

日本脳炎ウイルス弱毒変異 (S-) 株 による、豚の感染防禦について (1)

羽 生 章 中 島 雄 三 島 田 直 吉

菅原兼太郎 藤崎優次郎 ※

1. はじめに

東京都は1000万を越える膨大な人口を有し、首都の機能として、各種の催しが開かれ、内外人の集る機会が多く、他府県よりの通勤、通学人口も100万に及んでいる現状である。このような社会環境のなかで、都の日本脳炎(以下日脳と略す)患者発生数は43年を除けば30~64人におよんでおり、人の日脳の特徴として、致命率も22.9~43.8%と高く、治療患者も、脳障害等の後遺症が残り、いまわしい疾病といふことができる。

人の日脳の予防対策としては、日脳予防接種の励行、媒介こん虫の駆除などが考えられる。またScherer^{1) 2)}らは、豚が日脳ウイルスの伝播サイクルにおける増幅動物として、重要な役割を演じていることを指摘しており、今野³⁾は、ブターカーヒトという日脳伝播サイクルの存在を示唆した。そこで人の日脳の予防対策として、豚のウイルス血症を予防して、有毒蚊の道幅⁴⁾を防ぐことが、公衆衛生上日脳の感染源対策として重要な課題となりうる可能性ができた。すなわち、養豚経営における公衆衛生上の畜産公害として、予防対策を立てることが、行政上の研究課題となつた。

一方都の豚飼養状況は第2表のとおりで、豚飼養頭数は約70000~90000頭で、肉豚出荷頭数はその約2.5倍となっているから、常時70000~90000頭が飼育されているものと考えられる。このような新しい行政需要の解決策として、豚の日脳ウイルス血症を予防して、ブターカーヒトの伝播サイクルを遮断して、それによってヒトへの感染を少なくするために(感染源対策)、豚用日脳生ワクチンを目的として、開発された、農林省家畜試の日脳ウイルス弱毒変異(S-)株の豚における抗体産生と感染防禦を調べるために、生後5カ月から8カ月令の無抗体の豚を用いて、実験を行ったので、その成績の概要を報告する。

※農林省家畜衛生試験場研究第2部ウイルス第2室長

表 1 都の日脳患者発生状況

事 項 \ 年 度	1 9 6 4	1 9 6 5	1 9 6 6	1 9 6 7	1 9 6 8
	昭和 3 9	4 0	4 1	4 2	4 3
患 者 数	6 4	3 0	3 2	4 3	1
罹 患 率	0.6	0.3	0.3	0.4	0.0
死 者 数	2 8	8	8	1 5	0
致 命 率	4 3.8	2 5.8	2 2.9	3 4.9	0

(都衛生局防疫課)

表 2 都の豚飼育頭数及び肉豚出荷頭数

年 度		昭 和 3 9	4 0	4 1	4 2	4 3
頭 数	総 数	6 8 3 6 0	7 9 4 3 0	9 1 1 9 0	8 7 1 0 0	8 9 3 0 0
	6ヶ月以上 繁殖用めす	5.9 2 0	5.7 9 0	6.4 1 0	6.0 0 0	6.6 0 0
肉 豚 出 荷 頭 数		1 4 8 2 5 6	1 8 8 6 0 0	2 3 8 4 0 1	2 6 7 6 6 3	2 7 1 6 3 6

飼育頭数は東京農林水産統計年報

出荷頭数 都農林部畜産課調べ

2. 材料と方法

(1) 供試豚：當場で生産飼育中の未越冬豚で次のとおりである。

表 3 供 試 豚

試験区分	豚番号	品 種	性別 生年月日	試験区分	豚番号	品 種	性別 生年月日
生ワクチン 1 回 接 種	No. 1	ヨークシャー	♂ 43. 12. 19	生ワクチン 2 回 接 種	No. 3	ヨークシャー	♂ 43. 12. 23
	No. 2	ヨークシャー	♂ 43. 12. 23		No. 4	ヨークシャー	♂ " "
生ワクチン 2 回 接 種	No. 1	ランドレース	♀ 43. 9. 23	5 週 後 攻 撃 無処置対照	No. 5	大ヨーク	♂ 43. 12. 5
	No. 2	ヨークシャー	♂ 43. 12. 5		No. 7	ヨークシャー	♂ 43. 12. 23
無処置対照	No. 6	ヨークシャー	♂ 43. 12. 19				

