

日本脳炎生ワクチン(S⁻株)による雄豚の造精機能障害 および精液によるウィルス散布の予防について

羽生 章*・楯島敏男*・中島勇三*・小林正大*・宮下光男*杉森 正**
藤崎優次郎**・小笠 晃**

Application of Live Virus Vaccine (S⁻) to the Prevention of Obstruction of Spermatoge- nesis and Viral Discharge in Semen of Boars Infected with Japanese Encephalitis Virus

Akira HABU, Toshio NARASHIMA, Yuzo NAKAJIMA, Masadai KOBAYASHI, Mitsu MIYASHITA, Tadashi SUGIMORI, Yujiro FUJISAKI
and Akira OGASA

(要 旨)

雄豚の造精機能障害が夏季に多発することは、経験的に知られており、雄豚が日本脳炎ウィルスに感染すると造精機能障害をおこし、かつ、精液中にウィルスが排出されることは、実験的に証明されているので、雄豚の造精機能障害と精液によるウィルス散布を防止するために、生ワクチン(S⁻株)を雄豚に接種して、その安全性と有効性を調べた。日本脳炎生ワクチン(S⁻株)を雄豚に3~5週間隔で2回接種すると抗体産生がみとめられ、食欲不振、発熱などの臨床的異常はみとめられず、ウィルス血症もみとめられなかった。また(S⁻株)接種後2か月間原則的に週1回採取した精液の性状を、精液量、膠様物、pH、精子数(1ml中)、総精子数、精子の生存指数および奇形率などについて調べたが、とくに異常はみとめられなかった。また、(S⁻株)を2~3回接種した免疫雄豚において、HI価320および40の2頭の雄豚に対して、野外(AS-6)株を皮下に攻撃接種したが、攻撃後食欲不振、発熱などの臨床的異常はみとめられず、ウィルス血症もみとめられなかった。さらに攻撃後2か月間、原則的に週1回採取した精液の性状を、精液量、膠様物、pH、精子数、総精子数、精子の生存指数および奇形率などについて調べた。また攻撃後2か月間精漿を哺乳マウスの脳内に接種してウィルスの回収を試みたが、ウィルスは精液中には排出されなかったため、(S⁻株)を雄豚に接種しても、安全であり、かつ、日本脳炎ウィルスの感染による造精機能障害および精液中へのウィルスの排出を防止するのには有効であると考えられた。

ま え が き

夏季に発生する雄豚の造精機能障害は経験的に知られており、當場においても、1966年の日本脳炎(以下JEVと略す)の流行期である8月下旬に、1種の雄豚が発熱し、9月上旬に造精障害を起したことを経験している。羽生ら¹⁾、小笠ら²⁾は雄豚がJEVに感染すると造精機能障

害を起し、かつ、精液中にウィルスが排出され、組織学的にも総鞘膜、精巣上体間質に炎症性変化が観察されることを報告した。また羽生ら³⁾は精液中にJEVを混入して、発情中の雌豚に人工授精して、JEV感染が起ることを報告した。このような雄豚の造精機能障害と精液によるウィルス散布を予防するために、生ワクチン(S⁻株)を雄豚に接種して、その安全性と有効性を調べた。

* 東京都畜産試験場経営部 青梅市新町715

** 農林省家畜衛生試験場 小平市上水本町

試験材料および方法

1. 生ワクチン(S⁻株) (以下S⁻株と略す)の雄豚に対する安全性試験

生後7~8ヶ月令の抗体陰性の雄豚3頭を用いて(S⁻株)を1頭には3週間間隔で2回, 1回に10mlを耳根部皮下に接種した。また2頭には5週間間隔で2回, 1回に2mlを同様に耳根部皮下に接種した。(S⁻株)のウィルス価は $10^{5.5}$ TCID₅₀/mlであった。接種後体温, 食欲などの臨床症状を調べた。また接種後7日間毎日採血して, そのヘパリン血漿を哺乳マウスの脳内に接種して, ウィルス血症を調べた。また原則として1週間隔で採血して, そのアセトン処理血清を用いて, 薬研中山株の抗原8単位を使用して, 予研法に準じてHI抗体を調べた。また約1週間隔で採取した精液の性状^{5,6)}(精液量, 膠様物, pH, 精子数, 総精子数, 活力, 奇形率など)を調べた。

2. (S⁻株)の雄豚に対する有効性試験

上記試験実施後8ヶ月を経過した冬季に, 防蚊設備を完備した豚房で飼育した2頭の試験豚に対し, HI抗体40価の豚はそのまま, <10の豚には(S⁻株)10mlを耳根部皮下に接種した後, 野外(AS-6)株を皮下に攻撃接種した。そのウィルス価は $10^{6.0}$ LD₅₀/0.03mlであった。攻撃後安全性試験と同様に体温, 食欲などの臨床症状, ウィルス血症およびHI抗体価の推移を調べた。また約1週間隔で採取した精液の性状を調べるとともに, 精液を3000回転, 10分間遠心し, 精漿を分離して, -80℃に保存し, その0.03mlを, 哺乳マウスの脳内に接種して精液中のウィルス回収を8週間試みた⁴⁾。発症マウスについ

