マウスの Weil-Felix 反応 (抗 OXK 菌) に関する研究

第1報 Freund 型 Adjuvant 添加による OXK 抗体の増強について

石 川 正 策*

SHOSAKU ISHIKAWA: STUDIES ON WEIL-FELIX REACTION
(OXK ANTIBODY) IN MICE
(I) ENHANCEMENT OF OXK ANTIBODY PRODUCTION
IN MICE THROUGH COMBINATION WITH FREUND TYPE
ADJUVANT.

[受稿 7月10日 1956]

まえがき

発疹チフスに感染した患者血清内に *Proteus* OX₁₉ 菌を凝集する抗体の証明されることは、1916年 Weil 及び Felix によつて始めて見出されたり。この反応は Weil-Felix 反応 (以下 W. F. R. と略) と呼ばれ、本病の診断に広く用いられている。

次いで発疹熱や ロッキー山紅斑熱免疫血清も *Proteus* OX 菌を凝集することが認められた。

更に発疹チフスや発疹熱患者血清は同じ *Proteus* OX 菌属のうち OX₂ 菌に対しても低い年ら凝集価の上昇を示し、またロッキー山紅斑熱のそれには OX₁₉ 菌に対し高く OX₂ 菌に対し低い値を示すものと、逆に OX₂ 菌に対し高く OX₁₉ 菌に対し低い値を示すものとの2型のあることが認められた²⁾³⁾⁴⁾。恙虫病の *Proteus* OX 菌に対する凝集反応については、1928年 Fletcher⁵⁾等がマレー半島の所謂熱帯チフスの中には「都会型」と「田園型」と2種のあること、前者の患者血清が従来の OX₁₉ 菌 (No. 67 株及び Warsaw 株) を凝集するのに対し、後者のそれはこれらの標準株を凝集せず、ただ1921年英国マ立菌株保存室より OX₁₉ 菌株として Bland-Suttan 研究所に供給され、更に1923年 Kingsbury によつてマレー植民地におくられた所謂 Kingsbury 株のみを凝集することを見出した。この K 株は OXK として広く使用されるに至つたが従来の OX₁₉ 菌と抗原的に明かに異なるもので、氏等はこの OXK の凝集する疾患を新しいリケッチア症として他から区別した。この事実はスマトラ、その他南方系

の所謂チフス性疾患にも認められ、また日本からおくられた恙虫病患者血清も明らかに OXK 菌を凝集することは Felix⁶⁾等によつて確められた。同時に我が国の多くの学者⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾も秋田、山形、新潟で発生した多くの恙虫病患者血清を用い、OXK 株に対する W. F. R. を行い、陽性反応を呈することを再確認した。現在までのところ、OXK に対する抗体の上昇の認められるリケッチア症は、南方地域では田園型熱帯チフスや叢林地帯のチフス様疾患 (Scrub typhus)、また我が国では古くから知られている古典的恙虫病や近年注目されて来た新型恙虫病等で、これらを一括して恙虫病或は叢林チフス或は K 型リケッチア病と呼ばれている。そしてその病原体も恙虫病リケッチア (学名 *Rickettsia orientalis* (以下 R. o と略)) と総称されている。

R. o に対し感受性をもつものとして人以外にさる、うさぎ、モルモット、コトンラット、ハムスター及びマウスが挙げられる。しかしその感受性はリケッチアの株の差によつてかなりの強弱のあることが認められている。例えば、さるは皮内、皮下、静脈内、腹腔内のいずれの接種部位からも発症し、特に皮内接種では局所に人の場合と同様に壊瘍形成と局所リンパ節の強い腫脹が認められる。さるが発症すると、全身性に弱いリンパ節腫脹と、白血球減少を伴い、一定の発熱を示す。しかし感染死亡することは稀である。この際 OXK 抗体の上昇は余り顕著でない。うさぎでは睾丸内接種¹¹⁾並に前眼房内接種¹²⁾によつてリケッチアの増殖を鏡検下にみとめることが出来る。殊に後者ではそ

*国立予防衛生研究所 研究生 (リケッチア・ウイルス部長 北岡正見博士 指導)

の Descemet 膜内被細胞内に無数のリケッチアが見出される。しかし何れの場合も発熱は余り著しくなく、且つ血清内の OXK 抗体の上昇は一定しない (60%~0%)¹³⁾。モルモットに対しては腹腔内接種後、発熱や腹腔内に腹水の溜溜を起す株もあるが、一般には感受性は低い。コトンラットは濃厚な材料を経鼻或は静脈内感染させると肺炎を起し、肺組織に無数のリケッチアが見出される。濃厚材料をハムスターに接種すると致死せしめる。しかしこれらの動物は免疫しても OXK 抗体の確実な上昇を示さない。

