恙虫病リケッチア接種マウスおよびラットにおける ウイルスの各血液成分内分布について

Studies on the Distribution of Agent in the Blood Elements in Mice and Rats inoculated with Tsutsugamushi Disease Rickettsiae

東京大学医学部衛生学教室（主任 羽里彦左衛門教授）

門 脇 秀 夫

Hideo Kadowaki

Department of Hygiene, Faculty of Medicine, University of Tokyo

(Director: Prof. H. Hazato)

I. 緒 言

病原微生物と血液との関係については喰菌作用の面から、またウイルスの赤血球凝集現象の面からそれぞれ種々報告がみられる。当教室においても黒子¹⁾の細菌および血清の腹腔内注射に対する腹腔内各種白血球の態度についての報告や、佐藤²⁾の泉熱ウイルスを用いての血液諸成分とウイルスとの関係についての基礎的実験がある。著者は実験的恙虫病において、リケッチア血症の時期に流血中の *Rickettsia* が血液の各成分とどのように関連しているかを主題として実験をおこなった。血液成分を分離する方法は古来種々の試みがあるが、病原体の毒力を低下させず、血球の機能を阻害せず、生体に対して有毒成分が含まれず、かつ純粹に採集できるという理想的方法が困難なため、血液諸成分とウイルスとの比較関係については、なお満足すべき報告がみあたらない。白血球の性状を利用し採集する方法としては、異物注入による捕集、物理的方法による分離および化学的方法による分離があるが、著者は最近 Polyvinylpyrrolidone (K 90) (Average Molecular Weight 70,000) を入手したので、この薬品を使用する物理的方法を選んで白血球採集法とした。Polyvinylpyrrolidone (以下 P.V.P. と略す) はドイツでは10数年前より代用血漿剤として用いられ、近時わが国でも盛んに使われており、コロイド性をもち化学的に中性で毒性は非常に少ない。P.V.P. の高分子部分は赤血球沈降速度に影響を及ぼし、正常状態では赤血球は血清中で負に荷電し浮

遊していると考えられているが、P.V.P. により赤血球の電荷状況が不安定となつて体外で速やかに沈澱するものと考えられる。このように P.V.P. は代用血漿剤として盛んに用いられているので、少なくとも血球ないし生体側に対する欠点は除外できる。したがつて、これを用いて実験した場合に病原体側の毒力低下がなければ、かかる問題の実験法として優れたものとなることが考えられる。著者は P.V.P. を用いる白血球の採集法に検討を加えることにより、恙虫ウイルスと血液との関係を、病毒側に影響を与えることなく追究できることを認めたので、ここにその成績を発表する。

II. 実験材料および方法

1) 使用恙虫病病毒株

昭和24年新潟県恙虫病患者から分離したもので伝染病研究所川村博士より分与され当教室でマウス継代保存された *Rickettsia orientalis* 大関株を使用した。

2) 使用動物

市販の雑系白色マウスを研究室内でオリエンタル固型飼料と水を与え1週間前後飼育し、10 g から15 g までの健全な動物を選んで実験に供した。

3) 恙虫病リケッチアのマウスにおける発症条件

大関株継代をおこなった腹腔内接種マウスを接種6日から10日後に殺し、腹壁リンパ腺腫脹、粘稠性の腹水滲溜、脾臓の腫脹があり、腹膜上皮細胞の塗抹標本により *Rickettsia* の証明されたマウス脾臓の生理的食塩水10%

乳剤 0.2 ml をマウス腹腔内に注射した。大関株の発症に要する期間は夏で8日から10日、冬は6日から8日で、松原⁴⁾は寒冷時においては発症、死亡が早いと発表している。発症の外見条件としては元気喪失し、動作が緩慢となり、食欲不振となり、体毛の艶がなくなり、毛が荒だつて逆毛となり、腹部が腹水滯溜のため膨隆し、下痢現象を呈することなどである。

4) 採血方法

動作が緩慢となり元気喪失せるマウスを無麻酔にて仰臥位固定し、股部を消毒切開し股動脈を露出し、周囲筋肉に損傷を与えないよう注意して切断し、1 cc のツベルクリン用注射器にて無菌的に採血をおこなつた。

5) 血液凝固阻止剤

二重蓚酸および EDTA (市販品名 Crewat N) を使用した。固体のまま用いる場合は二重蓚酸を使い、血漿の稀釈が問題にならぬときは、白血球採集上の利点や毒性が少なく凝固阻止能力や溶血防止の点で Crewat N⁵⁾を選んだ。

後者は5%の葡萄糖液に1%の割合で Crewat N を混じ、1% Crewat N 葡萄糖溶液とし血液との対比1:9の割合にておこなつた。なお採血の際は常に氷水中にて血液を冷却できるよう注意した。

6) 白血球の採集

P.V.P. を用い白血球を集める方法として Dausset⁶⁾に準じた。原法では約 1/5 量の 3.5% P.V.P. 溶液(高分子)を脱線維血液に加えよく混じ、37°C の孵卵器中で45度傾斜して30分間放置すると比重の差により赤血球は沈澱し、ピンク色の上清ができ、この上清は大体 5,000 ~ 10,000 /mm³ の白血球と 100,000 ~ 500,000 /mm³ の赤血球を含むという。しかるに原法では脱線維血液をつくる際にはどうしても多少の溶血現象を起し、赤血球の破壊物質混入が不可避のうえ、37°C 孵卵器30分間放置は毒力の低下や Rickettsia の血球からの誘出が考えられるので、この欠点を解決するために次の改良法を考案した。すなわち血液9に1% Crewat N 葡萄糖液1の割合に混じ氷水中に立て、分子量7万の 3.5% P.V.P. 生理的食塩水溶液(以下 3.5% P.V.P. 溶液と略す)を約 1/5 量加えよく混じ、800 rpm 5分間遠心沈澱を加えると赤血球は沈澱しピンク色の上清ができる。この上清には正常マウス白血球 2,500 ~ 4,500 /mm³ と赤血球 5 万 ~ 20 万 /mm³ を含み、さらにこの赤血球を除去するには白血球浮遊液に800 rpm 5分間遠心沈澱を加え、沈澱赤血球塊を除去すれば純度は高まる。