てはPBSで10%脳乳剤をつくり, 哺乳マウスおよび組織培養により継代証明を行った。

試験結果および考察

1. (S⁻株)の雄豚に対する安全性

(1) 試験豚の臨床症状:(S⁻株)接種豚の体温, 食欲など一般臨床症状について調べた。

ア. 食欲:試験豚の食欲は(S⁻株)接種により, 3頭とも, とくに異常はみとめられなかった。

イ. 体温:(S⁻株)接種豚の体温の変化を示すと, 図1のとおりである。3頭の接種豚はいずれも38~39.7℃の範囲で, 40℃以上にはならなかった。

(2) 試験豚のウィルス血症:(S⁻株)接種豚のウィルス血症発現の有無を示すと表1のとおりで, いずれの接種豚も, 接種後1週間ウィルス血症はみとめられなかった。

(3) JEVに対する血清中のHI抗体の推移:(S⁻株)接種豚のJEVに対する血清中のHI抗体価の推移を示すと図2のとおりである。Na1の豚では, 2回接種後1週目に160に上昇し, 16週後に<10となった。Na2の豚では1回接種後2週目に640に上昇しその後320から漸減して, 8ヶ月後40を示していた。またNa3の豚では1回接種後3週に20を示し, 4週後に<10となり, 2回接種後1週に160を示し, 13週後に<10となった。

(4) 試験豚の精液性状:(S⁻株)接種豚の精液性状は次のとおりである。

ア. 精液量, 膠様物, pH:精液量, 膠様物, pHについて示すと図3および図4のとおりである。精液量, 膠

表1 日本脳炎生ワクチン(S⁻株)接種雄豚のウィルス

豚 No	生ワクチン S ⁻ 株接種	ウィルス血症						
		接種後日数						
		1	2	3	4	5	6	7
Na 1	10 ml $10^{5.5}$ TCID ₅₀ /ml	—* 0/10**	— 0/11	— 0/11	— 0/10	— 0/9	— 0/8	— 0/9
Na 2	2 ml $10^{5.5}$ TCID ₅₀ /ml	— 0/8	— 0/10	— 0/10	— 0/9	— 0/10	— 0/10	— 0/7
Na 3	—	— 0/9	— 0/10	— 0/8	— 0/9	— 0/7	— 0/11	— 0/10

* 哺乳マウスの脳内接種による生ワクチンのウィルス血症の有無

**分母:接種哺乳マウス数, 分子:発症哺乳マウス数

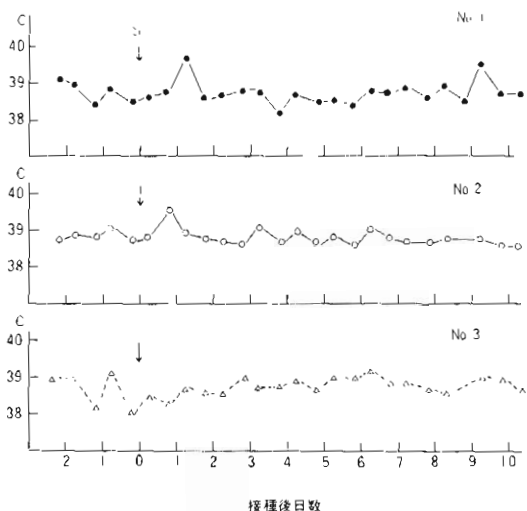


図1 日本脳炎生ワクチン (S⁻株) 接種雄豚における体温の変化 (1)

様物, pH は多少のパラツキはみとめるが, とくに異常はみとめられなかった。

イ 精子数と総精子数: (S⁻株) 接種豚の 1 ml 中の精子

数および総精子数を示すと図5および図6のとおりである。1回目の(S⁻株)接種によりNa3の豚がいく分精子数および総精子数が減少したが, 次回よりは回復しており, Na1, Na2の豚では(S⁻株)接種により変化はなかった。精子数はNa1が 3.24 ± 1.24 億, Na2が 2.13 ± 0.93 億, Na3が 4.14 ± 1.68 億であった。また総精子数はNa1が 537.2 ± 188.5 億, Na2が 423.0 ± 259.2 億, Na3が 596.0 ± 207.5 億であったから(S⁻株)接種により異常はみとめられなかった。

