恙虫病における免疫の分析

千葉大学醫學部細菌學教室

桑 田 次 男

ウィールス、リケッチア病においては発症治癒後動物が再感染に対して長い間強い抵抗性を示すことが多い。しかしこの抵抗性も絶対的なものではなく、感染免疫といふ概念が適用されるような一群の疾病にあつても病原体の存続する個体が常に再感染から免れるものとは思われない。恙虫病においても再感染例が林、川村等によつてなされている。それらの報告により我々は恙虫病の免疫がよく10年乃至20数年の長期間にわたつて保たれる場合があり、他方初感染後数年を出でずして再感染を蒙る場合のあることを知るのである。しかしながらそれが組織からリケッチアの消失した後の再感染か、或はまた重感染であるかの判定は困難である。実験的再接種例は川村、上村、西成田等によつて報告されている。それらの実験結果を考察する場合注意しなければならないことは、第1回、特に第2回の接種材料中のリケッチアに対する定量的考慮がなされていない事実である。この点に注意を払ひ、恙虫病における免疫の様相を明かにすることが必要と思われる。

Sergeant, Parrot 等は梅毒、マラリア、結核等、発症治癒後も病原體が體內に永く存在しつゞけ、その存在する間のみ再感染に対する抵抗を示すと見做される一群の疾病を他から區別し、それらにおいて見られる抵抗性は病原體の消失後も永く継続して認められる真性免疫“Immunité vraie”と異るとし、之を“Prémunition”とよんでいる。そしてリケッチア病もこの範疇にいれているのである。川村等はウサギを使用して組織中におけるリケッチアの存続と免疫の持続期間を調べ、両者の間に密接な関係のあることを示唆している。恙虫病においては再接種に対する抵抗性を獲得するためにリケッチアが組織中に存在することが必要且充分な条件であるが、また重感染は成立するか否か、成立するとすれば如何なる条件の下に起るか、これらの問題に関して本報告においてその分析が試みられた。

リケッチア株： AX 及び S.13 の2株が使用された。AX 株は阿賀川流域の有毒地において罹患した患

者の死後の血液から分離されたものであり、前報に述べられた通り本株に感染したハツカネズミの肝、脾乳剤はハツカネズミに対して 10^{-6} 乃至 10^{-7} の LD50 價をもっている。これに反して S.13 株は信濃川流域の有毒地において罹患した比較的軽症の患者の血液から分離された。本株の詳細については別報にゆづる。本株のハツカネズミに対する LD 50 は 10^{-1} 前後であり強毒な AX 株と比較して際だつた特徴をなしている。AX 株の接種をうけたハツカネズミは感染後7日前後ですべて斃死するが、S.13 株の場合は通常14乃至15日前後で少数のネズミが死亡するにすぎない。S.13 株の感染を経過したハツカネズミの AX 株に対する抵抗性を検索中、AX 株の再接種に耐へたネズミの臓器の感染價が測定された。予期に反して、それは S.13 株の感染價に比較して高く、ネズミを継代することにより、それが AX 株の感染價を示すことを知つた。この場合動物は S.13 と AX 株との重感染を蒙っているものと思はれるが、再接種に使用された AX 株の病原性が S.13 株のそれと全く異なることによつて両者が明に區別され、AX 株の存在が確認されたわけである。この逆の場合には S.13 株の病原性が AX 株のそれに覆われて S.13 株による重感染が起つたか否かを判定することは出来ない。以上の予備実験に従つて、本報告においては先づ S.13 株によつてハツカネズミが免疫され、次に AX 株を再接種し、AX 株を云はゞ“Tracer”として免疫動物中における再接種リケッチアの消長を追跡された。

感染後の測定： リケッチアの接種をうけたハツカネズミの臓器を秤量し硝子粉を加えて乳鉢で磨碎、生理的食塩水で10倍乳剤とし、2,000 廻転10分間遠心した上清を感染價測定の出発材料とする。之を10倍に稀釋した脱脂乳で階段的に10倍稀釋し、各稀釋の0.3cc を1群6乃至7匹のハツカネズミの腹腔に注射した。ネズミは3週間観察しその LD50 が Reed 及び Muench の法によつて算出された。