7) 血球計算

実験に際しては、白血球の採集の場合、赤血球の混入が不可避のため全血、白血球浮遊液および赤血球浮遊液中の各血球の割合を示すため血球計算をおこない、少なくとも3回繰り返し計算し平均をとつた。

8) 溶血方法

Lusena, Rose⁷⁾ は種々の濃度のグリセリンを使い豚の赤血球の凍結による溶血現象の遅延作用を発表しているが、著者は試験管内採取血液をドライアイスを入れた魔法瓶に4分間から5分間入れ凍結し、次に取り出して室温に放置融解することにより、白血球の形態は破壊されずに赤血球の溶血現象のみを起すことに着目し、白血球は破壊されずに赤血球の溶血現象のみを期待する場合はこの方法にておこなつた。さらに白血球の破壊をも期待する場合は、ドライアイスを入れた魔法瓶内で凍結10分間後室温に放置し融解を起させ、この凍結融解を2回繰り返しおこなつた。

9) 白血球をリンパ球層と混合層に分離する方法

Philippu⁸⁾ の方法を踏襲し前記白血球の採集方法で集めた白血球塊を、長さ11 cm、内径2 mm の毛細管に入れ 500 rpm 6分間遠心沈澱すると上層に比重の軽いリンパ球が分かれ、下層は顆粒球、リンパ球および単核細胞の混合層となる。この実験では白血球のみをマウスで多量に集めるのは困難なのでとくに 100 g 前後の雄ラットを使用した。

10) リケッチア病毒の LD₅₀ の求め方

実験に際し、マウスの血液内含有病毒量を調べるため、10進法で S P G 液⁹⁾ を用い 10⁻⁴ まで稀釈し、各稀釈液ごとにマウス 3 匹ずつに 0.2 ml ずつ腹腔内接種し、斃死せるものは斃死日数を記入し、3週間動物を観察後生存せるものは剖検所見により感染の有無を判定し ID₅₀ を計算した。この際の ID₅₀ はほとんど毎常 LD₅₀ に一致した。故に実際の数字として表わす場合は常に LD₅₀ 対数値とした。なお LD₅₀ の算定方法は Behrens-Kaerber の法によつた。

11) 各実験ごとの対照の設定

実験に際し対照として必ず全血の LD₅₀ を調べそれぞれ比較した。

III. 実験成績

1) 大関株感染マウス(接種7日後)の全血、血球および血漿の含有病毒量

大関株腹腔内接種7日後のマウスの血液をあらかじめ乾燥せる二重蓚酸塩加冷却滅菌小試験管に採取し、まず全血を S P G 液により 10進法で稀釈し、ついて 3,000

rpm 5 分間遠心沈澱して血球と血漿に分けてそれぞれをさらに SPG 液で 10 進法稀釈をおこない、各稀釈液をマウスの腹腔内に 0.2 ml ずつ接種し 3 週間観察を続け LD₅₀ 対数値を調べた。その結果は第 1 表に示すごとく血球と血漿のマウス LD₅₀ 対数値は同じであるが斃死日数は血球の方がより短く含有ウイルス量は全血、血漿の順であつた。

第 1 表

	全 血	血 球	血 漿
10 ⁻¹	● 11 13 15	● 12 14 15	● 13 15 18
10 ⁻²	● 14 14 18	● 10 14	● 15 20
10 ⁻³	● 16	● 13	● 14
10 ⁻⁴	● 18	● 5	● 13
LD ₅₀ 対数値	3.17	2.83	2.83

註：表中●は死亡，○は生残，下部数字は死亡までの日数を意味す

2) 大関株感染マウス (接種 7 日後) の血球内病毒に対する洗滌の影響

大関株接種 7 日後のマウスの血液を上記の場合と同様方法で採取し、3,000 rpm 10 分間遠心沈澱し血漿を除き、除いた血漿と同量の SPG 液を入れよく攪拌し、この血球浮遊液を SPG 液により 10 進法稀釈をおこない、各稀釈液をマウスに接種し第 1 回洗滌血球浮遊液の LD₅₀ 対数値を求めた。さらにこの血球浮遊液を 3,000 rpm 10 分間遠心沈澱して、その上清 0.2 ml ずつをマウス 2 匹に接種し、第 1 回洗滌上清中に遊離したと思われる *Rickettsia* の有無を調べた。ついて沈澱血球に第 1 回と同様

第 2 表

	第 1 回洗滌	第 2 回洗滌	第 3 回洗滌
10 ⁻¹	● 13 14 17	● 11 12 17	● 13 13 13
10 ⁻²	● 15 17 17	● 15 17 18	● 14 16 17
10 ⁻³	● 18 19	● 20 21	● 15
10 ⁻⁴	● 19 21	● 16	● 5
LD ₅₀ 対数値	3.83	3.50	3.17

	第 1 回洗滌上清	第 2 回洗滌上清	第 3 回洗滌上清
	● 14 21	● 14 14	● 14 14

にして SPG 液を加え処置を施し第 2 回洗滌による病毒含有量の変化と第 2 回洗滌上清中の病毒量を測り、同様操作を第 3 回まで繰返しおこなつた。その結果は第 2 表に示すごとく洗滌ごとに暫時血球浮遊液の LD₅₀ 対数値はわずかに低下するが、同じ 3 以内の値を示し、また上清接種マウスは各回とも感染斃死した。

