発疹チフス並に発疹熱リケッチア毒素の免疫学的研究

第1編 リケッチア毒素の特異性について

宍 戸 亮

國立予防衛生研究所 (リケッチア部々長 北岡正見指導)

[受付: 5 月 30 日, 1950 年]

発疹チフスと発疹熱の両リケッチア (以下 R と略す) の間に交叉免疫の成立することは既に知られている (Zinsser¹⁾ その他)。Cox-Craigie 法が案出され、比較的容易に純粹に R を集めることができるようになってから、R に関する免疫学的諸反應の研究は急速の進歩をとげ、ことに補体結合反應 (Plotz)²⁾ 或は R 凝集反應によつて両 R を特異的に區別しうるに至つた (北岡³⁾)。

孵化鶏卵々黄囊内に R を培養すれば、その乳剤中にマウスを斃す毒素のあること、またこの毒素は発疹チフス並に発疹熱の両 R に対する免疫血清或は恢復患者血清によつて中和されることは既に Gildemeister 等⁴⁾ によつて指摘された。その後 Otto⁵⁾, Topping, Henderson, Bengtson^{6) 7) 8)} は更に本毒素に関する研究を進め、患者と免疫動物の血清中における毒素中和抗体の出現消長を明らかにすると共に、血清中の中和抗体価を測定する方法を案出した。之等は Van der Ende, Mill 等¹⁰⁾ により追試確認された。

Hamilton¹¹⁾ は発疹チフス・リケッチア (*Rickettsia prowazekii* 以下 R. p. と略す) 或は発疹熱リケッチア (*Rickettsia typhi* 以下 R. t. と略す) のそれぞれの同系株の毒素の間には差異は認められないが、両 R の毒素の間には、吸収試験により、明らかにそれぞれの特異的な部分の存在することを明らかにした。さらに恙虫病 R の或種の株 (Gilliam 株 Smadel¹²⁾) 及び蜱咬リンパ肉芽腫症並にオウム病疾患株の中にも (Rake, Jones¹³⁾) R. p. 並に R. t. の R と同様にマウスを斃す毒素を出すことがしられ、また最近に至り Clark, Fox¹⁴⁾ はこの毒素はウサギの血球を溶血し、しかもその溶血作用は患者血清により阻止されることを明らかにした。

R 毒素についてはわが國でもその中和試験術式が紹介され、またその性状と特異的部分抗原についても報告されている (北岡¹⁵⁾)。その後著者¹⁶⁾ は北岡と共に発疹チフス・ワクチン接種マウスが本毒素の攻撃に耐えることを明らかにし、これによつて発疹チフス・ワクチンの力価が測定できることを報告した。さらに著者は発疹チフスと発疹熱 R の毒素のそれぞれの特異性、ワクチン接種マ

ウス並に昭和 25 年 1 月より 2 月にわたり東京に流行発生した発疹チフス患者について血清内中和抗体の出現消長を追求した。

実験は 3 編から成立ち、第 1 編は発疹チフスと発疹熱 R のそれぞれの毒素の特異性について、第 2 編は発疹チフス・ワクチン被接種マウスにおける中和抗体の出現消長について、第 3 編は昭和 25 年東京都内に発生した患者における中和抗体の出現消長について行われた。まず毒素の特異性について述べることにする。

毒素の特異性については後述の試験管内中和法により既に検討が加えられている (Hamilton¹¹⁾, 北岡¹⁵⁾)。著者はさらにその特異性について、後述の直接攻撃法を行い、角度をかえて検討してみた。

實驗方法

(1) 毒素のつくり方

毒素のつくり方は Henderson, Topping, Bengtson⁷⁾, 北岡¹⁵⁾ の記載に準じた。即ち孵化 7 日の鶏卵々黄囊内に R 乳剤を接種し、さらに 7~9 日培養し鶏胎兒がなお生存し、しかも卵黄囊塗抹標本において鏡檢上 R が無数に認められる卵黄囊をもつて乳剤を作る。即ちこれら無菌砂ですりつぶし、10% 滅菌脱脂乳液か血清ブイオンで 10 重量パーセントの乳剤をつくり、これを軽く遠心 (2000 r. p. m 5 分間)、その上清の 1~2 cc 宛をアンプルに分注熔封し、ドライアイスとアルコールの混合の中で急速に凍結し、必要の時までドライアイス・ボックス中に (-20°C ~ -40°C) 貯藏する。このように保存された毒素は少くとも一週間はその力價を保存し実験に供せられる。

(2) 使用菌株

発疹チフス・リケッチア株として Breinl 株、発疹熱リケッチア株として Wilmington 株が用いられた。

SHISHIDO, Akira: Immunological studies on Toxins of *Rickettsia prowazekii* and *Rickettsia typhi*. I. On specificity of rickettsial toxins. Japan. J. Bact., 5(6): 327-333, 1950.

