豚に対する日本脳炎生ワクチン接種の野外実験

土屋 夏実*・唐木 利朗・黒田 晃生
唐牛 良明・佐々木 修

FIELD STUDIES ON IMMUNIZATION OF SWINES USING LIVE ATTENUATED JAPANESE ENCEPHALITIS VACCINE

Natsumi TSUCHIYA, Toshiro KARAKI, Akio KURODA, Yoshiaki
KAROJI, Osamu SASAKI

Department of Microbiology, Public Health Research Institute of
Kyoto City, Kyoto, Japan

〔受付：2月15日，1971年〕

総 括

Pig-mosquito cycle が日本脳炎ウイルス (JEV) 流行期に於ける主要な増幅機序であるという生態学的所見に基づき，1968年から1970年の3年間，京都市内において豚に対する日本脳炎生ワクチン接種の野外実験を試みた。豚の一斉感染期の約1カ月前（6月中旬～下旬）に総計13,900頭の豚に日脳生ワクチン(m株)を接種し，増幅抑制効果を検討した。

生ワクチンの効果は主として接種豚舎内採集の吸血コガタアカイエカのウイルス感染率，吸血蚊の HI 抗体によつて判定した。感染率は吸血蚊を7日～10日間飼育した後，JEV 分離を行ない，その分離率から計算した。吸血蚊 HI 抗体は採集後直ちに測定し，豚集団の HI 抗体保有状況を推定した。その結果つぎのような成績をえた。

ワクチン接種地域，非接種地域で採集したドライアイス誘引蚊の JEV 保有率は採集地点による著差を認めなかった。

ワクチン接種豚舎のあるものでは感染開始期が遅延し，又一斉感染前の前駆感染が消失するなど，豚舎における JEV の一般的侵襲パターンと異なる形をとつたものもみられた。

ワクチン接種豚群は流行期前に20倍～40倍の HI 抗体

が認められるが，流行期に至ると急激な抗体上昇を認めた。ワクチン接種豚舎は非接種豚舎に比し，コガタアカイエカのウイルス感染率がピーク時で約 $1/2$ 以下，全感染期間を通じての有毒蚊の生産効率が $1/4$ 以下であつた。なお，ワクチン接種による豚の副反応は報告されなかつた。

以上の野外実験から生ワクチンの有効性が示唆されたが，より高い効果を期待するには実験計画，効果判定に慎重な配慮が必要なることを指摘したい。

序 文

Scherer ら (1959) に指摘されて以来，多くの研究者 (Konno et al., 1966, Oya, 1967) によつて豚が日本脳炎ウイルスの自然界における最も重要な増幅動物であると考えられている。

Buescher ら (1959) は日本脳炎を予防する方法の1つとして豚を免疫することを考慮したが，その効果については強く期待していない。大谷ら (1967) は群馬県下で小地域の全家畜 (豚，家兎，犬，牛，山羊) を免疫することにより，その地域で採集された媒介蚊の JEV 保有率が対照地域採集蚊の保有率と異なるか否かを検討した。大谷らの報告によると接種地域採集の媒介蚊からの JEV 分離は対照より約2週間おくれたが，それ以後の検出率には差がなかつた。最近高橋ら (長崎県報告1969) は壱岐全島の豚に対する日脳生ワクチン接種の実験を行ないコガタアカイエカからのウイルス分離パターンが非接種地域に比し特異的で，分離頻度も少なかつたと報告した。大阪府下の実験では接種地区，非接種地区におい

* 京都市衛生研究所，細菌・ウイルス部門
本研究の一部は第16回ウイルス学会総会，第43回，第44回日本伝染病学会総会において発表した。1970年の研究には厚生科学研究補助金が交付された。

でドライアイス・ライトトップで採集した未吸血蚊の JEV 分離率は有意の差を示したと報告されている (上羽ら, 1969)。

これらの野外実験においては調査の資料として接種豚の抗体の推移と媒介蚊からの JEV の分離が用いられたが、蚊からの JEV 分離を考察する場合、蚊の飛翔分散を考慮に入れなくてはならぬことは既に大谷が指摘した通りである。

我々は京都市において1968年から1970年までの3年間井上 (1964) の作出した生ワクチン (m株) を使用して広範な肥育豚を免疫する野外実験を行なった。実験の効果判定の方法は主として、豚舎内採集の吸血蚊のウイルス感染率を用い、同時に吸血蚊による豚集団の HI 抗体価、ドライアイス誘引蚊の JEV 保有率を併せ検討した。その結果、日脳生ワクチン m 株の豚に対する広範な接種は JEV の増幅を抑制する一方法であると考えられ、又我々が独自に考案した効果判定の方法により、ワクチン接種の効果判定のみでなく同時に JEV の豚集団に対する侵襲パターンを考察することが出来たのでその大要を報告する。

材料と方法

1) 使用ワクチンと接種方法：

使用ワクチンの種ウイルスは日脳向井株を HK 細胞を用いてクローニングし、得られた野生型親ウイルス m⁺株をマウス胎児線維芽細胞で継代、更に HK 細胞での限界希釈法によるクローニングにより得られた弱毒株である (Inoue, 1964, Kodama et al., 1967)。

ワクチンは微生物化学研究所で試験製造された乾燥ワクチンである。乾燥ワクチンを生後3～4日の哺乳マウス6匹以上を用いて脳内接種法によって検討すると、1968年、1970年は $10^{5.5}LD_{50}/0.02ml$ 、1969年は $10^{5.2}LD_{50}/0.02ml$ の力価を有していた (微研自家検定)。使用時1バイアル当り20mlのゼラチン添加磷酸緩衝液で溶解 (ワクチン液1ml 当り約 10^6LD_{50} のウイルス量を有するものと考えられる)、その2～3mlを豚の頸側部の皮下に1回接種した。接種時期は年によって異なるが、予想される JEV の一斎増幅時期より約1カ月前を目標として6月中旬～下旬にかけて接種した。

