

恙虫病リケッチャの電子顕微鏡的研究

岡山大学医学部微生物学教室（指導：村上 栄教授）

仁 熊 浩 一 郎

〔昭和 34 年 3 月 25 日受稿〕

目 次

緒 言	器及び組織の超薄切片電子顕微鏡像
実験材料及び方法	第 1 節 腹腔細胞
実験成績	第 2 節 精製リケッチャと腹腔細胞内リケッチャの形態学的諸性状の比較
第 1 部 恙虫病リケッチャの精製及びその電子顕微鏡的観察	第 3 節 肝臓、脾臓及び腹膜
第 1 節 恙虫病リケッチャの精製	総括及び考按
第 2 節 精製恙虫病リケッチャの電子顕微鏡像	結 論
第 2 部 恙虫病リケッチャ感染発症マウス臓器	参考文献

緒 言

Ricketts (1910), Prowazek (1913) 等によりリケッチャという全く新しい種類の病原微生物の存在が明らかにされて以来、その本態の究明に対して絶大な努力がなされて来た。又一方同時に諸地方の風土病の可成り多数のものがこのリケッチャによる疾患であることも次第に明らかにされて来た。我国のみならず東洋の処々に分布している所謂恙虫病に関しても緒方、長与、川村等諸先賢の大なる努力により、その病原体がリケッチャであることが明らかにされ、以後その本態は他のリケッチャとの比較の下に種々研究され、臨床症状、感染経路、媒介者等は殆んど残すところなく解明され、又その治療に関してもテトラサイクリン系抗生物質が著効を奏することが知られて来た^{1)~3)}。然し一方リケッチャは如何にして感染し増殖するか、果して従来推論されている如く⁴⁾ 分裂増殖を行うものであるのか、或はウイルスの如く封入体を形成し成熟増殖して行くのか、等の微生物学的に極めて重要な疑問は現在尚全く未解決の儘に残されている。

著者は諸種リケッチャの中でも、これらの問題の解明が最も遅れている恙虫病リケッチャについて、その形態、感染増殖等の機転の解明に資する意図から電子顕微鏡及び超薄切片法を応用して以下の諸実験を行つた。

実験材料及び方法

供試病毒： 本教室保存の恙虫病リケッチャ（以下「リ」）Karp 株を使用した。尚香川県東部に於て村上等が分離し本教室に保存している恙虫病「リ」三谷株の使用をも試みたが、三谷株は孵化鶏卵に於ける増殖が Karp 株に比し不良の為（恙虫病「リ」は株により卵黄囊に対する定着性に差がある⁵⁾⁶⁾）精製に適せず、結局 Karp 株のみを使用した。

孵化鶏卵培養： 恙虫病「リ」感染発症マウス肝、脾の10%生理的食塩水乳剤 0.3 ml を5~6日孵化鶏卵卵黄囊内に接種し、37°C 7日間培養し、以後数代孵化鶏卵に継代馴化せしめた後、「リ」感染卵黄囊を取出し、塗抹標本（Giemsa 染色）で「リ」の増殖の良好であることを確めた後精製に使用した。

精製： 実験成績の項に記述する。

電子顕微鏡撮影： この「リ」の存在を確めた精製材料をメッシュに載せ、その儘又はクロムシャドウイングを行つた後電子顕微鏡撮影を行つた。尚電子顕微鏡は日立製 Hu-6 型を使用した。

供試動物： 体重 15g~20g の成熟マウスを供した。

病毒接種方法： 恙虫病「リ」感染発症マウスの肝及び脾混合20%乳剤の 0.3 ml を健康マウスの腹腔内に接種し、6~7日後充分発症したマウスの腹水を Giemsa 染色しリケッチャの増殖の良好なこ

とを確めた後、肝、脾、腹膜、腹腔細胞に以下の処理を行った。

材料の固定から鏡検まで⁷⁾：

1) 肝臓及び脾臓 取出した後濾紙でその表面の水分を吸いとり、いずれも $1 \times 1 \times 1$ mm 以下の大きさに切り、1%オスミック酸磷酸緩衝液 (p. H 7.4) (以下オスミック酸) で氷室に於て2時間固定後形の如く水洗、脱水、包埋、を行った。

2) 腹腔細胞： オスミック酸を注射器に取りマウスの腹腔内に注入して腹腔液と混合した後、再び同じ注射器で吸引し腹水を採取した。採取した腹水はスピットグラスに移しオスミック酸を適当に加えて氷室内で2時間固定した後遠沈操作 (1000 r. p. m. 10分) で形の如く (細菌超薄切片標本作製⁸⁾⁹⁾ と同一方法) 水洗、脱水、包埋、を行った。

3) 腹膜： 腹膜にオスミック酸を注ぎ、腹膜が褐色を呈した時、ピンセット及び分離針を用いて腹膜の剝離を行い、更に氷室で2時間固定後、形の如く水洗、脱水、包埋を行った。

超薄切片作製から電子顕微鏡観察まで： ガラスナイフを作り Spencer の超マイクローム Ru 3 型に装置し、形の如く切片を作り、メッシュにのせ光学顕微鏡で撰択後、電子顕微鏡で観察した。

電子顕微鏡： 明石製電子顕微鏡 TRS—50 B 型及び日立製電子顕微鏡 Hu—6型を使用した。

光学顕微鏡標本：

1) 腹腔細胞： 粘稠な腹水をスライドグラスに塗抹し、乾燥、メタノール固定後、Giemsa 染色を行い鏡検した。

2) 超薄切片： 超薄切片用のブロックを 0.5μ の厚さに切り、醋酸アミルを使用する方法⁷⁾ により脱包埋し、Giemsa 染色を行い鏡検した。

実 験 成 績

第1部 恙虫病「リ」の精製及び その電子顕微鏡的観察

一般に病毒の精製は、その病毒の形態、構造、性状から更にワクチン製造等の諸問題を解決するに当つて最も基本的且つ重要な課題である。而してリケッチャがその大きさではウイルスよりかなり大きいものにも拘らず、その研究が長年遅々として進まなかつたのは一にその精製の困難さ⁶⁾ 及び形態の多様性¹⁾ にあつた。殊に恙虫病「リ」は非常に破壊されやすい³⁾¹⁰⁾ 為、その形態、生体内増殖機転等の研究が発疹チフス「リ」¹¹⁾¹²⁾ に比し可成り遅れていた。

近時 Bailey 等¹³⁾ 及び福住等¹⁰⁾ により恙虫病「リ」の精製方法が研究され、その電子顕微鏡の形態も明かにされ、更にそのワクチンとしての効果も多少期待される様になつて来ている。

著者は生体内に於ける恙虫病「リ」の感染増殖機転を電子顕微鏡的に研究する為の基礎として、福住等の方法に従つてその精製を試み更にその精製材料の電子顕微鏡的観察を行い以下の如き諸結果を得た。

第1節 恙虫病「リ」の精製

福住等の方法に従つて行つた。即ち塗抹染色により「リ」の増殖良好なることを確めた卵黄嚢を生理的食塩水で水洗し、濾紙で水分を除き、30% Sucrose 磷酸緩衝液 (p. H 7.6) を加えて10%乳剤とし、1%の割に中性ホルマリン及び0.15%の割に重クロム酸カリを添加し、10%メタノール加エーテルを乳剤の倍量添加、振盪し、 $3 \sim 5^{\circ}\text{C}$ の冷凍室に24時間放置後水層部を取り出し、6000 r. p. m. 1時間遠沈し、沈渣に再蒸溜水を適量加え、Giemsa 染色により「リ」の存在を確めた。尚この詳細に関しては福住等¹⁰⁾ 及び劉¹⁴⁾ の報告を参照されたい。

第2節 精製恙虫病「リ」の電子顕微鏡像

以上の如くして精製した「リ」を電子顕微鏡の数視野にわたつて注意深く観察撮影したが、精製「リ」の形態は従来染色標本光学顕微鏡像に関する諸報告と同様、可成り多様で長桿菌状、短桿菌状、球菌状、多形状、顆粒状等を呈していた。(写真1, 2) その形態間の割合は表1に示した如く桿菌状のものが過

