

## R. tsutsugamushi の中和試験に関する研究

## 第 2 編

## R. tsutsugamushi の中和試験の術式に関する検討

岡山大学医学部微生物学教室（主任：村上 栄教授）

難波富三郎

〔昭和 32 年 11 月 20 日受稿〕

## 緒 言

著者<sup>1)</sup>は既に第 1 編に於て、R. tsutsugamushi（以下 R. t. と略記す）の中和試験に於ける、諸因子の及ぼす影響について、検討を行い、病毒側、免疫血清、外的条件の三方面より、実験を試み、中和試験に及ぼす諸因子の影響により、その中和効果に大きな差違が生ずる場合のあることを実験的に明にした。

R. t. の中和試験については、既に多数の研究者により、R. t. の同定及び抗原分析等に応用されている事は、周知のことであるが、中和試験に限局して論議されている。換言すれば R. t. の中和試験に関する疑問はない訳ではない。

就中 Fox (1949)<sup>2)</sup> の中和試験についての論述、更に我国の川村 (1953)<sup>3)</sup> の見解は注目すべき報告と信じられ、R. t. の中和試験に対する注意を喚起した点でも興味深いものである。

既に R. t. の免疫学的研究は、Bengtson<sup>4)</sup>、Fox<sup>2)</sup>、Smadel<sup>5)</sup> 等により補体結合反応、中和試験、感染防禦試験が用いられて、夫々論議されながら、R. t. の各 strain の抗原性が、多少とも異り、他の Virus に於ける是等の免疫学的研究に於ける程に、確実な成果が挙つてない。

中和試験に於ても一応 R. t. の同定とか、抗原分析等に応用されながら、未だ疑問視されているのも、R. t. の特異的な性状と共に、抗原性の各 strain による多岐性に帰せられよ

う。

著者は第 1 編に於て、中和試験に及ぼす諸条件若くは諸因子の影響を、詳細に追究した結果、R. t. の中和試験についての疑問を、多少とも解決し得たと信じられる所見を得たので、更に進んで中和試験の術式に関する研究を行い、興味ある所見を得たので、茲にその大要を報告する次第である。

## 実験材料及び方法

供試病毒：実験に用いた R. t. は香川県下に発生した馬宿病患者より同僚軒原<sup>6)</sup>により分離された三谷株、同僚丸岡<sup>7)</sup>により同病発生地の野鼠より分離された鼠系 XII 株と共にマウスにより累代中のものである。実験当時の LD<sub>50</sub> は  $10^{-5.5} \sim 10^{-6.2}$  程度を示していた。別に Karp 株を対照として使用した。

感染及び累代：以上の各 R. t. をマウスを用いて累代した。R. t. 接種マウスは一般に 7 ～ 12 日で一様に発症斃死するため、次代接種には肝、脾乳剤を用いて行い、累代に際しては塗抹標本により R. t. の存在を確めた後累代した。

中和試験： 中和試験の術式は陸軍軍医学校法に倣つた。即ち R. t. 罹患マウス 3 ～ 5 匹の肝、脾を集め、pool し秤量後、P.G.S. (Snyder)<sup>8)</sup> を用い 10 倍に稀釀し、Homogenizer により均等なる乳剤を作製、2,000 r. p. m. 10 min. 遠心して上清を得、倍数稀釀を行い、予め準備した家兎血清を、稀釀せず同量宛混合し、マウスの腹腔内に接種し、3 週間以上

観察を行い、LD<sub>50</sub>を求め、必要に応じて対照血清との差即ち中和指数を求めて判読した。マウスに接種する際は、各稀釀混和液を氷中に保ち、接種は迅速に行うことによめた。

著者の実験では、R. t. 肝、脾乳剤と抗血清との接觸時間を重視するため、接種は、接觸直後、接觸後室温1時間、24時間、48時間氷室保存とに分つて、予め調製した混和液を用いた。又人間血清、海猿血清の添加の際は、新鮮血清を、2倍稀釀血清として稀釀に用いた。