(3) 毒素の力價の定め方

上述の卵黄囊 10% 乳剤を原液として、その 2 倍階段稀釈 ($\times 8, \times 16, \times 32, \times 64, \times 128, \times 256$ 等) 液を作り、各稀釈液の 0.5cc 宛をそれぞれ一群 (4~6 匹) のマウスの尾静脈内に注射し、6~24 時間後に斃死するマウスの数から Reed, Muench¹⁷⁾ の 50% 終末点法に準じ、この毒素の LD₅₀ を定める。著者の使用した Breinl 株の LD₅₀ はおよそ 90~120, Wilmington 株のそれはおよそ 180~240 であった。即ち Wilmington 株は常により強毒であった。LD₅₀ の 60 以下のものは実験には不適当であり、実験には使用されなかつた。毒素の測定は専ら静脈内注射により腹腔内法は行われなかつた。

(4) 中和試験術式

中和抗体を定量する方法として次の 2 法がしられている。

(i) 直接攻撃法 発疹チフス・ワクチン力價検定法として既に報告した方法である (北岡, 著者¹⁸⁾)。即ち種々の被検材料でマウスを免疫し、一定期間後に 0.5 cc に 2 LD₅₀ の毒素を含むような毒素稀釈液でマウスの尾静脈内より攻撃し、6~24 時間後の斃死マウスの数により中和抗体の力價を定量するのである。

(ii) 試験管内中和法 (間接法) 既に Topping, Bengtson^{8) 9) 10)}, 北岡¹⁷⁾ の報告している方法である。即ち被検血清の各 2 倍階段稀釈液と 4 LD₅₀ の毒素液とをそれぞれ等量に混和し、これを 5°~100° の冷室に 2 時間放置し、各混合液の 0.5cc 宛をそれぞれ一群 (4~6 匹) のマウスの静脈内に接種し (マウスは 2 LD₅₀ の毒素の攻撃を受けたことになる)、6~24 時間後におけるマウスの斃死数からこの被検血清中の中和抗体量を測定するのである。血清力價の判読は 2 LD₅₀ の毒素攻撃を耐過せしめる被検血清の最大稀釈 (血清は毒素液により更に 2 倍に稀釈されたことになる) 倍数を以て表すのである。

(5) 使用ワクチン Cox-Craigie 法によつて作られ國家検定に準じて検定され合格したものである。

實驗成績

発疹チフス、発疹熱両ワクチンをそれぞれ 1 群のマウスに注射し、ついで各群をさらに 2 群に分け、発疹チフス並に発疹熱の各 R 毒素で交叉的に攻撃し、各毒素の特異性を検討した。また発疹チフス・ワクチンを遠心し、上清と沈澱にわけ、いわゆる可溶性抗原と R 体との中和抗体産生能力を比較すると共に、抗原を加熱し中和抗体産生力に如何に影響されるかを検討した。さらに発疹チフスと発疹熱の両ワクチンを上清と沈澱にわけ、各分層をそれぞれ 1 群のマウスに注射し、ついで両 R 毒素で

交叉的に攻撃し、それ等の特異性について検討を加えた。

i) ワクチン被接種マウスにおける交叉毒素攻撃試験

(a) 発疹チフス・ワクチン被接種マウス

発疹チフス・ワクチン 1cc 宛を殆んど毎日異なる 1 群 10 匹宛のマウスの腹腔内に接種し、15 日後にはワクチン 1 回注射後 1~14 日経過したそれぞれ 11 群 (110 匹) のマウスを用意し 15 日目に一齊に各群の半分のマウス (各々 5 匹宛) に R. p 毒素 2 LD₅₀ を残りの半分には R. t 毒素 2 LD₅₀ を注射し、マウス体内に産生する中和抗体の出現を逐日的に追求した。その成績を曲線で示せば第 1 表の如くなる。この表から容易に看取されることは