表1 精製恙虫病リケッチャの形態

形態	長桿菌状	短桿菌状	球菌状	多形状	顆粒状
数	25	73	62	15	6
%	13.8	40.3	34.3	8.3	3.3

半数を占めていた。

又精製「リ」の大きさは長桿菌状のものは $1.0 \sim 2.0 \mu \times 0.4 \sim 0.7 \mu$ で平均 $1.3 \mu \times 0.5 \mu$ 、短桿菌状のものは $0.7 \sim 1.5 \mu \times 0.4 \sim 1.0 \mu$ で平均 $1.0 \mu \times 0.6 \mu$ 、球菌状のものは $0.3 \mu \sim 0.8 \times 0.3 \sim 0.8 \mu$ で平均 $0.6 \mu \times 0.6 \mu$ であつた。

次に電子密度に関しては、桿状乃至多形状を呈するものの過半数 (60.9%) は「リ」体の両端に於て電子密度が高く、所謂極染色の如き状態を示した。又球状のものはすべて電子密度が一様に高いことが認められた。又桿状のものの一部には、両端の電子密度の高い部分の一方がその電子密度を可成り低下

しているものも認められた。

又殆んどすべての精製「リ」体の周囲に、かなり幅の広い莢膜様のものの存在を認めた。然し Wissig 等¹⁶⁾ が報告している如き明瞭な限界膜の存在は確認されなかつた。

第2部 恙虫病「リ」感染発症マウス臓器及び組織の超薄切片電子顕微鏡像

「リ」は生細胞の存在しない人工培地には現在迄のところ全く生育し得ない。これが「リ」感染増殖等の機転の解明を今日まで全く不明の儘に止めおいた最大の理由であろう。そしてその微小であること、極めて破壊し易いこと等の為に切片標本に於ける検出が極めて困難であることも「リ」の感染増殖機転の解明を困難とした一因であろう。更に恙虫病「リ」は他の「リ」に比し一般にマウス、孵化鶏卵等に於ける感染増殖が弱く、又株によりその感受性に大なる差があるが⁵⁾⁶⁾、このことが本「リ」の形態、感染増殖等の機転の究明をより一層困難なるものとしている。一方「リ」より更に微小なウイルスに於ては、精製が「リ」よりも容易であることも一助となつて、近時超薄切片及び電子顕微鏡撮影等の諸技術の進歩により、その形態、感染増殖等の諸機転が逐時明かにされて来つつある^{16)~21)}。「リ」の分野に於てもこれらの諸技術の導入によりその形態は漸く明かにされて来ている¹¹⁾¹³⁾¹⁶⁾。然しその感染増殖等の機転はこれ等の最新の技術を駆使した種々の努力にも拘らず尚殆んど全く不明の儘である。

著者は超薄切片技術と電子顕微鏡とを応用して「リ」の中でもその研究が最も遅れている恙虫病「リ」の感染増殖の機転を一端だけでも明かにしたいと思ひ諸実験を行い以下の如き成績を得た。

第1節 腹腔細胞

1) 光学顕微鏡所見： 超薄切片電子顕微鏡写真判読の参考とする為、塗抹染色標本及び超薄切片用ブロックの脱包埋染色標本（実験方法の項参照）の光学顕微鏡的観察を行つた。「リ」発症マウスの腹腔液は衆知の如く極めて粘稠な糸を引く、この現象を強く認めるものの腸間膜の一部を切除し、それをスライドガラスに塗抹し、これをメタノールで固定後、Giemsa 染色を行つて鏡検すると、「リ」感染細胞の大部分（これは主として漿膜細胞と考えられる）に於て写真3にみる如く核の一侧を中心に細胞辺縁部近く迄「リ」の存在を認めた。又超薄切片用ブロックの脱包埋染色標本においても写真4、5に

見る如く同様の所見を認めた。この所見は牛田²²⁾も報告している如く、「リ」の細胞内存在位置の最も著しい特徴と考えられる。

2) 超薄切片電子顕微鏡像： 腹腔細胞の電子顕微鏡像に於ても光学顕微鏡に於けると同様の所見が得られ、更に光学顕微鏡像に加うる何物かが認められはしないかと考えて、その超薄切片を多数作製し（実験方法の項参照）、電子顕微鏡写真を撮影し詳細に観察した結果、次の如き知見を得た。

写真6及び7に於ては細胞の核は一方に偏在し、その反対側にその形、大きさ、電子密度、存在部位等から明かに「リ」と判定されるものをかなり多数に認める。又細胞質内に所謂 endoplasmic reticulum と思われるものの存在は猶多少認められるが、ミトコンドリアと思われるものの像は認められず、又数ヶ処に少々大きい空胞の形成を認めた。以上の所見より、これは寧ろ「リ」感染中期の像と考える。

写真8の切片は多少厚いが、細胞の辺縁部に島状の核像を認め（切断面の位置によりかかる核像を呈したものと考える）、その分散せる核陰影の内側（細胞の中心部）に多数の「リ」と思われる陰影を認める事が出来る。又この陰影は細胞の辺縁部にも少数ではあるが認められる。猶この細胞内には所謂細胞内オルガネラの鮮明な像は全く認められない。これも写真1及び2と同様「リ」感染中期の像と考えられる。

写真9及び10に於ては、核は矢張り細胞の一侧に偏在し、その周辺部より細胞辺縁部にわたつて可成り多数の「リ」の存在を認めることが出来る。又細胞内では所謂細胞内オルガネラの鮮明な構造は殆んど失われており、大きい空胞形成を認め、その空胞の辺縁には脂肪滴と思われる電子密度の高い小陰影が認められる。以上よりこの細胞は「リ」感染増殖の結果所謂空胞変性に陥つているものと考えられ、「リ」感染増殖の寧ろ後期に属するものと考えられる。

更に写真11に於ては細胞は著明な空胞変性に陥り、その一部は既に破壊されており、又核自体の電子密度も著明に低下し変性に陥つておる。この変性に陥つた細胞の僅かに残つた細胞質間に尚少数の「リ」の存在を認めることが出来る。即ちこれは「リ」感染増殖の為高度に変性した破壊直前の細胞であると考えられる。一方写真6の左方には高度に変性破壊し、ばらばらになつた細胞の遺残像をみるがそこには「リ」の存在は全く認められない。

以上の如く「リ」は感染増殖中期と思われるもの

に於て寧ろ多数認められ、後期と思われるものに於て減少していた。又塗抹染色標本に於て認めた細胞内に極めて多数の「リ」の密集した像は超薄切片電子顕微鏡像に於ては認められなかったが、これは「リ」感染細胞の一断面のみを切っている為と考えられる。

第2節 精製「リ」と腹腔細胞内「リ」の形態学的諸性状の比較

「リ」が細胞外に於ては極めて破壊しやすいものであることは従来知られている処であり、従つて「リ」を精製した場合、その方法が如何に秀れているとも、多少ともその形、大きさ、等に変化が来ていることは当然考えられる。このことは Wissig 等も発疹熱「リ」の研究に於て報告している¹⁵⁾。著者も以下、第1部に於て述べた精製恙虫病「リ」と第2部第2節に於て述べた腹腔細胞内「リ」(この腹腔細胞内のものが最も確実に「リ」と同定される故)とをその形態学的諸性状に関して比較検討した。

1. 形・ 腹腔細胞内の「リ」は、それが切片標本である為、その形を正確にしかも統計的に把握することは不可能であるが、精製「リ」に於て認められたと同様、長桿菌形、短桿菌形、球菌形等のものが認められ、その形に関しては精製「リ」のものと略々同様であつた。

2. 大きさ 又大きさに関しては、超薄切片に於てはそれが切断面を示していることから考えて「リ」の長さを正確に測定することは、不可能であるが、その幅は長さに比してより正確に現われやすいと考えられる。従つて腹腔細胞内「リ」の幅を慎重に測定し、精製「リ」のものと比較すると表2の

表2 精製リケツチャと腹腔細胞超薄切片内リケツチャの大きさの比較

	最 小		最 大		平 均	
	長さ μ	幅 μ	長さ μ	幅 μ	長さ μ	幅 μ
精製リケツチャ	0.3	0.3	2.0	1.0	1.0	0.6
腹腔細胞超薄切片内リケツチャ	0.2	0.2	0.9	0.5	0.5	0.3

如くなる。表の結果からみると細胞内「リ」の大きさはその幅に於て略々 0.3μ であり、精製「リ」の平均 0.6μ の約 $1/2$ である。

3. 莢膜様物質： 精製「リ」に於ては「リ」体の周囲に莢膜様物質を明らかに認めることが出来たが、細胞内「リ」にはこれと考えられるものは全く認められなかった。又 Wissig 等¹⁵⁾ が潰瘍性発疹熱