(2) ウイルス価測定とウイルス血症証明

生ワクチンS-株のウイルス価測定は豚腎株化細胞 (ESK) を用い、30℃で培養で行なった。

攻撃に用いた野外新鮮分離 (AS-6) 株のウイルス価の測定は、ESKまたは、3週マウス脳内接種法により行なった。

ウイルス血症の証明はAS-6株で攻撃接種後7日間毎日採血して、そのヘパリン血漿を3週マウスには0.03ml、哺乳マウスには0.02ml脳内接種して、14日間観察して行なった。

(3) 抗体価の測定、供試豚の前大脈より、週1回採決し、血清を分離して、-20℃に保存し血球凝集抑制 (HI) 抗体及び中和抗体を調べた。HI抗体は葉嶽中山株を抗原として、アセトン処理血清を用いる予研法⁵⁾により測定し、中和抗体は葉嶽中山株を使用して、鶏胎児細胞を用いて、50%フラック減少法により測定した。

(4) 体温測定 午前9時及び午後2時30分に1日2回測定した。

(5) 試験期間 昭和44年5月~7月の日脳流行期前に行つた。

3. 試験成績及び考察

(1) 日本脳炎ウイルス弱毒変異 (S-) 株 (以下生ワクチン) 1回接種による抗体産生と感染防禦試験。

この試験は生ワクチン1mlを1回耳根部皮下に接種した後3週目と7週目に、野外新鮮分離 (AS-6) 株を皮下に攻撃接種して、ウイルス血症阻止の効果を調べたものである。接種された生ワクチンのウイルス価は $10^{7.0}$ TCID₅₀ で、攻撃ウイルス量は $10^{4.5}$ TCID₅₀ であった。ウイルス血症出現の有無、体温及び試験期間中の抗体価の消長は、表4、図1、図2のとおりである。

表 4 日脳生ワクチン1回接種後の感染防禦

群	生ワクチン (S-株) 接種	野 外 株 (AS6) 攻撃	ウ イ ル ス 血 症 出 現						
			攻 撃 後 日 数						
			1	2	3	4	5	6	7
No. 1	1 回 SC1ml ($10^{7.0}$ TCID ₅₀)	3 週 後 SC1ml ($10^{4.5}$ TCID ₅₀)	-※	-	-	-	-	-	-
			-	-	-	-	-	-	-
No. 2	"	7 週 後 同 上	+	+	+	+	-	-	-
			-	+	+	+	-	-	-

※上は3週マウス、下は哺乳マウスによりウイルス証明

図 1.

(1) 生ワクチン1回接種 3-7週後攻撃豚における体温の変化

●—● 接種後3週目攻撃 (No.1)

○- - -○ 接種後7週目攻撃 (No.2)

