

日本脳炎の発病と流行についての一考察

黒 木 洋

# 日本脳炎の発病と流行についての一考察

黒 木 洋

# 目 次

|                               | 頁  |
|-------------------------------|----|
| 緒 言 .....                     | 1  |
| 実験材料と方法 .....                 | 4  |
| 1. 実験動物 .....                 | 4  |
| 2. 細胞の培養方法 .....              | 5  |
| 3. ウイルスの培養方法 .....            | 6  |
| 4. ウイルス量の測定方法 .....           | 8  |
| 5. 供試ウイルス株 .....              | 8  |
| 6. 血清学的試験 .....               | 9  |
| 7. 分離ウイルスの同定試験 .....          | 11 |
| 8. 物理化学的性状試験 .....            | 11 |
| 9. マウスの感染試験 .....             | 12 |
| 10. ブタの感染試験 .....             | 13 |
| 実験成績 .....                    | 16 |
| 1. おとり豚における抗体の消長とウイルス分離 ..... | 16 |
| 2. 新分離株の生物学的ならびに物理化学的性状 ..... | 22 |
| 3. 細胞ならびに動物に対する病原性 .....      | 33 |
| 考 察 .....                     | 56 |
| 総括ならびに結論 .....                | 64 |
| 参考文献 .....                    | 67 |

日本脳炎ウイルスはヒトおよび動物にきわめて高率の不顕性感染を示すが、比較的発病率は低い。家畜ではウマ<sup>15)</sup>、ウシ<sup>29)</sup>、ヤギ<sup>38)</sup>、子ブタ<sup>40)</sup>に脳炎症状をおこすことが知られている。また、成豚でも高率に不顕性感染するが、脳炎症状を示すことはなく、とくに妊娠豚では死産などの異常分娩をおこすことが知られ<sup>30), 39)</sup>、実験的にも清水ら<sup>32)</sup>によってたしかめられている。

近年、食肉の需要増による養豚の経営規模の拡大にともない、死産による損耗事故がかなり多くなり、この的確な原因究明とともに死産の防止対策が望まれている。

このように、ブタは日本脳炎ウイルスに高率に感染し、しかも感染後数日間に高濃度のウイルス血症をおこし<sup>31), 16), 64)</sup>、コガタアカイエカの嗜好性に適しており<sup>65)</sup>、さらに早熟多産性であって世代の交替が速かであるため、つねに本病に対する感受性豚が多数存在し、自然界でのウイルスの継代および供給源になり、増幅動物として疫学上重要視されている。<sup>31), 16), 64), 45), 6)</sup> いっぽう、豚群の抗体陽転の様相を調べることによってヒトの脳炎発生の予測<sup>6)</sup>、あるいは豚群を免疫することによって有毒蚊の発生を少なくし、ひいてはヒトの脳炎発生を阻止しようとする試みなども行なわれている。<sup>41)</sup>

以上のように、ブタの日本脳炎は家畜衛生上の問題にとどまらず、公衆衛生上重要な役割を演じているので、その流行に関する研究の意義ははなはだ大きいと思われる。

著者は、ブタの自然感染の実態を知り、さらに野外流行株の再検討を行なう目的で、1966年から1968年までの3年間に、鹿児島市谷山地区で流行期にあるブタの中和抗体および血球凝集抑制（以下HIと略記）抗体の消長を調べ、抗体の陽転時期および抗体感応について観察したが、1967年はおとり豚の抗体陽転が一斉にみられず、野外においても例年と異なる発生様相を示すことをみとめた。また、この間にブタの血液から年次別に1株ずつ、計3株のウイルスを分離し、既知日本脳炎ウイルス中山株<sup>8)</sup>および富士株<sup>30)</sup>の性状と比較するとともに、新分離株の性状とブタの抗体感応との関連性について検討した結果、1967年に分離した株は他の年のそれとやや性質を異にしていることを知った。