Absättigungsversuch (Wildföhr) : Wildföhr, G. (1953)<sup>9</sup>に依り実施した。即ち R. t. 抗血清を予めマウスの体内に 0.25 ml 宛 30 min. おきに皮下接種し、4時間後腹腔内に 0.25 ml 宛 R. t. 稀釀乳剤を接種攻撃を行い、中和試験と同様に LD<sub>50</sub>を求め、対照側の中和指数より差を算定した。

### 実験成績

#### 1) 中和試験の検討

R. t. の中和試験に於ける主として術式に関する検討を行つた。実験には三谷株、鼠系 XII 株及び Karp 株を用いた。是等の諸 R. t. について先づ同種血清に対する中和試験を行つた。

即ち是等の中和試験の術式は、従前の方法<sup>1)</sup>により、R. t. 乳剤と抗血清の接觸時間は室温1時間とし、室温は概ね 15°C であつた。

その成績では、R. t. の三株とも同種血清により、充分に中和効果を發揮し、三谷株では中和指数 1.2~2.6、鼠系 XII 株では 1.0~1.6、Karp 株では 2.5~3.2 で表示され、抗血清としては、有意な中和抗体を証明し得た（第1表）。

次に三谷株を用い、諸種の抗血清に対する

第1表 R. t. の同種血清に対する中和試験

R. t. (Strain)	R. t. の 稀 釀							LD <sub>50</sub>	中和指数	
	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>			
三 谷 株	5/5	5/5	5/5	2/5	1/5	0/5	0/5	5.1	6.3	1.2
	4/5	3/5	4/5	3/5	1/5	0/5	0/5	4.5	7.1	2.6
鼠 系 XII 株	5/5	4/5	3/5	3/5	1/5	0/5	0/5	4.7	6.3	1.6
	5/5	5/5	3/5	3/5	1/5	0/5	0/5	4.9	5.9	1.0
Karp 株	5/5	3/5	4/5	2/5	1/5	0/5	0/5	4.5	7.4	2.5
	3/5	4/5	2/5	3/5	0/5	0/5	0/5	3.9	7.1	3.2

註. i) 血清は同種血清を用いた。

ii) 表中 5/5 の表示は死亡マウス数/使用マウスを示す。

第2表 各種免疫血清に対する R. t. の中和試験

免 疫 血 清	R. t. の 稀 釀							LD <sub>50</sub>	中和指数	
	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>			
感 染 免 疫 血 清	5/5	2/5	4/5	2/5	1/5	0/5	0/5	4.3	5.3	1.0
	5/5	3/5	2/5	3/5	3/5	0/5	0/5	4.7	5.7	1.0
免 疫 血 清 (Bell et al.)	3/5	4/5	2/5	2/5	2/5	1/5	0/5	4.3	5.9	1.6
	5/5	2/5	4/5	2/5	1/5	0/5	0/5	4.3	5.7	1.4
免 疫 血 清	4/5	2/5	2/5	3/5	1/5	0/5	0/5	3.9	6.1	2.2
	5/5	2/5	4/5	2/5	0/5	0/5	0/5	4.1	5.9	1.8

註. i) 三谷株。

中和試験を行つた成績では、調製方法を異にして得られた抗血清の種類により、中和指数の上に多少の差が見られるが、感染免疫血清に 1.0、免疫血清 (Bell et al.) に 1.4~1.6、免疫血清に 1.8~2.2 と、いづれも表示されることは、有意な結果と判断された。と同時に再三 R. t. を接種することにより得られた免疫血清が、最も優れた中和効果を發揮していることが注目された (第 2 表)。

尚之等の実験成績に見られる中和現象にあつては、かつて Fox<sup>2)</sup> により指摘された “zonphenomenon” の現象も、R. t. 特異の中和効果も認められず、R. t. の稀釀に従つて、マウスの斃死数は減少し、中和現象は明かに観察されている。即ち種々な濃度の抗血清が中和する R. t. の量は血清濃度に比例することが窺われた。

著者は第 1 編に於て、R. t. の中和試験は、外部条件として室温、内部因子としては病毒側、免疫血清等の諸項が、中和試験に大きな影響を与えることが指摘されたが、本実験に於ては、斯る条項を充分に顧慮し、実験を試みたことは勿論である。