マウスは恙虫病リケッチアに最も感受性のある動物¹⁴⁾で通常腹腔内接種によつて7~9日後に概ね死亡する。その腹腔内壁や腸間膜の内被細胞内に無数のリケッチアを認めることが出来る。強毒材料の LD₅₀ は 10⁷~10⁸を示す。しかしその感染に耐過したマウスの血清内に OXK 抗体が出現上昇するかどうかについては今までのところ報告をみない。他方において R. o. といわれる株の間には、既に述べたように実験動物に対する病原性に差が認められているばかりでなく、血清免疫学的にもかなりの差があることも次第に明らかとなつて来た。即ち補体結合反応¹⁵⁾、交叉免疫試験¹⁶⁾及び中和実験¹⁷⁾の上で、株の間に明らかな差異が認められるものがあり、殊にお互に共通の中和抗体の全く欠けた株もある事が知られてきた。ここに於て R. o. の同定法を再検討する必要が生じて来た。ここでは先ず古くから広く用いられている OXK に対する W.F. R. について検討しようとしたが既に述べたように、さる、うさぎ、モルモット、ラッテに R. o. を感染させても OXK 抗体の有意な上昇は必ずしも得られない。そこで安価な研究室内で取扱いに便利な、しかも W.R.F. については未知であるマウスを用い、R. o. の同定に応用し得るかどうかを検討した。

実験材料並に実験方法

1) 使用恙虫病リケッチア株

実験に主に用いたのは新潟系加藤株で本株は1953年新潟県下の恙虫病患者加藤某より分離されたものを予研リケッチアウイルス部で保存しているもので、患者材料よりマウスに18代通過後孵化鶏卵々黄嚢に5~7代通過したもので、マウスに対する毒力 LD₅₀ は 10⁵~10⁶ 前後のものをドライアイス箱中に凍結保存し、用に臨み実験マウスに接種し、その感染臓器を爾後の実験に用いた。即ち各実験に使用する接種材料の卵通過代数やマウス通過代数を略同一にするように注意し

た。Karp 株 (ニューギニア系) は1953年8月29日、北里研究所から鶏卵33代継代、その後マウス1代通過の材料の分与を受け、次いで当研究室でマウスに11代通過後卵黄嚢に5代通過し、凍結保存して加藤株と同様、用に臨み、マウスに接種して使用した。

2) Weil-Felix 反応

術式は衛生検査指針¹⁸⁾の Weil-Felix 反応術式に準拠した。ただし予備実験で示すように正常マウス血清は OX K 菌に対し易熱性の非特異的凝集を持つている場合が少なくないので、すべての被検血清は 60°C 20分非働化して用いた。

抗原並に陽性免疫血清 (家兎) をつくるに用いた Proteus 菌株は 1955年米国軍医学校より第406総合医学研究所を経て送られた常用株 40-B-3 である。使用抗原は予研リケッチアウイルス部製造の Lot 5 及び 6 である。

3) R. o. に対するマウスの免疫法

R. o. に対し、マウスを免疫するには

(i) 生 R. o. (ii) 不活化 R. o. ワクチン及び (iii) Adjuvant (以下 Ad と略) を加えた生 R. o. 或は不活化 R. o. ワクチン等が用いられた。

(i) 生 R. o. の免疫元として腹腔内感染発症マウスの肝、脾を後述の P.G.S. で 10% 乳剤を作り、その 0.2ml 宛を体重およそ 15g の一群のマウスの背部 (初期の実験では大腿部) の皮下にそれぞれ接種し、1. 2. 3 及び 4 週後に別々の個体から採血した。

(ii) 不活化 R. o. ワクチンは、腹腔内感染発症マウスの死亡直前に致死せしめ、その肝、脾を無菌的に切除し、PGS で10%乳剤を作り、その 1,000 r.p.m 5分間遠心上清について、1部を10進稀釈してマウスの腹腔内に接種し、含有リケッチアの毒力を測定し、残りの大部分の上清に 0.2% の割合にホルマリンを添加し、24時間室温に放置し、次いで 4°C の冷蔵庫内に保存し、ワクチンとした。

この際のリケッチアの生残試験はワクチンを3匹のマウスの腹腔内に接種し、21日間観察し、ワクチン内に最早生 R. o. のないことを確めた。

(iii) 生 R. o. 或はホルマリン不活化 R. o. ワクチンに Ad を加えて免疫する場合の Ad の作り方は Freund¹⁹⁾のそれに大体準じたもので流動パラフィンに4%の割合にソルビタン・デステアリン酸エステル (乳化剤) を加え、それを 100°C 1時間滅菌し、その2容量に対し、生 R. o. 乳剤 (感染発症マウスの肝脾の 33.