3) 大関株感染マウス (接種 7 日後) の全血、白血球浮遊液、赤血球および血漿混合液の含有ウイルス量

大関株接種 7 日後マウス血液を、1% Crewat N 葡萄糖液 0.2 ml をあらかじめ入れた小試験管にとり、3.5% P.V.P. 溶液を 1/5 量入れて全量をほぼ 2.5 ml とし、その 0.2 ml を全血として 10 進法稀釈をおこないマウスに接種した。次に残りの血液を白血球浮遊液と赤血球および血漿混合液に分離し、それぞれ 10 進法で稀釈しマウスに接種した。すなわち残りの血液 2.3 ml を 800 rpm 5 分間遠心沈澱して得た上清 (白血球浮遊液) を他の試験管にとり、3,000 rpm 10 分間遠心沈澱して白血球沈澱をつくり、ついて上清を吸い上げて赤血球沈澱に入れ、さらにその赤血球浮遊液を 2 回目 800 rpm 5 分間遠心沈澱して得た上清 (白血球浮遊液) を白血球沈澱のある試験管

第 3 表

	全 血 (680万 2,800)	白血球 浮遊液 (14万 2,400)	赤血球 及血漿 (630万 400)
10 ⁻¹	● 2 13 13	● 4 11 13	● 6 15 16
10 ⁻²	● 6 17 18	● 15 15 15	● 6 14 17
10 ⁻³	● 5 6 16	● 6 6 13	● 4 4 18
10 ⁻⁴	● 6 20	○ ○ ○	● 14
LD ₅₀ 対数値	4.17	3.50	3.83

註：上段 () 内の上の数字は赤血球数、下の数字は白血球数

に入れ、3,000 rpm 10 分間遠心沈澱して白血球沈澱と血漿を分離して、その血漿を赤血球沈澱に入れ赤血球血漿混合浮遊液とした。白血球沈澱には最初の全血液と同量の 2.3 ml SPG 液を入れた。かくして得た赤血球および血漿混合液と白血球浮遊液とを 10 進法で稀釈しマウスに接種した。なお全血の血球計算では赤血球数 680 万、白血球数 2,400、赤血球および血漿混合浮遊液では赤血球数 630 万、白血球数 400 であつた。第 3 表の実験結果をみるに白血球浮遊液と赤血球および血漿混合液とのマウス LD₅₀ 対数値は 3.50 と 3.83 で、赤血球および血漿混合液に含有ウイルス量がわずかに多かつた。

4) 大関株感染マウス (接種 7 日後) の全血と白血球浮

遊液および赤血球浮遊液とそれぞれ凍結融解浮遊液の含有病毒量

大関株接種 7 日後 マウス血液に 抗凝固剤として 1% Crewat N 葡萄糖液 $\frac{1}{10}$ 量と 3.5% P.V.P. 溶液 $\frac{1}{5}$ 量を加えよく混和し、まず凍結前この全血をドライアイスで 1 回凍結融解したもののマウスに対する LD₅₀ 対数値を求めた。その際赤血球数 456 万、白血球数 2,100 であった。残りの血液を 800 rpm 5 分間遠心沈澱し、白血球浮遊液と赤血球沈澱を得た。しかしなお赤血球沈澱には白血球が相当数含まれているので、赤血球沈澱に 3.5% P.V.P. 溶液 $\frac{1}{5}$ 量を加え S P G 液を入れて全量を原容と同容量とし、800 rpm 5 分間遠心沈澱し、上清の白血球浮遊液を最初の白血球浮遊液と混じ、800 rpm 5 分間

第 5 表

	全 血 (801万 2,200)	白血球 浮遊液 (7万 2,000)	赤血球 (805万 400)
10 ⁻¹	● 12 ● 13 ● 14	● 14 ● 15 ● 15	● 14 ● 15 ● 15
10 ⁻²	● 15 ● 16 ● 17	● 16 ● 18 ● 18	● 19 ● 20 ○
10 ⁻³	● 16 ● 21 ○	○ ○ ○	○ ○ ○
10 ⁻⁴	○ ○ ○	● 20 ○ ○	○ ○ ○
LD ₅₀ 対数値	3.16	2.83	2.16

澱をつくる前の白血球浮遊液を血球計算し、さらに白血球沈澱と上清を分離してその上清の量を計り、この白血球沈澱に比例式で求めた数量の S P G 液を加えて赤血球

第 4 表

	全 血	凍 結 融 解 全 血	白血球浮遊液	凍 結 融 解 白血球浮遊液	赤血球浮遊液	凍 結 融 解 赤血球浮遊液
10 ⁻¹	● 12 ● 12 ● 14	● 12 ● 15 ● 15	● 15 ● 16 ● 18	● 15 ● 16 ● 18	● 14 ● 14 ● 14	● 13 ● 14 ● 21
10 ⁻²	● 15 ● 16 ● 19	● 15 ● 18 ● 20	● 14 ● 14 ● 20	● 12 ● 19 ● 20	● 14 ● 16 ○	● 15 ● 18 ● 18
10 ⁻³	● 6 ● 6 ● 13	○ ○ ○	○ ○ ○	● 5 ○ ○ ○	● 12 ● 15 ○	● 7 ● 16 ○
10 ⁻⁴	● 13 ○ ○ ○	○ ○ ○	● 12 ○ ○ ○	● 16 ○ ○ ○	● 4 ○ ○ ○	○ ○ ○
LD ₅₀ 対数値	3.83	2.50	2.83	3.17	3.17	3.17

遠心沈澱して赤血球を除き、3,000 rpm 5 分間遠心沈澱して白血球沈澱をつくり、S P G 液で原容とした。この白血球浮遊液は赤血球数 20 万、白血球数 1,200 よりなる。また赤血球沈澱にも S P G 液を加えて原容にした。これは赤血球数 485 万、白血球数 200 であった。これらの白血球浮遊液および赤血球浮遊液を凍結融解しその前後における病毒量をマウス腹腔内注射による LD₅₀ 対数値として求めた。