是等の中和試験に於て、その術式上比較的等間に附されているに拘わらず、重要な意味をもつと考えられる次の諸項について、詳細に実験を行つた。

### 1) R. t. 乳剤と抗血清の接觸時間

従来の中和試験では、R. t. とその抗血清

との接觸時間は、室温に 1 時間放置しおき、マウス可及的迅速に接種を行うのであるが、著者は該方法と、両者の接觸時間を直後、1 時間、更に 4°C 氷室内に 24 時間、48 時間と接觸せしめ、充分に抗原と抗体との結合を計り、後にマウスに接種を行つた。

中和試験に於ては、勿論抗原と抗体の結合が、充分、且正確であることが要求されるから、乳剤内に含まれる R. t. の減弱若くは死滅がない限り、可成り長時間作用させた場合の中和実験が興味をもたれる訳である。

先づ R. t. 乳剤と抗血清とを各稀釀に於て、混和接觸せしめた時と、接觸後室温に 1 時間放置した場合を見るに、各種の抗血清によつて、多少中和効果に差はあるが、接觸直後のものと、室温 1 時間の放置後に接種したものでは、明に後者の中和が優れている。

即ち感染免疫血清では、その中和指数 1.4~2.0、免疫血清 (Bell et al.) 1.2~2.6、免疫血清 1.4~1.6 であり、夫々の接觸直後の時と比較し、よく抗原と抗体との結合が行われていることを示している。

尚之等の実験に於ては、抗血清は稀釀しないものを使用した、稀釀した場合は 1:2, 1:5 の夫々の稀釀血清に従つて、ある程度の中和の成立があることが窺われるとしても、中和効果は著しく低下することは Fox の実験にも詳しいが、著者の実験でも明かに認められた。又免疫血清の側より見れば、それぞれ

第 3 表 接觸時間を考慮した中和試験 (1)

血 清	血清の稀釀	接觸時間	R. t. の稀釀								LD <sub>50</sub>	中和指数
			10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>			
健康血清	稀釀せず	0	5/5	5/5	4/5	4/5	3/5	2/5	0/5	6.1	0	
		1	5/5	3/5	4/5	2/5	2/5	1/5	0/5	5.7	0.4	
感染免疫血清	稀釀せず	0	5/5	5/5	3/5	4/5	1/5	1/5	0/5	5.3	0.8	
		1	5/5	3/5	4/5	2/5	2/5	0/5	0/5	4.7	1.4	
	1:2	0	5/5	3/5	3/5	4/5	3/5	1/5	0/5	5.1	1.0	
		1	5/5	4/5	2/5	4/5	1/5	1/5	0/5	4.7	1.4	
	1:5	0	5/5	2/5	4/5	4/5	3/5	1/5	0/5	5.3	0.8	
		1	4/5	3/5	2/5	2/5	2/5	0/5	0/5	4.1	2.0	

第4表 接触時間を考慮した中和試験 (2)

血清	血清の稀釀	接觸時間	R. t. の稀釀							LD <sub>50</sub>	中和指数
			10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>		
健康血清	稀釀せず	0	5/5	5/5	5/5	4/5	3/5	2/5	0/5	6.3	0
		1	5/5	5/5	4/5	5/5	3/5	1/5	0/5	6.1	0.2
免疫血清 (Bell et al.)	稀釀せず	0	4/4	3/5	2/4	2/6	2/5	1/5	0/5	4.5	1.8
		1	3/5	5/5	3/4	0/4	0/4	0/5	0/5	3.7	2.6
1:2		0	5/5	5/5	4/5	2/5	0/5	2/5	0/5	5.1	1.2
		1	4/4	2/5	4/5	4/5	0/5	0/5	0/5	4.5	1.8
1:5		0	5/5	5/5	3/4	3/5	2/5	1/5	0/5	5.3	0.8
		1	5/5	4/5	3/5	3/4	1/4	1/4	0/5	4.9	1.2

第5表 接触時間を考慮した中和試験 (3)