％乳剤) 1 容量を混和し、ホモジナイザーで2~4分間攪拌し、硝子板上でその一滴の上に、水一滴を落しても水滴が乳剤の上に散らずに丸く乗る状態を、乳剤の完全な water-in-oil の状態と見做し、それを接種材料とした。それには一回の攪拌で完全な water-in-oil にならないこともあつたが再度の攪拌でその目的が達せられた。ホルマリン不活化 R.o ワクチンに Ad を加える場合も同様な操作によつた。

4) 使用マウス

普通は市販の雑系マウス(体重凡そ 15g)を用いたが、その必要に応じて生後6~7週(体重凡そ 20g)の DD 系マウスを用いて免疫した場合は断つてある。

5) マウス血清

マウスを手で固定し、心臓より全採血した。技術の習熟によりマウス 1 匹から毎常 0.5~0.7 ml の血液が採集出来た。多くは4~5匹の血液を一括し、室温で凝固させ、1 日冷蔵庫に放置し、次いで遠心し、被検血清を分離した。マウスの血清はかなり注意深い操作にも拘らず一般に溶血し易く、屢々赤色の血清となつた。

6) 稀釈液

リケッチア材料の接種並にワクチン稀釈にはすべてグルタミンサッカローゼ磷酸緩衝液(Snyder¹⁹⁾ PGS)を用いた。本液はリケッチアを扱う上に極めて安定な稀釈液であるからである。

実験成績

1) 予備実験

(i) 正常マウス血清の Weil-Felix 反応

正常マウス(市販雑系)3~4匹分の一括血清について OX_{19} , OX_2 及び OXK に対する W.F.R. を行つたところ血清稀釈 1:20 において OX_{19} , OX_2 に対し陰性、しかも OXK に対し第一表に示すようにどの血清も 1:80~1:160 の凝集価を示した。これらの血清を 56°C 30分間、或は 60°C 20分間加熱し、しかる後

W.F.R. を行つたところ、56°C 30分間加熱血清の大部分が、また 60°C 20分間加熱血清の悉くが陰性(1:20以下)となつた。

このように生で陽性であつた血清が、加熱して非働化することにより陰転するのは、生血清内に易熱性の非特異的な凝集物質が含まれるためか否か検討したところ、後に述べるように OXK 菌に対する免疫マウス血清並に R.o ワクチンで免疫したマウス血清の加熱所見等から生血清内の易熱性の非特異的物質に起因するものと推定された。従つて実験はすべて 60°C 20分間加熱し非働化した血清について W.F.R. を行つた。

ii) OXK 菌で免疫したマウス血清内の

OXK 抗体の消長。

先ず OXK 菌でマウスを免疫し、その血清について OXK に対する抗体の出現消長について検討した。一群 8 匹宛の二群のマウスのそれぞれに OXK 菌液(濃度 Mc Farland²⁰⁾No. 3 に合せる、9 億/cc)の 0.2ml 宛を 1 週間々隔で 2 回、一群では皮下に、他の群では腹腔内にそれぞれ接種し、2 回目の注射から 2 週間後にマウスより採血し、各群のマウス血清を一括し、非働化して、W.F.R. を行つた。その結果、第 2 表に示すように、OXK に対し皮下群では、1:40 腹腔群では 1:640 の陽性価を示した。しかし OX_{19} に対しては何れの群も陰性に終つた。この事實はマウスを OXK 菌で免疫すればその血清内に OXK 抗体の出現することを物語るものである。

II) 本実験

実験 1 生 R.o で免疫したマウス血清の OXK 抗体の出現消長。

R.o をマウスの皮下に接種しても接種毒力量の如何により、マウスは生残し、免疫を獲得する²¹⁾。そこで腹腔内に接種すると 100% にマウスを斃す R.o の量をマウスの皮下にそれぞれ接種し、次いで生残マウスの血液を一括し、その血清内の OXK に対する抗体をしら

Table 1 Elimination of non-specific agglutinating substance to OXK from normal mouse serum by heating.

