

ツツガ虫病リケッチアの病原性に関する研究

誌名	日本獣医畜産大学研究報告 = The bulletin of the Nippon Veterinary and Zootechnical College
ISSN	03738361
著者	伊藤, 忠彦 寺山, 武 藪内, 清
巻/号	37号
掲載ページ	p. 54-63
発行年月	1988年12月

ツツガ虫病リケッチアの病原性に関する研究

—古典的および軽症型ツツガ病患者由来 *Rickettsia tsutsugamushi* の
マウス感染における virulence の比較検討—

伊藤忠彦・寺山 武・藪内 清・山上哲史*
杉山公宏*・磯田政恵*・石崎良太郎**

東京都立衛生研究所 微生物部

* 日本獣医畜産大学 獣医病理学教室

** 日本獣医畜産大学 分子腫瘍学研究室

要 約 ツツガ虫病（古典的ツツガ虫病）死亡例の屍血より分離された 80-1049 株と軽症型ツツガ虫病である七島熱の患者血液より分離された Shikine-S 株の 2 株の分離リケッチアを用いてマウス感染における virulence を比較検討した。両リケッチア株とも、腹腔内接種ではマウスを致死せしめるのに対し、皮下接種では、80-1049 株はマウスを全例殺すが、Shikine-S 株はマウスを発症させるものの、1 例も致死せしめることはなかった。このことから、古典的および軽症型ツツガ病患者の症状および予後の相違が両疾患の病原リケッチアによるマウス感染実験、特に皮下接種感染においても観察された。

上記 2 株、2 接種法で 10^3 マウス 50% 致死量のリケッチアをそれぞれ 4 群のマウスに感染させ、経口的に腹腔内のリケッチア感染細胞数および血清中のリケッチア抗体価を測定した。感染細胞は両リケッチア株とも腹腔内接種では接種後 4 日目より出現し、極期にはほとんどが感染細胞で占められていた。リケッチアの増殖は 80-1049 株の方が速やかであった。皮下接種の場合、80-1049 株では接種後 16 日目より 4 日間にわたって感染細胞が認められたが、Shikine-S 株では 17 日目のみに認められたにすぎなかった。しかし、いずれの場合も感染細胞数は比較的少なかった。リケッチアに対する抗体では、両リケッチア株とも接種ルートにかかわらず 11 日目前後より抗体価の上昇が認められた。

Shikine-S 株を皮下接種してマウスに感染させた後、更に両リケッチア株を腹腔内接種でそれぞれ攻撃すると、ホモ株で攻撃されたマウスは、攻撃までの期間が 2 日間と短いものでも死を免れることが確認された。また、ヘテロ株のそれは、14 日間以上の期間を必要とした。

これらのことから *Rickettsia tsutsugamushi* のマウスにおける致死性はリケッチア株のマウス細胞内での増殖性に関係することが示唆された。

キーワード: *Rickettsia tsutsugamushi*, マウス, 致死率, 日獣畜大研報, 37, 54 ~ 63, 1988.

ツツガ虫病は *Rickettsia (R.) tsutsugamushi* を保有するツツガムシ幼虫の刺咬により感染・発病する急性熱性疾患である。わが国では東北地方、特に秋田、山形、新潟の河川流域に沿って発生する致命率の高い重篤な疾患として古くより恐れられていた。これが古典的ツツガ虫病である。戦後に富士山麓、伊豆半島、伊豆七島等に発生した原因不明の熱性疾患も本症によるものであることが明らかとなり¹⁷⁾、これらは便宜的に従来の古典的ツツガ虫病に対し新型ツツガ虫病と呼ばれるようになった。

近年、新型ツツガ虫病が全国的に多発しており、公衆衛生上の大きな問題となっている。

新型ツツガ虫病は古典的ツツガ虫病に対して比較的軽症とされているが¹⁷⁾、なかには播種性血管内凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation, DIC) を生じて死亡した症例も報告されている^{1,13,16)}。このように新型ツツガ虫病といえどもヒトに対する病原性は一様なものでなく、各地域のリケッチア間でかなり差異のあることが示唆されており^{15,18,20)}、リケッチアの抗原性およびヒトに対する病原性についての統一的な見解は、まだみだされていないのが現状である。