S.13 株接種による免疫の發生狀態

組織におけるリケッチアの存在と免疫の發生との間には密接な関係があると云われる。しかしながら既に

Fox⁽¹²⁾によつて証明された様に、*R. orientalis** はハツカネズミの各臓器に 600 日以上も存在するものであり免疫状態もまた同様永く存続する。従つてリケッチアの組織よりの消滅と免疫との関係を追求することはしばらくおき、本実験においては先づ S.13 株接種後ハツカネズミの組織中におけるリケッチアの出現乃至その量と免疫の強さとの関係が定量的に調べられた。

S.13 株感染後 16 日目のハツカネズミの肝、脾の 10 倍乳剤が 150 匹のネズミの腹腔内に各 0.3c.c. づゝ注射された。他に 150 匹のネズミが対照として無処置のまま残された。S.13 株接種後 4, 8, 13, 及び 20 日目

に、AX 株感染ハツカネズミの肝、脾乳剤の感染価が上記両群のネズミを使用して測定し、S.13 株接種群の動物における抵抗の強さが定量的に測定された。その結果は第 1 表に示されている。なほ AX 株を接種する直前、S.13 株を接種したハツカネズミ 2 匹を解剖し、その肝の約 10 倍乳剤が 12 匹のハツカネズミの腹腔内の接種された。残りの各組織はこれをホルマリンにて固定、ヘマトキシリン・エオシン染色をほどこしてその病理的變化が免疫の発生と關聯して考察された。

第 1 表 S.13 株接種による免疫の發生

S.13, 及び AX, 兩株接種 の間の日数	實驗動物	AX 感染ハツカネズミの臓器の感染							DL50
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	
4	前處置群	6/6*	6/6	6/6	6/6	5/6	3/6		10 ^{-5.8}
	對照群	6/6	6/6	5/6	5/6	5/6	3/6		10 ^{-5.5}
8	前處置群	5/6	5/6	2/6	1/6	3/6	1/6		10 ^{-3.2}
	對照群	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	4/6		10 ^{-6.3}
13	前處置群	3/6	2/6	2/6	1/6	0/6			10 ^{-1.7}
	對照群		6/6	6/6	6/6	6/6	4/6	2/6	10 ^{-6.5}
20	前處置群	1/6	2/6	0/6					10 ^{-1.0}
	對照群		6/6	6/6	6/6	5/6	2/6	0/6	10 ^{-5.6}

* 6/6: 6 匹中 6 匹の死亡を示す

S.13 株接種後 4 日目のハツカネズミの臓器にはリケッチアの存在することが継代接種により確められたが、それらのネズミは AX 株の再接種に対しては正常ハツカネズミと同様の感受性を示している。この時期における各組織の病理所見は未だ軽度である。肝の Kupffer 星細胞には軽度の核濃縮が見かけられるが増加は認められず、肝細胞には軽度の變性が認められるにすぎない。脾においては細網細胞の變性が認められる。S.13 株感染の 8 日後になればリケッチアの増殖は確実であり、感染臓器の接種をうけたハツカネズミは 12 匹中 6 匹が死亡している。免疫も漸く発生しはじめてはいるが未だ弱い。この時期における S.13 株感染ハツカネズミの病理所見としては、肝の Kupffer 星細胞が増加し、且グラヌローム様の細胞集団の発生が見られる。脾においては一部變性をともなう細網細胞の軽

度の増殖が認められる。S.13 株感染後 13 日目ではネズミの免疫の強さの増加は著明であり、また解剖されたハツカネズミの肝には Kupffer 星細胞の増加、及び明かにグラヌロームと考えられる細胞集団が認められる。感染後 20 日に至れば AX の再接種に対して殆ど完全な抵抗をネズミは示している。一方それらのネズミの組織における S.13 株リケッチアの量は減少しはじめてをり、組織乳剤の接種をうけたネズミはいづれも生き残っている。