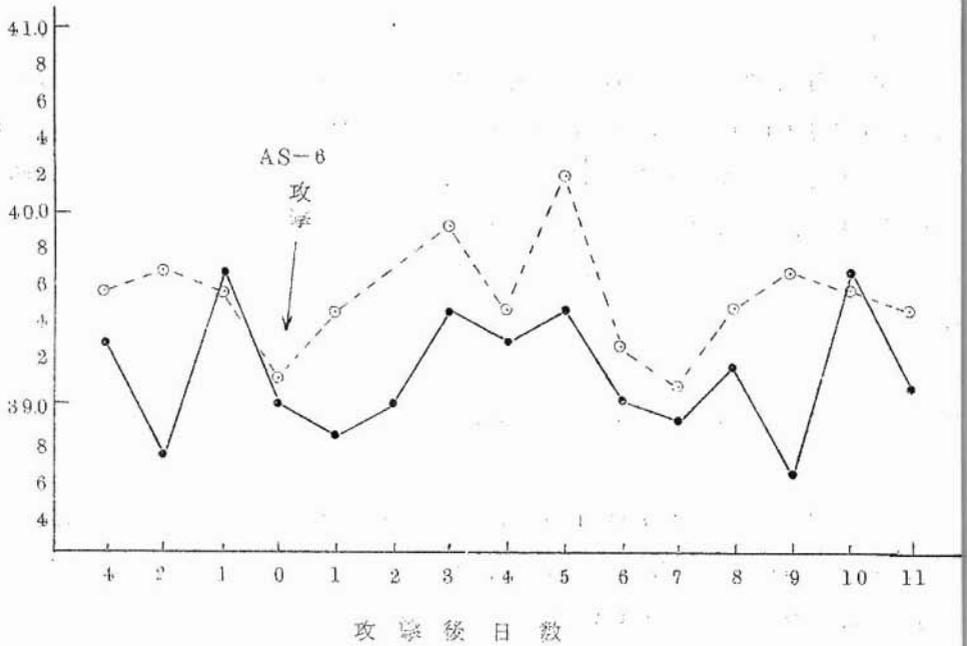
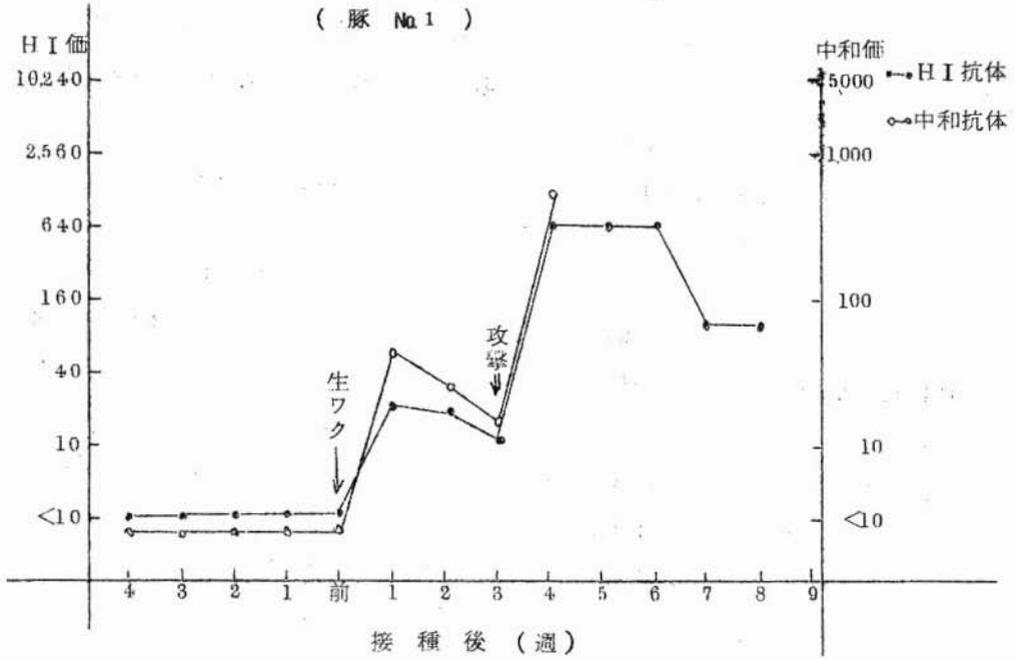


図 2

日脳 生ワクチン1回接種後における抗体価の消長

(豚 No. 1)



(豚 No. 2)

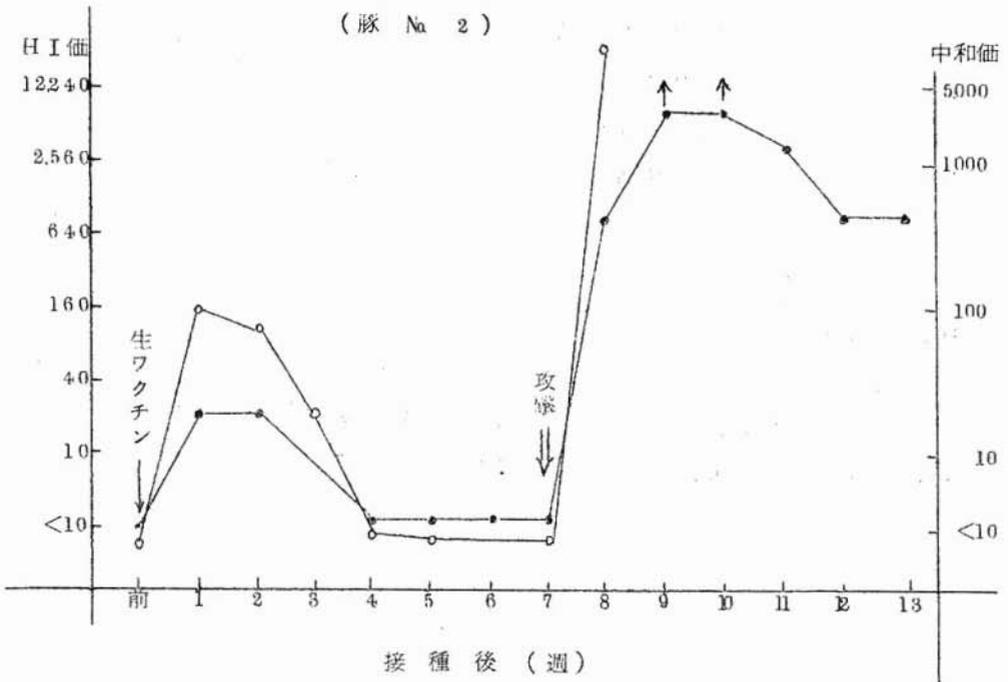


表1のように生ワクチン接種後3週目に攻撃されたNo.1の豚ではウイルス血症の出現がみとめられなかったが、生ワクチン接種後7週目に攻撃されたNo.2の豚では4日間ウイルス血症の出現がみとめられた。なお表中のウイルス血症出現の有無を示した成績は、上が3週マウスで、下が哺乳マウスにより、ウイルス証明をしたものである。

