節足動物媒介ウイルスの生態学的研究

第5報 蚊と日本脳炎

松山達夫, 中村忠義

群馬県立衛生研究所

大谷 明, 緒方隆幸

国立予防衛生研究所

1959年より群馬県をフィールドにしてアルボウィルスの生態学的研究を開始して間もなく、日本脳炎(JE)の流行の規模とその年の蚊(カ)のウィルス保有状況との間に密接な関係があることが判明した。即ち従来ばく然とカが多い年はJEが流行するといわれたが、実際には非流行年に於てもかなりの数のカが発生するが、大部分がウィルスを保有していないという点が、流行年と大きくことなっていた。本報ではこれらの流行を左右する因子のうちカに関する部分を報告する。

I 材料および方法

1. JE患者：本研究においては、届出患者とは別に、血清学的に（特殊な症例は他のウィルス学的方法により）JEであることが証明されたもののみを確認患者Confirmed caseとして流行の規模を示す基準とした。また県内医療機関の協力を得て一定の条件¹⁾をそなえた熱性疾患についても極力JEの血清診断を実施した。

2. 血清学的ウィルス学的診断：患者血清は10～14日間かくで採取した急性期、回復期のペア血清を用い症例によっては1～3ヵ月後の血清も採取した。血清診断には赤血球凝集抑制反応と補体結合反応を併用しJEの中山株、G-1, JaGAR O1等の抗原のほか、Akabane, Bebaru, Getah, Sagiyama, Sindbis, Negishi, Russian Spring-Summer Encephalitis, Bunyamwera等のアルボウィルス抗原を適宜併用した。血清学的にJEが否定された症例についてはムンプス、ポリオ、コクサッキー、エコー等鑑別を要するその他のウィルスに対する検索を実施した。なお一部の年度に於ては群馬大学衛生学教室今村晋教授によりレプトスピラの検査を行った。剖検材料は脳の細片ま

たは脳内穿刺物をウィルス分離用とした。剖検が夜間等で医療機関から即日送付が出来ないときは、50%グリセリン食塩水に入れ4°Cで保存する方式をとった。

3. カの採取地点：表1のように群馬県平野部に散在する次の各地点で実施した。なおカッコ内は県内最南東に所在する板倉を基点とした直線距りを示した。板倉、赤羽(5Km)、館林(邑楽村渋沢牧場, 16Km)、太田(25Km)、桐生(30Km)、伊勢崎(40Km)、前橋(50Km)、高崎(60Km)。地勢その他の詳細は別報²⁻⁴⁾に記載した。

4. カの採取方法：カの発生がみとめられる4月下旬より、捕かく不能となる11月上旬までの間、各週3日間畜舎、水田等予め定めた実験条件⁵⁾に基づき夜間採取を実施した。採取方法としては吸虫管、ナイロンネットによるSweeping、加藤式、高橋式捕蚊器を含む各種マグネットラップ、ライトトラップ、ドライアイス法等が使用された。なお、ウィルス分離に適する方法と、カが発生数や種類の分布状況を推定するのに適する方法とは若干異なるので、その詳細は別に記載した²⁻⁵⁾。

5. カよりのウィルス分離：表1のように年により多少変更があったが、概略次の通りである。採取したカは飼育籠に移し一夜生存させ、吸血した血液を消化させたのち、翌日クロロホルムで殺し、カの種類を分類しメスのみ地区別、日別、種類別に50匹を1単位としてプールし虫体のまま接種するまで-70°Cに凍結保存した。

接種直前に滅菌乳鉢でカをすりつぶし、別記の稀釈液を加えて乳剤とし、0°Cの氷水槽に1時間おいたのち、冷凍遠心器で10,000r.p.m. 10分間遠心し、その上清を生後2～4日の哺乳マウスに0.02ml 脳内接種した。なお、マウスはカ1プールにつき2 litter 用い

表1 カの採取方法その他

年 度	地 区	採 取 方 法 *	1 プール	稀 釈 液 (量) **
1959	板倉, 赤羽, 太田, 桐生, 伊勢崎, 高崎	吸 虫 管 (以下ライトトラップ併用)	100匹	2%RSS CT2.0, CP4.0, 他6.0ml
1960	板倉, 赤羽	加 藤 式 捕 蚊 器 ナイロンネット	100	2%HSS CT4.0, CP6.0
1961	板倉, 赤羽, 桐生	高 橋 式 捕 蚊 器 ナイロンネット	50 AVのみ100	2%HSS Culex 4.0, 他3.0
1962	板倉, 館林, 前橋	ナイロンネット, 吸虫 管, ドライアイス	同 上	同 上
1963	板倉, 高崎	同 上	同 上	2%CSS
1964	板倉, 西谷田	ド ラ イ ア イ ス	CT 50 他 100	2%CSS Culex 2.0, 他 3.0
1965	板倉 (曾根, 海老瀬)	同 上	同 上	同 上