その結果は第 4 表に示すごとく全血では凍結融解した場合の LD₅₀ 対数値が低く、白血球浮遊液の場合は凍結融解した液の LD₅₀ 対数値が高く、赤血球浮遊液の場合は凍結融解した場合と同じ LD₅₀ 対数値を示した。

5) 大関株感染マウス (接種 7 日後) の全血とほぼ同数の白血球数または赤血球数を含む白血球浮遊液および赤血球浮遊液の含有病毒量

大関株接種 7 日後マウス血液に Crewat N 葡萄糖液を $\frac{1}{10}$ 量および 3.5% P.V.P. 溶液を $\frac{1}{5}$ 量の割に加えよく混じ、血球計算すると赤血球数 801 万、白血球数 2,200 であった。次に前回同様にして白血球沈澱と赤血球沈澱をつくり、全血の白血球数と一致させるため、白血球沈

澱 7 万、白血球数 2,000 のものをつくり、赤血球沈澱についても同様赤血球数 805 万、白血球数 400 と相近似せる血球数にした浮遊液をつくった。以上全血、白血球および赤血球浮遊液の 3 系列を 10 進法稀釈し、マウスに接種した結果は第 5 表のごとく、LD₅₀ 対数値は全血は 3.16、白血球浮遊液は 2.83、赤血球浮遊液は 2.16 であった。

6) 大関株感染マウス (接種 7 日後) 血液の凍結融解処理後の遠心上清および遠心沈澱の含有病毒量、および未処置全血、血漿、凍結融解処理後の全血との比較

大関株 7 日後マウス血液に 1% Crewat N 葡萄糖溶液を $\frac{1}{10}$ 量加え、まず対照として全血と別に 3,000 rpm 10 分間遠心沈澱した血漿性上清の病毒含有量を測定した。次にドライアイスで 5 分間凍結融解した溶血血液を 3 分し、1 部はそのまま病毒量を調べ、他の 1 部は 3,000 rpm 10 分間遠心沈澱して凍結融解後の溶血上清と凍結融解後の沈澱に分けて、それぞれ 10 進法稀釈し病毒量を測定した。他の血液ではドライアイスで 10 分間 2 回凍結融解して同様処理した。その結果は第 6 表に示すごとく対照血漿に比較して凍結融解後の溶血上清の LD₅₀ 対数値が高く、それは凍結融解 2 回の溶血上清でも同じ

第 6 表

	全 血	血 漿	凍 結 融 解 処 置 全 血	凍 結 融 解 処 置 上 清	凍 結 融 解 処 置 沈 渣	凍 結 融 解 2 回 処 置 上 清
10 ⁻¹	● 12 ● 15 ● 15	● 19 ● 20 ○	● 16 ● 16 ● 17	● 19 ● 20 ○	● 13 ● 15 ● 15	● 15 ● 16 ○
10 ⁻²	● 16 ● 19 ● 19	○ ○ ○	○ ○ ○	● 15 ○ ○	● 15 ● 15 ● 16	● 15 ○ ○
10 ⁻³	● 16 ● 19 ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	● 17 ○ ○	○ ○ ○
10 ⁻⁴	● 10 ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○
LD ₅₀ 対数値	3.50	1.17	1.50	1.50	2.83	1.50

第 7 表

	全 血	赤血球浮遊液		37°C 放置赤血球浮遊液				白血球浮遊液		
		上 清	沈 渣	30 分間		60 分間		白血球 浮遊液	未処置 上 清	37°C 放置 30 分上清
				上 清	沈 渣	上 清	沈 渣			
10 ⁻¹	● 17 ● 18	○ ○	● 15 ● 15	● 19 ○	● 14 ● 15	○ ○	● 13 ● 15	● 15 ● 16	○ ○	● 15 ● 21
10 ⁻²	● 15 ● 18	○ ○	● 16 ● 19	○ ○	● 16 ● 16	● 10	● 21	● 17	○ ○	○ ○
10 ⁻³	● 14 ● 21		○ ○		● 14 ○		○ ○	● 18		
10 ⁻⁴	○ ○									
LD ₅₀ 対数値	3.5	1.0>	2.5	1.0	3.0	1.0	2.0	2.5	1.0>	1.5

であつた。なお実験4)と同様凍結融解全血の LD₅₀ 対数値は対照全血に比較し低かつた。

7) 大関株感染マウス (接種 7 日後) 血球の 37°C 放置が病毒含有量に及ぼす影響

大関株接種 7 日後マウス血液に前回同様 1% Crewat N 葡萄糖液および 3.5% P.V.P. 液を加えよく混じ、赤血球数 670 万、白血球数 5,600 のものについて含有病毒量を調べ、次に前回同様 800 rpm 5 分間遠心沈澱し白血球浮遊液と赤血球沈渣に分け、さらに赤血球沈渣に全血原容量の SPG 液を混和したものを 800 rpm 5 分間遠心沈澱を繰り返して得た赤血球沈渣に SPG 液を加えて 3,000 rpm 5 分間遠心沈澱し、その沈渣に原容の SPG 液を加えて赤血球浮遊液とした。これは赤血球数 640 万、白血球数 400 で、さらに 3,000 rpm 5 分間遠心沈澱した上清と赤血球沈渣の病毒含有量を測定した。次に前記赤血球浮遊液を 37°C 孵卵器内に 30 分間および 60 分間放置し、3,000 rpm 5 分間遠心沈澱して、上清および沈渣の病毒含有量を調べた。白血球浮遊液については 800 rpm 5 分間遠心沈澱して沈渣赤血球を除き、さらにその上清を 3,000 rpm 5 分間遠心沈澱し、得た白血球沈渣に原容の SPG 液を加えてよく混じ血球計算して赤血球数 16 万、白血球数 3,400 を確かめたのち病毒含有量を調べた。こ