著者らは、*R. tsutsugamushi* の病原性を解明する一助として、東京都立衛生研究所において古典的ツツガ

虫病による死亡例の屍血より分離されたリケッチア株¹³⁾と新型ツツガ虫病である軽症型の七島熱患者の血液より分離されたリケッチア株^{5,6)}の病原性について、マウスにおける実験的感染による virulence を比較検討した。

実験材料および方法

1. 供試動物

感染実験には静岡県実験動物農業協同組合より購入した5~6週令雌のBALB/cマウスおよびヌードマウス(BALB/c nu/nu)を供した。また、*R. tsutsugamushi*の型別確認のための免疫血清作成には、日本医科学動物資材研究所より購入した8週令雄ハートレイ系モルモットを用いた。

2. 供試リケッチア

マウス感染実験には、東京都立衛生研究所において分離された80-1049株およびShikine-S株を用いた。*R. tsutsugamushi*の型別確認には、分離株とKarp, GilliamおよびKatoの標準株を用いた。80-1049株は、1980年9月にツツガ虫病死亡例の屍血より検出され¹³⁾、マウスに10代継代されたものである。Shikine-S株は1983年11月に七島熱患者血液より検出され^{5,6)}、マウスに4代継代されたものである。感染実験用リケッチアは以下のように調整された。リケッチア株をマウス腹腔内に感染させ、発症を確認したマウスより脾を摘出し、これにsucrose phosphate glutamate (SPG)液を加え約10%乳剤とし、これをリケッチア原液として使用時まで-80°Cに凍結保存した。使用時に融解し、500 rpm 5分間遠沈した上清を接種材料とした。

3. マウス50%致死量(LD₅₀)および50%感染量(ID₅₀)の測定

供試リケッチア80-1049株およびShikine-S株の接種材料を各々冷SPG液で、試験管を冷やした状態において10⁻¹から10⁻⁹までの10倍階段希釈列を作り、それぞれの材料希釈液をBALB/cマウスの腹腔内(ip)および皮下(sc)に各々一希釈液について3匹ずつ0.25 ml宛接種した。リケッチア接種後のマウスは連日観察し、株別、接種群別および希釈列別の発症の有無と生死を観察した。生存マウスは30日目に心臓穿刺で採血後に剖検し、鼠径リンパ節の腫脹、脾腫の有無等を観察して発症の有無を推定した。LD₅₀は各接種群別に接種量別のマウス死亡数より、また、ID₅₀は抗体獲得生存マウスを感染マウスとみなし、その感染マウス数と死亡例数からBehrens-Kärber法で計算して求めた。

4. 血清学的検査

血中抗体価を測定するために動物より心臓穿刺で採血

し、分離血清を検査時まで-20°Cに凍結保存した。間接蛍光抗体法⁹⁾(IF)にはKarp, GilliamおよびKatoの標準株と分離株の80-1049株、Shikine-S株を抗原として用いた。すなわち、これらのリケッチアをL細胞に感染させ、その細胞浮遊液を32穴の蛍光抗体用スライドの穴に少量分注し、風乾ののち、冷アセトンにより10分間固定して抗原スライドとした。二次血清にはFITC標識抗マウス(IgG, IgM, IgA)ヤギ血清(Cappel社製)と抗モルモットIgGウサギ血清(Miles社製)を用いた。

補体結合反応(CF)は、市販のKarp, GilliamおよびKato型の各抗原(デンカ生研製)および80-1049株とShikine-S株の自家製抗原を使用し、常法²⁾に従ってマイクロタイター法で実施した。

5. *R. tsutsugamushi*の型別

80-1049株およびShikine-S株の型別は、これらをモルモット脳内に接種して得られた免疫血清の標準株抗原とのIFおよびCF試験の反応性によった。

6. 10³ LD₅₀ リケッチア量での感染実験

マウスip接種の結果より算出した80-1049株およびShikine-S株の10³ LD₅₀のリケッチア量をそれぞれBALB/cマウスのipおよびscに接種した。接種したマウス数は、80-1049株ip群42匹、同sc群48匹、Shikine-S株ip群48匹、同sc群57匹の合計195匹である。これらリケッチアを接種されたマウスは連日観察し、立毛、元気消失、ふるえ、腹部膨満等で発症を確認した。また、これらのマウスを経日的に各群3匹ずつエーテル麻酔下で全採血により屠殺して、解剖を行った。解剖は接種後12時間目より行い、以後1日目から5日目まで毎日、7日目以後21日目まで隔日に行ったが、マウスの症状いかんでは設定日以外にも行った。剖検では、マウスの鼠径リンパ節の腫脹、脾腫、胸水および腹水の貯留、腹水の牽糸性等を確認できた場合を発症と判定した。