以上の実験によつて我々は、S.13 株感染ハツカネズミの各組織中にリケッチアが存在するにも拘らず正常動物と同様に再接種に対して感受性を示す時期のあることを知るのである。免疫は大體感染後 8 日頃より発生し始め 20 日乃至 1 ヶ月後には強固なものとなる。この免疫の発生は最初に接種したリケッチアの量によつ

*本論文において學名 "*R. orientalis*" が使用されたのは本誌の編集委員である川喜田教授の示唆によるものであることを此處に附記する。

て影響をうけることは勿論であり、Fox¹²⁾は生病毒の皮下注射をうけたハツカネズミが感染後2日にして既に再接種に対して抵抗を示す事実を報告し、これを干渉現象と解している。感染の初期において干渉現象が動物の示す抵抗に何らかの影響を与えることは考えられるが、それは決して大きなものではないであらう。免疫の発生と平行して組織におけるグラヌローム様の細胞集団が認められた。感染に対してグラヌロームとして現われる組織の反応性と血清中の所謂中和抗體との

関係に就いては今後更に検討を加える所存である。

免疫動物に再接種されたリケツチアの増殖状態

第1の実験によつて、S.13株接種4日以後においてはハツカネズミの組織中に既にリケツチアが存在するにも拘らずAX株による重感染が成立することが判明した。よつてS.13株により強い免疫を与えられたハツカネズミにAX株を再接種し、ネズミの組織中におけるAX株の増減の様相が日を追つて追求された。

(第1図)

第1図 免疫ハツカネズミ組織中における *R. orientalis* の消長

S.13株感染後18日目のハツカネズミの肝の10倍乳剤0.3ccが40匹のハツカネズミの各腹腔に注射された。強い免疫の発生したと思われる46日後に、AX株感染ハツカネズミの肝の100倍乳剤——それは $10^{4.4}$ LD50に相当する——をこの免疫動物及び同数の対照動物群に接種した。以後4, 7, 13, 17, 20日後に2匹の動物が解剖され、その肝におけるリケツチアの量がハツカネズミを使用して決定された。対照のAX単一接種群では接種後10日目には肝におけるリケツチアの感染価は $10^{-6.5}$ に達し、全部死亡するに至つた。ところがS.13株が免疫されたハツカネズミにおいてはリケツチアの増殖は抑制され、最初の4日目では $10^{-1.8}$ であつたが7日目には $10^{-2.8}$ 、10日目には $10^{-4.0}$ と上昇し、10日を境として再び下降してゆくのである。この事実は生病毒の接種をうけた動物の抵抗力が再感染の前後において同一状態にあるのではなく、再接種をうけることによつて増強されて行くものであることを教える。つまり免疫と云う潜勢的な力は固定したものではなく動的のものである。

免疫動物の組織中におけるリケツチアの感染価を定量すると同時に組織の病變も日を追つて調べられた。再接種後4日においては対照群に比較して、脾のリン

パ濾胞の細胞に核の變性が強く、又肝のグラヌロームにも變性が見られ、病變は対照群よりもむしろ激しい。しかし7日目においては既に髄索の白血球の減少が見られ、細胞浸潤は早期に収まる像を示している。10日目になると両者の差は更に顕著となる。即ち肝におけるグラヌロームは両群とも漸次大きくなつていくが、対照動物ではグラヌロームの細胞にも變性、核濃縮等が強く肝細胞には解離が認められ、同日対照動物群はすべて斃死する。之に反し免疫群においてはグラヌロームが腫脹、且分枝した像を示し、グラヌローム自体吸収されつゝある像を呈している。肝細胞の病變も対照に比較して軽度である。13, 17と日を経るにつれグラヌロームは不規則の形となり肝細胞には再生が見られ、脾の細胞も漸ち正常時の状態に近くなつて行く。即ち免疫群は対照群に比し病變の限局化及び再生的傾向にあるものと考えられる。総じて免疫動物に見られる病變は活潑な修復機構を示して居り、それは無反應状態とは明かに異なる。