血清	血清の稀釀	接觸時間	R. t. の稀釀							LD <sub>50</sub>	中和指数
			10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>		
健康血清	稀釀せず	0	5/5	2/5	4/5	4/5	2/5	2/5	0/5	5.3	0
		1	5/5	5/5	3/5	4/5	2/5	1/5	0/5	5.5	-0.2
免疫血清	稀釀せず	0	5/5	5/5	3/5	4/5	2/5	1/5	0/5	5.5	-0.2
		1	5/5	2/5	3/5	2/5	1/5	0/5	0/5	4.1	1.4
1:2		0	5/5	3/5	3/5	4/5	1/5	1/5	0/5	4.9	0.6
		1	4/5	3/5	3/5	1/5	1/5	0/5	0/5	3.9	1.6
1:5		0	5/5	4/5	4/5	2/5	3/5	1/5	0/5	5.3	0.2
		1	3/5	4/5	2/5	2/5	1/5	0/5	0/5	3.9	1.6

程度の差はあるが、一様に中和抗体は認められるが、中和指数の上からの判断では、免疫血清が最も優れていて、感染免疫血清が多少とも、劣っていることは明かである（第3、4、5表）。

更にR. t. と抗血清との接觸時間を漸次延長し、夫々の混合液を24、48時間氷室に保存しあき、充分に接觸を行わしめた場合の中和効果について観察を行つた。斯る長時間の接觸では、当然R. t. の側において、保存によるR. t. の減弱若くは減弱があり、抗血清の側においても、稀釀が行われる訳で、両者の接觸が充分になると共に、又他方悪条件も加わる結果となることが考えられる。

即ち感染免疫血清では、R. t. と抗血清の夫々の混液合の、試験管内保存により、次第に感染価は低下するが、中和効果が認められる

ことは明かであり、R. t. の各稀釀と抗血清との混和により、充分な両者の結合が行われたと推定する限界は断言し得ないとしても、之等の結合には可成りの時間的の幅があることが推測された（第6表）。

次に免疫血清（Bell et al.）でも、同様な傾向がある。即ちR. t. 各稀釀と抗血清との混和により、R. t. の減弱若くは減毒、更に抗血清の稀釀等の点を考慮した上で判断しても、中和の進行は窺い得るのである。

只、此の際、中和として表現されている数値に対し何の程度に、R. t. の減弱が反映しているかということが不明であつて、総てを中和効果と判定するのは妥当でない事は明である。

マウスの生死により、中和効果が判定される本実験では、諸種の条件の加わらぬ特に病

第 6 表 接触時間を延長した中和試験の比較 (1)

血 清	血清の稀釈	接觸時間	R. t. の 稀釈							LD <sub>50</sub>	中和指数
			10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>		
健康血清	稀釈行わず	0	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	2/5	0/5	6.5	0
		1	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5	1/5	0/5	6.1	0.4
		24	5/5	5/5	5/5	5/5	1/5	0/5	0/5	5.7	0.8
		48	5/5	5/5	4/5	1/5	2/5	0/5	0/5	4.9	0.6
感染免疫血清	稀釈行わず	0	5/5	5/5	5/5	3/5	4/5	1/5	0/5	6.1	0.4
		1	5/5	5/5	5/5	2/5	1/5	0/5	0/5	5.1	1.4
		24	5/5	5/5	5/5	1/5	1/5	0/5	0/5	4.9	1.6
		48	5/5	5/5	4/5	1/5	1/5	0/5	0/5	4.7	1.8

毒の減弱の著明でないと考えられる、室温に比較的妥当な安定性があるものと判定せざる1時間放置後接種の中和抗体価を探ることが、を得ない(第7表)。

第 7 表 接触時間を延長した中和試験 (2)

血 清	血清の稀釈	接觸時間	R. t. の 稀釈							LD <sub>50</sub>	中和指数
			10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>		
健康血清		0	5/5	5/5	5/5	3/5	3/5	2/5	0/5	6.1	0
		1	5/5	5/5	5/5	3/5	2/5	1/5	0/5	5.7	0.4
		24	5/5	5/5	5/5	2/5	2/5	0/5	0/5	5.3	0.8
		48	5/5	5/5	2/5	2/5	1/5	0/5	0/5	4.5	1.6
免疫血清 (Bell et al.)		0	5/5	5/5	3/5	4/5	2/5	1/5	0/5	5.5	0.6
		1	4/5	4/5	3/5	2/5	1/5	0/5	0/5	4.3	1.8
		24	4/5	3/5	2/5	2/5	1/5	0/5	0/5	4.7	1.4
		48	2/5	4/5	4/5	2/5	0/5	0/5	0/5	3.7	2.4