日本脳炎ウイルスの新分離株あるいは実験室保存株間の性状の差異については、Haleら<sup>54)</sup>がマレー半島における分離株で中山株と共通抗原のほか、別の抗原構造を有することを報告して以来、主に免疫血清学的性状<sup>42), 21), 5), 28), 9), 21), 23), 27), 24), 1), 60), 65)</sup>のほか、マウスおよびブタに対する末梢感染性（病原性）<sup>25), 22), 33), 34), 57), 66), 68), 62), 59)</sup>、培養細胞におけるウイルス増殖と血球凝集（以下HAと略記）性<sup>4), 67)</sup>、HA素の至適PH域<sup>23), 25), 26), 18)</sup>、HA素およびウイルス活性の耐熱性<sup>25), 18)</sup>、ウイルス活性のトリプシン抵抗性<sup>70), 48)</sup>など、これまでにいくつかの報告がある。しかしながら、ヒトおよび動物における感染状況あるいは疫学所見と分離株の性状との関連において検討された報告はみあたらない。

著者は、流行様相あるいは動物の抗体感応が年次と地域と

によって異なること、および日本脳炎ウイルスに感染した動物やヒトが発病するか、不顕性感染に終るかを左右する要因の一つとして流行株の病原性の差を考えて注意を払ってきた。その結果、抗体の陽転化の進行が緩慢で、抗体感応のわなかった1967年のおとり豚から分離した「谷山S-2」株は、他年次の分離株に比べてHA素およびウイルス活性の耐熱性が弱く、培養細胞におけるウイルス増殖性が劣り、マウスやブタに対していわゆる末梢感染性の弱いウイルス株であることがわかった。

従来、ウイルス分離は主としてマウス脳内接種法により行なわれ、多くの場合、継代の進んだ株についてその性状が検討されている。継代の進まない野外株の性状について検討された報告もあるが、その病原性について感染動物の発病や流行との関連について論じた報告はないようである。今回、培養細胞やマウスを用いてウイルスを分離し、継代の進まないうちに生物学的性状、および病原性について詳しく調べた結果、野外流行株のなかには病原性の弱いウイルス株が存在すると云う新しい事実を発見した。

本論文は、新弱毒ウイルス株の分離のいきさつと生物学的性状および免疫血清学的性状についてウイルス学的に検討した結果を述べるとともに、弱毒ウイルス株分離の疫学的意義と日本脳炎の感染病理について考察したものである。

# 実験材料と方法

## 1. 実験動物

### 1.1 ブタ

おとり豚は、いずれも鹿児島市内で非流行期に生れ、流行開始時には5～6ヵ月令に達したバークシャー種で移行抗体のないものを毎年3～6頭ずつ、鹿児島市谷山地区（九州支場内）に繋養した。採血は毎週1回行ない、ウイルス分離と抗体検査に供した。

実験感染豚は、開腹摘出人工ほ育豚（以下HPCD豚と略記）を使用した。母豚はランドレスとバークシャー種の1代雑種で、体重は310kg、3産目の健康豚であった。HPCD豚は開腹摘出後35°Cの隔離室で飼育し、SUN Aミルク（アミノ飼料工業KK製<sup>14)</sup>）を給与した。また、1日1回シノミンシロップ（塩野義製薬KK製）1mlを飼料に混合投与した。感染試験は開腹摘出後4日目に行なったが、これら一連の試験は家畜衛生試験場SPF豚研究施設を使用した。

### 1.2 モルモット

自家繁殖した体重300gのモルモットで、日本脳炎ウイルス中和抗体陰性のものを免疫血清作製に使用した。

### 1.3 マウス

自家繁殖中のgPC系マウスで、使用マウス群の日令は3～4日の幅をもってそろえ、乳呑みマウスは3～4日令、3週マウスは17～21日令、4週マウスは28～32日令のもの

を使用したか、いずれも健康で日本脳炎ウイルスH I抗体は陰性であった。

## 2. 細胞の培養方法

### 2.1 鶏胎児細胞（以下C E細胞と略記）

Dulbecco らの方法<sup>49)</sup>に準じ、10日令の鶏胎児からトリプシン消化でえた細胞を0.5%ラクトアルブミン水解物を加えたHanks液（LH液）<sup>58)</sup>に非働化ウシ血清（中和抗体陰性）10%、7.5%  $\text{NaHCO}_3$  0.5%、ペニシリン100U/ml、ストربتマイシン100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を加えた増殖メヂウムで所定の細胞数（ $4 \times 10^6/\text{ml}$ ）に規正し、径6cmのシャーレーに5ml、容量200mlの角瓶には10ml分注した。前者は5%炭酸ガス通気ふらん器、後者は普通ふらん器でいずれも37°Cで培養し、いずれも20時間培養細胞を使用した。