上記の実験においては免疫材料としてS.13株が使用されたが、この株は既に報告された様に特に病原性の弱いものであり、この病原性の差が実験の結果に何らかの影響を与えていないかとの懸念がある。そこで

先づ AX株の皮下接種によつて生病毒免疫が施された。即ち AX株感染ハツカネズミの肝乳剤 10^{-2} 稀釋——それは $10^{4.2}$ LD50 に相当する——0.3cc を皮下に注射し、42日後に同様 AX株 $10^{5.4}$ LD50 0.3ccが腹腔内に注射された。その結果は第1図に示されている。AX株により免疫されたハツカネズミにおいては前回の実験と異り、再接種後2日にして既に肝、脾乳剤の感染価は $10^{-2.3}$ を示してをり、4日後の感染価は $10^{-3.3}$ 、7日目では $10^{-4.3}$ に達するが、之を頂点として下降してゆく。之は皮下に接種された AX株と第2回に腹腔内に接種された同株のリケツチアとの総和が感染価として現われるためであらう。

再接種量を異にした場合の免疫動物組織
中における *R. orientalis* の消長

S.13株によつて強く免疫されたハツカネズミの組織中にリケツチアの存在する場合にも再接種された *R. orientalis* はそれらの組織に侵入して行くことが前回の実験によつて確められた。しかしながら再接種は $10^{4.2}$ LD50 乃至 $10^{4.4}$ LD50 と云う比較的大量のリケツチアを用いて行われた。免疫組織に対するリケツ

チアの侵入が、かゝる大量の場合にのみ起ると云う可能性がある故今回は再接種を 10^3 LD50 及び 10LD50 と云う少量のリケツチアを以て行いその結果が比較された。S.13株感染ハツカネズミ臓器の 100 倍稀釋乳剤で一群のハツカネズミを免疫後 80 日目に AX株による再接種が行われたがそれらの動物は強い抵抗性を示しづれも死をまぬがれた。次に再接種後 20, 42, 80日目に再接種動物の組織中における AX株の存在の有無が調べられた。第2表に明かな様に、再接種後20日においては夫々 10^3 LD50 及び 10 LD50 の接種をうけた両群のハツカネズミの肝、脾のリケツチアの量に差が見られるが42日後においては既に大體両者の量はその感染価から判定して等しくなっている。88日後においても 10LD50 のリケツチアを接種されたハツカネズミの脳、腎、脾等に依然としてリケツチアの残存していることを知る。しかもその量は夫々 10^3 LD50 の接種をうけた群と等しい。之等の事実より、再接種量を異にした場合にも40日以上経過すれば組織中には大體一定量のリケツチアが定着するに至り、しかも83日以上それらの組織から消えないこと知るのである。

第2表 再接種量を異にした場合の免疫ハツカネズミ組織中における *R. orientalis* の消長

再接種後の 日 数	臓 器	稀 釈	1000LD50 接種群	10 LD50 接種群
20	脾及肝	10^{-1}	●* 12 13 15 14 16	● 17 18 16 18
		10^{-2}	● 13 15 15 16 18 ○	● 15 ○ ○ ○ ○ ○
	脳	10^{-1}	● 13 15 14 14 14	● 14 15 15 15 16
		10^{-2}	● 14 15 15 16 16	● 10 ○ ○ ○ ○ ○
42	脾及腎	10^{-1}	● 13 13 14 14 16 16	● 14 15 15 16 16 ○
		10^{-2}	● 14 ○ ○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○ ○
88	脳	10^{-1}	● 15 15 ○ ○ ○ ○	● 17 ○ ○ ○ ○ ○
	腎	10^{-1}	● 12 12 13 13 15 ○	● 12 13 13 13 ○ ○
	脾	10^{-1}	● 13 13 15 15 15 15	● 13 14 14 15 16 16

* ○ 生存ハツカネズミ
● 死亡ハツカネズミ 数字は死亡した数を表す

免疫動物に再接種されたリケツチアの
組織における存続期間

前回の実験において、免疫後再接種をうけたハツカネズミの体内に88日も AX株の存在することを知つたので、今回は更にその消長が追求された。S.13株にて

動物を免疫後36日目に AX株の再接種が行われ、免疫動物はすべて生き残つた。再接種後 14日、70日、150日目にハツカネズミの脾、肝中の *R. orientalis* の存在の有無が調べられた。第3表に示されている様に、150日後においても再接種リケツチアの存在が確認さ