「リ」に於て認めた限界膜の如きものも全く認められなかった。

4. 内部構造： 精製「リ」殊に桿状のものの過半数に於ては所謂極染色標本にみる如き電子密度の高い部分とその間をつなぐ低い部分を認めた。細胞内「リ」では、その少数のものに於て、極染色に似た構造が認められた(写真10)が、大多数のものは一様に電子密度の高い無構造乃至多少顆粒状の構造を呈していた。又 Wissig 等¹⁵⁾ が細胞内発疹熱「リ」に於て認めた transverse fission を思わせる如き像は見られなかった。

第3節 肝臓、脾臓及び腹膜

肝臓及び脾臓は恙虫病「リ」のマウスに於ける継代に際してホモジネートとして使用される主臓器である。即ちこれらの臓器に「リ」は最もよく感染増殖していることが考えられる。従つて恙虫病「リ」感染発症マウスのこれらの臓器は、この「リ」の感染及び増殖の機転を追究してゆくのに最も自然且つ適当なものであると考えられる。然し緒方¹⁾も述べている如く、一般に切片標本に於て「リ」を染色検出することは極めて困難であるとされており、その原因としては一つには従来のパラフィン切片の厚さが関係し、又一方その臓器固定乃至貯蔵時の著明な組織細胞の収縮等があげられている。

著者はオスミック酸固定の優秀性、上手に切られた超薄切片が「リ」の大きさよりも遙かに薄いこと、電子顕微鏡の高い分解能等より、これらの方法をもつてすれば臓器内「リ」の検出から更に感染増殖機転の追究迄も可能となるのではないかと考えて、恙虫病「リ」感染マウス肝臓、脾臓及び腹膜の超薄切片を作り(方法は実験方法の項に記述)電子顕微鏡で観察した。

1. 肝臓： 写真12は正常マウス肝の超薄切片電子顕微鏡写真であり、核には二層構造のみられる核膜及び核小体を認め、又細胞質には多数のミトコンドリア及び所謂 endoplasmic reticulum を明瞭に観察することが出来る。

写真13~15は恙虫病「リ」感染発症マウス肝の超薄切片電子顕微鏡像である。写真13の中央稍左下部に核に隣接して電子密度、大きさ、形等から考えて「リ」ではなかろうかと推定されるものの密集像をみる。但しその輪廓は腹腔細胞に認められたものに比し多少不明瞭である。又核の左側上及び下部に大空胞様のもの(但し普通の空胞とは異り、極く微細な顆粒構造がみられる)を認め、その間の細胞質の

処々に尚ミトコンドリアを認めるが、その数は正常細胞のものに比し可成り減少し、又鮮明な endoplasmic reticulum の像は認められず細胞は空胞変性に陥っていることが考えられる。写真14の左側の細胞に於ても一方に屈在する核及び核に隣接して写真13にみられたと同様の巨大な空胞様のものを認め、核及び空胞の周辺にミトコンドリアとは区別される「リ」に類似したものを指摘することが出来る。又この写真の右側には多数の小空胞、及び電子密度の極めて高い、不定形の胆汁と思われるもの、更にその間に猶多数のミトコンドリアを有する、所謂小空胞性変性に陥った細胞像をみる。この型の細胞変性像はかなり多く観察された。

更に写真15に於ては核の左上方に周囲との可成り明瞭な境界をもつた電子密度の高い粒子の集団が認められ、その中に一応「リ」に類似したものも認められるが、その不均等な形態、電子密度、大きさ等から、これらは寧ろ細胞の変性により生じた脂肪滴乃至顆粒ではなからうかと考える。尚処々にミトコンドリア及び endoplasmic reticulum も認められる。

2. 脾臓： 写真16は正常マウス脾臓の超薄切片電子顕微鏡像であり、二重構造のみられる核膜をもつた核及び多数のミトコンドリア及び endoplasmic reticulum を認めることが出来る。写真17は恙虫病「リ」感染マウス脾臓のものであるが、少々左寄りに核様部及びそれを取りまく電子密度の極めて高い顆粒の集団を認める。これはその形、大きさ、電子密度等より「リ」とは明かに異なるものであり、細胞質から一塊となつて明瞭に区別されている点、又この部は脱包埋ギムザ染色標本に於て紅色に染つて来る点等から、健全な部分を尚残した核濃縮に陥っている核像ではないかと考える。この像は恙虫病「リ」感染発症マウス脾の超薄切片に於て可成り多数認められた。

3. 腹膜： マウスに於ける恙虫病「リ」の継代は通常腹腔内接種により行われ、感染発症とともに「リ」をもつた腹腔細胞（牛田²²⁾によればこれは主として漿膜細胞である）が粘稠な腹水とともに遊離して来ることは本「リ」に特有な衆知の事実である。従つて「リ」の腹腔内接種により腹膜が何らかの変化をうけることは当然予想されるところである。この予想の下に著者は恙虫病「リ」感染発症マウスの腹膜の超薄切片を作製し、電子顕微鏡像を観察した。写真18, 19は恙虫病「リ」感染発症マウスの腹膜

及びその附着した腹壁筋内の超薄切片電子顕微鏡像である。其処には「リ」様のものを多数認めるが、これは正常マウス腹筋電子顕微鏡像にも認められ、又その一部のものには、不鮮明ではあるが、ミトコンドリアの所謂 cristae 様の構造が観察される。これらの所見、及び Fawcett 等²³⁾の正常心筋超薄切片電子顕微鏡写真の所見等を併せ考えて、これらのものは「リ」ではなく、ミトコンドリアであると考えが、今後の研究の参考の為に一応呈示しておく。

総括及び考按

恙虫病「リ」が極めて多様な形態を示すことは幾多の研究者がその光学顕微鏡像より、又福住等¹⁰⁾がその電子顕微鏡像について報告して来ているところである。そしてこの多形性及び染色性の変動¹⁾²⁴⁾がこの「リ」の大きな特徴であるとともにその発見乃至同定等を極めて困難なものとして来た。

著者の得た電子顕微鏡像に於ても長桿菌形、短桿菌形、球菌形、多形、顆粒状等種々の形のものを認めたが、その間の比率は牛田²²⁾が恙虫病「リ」感染マウスの腹腔内漿膜細胞内恙虫病「リ」の形態につき光学顕微鏡的に観察し報告している諸形態間の比率にかなり近く、組織球内のものについて報告しているものよりも桿状のものの割合が非常に高い。又牛田は漿膜細胞内への「リ」の出現は「リ」の侵入増殖によるものであり、組織球内のものはその貪食作用により取り入れられたもので侵入増殖によつたものではなからうかと推論している。著者が恙虫病「リ」感染卵黄嚢より福住等の方法により精製した「リ」の諸形態間の比率が漿膜細胞内「リ」のそれに近いということは、この方法により精製した「リ」の形態乃至諸形態間の比率が、正常な増殖機転を取っている「リ」のそれ乃至それに近いものを示していると考えられる。

次に恙虫病「リ」の大きさに関して緒方は恙虫病「リ」は多形ではあるが平均 $0.3\mu\sim 0.5\mu$ 程度の大きさであると、又牛田²²⁾も染色標本の観察結果から恙虫病「リ」感染マウスの腹腔漿膜細胞内「リ」の大きさは $0.3\mu\sim 0.5\mu\times 0.2\mu\sim 0.4\mu$ 程度であると報告している。一方佐藤²⁴⁾は恙虫病「リ」には時に球菌形 1.5μ 位、双球菌形 2μ 位、 $3\sim 7$ 個の連鎖乃至連珠形 $2\mu\sim 4\mu$ 位等の著明な変形体が極めて少数ではあるが発見されるとも報告している。一方 Wissig 等¹⁵⁾は発疹熱「リ」を Wisseman 等²⁵⁾の方法により精製し（著者の方法とは、

エーテルを使用せず, Celite 処理, Trypsin 消化等を行う点で異なる), その大きさを卵黄嚢組織超薄切片に観察されるものと比較測定し, 精製「リ」は組織内「リ」に比し約2倍程度大であつたと報告している。