第 1 表 発疹チフス・ワクチン免疫による R. p 並に R. t 兩毒に對する中和抗体の消長

R. p 毒素の攻撃に対しワクチン接種後 1~2 日では中和抗体の産生は認められないが、3 日を経過すれば 40% のマウスは死をまぬがれ、5~7 日後には 100% に斃死をまぬがれる。R. t の攻撃に対しては、1 日後に始めて 40% 5 日後におよそ 60% のマウスが死をまぬがれる。換言すれば、発疹チフス・ワクチンでは、R. t 毒素を完全に中和することはできないのである。

(b) 発疹熱ワクチン接種マウス

発疹熱ワクチンで a の実験と同様に殆んど毎日異なる 1 群 10 匹宛のマウスの腹腔内に注射し、14 日間に 12 群 (120 匹) のマウスを用意し、15 日目に一齊に各群の半分のマウスに R. p 並に R. t のそれぞれ 2 LD₅₀ の毒素で攻撃した。使用ワクチンは國家検定法に準じて検定され、ワクチン内の R 数は 1 cc 中約 5 億、含有窒素量 25.5 mg%, モルモット直接攻撃試験においては、R. p に対しては 20% 発症阻止 (対照は 100% 発症)、R. t に対しては 85% 発症阻止 (対照は 100% 発症) という力價のものである。

その成績を第 2 表に示せば、R. t 毒素に対しては、

第2表 發疹熱ワクチン免疫による R. p
並に R. t 兩毒素に對する中和抗体の消長

ワクチン注射後2日間はまだ中和抗体は認められないが, 3, 4, 並に5日後にはそれぞれ20, 60, 並に80%にマウスは死からまぬかれ, 6日を経過すれば, 100%に生残する。R. p 毒素に対しては, 2日間0%, 3並に4日後にはそれぞれ60並に80%の生残率を示し, その後もおよそ80%の生残率で100%に達しないのである。しかし仔細にみれば R. p ワクチンの場合と多少趣きを異にし, R. t ワクチンは, R. p 毒素を比較的好く中和する抗体を産生する能力がある。

以上の成績を要約すれば, 既に北岡¹⁾が試験管内中和法に於て指摘したと同様に, 直接法によつても R. p 並に R. t の兩ワクチンはそれぞれ同系Rの毒素を完全に中和する抗体産生能力があるが, 異系Rの毒素を部分的に中和し, とくに R. t ワクチンは R. p ワクチンより異系Rの毒素をより大きく部分中和することが認められる。

ii) 發疹チフス・ワクチンの遠心上清と沈澱リケッチアの中和抗体産生能力

發疹チフス・ワクチンをR補体結合反應用抗原の製法(北岡²⁾)に準じ 6000 r. p. m. 1時間遠心沈澱し, 上清は可溶性抗原(以下 SA と略す)を作るため別に保存し, 沈澱を磷酸緩衝食塩水で再浮游し, 再び遠心し, 数回洗滌して, そのR体を原ワクチン量の緩衝食塩水に浮游し, 他方において前記の保存上清を Seitz E. K で濾過し SA とした。これらR体浮游液並に SA の1cc をそれぞれ6匹のマウスの腹腔内に注射し, 10日後に2LD₅₀の R. p 毒素で攻撃した(第3表)。対照として原ワクチン1cc をマウスに注射し, 同一毒素で攻撃した。その結果2LD₅₀の毒素に対していずれもよく耐過した。即ちR体も SA も全ワクチンと同様に毒素中和抗体の産生能

第3表 抗原の種類と中和抗体産生との関係

免疫抗原の種類	攻撃毒素	生残数/免 疫数	抗産 生能力
發疹チフスワクチン	R. p 毒素 2LD ₅₀	6/6	+
同上 清 (SA)	"	6/6	+
同 沈澱再浮游液	"	6/6	+
60° 30' 加熱ワクチン	"	0/6	-
100° 30' 加熱ワクチン	"	0/6	-
R. p 抗原5單位	R. p 毒素 2LD ₅₀	5/5	+
同上	R. t 毒素 2LD ₅₀	0/5	-
R. t 抗原5單位	R. p 毒素 2LD ₅₀	0/5	-
同上	R. t 毒素 2LD ₅₀	5/5	+
SA (p) 5單位	R. p 毒素 2LD ₅₀	5/5	+
同上	R. t 毒素 2LD ₅₀	3/5	+
SA (t) 5單位	R. p 毒素 2LD ₅₀	4/5	+
同上	R. t 毒素 2LD ₅₀	5/5	+