Heating	not heated	56°C for 30 minuts	60°C for 20 minuts
No of test ser.			
No. 1	1:160	1:20(-)	1:20(-)
No. 2	1:80	1:20(-)	1:20(-)
No. 3	1:160	1:40	1:20(-)
No. 4	1:160	1:20	1:20(-)
No. 5	1:160	1:20(-)	1:20(-)

Table 2 Antibody to OXK in sera from mice immunized with OXK.

mouse group	Dosis of inoculum	days after 2nd shot	W. F. R.	
			OXK	OX ₁₉
Subcutaneous group	0.2ml × 2 (7 days interval)	14 days	1:40	1:20(-)
Intraperitoneal group	0.2ml × 2 (7 days interval)	14 days	1:640	1:20(-)

べてみた。

(1) Karp 株皮下1回接種の場合

生 R.o 乳剤を作りマウス40匹のそれぞれ大腿部皮下に 0.2ml 宛接種し, 1,3 及び4週後にそれぞれ6匹乃至8匹から採血一括し, W.F.R. を行つた。因みに毒力対照マウスの5匹は腹腔内接種後10日以内に悉く死亡したが, 免疫マウスのうち14匹は皮下接種後28日以内に死亡した。

免疫マウスの逐週の W.F.R. の成績をみると, 第3表に示すように1週と4週では共に 1:40 を示し, 3週では陰性に終つた。

(2) 加藤株皮下1回接種の場合

加藤種マウス18代通過材料の 0.2ml 宛をマウス(体重約 15g) 4 匹の皮下にそれぞれ1回接種し, 26日後に採血し, W.F.R. を行つたところ OXK に対する抗体の上昇は認められなかつた。

(3) 加藤株皮下3回接種の場合

加藤株の乳剤 0.2ml 宛を DD マウス(生後6~7週, 体重およそ 20g) 7 匹の背部皮下に5日間隔で3回接種し, 最後の注射から1,2, 及び3週後にそれぞれ2,2 及び3匹のマウスから一括採血し, W.F.R. を行つた。因みに毎回接種材料の毒力対照群として各3匹宛のマウスの腹腔内に材料を接種したが, 何れも接種後7~11日の間に定型的に発症死亡した。しかし背部皮下3回接種を受けたマウスでは1匹の死亡も認められなかつた。それらマウス血清の W.F.R. を見ると, 第3表に示すように1週後 1:20(-), 2週後 1:20, 3週後 1:40 となつた。

以上3回実験の成績を通覧すると生 R.o をマウスの皮下に接種すれば, 軽度であるが, OXK 抗体の上

昇が認められ, ことにその注射回数が多くなる程高くなるようである。

実験 2 フォルマリン不活化ワクチンで免疫した場合の OXK 抗体の出現消長

生 R.o をマウスに接種すると発症死亡の可能性があるため多量に接種出来ない。また, 生 R.o を取扱う注意が必要である。そこでホルマリンで不活化してワクチンを作り, マウスに接種し OXK 抗体の出現の有無を検討した。

(1) 不活化ワクチン

既に実験材料のところで述べたように予め毒力を測つた R.o. 乳剤にホルマリンを添加し不活化ワクチンを作りマウスを免疫した。このワクチンには最早生 R.o. の生残していないことをマウスを用いた生残試験によつて確めた。

(2) ワクチンで免疫したマウス血清の W.F.R.

Karp 株で作つたホルマリン不活化ワクチンの 0.2 ml 宛をそれぞれ1週間間隔で2回40匹のマウスの腹腔内に接種し, 2回目の接種から1,2,3 及び4週後にそれぞれ9匹乃至10匹のマウス群より採血一括し, その血清について W. F. R. を行つたが, その成績は悉く陰性に終つた。

即ち不活化ワクチンの 0.2 ml を1週間々隔で2回接種しても OXK 抗体の出現を認める程度の抗体産生は認められなかつた。

実験 3. R.o に Ad を添加した場合の OXK 抗体産生促進効果

加藤株や Karp 株の生 R.o を皮下に接種すると弱い乍ら抗体産生の認められることは既に実験1で示した。この低い抗体産生が, Freund²⁰⁾の Ad を添加す

Table 3 Detective OXK antibody following inoculation with organ emulsion infected with *Rickettsia orientalis*.

No. of series	Strains used	Dosis and locality of inoculation	W. F. R.			
			1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks
1	Karp	0.2 ml × 1 s. c.	1:40	—	1:20(-)	1:40
2	Kato	0.2 ml × 1 s. c.	—	—	—	1:20(-)
3	Kato	0.2 ml × 3 5 days interval s.c.	1:20(-)	1:20	1:40	—