著者が福住, 劉等¹⁰⁾¹⁴⁾の方法に従つて精製した恙虫病「リ」の大きさは平均長桿菌形 $1.3\mu \times 0.6\mu$, 短桿菌 $1.0\mu \times 0.6\mu$, 球菌形 $0.6\mu \times 0.6\mu$ で, これは福住, 劉等の得た結果と大体同程度であつた。一方腹腔細胞内のものの幅は平均 0.3μ であり, これは染色標本光学顕微鏡像から得た従来の諸報告の結果と略々一致している。従つて従来の諸報告の結果と著者の得た結果を種々比較考察するならば「佐藤の報告した大きい変形体はその数が極く少数であること, 及び細菌との異同に関する検討が行われていないことから, これは一応無視する), 恙虫病「リ」の普通の大きさは大体 $0.3\mu \times 0.3\mu$ から $0.3\mu \times 0.6\mu$ 前後と考えられる。そして精製「リ」がこのような大きく観察される理由としては, その固定方法が異なること, 精製時の分割遠沈により小型の「リ」が失われてる可能性があること, 精製時の諸操作乃至条件により「リ」が膨化すること, 又精製「リ」をホルンバール膜上に載せ乾燥する際「リ」が扁平化すること等が挙げられるであろう。

一方「リ」の感染増殖の機転に就いては従来種々説えられて来たがそれは飽く迄憶測に過ぎなかつた。即ち Wissig 等¹⁵⁾は発疹熱「リ」を孵化鶏卵に接種し, その卵黄嚢超薄切片電子顕微鏡像より横断分裂により増殖するのであろうと推定し, 牛田²²⁾もその腹腔漿膜細胞内恙虫病「リ」の状態を光学顕微鏡的に観察し, 「リ」がウイルスと異り, 分裂増殖するのではなからうかと推論している。

著者の本研究の初の目的は恙虫病「リ」感染マウス諸臓器組織の超薄切片を作製し, その電子顕微鏡像を観察することにより, この「リ」の細胞内感染増殖機転の一端を明かにすることにあつた。そして幾多の切片を作製し, 電子顕微鏡写真を撮影したのであるが, 実験成績の項に記述した如く「リ」と同定し得る像を得たのは腹腔細胞に於てのみであり, 他の臓器組織に於ては明かに「リ」と推定し得るものの像を得ることは困難であつた。然し一応或程度知見は得られたのでこれについて従来の諸報告と比較検討しつつ考察したい。

牛田²²⁾は恙虫病「リ」感染発症マウスの腹腔細胞の染色標本を光学顕微鏡で観察し, 「リ」の感染

増殖する主な細胞は漿膜細胞であり, これに於ては, 「リ」は核の辺縁部に定着増殖し, その存在形式は恰も「リ」が分裂増殖を行つた如くであり, 又漿膜細胞内の「リ」は佐藤²⁴⁾の所謂 Hyals-chromomer 型であり核の辺縁部を中心に集団状に存在し, 組織球内のものは所謂 chlomomer 型であり, その存在部位も細胞内に分散し一定しないと報告している。著者の得た腹腔細胞超薄切片電子顕微鏡像に於て, その細胞を漿膜細胞或は組織球の何れと判別することは困難であつたが, 「リ」は一般に核から細胞辺縁部に広がつて存在し, 必ずしも核周辺部に局限して存在するとは限らなかつた。然し核周辺部に存在しないで, 細胞辺縁部にのみ存在するというものは殆んど見られなかつた。従つて「リ」は核周辺部を中心に増殖するという従来の見方は超薄切片観察の場合にも当てはまるものと考えられる。又従来報告されているような, そして又精製「リ」に見られたような所謂極染色様の構造を腹腔細胞超薄切片内「リ」の一部のものに於て認めた。従つて細胞内に於ても一部の「リ」は斯かる構造をもつており, それが「リ」の増殖と何等かの関係をもつのではなからうかとも考えられるが, 明言することは出来ない。又従来報告されている, 横断分裂を暗示する如き所見⁴⁾⁶⁾は認められなかつた。

又「リ」が英膜を有することは従来報告されており¹⁾¹²⁾, 又著者の調製した精製「リ」に於ても英膜様粘液層の存在が明かに認められた。然し細胞内「リ」にはかかるものの存在は全く認められなかつた。近時ウイルスの研究に於てもかかる事実が屢々報告されている。即ち細胞質内の家鶏痘ウイルスは一層の膜を有しているが, 細胞外のは二層の膜を有すること²⁶⁾等がそれである。恙虫病「リ」に於て精製したものには英膜粘液層が認められたのにそれが細胞内「リ」に認められなかつた理由としては, 細胞内「リ」は細胞の原形質と何等かの形で結合しており(これは「リ」の精製殊に細胞質成分との分離¹⁰⁾¹³⁾¹⁴⁾²⁵⁾がミトコンドリアの分離²⁷⁾よりも更に困難であることから考えられるところである), 「リ」の分離に当り, 細胞質成分が周囲に附着して来ること, 又精製に際してアルコール・エーテルを使用した為に「リ」体表面物質に変化を来したこと等が考えられる。然しこれらの中の何れであるかを決定することは現在不可能である。

又この英膜様物質が, Plotz 等¹¹⁾が発疹チフス, ロッキー山紅斑熱, Q熱の, 又 Wissig 等¹⁵⁾が発

疹熱の夫々の精製「リ」に認めた限界膜と同一のものであるか否かも現在不明であるが、Wissig 等もこの精製「リ」に認められた限界膜は、細胞内「リ」には認められなかったと報告している。以上何れにもせよ、細胞外に遊離した「リ」と細胞内「リ」とが少なくともその表面構造に於て可成り異なることは明かである。

一方「リ」の多数認められる細胞は寧ろ変性が低く、空胞変性の高度な細胞に於ては寧ろ「リ」の数が少いという現象が認められたが、これは「リ」が発育の盛んな細胞に好んで感染増殖し、その細胞の変性ととともに多少ともその表面に細胞質の一部をつけて「リ」体の破壊を保護した形で細胞外に遊離し、次の新鮮細胞に入つてゆくという感染増殖過程を取るのではないかと考えられる。

一方肝臓に於ては腹腔細胞にみられたものと多少そのニュアンスを異にするが、その大きさ、存在部位、電子密度等より考えて「リ」とも考えられるものの集団を時に認めることがあつた。このものが本当の「リ」か、或は未成熟の所謂プレリケッチャとも云うべきものか否か、或は更に肝臓超薄切片に於て時々見られた電子密度の高い小顆粒の集団との関係、更に「リ」様小体を認める肝細胞に於ては大空胞様のものの存在を認めたが、これが恙虫病「リ」の感染と如何なる関係にあるか等については尚今後の研究を待たねばならない。

又、脾臓に於ても肝臓に於て認めたと同様の小顆粒の集団を認めることがあつたが、脾臓の切片に於ては肝臓のものに比し「リ」乃至「リ」に擬すべきものの発見は更に困難であつた。

更に「リ」の接種部位が腹腔であること、又腹腔細胞内に「リ」を認めたこと等より考えて、腹膜乃至腹壁内に「リ」の存在が予想され、又、事実「リ」様のものの存在を認めた。然しその大きさ、電子密度、輪廓等から、又正常のものにも同様のものを認めたこと、更に Fawcett 等²³⁾の報告をも併せ考えると、これらのものは「リ」ではなく——「リ」の存在を全面的に否定することは出来ないが——寧ろミトコンドリアであると考えられ、この点は尚今後の研究を要する処である。

以上の如く、著者の初期の狙いであつた恙虫病「リ」の感染増殖機転の解明という点に関しては資するところが少いうらみがある。然し、恙虫病「リ」の精製されたものと細胞内のものとの間の形態学的差異が可成り明かにされたこと、又恙虫病「リ」感

染時の肝臓、脾臓等の電子顕微鏡的所見が多少とも明かにされたこと等は今後の「リ」の研究に資するところがあろうと考える。

結 論

恙虫病リケッチャを精製し、それを電子顕微鏡的に観察し、又恙虫病「リ」感染マウスの諸臓器組織の超薄切片を電子顕微鏡的に観察し以下の如き知見を得た。

1. 精製「リ」は多様な形態を示した外、桿菌形のもの過半数を占めていた。一方腹腔細胞超薄切片内に認められた「リ」の形態も多様であつた。

2. 精製「リ」の大きさは、長桿菌形のもので平均 $1.3\mu \times 0.6\mu$ 、短桿菌形のもので平均 $1.0\mu \times 0.6\mu$ 、球菌形のもので平均 $0.6\mu \times 0.6\mu$ であつた。一方腹腔細胞超薄切片内に認められた「リ」の幅の平均は約 0.3μ であり、精製「リ」の約 $1/2$ の大きさであつた。

