マウスにおける恙虫病の不顕性感染による 免疫に関する実験的研究

Experimental Studies of Immunity Following Induced Inapparent Infection with *Rickettsia orientalis* in Mice

東京大学医学部衛生学教室 (主任 羽里彦左衛門教授)

関 場 一 恵

Kazue Sekiba

Department of Hygiene, Faculty of Medicine, University of Tokyo

(Director: Prof. H. Hazato)

緒 言

ウイルスおよびリケッチア病の疫学的調査において、
ウイルスの地理的分布を知るには、住民の集団的血清につい
て、不顕性感染による抗体産生の有無の状態を調査すべ
ば、その大勢を知ることができる。恙虫病の不顕性感染
については、七島熱および古典的夏型恙虫病々々の浸染
状態を知る 目的のもとに、ワイル・フェリックス反応
OX_K 凝集素の発現状態を調べた報告⁸⁾ もみられるが、
まだ決定的結果が得られていない。

著者は低濃度のウイルスをマウスの皮下に接種し、感染を
受けても無症状で経過したのを不顕性感染と見做し、そ
れによつて得られた獲得性免疫が再感染接種攻撃に対
し、いかなる免疫状態を示すかにつき、マウスを用いて
実験的研究をおこない、注目すべき結果をあげたので
ここにそれを報告する。

実験材料および実験方法

実験動物

市販の白色マウスを購入し、研究室内で麦、パン屑お
よび魚粉と野菜などを与え1週間以上飼育し、15g前後
に達した健康なものを選んで実験に使用した。

供試病毒株

大関株 1949年新潟県恙虫病患者より分離した株で、
予防衛生研究所ウイルス・リケッチア部から分与され、
本教室においてマウス継代法で保存したものである。

長戸路株 七島熱患者血液より分離された株で予防衛
生研究所より分与された。

実験方法

一群の正常マウスに、感染マウス脾臓の 10^{-1} から 10^{-8}
までの各種稀釈乳剤をつくり、腹腔内へは 0.2cc、皮下
には 0.1ccをそれぞれ注射し、その後3週間以上の観察
により、発症斃死のみられなかつたものを、不顕性感染
動物として取り扱った。

不顕性感染の証明には、生残動物の脾を摘出し、継代
接種よりリケッチア感染を立証した。

不顕性感染により成立した免疫の程度を知るには、大
関株および長戸路株感染マウス脾の 10^{-1} または 10^{-2} 乳
剤 0.2ccを腹腔内に交叉的に再感染接種をおこない、そ
の後3週間以上にわたり感染死の有無を観察した。

再感染試験までの期間の長短により、動物の生死によ
る免疫判定に相違をきたすことがみられたので、早期再
感染試験は間隔を1週ないし2週とし、後期再感染試験
では3週間以後とした。

実験成績

実験 1.

大関株感染マウス脾の 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、
 10^{-8} の各稀釈乳剤を、それぞれ12頭のマウスの腹腔内に
0.2ccずつ注射し、3週間の観察により生残したものは、
第1表に示すごとくであつた。

第1表に示すごとく、 10^{-3} および 10^{-4} 乳剤接種群で

第 1 表

接種脾乳 剤稀釈度	大関株 0.2 cc 腹腔内接種群														
10^{-3}	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	
	7	8	10	10	11	11	11	11	12	13	14				
10^{-4}	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
	10	12	12	12	13	13	14	15	18	18	21	21			
10^{-5}	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
	16	18													
10^{-6}	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
	21														
10^{-7}	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
	18	21													
10^{-8}	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	

第 2 表

接種脾乳剤濃度		大関株腹腔内 接種生残群		10 ⁻¹ 脾乳 剤 0.2 cc 腹腔内接 種	被接種 正常マ ウス群		
10 ⁻⁵		○ ○ ○ ○		→	● ● 11 13		
剖 検 所 見	リンパ腺	(+)	(+)	(-)	(-)		
	脾	(-)	(+)	(-)	(-)		
	腹水	(-)	(-)	(-)	(-)		
	粘度	(-)	(-)	(-)	(-)		
	リケッチア	(-)	(-)	(-)	(-)		
10 ⁻⁶		○ ○ ○ ○		→	● ○ 30		
剖 検 所 見	リンパ腺	(-)	(+)	(-)	(-)		
	脾	(-)	(-)	(+)	(-)		
	腹水	(-)	(-)	(-)	(-)		
	粘度	(-)	(-)	(-)	(-)		
	リケッチア	(-)	(-)	(-)	(-)		
10 ⁻⁷		○ ○ ○ ○		→	● ○ 32		
剖 検 所 見	リンパ腺	(-)	(+)	(+)	(-)		
	脾	(-)	(+)	(-)	(-)		
	腹水	(-)	(-)	(-)	(-)		
	粘度	(-)	(-)	(-)	(-)		
	リケッチア	(-)	(-)	(-)	(-)		
10 ⁻⁸		○ ○ ○ ○ ○		→	● ○ 43		
剖 検 所 見	リンパ腺	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	
	脾	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	
	腹水	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
	粘度	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
	リケッチア	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	