2) 媒介蚊の採集：

a) ドライアイスによる誘引； 日没直後ドライアイス5kgを蚊帳内 (最盛期には不要) で昇華させ、これに誘われて飛来する蚊成虫を捕虫網で採集した。

b) Sweeping； 夜間豚舎内で捕虫網または吸虫管を用いて未吸血蚊を採集した。

c) Light-trap による誘引； Light-trap (野沢式

NH-3型 BL-管球) を豚舎内一定場所に数個設置し、フオートスイッチによって終夜点燈、翌朝捕虫部を回収した。

3) 採集の蚊飼育方法：

Light-trap 採集の吸血蚊はケージ (40×40×50cm) 中で7日～10日間飼育し、吸血した血液の消化、蚊体内での JEV の増殖をまつた後 JEV 分離を行なった。飼育条件は温度28°～29°C、湿度70～80%で、14時間照明、1.5%蔗糖液を綿塊に浸して与えた。

4) JEV の分離同定：

ドライアイスによる誘引、Sweeping 採集の未吸血蚊は翌日4°Cの低温室で寒冷麻醉下でコガタアカイエカ (*Culex tritaeniorhynchus*) を選別し、通例100個体を1プールとする。Light-trap 採集吸血蚊は7日～10日飼育後同様にコガタアカイエカ50個体を1プールとする。プール蚊は通常-80°Cで保存され順次 JEV 分離にまわす。各プール蚊は5.6%ウシアルブミン液5%を含む0.01Mリン酸緩衝食塩液 pH7.2 (PBS) 3ml (ペニシリン500unit/ml、ストレプトマイシン0.5mgr/ml 添加) で乳鉢内で磨砕、10,000rpm、4°C、30分遠心、上清を生後3～4日のDDN系哺乳マウス4匹の脳内に0.02ml接種した。マウスは7～10日間観察し、発症状況及び発症

図1 野外実験調査地点

表 1 接種・非接種豚舎の吸血蚊感染率(%) (1968年)

採集 月日	集所	A(出橋)豚舎・接種			B(吉祥院)豚舎・接種			C(向代)豚舎・非接種		
		プール サイズ	JEV * 分離率	JEV 感染率	プール サイズ	JEV 分離率	JEV 感染率	プール サイズ	JEV 分離率	JEV 感染率
7—8		50	0/2	0.00	50	0/3	0.00	50	0/1	0.00
9		50	0/7	0.00	35	0/1	0.00	50	0/7	0.00
11		50	0/12	0.00	50	0/5	0.00	50	0/5	0.00
12		50	0/9	0.00						
15		50	0/24	0.00	50	0/23	0.00	50	11/24	1.22
16		50	0/16	0.00						
18		50	0/24	0.00	50	0/11	0.00	50	0/24	0.00
20		50	0/24	0.00	50	0/24	0.00	50	0/24	0.00
22		50	1/19	0.11	50	0/12	0.00	50	1/24	0.09
25		50	1/24	0.09	50	0/14	0.00	25	9/24	1.86
27		50	4/9	1.17	50	0/13	0.00	10	11/24	5.95
29		100	4/12	0.41	50	0/27	0.00	10	9/24	4.59
30								5	4/24	3.59
8—1		50	8/24	0.81	50	4/24	0.36	10	6/24	2.84
2								10	11/22	6.70
3		25	7/24	1.43	50	6/24	0.57	10	12/24	6.70
5		10	24/48	6.70	50	6/24	0.57	10	11/24	5.95
8		25	6/22	1.27	50	5/15	0.81	25	19/24	6.08
12		25	3/24	0.53	50	9/12	2.73	25	7/19	1.82
15		50	6/24	0.58	25	9/24	1.86	50	3/24	0.27
19		50	0/23	0.00	50	0/5	0.00	25	2/24	0.34
30		25	0/11	0.00	25	0/9	0.00	25	0/21	0.00
9—5		25	0/4	0.00				25	0/6	0.00

* JEV 陽性プール数/被検プール数

マウス脳の蛍光抗体検査によつて JEV 陽性と判定した。必要の場合は発症マウス脳のアセトン・エーテル抽出抗原を作製し、HA 及び HI によつて同定した。

5) ウイルス感染率及び保有率の算出：

感染率を算出するには通常採集コガタアカイエカの24プールを使用し、その陽性プール数(分離率)から感染率(%)を算出した。分離率が80%以上の場合はプールサイズを減少させて再検した。感染率算出式はつぎのように Chiang ら(1962)のものをを用いた。

$$(1-p)^n = 1 - P$$

但し p = 感染率 P = n 匹プールによる分離率

6) 豚の抗体測定：

ワクチン接種後豚の耳静脈から採血し、その血清につき HI 抗体を測定した。方法は Clarke ら(1958) 大谷ら(1967)の方法に従い JaGAr 01株抗原の8単位とヒヨコ血球を用いた。又吸血蚊を用いてその吸血宿主の抗体を推定する方法をとった。唐木らの報告した方法(1968, a)に従い吸血蚊を採集翌朝100個体1プールとし、乳鉢で1mlのPBSで磨砕、更にPBS1mlを加

え3,000rpm 15分遠心、上清を試料として常法に従い HI 抗体価を測定した。コガタアカイエカの1個体当たり吸血量は平均2mgであつたので、アセトン処理後の材料に硼酸緩衝液1mlを加えて10倍希釈とし、この吸血蚊 HI 抗体価によつて吸血源である豚集団の抗体価を推定した。一部の検体遠心上清は Svehag ら(1964)の方法に準拠して2メルカプトエタノール(2-ME)処理を行ない、2-ME 感受性を検討した。

成 績

A) 1968年の成績

図1に示す出橋豚舎(A)197頭、吉祥院豚舎(B)71頭に第1次6月11日、第2次25日、日本脳炎生ワクチン3mlを1回接種した。越夏繁殖豚、2週間以内に出荷予定豚、授乳中の仔豚は接種を受けなかつた。接種豚の月令は3カ月以上のものA豚舎86頭(43.6%)、B豚舎56頭(78.9%)であつた。A豚舎から約800m、B豚舎から約2,200m離れた中間地点の向代豚舎(C)一飼育頭数約800頭一においてもA、B豚舎と同様の調査を実施して

