原 著

日本脳炎アジュバントワクチンの研究

I. 日脳アジュバントワクチンによるブタ のウイルス血症予防

安 藤 泰 正

STUDIES ON THE INACTIVATED ADJUVANT VACCINE AGAINST JAPANESE ENCEPHALITIS VIRUS.

I. Experiments on the prophylaxis of viremia in swine.

Yasumasa ANDO

The Nippon Veterinary and Zootechnical College, Tokyo

[受付: 4月1日1971年]

総 括

日本脳炎ウイルス（以下日脳ウイルスと略す）の増幅動物としてのブタを免疫し、そのウイルス血症を阻止することにより、日脳ウイルスの散布を抑制することを目的として実験をおこなった。

東京産の50～80日齢のブタを20頭用いて精製不活化ワクチンに等量のドラケオール、6を添加したアジュバントワクチンの1回接種および2回接種を行ない、最終免疫後の8週目に JaGAR 01ウイルス感染マウス脳（10%乳剤（106.5～7.2LD₅₀/0.02ml マウス）を2ml または4mlを腹部皮内に直接攻撃をおこない、ウイルス血症の測定は、全血を乳のみマウス脳内に接種して観察し、次の成績が得られた。

1. アジュバントワクチンの1回接種ではブタを確実に免疫することはできなかった。

しかし、1:10以上の HI 抗体価の認められた例では、大量の野外株ウイルスの直接攻撃に対して、そのウイルス血症の発生を阻止した。

2. アジュバントワクチンの2回（7週間間隔）接種によってブタに確実に免疫賦与ができ、産生 HI 抗体の

持続が3カ月以上の長期に及び、しかも、大量の野生株日脳ウイルスの直接攻撃においてもウイルス血症の発生を阻止した。

序 文

わが国における日本脳炎（日脳と略す）の流行発生に対しては、ヒトおよびウマへの日脳ワクチンの接種ならびに媒介動物の駆除がおこなわれているが、その発生数には多少の差はあるが、なお、毎年患者が発生している。

この事実は、蚊、特に媒介蚊のコガタアカイエカが、わが国の住民の密集地帯である平地、すなわち、都市周辺の水田地帯を繁殖地とする特殊性によるものと考えられ、蚊の完全な撲滅は期待し得ない状況にある¹⁾。

一方、自然界において、温血動物はもちろん、冷血動物²⁾といえども日本脳炎ウイルスの侵入を受けると脳炎の発症はなくとも、体内でウイルスが増殖してウイルス血症を発生することが明らかにされて来た。これらの動物中、特にブタは、近年住宅および水田の近辺に多く飼育育成されているので、この育成ブタによって日脳ウイルスが増幅される事実が Scherer らによって指摘されている。しかもこれらのブタは、日脳ウイルスの侵入に

よつてウイルス血症を発生⁹⁾するが、発症することはまれである。しかしながら、妊娠母豚に感染した場合には死産を発生せしめて産業的⁹⁾にも多大の損害を与えている。

このブタに、ウマ型ワクチンを試みた成績⁵⁾⁷⁾¹⁰⁾はあるが、その効果は不明瞭である。

私達は、かねてより日本脳炎不活化アジュバントワクチン²⁾（以下ア・ワクチンと略す）を液状ワクチンに換えてブタに使用し、ウイルス血症はもちろん、死産を予防することを目的として実験を重ねてきたので、その成績の一部を報告する。

実験材料および実験方法

供試アジュバントワクチンは、人体用に高度精製されたホルマリン不活化ワクチン（窒素量0.08 mg/ml 以下、ED₅₀ 42.5~3.0）に、アジュバントとして等量のドラケオール-6を加え、water in oil に調製したものを用いた。

