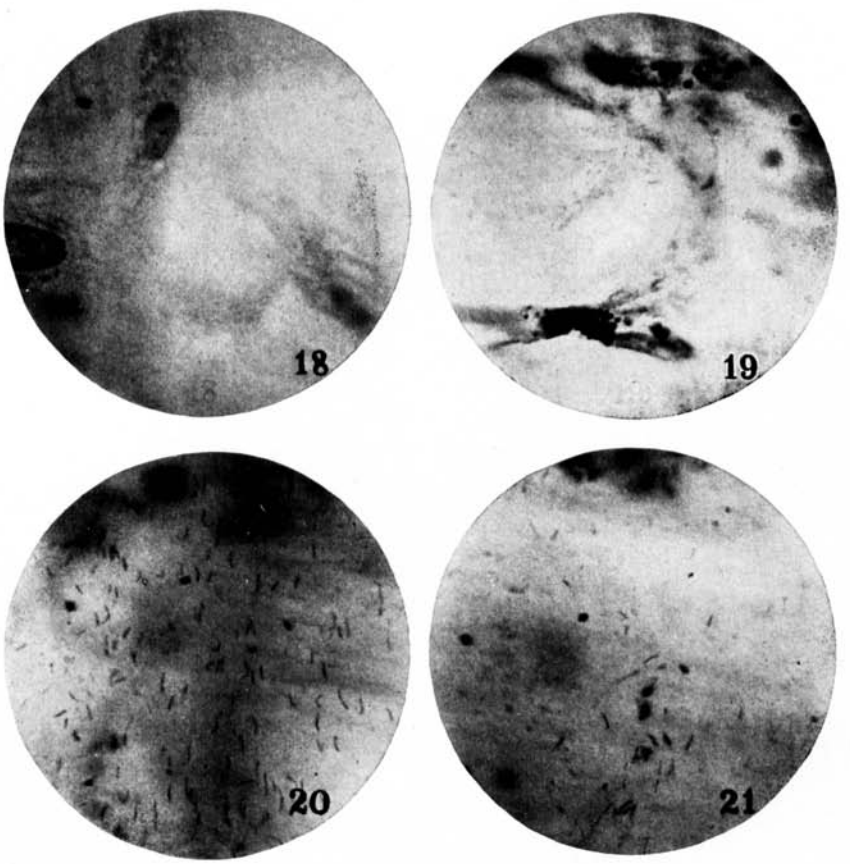


PLATE 4