ることにより抗体産生が促進上昇されるかどうかを検討した。ここでは専ら既知のK型リケッチア株である加藤株を用いて実験を行った。

Ad 添加加藤株乳剤を次の2群のマウスに接種した。

- i) 第1群 10匹の皮下にそれぞれ0.2ml宛1回接種群
- ii) 第2群 24匹の皮下にそれぞれ0.2ml宛1週間間隔で2回接種群

マウスはAdのみを接種されても逆毛となり、最初の1~2日間はやや元気がなくなり、一部はそのまま死亡したが大部分は回復した。

また約半数において注射部位に潰瘍形成が認められたが、何れも痂皮痂痕を経て治癒した。

第1群では接種後1匹が死亡したが残りの4及び5匹からそれぞれ1及び3週後に採血一括し、血清についてW.F.R.を行い、第2群では接種後2匹が死亡したが、残りの6,7及び9匹から第2回接種1,2,及び3週後にそれぞれ採血、一括し、第1群と同様にW.F.R.を行った。

第4表に示すように1回接種群では1及び3週後にはそれぞれ、1:20(-)及び1:20、2回接種群では1,2,及び3週後にはそれぞれ1:320,1:320,及び1:20

の価を示し1回接種では低い、2回接種では生R.oのみを接種した場合に比し、明らかにOXK抗体の産生増強が認められた。

実験4. Ad 添加フォルマリン不活化ワクチンによる OXK 抗体の出現消長

実験3により Ad 添加生 R.o の皮下接種では生 R.o. 単独皮下接種に比し、明らかに OXK 抗体の産生促進効果が認められたので、不活化 R.o. ワクチンにも Ad を添加することにより、OXK 抗体の産生促進が起るのでないかと推定し、実験を進めた。

1) Ad 添加不活化加藤株(新潟系)ワクチンによる実験。

マウス27匹にAd添加不活化加藤株ワクチンの0.6ml宛を夫々一週間間隔で皮下に2回接種した。この場合ワクチンの総量を実験2と揃えるために、ワクチン1容量とAd2容量と混和したもの0.6mlを1回量とした。その結果、量が多すぎたためか、被接種マウス27匹中16匹が衰弱死亡した。ワクチン接種1,2及び3週後にそれぞれ3,4及び4匹のマウス群から採血、一括し、W.F.R.を行った。その成績は第5表に掲げてある。即ち1,2及び3週後の血清はそれぞれ1:320,1:160,及び1:80の値を示し、明らかにOXK抗体の上昇を示した。

Table 4 Detective OXK antibody following inoculation with infected organ emulsion combined with adjuvant.

No. of series	Strains used	Dosis and locality of inoculation	W. F. R.		
			1 week	2 weeks	3 weeks
1	Kato	0.2 ml × 1 with adjuvant s. c.	1:20(-)	—	1:20
2	Ditto	0.2 ml × 27 days interval s. c.	1:320	1:320	1:20

Table 5 Specifity of OXK antibody produced by vaccine of Rickettsia orientalis combined with adjuvant.

No. of series	Strains used	Dosis and locality of injection	W. F. R.		
			1 week	2 weeks	3 weeks
1	Kato	0.2 ml × 2 with adjuvant s. c.	1:320	1:160	1:80
2	Karp	0.2 ml × 2 with adjuvant s. c.	1:80	1:20(-)	1:20(-)
	Karp	0.2 ml × 2 intraperitoneal	1:20	—	1:20(-)
	Karp	0.2 ml × 2 s. c.	1:20(-)	—	1:20(-)
3	Wilmington (R. typhi)	0.2 ml × 2 with adjuvant	1:20(-)	—	1:20(-)
	liver and spleen emulsion from normal mice	0.2 ml × 2 with adjuvant	1:20(-)	—	1:20(-)

この成績は定型的K型恙虫病リケッチアである加藤株で不活化ワクチンを作り、それに Ad を添加し、マウスに接種すれば血清中に OXK 抗体の証明されることを立証したものである。

2) Ad 添加不活化 Karp 株ワクチンによる実験

K型恙虫病リケッチアである Karp 株を用い、1)と同様に Ad 添加不活化ワクチンをつくり、マウス20匹の皮下に1週間間隔で2回免疫し、第2回免疫より1,2及び3週後にそれぞれ6,5及び9匹のマウス群から採血、一括し、その血清について W.F.R. を行つた。この実験で使用した Ad 中のソルビタン・ヂステリアン酸エステルは加藤株の場合と同一製造番号のものであつたがパラフィンに新に購入したもので加藤株の場合とは異つていた。この際対照として一群10匹宛のマウスに Ad を添加しない不活化ワクチンをそれぞれ皮下及び腹腔内に、それぞれ1週間間隔で2回接種し、1及び3週後にそれぞれ5匹宛のマウス群から採血し、W.F.R. を行つた。

第5表に示すように Ad 群では1週1:80, 2週1:20(-) 3週1:20(-)となり、Ad を添加しない腹腔群と皮下群では、腹腔群の1週後1:20を除けば全部陰性に終つた。即ち加藤株程顕著ではないが不活化ワクチンに Ad を添加することによりマウスで OXK 抗体の産生が認められるようになった。