れた。動物の斃死のため之以上の検索は行われなかつたがなほ長期間存在しつづけるものと思われる。

第3表 免疫ハツカネズミに再接種されたリケツチアの組織における存続期間

再接種後の日数	臓器	臓器乳剤の接種を受けたハツカネズミの生死
14	脾及肝	
70	全上	
150	全上	

※ 解剖されたハツカネズミを示す

Blanc 及び Baltazard の報告によれば¹³⁾ 発疹チフス、発疹熱、或はロッキー山紅斑熱の感染をうけた動物にあつては、不顕性の再感染は非常に稀であると云われている。私は¹⁴⁾ 5匹のテンデクネズミを先づS.13株にて感染せしめ、次に1ヶ月後AX株を再接種し、再感染の有無を調べた。最初のS.13株による感染の際には発熱を示すものは少かつたが、AX株の再接種の時にも何れも無熱に経過した。勿論この時対照の正常テンデクネズミは40°C以上の定型的発熱を示した。有熱期及び解熱後、両群の動物の心臓穿刺を行ひ、その血餅の乳剤をハツカネズミの腹腔内に接種してリケツチアの検出を試みられた。ところが Blanc 等の結果と異り、実験的恙虫病の場合には不顕性の再感染は成立し、再接種群の動物の血餅からは対照群のそれと同様にリケツチアが証明されたのである。ハツカネズミ及びテンデクネズミを使用した上記の実験結果からして実験的恙虫病において重感染が起り得ることは明かである。¹⁴⁾ ¹⁵⁾ 従つて Traub, Schoen 等の脈絡脳膜炎ウィールス、或は第四性病ウィールスについての実験結果もさらに検討してみる必要があらう。

リケツチアの消失と共に再接種に対する組織の抵抗が消失するかの問題は未だ決定されていない。感染の初期において、リケツチアが存在にも拘らず再接種に対して感受性のあることは、免疫が単なるリケツチア

の存在に依存するものでなく組織の機能的——それは未だ具体的に明かにされていない——の強まりを必要とすることを示す。従つて感染の末期において組織からリケツチアの消滅後直ちに再接種に対し無抵抗となるとは考え難い。Hallauer により示唆された様に“*Infectionsgebundene Immunität*”と“*Heilungsimmunität*”との間には“*graduelle Unterschied*”があるにすぎないのではなからうか。結局それは病原體消滅後の抵抗の存在期間の長短に帰せられよう。両者の間に劃然とした質的な差は設定し難い。Sergent¹⁶⁾ 或は Francis¹⁶⁾ 等は“*Prémunition*”と

云う概念を、免疫と全く異質なものとして規定している。若しこの規定が正しいとするならばそれはリケツチア病、少くも恙虫病には妥当しない。我々はこの興味ある概念の適用を急ぐ前に、個々の疾病の病理について更に精細に検討することが必要であらう。

Smadel 等によれば¹⁷⁾ R. akari 等とことなり R. tsutsugamushi はハツカネズミにクロ、マイセティンの治療を1ヶ月以上継続しても、組織からこれを消滅することは出来なかつた。このことは10LD50のリケツチアを再接種した場合にも之が免疫動物中において消滅されずに定着することゝ比較して注目すべき所見であらう。然し Tranb が脈絡脳炎ウィールスについて述べている様に、リケツチアの漸減が起る可能性を否定し得ない。第2表に見られる様に免疫動物に再接種されたAX株は83日後においてその腦の感染価が低くなつており、脾に比較して早期にリケツチアの消滅の起ることを示唆している。リケツチアの減少が血清中の抗體によるか、直接局所の組織そのものの機能によつて起るかは現在明かでない。之等の点については実験により解決が試みられるであらう。