図2 ワクチン接種・非接種豚舎の吸血蚊感染率と HI 抗体価
(左1968年, 右1969年)

HI 抗体価は・印1検体

3者を比較検討した。

1) 吸血蚊のウイルス感染率の推移:

感染率測定は各豚舎7月1日から開始し2日又は3日おきに測定した。(表1, 図2)

A豚舎は7月22日始めて JEV を分離, その後は8月15日迄連続的に JEV を分離した。8月5日, 感染率は6.7%の最高値を示した。

B豚舎の最初の JEV 分離はA豚舎より遅れて8月1日, その後連続的に8月15日迄 JEV を分離した。感染率は次第に上昇するが, 8月12日の最高値においても2.7%に止った。

非接種豚舎Cの最初の JEV 分離はA, B豚舎より早く7月15日であったが, その後一度 JEV 分離陰性となり, 7月22日再び JEV を検出した。以後8月19日迄連続的に分離された。感染率では7月27日6.0%, 8月2日6.7%の2つのピークが認められた。

3つの豚舎での感染率を比較すると, ワクチン非接種C豚舎は媒介蚊の感染が長期にわたり, その期間中の感染率も高い(最高6.7%)。これに対してワクチン接種豚舎の媒介蚊の感染期間は短く, 感染率の最高はA豚舎

6.7%, B豚舎2.7%であった。A豚舎は8月5日, 1日だけかなり高い感染率を示したが, その他の感染率は低い。これは恐らくA豚舎には移行抗体を有する幼若の豚が多数含まれていたためワクチン接種が無効の例が多かったのであろう。

各豚舎内採集の吸血蚊の最高感染率の比較のみでなく, 流行期全期間を通じての感染蚊の生産を考察するために, 毎日の感染率の全感染期間中の総和(以下仮にこれを感染効率と略称する)を検討した。感染率が毎日測定されていない場合はその前後の実測値から感染率を推定して集計した。1968年は非接種C豚舎の感染効率を100とすると接種A豚舎は41, B豚舎は22で接種豚舎での感染蚊の生産は全体として強く抑制されていたことがうかがわれる。

2) 未吸血蚊の JEV 保有率(表2):

吸血蚊の中には吸血に飛来する以前に既に感染しているものがまざっていると考えられるので, 豚舎に飛来する未吸血蚊の JEV 保有率を検討した。

A豚舎は3回, 非接種C豚舎は6回にわたり未吸血蚊の JEV 保有率を測定した。A豚舎の保有率は0.7~1.6

表 2 豚舎内採集未吸血蚊の JEV 保有率(%)
(1968年)

採集 箇所 採集 月日	A (出橋) 豚舎			C (向代) 豚舎		
	プール サイズ	JEV* 分離率	JEV 保有率	プール サイズ	JEV 分離率	JEV 保有率
7—17				64	0/2	0.00
22				100	1/4	0.28
23				100	0/6	0.00
25				50	0/1	0.00
8—2	100	5/10	0.69	100	11/19	0.86
8	50	9/16	1.62	50	8/22	0.90
12	50	2/7	0.67	50	4/11	0.90

* JEV 陽性プール数/被検プール数

表 3 生ワクチン接種豚の HI 抗体価及び
2-ME 処理成績(1968年)

No.	A (出橋) 豚舎				B (吉祥院) 豚舎			
	豚齢*	HI	2-ME		豚齢	HI	2-ME	
		抗体価	対照	処理		抗体価	対照	処理
1	77日	20	10	5	93日	20	20	10
2	"	40	20	10	"	20	40	20
3	"	20	—	—	"	10	5	5
4	"	20	10	10	"	40	—	—
5	"	40	20	20	"	40	20	20
6	7月	320	—	—	4月	320	320	10
7	"	10	20	< 5	"	160	80	20
8	"	80	—	—	"	80	40	40
9	"	80	—	—	"	10	—	—
10	"	40	—	—	"	40	40	40

* ワクチン接種時の豚齢
(生ワクチン接種22日後採血)

%, C豚舎は最高8月8日, 12日の0.9%であつた。豚が一斉感染を起している時期でも豚舎内採集の未吸血蚊の JEV 保有率は略々1%程度と考えられる。

3) HI 抗体価の推移 (図2, 表3):

吸血蚊を用いた HI 抗体の測定は週1回実施した。接種豚舎Aの吸血蚊抗体価は接種前いづれも10倍以下であるが, 接種後の6月14日以降の検体は7月下旬迄10倍~80倍の間に分布している。A豚舎の10頭をえらんで接種22日後(7月3日)に個別採血した結果は, 生後77日の5頭には20倍~40倍の HI 抗体が認められ, 2-ME処理を行った4検体はいづれも2-ME 耐性で移行抗体と推定された。生後7カ月の5頭の HI 価は10倍から320倍の間に分布しているが20倍の検体は2-ME感受性であつた。各個体間の差はあるがこれら5頭の HI 抗体は恐らくワクチン接種の応答であろうと考えられる。

表 4 接種・数種豚舎の吸血蚊感染率(%)
(1969年)