実験5. Ab 添加不活化ワクチンにより認められる OXK 抗体の特異性について。

Ad 添加不活化ワクチン免疫によつて OXK 抗体の出現するのはワクチン中に含まれる R.o. そのものによる特異的反応であるか、否かを確かめる必要がある。そこで健康マウスの肝脾乳剤の他に発疹熱 (Wilmington) に感染したマウスの肝脾乳剤を用い、不活化 R.o. ワクチンを作ると同一操作でワクチンを作り、更に実験4と同様に Ad を添加し、それぞれ10匹宛のマウスを免疫し、第2回接種より1及び3週後にそれぞれ5匹ずつのマウス群から採血し、W.F.R. を行つた。第5表に示すようにそれ等被接種マウスのいずれの血清にも OXK 抗体の出現は認められなかつた。以上の諸事実はマウスに Ad 添加不活化 R.o. ワクチンを接種して証明される OXK 抗体の出現上昇は K 型リケッチア群による特異的のものと解される。

考 え 方

OX₁₉ 菌と発疹チフス並に発疹熱の各リケッチアと

の共通抗原については多くの実験報告がある。即ち 1934年 Castaneda²⁹⁾は OX₁₉ 菌の菌体成分中アルカリ耐性の多糖類がリケッチアと共通因子であることを明らかにし Westphal²⁴⁾はこの抗原は Proteus では表在性に、リケッチアでは深部に位し、従つてリケッチアでは感染後にこの抗体の上昇が認められるが、ワクチン接種後ではリケッチアの表在性の抗原に蔽われ、この抗体の上昇は認められないとされた。このことは Zarafonitis²⁹⁾によつて発疹チフスワクチンを7~10回以上接種すると補体結合(以下 C.F. と略す)抗体は上昇するが OX₁₉ に対する抗体は有意の上昇を示さなかつたことから推定された。北岡³⁰⁾土屋³¹⁾もこのことを認めている。しかし平松³²⁾は異なる成績を発表した。それは W.F.R. の術式に検討の余地があると考えられる。一方田宮、羽里³³⁾は発疹チフスに感染したモルモットの血清内に OX₁₉ の抗体の上昇が殆んど認められないことから Proteus OX₁₉, R. Pro-wazeki, R. mooseri 間の共通抗原物質はモルモットの脾臓中に存在する血液型 B II型物質と関連があると指摘した。

しかるに R.o. と OXK 菌体成分間の共通抗原についてみると、R.o. は比較的不安定で、孵化鶏卵卵黄嚢内で良く發育した材料を用いても発疹チフス、発疹熱或はロッキー山紅斑熱、Q熱リケッチアで行われているような Cox-Craigie 法のエーテル浸出により、リケッチア体を集めることは困難であり、またリケッチア抗原の多くは水溶性部分に移行し、水溶性抗原が C.F.T. に使用され³¹⁾32), 従つてリケッチア体成分と OXK 菌体成分との比較検討は必要なことであるに拘らず、信頼すべき報告は未だないのである。実験動物の面でも、動物を R.o. で感染させ、或は R.o. 不活化ワクチンで免疫しても OXK 抗体の出現は不定である。かくして R.o. と OXK の関係はそれ以上深く掘り下げられないのである。

上述のマウスの実験において、単なる不活化ワクチン接種では陰性であるが、生 R.o. 感染では僅かに OXK 抗体の上昇が認められた。これらの事実は接種材料に Freund の Ad を添加することにより抗体の産生が促進される可能性を示唆するものである。というのは各種細菌抗毒素或はリケッチア、ウイルス等のワクチンに Ad を添加することは古くから行われ、近くは Freund はパラフィン油等の油剤を Ad として用い³³⁾その後 Friedewald³⁴⁾, Warren³⁵⁾, Lipton³⁶⁾等がインフルエ

ンザ、日本脳炎、狂犬病等のワクチンに Ad を添加し、抗体の増強とその持続の延長を報告しているからである。Fox³⁷⁾はリケッチア・ワクチンに Ad を加え water-in-oil とし有効な事を認め、羽里³⁹⁾は発疹チフスワクチンに明礬を添加し、抗原性をたかめうると述べた。