* ライトトラップのカはウイルス分離には使用しなかった。

** CT: コガタアカイエカ、CP: アカイエカ、AV: キンイロヤブカ、RSS: ウサギ血清緩衝食塩水、HSS: 同ウマ血清、CSS: 同コウシ血清

5頭以下および9頭以上の哺乳マウス数の littr は使用しないこととした⁵⁾。接種後1日2回10日間かん察し、発症したマウスは採脳して 10^{-8} 乳剤を次のマウスに継代し同定試験に移すと共に、残余の乳剤でチオグリコレート培地を用い無菌試験を実施した。同定は赤血球凝集抑制反応および補体結合反応で行なった。

6. 稀釈液および稀釈の大きさ: カの乳剤を作るための稀釈液には、PH7.4の正常血清加緩衝食塩水(血清の種類により RSS, HSS, CSS に区分)を用い、カ50匹あたりコガタアカイエカは2.0ml, 他種は3.0mlの割合で加えた⁵⁾。血清は1959年を除き北海道のJE非流行地で採取したコウシまたはウマ血清を使用した。調製に際しては、予め正常血清(中和抗体のないことを確認)を 56°C 30分加熱し、最終濃度2%になるように緩衝生理食塩水(PBS)に加え、ペニシリン500 μ /ml, ストマイ500 γ /ml添加した、PBSは0.5M Na_2HPO_4 18mlと0.2M KH_2PO_4 5mlに生理食塩水を加え、総量1,000mlとしたものである。

7. 分離効率: 陽性プール数/被検カ数 $\times 1,000$ で示した。

8. 研究組織: 既報のメンバーのほか本報に関連のある野外実験および患者血清診断等には予研 小林 正美, 片岡政夫, 矢部貞雄, 韓行徳, 清水康資, 群馬衛研土屋幸子, 岡田佐登子, 砂盃圭子が参加した。

Ⅱ 成 績

1. カの生態: 1959年以来群馬県内の数カ所でカの発生消長をしらべた結果, 多くの現象が明かになった²⁻⁷⁾。そのうち本報に関連の深い点を記すと次の通りである。

a) 採取されたカは *Culex triaeniorhynchus*, *Culex pipiens*, *Culex bitaeniorhynchus*, *Culex vorax*, *Culex orientalis*, *Aedes vexans nipponii*, *Aedes albopictus*, *Aedes togoi*, *Anopheles spp.*, *Mansonia uniformis*, *Mansonia ochracea*, *Ar-*

migeres subalbatus 等 12種に分類された。このうち比率の高いものは *Culex tritaen.*, *Culex pipiens*, *Aedes vexans*, *Anopheles spp* であった。

b) 距離的にかなり接近した2地点であっても環境条件により発生するカの数、種類、比率等がかなりことになっていた。また、カの動物嗜好性による影響もみられ、例えばわずか十数mしかはなれていないニトリ小屋とウシ小屋では採取されるカの種類の著明な差がみられた。

c) 図1のように同一地点では、コガタアカイエカはほぼ毎年6月上旬頃に出現し、7月上旬に最高に達し9月上旬頃まで続き、以後漸減して、10月末に消失し、かなり一定していた。図にみられるように農薬散布による影響は一時的であってすみやかに回復する。以上の事項が、ウィルス保有状況の研究の基礎となった。

図1. コガタアカイエカの発生曲線とウィルス保有 (板倉地区)

1964, 1965年の図はJJMSB, 20, Suppl. 26-30, 1967および第6報18)を見よ。

2. カのウィルス保有状況: アルボウィルスのいろいろの目的を含めてフィールドワークを行ったので採

取方法、器具、地点その他が年により表1のように若干ことになっているが概況は次の通りである。

a) 出現状況: 1959年に平野部の6地点をえらび、カのウィルス保有状況をしらべた結果、赤羽を除きすべての地点からJEウィルスが得られた。また、1961年には平野部北側の桐生と約30km南の板倉、赤羽の2地区とを比較したところ1週間以内の差で3地点ともJEウィルスが出現していた。よって板倉地区の調査で県内平野部のウィルス汚染状況を推定しても大きな誤りはないだろうとの決論に達し、別項の患者発生との関係も主として、板倉地区のデーターを基準とした。