### 2.2 ブタ胎児腎継代細胞（以下E S K細胞と略記）

家畜衛生試験場本場から分与された細胞<sup>67)</sup>で、培養に際してトリプシン・EDTA混液<sup>10)</sup>で細胞を分散したのち、LH液よりなる増殖メヂウムで細胞数を $10^5/\text{ml}$ に規正して浮游させ、容量200mlの角瓶に10ml、培養小試験管に0.5ml、径6cmのシャーレーには5mlをそれぞれ分注し、前2者は普通ふらん器で、後者は5%炭酸ガス通気ふらん器でそれぞれ4～5日間静置培養後使用した。

細胞の継代維持培養には容量200mlの角瓶を用い、5～7日おきに継代または新鮮な培養液と交換して維持したが、培



養液の交換には Hanks 液を Earle 液に替え、7.5%  $\text{NaHCO}_3$  を 3% に増量し、さらにウシ血清を半減 (5%) した培養液を維持培養に用いた。

### 3. ウイルスの培養方法

#### 3.1 ウイルスの分離方法

分離材料は、いずれも抗体上昇 1 週間前の血液を用いたが、使用まで  $-80^{\circ}\text{C}$  に保存した。

ウイルス分離には、主に杉森らの<sup>67)</sup> ESK 細胞を試験管に単層培養して使用した。使用に際して Earle 液で細胞表面を 2 回洗滌したのち、血液 0.1 ml ずつを 20 本の培養試験管に接種し、 $37^{\circ}\text{C}$  2 時間吸着後、接種材料を除去し、再び細胞表面を 2 回洗滌してから、イーストエクストラクト 0.1%、ラクトアルブミン水解物 0.5% を含む Earle 液 (以下 YLE 液<sup>53)</sup> と略記) にウシ血清アルブミン 0.1%、7.5%  $\text{NaHCO}_3$ 、3%、ペニシリン  $100\text{U/ml}$ 、ストレプトマイシン  $100\mu\text{g/ml}$  をさらに加えた維持メヂウムを 0.5 ml を加えて  $37^{\circ}\text{C}$  で回転培養を行なった。細胞変性効果 (以下 CPE と略記) と培養液の HA 性を指標に 7 日間観察後、ウイルス増殖の所見のないときは、半数例の培養液を混合して継代したが、残りの培養は新鮮な維持メヂウムと替え観察を続けた。また、ESK 細胞および CE 細胞におけるウイルスの継代および培養方法もこれに準じて行なった。なお、一部ではマウス脳内接種法によるウイルス分離も併用した。

### 3.2 ブラック法

大谷<sup>11)</sup>らの方法に準じ、主に C E 細胞の 20 時間培養を使用した。Earle 液で細胞表面を 2 回洗滌したのち、ウイルス材料またはウイルスと血清の混合液を細胞培養したシャーレーに 0.2 ml ずつ接種し 37°C で 2 時間吸着後、一次寒天重層培地 (Y L E 液からなる維持メヂウムに粉末寒天 0.9 % を溶解したもの) を 5 ml ずつ分注凝固させ、35°C の 5 % 炭酸ガス通気ふらん器で 2 日間培養後、二次寒天重層培地 (Earle 液に 0.01 % の中性赤および粉末寒天 0.9 % を溶解したもの) を 5 ml 重層し、さらに 35°C に 1 ~ 2 日おいたのち判定したが、必要に応じて 6°C<sup>71)</sup> に一夜おいてたしかめた。なお、E S K 細胞では培養後 4 ~ 5 日目に使用し、接種後 4 日目に二次寒天重層培地を加え、さらに 35°C に 2 ~ 3 日おいてから判定した。

### 3.3 ウイルスの増殖試験

#### 3.3.1 C E 細胞

角瓶に 20 時間培養して使用したが、その細胞数は  $2 \times 10^7$  / 瓶であった。細胞表面を Earle 液で 2 回洗滌してから、一定ウイルス量 ( $\text{moi} \doteq 0.00015$ ) を接種し、37°C で 2 時間吸着後、接種材料を除去し、再び細胞表面を 2 回洗滌後、維持メヂウムを加えて 37°C と 30°C で培養を行なった。接種後 12 時間、24 時間、その後は 24 時間おきに培養液のウイルス量と H A 価を測定した。さらに「谷山 S - 2」株では大量接種 ( $\text{moi} \doteq 0.08$ ) と少量接種 ( $\text{moi} \doteq 0.00000025$ ) について 37°C