3. 精製「リ」体の周囲に可成り幅の広い莢膜様物質の存在を認めたが、腹腔細胞超薄切片内のものには、かかる物質は全く認められなかった。

4. 精製「リ」体の電子密度は可成り高く、又桿菌形のもの過半数に於てはその両端の電子密度が特に高く、所謂極染色の如き状態がみられた。一方腹腔細胞超薄切片内に認められる「リ」では、その少数のものに於ては極染色の如き構造がみられたが、大多数のものでは一様に電子密度が高い無構造、或は多少顆粒状の構造を呈していた。

5. 諸臓器組織超薄切片電子顕微鏡像の中、「リ」の存在が明かに認められたのは腹腔細胞に於てのみであつた。肝臓及び脾臓殊に肝臓に於ては「リ」に極めて類似したものの存在を認めたが、その同定は困難であつた。

終りに臨み終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師村上栄教授に深甚なる謝意を表し、又実験に際し種々御助言と御援助を戴いた俵助教授、矢部博士、更に技術面に於て御協力下さつた教室の松下氏、電子顕微鏡室の黒田、林両氏に心より感謝致します。

参 考 文 献

- 1) 緒方 : Rickettsia, 医学書院, 1951.
- 2) 緒方 : 東京医事新誌, 70, 595, 1953.
- 3) 田宮等 : Virus, 6, 248, 1956.
- 4) Wolbach, S. B. : J. M. Research, 41, 1, 1919—20.
- 5) Lewthwaite, R. : O'Connor, J. L. & Williams, S. E. : Med. J. Austral., 2, 37, 1946.
- 6) 桑田 : Virus, 3, 167, 1953.
- 7) 電子顕微鏡学会関東支部編 : 超薄切片技術, 本田書店, 1953.
- 8) 東 : 科学, 22, 480, 1952.
- 9) 菅 : 岡山医学会雑誌, 印刷中.
- 10) 福住, 大和田, 劉, 熊野 : 東京医事新誌, 73, 579, 1956.
- 11) Plotz, H. : Smadel, J. E. : Anderson, T. E. & Chambers, L. A. : J. J. Exper. Med., 77, 355, 1943.
- 12) Shepard, C. C. & Wyckoff, R. W. G. : Pub. Health Rep., 61, 761, 1946.
- 13) Bailey, C. : Diercks, F. H. & Profitt, J. E. : J. Immunol., 60, 431, 1948.
- 14) 劉 : Virus, 6, 318, 1956.
- 15) Wissig, S. L., Caro, L. G., Jackson, E. B. & Smadel, J. E. : Am. J. Path., 32, 1117, 1956.
- 16) 寺田, 深井編 : 微生物電子顕微鏡写真集, 1, 1952.
- 17) 土肥 : Virus, 6, 369, 1956.
- 18) 水口 : Virus, 7, 1, 1957.
- 19) 和田 : Virus, 7, 9, 1957.
- 20) 和田 : Virus, 7, 169, 1957.
- 21) 第四回ウイルス増殖シンポジウム : Virus, 7, 342, 1957.
- 22) 牛田 : 岡山医学会雑誌, 70, 173, 1958.
- 23) Fawcett, D. W. & Selby, C. C. : J. Biophys. Biochem. Cytol., 4, 63, 1958.
- 24) 佐藤 : 日本医師会雑誌, 31, 634, 1954.
- 25) Wissman, C. L., Jr., Jackson, E. B., Hahn, F. E., Ley, A. C., Smadel, J. E. : J. Immunol., 67, 123, 1951.
- 26) Morgan, C., Ellison, S. A., Rose, H. M. & Moore, D. H. : J. Exper. Med., 100, 301, 1954.
- 27) 江上, 石本, 丸尾, 三浦, 関根, 須田, 田宮編 : 標準生化学実験, 文光堂 (1953), 384.

Electron Microscopic observation on Rickettsia tsutsugamushi

By

Koichiro Niguma

Department of Microbiology, Okayama University medical school

(Director; Prof. Dr. Sakae Murakami)

The author tried purification of Rickettsia tsutsugamushi, and electron microscopic observation of the purified rickettsiae, and also studied electron microscopic figures of the ultra-thin sections of the mouse organs and tissues infected with Rickettsia tsutsugamushi. The results are summarized as follow:

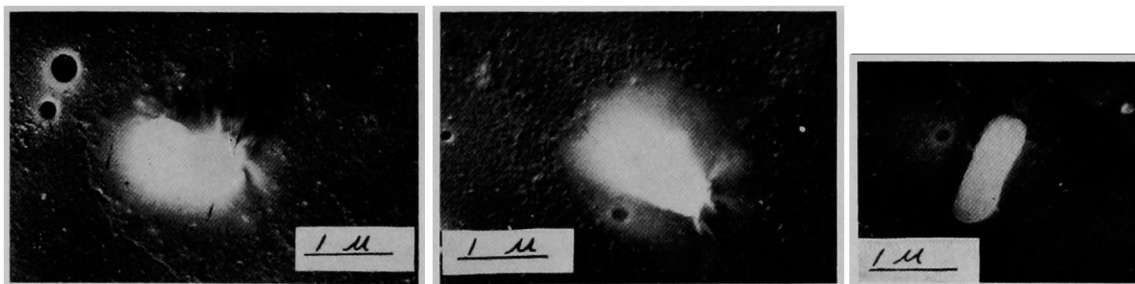
1) Both of the rickettsiae purified and observed in the ultra-thin sections of the abdominal exudate cells were of various figures. The size of purified rickettsiae is 0.6 to 1.0 μ , and that of those in abdominal cells is 0.3 to 0.5 μ on the average.

2) A capsul-like substance could be observed around the purified rickettsiae, but the presence of such substance could not be proved around the ones in abdominal cells.

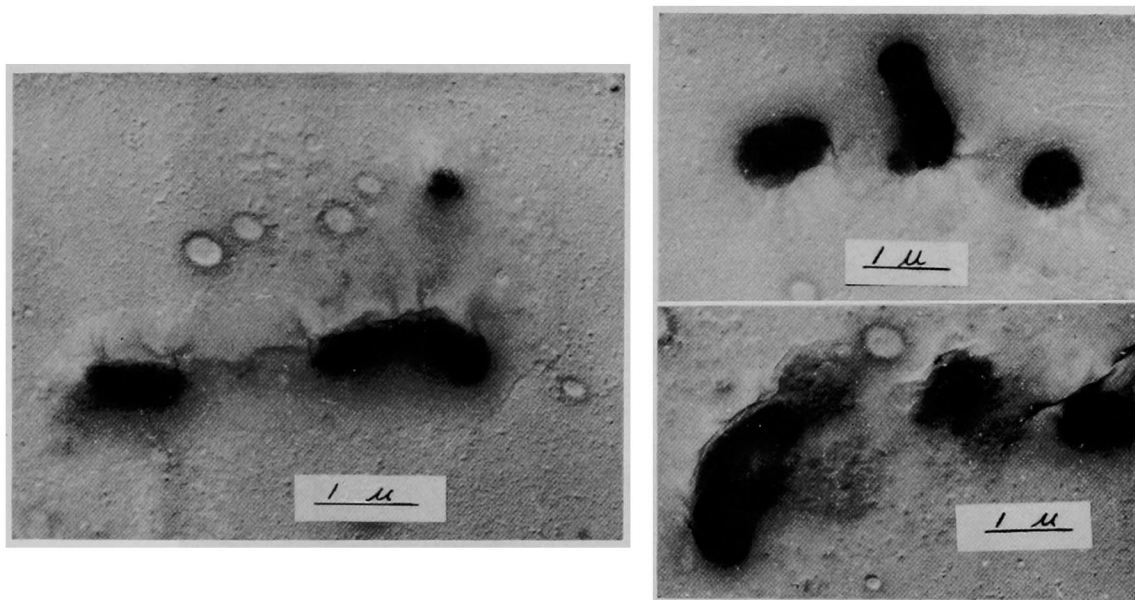
3) In more than a half of the rod-shaped purified rickettsiae, the so-called polar-staining-like structure could be observed of those in abdominal cells, some has the polar-staining like structure, but most of them were of no or somewhat granular structure.