b) JEウィルスはコガタアカイエカ *Culex tritaen* およびアカイエカ *Culex pipiens* の2種からのみ検出され、他種からは全く得られなかった。その割合は表2のように1959—1963年の間に分離されたJEウィルスの約99%はコガタアカイエカからとれており、アカイエカは極めて少数例外的であった。なお、分離されたウィルスはいずれもJaGAR o1型であって旧来の中山株と諸性質がことになっていた。

c) コガタアカイエカの発生とそのウィルス保有の時期は一致せず、図1のように春から夏の半ばまではきれいなカのみ出現しており、7月中旬から8月中旬の間に突然ウィルスを保有するようになる。即ちカの数が高点に達しても依然ウィルスが現われず、約1カ月おくらせてウィルスが出現する年が多い。一旦ウィルスが出現するとウィルス保有率は50~300匹に1匹の割合であって、かなり高率であった。非流行年であっても流行年に比べてくにコガタアカイエカの発生が少いということとはなかった。

d) その他: 吸血活動をしていないオスのカはすべてウィルス陰性であった。また自然界のカにJEウィルスが高率に証明される8月中旬に水田から幼虫(ボーフラ)を採取し、約10,000匹につき実験室内で飼育し成虫とし、一定日数、高気温環境においてからウィルス分離を行ったが、すべて陰性であった。また、初夏までの間に発生したカを糖液ですべて人工飼育し、高気温環境に一定日数おいてからウィルス分離を行ったが矢張り陰性であった。また板倉で昼間飛来するカおよびカ以外の吸血節足動物約7,000匹を採取し、ウィルス分離が行われたが、ウィルスJEはすべて陰性であった⁴⁾。これらの事実は北岡ら⁸⁾によってコロモジラミ、イエダニ、南京虫、マダニ等はJEウィルスを保

有する能力がなく、ゴキブリ、ハエ等は人工的に感染させてもウィルスは短時間で消失し、カ以外は J E ウィルスは陰性であることが報告されているが、これらと相まってヒトの感染に直接つながる因子はコガタアカイエカが唯一のものであり、J E の流行をカにより予測するにはコガタアカイエカの動向を調査すればよいことが判った。しかもカの体内でウィルスが越冬する可能性はほぼ否定され、何物かからウィルスを得てヒトへ伝える役割をはたしていることが立証された。

3. J E 患者発生とコガタアカイエカのウィルス保有との関係：前記のカに関するデータをもとにして患者発生との関係をみた。表 3 にカの調査が 7 カ年間継続した板倉の数値を中心に表示した。

a) 患者数との関係：表 3 で明かのように 1958, 1961, 1964 のように群馬県においてはほぼ 3 年周期で J E の大流行がみとめられている。この関係を板倉地区に於けるコガタアカイエカのウィルス保有状況と比較すると、流行年においては、いずれも 7 月中にウィルスが検出されており、ウィルス汚染カの早期出現と持続期間の長いことが特徴である。同時にカの数に対するウィルス分離数も多く、いわゆるウィルス分離効率

で示すと、他の年より高かった。逆に非流行年は、夏おそく出現し比較的短期間に消失する傾向にある。殊に分離効率は大中小の流行規模にかなり忠実に平行していた。

b) 患者発生期間との関係：従来患者は年間を通じて届出されていたが、血清診断その他による Confirmation を行った結果、夏季ウィルス保有カが出現している期間を中心に限られた範囲のみがウィルス学的に真性の J E であることが判った。その関係は表 3 のようにいずれもその夏はじめてカに J E ウィルスが証明されてからある期間おくれで初発の患者が発生していることが明瞭に示されている。この期間は板倉以外の地区のデータも総合すると平均 2 週間である。次に患者発生の終そく時期は表 3 のカのウィルス保有期間の終末とほぼ同時か、またはそれより一定期間おくられてウィルス学的に陽性の患者は発見されなくなっている。なお、非 J E のうち、ウィルスが分離され、または血清学的に確認され病因の判明したものは ECHO 6, ECHO 4, Mumps 等であった。なお、患者の鑑別に関する詳細は別報に記載した。

表 2 カからのウィルス分離

年 度	カ 採 取 数	J E 陽 性 プ ー ル		Non— J E 総 数 (種 別) *
		総 数 (種別) *	地 区	
1959	52,642	39 (CT38, CP1)	板倉8, 其他31	8 (AV6, CT2)
1960	♀ 62,995	11 (CT9, CP2)	板倉9, 赤羽2	
1961	74,306	68 (CT68)	板倉23, 赤羽12, 桐生33	7 (AV2, CT5)
1962	146,037	39 (CT39)	板倉35, 前橋4	4 (CT4)
1963	144,369	39** (CT39)	板倉37, 高崎2	4 (AV4)