図1の攻撃後の体温上昇は、No.1の豚ではみとめられなかったが、No.2の豚では攻撃後2日目に41℃、5日目に40.2℃の上昇がみとめられた。

なお、同時に攻撃接種された無処置対照豚No.6では明らかな発熱が認められた。

試験期間中の抗体価の消長は、図2のとおりである。上がNo.1の豚で、下がNo.2を示し、実線がHI抗体価、点線が中和抗体価を示したものである。生ワクチン接種後2頭とも、いずれも、HI抗体価は1:20に、中和抗体価はNo.1が1:49、No.2が1:55に上昇がみとめられた。攻撃時の抗体価はNo.1ではHIは1:20、中和は1:20であったが、No.2ではHI抗体価、中和抗体価ともに $< 1:10$ であった。

(2) 生ワクチン(S-)株1mlずつを4週間隔2回接種後の抗体産生と、2回接種後3週目に攻撃による感染防禦試験；この試験は生ワクチンを4週間隔で1mlずつ2回、耳根部皮下に接種した後、3週目に野外豚で攻撃して、ウイルス血症阻止の効果を調べたものである。生ワクチンの接種、攻撃接種の材料及びウイルス証明の方法は、前と同じである。ウイルス血症出現の有無、体温上昇、抗体価の消長を示すと表5、図3及び図4のとおりである。表5のように生ワクチン接種群ではNo.1、No.2の豚ともウイルス血症の出現はみとめられなかったが、同時に攻撃接種された無処置対照豚では、5日間ウイルス血症の出現がみとめられた。体温の上昇も生ワクチン接種群の2頭ではみとめられなかったが、無処置対照豚では3日目、4日目に39.8℃の上昇がみとめられた。抗体価は生ワクチン1回接種後、HI抗体価の上昇がみとめられたのは2頭中1頭で(1:10)であった。中和抗体価は2頭が1:14と1:25であった。第2回生ワクチン接種後1週目ではHI抗体価は1:40と1:80で、中和抗体価は1:56と1:46であった。また攻撃時のHI抗体価は1:10と1:40であり、中和抗体価は1:25と1:17であった。

表 5 日脳生ワクチン2回接種後の感染防禦

群	生ワクチン (S-株) 接種	野 外 株 (A S 6) 攻撃	ウイルス血症出現						
			攻撃後日数						
			1	2	3	4	5	6	7
No.1	4週間隔SC 1mlずつ2回 (10^7 TCID ₅₀)	3週後 SC 1ml ($10^{4.5}$ TCID ₅₀)	- ※	-	-	-	-	-	-
			-	-	-	-	-	-	-
No.2	"	"	-	-	-	-	-	-	-
			-	-	-	-	-	-	-
無処置対照豚		SC 1ml ($10^{4.5}$ TCID ₅₀)	+	+	+	+	+	-	-