れら 10 系列の試料中の病毒量は第 7 表のごとく、37°C 30 分および 60 分放置した赤血球浮遊液の上清のマウス LD₅₀ 対数値は 1.0 であるのに対照上清の LD₅₀ 対数値は 1.0 より小であり、また白血球浮遊液では未処置対照上清の LD₅₀ 対数値は 1.0 より小であるのに 37°C 放置 30 分間上清の LD₅₀ 対数値は 1.5 であつた。すなわち赤血球、白血球ともに 37°C 放置により上清中に病毒の移行することが認められた。

8) 大関株感染マウス (接種 7 日後) の全血球、白血球および赤血球の洗滌による影響

大関株接種 7 日後マウスの血液に前回同様 1% Crewat N 葡萄糖液 1/10 量および 3.5% P.V.P. 溶液を加え、3,000 rpm 5 分間遠心沈澱し沈渣全血球を SPG 液で原容まで稀釈し、血球計算の結果赤血球数 425 万、白血球数 1,400 であつた。さらに残りの血液から実験 7) と同様白血球沈渣と赤血球沈渣をつくり原容まで SPG 液を加えて稀釈し、血球計算の結果白血球浮遊液では赤血球数 26 万、白血球数 1,200 で、赤血球浮遊液では赤血球数 470 万、白血球数 400 であつた。それぞれ浮遊液を 3,000 rpm 10 分間遠心沈澱し上清をマウス 2 匹に接種し、さらに SPG 液を上清と同量加えて 0.2 ml ずつマウス 2 匹に接種し、さらに 1 回操作を繰り返し第 3 回洗滌までお

第 8 表

	全血球 (425万 1,400)			白血球 (26万 1,200)			赤血球 (470万 400)		
	第1回洗滌	第2回洗滌	第3回洗滌	第1回洗滌	第2回洗滌	第3回洗滌	第1回洗滌	第2回洗滌	第3回洗滌
10 ⁻¹	● 14 ● 15	● 18 ○	● 14 ● 18	● 14 ● 14	● 14 ● 14	● 14 ● 16	● 13 ● 18	● 16 ● 18	● 14 ● 16
10 ⁻²	● 12 ● 18	○ ○	● 14 ○	● 15 ○	○ ○	● 18 ○	● 14 ● 17	● 14 ○	● 14 ● 17
10 ⁻³	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	● 17 ○	○ ○	○ ○	● 5 ● 15	● 15 ● 18
10 ⁻⁴	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	● 15 ○	● 14 ○	○ ○	○ ○	● 18 ○
LD ₅₀ 対数値	2.5	1.0	2.0	2.0	2.5	2.5	2.5	3.0	4.0

第1回 上清	● 20	○	● 14	● 17	● 13	● 18
第2回 上清	○	○	● 16	● 17	○	○
第3回 上清	● 16	○	● 15	● 17	● 15	○

第 9 表

	全血	赤血球 浮遊液	洗滌第1回 上清	洗滌第2回 上清	洗滌第3回 上清	洗滌後 赤血球 浮遊液	凍結融解 処置上清	凍結融解 処置沈渣 浮遊液
10 ⁻¹	● 14 ● 14 ● 16	● 16 ● 17 ● 18	● 16 ● 16 ○	● 17 ○ ○	● 6 ○ ○	● 16 ● 16 ● 18	● 3 ● 4 ● 14	● 13 ● 14 ● 17
10 ⁻²	● 14 ● 16 ● 17	● 17 ● 19 ○	○ ○ ○	● 17 ○ ○	● 11 ○ ○	● 4 ● 18 ○	● 18 ● 20 ○	● 3 ● 8 ● 15
10 ⁻³	● 17 ● 17 ● 18	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	● 17 ○ ○ ○
10 ⁻⁴	● 16 ○ ○ ○	● 12 ○ ○ ○				● 16 ○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○
LD ₅₀ 対数値	3.85	2.50	1.17	1.17	1.17	2.50	2.17	1.83

となった。その結果は第8表に示すごとく赤血球浮遊液に比べ、白血球浮遊液の上清が第3回まで全部斃死しており、また洗滌により血球そのもののLD₅₀対数値は白血球がわずかに低下の傾向にあり、なお赤血球および全血球ではむしろ上昇の傾向にあった。

9) 大関株感染マウス(接種7日後)の赤血球内病毒の洗滌による影響およびその凍結溶血後の上清および沈渣の含有病毒量

大関株接種7日後マウスの血液に1% Crewat N 葡萄糖溶液および3.5% P.V.P. 液 1/5量を前回同様よく混じ、それについて血球数を算定した結果赤血球数 618万、白血球数 4,000 であった。次に同液を前回同様3回遠心沈澱を繰り返したのち、赤血球浮遊液とし、再び血球計算をした結果赤血球数 634万、白血球数 800 であった。さらに同赤血球浮遊液を3,000 rpm 10分間遠心沈澱し上清を10⁻³まで10進法稀釈し、さらに沈渣に対しては

SPG液を加え再浮遊せしめたのち、再び同一条件で遠心沈澱する操作を2回繰り返す、各回につき上清のマウスLD₅₀対数値を測定した。次に第3回目上清を除いたのちの赤血球沈渣にSPG液を原容まで加え赤血球浮遊液とし、これをドライアイス内10分間凍結後融解し、3,000 rpm 10分間遠心沈澱し溶血性上清およびその沈渣浮遊液(SP G液を加えて原容とする)のマウスLD₅₀対数値を測定した。その結果は第9表に示すごとく、洗滌第1回上清も第3回上清もLD₅₀対数値は1.17で変化なく、また洗滌前赤血球浮遊液も洗滌後赤血球浮遊液もLD₅₀対数値は2.50で変化なかった。凍結融解後の上清では2.17と凍結融解前の上清のLD₅₀対数値に比較して上昇を示していた。また凍結融解沈渣浮遊液は1.83で対照の赤血球浮遊液2.50に比較しLD₅₀対数値は低下した。