更に免疫血清について行つた同様な実験でも、類似した結果が得られた。即ち対照血清と比較して、免疫血清に於ては、その感染価は低く、従つて中和指数は1.4~2.4で表示さ

れているが、中和効果が必ずしも、R. t. と抗血清との接觸時間に平行した関係が認められないことは明白である(第8表)。

以上調製要領を異にして得た各種抗血清を

第 8 表 接触時間を延長した中和試験 (3)

血 清	血清の稀釈	接觸時間	R. t. の 稀釈							LD <sub>50</sub>	中和指数
			10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>		
健康血清	稀釈行わず	0	5/5	5/5	4/5	4/5	2/5	2/5	0/5	5.9	0
		1	5/5	5/5	5/5	3/5	1/5	0/5	0/5	5.3	0.6
		24	5/5	5/5	3/5	4/5	1/5	0/5	0/5	5.1	0.8
		48	5/5	4/5	4/5	3/5	2/5	1/5	0/5	5.3	0.6
免疫血清	稀釈行わず	0	5/5	1/5	4/5	4/5	3/5	1/5	0/5	4.1	1.8
		1	2/5	2/5	4/5	1/5	1/5	0/5	0/5	3.5	2.4
		24	2/5	4/5	4/5	4/5	1/5	0/5	0/5	4.5	1.4
		48	2/5	2/5	2/5	4/5	0/5	0/5	0/5	3.5	2.4

用いて、R. t. と抗血清との接触を充分に顧慮して、実験を行つた場合、中和効果が如何に見られるの検討を行つた成績では、R. t. が細胞内に位置し、而も抗血清中の抗体に捕捉される時間を要するであろうとの推測も、他のウイルスの場合と同様に、予想に反してかなりの短時間で結合が行われることが考えられる成績を得た。

前述の中和試験に際し人血清若くは、新鮮な海猿血清を添加した場合の影響を窺う目的から、中和血清に夫々新鮮な人及び海猿血清を加えて1時間放置し、抗血清の R. t. に対する中和効果を検討した。

著者の実験では、本実験に於ける R. t. の

稀釀等には總て P. G. S. を用いたが、血清類を添加した実験との比較では、中和指数に於て大差は認めない。即ち P. G. S. は 1.8~2.6 と示され、血清類では 1.0~2.0 であつて少くとも中和に対する影響はあまりないと推定された。

本実験で只興味ある点は、人血清若くは海猿血清を添加した場合、マウスの生死が極めて異常であり、 $10^{-2}$ ~ $10^{-3}$  に於ける時よりも  $10^{-4}$ ~ $10^{-6}$  に於てよくマウスの斃死が認められている事実があり、Fox の述べた “zone phenomenon” にやや類似した現象と観察された（第9表）。

他の実験では認められなかつた点より、

第9表 血清類添加による中和試験 (1)

血清	稀釀液	接觸時間	R. t. の稀釀							LD <sub>50</sub>	中和指数
			10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>		
健康血清	P. G. S.	1	5/5	4/5	5/5	4/5	4/4	2/5	0/5	6.3	0
		24	5/5	5/5	3/5	4/5	2/5	2/5	0/5	5.7	0.6
		48	5/5	5/5	5/5	3/5	3/4	2/4	0/5	6.1	0.2
感染免疫	P. G. S.	1	5/5	2/5	4/5	3/4	0/5	0/5	0/5	4.3	2.0
		24	5/5	5/5	2/5	2/5	1/5	0/5	0/5	4.5	1.8
		48	5/5	2/5	4/5	2/5	0/5	0/5	0/5	3.7	2.6
血清	海猿	1	2/4	3/5	3/4	3/5	4/5	0/5	0/5	4.5	1.8
		24	3/5	2/5	4/5	4/5	2/5	0/5	0/5	4.5	1.8
		48	5/5	2/5	4/5	3/5	3/5	0/5	0/5	4.9	1.4
	健康人	1	2/5	1/5	4/5	4/5	2/5	1/5	0/5	4.3	2.0
		24	3/5	3/5	4/5	4/5	4/4	4/4	0/5	5.1	1.2
		48	2/5	1/5	4/5	3/5	4/5	2/5	0/5	4.7	1.6
	血清	1	2/5	1/5	4/5	4/5	4/4	4/4	0/5	4.3	2.0
		24	3/5	3/5	4/5	4/5	4/4	4/4	0/5	5.1	1.2
		48	2/5	1/5	4/5	3/5	4/5	2/5	0/5	4.7	1.6