採集 箇所 採集 月日	C (向代) 豚舎・接種			D (向島) 豚舎・非接種		
	プール サイズ	JEV 分離率	JEV 感染率	プール サイズ	JEV 分離率	JEV 感染率
7—5	50	0/9	0.00	50	0/12	0.00
6	50	0/5	0.00	50	1/12	0.17
7	50	1/15	0.14	50	4/12	0.81
8	50	2/22	0.19	25	4/12	1.61
9	50	0/8	0.00	50	1/12	0.17
10	50	0/8	0.00	50	0/12	0.00
11	50	1/18	0.11	50	0/12	0.00
12	50	0/12	0.00	50	1/12	0.17
13	50	0/9	0.00	50	0/12	0.00
14	50	0/6	0.00	50	1/12	0.17
15	50	0/6	0.00	50	1/12	0.17
16	50	0/6	0.00	50	0/12	0.00
17	50	0/6	0.00	50	0/12	0.00
18	50	0/6	0.00	50	0/8	0.00
19	50	0/12	0.00	50	3/24	0.27
20	50	0/12	0.00	50	7/18	0.98
21	50	1/12	0.17	10	8/24	3.97
22	50	2/12	0.36	10	5/24	2.31
23	50	1/12	0.17	50	4/12	0.81
24	50	2/12	0.36	50	2/12	0.36
25	50	2/12	0.36	50	2/12	0.36
26	50	4/12	0.81	10	5/24	2.31
27	50	3/12	0.57	10	11/23	6.30
28	50	5/12	1.07	10	9/24	4.59
29	50	3/12	0.57	10	8/24	3.97
30	50	4/12	0.81	10	8/24	3.97
31	50	7/11	2.00	10	13/24	7.51
8—1	50	5/12	1.07			
2	10	3/12	3.95	25	15/24	3.85
3	50	4/12	0.81	10	13/24	7.51
4				10	15/24	9.35
5	25	7/12	3.44	10	13/24	7.51
6	50	2/12	0.36	25	13/24	3.07
7	50	3/15	0.57	50	11/18	1.87
11	50	7/24	0.68	50	1/6	0.36
14	50	0/12	0.00	50	0/6	0.00

A豚舎の感染率が最高値を示した8月5日, HI 抗体価は急激に上昇し640倍以上を示し, 8月下旬, 9月上旬採集の検体はすべて2,560倍以上である。

B豚舎採集の検体はA豚舎より抗体価の上昇がおくられて8月5日まで20倍~160倍の間に分布し, 8月20日にはすべて5,120倍になった。B豚舎7月3日の個別採血の10頭の HI 抗体価についてみると, 生後93日の5頭には10倍~40倍の抗体が認められ, 2-ME 処理の4検体

表 5 ドライアイス誘引未吸血蚊の JEV 保有率(%) (1969年)

採地 集地 月 日	C (向代)地点			D (向島)地点			E (岩倉)地点		
	プール サイズ	JEV 分離率	JEV 保有率	プール サイズ	JEV 分離率	JEV 保有率	プール サイズ	JEV 分離率	JEV 保有率
7—14	50	0/ 8	0.00	100	0/24	0.00			
17	100	0/11	0.00	100	1/12	0.09			
21	100	0/22	0.00	100	0/12	0.00	100	1/24	0.04
24	100	4/24	0.18	100	4/24	0.20	100	1/20	0.05
28	100	6/24	0.29	100	7/24	0.34	100	11/24	0.61
31	100	12/24	0.69	100	3/23	0.14	100	10/24	0.54
8— 5	100	7/24	0.34	100	8/23	0.43	100	4/12	0.41
7	100	5/24	0.23	100	1/12	0.09	100	7/24	0.34
11	100	10/21	0.64	100	2/ 7	0.34	100	4/24	0.18
18	100	0/22	0.00				100	2/24	0.09
20				100	0/24	0.00			
25	100	0/12	0.00				100	0/24	0.00

図 3 ドライアイス誘引未吸血蚊 JEV 保有率の推移

はA豚舎と同様すべて2-ME 耐性であった。生後4カ月の5頭のHI価は10倍から320倍の間にあったが、2-ME 感受性でワクチン接種による抗体と推測されるものと2-ME 耐性で移行抗体の残存を推定するものとが混在していた。

非接種C豚舎の採集蚊は7月15日迄10倍又はそれ以下のHI抗体価であったが、7月29日には上昇のきざしをみせ、8月5日すべて320倍以上となった。

接種豚舎の7月下旬迄の低いHI抗体価は吸血蚊抗体価、個別採血による血清の抗体価両者がほぼ等しく生ワ

クチン接種による抗体応答であろうと考えられる。8月上旬の接種豚舎のHI抗体の急激な上昇はその豚舎の吸血蚊の感染率の上昇より遅れているので豚集団の自然感染によるブースター効果の反映と考えられる。B豚舎のHI抗体の上昇がA豚舎より遅れているが、吸血蚊感染率の上昇もB豚舎が遅れており、吸血蚊を用いた抗体測定が吸血源である宿主の抗体反応を忠実に反映していることがわかる。

B) 1969年の成績

1969年は1968年から更に接種範囲を拡大した。図1の向代豚舎(C)を中心に半径約1km内の生後3カ月以上の肥育豚を接種の対象とした。この地域は鴨川堤防沿いに養豚業者が密集し、市内の豚総数の約60%、約6,000頭の豚が飼育されている。接種前の予備調査で飼育状態を把握し、6月12日から27日迄第1次、4,063頭、7月14日から17日迄第2次709頭、計4,772頭を接種した。この地域に飼育されていた豚は当時14豚舎5,868頭であったのでその81.3%が接種を受けた。未接種豚1,096頭の中には接種時から3週間以内にと畜場に送られる出荷予定豚878頭が含まれている。

1) 吸血蚊のウイルス感染率の推移(表4, 図2):

吸血蚊は接種地域の中心C豚舎とC豚舎の南方約4kmにある向島豚舎(D)一飼育頭数約600頭一で連日採集し、その感染率を検討した。

接種C豚舎は7月7日、8日、11日に吸血蚊からJEVが分離されたが、感染率は甚だ低率であった。その後7月20日迄JEVは分離されず、7月21日以降は連続的にJEVが分離された。感染率は次第に上昇して8月2日4.0%、8月5日3.4%のピークを示し、その後減少、8月14日には既に分離出来なくなった。