ウ. 精子の生存指数と奇形率: (S⁻株) 接種豚の精子の生存指数および奇形率は図7のとおりである。精子の生存指数はNo1では, 78.8 ± 2.5 , No2は 76.7 ± 2.0 , No3は 77.9 ± 2.6 であって, (S⁻株) 接種によりとくに異常はみとめられなかった。また奇形率は, Na1が $1.33 \pm 0.59\%$, Na2が $1.56 \pm 1.57\%$, Na3が $3.68 \pm 2.33\%$ であった。Na3は試験開始時から4週ごろまで, 7.91~5.0とやや高かったが, (S⁻株) 接種以前より高く, 尾部奇形の精子が多かったためであるから, 奇形率についてもとくに異常はみとめられなかった。従って, JEV感染予防のために雄豚に(S⁻株)接種することは, 精液性状に悪影響を与えないものと考えられた。

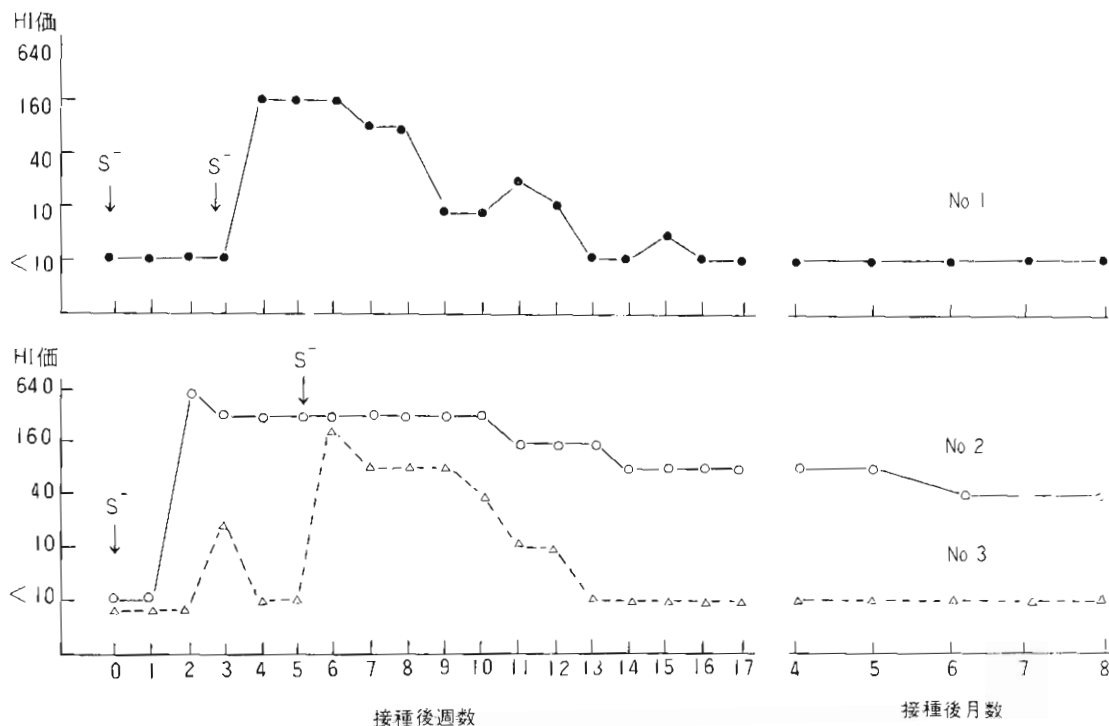


図2 日本脳炎生ワクチン (S⁻株) 接種雄豚におけるHI抗体価の推移

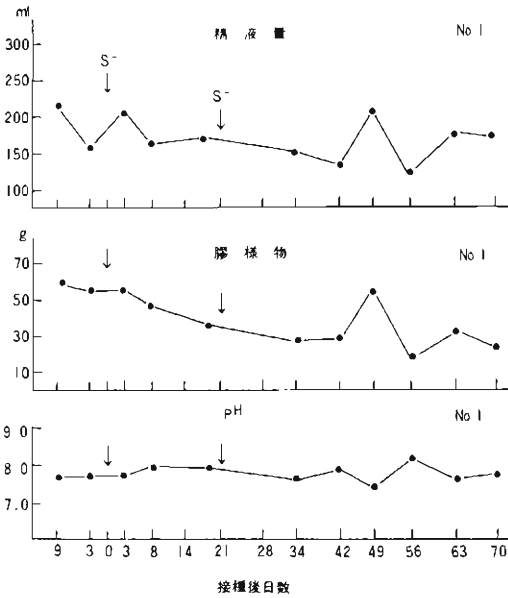


図3 日本脳炎生ワクチン (S⁻株) 接種雄豚における精液性状の変化 (1)