7. 腹腔細胞の観察

リケッチア接種マウスを剖検後、腹腔内にHanks液(日水製薬)を5 ml注入し、腹腔内を洗浄して腹腔内細胞を回収した。これを遠沈操作で適量の細胞浮遊液にしてIF用スライドグラスに少量スポットし、感染細胞検出用の標本とした。感染細胞の検出はIFにより行い、細胞内で蛍光を発したリケッチア粒子を含むものを感染細胞とみなした。腹腔細胞のリケッチア感染率は蛍光顕微鏡下で細胞500個をめどに観察し、その中の感染細胞数をもって算出した。

Table 3. Dependence of mortality rate on inoculation routes and dose of *Rickettsia tsutsugamushi* strain Shikine-S.

Route of inoculation	Dose* (10 ⁿ)	Mortality** rate	Immunized*** rate	Average survival day	LD ₅₀	ID ₅₀
Intraperitoneal	0	3/3		11		
	-1	3/3		12.3		
	-2	3/3		13.7		
	-3	3/3		16	10 ^{-4.5}	10 ^{-4.5}
	-4	3/3		16.3		
	-5	0/3	0/3			
	-6	0/3	0/3			
Subcutaneous	0	0/3	3/3			
	-1	0/3	3/3			
	-2	0/3	3/3			
	-3	0/3	3/3		< 10 ⁰	10 ^{-4.5}
	-4	0/3	2/3			
	-5	0/3	1/3			
-6	0/3	0/3				

* Serial 10-fold dilutions with 10% SPG solution of spleen homogenates from mice which had been infected with *Rickettsia tsutsugamushi* Shikine-S.

** Number of mice dead / Number of mice inoculated with *Rickettsia tsutsugamushi* Shikine-S.

*** Number of mice with antibody to *Rickettsia tsutsugamushi* / Number of the survived.

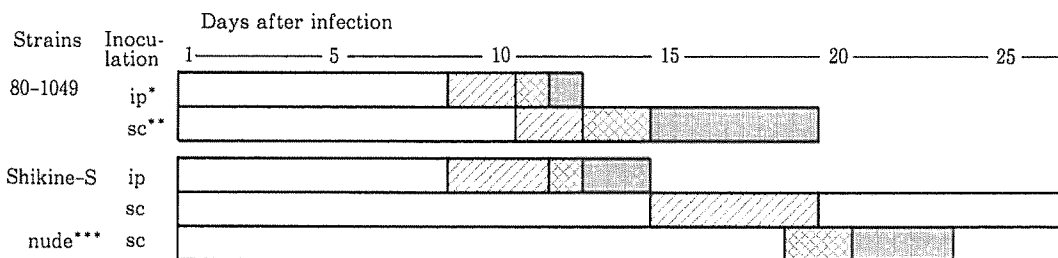


Fig. 1. Course of mice infected with *Rickettsia tsutsugamushi*.

* : intraperitoneal ** : subcutaneous *** : nude mouse (BALB/c nu/nu)

□ : healthy ▨ : sick ▩ : severely sick ■ : moribund state or died

粘稠は 15, 17 日目の各 1 例に認められた。また, 16 日目以降に解剖した 10 例には, すべて胸水の貯留が認められた。

Shikine-S 株 ip 群では, 80-1049 株 ip 群とほぼ同様の所見であったが, リンパ節の赤色調は同群より 2 日遅れ接種後 11 日目より認められた。Shikine-S 株 sc

群では, 腹水は貯溜する程のものは認められなかったが, 牽糸性の粘稠は接種後 17 日目の 1 例, 19 日目の 3 例に認められた。また, 胸水の貯溜が 17 日目の 3 例に認められた。