非接種D豚舎は7月6日から9日にかけて感染率は小さなピークを示し、恐らく前駆感染であつたと考えられる。一度分離は陰性となり、7月19日から連続的に陽性となった。感染率の最高値は8月4日9.4%である。接種豚舎、非接種豚舎の最高感染率を比較すると4.0%、9.4%と著差が認められるが、更に感染全期間中の感染効率を検討すると非接種豚舎の感染効率100に対し接種豚舎は25で接種豚舎の感染蚊の生産は1968年のB豚舎とほぼ同程度に抑制されていたと推測される。

2) 豚集団の HI 抗体価 (図2) :

非接種D豚舎の7月21日の吸血蚊抗体は6検体中5検体が10倍かそれ以下であるが、接種豚舎Cでは20倍3検体、40倍3検体でワクチン接種による HI 抗体の上昇が見られた。7月28日にはC、D両豚舎で HI 抗体が上昇傾向をみせ、吸血蚊の感染率のピークである8月4日には両豚舎共略々全検体が320倍になった。前年と同様ワクチン接種豚舎においても豚の一斉感染時期後には HI 抗体価の上昇が認められた。

3) ドライアイスによる誘引蚊の JEV 保有率 (表5, 図3) :

ドライアイスによる採集は3地点、すなわちC豚舎に近接した鴨川堤防上、D豚舎から約300m離れた水田あぜ道上、及びC豚舎から約9km北方の京都市街北端の岩倉(E)において実施した。採集は週2回行い、コガタアカイエカから JEV を分離して保有率を算出した。北部E地点は7月28日に最高値0.6%を示し、他の地点はこれよりおくれ、C地点が7月31日0.7%、D地点が8月5日0.4%の最高値に達した。E地点の保有率は以後次第に低下するが、C地点は0.6%、D地点は0.3%の第2のピークが8月11日同時に認められた。南部のC、D地点の保有率は2峰型の曲線をえがきパターンが似ているが、保有率の高さはワクチン接種地域C地点の方が非接種地域D地点より高い。

C) 1970年の成績

1970年は1969年より範囲を広げ、京都市65豚舎の生後3カ月以上の肥育豚すべてを対象に接種を行なった。接種は接種業務を委託された獣医師によつて、6月1日から6月24日に至る間に実施された。3カ月以上の肥育豚は当時の調査では全市で9,799頭で、そのうち8,907頭が接種を受けた。未接種豚は出荷予定750頭、異常豚142頭であつた。

1) 吸血蚊のウイルス感染率の推移 (表6, 図4) :

ワクチン接種豚舎としては前年と同じ向代(C)豚舎を、非接種豚舎としては京都市南方宇治市大久保の(F)豚舎をえらび、2日或いは3日毎に感染率を測定した。

接種豚舎Cは例年より約10日おくらせて8月2日に始め

表6 接種・非接種豚舎の吸血蚊感染率 (%)

1970年

採集所 採集月日	C (向代) 豚舎・接種			F (大久保) 豚舎・非接種		
	プール サイズ	JEV 分離率	JEV 感染率	プール サイズ	JEV 分離率	JEV 感染率
7—28	50	0/24	0.00	50	0/24	0.00
31	50	0/24	0.00	50	0/21	0.00
8—2	50	1/24	0.09	50	5/22	0.51
4	50	2/20	0.21	50	3/23	0.28
6	50	4/24	0.36	50	8/24	0.81
7	50	0/24	0.00			
9	50	14/24	1.74	50	8/18	1.17
11	50	6/24	0.57	10	18/24	12.95
13	10	2/24	0.87	10	5/13	4.74
15	10	15/24	9.35	10	8/24	3.97
17	10	11/24	5.95	10	8/24	3.97
19	10	11/24	5.95	10	13/23	7.99
21	10	7/23	3.56	10	12/24	6.70
23	10	11/24	5.95	10	4/24	1.81
25	10	10/24	5.25	25	7/18	1.95
27	10	6/24	2.84	25	1/4	1.14
29	10	3/24	1.33	25	0/12	0.00
30	50	11/24	1.22			
9—1	50	3/24	0.27	25	1/7	0.61
3	50	7/24	0.68	25	0/12	0.00
5	25	1/19	0.22	25	0/12	0.00
6	50	4/12	0.81	25	0/7	0.00
8	25	1/12	0.35	25	0/2	0.00
9	50	0/16	0.00	25	0/2	0.00
11	25	1/12	0.35	25	0/2	0.00
12	10	1/12	0.87

図4 ワクチン接種・非接種豚舎の吸血蚊感染率と HI 抗体価 (1970年)

て JEV を分離し、その後連続的に JEV を分離したが、分離期間は例年より長く、9月上旬末に JEV が分離されていた。感染率は最高は8月15日9.4%であつた。

非接種豚舎Fは8月2日から感染率陽性となつたが、

表 7 ドライアイス誘引未吸血蚊の JEV 保有率(%) (1970年)

採集 地点 採集 月日	C (向代) 地点			D (向島) 地点			E (岩倉) 地点			F (大久保) 地点		
	プール サイズ	JEV 分離率	JEV 保有率	プール サイズ	JEV 分離率	JEV 保有率	プール サイズ	JEV 分離率	JEV 保有率	プール サイズ	JEV 分離率	JEV 保有率
7—20	100	0/22	0.00	100	0/24	0.00				100	0/10	0.00
23	50	0/24	0.00	100	0/24	0.00	50	0/11	0.00	100	0/23	0.00
27	100	0/24	0.00	100	0/24	0.00	100	0/24	0.00	100	0/22	0.00
30	100	0/24	0.00	100	0/24	0.00	100	0/24	0.00	100	0/24	0.00
8—3	100	0/24	0.00	100	2/24	0.09	50	0/17	0.00	100	0/22	0.00
6				100	1/24	0.04	100	0/24	0.00	100	2/24	0.09
7	100	0/24	0.00									
10	100	3/22	0.15	100	1/24	0.04	100	2/24	0.09	50	1/24	0.09
13	100	7/24	0.34	100	0/24	0.00	100	2/24	0.09	100	2/12	0.18
17	100	16/24	1.09	100	3/23	0.14	100	8/24	0.41	100	8/12	1.09
20	100	14/24	0.87	100	4/24	0.18				50	0/15	0.00
24							50	4/24	0.36			
27	100	14/23	0.93	100	2/21	0.10				50	1/15	0.14
9—3	100	2/24	0.09	100	4/24	0.18	100	4/24	0.18	50	0/9	0.00
7							100	1/22	0.05			
10	100	7/24	0.34	100	0/20	0.00				50	0/24	0.00
17	25	0/2	0.00	50	1/12	0.17						