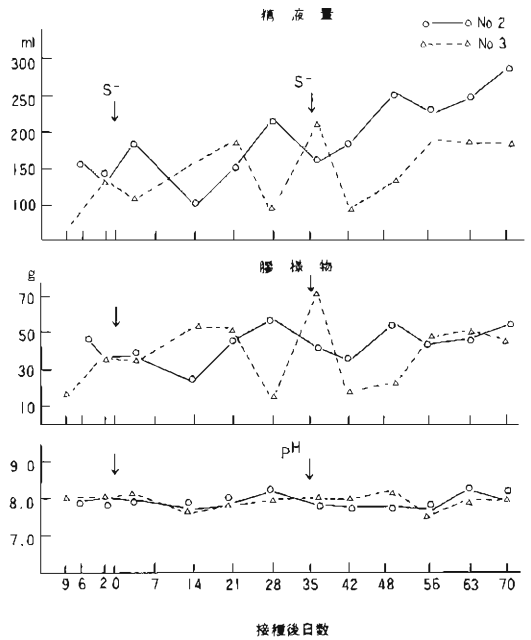


図4 日本脳炎生ワクチン (S⁻株) 接種雄豚における精液性状の変化 (2)

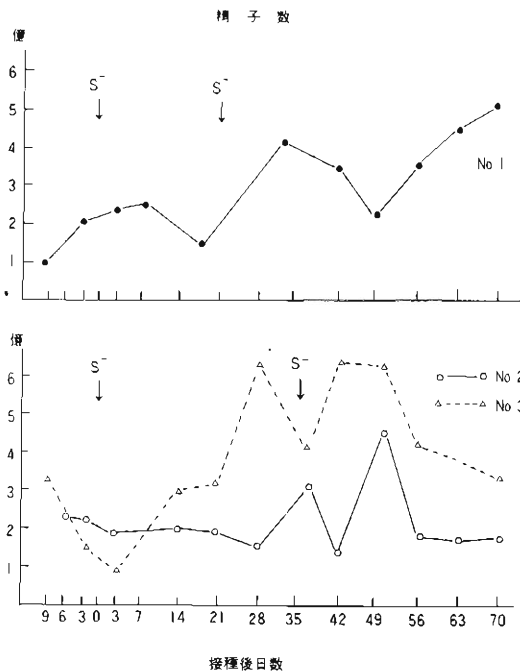


図5 日本脳炎生ワクチン (S⁻株) 接種雄豚における精液性状の変化 (3)

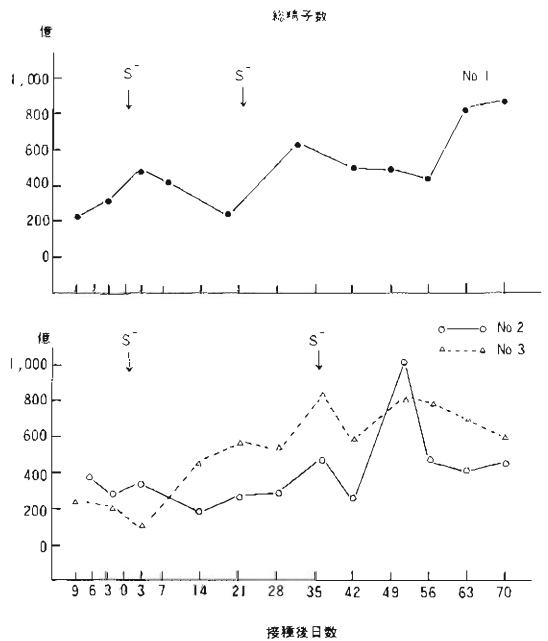


図6 日本脳炎生ワクチン (S⁻株) 接種雄豚における精液性状の変化 (4)

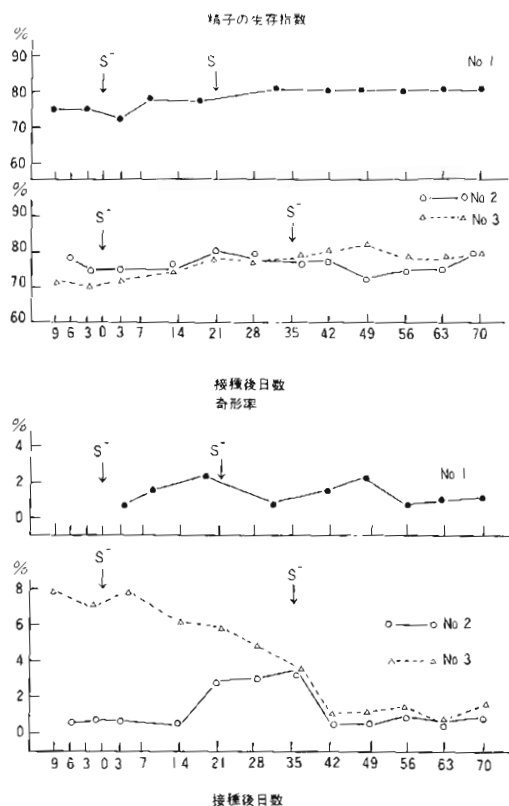


図7 日本脳炎生ワクチン(S⁻株)接種雄豚における精液性状の変化(5)