これらの所見から接種ルート別では, 両株とも ip 群で牽糸性粘稠性腹水の貯溜を, sc 群で胸水の貯溜を,

株別では 80-1049 株で病変の進行がより速かであったことが剖検上の特徴としてあげられる。また、脾腫は各群のマウスで 9 日目頃より認められるが、sc 群においてより著明であり、特に Shikine-S 株 sc 群で最も顕著となった。

ヌードマウスでの感染実験では、Shikine-S 株 sc 接種で、19 日目から動作緩慢、ふるえ等の初発徴候が認められ、日を追うごとに消瘦し、21~23 日の間に死亡した。発症後オキシテトラサイクリンを投与されたものでは 25~27 日の間に死亡した。80-1049 株 sc 接種では 14 日目に、Shikine-S 株 ip 接種で 13 日目にそれぞれ全例死亡した。なお、ヌードマウスの未接種対照は実験終了後も観察を続け、約 2 ヶ月後に殺処分するまで生存した。

4. 腹腔細胞のリケッチア感染率

10^3 LD₅₀ リケッチア量を接種された 4 群のマウスにおける腹腔細胞の経日的な感染率 (3 匹の平均、80-1049 株 sc 接種 19 日目のみ 1 匹) を Table 4 に示した。マウス腹腔内感染細胞は両株とも ip 接種後 4 日目より認められ、経日的にその増加および細胞内のリケッチア数

の増加が認められた。そして極期にはほとんどが感染細胞で占められ、それぞれの細胞内に多数のリケッチア粒子が認められた。両株接種後の経日的感染率を比較した場合、80-1049 株は Shikine-S 株に比し、2 日程度の先行が認められ、細胞内リケッチア粒子の数も 80-1049 株接種マウスの方が多かった。

一方、sc 接種では、80-1049 株は接種 16 日目以降のマウスから、Shikine-S 株で 17 日目のマウスのみ感染細胞が認められたが、ip 接種に比べると極めて低率であった。

5. 血中抗体価の推移

10^3 LD₅₀ リケッチア量を接種された 4 群のマウスにおけるホモ株に対する IF 抗体価の経日推移を Fig. 2 に示した。4 群のマウスすべてにおいて接種 9 日目まで IF 抗体は確認できなかったが、接種 11 日目のマウスより Shikine-S 株 sc 群を除き IF 抗体が認められた。両株の sc 接種マウスの抗体価は 19 日目まで上昇傾向がみとめられ、1:640~1:≥2560 の高い価を示した。また、ヘテロ株に対する抗体価は表示していないが、ホモ株に対するそれより 1~5 管低い価であり、抗体出現初

Table 4. Infection rate of mouse peritoneal cells after infection with *Rickettsia tsutsugamushi* strain 80-1049 or Shikine-S.

Days after inoculation	Infection rate			
	80-1049 ¹⁾		Shikine-S ²⁾	
	ip ³⁾	sc ⁴⁾	ip	sc
3	(-) ⁵⁾	(-)	(-)	(-)
4	40/546 (7.3) ⁶⁾	(-)	1/566 (0.2)	(-)
5	69/515 (13.4)	(-)	10/545 (1.8)	(-)
7	221/515 (42.9)	(-)	38/570 (6.6)	(-)
9	440/543 (81.0)	(-)	211/563 (37.4)	(-)
11	523/576 (90.8)	(-)	410/508 (80.8)	(-)
12	495/542 (91.3)			
13		(-)	352/549 (65.9)	(-)
15		(-)		(-)
16		14/538 (2.6)		
17		8/550 (1.4)		3/555 (0.5)
18		9/550 (1.6)		
19		3/560 (0.5)		(-)
21				(-)

¹⁾ *Rickettsia tsutsugamushi* strain 80-1049.

²⁾ *Rickettsia tsutsugamushi* strain Shikine-S.

³⁾ Intraperitoneal inoculation, 0.25 ml of 1000 LD₅₀.

⁴⁾ Subcutaneous inoculation, 0.25 ml of 1000 LD₅₀.

⁵⁾ Infected cells were not detected.

⁶⁾ Percentage in parenthesis, Number of cells infected / Number of cells observed.