10) 大関株腹腔内接種後1日から斃死直前8日までの各病日における全血、白血球浮遊液、赤血球浮遊液およ

び血漿の含有病毒量の消長

マウス腹腔内に大関株を接種して1日から斃死直前8日までの各病日に血液を採取し、その全血、血漿、白血球浮遊液および赤血球浮遊液について実験5)と同様方法によつてマウスLD₅₀対数値を測定した。この場合は血漿の上清についても測定した。この際赤血球浮遊液ならびに白血球浮遊液中の血球数を算定した。その成績は第10表および第1図に示すごとくであつた。

第 10 表

	全 血	白血球浮	赤血球浮	血 漿
第1病日 (560万 7,800)	1.17	1.83	2.83	1.17
第2病日 (489万 5,500)	1.50	0.83	0.83	1.50
第3病日 (550万 5,200)	1.17	1.83	2.50	0.83>
第4病日 (535万 4,200)	1.50	2.17	2.17	0.83
第5病日 (585万 3,200)	1.50	2.83	1.83	1.17
第6病日 (454万 2,200)	3.50	2.83	3.50	1.50
第7病日 (535万 1,900)	4.17	3.17	2.83	2.50
第8病日 (375万 1,800)	3.50	3.17	3.17	2.17

第 1 図

第10表によると接種後病日が進むごとに白血球数は減少するが、赤血球数はあまり変化しないことが認められる。また第1図により全血および血漿はほぼ病日を追うごとにマウスLD₅₀対数値は一旦低下し、以後暫時増加する傾向にあることがうかがわれた。

11) 大関株接種8日後ラット白血球についてのリンパ層と混合層との含有病毒量の比較

大関株接種8日後ラットから採血し、1% Crewat N

葡萄糖液 1/10 量を加えた試験管内に入れ、さらに 3.5% P.V.P. 液 1/10 量を混和し 800 rpm 5分間遠心沈澱し、白血球を多量に集めるためさらに2回繰り返して、得たる白血球浮遊液を 800 rpm 5分間遠心沈澱し赤血球を除き、2,000 rpm 5分間遠心沈澱して上清を捨て、得たる白血球沈澱をSPG液で洗滌し、さらに沈澱にSPG液を0.7 ml 加えて濃厚な白血球浮遊液とし、血球計算したところ白血球数42,200、赤血球数550万であつた。また同時に血液塗抹標本をつくり白血球百分率を調べた結果、リンパ球34%、顆粒球63%、単核細胞3%であつた。同浮遊液から0.2 ml をとり、これを10進法稀釈し、残りを長さ11 cm、内径2 mm の毛細管2本に入れ500 rpm 6分間遠心沈澱し、上層のSPG液を捨て、白血球層の上層と下層を小毛細管ピペットに吸い取り、それにSPG液を加えて原容の0.3 ml とし、それぞれについて血球計算をし白血球百分率を調べた。上層部では白血球数21,900、赤血球数122万、下層部では白血球数34,600、赤血球数56万、なお白血球百分率では上層ではリンパ球80%、顆粒球18%、単核細胞2%で、下層部ではリンパ球28%、単核細胞2%、顆粒球70%であつた。すなわち上層部には比較的にリンパ球が多く、下層部には顆粒球が多かつた。ために上層部を比較的のリンパ球多数層とし下層部を混合層とした。そして操作を加えない白血球液とそれから分離した上層部浮遊液と下層部浮遊液のマウスLD₅₀対数値を測定した。その結果第11表に示すごとく全白血球浮遊液のLD₅₀対数値は3.17で、比較的のリンパ球多数浮遊液および白血球混合浮遊液はともに2.17であつた。

第 11 表

	全白血球 浮遊液	比較的リンパ 球多数浮遊液	白血球混 合浮遊液
10 ⁻¹	● 4 17 18	● 9 11 14	● 15 15 15
10 ⁻²	● 13 17 ○	● 17 ○ ○	● 18 ○ ○
10 ⁻³	● 15 21 ○	● 19 ○ ○	● 15 ○ ○
10 ⁻⁴	● 21 ○ ○	○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○
LD ₅₀ 対数値	3.17	2.17	2.17

12) 感染マウス脾10%乳剤中の恙虫病病毒の正常マウス赤血球および白血球に対する、試験管内で37°C 孵卵器10分間放置後の親和性

大関株接種7日後マウス脾10%乳剤をつくり2,000 rpm 5分間遠心沈澱し上清の一部をとり、これを10進法稀釈した。別に健康マウス血液を採血し前述のごとく1

% Crewat N 葡萄糖液ならびに 3.5 % P.V.P. 液を加え、白血球浮遊液および赤血球浮遊液をつくり、それぞれ 2,000 rpm 5 分間遠心沈澱し、白血球沈澱と赤血球沈澱に大関株感染マウス脾 10% 上清乳剤を 1.0 ml 加えよく混じた。両浮遊液についてそれぞれ血球計算したところ白血球浮遊液は赤血球数 25 万、白血球数 2,000、赤血球浮遊液は赤血球数 415 万、白血球数 300 であつた。両浮遊液を 37°C 10 分間解卵器内放置し、のち 2,000 rpm 5 分間遠心沈澱し上清を捨て血球に S P G 液を上清と同量加えて第 1 回洗滌とし、10 進法稀釈してマウスに接

が、それでも血球の破壊が多少あり白血球百分率もやや不正確を免れなかつた。

2) 病毒と血液との関係についての総括ならびに考按

1) の実験では血球と血漿にそれぞれ等分に Rickettsia が配分されているようであるが、実験を総合してみると Rickettsia は血球により多く吸着しており、一部は血球より血漿に移行して病日が進むごとに LD₅₀ 対数値は相接近してくると思われる。