R. t. の特異性とは認め難いものと思惟された（第10表）。

## 2) Absättigungsversuch の応用

流行性肝炎の研究に際し Wildfuhr G. (1950)<sup>9</sup> は、その型別試験に用いる目的から “Absättigungsversuch” を考案し、肝炎病毒の型別を分けた。本法は従来の中和試験と異り、病毒と抗血清を試験管内で接觸することなく、直接抗血清を動物体内に注射し、飽和の状態に至らしめて、後病毐を用いて攻撃し、中和を判断する一種の中和試験に外ならない。

Wildfuhr の原法は、極めて簡単であるが、

その儘では応用し得られぬ点が少くないので、著者の用いた中和試験の方法に倣つて、その術式と断定要領を改変した。

実験成績の上では、R. t. を用いた場合では、用いた各種血清共に、中和指数は -0.2 ~-0.8 を示して、中和効果は毫も認められず、有意な結果が得られなかつた。引続き抗血清の注射部位を変更するとか、抗血清の量的関係をも考慮した実験を試みたが、中和指数 1.0 以上に達した例はなく、実験は失敗に終つた。

この実験により、R. t. の中和試験では、

第 10 表 血清類添加による中和試験 (2)

血清	稀釀液	接觸時間	R. t. の稀釀							LD <sub>50</sub>	中和指数
			10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>		
健康血清	P. G. S.	1	5/5	5/5	5/5	3/5	4/5	1/5	0/5	6.1	0
		24	5/5	5/5	4/5	4/5	2/4	2/4	0/5	5.9	0.2
		48	5/5	5/5	2/5	5/5	4/5	0/5	0/5	5.7	0.4
免疫血清	P. G. S.	1	5/5	3/5	3/5	1/5	1/5	0/5	0/5	4.1	2.0
		24	5/5	2/5	4/5	2/5	0/5	0/5	0/5	4.1	2.0
		48	5/5	2/5	2/5	0/5	1/5	1/5	0/5	3.7	2.4
	海 猿 血 清	1	3/5	1/5	3/5	4/5	2/5	0/4	0/4	4.1	2.0
		24	5/5	2/5	4/4	3/4	2/5	1/5	0/5	4.9	1.2
		48	3/5	3/5	2/5	5/5	3/5	0/5	0/5	4.7	1.4
	健康人 血 清	1	5/5	3/5	4/5	3/5	2/5	1/5	0/5	5.1	1.0
		24	5/5	2/5	3/4	4/4	3/5	0/5	0/5	4.9	1.2
		48	5/5	1/5	4/5	3/5	1/5	1/5	0/5	5.0	1.1

第 11 表 Absättigungsversuch

血清	血清量	経過時間	R. t. 攻撃量	R. t. の稀釀							LD <sub>50</sub>	中和指数
				10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>		
健康血清	S. C 0.5ml	4 時間	ip 0.25ml	5/5	5/5	5/5	2/5	4/5	1/5	0/5	5.9	0
				5/5	5/5	4/5	3/5	2/5	1/5	0/5	5.5	0.4
感染免疫血清	S. C 0.25×2	"	ip 0.25ml	5/5	4/5	4/5	3/5	3/5	0/5	0/5	5.3	0.6
				5/5	5/5	2/5	4/5	4/5	1/5	0/5	5.7	0.2
				5/5	5/5	4/5	2/5	3/5	1/5	0/5	5.5	0.4
免疫血清 (Bell et al.)	S. C 0.25×2	"	ip 0.25ml	5/5	5/5	3/5	4/5	4/5	2/5	0/5	6.1	-0.2
				5/5	5/5	5/5	3/5	3/5	2/5	0/5	6.1	-0.2
				5/5	5/5	4/5	4/5	3/5	2/5	0/5	6.1	-0.2
免疫血清	S. C 0.25×2	"	ip 0.25ml	5/5	3/5	5/5	3/5	4/5	1/5	0/5	5.7	0.2
				5/5	4/5	4/5	2/5	2/5	1/5	0/5	5.1	0.8
				5/5	4/5	4/5	2/5	1/5	2/5	0/5	5.1	0.8