力があるのである。

iii) 中和抗体産生抗原の温度による影響

上述の実験に 使用した發疹チフス・ワクチンを 60°C 30' 並に 100°C 30' 加熱し, ついでそれぞれ6匹のマウスの腹腔内に1cc 宛注射し, 10日後2LD₅₀の R. p 毒素で攻撃した(第3表)。その成績を要約すれば, 60°C 並に 100°C にそれぞれ30' 加熱すれば, ワクチンはその中和抗体産生能力を全く失うことが明らかにされた。即ちワクチン内の中和抗体の産生抗原は易熱性のものである。

iv) R体並に SA の中和抗体産生能力の特異性について

Cox-Craigie 法によつて作られた R. p 並に R. t ワクチンを上述の遠心法により, R体と SA に分け, それぞれの抗原価を補体結合反應により測定した。即ち標準血清4單位で, 階段的稀釈した抗原の補体結合反應を行い, それぞれの抗原の1單位の稀釈倍数を定量し, これら5單位が1cc に含まれるように稀釈した液の1cc をそれぞれ1群のマウスに注射した。R. p 抗原の160倍は1單位に相当し, 従つて5單位として R. p 抗原32倍稀釈液が用いられ, R. t 抗原の1單位は抗原の80倍稀釈に相当し, 16倍稀釈液が5單位として用いられた。他方 R. p 並に R. t ワクチンからそれぞれ SA (p) 並に SA (t) を作り, R体と同様に補体結合反應を行い, それぞれ5單位の抗原価が1cc に含まれるようにした。以上それぞれ5單位の抗原価を含む R. p, R. t SA (p), SA (t) の4種の抗原を1群10匹のマウチにそれぞれ注射し, 10日

後に各群のマウスの半分に R. p 毒素, 残りの半分に R. t 毒素で攻撃した。攻撃毒素はいずれも 2 LD₅₀ である。

その成績を要約すれば, 第3表に示す如く, R. p 或は R. t のそれぞれのR体を数回遠心洗滌し, 特異的となつた抗原は同系毒素に対し完全に中和抗体を産生する能力があるが, 何等異系毒素に対する中和抗体産生能力が認められないことが明かにされた。これに反しR体を含まない SA は同系なると異系なるとを問わずR毒素を中和する抗体を産生する能力がある。しかし仔細に観察すれば, SA(p)は同系 R. p 毒素を 100%, に異系 R. t 毒素を 60% に中和する抗体を生ずるが, SA(t)は R. t 毒素を 60% に, R. p 毒素を 80% に中和する抗体を産生し, SA(t)は異系R毒素に対して SA(p)より, より広い中和抗体産生能力が認められる。

考案とむすび

R. p 並に R. t を孵化鶏卵々黄嚢内に培養すれば, その卵黄乳剤の腹腔内接種を受けたマウスが斃死することは, 最初 Gildemeister⁴⁾ 等によつて指摘された。その後卵黄嚢乳剤の静脈内注射が毒素の証明により適当であることが明かにされた(Bengtson⁸⁾)。本毒素の性状については 2, 3 の報告^{5) 6) 7) 8)} があるが, 本毒素は生きたRと不可分の関係にあり, また極めて不安定でその毒性が容易に消失し, その保存には低温(-10°C)が必要である(北岡¹⁷⁾)。さらにその特異性については本毒素は最初発疹チフス, 発疹熱に共通と考えられたが(Gildemeister), 交叉中和試験の結果 R. p と R. t 両毒素の間に共通の部分抗原の他に, それぞれに特異的な部分抗原の存在が推定された(北岡¹⁷⁾)。Hamilton¹³⁾ はそれぞれの免疫血清を特異抗原をもつて吸収し, その特異性を証明した。以上はいずれも免疫血清と毒素の混合を健康マウスに注射するいわゆる間接法によつてその特異性が検討されたものである。著者は既知抗原をマウスに注射し, 一定日数後に 2 LD₅₀ の毒素をこのマウスに直接注射する直接法によつてその特異性を検討した。その成績を要約すれば,