培養における増殖を調べた。

### 3. 3. 2 E S K細胞

角瓶培養後4～5日目に使用したが，その細胞数は $10^7$ /瓶で，一定ウイルス量( $\text{moi} \div 0.0003$ )を接種後，C E細胞におけると同様に培養液のウイルス量とH A価を経時的に測定するとともに，C P Eは24時間おきに観察した。

## 4. ウイルス量の測定方法

主にC E細胞でブラック法により測定し， $\text{Log PFU/ml}$ を求めたが，一部ではE S K細胞の試験管法により $\text{Log TCID}_{50}/\text{ml}$ ( $\theta$ )，およびマウス接種法による $\text{Log LD}_{50}/\text{ml}$ を算出した。

## 5. 供試ウイルス株

実験室保存株は，中山株<sup>8)</sup>(マウス脳継代，継代数不明)と富士株<sup>30)</sup>(マウス脳継代153代)を使用した。新分離株は，年次別にブタの血液から分離した「谷山S-1」株(1966年)，「谷山S-2」株(1967年)，「谷山S-3」株(1968年)の計3株を供試した。

諸性状の比較試験には，保存株のマウス脳継代ウイルスと新分離株のE S K細胞継代3代ウイルスをそれぞれC E細胞で11代継代し，この間7代と8代でブラック法によるクローニングを2回行ない，継代歴の同じ時点のものを主に使用したが，新分離株のマウス感染試験には，分離当初のE S K細胞継代3代ウイルスもあわせて用いた。また，このほかHPCD

豚の感染試験には、「谷山 S-2」株のマウス脳継代 2 代ウイルスおよび「谷山 S-1」株の ESK 細胞継代 3 代後、マウス脳継代 3 代ウイルスも使用した。

## 6. 血清学的試験

### 6.1 免疫血清

富士株および新分離株の CE 細胞継代 11 代ウイルスをモルモット脳内に  $0.1\text{ ml}$  ( $10^{5.0}\text{ PFU/ml}$ ) を接種し、1 週間後に再び腹腔内に  $1\text{ ml}$  を補強注射した。初回免疫から 4 週後に採血して使用した。

### 6.2 HA 反応および HI 試験

反応術式は Clarke ら<sup>47), 19)</sup> の方法に準じて行ない、血球は主に鷺鳥血球を使用した。一部では、ほ乳動物（ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウサギ、モルモット、ラット、マウス）および鳥類（ハト、ニワトリ - 2 日令、75 日令、700 日令）の血球も使用した。また、HA 抗原の至適 PH 域の検討には種々な PH の反応メヂウムを用いた。

HA 抗原はブタの抗体検査には薬検中山株<sup>2)</sup>、新分離ウイルスの同定試験には富士株と新分離株を使用した。至適 PH 域の検討には中山株も加えた。いずれの抗原も感染マウス脳から作ったアセトン・エーテル抽出抗原（以下 A・E 抗原と略記）で、その 10 倍抗原液を原液として使用した。なお、一部の至適 PH 域の検討には CE 細胞培養ウイルス液をそのまま使用した。

H I 試験には、いずれも血清を用い、アセトン処理後それぞれの株の至適 P H 域で反応を実施した。また、血清の 2 -メルカプトエタノール（以下 2 -M E と略記）処理は、今野<sup>7)</sup>らの方法に準じて行ない、処理血清の H I 価が未処理対照血清のそれよりも  $\frac{1}{4}$  以下に減じたとき、一応その血清は 2 -M E 感受性抗体とし、感染初期と推測した。

### 6. 3 補体結合（以下 C F と略記）試験

反応術式は Kolmer の少量法<sup>12)</sup>で実施した。C F 抗原は、H A 抗原と同様に保存株と新分離株の A ・ E 抗原を用い、モルモット免疫血清は 56°C で 30 分非働化して使用した。

### 6. 4 中和試験

大谷ら<sup>11)</sup>の方法に準じ、C E 細胞で 50 % ブラック減少法により実施した。ブタの中和抗体測定には、その年次の分離株を使用した。中和同定試験には、富士株と分離した 3 株を用い、モルモット免疫血清で行なった。血清はいずれも 56°C 30 分非働化してから使用した。