既に述べたようにマウスは一般に抗体産生の比較的困難な動物であるが、著者はマウスが R.o に最も感受性のあること、また OXK 抗体産生の可能な動物であることから、接種材料に Ad に加えることにより、たとえ不活化 R.o でも体内に容易に抗原が遊離され、OXK 抗体産生が増強されるであろうと推定して、実験を進めた。その結果、著者の方法は K 型リケッチアを他のリケッチア群から区別する簡易な方法であるとの結論に到達した。更に正常動物血清を不活化することなく、そのまま OXK に対する W.F.R. を行うと非特異的陽性成績を示すことを指摘した。因みに最近 Havas⁴⁰⁾等も著者と無関係に、血清アルブミンに対する抗体産生は、Freund の water-in-oil の Ad の添加によつて増強されると発表した。

むすび

著者は K 型リケッチアの代表である *Rickettsia orientalis* 加藤株 (新潟系) と Karp 株 (ニューギニア系) を用い、マウス感染し或はホルマリン不活化ワクチンを作り、マウスを免疫し、OXK 抗体の出現を追及し、次の成績を得た。

1) マウスは OXK 菌液の接種によつて血清中に OXK 抗体の出現を示した。

2) R.o の生病毒をマウスの皮下に 1 回乃至数回接種すると、低い乍ら OXK 抗体の出現上昇がみられた。この際接種材料に Freund 型 Adjuvant を添加すると、その抗体上昇は顕著となり、しかも接種回数の多い程高い値を示した。

3) R.o に感染したマウスの肝脾乳剤からホルマリン不活化ワクチンを作り、マウスの腹腔或は皮下に単に接種したのでは OXK 抗体の出現の証明は困難であつた。しかしこれに Freund 型 Adjuvant を添加すると 1~3 週後に OX 抗体の上昇は増強され、また接種回数の多くなる程高い値を示した。

本研究は田宮猛雄博士を班長とする地方性リケッチア症の研究の下になされた。ここに田宮先生に厚く謝意を表すると共に始終御懇篤な御指導と御校閲の労を戴いた恩師北岡正見部長に厚く感謝の意を表します。

なお本研究に当り多大の御援助と御鞭撻を戴いた戸亮博士並にリケッチアウイルス部々員各位に深く感謝を申し上げます。

文 献

- 1) Weil, E. und Felix, A.: Zur serologischen Diagnose des Fleckfiebers. Wien Klin. Wschr., **29**, 33-35, 1916.
- 2) Felix, A.: Serological types of typhus virus and corresponding types of proteus. Tr. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., **27**, 147-172, 1933.
- 3) Parker, R.R.: Rocky Mountain spotted fever. J. Amer. Med. Ass., **110**, 1105-1185, 1273-1298, 1938.
- 4) Felix, A.: Technique and interpretation of the Weil-Felix test in typhus fever. Tr. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., **37**, 321-341, 1944.
- 5) Fletcher, W., Lesslar, J. P., and Lewthwaite R.: The aetiology of the tsutsugamushi disease and tropical typhus in the Federate Malay States. Part II, Tr. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., **23**, 57-70, 1929.
- 6) Felix, A. and Rhodes M.: Serological varieties of typhus fever. J. Hyg., **31**, 225-246, 1931.
- 7) 川村麟也, 今川与曹, 伊藤辰次: 恙虫病における Weil-Felix 反応について。東京医事新誌, **2930**, 1255~1264, 1933.
- 8) 川村麟也, 今川与曹, 伊藤辰次: ワイルフェリックス氏反応より見たる台湾の恙虫病及び之に類似する発疹熱について。東京医事新誌, **2864**, 303~308, 1934.
- 9) 緒方規雄, 黒田収, 宮田光男, 寺邑政徳: 恙虫病における血清学的諸反応に Weil-Felix 反応について。千葉医学会雑誌, **13**, 1059~1101, 1935.
- 10) 寺邑政徳: 恙虫病における Weil-Felix 氏反応知見補遺: 千葉医学雑誌, **15**, 639~665, 1937.
- 11) 緒方規雄, 海野幸胤: 恙虫病毒の家兎睾丸接種による移植並にその組織内に出現する微生物について: 千葉医学会雑誌, **7**, 1215~1222, 1929.
- 12) Nagayo, M., Tamiya T., Mitamura, T., and Sato, K.: On the virus of tsutsugamushi disease and its demonstration by a new method. J. J. Exp. Med., **8**, 309-318, 1930.
- 13) Blake, F. G., Maxcy, K. F., Sadusk, J.F., Kohls, G.M., and Bell, E.J.: Studies on tsutsugamushi disease (scrub typhus, mite borne typhus) in New Guinea and adjacent islands. Amer. J. Hyg., **41**, 243-373, 1945.
- 14) 緒方規雄, 中島文徳, 鹿島定逸: 各種病原リケッチアの実験動物に就いて。東京医事新誌, **2760**, 13~18, 1932.
- 15) Bengtson, I. A.: Apparent serological heterogeneity among strains of tsutsugamushi disease. Pub. Health Rep., **60**, 1483-1488, 1945.
- 16) Rights, F.L., Smadel, J.E., and Jackson, E. B.: Studies on scrub typhus. III Heterogeneity of strains of R. tsutsugamushi as demonstrated by cross-vaccination studies. J. Ex-