第 3 表

接種脾乳 剤稀釈度	大関株 0.1 cc 皮下接種群									
10^{-2}	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○
	11	21	21	21	22	24				
10^{-3}	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○
	21	22	24	24	24					
10^{-4}	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	6									
10^{-5}	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
10^{-6}	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	16									
10^{-7}	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	17									

はほとんどすべてが感染死をきたしたが、 10^{-5} 接種群では 12 頭中 2 頭が死亡したのみで、残りの 10 頭は生残した。 10^{-6} 、 10^{-7} 接種群においても、ほとんど同様の成績が得られ、 10^{-8} 接種群では全部が生残した。各接種群の生残半分の動物の脾を集めて、 10^{-1} 稀釈乳剤をつくり、その 0.2cc をそれぞれ正常マウス 2 頭の腹腔内に注射し、リケッチアによる感染死の有無を検したところ、 10^{-5} 感染動物群の脾によつては、接種動物の 2 頭中の 2 頭が感染死をきたし、それよりも低濃度感染動物群の脾の接種を受けたマウス 2 頭のうち 1 頭が感染死をきたした。第 1 表および第 2 表に示す実験結果から、腹腔内接種を受けたマウス群においても、少量感染の場合には、不顕性感染に止まるものが多く、無症状に止まるも脾臓内に感染したリケッチアを保有していたことが明らかである。

実験 2.

大関株を用いて、0.1cc 皮下接種の場合はいかなる結果が得られるかについて実験をおこなつた。

第 3 表のごとく、0.1 cc 皮下接種によつても、比較的高濃度(10^{-2} および 10^{-3} 乳剤)の場合は、被接種動物の過半数が発症死をきたし、それよりも低濃度(10^{-4} ~ 10^{-7} 乳剤)の場合は、過半数が発症死から免れ生残するをみた。

生残動物の約半数を剖検するに、リンパ腺および脾臓の腫大が明らかに認められ、これらはリケッチア感染に由来することが想定された。これら脾臓の混合乳剤をつくり、正常マウス腹腔内へ接種したところ、第 4 表に示すごとく、 10^{-4} 乳剤感染動物の脾乳剤接種動物は、いずれも 2 頭中 2 頭が感染死をきたし、それよりも低濃度乳剤感染動物の脾乳剤接種動物においては、発症をみなか

つたが、剖検によりいずれもリンパ腺、とくに脾臓の腫大が顕著に認められ、この所見はリケッチア感染を肯定す

第 4 表

接種脾乳剤濃度	大関株皮下 接種生残群	10 ⁻¹ 脾乳剤 0.2 cc 腹腔 内接種	被接種正常 マウス群
10 ⁻²	○ ○ ○	→	● 8 ● 12
剖 検 所 見	リ ン パ 腺 (+) (++) (++) 腹 水 (—) (—) (—) 粘 度 (—) (—) (—) 脾 (冊) (冊) (冊) リケッチア (—) (—) (—)		
10 ⁻³	○ ○ ○	→	● 9 ● 9
剖 検 所 見	リ ン パ 腺 (+) (+) (+) 腹 水 (冊) (—) (—) 粘 度 (—) (—) (—) 脾 (冊) (冊) (冊) リケッチア (—) (—) (—)		
10 ⁻⁴	○ ○ ○	→	● 9 ● 11
剖 検 所 見	リ ン パ 腺 (—) (+) (+) 腹 水 (—) (—) (—) 粘 度 (++) (—) (—) 脾 (++) (冊) (冊) リケッチア (±) (—) (—)		
10 ⁻⁵	○ ○ ○	→	○ ○
剖 検 所 見	リ ン パ 腺 (+) (—) (—) 腹 水 (—) (—) (—) 粘 度 (—) (—) (—) 脾 (+) (+) (—) リケッチア (—) (—) (—)		(+) (+) (—) (—) (—) (—) (++) (冊) (—) (—)
10 ⁻⁶	○ ○ ○	→	○ ○
剖 検 所 見	リ ン パ 腺 (+) (—) (+) 腹 水 (—) (—) (—) 粘 度 (—) (—) (—) 脾 (+) (+) (++) リケッチア (—) (—) (—)		(+) (+) (—) (—) (—) (++) (++) (++) (—) (—)
10 ⁻⁷	○ ○ ○	→	○ ○
剖 検 所 見	リ ン パ 腺 (—) (—) (+) 腹 水 (—) (—) (—) 粘 度 (—) (—) (—) 脾 (+) (++) (—) リケッチア (—) (—) (—)		(+) (+) (—) (—) (—) (—) (冊) (++) (—) (—)