第 12 表 Absättigungsversuch

血清	血清量	経過時間	R. t. 攻撃量	R. t. の稀釀							LD <sub>50</sub>	中和指数
				10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>		
健康血清	ip 0.5ml	4 時間	ip 0.25ml	5/5	4/5	5/5	3/5	5/2	2/5	0/5	6.3	0
				5/5	5/5	5/5	4/5	2/5	1/5	0/5	5.9	0.4
感染免疫血清	ip 0.25×2	4 時間	ip 0.25ml	5/5	5/5	4/5	4/5	3/5	1/5	0/5	5.9	0.4
				5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	2/5	0/5	6.5	-0.2
				5/5	5/5	4/5	4/5	3/5	2/5	0/5	6.5	-0.2
免疫血清 (Bell et al.)	ip 0.25×3	4 時間	ip 0.25ml	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5	1/5	0/5	6.1	0.2
				5/5	5/5	4/5	4/5	5/5	2/5	0/5	6.5	-0.2
				5/5	5/5	4/5	4/5	1/5	2/5	0/5	6.1	0.2
免疫血清	ip 0.25×3	4 時間	ip 0.25ml	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5	1/5	0/5	6.1	0.2

R. t. と抗血清の接触は試験管内での接触を必要とし、而も抗原と抗体との結合が生体内では、少くとも R. t. に於ては行われ難いことを意味するものである（第12表）。

### 総括及び考按

R. t. の中和試験は既に、補体結合反応、感染防禦試験と共に、免疫学的研究に用いられ、R. t. の同定及び抗原分析等に応用されていることは、周知の事実である。

而しながら、R. t. の中和試験が、ウイルスの場合に比し、確実な結果を得難い<sup>3)</sup>ことが知られている。

元来 R. t. の間には、生物学的或は免疫学的性状に於て、一様でなく、極めて複雑な多岐性を示すことは、既に指摘されている所である<sup>5)10)11)</sup>。

香川県下に発生した馬宿病の病原として分離された R. t. の株の間にあつても、可成りの性状の差異が窺われることは軒原<sup>6)</sup>の報告に詳しい。

著者は既に第1編に於て、中和試験に及ぼす各種の影響をあげ、検討を行つて來たが、更に R. t. の中和試験の術式に於て、殊に重要な点と考えられる。R. t. と抗血清との接触即ち抗原と抗体との結合についての吟味を行い、より一層中和効果が、従来の中和試験よりも、効果的に発揮され、而も真の中和抗体価が得られるかについて、諸種の条件を検討した。

その実験では、R. t. と抗血清の試験管内に於ける接触時間を、従来の法よりも更に延長して行い、他に R. t. と抗血清の接触を生体内で行う “Absättigungsversuch” を応用して検討した。

前者の場合は、R. t. と抗血清の接触を充分に行い、両者の結合を助長する意味より、接触直後、1時間、24時間、48時間と種々の条件のもとに、R. t. 各稀釀液と抗血清の混合液を放置し、マウスに接種し、動物の生死により中和指数を比較判断した。その結果、両者の接触時間の漸次延長するに伴い、中和

現象は一応認められるとしても、次第に R. t. の毒性の減弱があることが指摘され、真の中和効果と判定することが危険であることも考えられるに至つた。この場合は寧ろ R. t. と抗血清の接触は、R. t. の毒性の低下を來さぬ程度の短時間の接触で充分であり、しかも安全であると認められた。