4) In ultra-thin sections of abdominal cells, the presence of rickettsiae could be clearly observed. In the liver and spleen particularly in the liver, the rickettsialike structures could be also observed, but the identification needs further studies,

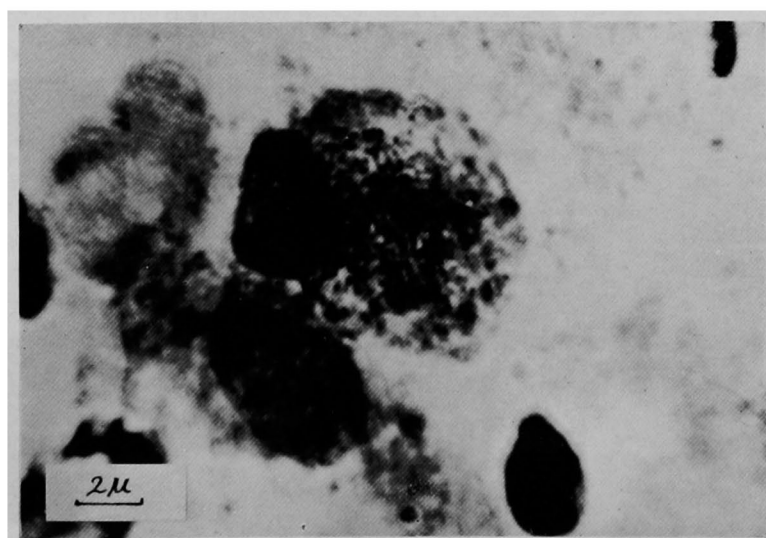
仁 熊 論 文 附 図



写 真 1 精製恙虫病「リ」電子顕微鏡像，クロム・シャドウイング。

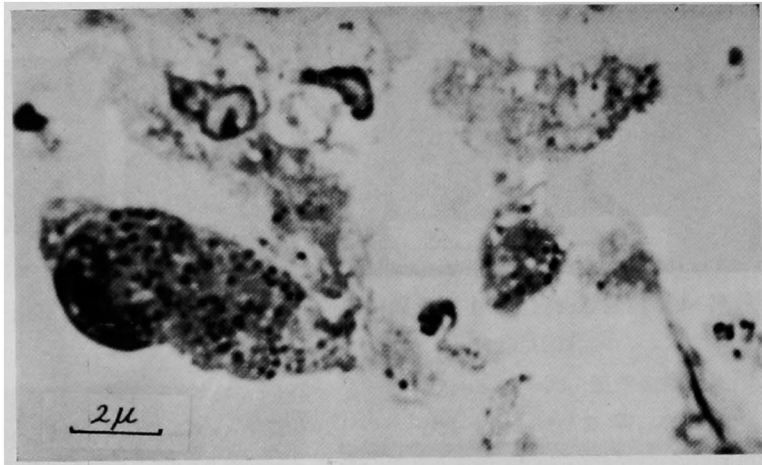


写 真 2 精製恙虫病「リ」電子顕微鏡像，シャドウイングなし。



写 真 3 恙虫病「リ」感染マウス腹腔細胞塗抹標本
光学顕微鏡像，ギムザ染色。

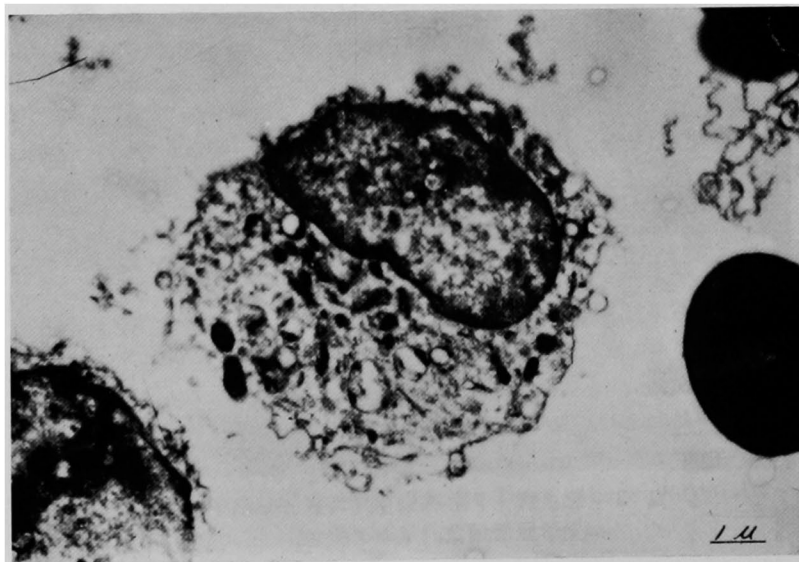
仁 熊 論 文 附 図



写 真 4 恙虫病「リ」感染マウス腹腔細胞超薄切片
脱包埋標本光学顕微鏡像，ギムザ染色



写 真 5 恙虫病「リ」感染マウス腹腔細胞超薄切片
脱包埋標本光学顕微鏡像，ギムザ染色。