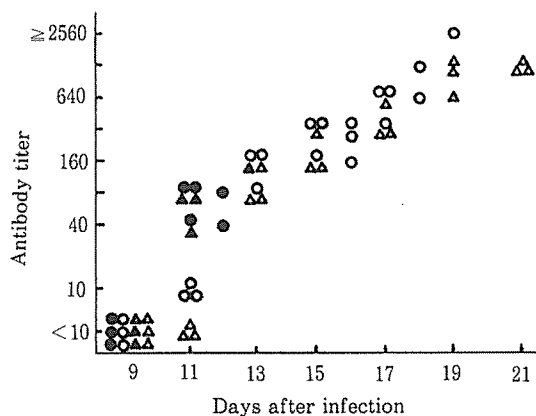


Fig. 2. Features of antibodies in mice infected with *Rickettsia tsutsugamushi*.

- Intraperitoneal infection of 80-1049 strain
- Subcutaneous infection of 80-1049 strain
- ▲ Intraperitoneal infection of Shikine-S strain
- △ Subcutaneous infection of Shikine-S strain

期でホモ株との差が大きかった。

6. 再感染試験による防御能の検討

Shikine-S 株を sc 接種で感染させた後、ip に再感染を行った際の防御効果を検討した結果を Table 5 に示した。ヘテロ株の 80-1049 株による再感染では、攻撃 14 日目以後に行ったマウスから生存個体が認められた。これに対してホモ株の Shikine-S 株による再感染では、攻撃を 2 日目に行ったマウスで早くも生存が認められ、3 日目以降の攻撃では、5 日目の 1 匹が死亡したのを除きすべて生存した。このことからホモ株の攻撃では、sc 接種後、攻撃間隔が短くても防御効果のあることが認め

られた。なお、再感染の際の対照マウスは、80-1049 株で 12 日後に、Shikine-S 株で 13~14 日後に全例死亡した。

考 察

R. tsutsugamushi 分離株の抗原分析結果から 80-1049 株は Kato 型のリケッチア株、Shikine-S 株は Karp 型のリケッチア株と同定された。古典的ツツガ虫病の病原リケッチアは主として Kato 型であり、七島熱は Karp 型であると言われていた従来¹⁷⁾と同様となった。

ツツガ虫病を古典的なものと新型とに分けることについては現在異論もあるが、本症に有効な化学療法が普及する以前とはいえ、ヒトに対する致命率が 19~45% と言われていた古典的なものと、0% の七島熱とでは、その病原性において歴然とした差が認められている²¹⁾。しかし、これまで、両者の病原リケッチアをマウスの腹腔内に接種・感染させた場合、いずれも発症・死亡し、ヒトで認められるような顕著な差が実験的感染では示されなかった。本実験では、これら両株のマウスにおける ip と sc 接種の感染ルートの違いによって病原性発現に差が認められることを明らかにした。すなわち、ip 接種法では、両者の病原性の違いを認めることはできなかったが、sc 接種法では、両株間でヒトのツツガ虫病でみられるような症状および予後の相違が感染マウスに反映された。

10^3 LD₅₀ リケッチア接種での株別、感染ルート別によるマウス感染実験で、各群のマウスは Fig. 1 にみられるようにそれぞれの発症経過を示したが、ip 接種による感染では、リケッチアの増殖に腹腔細胞が大きく関与していることが腹腔細胞のリケッチア感染率の推移から立証された。リケッチアを ip 接種で感染させると腹腔マクロファージ、腹腔上皮細胞、各臓器の被膜細胞内

Table 5. The effect of subcutaneous preinfection of *R. tsutsugamushi* strain Shikine-S on survival rate of mice intraperitoneally infected with *R. tsutsugamushi* strain Shikine-S or 80-1049.

intraperitoneal challenge strain	Days from subcutaneous Shikine-S preinfection to intraperitoneal Shikine-S or 80-1049 infection													
	0	1	2	3	4	5	6	7	14	21	45	60	110	270
	Rate*													
Shikine-S	0/6	0/3	1/3	3/3	3/3	2/3	3/3	6/6	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/2
80-1049	NT**	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0/3	3/3	3/3	6/6	6/6	6/6	1/1

* Number of mice survived / Number of mice subcutaneously inoculated.