* CT: コガタアカイエカ、CP: アカイエカ、AV: キンイロヤブカ

** Subzero事故(落雷)で高崎地区8月20日以降のプールは実施不能となった。

表3 JE患者発生と板倉地区コガタアカイエカウイルス保有状況

年 度	陽性患者* (届出数)	同発生期間 **	カからのウィルス分離		オ ト リ 動 物 そ の 他 ****
			陽 性 期 間	分 離 効 率	
1959	6 (25)	8月上—9月中	(8月下—9月中)	***	ND
1960	0 (13)	0	8/24 — 8/31	1 (5/4,920)	ND
1961	33 (71)	8月上—9月下	7/20 — 9/28	2 (23/12,089)	ウサギ 8/17
1962	15 (55)	8月下—9月下	8/1 — 9/12	1.5 (34/22,500)	ヤ ギ 8/22
1963	1 (17)	9月13日+	8/7 — 9/25	1.2 (37/31,891)	ヤ ギ 9/5
1964	32 (66)	8月上—9月下	7/23 — 8/20	***	ヤ ギ 9/2, ブタ7/15
1965	13 (48)	8月中—9月中	8/17 — 9/29	***	ブ タ JEV 8/3
1966	8 (14)	8月下—9月中	ND		ブ タ JEV 8/2

* 届出以外の陽性者を含む、なお1958年は31(71)

** 各月とも上、中、下旬に区分

*** 実施方式が異なる。

**** 日付は抗体初発を示す。ND：実施せず、JEV：ウイルス分離陽性

十 高崎(患者)地区のカ陽性は8月20日

Ⅲ 考 察

7カ年間のJEウイルス保有状況と患者発生との関係を調査した結果、夏の自然界のカにウイルスが証明されている期間を中心にウイルス学的にJEと断定される患者が発生していた。夏カにウイルスが早く出現する年に患者が多発することは、カの発生自体が平年通りであってもウイルス保有カの出現期間が長く、総数が多くなり、ウイルス保有カに刺されるチャンスが高いためと考えられる。非流行年においてもカの発生はとくに少くはないことから、原因はカへのJEウイルスの他動物(アンプリファイヤー)からの供給状況の変動と思われる。既報⁹⁾のブタが100%抗体陽性になると、その地区のカからウイルスが消失することをもこれを証明している。なお、今野ら¹⁰⁾がブタとカの間に2伝播サイクルをみとめたことや、日照、気温等吸血活動を止める条件が判ったことは、流行年と非流行年のカの生態につき有力な手がかりを得たものといえよう。また大塚ら¹¹⁾は東日本ではカの発生のピーク

のあとにカへのJE感染がおこるのでウイルス出現の早い年はピークと一致して、絶対数が大となり大流行しおそくなればそれだけ、ピークから離れて非流行年になるとのべている。一方九州方面は逆のパターンを示し、カのピークより先に有毒カの出現があり、そのため有毒出現がおくれた年の方が患者が多発するという見解をのべている。高橋ら^{12,13)}の長崎での調査では有毒カの出現がきわめて早く、カのピークとの関係、ヒトの流行との関係等に特異なパターンを示していることが判明した。また林ら^{14,15)}の長崎と鹿児島を比較したデーターでも長崎地方の有毒カの早い出現をみとめており、アルボウイルスの生態は局地的な性格が強いことを示している。更に流行の3年周期も東日本に限られているようであり、それも戦後みられた現象といわれ、この分野における研究が今後さらに必要であることが痛感される。

Ⅳ 決 論

1959—1965年まで7カ年間群馬県をフィールドにし

て調査を行った結果、次のことが判った。

1. 採取されたカは12種に及んだが、コガタアカイエカとアカイエカのみJEウイルスを保有し、他種からは全く得られなかった。カはJE株の約99%はコガタアカイエカに由来した。