写 真 6 恙虫病「リ」感染マウス腹腔細胞超薄切片電子顕微鏡像、

仁熊論文附図

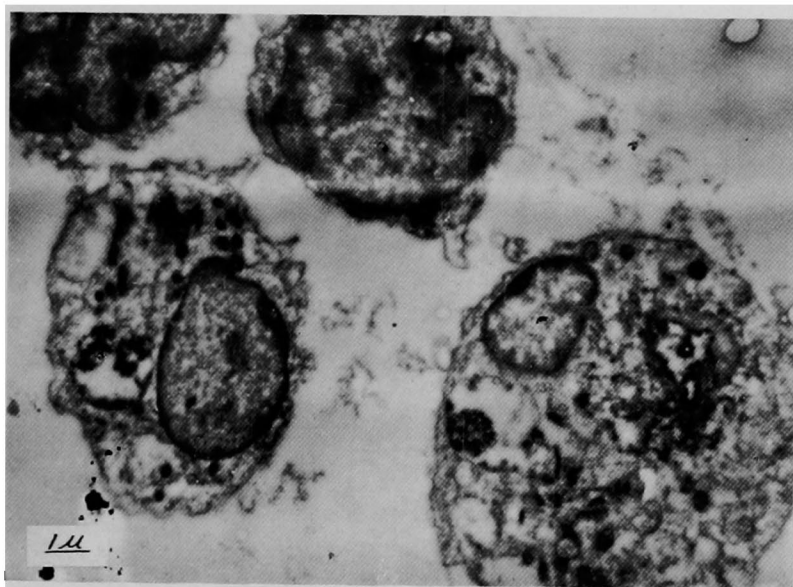


写真 7 恙虫病「リ」感染マウス腹腔細胞超薄切片電子顕微鏡像。

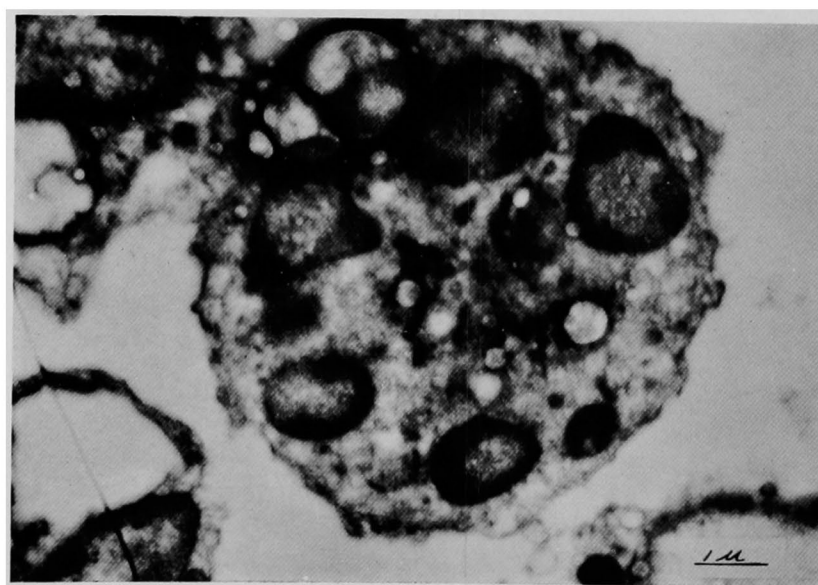
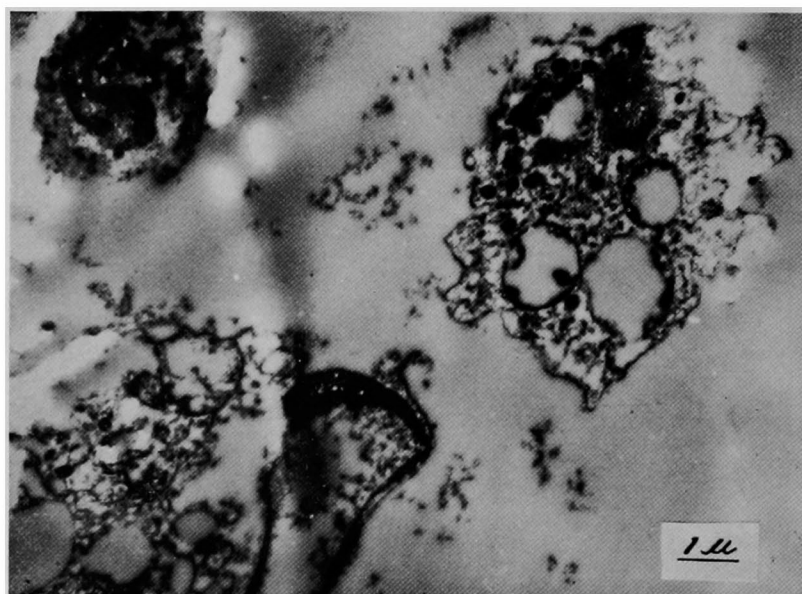


写真 8 恙虫病「リ」感染マウス腹腔細胞超薄切片電子顕微鏡像。

仁 熊 論 文 附 図



写 真 9　恙虫病「リ」感染マウス腹腔細胞超薄切片電子顕微鏡像。

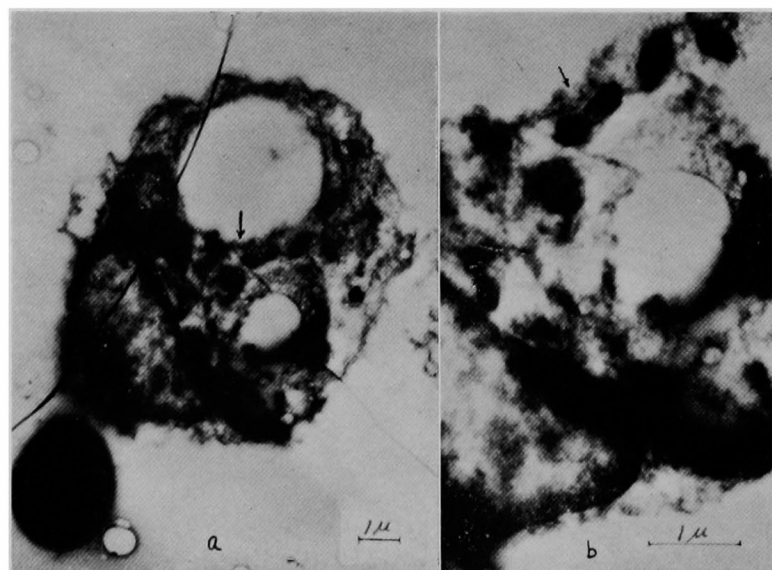


写真10　恙虫病「リ」感染マウス腹腔細胞超薄切片電子顕微鏡像。
b は a の→部の拡大写真，極染色様のものをみる。

仁 熊 論 文 附 図

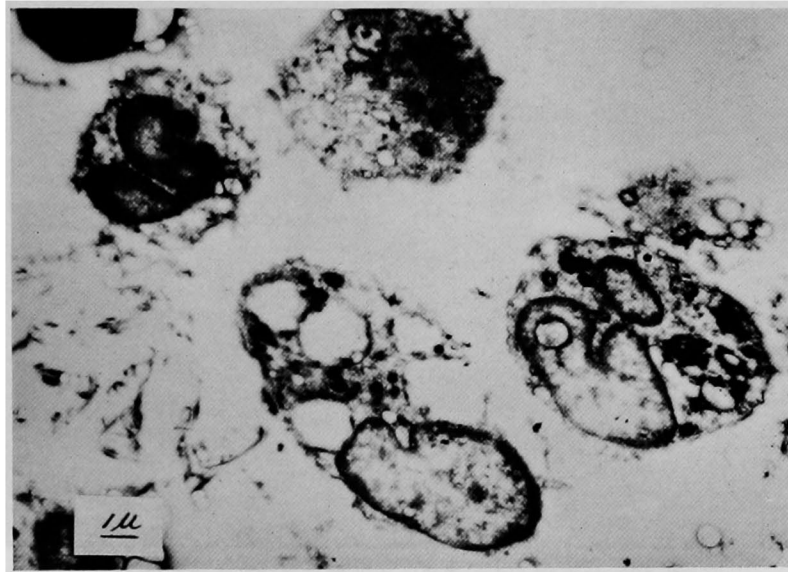


写真 11 恙虫病「リ」感染マウス腹腔細胞超薄切片電子顕微鏡像。

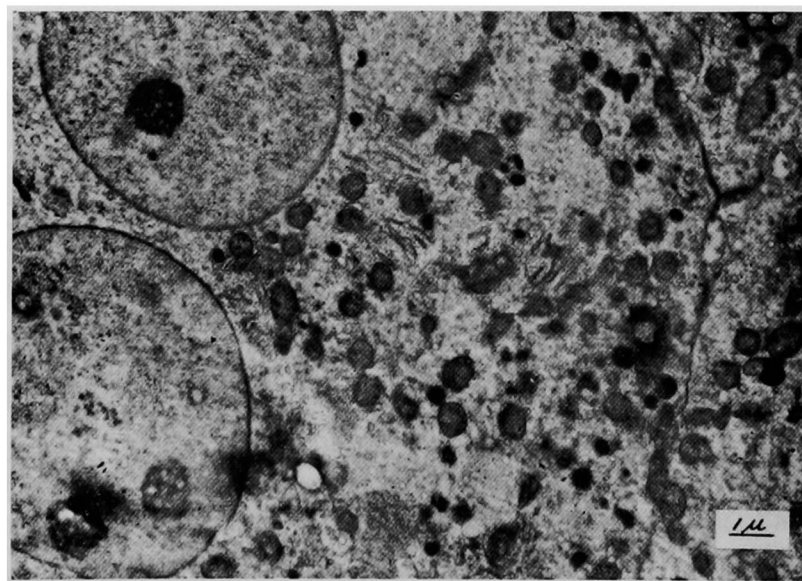
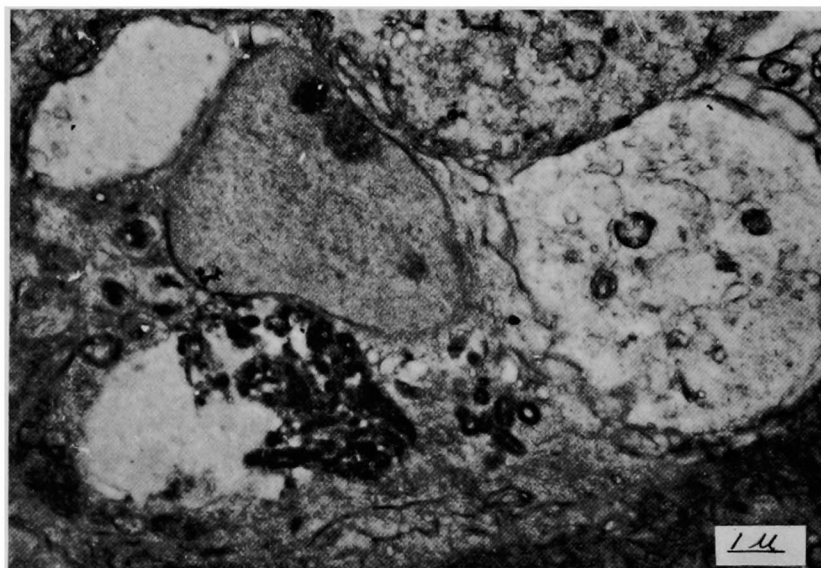
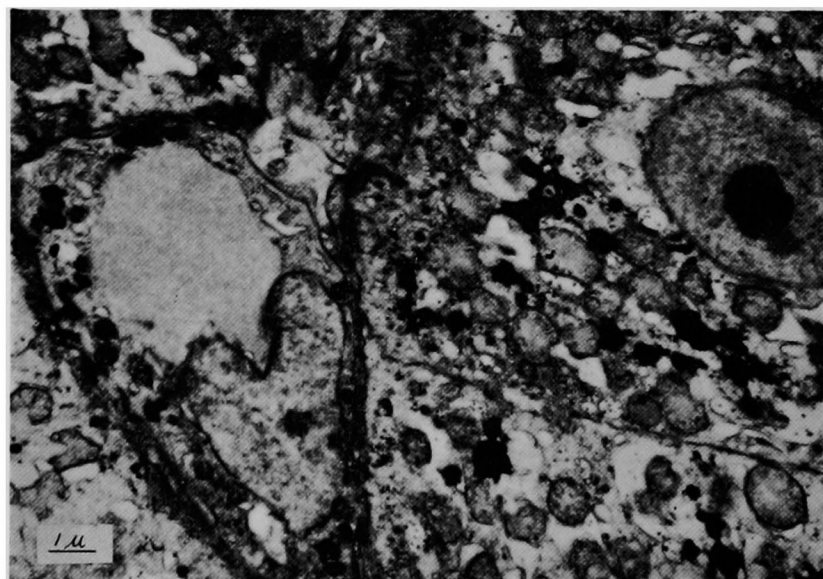