攻撃用ウイルスは、JaGAR 01 感染マウス脳10%乳剤（マウス LD₅₀ 106.5~7.2/0.02ml）を使用した。

供試豚は、生後50~80日齢の東京産の幼豚20頭を使用した。

抗体の測定は、赤血球凝集抑制反応（HI）により、JaGAR 01 株、中山株を用い、2・メルカプトエタノール処理を併用し、HI 抗体価の測定を行なった。

ワクチン接種部位は、頸部筋肉内に行ない、ア・ワクチンの1回接種法、および2回接種法について実験をおこなった。

ワクチン接種量は、1回5mlとし、1回ア・ワクチン接種法では、移行 HI 抗体の存在するブタ5頭、および移行 HI 抗体の消失したブタ5頭、対照豚2頭に行い。2回ア・ワクチン接種法では間隔を7週間として5頭に接種を行ない、対照豚3頭を同居させて実験を行なった。

ウイルス攻撃は、最終ア・ワクチン接種後7週目にウイルス攻撃を皮内接種法で行ない、1回ア・ワクチン接種群では、ウイルス液2ml、2回接種群では4mlの接種を行なった。

ウイルス血症の証明は、ウイルス攻撃後翌日から12日間にわたり、ヘパリンを加えて採血した全血0.02mlを1腹の乳のみマウスの脳内に接種し、へい死マウスの有無で判定し、更に、へい死マウスは、0.5%牛アルブミン加 PBS(-)で10%脳乳剤を造り、成熟マウス脳内に接種して確認し、更に病理組織学的に再確認を行なった。

実験成績および考察

移行抗体の未消失の5頭のブタにア・ワクチン5mlの接種を試みた結果が、図1に示すように、ワクチン接種前より高い HI 抗体価（1:80）の No. A-4 では、徐々に HI 抗体価の下降が認められるが、ア・ワクチンによる HI 抗体価の上昇は認められなかった。しかしながら、移行抗体価が HI 1:10~40 の No. A-2, No. A-3 No. A-5 において、No. A-3 ではア・ワクチン接種5週間目、No. A-2 では7週間目、また No. A-5 では14週間目より HI 抗体価の上昇が徐々に認められ、HI 1:20 の HI 抗体価が得られた。

図1 移行抗体未消失ブタにアジュバントワクチン1回接種による HI 抗体の測定

これらア・ワクチン接種の No. A-1, No. A-3 と無処置対照ブタ No. 1 の3頭にウイルス攻撃として JaGAR 01 ウイルス感染マウス脳10%乳剤を2ml、各ブタの腹部皮内に接種し、その翌日から12日間毎日1回採血し、乳のみマウス脳内に接種し、ウイルス血症の出現を観察した結果、対照ブタ No. 1 では3日間ウイルスが分離された（図中卅でウイルス血症を示す）。

移行抗体が存在し、ア・ワクチン接種によつて HI 抗体価の上昇の認められなかった No. A-1 では、ア・ワ

図 2 移行抗体未消失ブタにアジュバントワクチン1回接種による HI 抗体の測定

クチン接種7週間後のウイルス攻撃により2日間ウイルス分離が陽性(図中卅で示す)であつたが、移行抗体が存在してもア・ワクチン接種で、HI 抗体価の上昇した No. A-3 では、ア・ワクチン接種後7週目のウイルス攻撃において、ウイルス血症は見られなかつた。

母体からの移行 HI 抗体価の消失したブタに対してア・ワクチン5mlの接種を試みた結果が図2である。HI 抗体価により免疫効果を観察すると、No. B-3, No. B-4, No. B-5 では HI 抗体価の上昇が認められた。しかし、No. B-1, No. B-2 では HI 抗体価の上昇は認められなかつた。この移行抗体の消失したブタに、ア・ワクチンの接種により、ウイルス血症を阻止できるか確かめるために、No. B-1, No. B-3, 無処置対照ブタ No. 2 の3頭に、ウイルス攻撃として、ア・ワクチン接種後7週目に JaGAR 01 ウイルス感染マウス脳10%乳剤を2ml, 各ブタの腹部皮内に接種し、ウイルス攻撃後翌日から12日間毎日1回採血し、その全血を乳のみマウス脳内に接種し、ウイルス血症の出現を観察した結果、無処置対照ブタ No. 2 では、ウイルス攻撃の翌日から3日目までの3日間のウイルス分離が陽性(図4中卅で示す)であつたが、ア・ワクチン接種で HI 抗体の上昇の認め