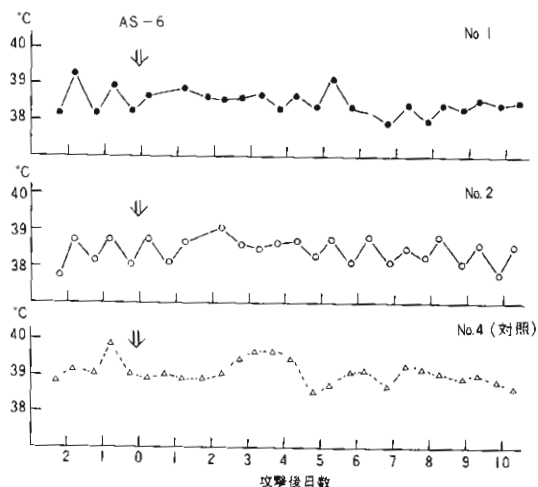


図8 日本脳炎生ワクチン(S⁻株)免疫雄豚の攻撃後における体温の変化

2. 生ワクチン(S⁻株)免疫雄豚の造精障害およびウイルス散布予防試験

(1) 試験豚の臨床症状：(S⁻株)免疫雄豚の野外分離(AS-6)株による攻撃後の臨床症状を、食欲、体温などについて調べた。(AS-6)株の攻撃により(S⁻株)免疫雄豚の食欲は、正常でとくに落ちるようなことはなかった。また体温の変化を示すと図8のとおりである。今回は対照をとくに設けなかったため、前回のJEV感染実験豚を対照(No 4)として示した。無処置対照のNo 4は(AS-6)株攻撃後3日目、4日目にそれぞれ39.5°C、39.7°Cで上昇傾向を示したが、40°C以上にはならなかった。(S⁻株)で免疫した豚はNo 1は37.9~39.2°Cであり、No 2は37.6~39.0°Cでいずれも40°C以上にはならなかった。

(2) 試験豚のウイルス血症：さきの試験豚のうち2頭についてHI抗体価を調べたところNo 1は(S⁻株)接種8ヶ月後HI価<10であったので、さらに(S⁻株)を、10ml接種し、No 2はHI価40であったからそのまま(AS-6株)を皮下に攻撃接種した。攻撃後のウイルス血症は表2のとおり、対照豚では攻撃後3日間ウイルス血症がみとめられたが、(S⁻株)接種豚では2頭とも攻撃後7日間ウイルス血症はみとめられなかった。

(3) 試験豚におけるJEVに対する血清中のHI抗体価の推移：試験豚のJEVに対する血清中のHI抗体の推移を示すと図9のとおりである。対照豚が攻撃1週後に640、その後やや漸増して2560となり、4週後から1280と攻撃後著しい抗体上昇がみとめられた。(S⁻株)接種豚では、攻撃後No 1は抗体上昇がなくなり、No 2は攻撃後640と抗体上昇が軽度であった。なお攻撃時のHI抗体価はNo 1が320、No 2が40であった。

(4) (S⁻株)免疫雄豚の攻撃後における精液性状の変化：(S⁻株)免疫雄豚の攻撃後における精液性状の変化を調べるために採取直後の精液の性状を、精液量、膠様物量、pH、1ml中の精子数、総精子数、活力、奇形率などについて攻撃後8週間調べた。その成績はつぎのとおりである。

ア. 精液量、膠様物、pH：(S⁻株)免疫雄豚の攻撃後における精液量、膠様物量、pHは、図10のとおりである。精液量は対照豚が、240.1±44.8mlで、(S⁻株)免疫豚のNo 1が239.6±30.2ml、No 3が240.1±44.3mlであった。膠様物量は対照豚が36.6±18.2gで、(S⁻株)免疫豚ではNo 1が66.0±17.8g、No 2が55.5±9.0gであった。pHは対照豚が7.85±0.15で(S⁻株)免疫豚ではNo 1が7.92±0.42、No 2が7.78±0.31であった。徒って、精液量、膠様物、pHについては、対照豚、(S⁻株)接種豚

表2 日本脳炎生ワクチン (S⁻株) 免疫雄豚の攻撃後におけるウイルス血症

豚 No	生ワクチン 接種種	攻 撃 接種種	ウ イ ル ス 血 症							
			攻 撃 後 日 数							
			1	2	3	4	5	6	7	
No 1	10 ml 3 回 10 ^{5.5} TCID ₅₀ / ml	(AS-6株) SC 1 ml 10 ^{6.0} LD ₅₀ /0.03 ml	—* 0/10**	— 0/10	— 0/12	— 0/10	— 0/10	— 0/10	— 0/10	— 0/9
No 2	2 ml 2 回 10 ^{5.5} TCID ₅₀ / ml	''	— 0/8	— 0/10	— 0/11	— 0/10	— 0/10	— 0/10	— 0/10	— 0/10
No 4	無 処 置 対 照	''	+ 10/10	+ 10/10	+ 9/9	— 0/8	— 0/9	— 0/9	— 0/9	— 0/9