※上は3週マウス、下は哺乳マウスにより、ウイルス証明

図 3 生ワクチン4週間隔2回接種、接種後3週目攻撃豚における体温の変化

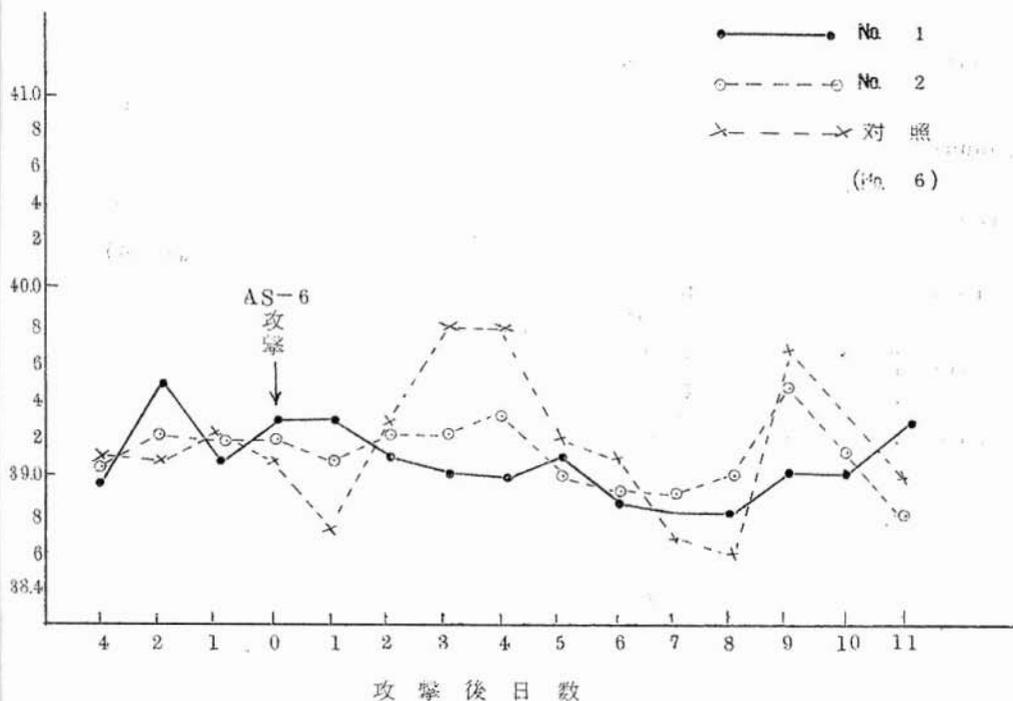
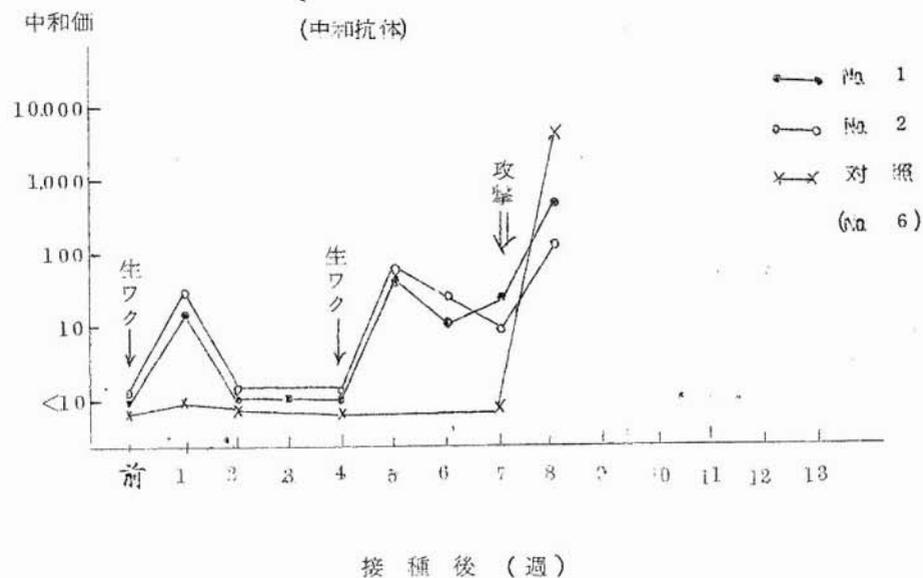
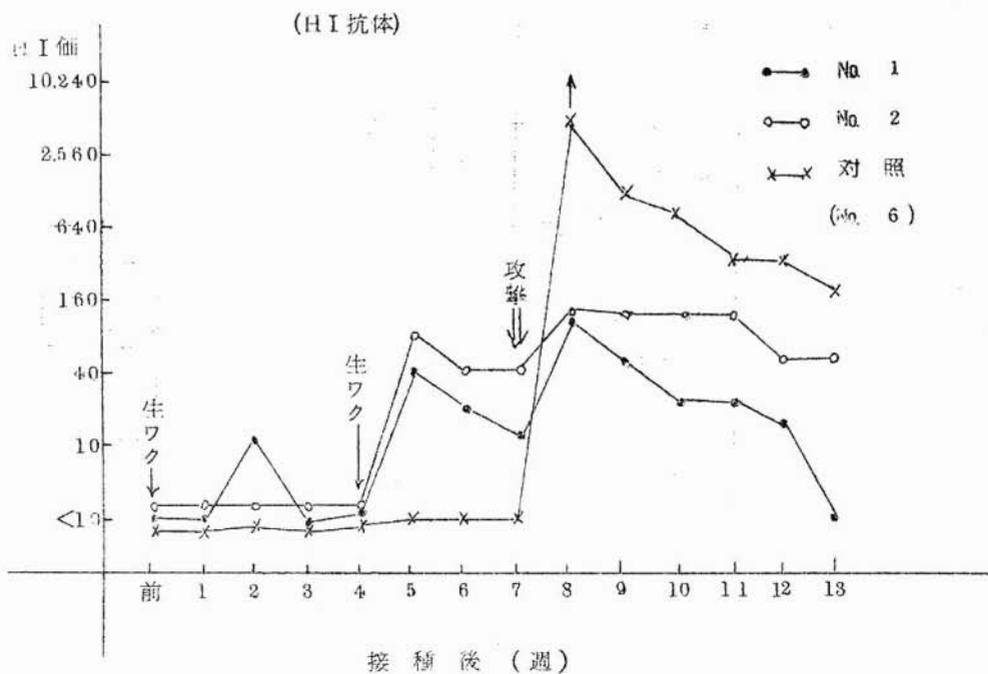