総 括

(1) ハツカネズミにS.13株を接種し、各組織中にリケツチアの侵入した後においても再接種に対して正常動物と同様の感受性を示す時期がある。

(2) S.12株で強く免疫されたハツカネズミも、再

* Loi de préséance

** Lack of normal reactivity to the same organism.

接種をうければリケッチアの組織への侵入を阻止することは出来ない、即ち重感染が成立する。

(3) 10⁴LD50 或は 10LD50 と云ふ様な少量のリケッチアを以てしても再感染は成立し、再接種リケッチアは免疫組織に侵入、定着するに至る。

(4) 免疫物動の組織に定着した *R. orientalis* は 180 日以上存続するが、リケッチアの漸減が起り得ることが示唆された。

(組織標本の作製とその所見について援助を頂いた病理學教室伊藤弘氏に感謝する。)

文 献

- 1) 林直助：本年度に於ける恙虫病研究，北越醫學會々報，26：1—44（明 44）
- 2) Kawamura, R. : Studies on Tsutsugamushi disease. Cincinnati (1926)
- 3) 川村麟也，伊藤辰治，中村隆治，上村忠雄，佐藤猪之彦：恙虫病の予防に就て（第一報）．東京醫事新誌，No. 3021，1—13（昭 12）
- 4) 川村麟也，笠原四郎，外山富雄，西成田富智雄，椿精一：恙虫病の予防に就て（第二報）．東京醫事新誌，No. 3115，1—15（昭 13）
- 5) 上村忠雄：恙虫病の免疫持續期間に關する實驗的研究．北越醫學會雜誌，59：1269—1271（昭19）
- 6) 西成田富智雄：弱毒（澎湖島系）恙虫病毒微量入何接種による免疫の獲得．日本醫學，No. 3382，12—15（昭 19）
- 7) Sergeant, E. & Parrot, G. : Immunité, pré-munition et la résistance innée. Arch. Inst. Pasteur d'Algérie, 13, 279-319 (1935)
- 8) Parrot, G. : Les rickettsioses confèrent-elles l'immunité vraie ou la prémunition? Arch. Inst. Pasteur d'Algérie, 15, 183-213 (1937)
- 9) 川村麟也，河野道俊，福住定吉，椿精一，伊藤平八，伊藤忠一，石井邦輔，小畑英雄：「リケツチオーグス」と免疫との關係に就て（第一）．第16回聯合微生物學會記録，192—195（昭 17）
- 10) Kuwata, T. & Berge, T.O. : Comparative studies of *Rickettsia tsutsugamushi* isolated in the endemic areas of Niigata, Japan. 近刊
- 11) Kuwata, T. & Berge, T.O. : On the *Rickettsia tsutsugamushi* of weak pathogenicity, Strain S.13 近刊
- 12) Fox, J. P. : The long persistence of *Rickettsia orientalis* in the blood and tissues of infected animals. J. Immunol, 59, 109-114 (1948)
- 13) Blanc, G. & Baltazard, M. : Recherches sur l'immunité dans les maladies exanthématiques humaines; III. Qualité de l'immunité. "Réinfection inapparente." Arch. Inst. Pasteur du Maroc, 2, 633-650 (1944)
- 14) Tranb, E. : Persistence of lymphocytic choriomeningitis virus in immune animals and its relation to immunity. J. Exp. Med., 63, 847-861 (1921)
- 15) Schoen, R. : La réinfection névraque des souris blanches avec le virus de la maladie de Nicola et Favre. Compt. rend. Soc. biol., 131, 475-478 (1939)
- 16) Francis, T., Jr. : Response of the host to the parasite. in "Bacterial and mycotic infections of man" edited by R.J. Dubos, pp. 91~109 (1949)
- 17) Smadel, J.E., Jackson, E.B. & Cruise, A.B. : Chloromycetin in experimental rickettsial infections. J. Immunol, 62, 49-65 (1949)

IMMUNITY OF THE TSUTSUGAMUSHI DISEASE

Tsuguo KUWATA

Department of Bacteriology,
University of Chiba School of Medicine

Details of this paper will be published
separately in English