2) の実験では試験管内での洗滌によつて血球と Rickettsia の吸着はなかなか遊離しないが、一部は遊離して

第 12 表

	大関株マウス 脾 10 % 乳剤	赤血球浮遊液 (415万 300)		白血球浮遊液 (25 万 2,000)	
		第 1 回洗滌	第 2 回洗滌	第 1 回洗滌	第 2 回洗滌
10 ⁻¹	● ● ● 3 15 16	● ● ● 14 16 17	● ● ● 15 15 16	● ● ● 4 13 13	● ● ● 14 14 17
10 ⁻²	● ● ● 3 13 15	● ● ● 13 14 16	● ● ● 15 15 16	● ○ ○ 17	● ● ● 10 15 16
10 ⁻³	● ● ○ 6 14	● ● ○ 13 16	● ● ● 13 14 14	● ○ ○ 16	● ● ● 13 15 17
10 ⁻⁴	● ● ○ 13 17	● ○ ○ 16	● ○ ○ 13	○ ○ ○	● ● ○ 11 12
LD ₅₀ 対数値	3.83	3.50	3.83	2.17	4.17
上 清		● ○ 10	● ● 13 15	● ● 7 12	● ● 12 15

種し、さらに 2,000 rpm 5 分間遠心沈澱した上清をマウス 2 匹に接種し、さらに繰返し血球沈澱に S P G 液を加えて第 2 回洗滌をおこない、血球浮遊液とその上清をマウスに接種した。その結果第 12 表に示すごとく赤血球では第 1 回洗滌より第 2 回洗滌に LD₅₀ 対数値が高い。白血球でもやはり第 1 回洗滌は極端に低く第 2 回洗滌では急に高くなる。なお上清中に移行する病毒量もやはりかなりあることが推測される。

IV. 総括ならびに考按

1) 実験方法に関する考按

純粹の白血球や赤血球のみの浮遊液を得ることが現在不可能のため、実験ごとに血球計算してそれぞれ赤血球数および白血球数を調べ判断の基礎とした。またマウスによつて継代接種した大関株も季節や動物の個体差などにより毒力に多少の差を生ずるが、できるだけ同一条件にするため大関株接種 7 日後に必ず採血するよう留意した。なお実験 11) では採血後数時間にわたつて遠心沈澱操作を加えるため、白血球の核脱出や崩壊が著しく、できるだけ回転数を少なく短時間操作するよう注意した

上清に移行すると思われる。

3) の実験では病毒感染マウスの白血球浮遊液と赤血球および血漿混合液とのマウス LD₅₀ 対数値は接近しており、かつ白血球浮遊液中に含まれる赤血球数は、赤血球および血漿混合液に比較して 1/45 にしかならず、しかも白血球の比較では 6 倍多いという条件から考えると白血球中に病毒が圧倒的多量に含まれていることがわかる。

4) の実験では全血の場合は血球中に寄生する Rickettsia が凍結融解により血球から遊離しある程度の破壊死滅をきたすため LD₅₀ 対数値が低下するものと思われる。白血球浮遊液の場合は血漿の干渉を受けず、白血球数が少なくかつ白血球凝塊をつくる傾向があるが、凍結融解により Rickettsia が遊離細分して Medium 中に均等に配分されるためその LD₅₀ 対数値が上昇したものと考えられる。赤血球浮遊液の場合は赤血球数のはなはだしく多く凍結融解による細分均等はあまり影響しないものと考えられる。

5) の実験では病毒感染マウス白血球浮遊液の LD₅₀

対数値が赤血球浮遊液のそれよりも大である結果を示したが、このことは *Rickettsia* の白血球関連性の方が赤血球関連性よりも大であることを意味すると考えられる。

6) の実験では赤血球細胞内にも 病毒があることを意味していると思われる。しかし白血球や赤血球の基質を含む血球沈渣により多く 病毒を含み、白血球が破壊されても 病毒の親和性は細胞破片に大であることから、血漿中に 病毒が多量に遊離することは考えられない。

7) Hirst¹⁰⁾ は「ウイルス粒子の赤血球への吸着は、必ずしも不可逆的なものではない。凝集のおこっているウイルス—赤血球混合液を 37°C に保っておくとすぐにほぼ完全なウイルスの遊離がおこる。0°C ではウイルスの誘出は遅いか、あるいはまったくおこらない。」と述べているが、この実験では赤血球および白血球の基質に吸着されている *Rickettsia* は 37°C の体温とほぼ同じ条件におくと誘出することが認められ、室温放置の場合の 病毒の S P G 液 Medium 中への誘出程度は LD₅₀ 対数値としてはつきりした数字のうへでは認められなかった。なお赤血球よりも白血球からの誘出現象がやや強い傾向にあり、これは白血球に含有 病毒量がより多く、それだけ誘出が多いのではないかという想像もつき、かつ実験 10) の第 1 図のグラフに示すごとく、接種 8 日後から大体白血球の曲線とほぼ平行して血漿が上昇しているのと相まって興味ある知見と思われる。

8) の実験では実験 7) に述べたごとく全血血球および赤血球に比較し白血球からの *Rickettsia* の誘出がより多いことが実証できる。

9) の実験では赤血球から *Rickettsia* が洗滌ごとに遊離するが、洗滌後の赤血球含有 病毒量はなお変化しない結果を示したことから、*Rickettsia* の赤血球に対する親和性が相当強固であることが考えられる。これと同様のことが紅斑熱群 病毒感染動物においてもみられることが記載されている¹¹⁾。なお凍結融解処置後の上清とその沈渣浮遊液とを比較した結果は赤血球細胞内にもかなりの 病毒量の存在を示したものと考えられる。

10) の実験ではマウス腹腔内接種 1 日後の流血中のリケッチア数は LD₅₀ 値からみてかなりの数に達するが、その後一旦急激に減少し、さらに暫時増加していくかの結果が得られた。このグラフでは赤血球に 病毒が吸着する状態は不安定で種々変化するに反し、白血球の 病毒親和性はより大きくて病日とともに増加していくことが認められた。このことはまた *Rickettsia* の白血球原形質内増殖も考慮さるべきであつて、René I. Dubos ら^{12)~16)} が Host Parasite Relationship について述べているごと