(1) Cox-Craigie 法に準じて作られ, しかも國家検定に合格する力價を有する発疹チフス並に発疹熱のワクチンをそれぞれ毎日異なる 1 群のマウスに 1 回注射し, 14 日後に各群を 2 分し, 一半を R. p 毒素, 他の半分を R. t 毒素で直接攻撃し, マウス体内での中和抗体の出現消長を追求すると共に R. p と R. t の両毒素の特異性について検討した。ワクチン接種 3 日後には既に中和抗体が証明され, 4~5 日後には同系 R の毒素の攻撃に対し

ては 100% の生残率を, 異系 R 毒素に対しては 60~80% の生残率を示し, 発疹熱ワクチンは発疹チフス・ワクチンより大きな異系 R 毒素に対する中和抗体産生能力のあることが明らかにされた。

(2) 発疹チフス・ワクチンを遠心し, 上清(いわゆる可溶性抗原)と沈澱(R体)とに分け, 中和抗体産生能力を比較したが, いずれの分府にも陽性中和抗体産生が認められた。

(3) ワクチンを 60°C と 100°C にそれぞれ 30 分宛加熱すれば, 中和抗体産生能力が消失する。即ちワクチン内の中和抗体産生抗原は易熱性である。

(4) 発疹チフス並に発疹熱の両ワクチンからそれぞれ可溶抗原とR体を作り, それぞれマウスを免疫し, それぞれの群を R. p 並に R. t の両毒素で交叉的に攻撃すれば, R体は同系R毒素の攻撃に対しては生残率 100% の中和抗体産生能力があるが, 異系R毒素の攻撃に対しては, 0% であつた。これに反し可溶性抗原は同系R毒素では生残率 100%, 異系R毒素では生残率 60~80% の中和抗体産生能力がある。この際においても R. t の可溶性抗原は, R. p のそれに比して異系R毒素の攻撃をより大きく中和する。これを要するに, R. p 並に R. t のR体はそれぞれのR毒素に特異的な中和抗体を産生するのである。

文 献

- 1) Zinsser, H.: Harvard Symposium "Virus and Rickettsial Diseases" 872-907, 1941.
- 2) Plotz, H.: Science, 97, 21-21, 1943.
- 3) 北岡正見: 総合醫學, 6, 829-833, 1949.
- 4) 北岡正見: 日本醫事新報, 1351, 653-657, 1950.
- 5) 北岡正見, 井上裕正: 総合醫學, 7, 253-260, 1950.
- 6) Gildemeister, E., und Haagen, E.: Deutch Med. Wehsehr. 66, 878-880, 1940.
- 7) Otto, R., und Rieckhardt, R.: Ztschr. f. Hyg. und Infektionkr. 123, 447-462, 1942.
- 8) Bengtson, I. A., Topping, N. H., and Henderson, R. G.: National Inst. of Health Bull. No. 183, 25-29, 1945.
- 9) Henderson, R. G.: National Inst. of Health Bull. No. 183, 33-35.
- 10) Bengtson, I. A.: National Inst. of Health Bull. No. 183, 36-40.
- 11) Henderson, R. G., and Topping, N. H.: National Inst. of Health Bull. No. 183, 41-52.
- 12) Van der Ende, M., Mills, K. C.: Medical Research council, special series No. 255, 1946.
- 13) Hamilton, H. L.: A. J. Trop. Med. 25, 391-395, 1945.

- 14) Smadel, J. E., Jackson, E. B., Bennett, B. L. and Rights, F. L.: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* **62**, 138-140, 1946.
- 15) Rake, G. and Jones, H. P.: *J. Exp. Med.* **79**, 463-486, 1944.
- 16) Clark, D. H., and Fox, J. P.: *J. Exp. Med.* **88**, 25-41, 1948.
- 17) 北岡正見, 西真楠: *日本細菌學雜誌*. **3**, 15-17, 1948.
- 18) 北岡正見, 矢戸亮: *綜合醫學*. **6**, 266-269, 1949.
- 19) Reed, L. T., and Muench, E.: *A. J. Hyg.* **27**, 493-497, 1938.
- 20) 北岡正見: *日本醫學*. **3423**, 181-184, 1948.