写真 12 正常マウス肝超薄切片電子顕微鏡像。

仁 熊 論 文 附 図

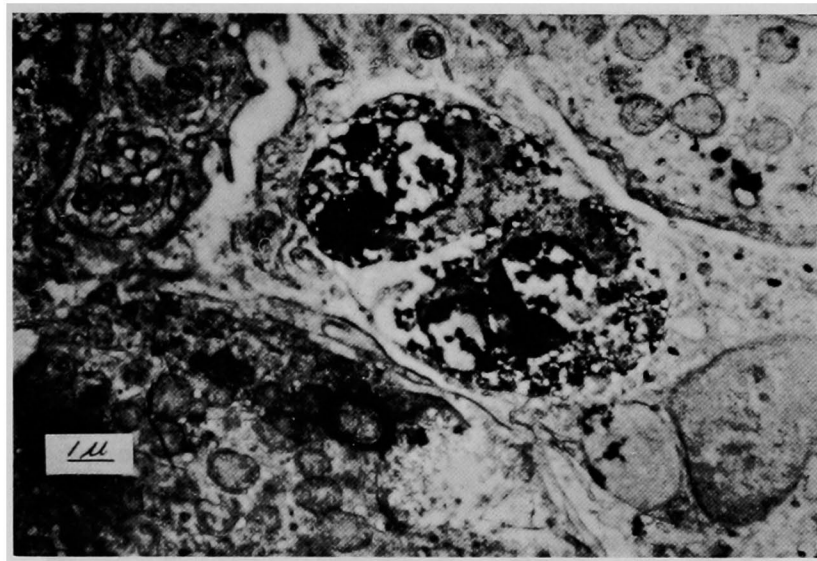


写 真 13 恙虫病「リ」感染マウス肝超薄切片電子顕微鏡像。

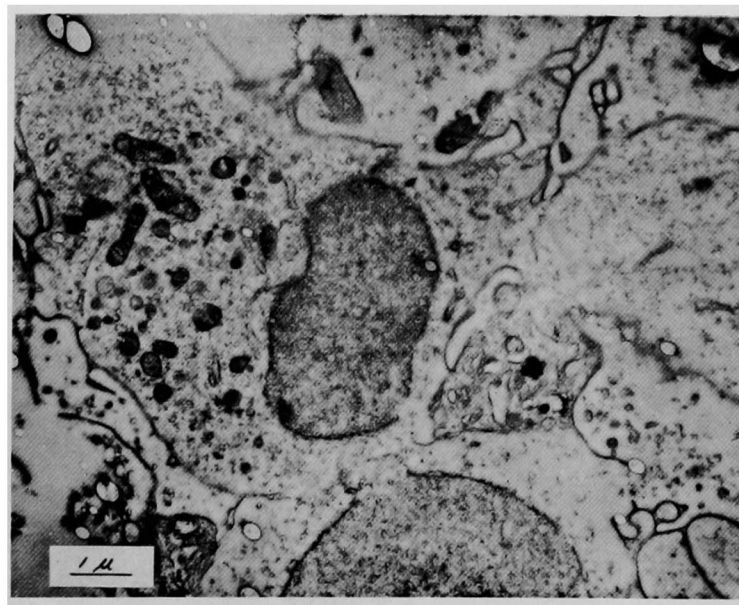


写 真 14 恙虫病「リ」感染マウス肝超薄切片電子顕微鏡像。

仁 熊 論 文 附 図



写 真 15 恙虫病「リ」感染マウス肝超薄切片電子顕微鏡像。

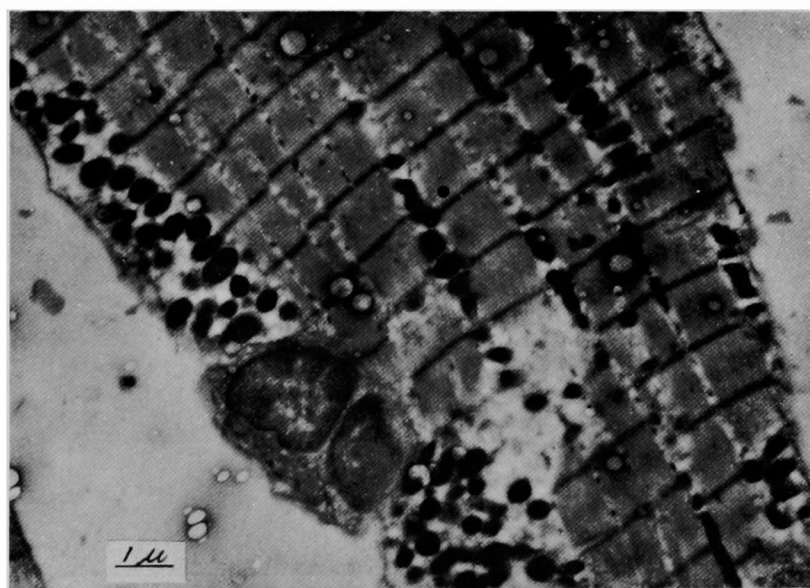


写 真 16 正常マウス脾超薄切片電子顕微鏡像。

仁 熊 論 文 附 図

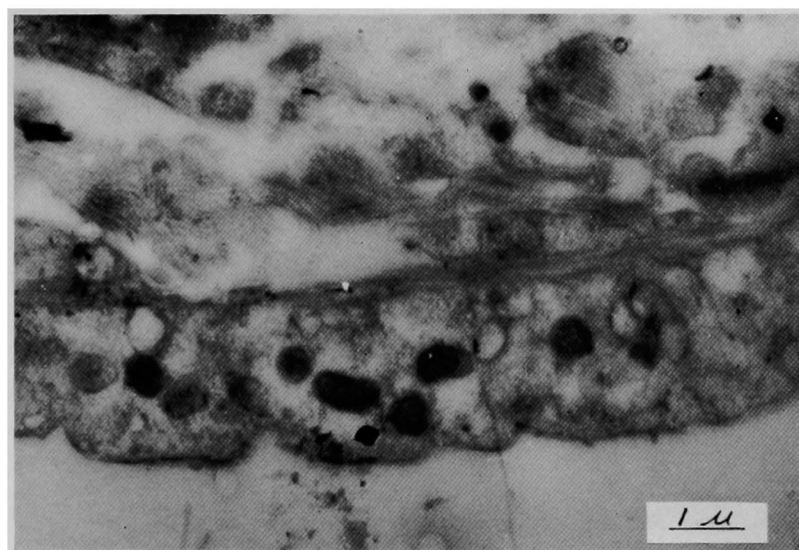


写 真 17 恙虫病「リ」感染マウス脾超薄切片電子顕微鏡像。



写 真 18 恙虫病「リ」感染マウス腹壁超薄切片電子顕微鏡像。

仁 熊 論 文 附 図



写 真 19 恙虫病「リ」感染マウス腹壁超薄切片電子顕微鏡像。