るに充分であつた。

次に大関株腹腔内接種動物を 2 分し、一方には大関株、他方には長戸路株感染マウス脾乳剤 10⁻²、0.2cc 腹腔内注射により再感染攻撃をおこなつたところ、第 5 表に示すごとくいずれの株に対しても高度の防禦力を示すをみた。

長戸路株を用いて同様の実験（皮下接種免疫）を繰り返したが、大関株の場合とほぼ同一傾向の実験結果が得られた。第 6 表および第 7 表はこの場合の成績を示す。

実験 3.

以上のごとく、再感染攻撃試験によつて、大関株、長戸路株の間に、抗原的差異の認められなかつたことは、初感染から再感染までの期間の長短に由来するのではないかと考えられたので、実験 3 においては、攻撃までの期間を 1 週、2 週および 3 週の 3 つについて試験をした。第 8 表は大関株および長戸路株を用いての交叉直接攻撃試験の結果を示す。

第 5 表

		大 関 株 攻 撃 (10 ⁻² , 0.2 cc) 群	長 戸 路 株 攻 撃 (10 ⁻² , 0.2 cc) 群
大 関 株 腹 腔 免 疫 接 種 濃 度	10 ⁻³	○	○
	10 ⁻⁴	○ ○ ○ ○ ● 15	○ ○ ○
	10 ⁻⁵	○ ○ ● ● ● 12 19	○ ○ ● ● ● 23 28
	10 ⁻⁶	● ● ● ● ● 10 14 17	● ● ● ● ● 11 12 23

第 6 表

接種脾乳 剤濃度	長戸路株皮下接種 生残群 (0.1 cc)	10 ⁻¹ 脾乳剤 0.2 cc 腹腔 内接種	被接種正常 マウス群
10 ⁻²	○ ○ ○ ○	→	○ ● ● ● 17 21
10 ⁻³	○ ○ ○	→	○ ● ● ● 17 20
10 ⁻⁴	○ ○ ○ ○	→	○ ○ ● ● 10
10 ⁻⁵	○ ○ ○ ○ ○	→	○ ○ ○
10 ⁻⁶	○ ○ ○ ○ ○	→	○ ○ ○
10 ⁻⁷	○ ○ ○ ○	→	○ ○ ○

第 7 表

		長戸路株攻撃 (10^{-1} , 0.2 cc)				
長免 戸疫 路接 株種 皮濃 下度	10^{-2}	○	○			
	10^{-3}	○	○	○	●	12
	10^{-4}	○	○	○	●	18 20
	10^{-5}	●	●	●	●	25 28
	10^{-6}	●	●	●	●	23
	10^{-7}	●	●	●	●	30

この場合の成績は表に示すごとく、大関株免疫群を 1 週後に、同株大関株で攻撃した場合には 58.82% の生残率を示し、異株長戸路株で攻撃した場合には 43.75% の生残率を示し、両者の間にいくぶんの防禦率の差が認められたが、長戸路株免疫群においては、同株長戸路株攻撃の際の生残率が 81.25% を示し、異株大関株攻撃の際は 41.17% を示し、大関株免疫群におけると同様に、同株攻撃の場合の方が異株攻撃の場合よりも、高い防禦率

を示すことが認められた。ところが 2 週後に攻撃を加えた場合の防禦率は、1 週攻撃の場合よりもやや高率を示し、同株攻撃の場合と、異株攻撃の場合との相違があまり顕著でなくなる傾向のあることが認められた。

3 週攻撃の場合は、その傾向がますます顕著となり、同株攻撃の場合も異株攻撃の場合も同様に生残率がより高度となり、両者の間にその差を認めがたくなる傾向のますます顕著となること、すなわち得られた結果から両株の間の抗原的差異を判定することが容易でないことが認められた。

考 按

上述の実験成績から考えられることは、皮下接種によつても、腹腔内接種によつても、感染量の比較的高濃度の場合の生残動物においては、リケッチアが体内にあつても発症死から免れたものは、不顕性感染に終つたものであることが、その動物の脾を次代マウス腹腔内に接種し、リケッチア感染死をきたすことから立証され、低濃度感染群においては、生残動物数を増すも、それら動物群にリケッチア感染が立証されないときは、免疫のほとんどが成立していなかつたことが、再接種攻撃により明らかにされた。