図 4 日脳生ワクチン2回接種後における抗体価の消長



(3) 生ワクチン (S-) 株 1 m μ ずつ 4 週間隔で 2 回接種し、その抗体産生と、2 回接種後 5 週目攻撃における感染防禦試験；この試験は生ワクチン 1 m μ を 4 週間隔 2 回接種し、2 回接種後 5 週目に AS-6 株で攻撃して、ウイルス血症阻止の効果を調べたものである。ウイルス血症出現の有無、体温及び試験期間中の抗体価の消長を示すと、表 6、図 5 及び図 6 のとおりである。生ワクチン接種、ウイルス証明の方法は前と同じであるが、攻撃時のウイルス量は $10^{5.5}$ TCID₅₀ であった。表 6 の如く生ワク接種豚 No. 3、No. 4、No. 5 では 3 頭とも、いずれも、ウイルス血症の出現がみとめられなかったが、同時に攻撃接種された無処置対照豚では 5 日間ウイルス血症の発現がみとめられた。体温の上昇も、生ワクチン接種豚 3 頭ではみとめられなかったが、無処置対照豚の No. 7 では攻撃後 2、3、4、5、7 日目に 39.8~40.0℃ の上昇がみとめられた。抗体価の消長は、第 1 回生ワクチン接種後 1 抗体価の上昇がみとめられたのは、No. 5 の 1 頭 (1:20) のみであったが、中和抗体価では 3 頭とも、1:85、1:33、1:22 と上昇がみとめられた。

第 2 回の生ワク接種では 3 頭いずれの豚も上昇がみとめられ、HI 抗体価は 2 頭が 1:40 に、1 頭が 1:80 であった。中和抗体価は 1:20、と 1:85 及び 1:125 であった。また攻撃接種時の抗体価は HI 抗体価が 1 頭は 1:10 で他の 2 頭は < 1:10 であった。中和抗体価は 3 頭とも < 1:10 というように低い抗体価であったが、表 6 のようにこれらの試験豚は、いずれも、ウイルス血症の阻止がみとめられた。

表 6 日脳生ワクチン 2 回接種後の感染防禦

群	生ワクチン (S-株) 接種	野 外 株 (AS6) 攻 撃	ウイルス血症出現							
			攻撃後日数							
			1	2	3	4	5	6	7	
V ₂	No.3	4 週間隔 SC 1 m μ ずつ 2 回 (10^7 TCID ₅₀)	5 週後 SC 1 m μ ($10^{5.5}$ TCID ₅₀)	-	-	-	-	-	-	-
	No.4	"	"	-	-	-	-	-	-	-
	No.5	"	"	-	-	-	-	-	-	-
無処置対照		SC 1 m μ ($10^{5.5}$ TCID ₅₀)	-	+	+	+	+	-	-	