- per. Med. **87**, 339-351, 1948. 17) Fox, J. P.: The neutralization technique in tsutsugamushi disease. (Scrub typhus) and the antigenic differentiation of rickettsial strains. *J. Imm.*, **62**, 341-352, 1949. 18) 厚生省編: 衛生検査指針Ⅱ 122~127, 1950. 19) Bovarnick, M. R., Miller, J. C., and Snyder, J. C.: The influence of certain salts, amino acids, sugars, and proteins on the stability of rickettsiae. *J. Bact.*, **59**, 509-522, 1950. 20) Gershenfeld, L.: Biological products, 110, 1935. 21) Freund, J., Lipton, M. M., and Pisani, T. M.: Immune response to rabies vaccine in water-in-oil emulsion. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **68**, 609-610, 1948. 22) Sma-del, J. E.: Viral and Rickettsial infections of man. 2nd Edition, 1952. 23) Castaneda, M. R.: The antigenic relationship between Proteus OX19 and typhus rickettsia. *J. Exp. Med.*, **60**, 119-125, 1934. 24) Westphal, E.: 次の文献中より引用. Babudieri, R.: Immunologie der Rickettsiosen. *Ztschr. f. Imm. u. exp. Therap.*, **112**, 182-201, 1955. 25) Zarafonitis, C. J.: Serologic studies in typhus-vaccinated individuals. I. The effect of a stimulating dose of typhus vaccine on the Weil-Felix and complement fixing antibodies. *J. Imm.*, **51**, 365-374, 1945. 26) 北岡正見: 未発表. 27) 土屋博文: 発疹チフス予防接種後の W. F. R. *日本医事新報*, 1187, 207~209, 1946. 28) 平松稔夫, 長岡潤: 米国製発疹チフスワクチン接種前後における Weil-Felix 反応の消長について, *医学と生物学*, **11**, 123~125, 1947. 29) Tamiya, T., Hazato, H., Yamamoto, T., Iida, K., Kawamura, A., Shimojo, H., Suzuki, K., and Tani, S.: Studies on the so-called X factor common to proteus OX19, Rickettsia prowazeki, and Rickettsia mooseri, especially on the relation of the factor to blood group B specific substance. *J. J. Exp. Med.*, **20**, 1-23, 1949. 30) Tamiya, T., Hazato, H., Yamamoto, T., Iida, K., Kawamura, A., Shimojo, H., Suzuki, K., and Nishioka, K.: Studies on the antigenic substance common to Proteus OX19, Rickettsia prowazeki, and Rickettsia mooseri. *J. J. Exp. Med.*, **20**, 135-143, 1949. 31) Topping, N. H., and Shepard, C. C.: The preparation of antigens from yolk sacs infected with rickettsiae. *Pub. Health Rep.*, **50**, 402-405, 1944. 32) Wolf, D. M., Van der Scheer, J., Clancy, C. F., and Cox, H. R.: A method for the preparation of complement-fixing antigens in a study of experimental tsutsugamushi disease (scrub typhus). *J. Bact.*, **51**, 247-255, 1946. 33) Freund, J., Bonato, M. V.: The effect of paraffin oil, lanolin-like substances and killed tubercle bacilli on immunization with Diphtherie toxoid and Bacterium typhosum. *J. Imm.*, **48**, 325-334, 1944. 34) Friedwald, W. F.: Adjuvants in immunization with influenza virus vaccine. *J. Exp. Med.*, **80**, 477-491, 1944. 35) Warren, J. and Hough, P. G.: A vaccine against Japanese B. encephalitis prepared from infected chick embryo. *Pro. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **61**, 109-112, 1946. 36) Lipton, M. M. and Freund, J.: The formation of complement fixing and neutralizing antibodies after the injection of inactivated rabies virus with adjuvant. *J. Imm.*, **64**, 297-303, 1950. 37) Fox, J. P.: 次の総説で personal communication として引用. Freund, J.: Some aspects of active immunization. *Ann. Review of Microbiology.*, **1**, 291-308, 1947. 38) 羽里彦左衛門: Personal communication 39) Havas, H. F. and Andre, J.: A study of the enhancing effects of adjuvant on antibody formation in mice. *Brit. J. Exper. Path.*, **36**, 171-177, 1955.