尚理論的には、動物体内中和試験と考えられる、 “Absättigungsversuch” の成績では、殆んど中和効果は認められなかつた。

又、R. t. と抗血清に人血清若くは海猿血清を添加して、中和試験を実施して見たが、中和を助長するとも、抑制するとも断定し難い結果であつた。

以上の実験から、R. t. と抗血清を混和接触せしめた場合、その結合は、可成り短時間内に行われるものと理解される。更に “Absättigungsversuch” では、R. t. と抗血清との接触不十分により、R. t. は抗体に捕捉されるよりも、感受性細胞に定着するが多く、中和効果が発揮されぬものと解釈された。

要するに、R. t. の中和試験に於ては、R. t. の感染力を低下せしめない限界で、R. t. とその抗血清との接触を計り、両者の結合を充分に行うことにより、真の中和抗体価を判断し得るものと推測すべき所見を得た。

### 結論

香川県下に発生した馬宿病の病原として報告された R. t. 株の内、定型的馬宿病患者より分離された三谷株を用い、第1編に統いて、中和試験の吟味の一端として、R. t. と抗血清の接触時間を適宜変更し、更に “Absättigungsversuch” を応用して、中和試験の術式を検討した結果、次の所見を得るに至つた。

1) R. t. とその抗血清は、短時間内に、試験管内で結合が行われるものであり、接触時間を延長するに伴い、R. t. の毒性の減弱を招くことが明であるため、真の中和抗体価は、R. t. の感染力の減退するに至らぬ短時間の接触が望まれる。

2) R. t. の中和試験での抗血清は、稀釀

して用いることは好結果を得難い。人及び海猿血清等を添加しても、本実験では、中和効果に何ら影響は認められなかつた。

3) R. t. に於ける "Absättigungsversuch"

(Wildfähr) の応用は、良結果が得られない。

稿を終るに当り、終始御懇意なる御教示と御鞭撻を辱うし、且御校閥の労を賜つた恩師村上栄教授に深甚の謝意を表する次第である。

主　要　文　献

- 1) 難波：未発表。
- 2) Fox, J. P.: J. Immunol., 62, 341~352, 1949.
- 3) 川村：七島熱の研究, 2, 1953.
- 4) Bengtson: Pub. Health. Rep. 60, 1483~1488, 1945.
- 5) Rights, F. L., Smadel, J. E. and Jackson, E. B.: J. Exp. Med. 87, 339~351, 1948.
- 6) 軒原：岡山医学会雑誌, 第67巻, 6号, 1955.
- 7) 丸岡：岡山医学会雑誌, 第66巻, 12号, 1954.
- 8) Bovarnick, M. R., Miller, J. C. and Snyder, J. C.: J. Bact. 59, 509~522, 1950.
- 9) Wildfähr, G.: Zeitschr. f. d. Ges. Inner. Med. 573, 1953.
- 10) 桑田・Virus, 第3巻, 第3号, 1953.
- 11) 北岡：七島熱の研究, 2, 1953.
- 12) Rivers: Viral and Rickettsial of man 1951.

Studies on the Neutralization Test of Rickettsia tsutsugamushi

II: Studies on the Procedures of Neutralization Test  
of R. Tsutsugamushi

By

Tomisaburo Namba

Department of Microbiology, Okayama University Medical School  
(Director: Professor Dr. Sakae Murakami)

The author reinvestigated the procedures of neutralization test of Rickettsia tsutsugamushi in regard to the contact period of the agent with immune sera. At the same time, the "Absaettigungsversuch" (Wildfuehr) was also tried on R. tsutsugamushi. Mitani strain of R. tsutsugamushi isolated from the patients of Umayado disease in Kagawa prefecture was used as the test agent. The results were as follows:

- 1) In test tubes, R. tsutsugamushi combines with its antisera in a short time, and the virulence of R. tsutsugamushi falled along with prolongation of contact period. These facts suggest that estimation of the true titer of neutralization antibody become possible by the short-period-contact which causes no noticeable fall of rickettsial virulence.
- 2) In the neutralization test of R. tsutsugamushi, dilution of antisera to be mixed with rickettsiae in test tubes deteriorates its result, and addition of human or guinea-pig sera had no influence on its neutralizing effect.
- 3) No noticeable result was obtained in application of the "Absaettigungsversuch" to R. tsutsugamushi.