※上は 3 週マウス、下は哺乳マウスにより、ウイルス証明

図 5 生ワクチン4週間隔2回接種、接種後5週目攻撃豚における体温の変化

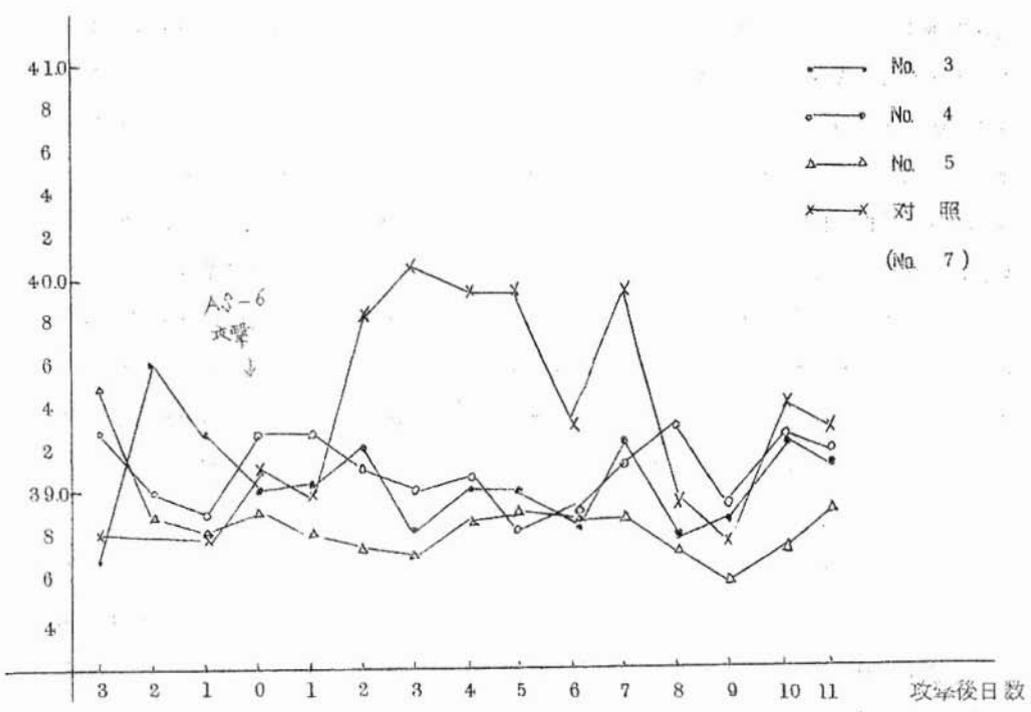
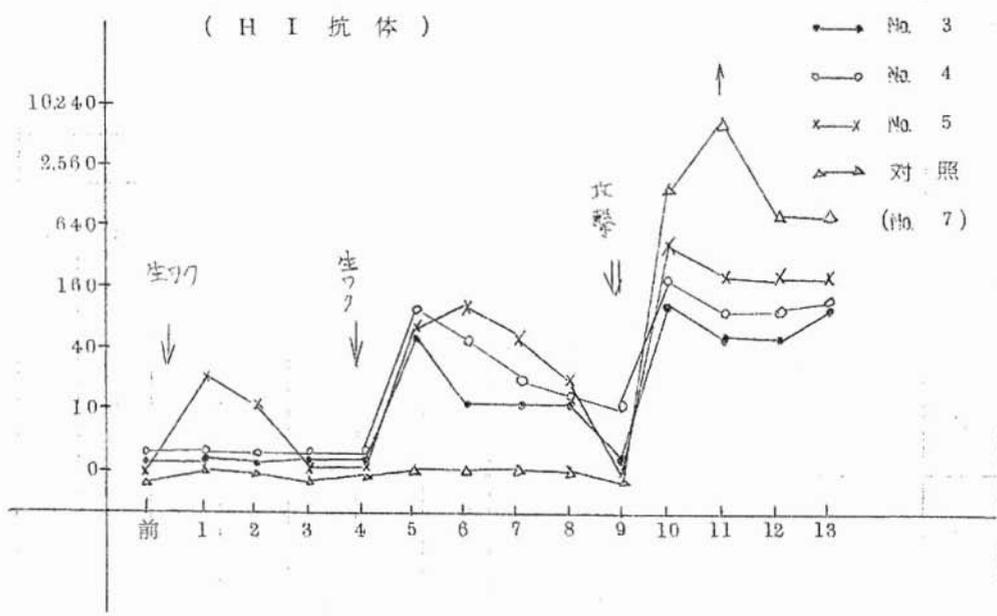
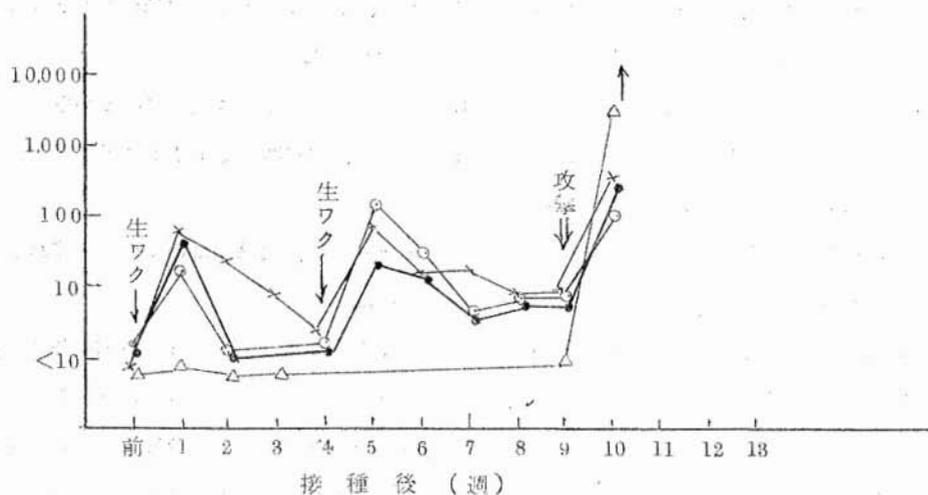