図 3 アジュバントワクチン2回接種(計10ml)のブタの HI 抗体の測定

られなかつた No. B-1 は、ウイルス攻撃後2日目から2日間のウイルス分離が陽性(図2中卅で示す)であつた。しかし、ア・ワクチン接種により HI 抗体の上昇の認められた No. B-3 では、ア・ワクチン接種後7週目にウイルス攻撃を行なつたが、ウイルス血症は陰性(図中(-)で示した)であつた。

ア・ワクチン5mlを7週間々隔で2回接種を試みた結果が図3である。初回ア・ワクチンの接種を4月2日に行なつたが、No. C-3, No. C-5 は、この初回ア・ワクチン接種で HI 抗体価の上昇は認められなかつたが、No. C-1, No. C-2, No. C-4 で低い HI 抗体価の上昇が認められた。

これらのブタに次回ア・ワクチン接種を7週後の5月23日におこなうと、1週間後には全例ともに HI 抗体価の上昇が認められた。初回ア・ワクチン接種で HI 抗体価の上昇が認められた No. C-1, No. C-2, No. C-4 では、いずれも1週間後には急激な HI 抗体価の上昇が見られ、1:640以上に達し、3カ月以上までも HI 1:160以上の抗体価の持続が見られた。

図4 無処置ブタの J.E. ウイルス攻撃による HI 抗体価およびウイルス血症の測定

また、初回ア・ワクチン接種で抗体産生の認められなかった No. C-3, No. C-5 においても、次回ア・ワクチン接種後、徐々に HI 抗体価の上昇が見られ、次回ア・ワクチン接種後3週間目には、HI 1:160 の最高値を示し、徐々に下降する様子ではあるが、3カ月以上も持続した。ア・ワクチンの2回接種によつて産生された HI 抗体価でウイルス血症を阻止できるか試みるために、初回ア・ワクチン接種で HI 抗体が産生され、ア・ワクチンの再接種で高い HI 抗体が産生された No. C-1, 初回ア・ワクチン接種では、抗体産生が認められず、再接種で HI 抗体が産生された No. C-3 と無処置対照 No. 3, No. 4 の4頭に、ア・ワクチン2回目接種8週間後の7月22日ウイルス攻撃として感染マウス脳10%乳剤を4ml、各ブタの腹部皮内に接種をおこなった。ウイルス攻撃後12日間にわたつて毎日1回採血し、その全血を乳のみマウス脳内に接種し、ウイルス血症の観察を行なつた結果、無処置対照ブタ No. 3 では、ウイルス攻撃後1日目、2日目、4日目の3日間のウイルス分離が陽性(図4, 冊で示す)であり、No. 4 では、ウイルス攻撃後翌日から4日間のウイルス分離が陽性(図4, 冊で示す)であつたが、ア・ワクチンを2回接種

した No. C-1, No. C-3 ではウイルス分離は陰性であつた。

以上の成績から、ブタに1回5mlのアジュバントワクチン接種においては、免疫効果を HI 抗体価の上昇および野外株ウイルスの直接攻撃により観察すると個体差があり、免疫効果は不確実であつた。しかし、アジュバンとワクチンの2回(計10ml)接種法においては、ア・ワクチンの再接種により全例のブタに確実に長期間の HI 抗体の免疫賦与ができ、しかも野外株日脳ウイルスの大量の皮内直接攻撃において、発生すべきウイルス血症を阻止できた。アジュバントワクチンの2回接種により長期間の免疫賦与がブタにできることから、日脳ウイルスの散布を阻止する手段として有効なワクチンであると考えられた。

おわりに、終始ご鞭撻いただきました日獣畜大教授大久保薫博士、予研細菌部部长福見秀雄博士、種々ご指導をいただきました東芝生研橋本治雄博士、馬場貞義博士、種々ご援助いただいた教室員の方々に深く感謝いたします。

(本研究の要旨は第9回日本熱帯医学会総会(昭和42年11月)で口演を行なつた。)

Summary

Prevention of viremia of Japanese encephalitis virus (JEV) in naturally infected swine is one of the most important and necessary measures for the prophylaxis of human JEV infection in Japan, and effective vaccination procedures for animals are expected.