** Not tested.

でよく増殖し、マウスは腹膜炎によって死亡すると考えられている^{3,4)}。一方、sc接種による感染では臓器細胞内でのリケッチアの増殖が顕著であると言われており¹¹⁾、リケッチアは血行性に各臓器に分散するものと思われる。そして病状の極期には、本実験のIF試験で観察されたごとく、腹腔にもリケッチアが認められるようになる。80-1049株では接種16日目以降4日間にわたり感染細胞が低率に認められている。しかし、経目的に増加しておらず、この時期にはすでに免疫機能が作動していることが抗体価の推移から示されている。すなわち、IF抗体価は、接種16日の1:160から19日の1:≥2560と経目的に上昇が認められている。抗体の上昇はShikine-S株のsc接種においても同様であった。しかし、マウスは80-1049株接種では死亡し、Shikine-S株では生存した。生死を分ける原因の一つとしては、マウス体内で増殖したリケッチア量の違いによるものとも考えられる。すなわち、腹腔細胞のリケッチア感染率の比較から両株における増殖性に2日程のずれが認められていること、細胞内のリケッチア粒子数に違いのあること等から、80-1049株では増殖が速くリケッチア量が多いため免疫機能が作動しても、もはや生体が対処しきれない状態になっている可能性が考えられる。このことは病理学的所見¹⁹⁾において80-1049株接種マウスで病変の出現から極期に達するまでの経過が早いことから裏付けられる。また、80-1049株のsc接種16日以降のマウスでは、全例に胸水が認められ、組織学的には肺の胸膜下および胸腔側への細胞浸潤が顕著であったが¹⁹⁾、この80-1049株が分離された症例の剖検所見でも、左右300mlの胸水と強い細胞浸潤を認めている¹⁾。

*R. tsutsugamushi*の病原性は、生きたリケッチアのみが保有する毒性(急性毒性および溶血能)と生体内での増殖率によって左右されると言われている^{7,9)}。このリケッチアの毒性物質は今日なお単離解明されていないが、その作用は血管内皮細胞への障害で、毛細血管の透過性の亢進、組織内への血漿流出(血液濃縮症)によって血液循環不全が起こるとされている^{7,9)}。また、リケッチアによる障害性として小血管の増殖性変化、血栓性病変等による各種臓器障害²¹⁾、また、DIC^{1,16)}を起こすとの報告もある。すなわち今日でも*R. tsutsugamushi*のヒトおよび動物に対する病原性においてこの毒性物質的なものによる障害とリケッチアそのものによる障害の関係が混沌としているのが現状である。

ヒトあるいはマウスの死因がリケッチアのいかなる作用に起因するのか不明であるが、リケッチアの著しい増殖により細胞および組織の崩壊、それに伴う各種臓器障

害、DICの併発、あるいは毒性物質の影響等、おそらく、これらの総合的な作用によるものと推察される。すなわち、感染マウスにおいて、80-1049株は体内のリケッチアの増殖が速く、上記作用を強く受けるために死亡するが、Shikine-S株ではリケッチアの増殖が遅れ、その間の免疫の成立により、それらが軽度なために死から免れるものと思われる。このことは、後述するヌードマウスの感染実験からもうかがえる。

リケッチアに対する感染防御は、細胞性免疫が主体をなすことが、すでに示されている¹⁴⁾。さらにNACY¹²⁾はリケッチア感染に対する生体防御の主役はTリンパ球が産生するリンホカインによって活性化されたマクロファージであることを示し、細胞性免疫による抗リケッチア作用の機構を明らかにしている。

今回の著者らが行った再感染試験の結果からも、免疫に関することがうかがえる。すなわち、ホモ株の攻撃では、sc接種後、攻撃間隔が短くても強い防御効果が認められている。この防御機構は、最初のsc感染によって早い時期より出現して、再感染を防御するのかもしれない。

リケッチアの増殖速度と免疫成立との関連については、河村¹⁰⁾がヌードマウスおよび正常マウスを用いたip接種での感染実験において、病原性の強弱が細胞性免疫成立までのリケッチアの増殖速度の違いにより決定されると推論している。本実験でもShikine-S株をヌードマウスに接種すると、ip接種では13日目に死亡するのに対し、sc接種では21~23日目に死亡した。すなわちリケッチアの増殖がsc接種で遅れるため、正常マウスではこの間に免疫が成立することにより生き残るものと考えられる。マウス感染実験において、80-1049株とShikine-S株ではリケッチアの増殖に2日程の差が認められていることは先にも触れたが、著者らが常時行っているリケッチアの細胞培養においても、80-1049株はShikine-S株に比べ増殖が良く、CPEの出現も早いことを認めている。これらのことからリケッチアのマウス感染実験における株間および接種法の違いによる死亡率の差は、リケッチア株固有の毒性物質の影響は否定できないにしても、増殖速度の相違と免疫成立との関連性に起因するものであると推察される。