表 8 生 Vaccine 接種豚舎・非接種豚舎の JEV 感染状況 (1968—1970)

		1968		1969		1970	
接 種 豚 舎	豚 舎 名	出 橋	吉 祥 院	向 代	向 代	向 代	向 代
	飼 育 頭 数	265頭	131頭	607頭	522頭	522頭	522頭
	接 種 月 日	6.11 ; 6.25	6.11 ; 6.25	6.24 ; 6.27 ; 7.15	6.15 ; 6.24	6.15 ; 6.24	6.15 ; 6.24
	最 高 感 染 率	6.7% (8月5日)	2.7% (8月12日)	4.0% (8月2日)	9.4% (8月15日)	9.4% (8月15日)	9.4% (8月15日)
	感 染 期 間	7月22日～8月15日	8月1日～8月15日	7月21日～8月11日	8月2日～9月12日	8月2日～9月12日	8月2日～9月12日
	抗 体 上 昇 時 期	8月5日	8月20日	7月28日	8月17日	8月17日	8月17日
非 接 種 豚 舎	豚 舎 名	向 代	向 島	向 島	大 久 保	大 久 保	大 久 保
	飼 育 頭 数	約600頭	約600頭	約600頭	約300頭	約300頭	約300頭
	最 高 感 染 率	6.7% (8月3日)	14.5% (8月2日)	9.4% (8月4日)	13.0% (8月11日)	13.0% (8月11日)	13.0% (8月11日)
	感 染 期 間	7月22日～8月19日	7月25日～8月12日	7月19日～8月11日	8月2日～9月1日	8月2日～9月1日	8月2日～9月1日
	抗 体 上 昇 時 期	7月29日	7月29日	7月28日	8月17日	8月17日	8月17日
	前 駆 感 染	7月15日	7月15日	7月6日～7月9日	(一)	(一)	(一)

ピークはC豚舎より早く8月11日で、感染率は13.0%であつた。8月19日感染率の第2のピーク8.0%が認められ、9月1日を最後にC豚舎より早く JEV は分離されなくなった。1970年は前2年と異り、接種豚舎の感染率が非接種豚舎と同程度の高率を示した。又 JEV 分離が遅れて始まり、感染率陽性期間も長期間であつたのが特徴的である。

2) 豚集団の HI 抗体価 (図4) :

接種豚舎(C)採集の吸血蚊の HI 抗体は7月15日、7月19日の両回20倍～40倍程度認められたが、8月10日上

昇し始め、8月17日採集のものはほぼ160倍、8月24日に至ると2,560倍又はそれ以上となつた。

非接種F豚舎は8月10日迄すべての検体が10倍以下であつたが、8月17日採集のものはC豚舎と同じく抗体上昇のきざしが認められ、8月24日に至ると HI 抗体は著しく上昇して320倍以上となつた。いづれにしても本年の HI 抗体の上昇は吸血蚊のウイルス感染率の上昇と同じく、例年に比し甚しく遅延した。

3) ドライアイスによる誘引蚊のウイルス保有率 (表7, 図3) :

前年の採集地点 C, D, E の3地点に南部大久保豚舎から約100m離れた水田辺縁F地点を加え、4地点のドライアイス誘引蚊について保有率を検討した。

北部E地点は8月10日からJEVが分離され、8月17日保有率は0.4%のピークに達した。ピークの時期は昨年より約3週間おくれた。多数の養豚業者の密集する向代地域C地点の保有率は8月10日から陽性となりピークは8月17日で前年より約20日間おくれ、ピーク時の保有率は前年の0.7%よりやや高く1.1%であった。この地点のJEV分離も甚しく長期にわたり9月10日でも尚0.3%の保有率を示した。C地点の南向島D地点はJEVの分離がE, C地点より早く8月3日から始まった。保有率の最高値は低く8月20日の0.2%であったが、ピーク時期がおくれ、JEV分離期間が長びいたことは他地点と同様である。非接種地域のF地点は8月6日分離陽性となつて8月17日1.1%の最高値に達した。

D) 3年間の小括

3年間にわたり京都市内の肥育豚に対して種々の規模においては日脳生ワクチンを接種した結果を表8に要約した。

吸血蚊感染率によって特定豚舎の豚感染の状況を見ると、通常多数の豚がViremiaを起して吸血蚊の感染率が急激に上昇し、同時に或いはややおくれ吸血蚊HI抗体も上昇する所謂一斉感染期と、それより約12日以前に吸血蚊感染率が1日乃至数日間低い陽性を示す前駆感染を区別することが出来る。ワクチン接種豚舎においてはこの前駆感染が認められない例が多かつた。又1968年の豚舎で見たようにワクチン接種豚舎の豚感染が他豚舎より遅れる傾向が認められた。

1968年、1969年の接種豚舎におけるJEV流行の基本的特徴は接種豚舎内採集の吸血蚊感染率が非接種豚舎に比し最高値において低く、又感染効率を指標にすると、全感染期間を通じての感染蚊の生産が著しく抑制されていたことであつた。

しかし1970年の接種豚舎の感染率は前2年と異り非接種豚舎より著しく低率になることはなかつた。又接種豚舎の感染期間も長期にわたつたので接種豚舎の感染蚊の生産が著しく抑制された所見は認められなかつた。1970年接種豚舎の感染率が期待通りに低下しなかつた原因として、流行開始が遅延したため流行期に多数の感受性豚が接種地域に流入したことが考えられる。図5はワクチン接種豚が残存する率を同一豚舎について接種後、日を追つて追求したものである。1969年、1970年と比較すると、1969年は流行開始時接種豚残存率は90%、流行末期でも70%以上であるのに対し、1970年は流行の遅れにより流行開始時既に接種豚が約50%しか残っていなかつ