* 哺乳マウスの脳内接種によるウイルス血症の有無

**分母：接種マウス数，分子：発症マウス数

表3 日本脳炎生ワクチン (S⁻株) 免疫雄豚の攻撃後における精液からのウイルス回収

豚 No	生ワクチン 接種種	攻 撃 接種種	ウ イ ル ス 回 収										
			攻 撃 後 日 数										
			2	3	7	14	17	21	28	35	41	48	56
No 1	10 ml 3 回 10 ^{5.5} TCID ₅₀ / ml	(AS-6株) SC 1 ml 10 ^{6.0} LD ₅₀ /0.03 ml	—* 0/10**	ND	— 0/8	— 0/9	ND	— 0/9	— 0/8	— 0/10	— 0/10	— 0/10	— 0/10
No 2	2 ml 2 回 10 ^{5.5} TCID ₅₀ / ml	''	— 0/10	ND	— 0/7	— 0/8	ND	— 0/9	— 0/9	— 0/10	— 0/9	— 0/11	— 0/10
No 4	無 処 置 対 照	''	ND	+ 4/10	— 0/9	ND	+ 6/10	— 0/7	— 0/12	— 0/11	— 0/10	— 0/10	ND

* 哺乳マウスの脳内接種による精液からのウイルス回収の有無

**分母：接種マウス数，分子：発症マウス数

とも多少のバラツキは認められるがとくに異常はみとめられなかった。

イ. 精子数と総精子数：(S⁻株)免疫雄豚の攻撃後における1 ml中の精子数および総精子数は図11のとおりである。対照豚では攻撃後9日目より減少を始め、20日、23日には、2533万、18万と減少しさらに28日目には無精子状態となりその状態が7週後まで続いていた。しかしながら(S⁻株)接種豚では、No 1が攻撃後やや精子の減少傾向を示したが、1 ml中1億以下にはならなかったので、

とくに異常とはみとめられなかった。No 2は異常はみとめられなかった。総精子数についても同様の傾向がみとめられた。1 ml中の精子数は対照豚が0.175±0.377億で、(S⁻株)接種雄豚ではNo 1が2.928±1.569億、No 2が3.728±1.339億であった。また精子数は対照豚が27.2±60.26億で、(S⁻株)接種豚ではNo 1が692.9±334.1億、No 2が920.4±370.2億であった。