図 6 日脳生ワクチン2回接種後における抗体価の消長 (HI抗体)



(中 和 抗 体)



4. ま と め

5～8月令の無抗体の豚を用いて、農林省家衛試開発の生ワクチン(S-1)株を、耳根部皮下に1ml ($10^{7.0}$ TCID₅₀) ずつ1～2回接種した後、3～7週目に野外新鮮分離(A3-6)株の $10^{4.5} \sim 10^{5.5}$ (TCID₅₀) を、耳根部皮下に攻撃接種し、攻撃後7日間採血して、ウイルス血症出現の有無を、哺乳マウス及び3週マウスの脳内接種により調べ、さらに週1回採血して血清アセトン処理(予研)法によりHI抗体価を鶏胎児細胞を用いて50%ブラック減少法により中和抗体価を測定した。えられた成績はつぎのとおりである。

(イ) S⁻株1回接種後3週目に攻撃した豚では、ウイルス血症はみとめられず、攻撃時のHI抗体価、中和抗体価は1:10と1:19であつた。また接種後7週目に攻撃した豚ではウイルス血症が4日間みとめられ、攻撃時の抗体価はHI、中和ともに $< 1:10$ であつた。

7週目に攻撃した豚では攻撃後2日目に体温の上昇がみとめられた。

(ロ) S-株を4週間隔で2回接種し、第2回接種後3週目に、攻撃した豚では、ウイルス血症はみとめられず、攻撃時の抗体価はHIが1:10、と1:40で、中和が1:25と1:17であった。また体温の上昇は2頭ともみられなかった。

(ハ) S-株を4週間隔で2回接種後5週目に攻撃した豚ではウイルス血症はみとめられず、攻撃時の抗体価はHIが1:10と <1:10であり、中和は <1:10であった。また体温の上昇は3頭ともみられなかった。

(ニ) 対照として用意した無処置豚2頭に同時にAS-6株で、攻撃したところ、いずれも5日間ウイルス血症がみとめられ、体温の上昇がみられた。

以上の成績から、生ワクチン(S-)株を豚に接種することにより、日腦の感染防禦が、とくに4週間隔で2回接種することにより、2カ月間有効であることを知った。また近い将来、カーブターヒトの感染経路を、たち切って、ヒトの日腦予防を、ブタの段階で行うという行政上の要求に答えるためには、野外株の攻撃接種から、今後さらに、生ワク接種豚を日腦の自然流行下に飼育して、感染防禦の可能性を検討して、野外応用への基礎資料としたい。

なお、この成績の概要は第69回日本獣医学会に報告した。

おわりに臨み、本実験の機会を与えて頂いた農林省家衛試の渡辺守松先生、宮川揚長並びに、実験に当り、種々御便宜を計って頂いた日生研、宮本猛、竹原孝一両先生に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Scherer, W.F., Moyer J. T., Izumi, T.,
Gresser, I. and McCown J.
Ecologic studies of Japanese encephalitis virus
in Japan, VI Swine infection.
Am J. Trop. Med. & Hyg., 8, 698 ~ 706. 1959.
- 2) Buecher, E.L., & Scherer, W.F.,
Ecologic studies of Japanese encephalitis virus
in Japan IX Epidemiologic Correlations
and Conclusions
Am. J Trop. Med. & Hyg., 8, 719 ~ 722. 1959.
- 3) 今野二郎, 速麻好喜, 我妻仁, 宇留野勝水, 野冢美夫, 山司男七, 茂庭秀高, 石田名香雄
日本脳炎の疫学-昭和39年度宮城県における調査成績-
医学の歩み, 53, 113 ~ 118, 1965.
- 4) 高橋克己
日本脳炎予防における新しい試み-増幅動物対策-
臨床と研究, 46, 1471~1480, 1969.
- 5) 大谷明, 奥野剛,
日本脳炎ウイルス
ウイルス実験学各論, 国立予防衛生研究所学友会編, 丸善, 東京132 ~ 146. 1967