く、微生物は細胞内寄生の性格を有し、喰細胞内で増殖するばかりでなく、喰細胞は逆にこれら微生物を抗体や薬剤の攻撃から防禦するという主張とともに興味ある事実と思われる。なお実験 7) で述べたごとく血漿のマウス LD₅₀ 値は接種 8 日後から大体白血球の曲線とほぼ平行して上昇しており、血球と血漿との間の *Rickettsia* の吸着誘出の現象が割合円滑におこなわれているのではないと思われる。

11) の実験では顆粒白血球とリンパ球の含有 病毒量の比較をしたが、リンパ球に若干多く含まれており、顆粒白血球ことに中性好性白血球や単核細胞に喰作用が旺盛で、リンパ球には喰作用が著明でないという定説¹⁷⁾のごとくとすれば、リンパ球は *Rickettsia* を捕捉するが喰菌消化作用がなく、このことが顆粒白血球とのマウス LD₅₀ 値の違いとなつて表われたものと思ふ。

12) の実験では *Rickettsia* の赤血球に対する親和性が洗滌に対しかなり高度の抵抗を示していることが考えられたが、白血球の場合では第 1 回洗滌によりマウス LD₅₀ 対数値が再び上昇する結果が得られた。このことは第 1 回洗滌により白血球内または表面に存在する *Rickettsia* から遠心および洗滌操作により白血球破壊片とそれに付着する *Rickettsia* が多く洗滌されたものと解され、第 2 回洗滌により LD₅₀ 対数値が再び上昇したことは一旦遊離した *Rickettsia* が Medium 中で容易に白血球に吸着しないし取り入れられたと解せざるをえない。

V. 結 論

マウスおよびラットを用いて、恙虫病感染動物が *Rickettsia* 血症を起す場合に流血中の *Rickettsia* が血液のいかなる成分と関連しているかを追求した。*Rickettsia* 接種 7 日後マウスの含有 病毒量は、全血、血球、血漿の順であつた。血球浮遊液の洗滌をおこなうと洗滌ごとに漸次その LD₅₀ 対数値は低下する傾向があつた。血球を赤血球および白血球に分離しそれぞれ 病毒量を測定した結果では白血球の方が多かつた。しかも血球浮遊液を凍結融解すると、白血球ではその操作により LD₅₀ 対数値は上昇するが、全血および赤血球浮遊液の場合はむしろ低下した。血液を凍結溶血せる上清と対照血漿とを比較するに溶血上清に 病毒量が多かつた。血球を白血球および赤血球に分離し 37°C に放置したのちの上清は、対照上清に比較しともに 病毒量は多かつた。血球を全血球、白血球および赤血球に分け洗滌すると、上清中に赤血球からも白血球からも *Rickettsia* が遊離してくるが、しかも各血球の LD₅₀ 値は洗滌による影響をあまり受けな

つた。マウスの実験的恙虫病において接種 1 日後より斃死直前までの各血液成分の含有病毒量の消長をみるに、全血およびそれから分離した白血球、赤血球ならびに血漿のマウス LD₅₀ 対数値は接種初期一旦減少し、ついで病日を追い上昇する。ラット白血球についてリンパ球と他の白血球との病毒量を比較した結果は、リンパ球に多少多く含まれていた。試験管内で 37°C 放置後の各血球と恙虫病毒との親和性は、赤血球では第 1 回洗滌より第 2 回洗滌により高値を示す傾向がみられ、白血球においては第 1 回洗滌では LD₅₀ 対数値が顕著に減少するが第 2 回洗滌により再び上昇する傾向がみられた。

摺筆に当たり、終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜わった恩師羽里教授に深甚の謝意を捧げるとともに、種々御教示、御支援を得た山本俊一氏ならびに及川淳氏ほか教室員諸氏に深謝の意を表する。さらに東京医科歯科大学法医学教室横山三男博士の御教示を得たことを付記し感謝の意を表する。なお本実験に当たり、杏林薬品株式会社と帝国化学産業株式会社の御協力を得た。なお本研究の一部は田宮名誉教授を班長とする地方性 Rickettsia 症調査班の援助によることを付記し、ここに併せて謝意を表する。

文 献

- 1) 黒子武道：日本衛生学雑誌，8，2，1953.
- 2) 佐藤嘉門：社会保険医学会雑誌，通巻 14 号，1958.
- 3) R. Achubert, H. Fischer：Z. ges. Inne. med. Grenzgebiete, 6, 526, 1951.
- 4) 松原宏：日本衛生学雑誌，14，3，1959.
- 5) 横山三男：第 7 回アメリカ血液銀行協会総会，11 月，1958.
- 6) Dausset, J.：Blood, 9, 697, 1954.
- 7) Lusena, C. V., Rose, D.：Arch. Biochem. N. Y. 65(2), Dec., 1956.
- 8) Philippu, A. J.：Blood, Balt., 11(11), Nov., 1956.
- 9) Bovarnick, M. R., Miller, J. C. and Snyder, J. C.：J. Bac., 59, 509, 1950.
- 10) Hirst, G. K.：Science, 94, 22, 1941.
- 11) Cox, H. R.：Viral and Rickettsial Infection of Man, 2nd ed., Lippincott, 611~637, 1948.
- 12) Shaffer, Kucera and Spink：J. Exper. Med., 97, 77~78, 1953.
- 13) Suter：J. Exper. Med., b. 96, 137~150, 1952.
- 14) Mackaness：J. Path. & Bact., 54, 429~445, 1952.
- 15) Mackaness and Smith：Am. Rev. Tuberc., 67, 322~340, 1953.
- 16) René, I. Dubos：Biochemical Determinants of Microbial Diseases. Harward University Press, 1957.
- 17) 小宮悦造：臨床血液学，南山堂，81，1950.

(受付：1959 年 8 月 7 日，特別掲載)