免疫成立が充分想定される動物群を用いての再接種攻

第 8 表 大関株および長戸路株による交叉直接攻撃実験

攻撃までの 期間	攻 撃 株	大関株免疫 (10^{-3} , 0.1 cc, 皮下) 群	生残率	長戸路株免疫 (10^{-3} , 0.1 cc 皮下) 群	生残率
1 週	大関株攻撃群	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ● 8 9 10 10 12 14 15	58.82%	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ● 7 9	41.17%
	長戸路株攻撃群	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ● 8 12 13 ● 14 15 16 16 20 25	43.75%	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ● 15 18 21	81.25%
2 週	大関株攻撃群	○ ○ ○ ○ ○ ○ ● 20 20	75%	○ ○ ○ ○ ○ ○ ● 21	85.71%
	長戸路株攻撃群	○ ○ ○ ● 5 6 7	50%	○ ○ ○ ● 9 10 13	50%
3 週	大関株攻撃群	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ● 7 12 16	76.92%	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ● 7 10 14	80%
	長戸路株攻撃群	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ● 16	91.66%	○ ○ ○ ● 6 7	86.66%

○ は生残 ● は死亡および死亡までの日数を意味する
10

撃により、同株、異株に対する防禦力の程度の差を知らんとするには、再接種攻撃までの期間を比較的短くしておこなうことが必要であり、それよりも長期間後におこなうときは、同株攻撃に対してはもちろん、異株攻撃に対して高度の防禦力を示し、その結果から両者の抗原的差異を推定することが困難となる⁶⁾。

他の二、三の学者も、恙虫病の血清反応において特異性を異にする抗体の産生時期が同一でないことのあること^{5), 7)}を報告している。

これらのことから考えられることは、同種族リケッチア株においても株特異性のあることが推定され、早期においては株特異性抗体がより多く産生され、後期になると株間における共通抗原が多く産生されて、交叉反応が顕著に出現するために、株特異性を立証することが困難となる。恙虫病リケッチアの抗原分析に関し、従来の報告^{1) 2) 6) 7)}においていくたの異論および混乱のみられるのは上述の事実がその原因の一つであることが考えられる。

結 論

著者は新潟県恙病患者大関株と七島熱恙病患者長戸路株とを用いて、マウスにおける不顕性感染のあることを実験的に立証し、不顕性感染の立証された動物においては、再接種攻撃に対し、高度の防禦力、すなわち免疫の成立が認められ、株間の特異性を知るには、攻撃までの期間を比較的早期におこなうことが肝要であることを立証し、その成績を記載した。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導を賜わった恩師羽里教授に満腔の謝意を捧げるとともに、御支援、御

助力をいただいた山本俊一氏をはじめとする東大衛生学教室諸氏、および実験に際し多大の便宜を与えられた群馬中央総合病院宮沢院長に深く感謝いたします。

本実験の一部は地方性リケッチア症調査研究田宮班の研究費の支援によつたものであることをここに付記し深甚の謝意を表します。

文 献

- 1) Kawamura, A. et al.: Studies on *R. tamiyai*. Jap. J. Exp. Med., 24, 385~409, 日本医事新報, 第1611号, 1231~1250, 1955.
- 2) 尖戸亮, 大田原美作雄, 館野進, 北岡正見: 恙虫病リケッチアの免疫に関する研究. *Virus*, 7, 455~457, 1957.
- 3) 中村賢吉: 日本に於ける患者及び野鼠から分離した恙虫病リケッチア株間の交叉直接攻撃法による免疫的關係. *社会保険医学雑誌*, 通巻13号, 14~18, 1958.
- 4) 塩谷忠春: いわゆる野比熱患者より分離した恙虫病リケッチア株に関する研究. *日本衛生学雑誌*, 第13巻第6号, 823~829, 1959.
- 5) 石橋英雄: *R. orientalis* 感染家兎における *Chloramphenicol* 投与の抗体産生に及ぼす影響. *日本衛生学雑誌*, 第14巻第2号, 162~170, 1959.
- 6) 野原孝七: 日本諸地域患者および野鼠から分離した恙虫病リケッチア株の抗原分析に関する研究. *日本衛生学雑誌*, 第14巻第3号, 334~347, 1959.
- 7) 羽里彦左衛門: 日本における恙虫病研究の最近の進歩, 病原体方面. 第15回日本医学会総会主題33発表, 1959.
- 8) 東京都: 七島熱の調査研究, 1952.

(受付: 1959年5月19日, 特別掲載)