ウ. 精子の生存指数と奇形率：(S⁻株)接種雄豚の攻撃後における精子の生存指数と奇形率は図12のとおりであ

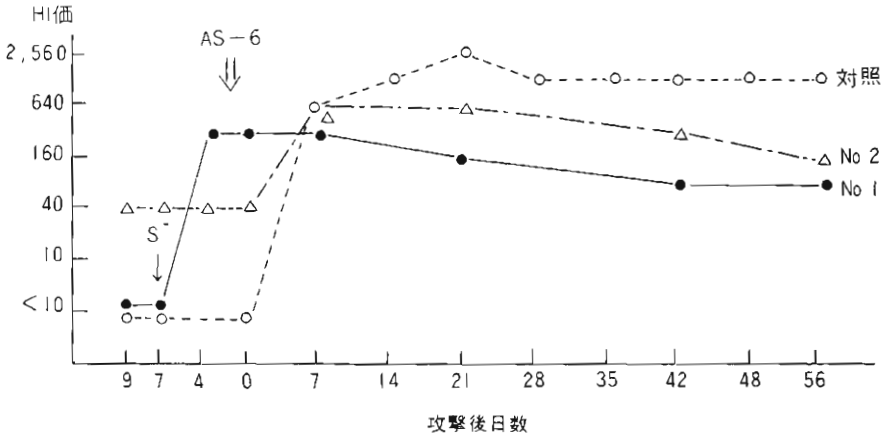


図9 日本脳炎生ワクチン(S⁻株)免疫雄豚の攻撃後におけるHI抗体価の推移

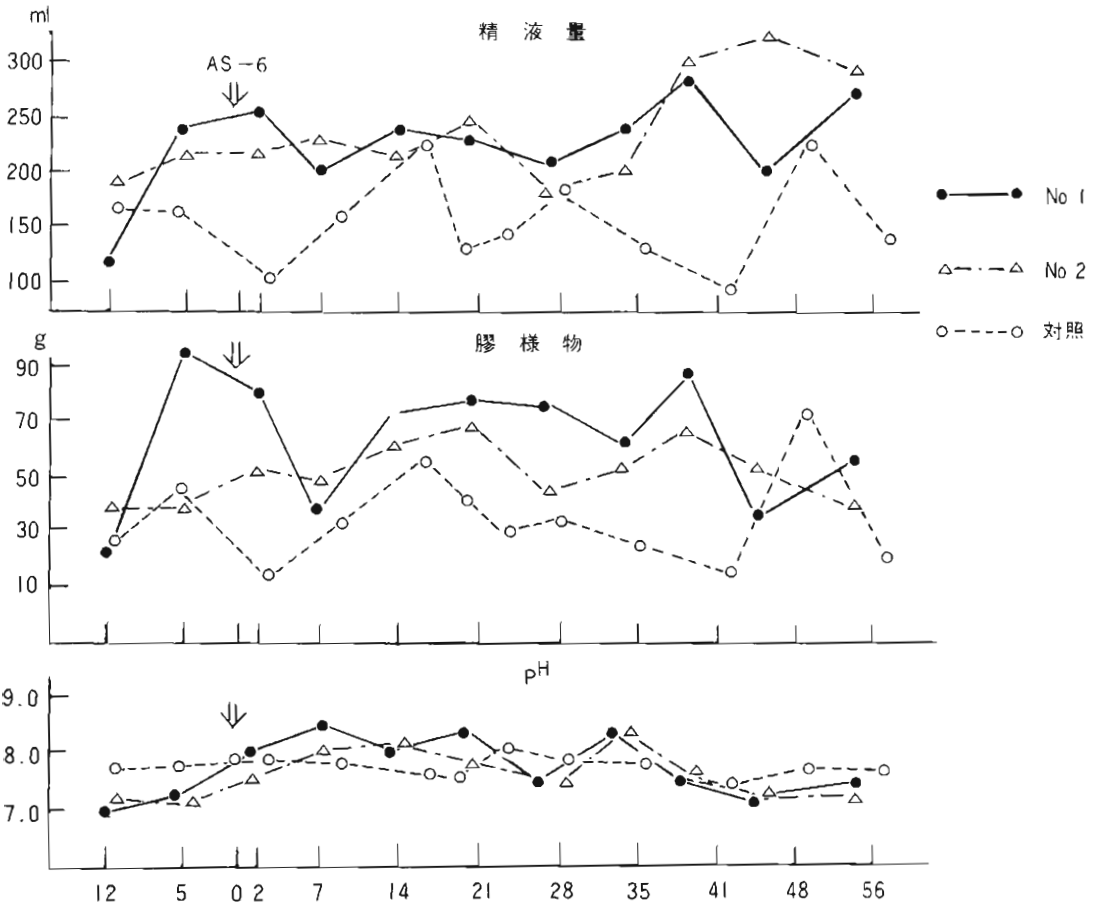


図10 日本脳炎生ワクチン(S⁻株)免疫雄豚の攻撃後における精液性状(1)

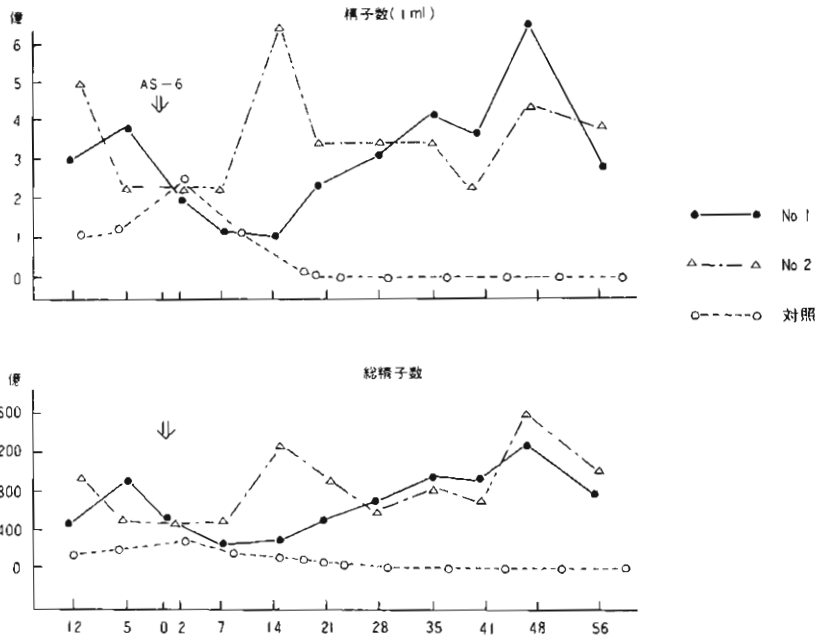


図11 日本脳炎生ワクチン (S⁻株) 免疫雄豚の攻撃後における精液性状 (2)