2. 初夏までのコガタアカイエカはウイルスを保有せず、夏の途中にいわゆる増市動物からウイルスを大量に供給され、有毒化してヒトの流行を起すことが確認された。

3. JEおよび類似疾患に対し年間を通じて調査した結果、ウイルス保有カが飛来している夏季以外はウイルス学的に真性のJE患者は発見出来なかった。

4. JE患者の発生はウイルス保有カ出現より平均2週間おくれて始まり、ウイルス保有カ消失と同時に若干おくれて終止する。

5. カにウイルスが早く出現する年ほど患者発生が多く、流行の規模はコガタアカイエカのウイルス分離効率とよく一致していた。

なお、増市動物を含めこれらの総合的な問題については大谷¹⁶⁾が第11回太平洋学術会議で述べた。

文 献

- 1) 国立予防衛生研究所：群馬県における節足動物媒介ウイルス病の疫学調査案。1959：群馬県衛生民生部，同疫学調査研究についての協力依頼。1959。
- 2) Oya, A. et al. : Ann. Rep. Arbor Virus Study Group of NIH, Japan. 1959, 1960, 1961.
- 3) Matsuyama, T. et al. : Isolation of Arbor Viruses from Mosquitoes collected at live-stock pens in Gumma Prefecture in 1959. Japn. J. Med. Sc. Biol. 13, 191—198, 1960.
- 4) 国立予防衛生研究所年報, XIII (1959)—XX (1966), 東京。
- 5) 予研ウイルス四室，群馬県衛生研究所：節足動物媒介ウイルス野外研究の概要，1961；1962年度の群馬県における *Arbor Virus* 野外研究の手引；同 1963；同 1964。
- 6) 大谷明：蚊と日本脳炎ウイルス，科学，32，28—33，1962；最新医学，17，1281—1284，1962；公衆衛生，26，265—272，1962。
- 7) 大谷明ほか：群馬県におけるコガタアカイエカの日本脳炎ウイルス保有の年度別変化と，その人の日本脳炎流行との関係，日本ウイルス学会総会，1963；日本医学総会，1963。
- 8) 北岡正見：国立予防衛生研究所二十年のあゆみ，P. 18，1967。
- 9) 中村忠義ほか：節足動物媒介ウイルスの生態学的研究，第4報 日脳ウイルスアンプリファイヤーとしてのブタの意義，北関東医学（投稿中）。
- 10) 今野二郎：日本脳炎の疫学，東北のコロニー，No. 15, 31, 1967。
- 11) 大塚悟：第4回日本脳炎生態学研究会，東京，1967。
- 12) Takahashi, K. et al. : Studies on Mosquito Infection with Japanese Encephalitis virus in 1964 in Nagasaki Prefecture. Endem. Dis. Bull. Nagasaki., 7, 165—177, 1965.
- 13) 高橋克己ほか：1965年，長崎県における日本脳炎流行の疫学的研究，第1報，コガタアカイエカからの日本脳炎ウイルス分離状況，長崎大学風土病紀要，8，1—7，1966。
- 14) Hayashi, K. et al. : Isolation of Japanese Encephalitis Virus from Mosquitoes collected in Omura District, Nagasaki Prefecture, Endem. Dis. Bull. Nagasaki., 7, 155—164, 1965.

- 15) Hayashi, K. et al. : Ecologic Studies on Japanese Encephalitis Virus. Isolation of JE virus from mosquitoes collected in Nagasaki and Kagoshima districts, Japan, 1965. *Endem. Dis. Bull.* 8, 61-73, 1966.
- 16) Oya, A. : The role of mammals as primary and supplementary hosts. (Symposium on arbovirus diseases, animal vectors and reservoirs). The 11 th Pacific Science Congress, Tokyo, 1966.

ECOLOGIC STUDIES OF ARBOVIRUS IN GUNMA PREFECTURE, JAPAN.
V. MOSQUITOES AND JAPANESE ENCEPHALITIS.

TATSUO MATSUYAMA and TADAYOSHI NAKAMURA

Gunma Prefectural Institute of Health, Maebashi

AKIRA OYA and TAKAYUKI OGATA

The National Institute of Health, Tokyo.

Mosquito factors concerning the human epidemics of Japanese encephalitis (JE) were strongly suggested from the data of the field trials during 1959 to 1965. In these research programs, mosquitoes were collected at study sites every year from May to October and tested for JE virus, and specimens from the patients clinically diagnosed as encephalitis and other related illness were examined throughout the year for etiological agent.

The results are as follows:

- 1) 12 species of mosquitoes were collected in study sites. However, JE virus was isolated from only *C. tritaeniorhynchus* and *C. pipiens*, and from none of other species. About 99% of isolates were obtained from *C. tritaeniorhynchus* and it was the most commonly infected mosquito in this area.
- 2) By serologic and virologic examinations, no JE patient was found except in the summer season when the mosquito infections were observed.
- 3) Mosquito infection in this area was regularly limited to the period from July to September, and the first human cases occurred about 2 weeks after the first isolate was obtained from mosquitoes.
- 4) In the years of major outbreaks, infected mosquitoes were found earlier than in normal years and high isolation efficiency (ratio of infected to total *C. tritaeniorhynchus* populations) was also observed.