図5 某豚舎におけるワクチン接種豚残存率と吸血蚊のウイルス分離期間との関係

た。

1969年、1970年は接種範囲が拡大したので、地域的な豚免疫がドライアイス誘引による未吸血蚊のJEV保有率に影響したかを検討したが、接種地域、非接種地域の各地点によつて未吸血蚊のJEV保有率に差がある所見は得られなかつた。

考 察

井上(1964)によつてJEVの弱毒変異株m株が報告されて以来、m株を種ウイルスとする生ワクチンの試作が行われ、人工哺乳仔豚を使用した室内実験(Kodama et al., 1967)、コガタアカイエカの感染実験(Takahashi et al., 1969)によつて、m株生ワクチンの有効性、安全性が確認されたが、これを野外に応用した場合、その効果判定には幾つかの困難な問題がある。

高橋らは沓岐における野外実験(長崎県報告1968)で、と場に出荷された接種豚のHI抗体が生ワクチン接種によつて上昇していることを報告した。我々の実験においても接種豚は吸血蚊抗体、個別採血共にHI抗体陽性を示し、生ワクチン接種による抗体産生が認められたがその抗体レベルは高くなかつた。日脳流行期に多数の

有毒蚊が豚を一斉に感染させる時期になると接種豚舎採集の吸血蚊抗体価は急激に上昇する。室内実験で生ワクチンを接種した豚に強毒株で攻撃を加えると、Viremiaは検出出来ないにもかかわらずHI抗体は1,280倍以上になったと報告されている(家畜衛生試験場1969)ので野外においても接種豚が自然感染によつてViremiaを起さずHI抗体価が上昇することが考えられる。しかし野外実験の接種集団にはワクチン接種時、移行抗体を保有しているために接種が有効でない豚が含まれ、それらの豚が自然感染によつて高いHI抗体を示す可能性が少なくないであろう。我々が行った1968年の接種豚の個別採血では、接種時2カ月、3カ月の若令豚はHI抗体価40倍又はそれ以下が100%であつて、そのうち2-ME試験を実施したものはすべて2-ME耐性であつた。これに対し、4カ月、7カ月の豚の大部分はHI抗体価40倍以上であつたが、4カ月豚には2-ME試験によつて移行抗体の残存を推測させるものが半数近く存在したので、生ワクチン接種は4カ月以上の豚を対象とすることが望ましいと考えられる。

豚に対するワクチン接種がJEVのPig-mosquito cycle中での増幅抑制を期待している以上、その効果の判定に媒介蚊のJEV保有率が検討されるのは当然である。大谷ら(1967)は不活化ワクチンを使用して接種地域と非接種地域の未吸血蚊のJEV保有率を検討したが、接種地域の保有率が有意に低いとは認められなかった。我々のドライアイスによる誘引未吸血蚊のJEV保有率においても接種地域のものが低率であるとは云えなかった。又JEV保有率は我々の成績では1%以下であるから、地域差を検討するには低すぎるきらいがある。

コガタカイエカの飛翔能力は最大1日4km~5km程度と推測されるので(前田1968)、ある地点で採集した未吸血蚊によつてその地域のJEV侵淫度を推定するには慎重でなくてはならない。又採集法が同じでも採集地点の僅かな相異によつて採集される蚊が質量共に異なることが多い点も考慮しなくてはならないであろう。

離島という特殊な条件下で実施された沓岐の実験では、沓岐各地の未吸血蚊のJEV分離率が九州本土の分離率より低く分離パターンも異つていると報告されているが(長崎県1968)、接種前の沓岐におけるJEV侵襲状況が調査されていないことが問題である。長崎沓岐(長崎県1968)大阪府下(上羽ら1969)の野外実験では未吸血蚊のJEV保有率の差をワクチンの効果判定の一方法としているが、上述の方法論上の問題点が解決されているとは云えない。

我々が本野外実験で用いた方法は、ドライアイスによ

る誘引、Sweeping等によつて未吸血蚊を採集し、JEV保有率を検討する従来の方法と異り、豚舎内のLight-trapで吸血蚊を採集し、一定期間飼育後そのJEV感染率を求めて、各豚舎の豚集団に対するJEV侵襲状況、有毒蚊の生産状況を推定したものである。吸血したコガタカイエカの飛翔距離は短いから(唐牛ら1970)、豚舎内Light-trap採集の吸血蚊の吸血源は主としてその豚舎内の豚であると考えてよい。従つてこの吸血蚊を飼育し蚊体内のJEVを増殖せしめて感染率を把握すれば、それは蚊を感染せしめた豚のViremiaの存在を鋭敏にとらえていることになる(唐木, 1968b)。我々はこの方法によつて幾つかの豚舎のJEV侵襲状況を推定したが、生ワクチンを接種した豚舎においては、この方法により感染蚊の生産の抑制—豚集団のViremiaの抑制の面からワクチンの効果判定に利用することを試みた。

1968年、1969年のワクチン接種豚舎の吸血蚊感染率が非接種豚舎よりはるかに低いことは、ワクチンの有効性を表現していると考えられよう。接種豚舎の最高感染率は非接種豚舎の $\frac{1}{2}$ 以下であり、全感染期間を通じての感染効率是非接種豚舎の20%~40%であつた。

1970年の成績は吸血蚊の感染率が接種豚舎、非接種豚舎で差がなかったが、この原因は流行期が予想以上におくれ、流行開始時期に多数の感受性豚が移入されていたと考えられる。現在の養豚経営形態では間断なく新入荷豚(感受性豚)が移入されるから、ある地域の肥育豚を100%免疫しても、その後の入荷豚の免疫を絶えず続行しないと、流行期に感受性の豚が残こり、生ワクチン接種豚舎においても有毒蚊の生産は進行することになる。