今回の実験では、リケッチアの接種法について比較検討したが、ヒトにおけるツツガ虫病の感染は常に経皮的に起こっており、同じ経皮感染のマウスsc接種法がヒトの感染モデルとして大きな意義を持つものと思われる。

謝 辞

本研究について、終始適切な御助言を賜わった東京都立衛生研究所所長大橋誠博士、同所微生物部長三木隆博士ならびに元同所微生物部主任研究員坂井富士子博士に深甚なる謝意を表す。さらに、本研究にいろいろと御協力戴いた同所微生物部中村清純博士、山崎清氏、新開敬行氏、大貫奈穂美氏、日本獣医畜産大学獣医病理学教室梅田昌樹博士、鈴木理香氏に深謝する。

文 献

- 1) 井口千春・馬野詠子・川口幸博・白沢健二郎・坂井富士子 (1983). 恙虫病の 1 剖検例. 病理と臨床, 1, 1693-1697.
- 2) 井上 栄 (1973). マイクロ法による補体結合試験. 臨床検査, 17, 838-843.
- 3) 石倉康弘・植松久雄 (1983). *Rickettsia tsutsugamushi* の感染に対する生体の防御機構 1, *R. tsutsugamushi* の感染局所における細胞の動態. 富山衛研年報, 6, 38-44.
- 4) 石倉康弘・植松久雄 (1984). *Rickettsia tsutsugamushi* の感染に対する生体の防御機構 2, 炎症細胞の感染防御能. 富山衛研年報, 7, 44-47.
- 5) 伊藤忠彦・坂井富士子・山崎 清・中村清純・藪内 清・大橋 誠 (1984). 最近の伊豆七島におけるツツガ虫病 (七島熱) の調査研究, 武根島を中心とした実態調査. 第 32 回日本ウイルス学会総会演説抄録, 213.
- 6) 伊藤忠彦・中村清純・山崎 清・坂井富士子・藪内 清・大橋 誠 (1984). 伊豆七島におけるツツガ虫病の研究, 武根島を中心とした実態調査. 東京衛研年報, 35, 61-68.
- 7) 川村明義 (1979). リケッチア並びにリケッチア症, 一特に最近のツツガ虫病リケッチアについて一. 日本細菌学雑誌, 34, 375-395.
- 8) KAWAMURA, A. Jr., and AOYAMA, Y. (Ed) (1982). Immunofluorescence in Medical Science, University of Tokyo Press.
- 9) 川村明義 (1985). リケッチア. 日本臨床, 43, 春期臨時増刊号, 58-65.
- 10) 河村伸一 (1984). リケッチア感染症の免疫学的研究, ヌードマウスにおける実験的ツツガ虫病リケッチア感染症, 感染症学雑誌, 58, 647-662.
- 11) 村田道里 (1980). 伊豆七島におけるツツガ虫病 (七島熱) の研究 第二報 マウスに弱病原であるリケッチアの分離とその性状. 感染症学雑誌, 54, 242-248.
- 12) NACY, C.A. and MELTZER, M.S. (1979). Macrophages in resistance to rickettsial infection: Macrophage activation in vitro for killing of *Rickettsia tsutsugamushi*. J. Immunol., 123, 2544-2549.
- 13) 坂井富士子・川口幸博 (1981). 東京都内の剖検例より検出された恙虫リケッチアの 1 例. 東京衛研年報, 32, 1, 45-47.
- 14) SHIRAI, A., CATANZARO, P.J., PHILIPS, S.M. and OSTERMAN, J.V. (1976). Host defenses in scrub typhus: Role of cellular immunity in heterologous protection. Infect. Immun., 14, 39-46.
- 15) SHISHIDO, A. (1962). Identification and serological classification of the causative agent of scrub typhus in Japan. Jap. J. Med. Sci. Biol., 15, 308-321.
- 16) 鈴木俊夫・関川弘雄 (1981). 血管内凝固症候群を併発した恙虫病の 4 例. 感染症学雑誌, 55, 642-648.
- 17) TAMIYA, T. (Ed) (1962). Recent Advances in Studies of Tsutsugamushi Disease in Japan. Medical Culture Inc., Tokyo.
- 18) TAMURA, A., TAKAHASHI, K., TSURUHARA, T., URAKAMI, H., MIYAMURA, S., SEKIKAWA, H., KENMOTSU, M., SHIBATA, M., ABE, S., and NEZU, H. (1984). Isolation of *Rickettsia tsutsugamushi* antigenically different from Kato, Karp, and Gilliam strains from patients. Microbiol. Immunol., 28, 873-882.
- 19) 山上哲史・鈴木理香・梅田昌樹・杉山公宏・磯田政恵・伊藤忠彦 (1988). *Rickettsia tsutsugamushi* 分離株のマウスに対する病原性の比較, 病理組織学的所見を中心として, 日本獣医学会講演要旨集, 133.
- 20) YAMAMOTO, S., KAWABATA, N., TAMURA, A., URAKAMI, H., OHASHI, N., MURATA, M., YOSHIDA, Y., and KAWAMURA, A., Jr. (1986). Immunological properties of *Rickettsia tsutsugamushi*, Kawasaki strain, isolated from a patient in Kyushu. Microbiol. Immunol., 30, 611-620.
- 21) 山作房之輔 (1979). リケッチア性疾患, 新内科学大系, 中山書店, 東京, pp. 223-265.