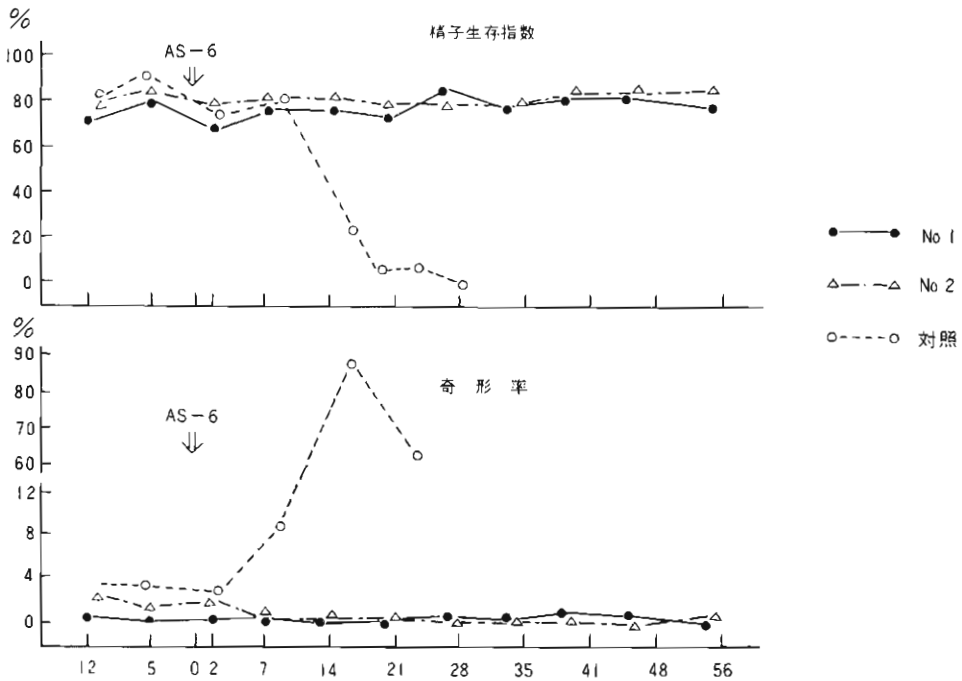


図12 日本脳炎生ワクチン (S⁻株) 免疫雄豚の攻撃後における精液性状 (3)

る。精子の生存指数では、対照豚は攻撃後3日目と9日目には正常であったが、17日目には26.3%と急激に減少し始めて、攻撃後28日目には無精子状態となり生存指数は0となったが、(S株)接種豚では2頭とも攻撃後も65~80%の値を持続していた。また奇形率は対照豚では、攻撃後9日目より上昇を始め、17日目には92.0%と急上昇を示したが(S株)接種豚では2頭とも5%以下で異常はみとめられなかった。攻撃後8週間の奇形率は対照豚では $53.3 \pm 34.7\%$ で、(S株)接種豚ではNa1が $0.64 \pm 0.34\%$ で、Na2が $0.79 \pm 0.65\%$ であって、両者間に明らかな差異がみとめられた。

エ。(S株)免疫雄豚の攻撃後における精液からのウィルス回収：(S株)接種雄豚の攻撃後8週間内における精液からウィルス回収成績を示すと表3のとおりである。無処置対照豚は攻撃後3日目と17日目の精漿からJEVが回収されたが、(S株) $10^{5.5}$ TCID₅₀/ml 10mlずつ3回接種のNa1および(S株) $10^{5.5}$ TCID₅₀/ml 2mlずつ2回接種のNa2の試験豚では、攻撃後8週間精漿中からウィルスは回収されなかった。

従って、雄豚に(S株)を接種して免疫することは、JEVの感染に際して、造精障害と精液を介してのウィルス散布を防止するのに有効であると考えられた。なお、

本研究の概要は第8回日本獣医学会に報告した。終りに臨み、血清保存などに御援助を頂いた日本生物科学研究所宮本猛、竹原孝一の両先生に深謝いたします。

引用文献

- 1) 羽生章, 中島勇三, 島田直吉, 杉藤和夫, 宮下光男, 杉森正, 藤崎優次郎, 小笠見, 横木勇逸, (1975) 日脳感染による雄豚の造精機能障害と精液中よりのウィルス分離: 東京畜試研報: 15: 27~52
- 2) 小笠見, 横木勇逸, 杉山茂, 藤崎優次郎, 長沢成吉, 乾純夫, 羽生章, (1973) 日本脳炎ウィルス感染による雄豚の造精機能障害, 日本獣医学会講演要旨: 第8回: 130
- 3) 羽生章, 中島勇三, 大沼孝宣, 小笠見, 鈴木博, 藤崎優次郎, (1975) 雌豚における日本脳炎ウィルスの実験的子宮感染: 日本獣医学会講演要旨: 第79回: 18
- 4) 大谷明, 奥野剛, (1967) ウィルス実験学各論, 国立予防衛生研究所学友会編, 丸善, 東京: 132-146
- 5) 伊藤祐之, 栢田精一, 西川義正, 吉岡善三郎, 丹羽太左衛門: (1961) 家畜の人工授精の技術: 産業図書, 東京: 295~303
- 6) 西川義正: (1951) 家畜人工授精法, 養賢堂: 東京: 87~109