ワクチン接種によつて豚におけるJEVの増幅を抑制しようとする試みは生態学的理論根拠を有しており、我々の野外実験も生ワクチンの安全性、有効性を明らかにしたものであると考えているが、この種の野外応用研究に際しては実施計画、効果判定方法に慎重な配慮が必要なることを指摘したい。

謝 辞

本研究は京都市衛生研究所衛生動物部門との共同研究である。研究の立案、実施に創意を發揮した同部門前田理博士に深謝する。又野外実験の実施に当つて援助をいただいた、京都市衛生局(局長松山雄吉博士)、経済局、京都府農林部、微生物化学研究所(所長佐々木文存博士)、京都大学ウイルス研究所井上幸重博士に謝意を表する。

Summary

Since 1968 to 1970, field studies in immunization of pigs have been carried out in Kyoto city, to control the transmission of Japanese encephalitis virus (JEV) into mosquito population. One or one and half months before JE epidemic season, a total of 13,900 pigs was vaccinated with the live attenuated Japanese encephalitis vaccine (m-strain) produced by Dr Inoue. No serious side reaction due to the vaccination was reported.

The result of the vaccination was followed by the determination of the hemagglutination inhibition (HI) antibody level in pigs and by the survey of the infection rate of engorged mosquitoes caught in pig pens. To determine the HI antibody level, blood in visibly engorged mosquitoes was employed. The infection rate was calculated from the JEV isolation rate of engorged mosquitoes which had been incubated for 7-10 days after collection.

HI antibody titers of 1:20 or 1:40 were observed in the vaccinated pigs although the secondary sharp rises were noted at a time when the wide spread of JEV was observed in nature. The infection rates of the pig pen administered with vaccine were markedly lower than the rates of those not vaccinated; the former was less than 1/2 of the latter at the highest point of the infection rates.

These results suggest that vaccination on pigs seems to be applicable in the field to reduce the density of infected mosquitoes.

文 献

- 1) Buescher, E. L. and Scherer, W. F. (1959). Ecologic studies of Japanese encephalitis virus in Japan. IX. Epidemiologic correlation and conclusion. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 8, 719-722.
- 2) Chiang, C. L. and Reeves, W. C. (1962). Statistical estimation of virus infection rates in mosquito vector populations. *Am. J. Hyg.* 75, 377-391.
- 3) Clarke, D. H. and Casals, J. (1958). Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 7, 561-573.
- 4) Inoue, Y. K. (1964). An attenuated mutant of Japanese encephalitis virus. *Bull. WHO.* 30, 181-185.
- 5) 唐木利朗, 前田理 (1968 a). 吸血“カ”による日本脳炎 HI 抗体測定. *医学のあゆみ*, 65, 582-586.
- 6) 唐木利朗, 土屋夏実, 黒田晃生, 尾崎良克 (1986 b). 日本脳炎ウイルスのコガタアカイエカによる感染実験とその疫学的応用. *ウイルス*, 18, 397 (第16回ウイルス学会総会記録).
- 7) 唐牛良明, 加藤陸奥雄, 石田名香雄, 白地良一, 白取剛彦, 山本仁, 今野二郎 (1970). 日本脳炎媒介蚊を中心とした水田地帯の蚊の吸血源の解析. *医学のあゆみ*, 74, 648-650.
- 8) Kodama, K., Sasaki, N. and Inoue, Y. K. (1967). Studies of live attenuated Japanese encephalitis vaccine in swine. *J. Immun.* 100, 194-200.
- 9) Konno, J., Endo, K., Agatsuma, H. and Ishida, N. (1966). Cyclic outbreak of Japanese encephalitis among pigs and humans. *Am. J. Epid.* 84, 292-300.
- 10) 前田理 (1968). コガタアカイエカの生態—成虫の移動分散について. *衛生動物*, 19, 137-138 (衛生動物学会第20回大会シンポジウム).
- 11) Oya, A. (1967). The role of mammals as primary and supplementary host. *Jap. J. Med. Sci. Biol., Suppl.* 20, 26-30.
- 12) 大谷明, 奥野剛 (1967). 日本脳炎ウイルス. *ウイルス実験学各論*. 丸善. 東京.
- 13) Scherer, W. F., Moyer, J. T., Izumi, T., Gresser, I. and McCown, J. (1959). Ecologic studies of Japanese encephalitis virus in Japan. VI. Swine infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 8, 698-706.
- 14) Svehag, S.-E. and Mandel, B. (1964). The formation and properties of polio virus neutralizing antibody. I. 19s and 7s antibody formation; differences in kinetics and antigen dose requirement for induction. *J. Exp. Med.*, 119, 1-19.
- 15) 高橋克巳, 松尾礼三, 熊正昭, 馬場純一, 野口英太郎, 田口末春, 松本照, 合沢竜信, 浜里徳雄 (1968). 豚人工免疫による日本脳炎ウイルス保毒蚊の増幅抑制に関する研究予報. *熱帯医学*, 10, 181-184.
- 16) Takahashi, M., Yabe, S. and Okada, T. (1969). Effects of various passages on some properties of an attenuated strain of Japanese encephalitis virus with special regard to mosquito infectivity. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* 22, 163-174.
- 17) 上羽昇, 光田文吉, 前田章子, 大津啓二他 (1969). 日本脳炎の疫学に関する研究 (第5報). VIII. ワクチンによる豚の日本脳炎ウイルス増幅抑制実験. 大阪府公衛研研究報告. 7, 69-74.
- 18) 農林省家畜衛生試験場 (1969). 生ワクチンの感染防禦効果の研究. 日本脳炎の流行阻止に関する特別研究. 科学技術庁研究調整局. 東京.
- 19) 長崎県衛生部, 長崎県農林部 (1968). 長崎日本脳炎予防特別対策事業報告書. 長崎県衛生部環境衛生課. 長崎.