Pathogenicity of *Rickettsia Tsutsugamushi* : A Comparative Study
on Virulence of the Isolates from the Patients in Classical
and Mild Types of Tsutsugamushi Disease

Tadahiko ITO, Takeshi TERAYAMA, Kiyoshi YABUUCHI, Tetsuji YAMAGAMI*,
Masahiro SUGIYAMA*, Masae ISODA* and Ryotaro ISHIZAKI**

Department of Microbiology,
Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
* Department of Veterinary Pathology,
Nippon Veterinary and Zootechnical College
**Molecular Oncology Laboratory,
Nippon Veterinary and Zootechnical College at Sakuragi

ABSTRACT

We compared mortality in mice infected with two isolated strains of *Rickettsia tsutsugamushi*; 80-1049 strain obtained from blood of an autopsy case (classical type) and Shikine-S isolated from blood of a patient with Shichito fever (mild type).

Both strains caused all mice to die by intraperitoneal inoculation. By subcutaneous inoculation, however, 80-1049 strain caused death, but Shikine-S allowed all mice to survive though morbid signs were observed. The difference of morbidity between two strains thus observed by the subcutaneous route of inoculation might partially reflect on the difference of symptoms and prognosis observed in the patients suffering from tsutsugamushi disease.

Mice were grouped into 4 by combinations of the number of strains and the inoculation route. Each group was infected with 10^3 50% mouse lethal dose rickettsia, and were daily measured for the number of rickettsia-infected peritoneal cells and the titers of anti-rickettsial antibody in serum. In mice intraperitoneally inoculated, infected peritoneal cells appeared 4 days after infection, and almost all cells were infected in the moribund state. These were samely observed in mice intraperitoneally infected either with 80-1049 or Shikine-S strain. In mice subcutaneously inoculated, however, infected cells appeared 16 days after infection with 80-1049 strain, and 17 days with Shikine-S strain. In either case, the number of infected cells observed was relatively small. Thus, 80-1049 strain appeared to grow faster than Shikine-S strain. Anti-rickettsial antibody was detectable in the serum of the infected mouse 11 days after inoculation.

The mice subcutaneously inoculated with Shikine-S were subsequently challenged by intraperitoneal inoculation with either Shikine-S or 80-1049. Only the mice challenged by homologous strain with Shikine-S, were confirmed to escape from death even when challenged at a short interval.

These results strongly suggest that the growth rate difference of rickettsia plays a role in determining the mortality of mice infected with *Rickettsia tsutsugamushi*.

Key words : *Rickettsia tsutsugamushi*, mice, mortality rate

Bull. Nippon Vet. Zootech. Coll., No. 37, 54~63, 1988.