Twenty healthy swine, between 50-80 days of its age, borne in Tokyo were selected and immunized against JEV, by injecting 5 ml of Toshiba's purified JEV inactivated vaccine which suspended with equal volume of Dorakeol-6.

Eight weeks after the last immunization, intradermal virus challenge was made by inoculating 2 or 4 ml of 10% emulsion of JaGAR 01 strain infected mice brain ($10^{6.5-7.2}$ LD₅₀ in mice). Detection of viremia was made by the intracerebral inoculation of the blood samples of the immunized swine into a litter of suckling mice.

The results obtained are summarized as follows:

1) Equivocal effectiveness of our adjuvant vaccine was observed when animals were immunized by the single injection method, however, the animals responded to the vaccination by the production of JE HI antibodies greater than 1:10 in their titer were consequently free from viremia when they were challenged by the wild type of JE virus.

2) Duplicated vaccination made on the animals at 7 weeks after the first ones, induced considerable amounts of long lasting JE HI antibodies, and all the animals did not manifest viremia when they were challenged.

文 献

- 1) 朝比奈正二郎, 安富和男, 緒方一喜(1963): 航空散布による水田のコガタアカイエカの駆除実験, 衛生動物, 14: 241-244.
- 2) アジュバントワクチン研究委員会(1963-1969): インフルエンザのアジュバントワクチンに関する討論会, 細菌製剤協会.
- 3) Burns, K. F. (1950): Congenital, Japanese B encephalitis infection of swine. *Proe, Soc, Exp. Med.*, 75: 621-625.
- 4) 土井陸雄, 大谷 明(1969): トカゲ類の日本脳炎感染に関する研究, 予研年報, 23: 77.
- 5) 福住定吉, 椿 精一, 升 茂, 島田文茂, 川口 允(1950): 豚の流産並びに発症予防に流脳ワクチンの応用, 日本脳炎, 81-83.
- 6) 星 修三, 伊藤 全, 尾高 実(1950): 1948年及び49年に実施された馬流行性脳炎予防注射の成績, 日本脳炎, 119-126.
- 7) 川窪 淳, 中村 肇, 竹原孝一, 中村稔治, 藤 井 毅(1967): 1964年静岡県における豚の日本脳炎性流産死の予防試験, 日獣会誌, 20: 255-260.
- 8) 川島秀雄, 椿原彦吉, 清水武彦, 須川幸夫, 望月圭二, 中村稔治, 山本修太郎(1949): 昭和23年に多発した豚の特殊死産について, 日本脳炎, 250-254.
- 9) 児玉和夫, 佐々木文存, 井上幸重(1966): ブタにおける弱毒日本脳炎生ワクチンの研究, 第14回日本ウイルス学会発表.
- 10) Akira OYA. (1967): The role of mammals as primary and supplementary hosts. Report to the 11th Pacific Science Congress, 1966, Japan. *J. Med, Sci, Biol.*, 20: (suppl.), 26-30.
- 11) 大谷 明, 奥野 剛(1967): 日本脳炎ウイルス, ウイルス実験学, 丸善, 124-162.
- 12) Scherer, W. F., Moyer, J. T., Izumi, T., Studies of Japanese encephalitis virus in Japan, VI. Swine infection. *Am, J, Trop. Med. Hyg.*, 8: 698-706.
- 13) 清水武彦, 川上善三(1949): 豚の流行性死産に就て(特に日本脳炎との関係に就て), 家衛試研究報告, 22: 117.
- 14) 渡辺守松(1969): 豚の日本脳炎, 日獣会誌, 22, 3: 85-90.