あらかじめ測定しておいた一定のウイルス量（200PFU/0.2 ml）と一定の希釈（20 倍と 200 倍）血清の等量混合液を室温（20～25°C）で 1 時間感作後、2 枚の培養シャーレーにそれぞれ 0.2 ml ずつ接種した。対照は血清の代りに 0.1 % ウシ血清アルブミン加 Y L E 液を用い、同様に処理したのち、10 枚の培養シャーレーに接種した。接種後 37°C で 2 時間吸着し、二次重層法によるブラック法に準じて行なった。

中和価は、ブラック減少と血清希釈との間に 45 度の直線

関係が成立つものとし，対照の平均ブラック数を50%減少させる血清希釈倍数を算出して抗体価とした。

## 7. 分離ウイルスの同定試験

既知日本脳炎ウイルス富士株および分離した3株のウイルスとそれぞれの免疫血清との交差中和試験および交差HI試験により血清学的同定を行なった。

## 8. 物理化学的性状試験

ウイルス材料は，保存株および新分離株のいずれもCE細胞継代11代ウイルスの培養ウイルス液を使用した，HA素はA・E抗原を使用した。

### 8.1 HA素およびウイルスの耐熱試験

#### 8.1.1 HA素

PH9.0の抗原液を40°Cに加温し，30分までは5分おきに，その後は10分おきにとり出し，直ちに冷却後それぞれの株の至適反応メヂウムを使用してHA価を測定し，HA素の不活化を調べた。

#### 8.1.2 ウイルス

ウイルス材料を滅菌再蒸留水で10倍に希釈し，7.5% NaHCO<sub>3</sub>でPH7.4に修正したのち，50°Cで加熱した。加熱後，5分，10分その後は10分おきに資料をとり出し，直ちに氷水中で冷却して使用まで-80°Cに保存した。それぞれの加熱時間における感染価をブラック法により測定し，

不活化の状況を調べた。

## 8.2 H A 素およびウイルスのプロタミン沈降試験

Warren<sup>72)</sup>らの方法に準じて、H A 素およびウイルス材料を 4 °C で 30 分振盪処理したのち、その遠心上液について H A 価および感染価を測定し、それぞれ対照のそれと比較した。

## 8.3 ウイルスのエーテル不活化試験

Andrews<sup>44)</sup>らの方法に準じて 4 °C で処理後、10 分おきに資料をとり出し、ブラック法で感染価の測定を行ない、不活化の状況を対照と比べた。

## 8.4 ウイルスのデゾキシコール酸塩不活化試験

Theiler<sup>69)</sup>らの方法に準じて 37 °C で処理したのち、10 分おきに資料をとり出しブラック法により感染価を測定して不活化の状況を対照と比較した。

## 8.5 ウイルスのトリブシン不活化試験

竹原<sup>70)</sup>らの方法に準じ、37 °C で 1 時間と 2 時間の処理材料について感染価をブラック法で調べ、不活化の状況を対照と比べた。

# 9. マウスの感染試験

## 9.1 感染価の測定

1.0 倍段階希釈したウイルス材料のそれぞれの希釈を 5 ～ 8 匹の乳呑みマウス（脳内に 0.01 ml, 皮下に 0.05 ml）と 4 週令マウス（脳内に 0.03 ml, 皮下に 0.1 ml）に接種した。接種後、3 週間観察したのち Log LD<sub>50</sub>/ml を求め、脳内と皮下接

種によるウイルス株間の感染価を比較した。

## 9.2 ウイルス血症の検索

あらかじめブラック法で測定しておいたウイルス材料を10倍段階希釈し、それぞれの希釈を12匹の3週マウスの皮下に0.1 mlずつ接種したが、「谷山S-2」株では腹腔内接種(0.1 ml)も併用した。接種後2日目に一希釈あたり6匹についてウイルス血症を調べ、残りの6匹は3週間観察したのち、生存例ではHI抗体を調べた。また、接種後6日目までウイルス血症の消長もあわせて調べた。

血中ウイルス量の測定は、腋下動静脈を切断して採血し、血液0.2 mlを0.8 mlの0.2%ウシ血清アルブミン加YLE液に加え、そのまま使用まで-80°Cに保存した。これを5倍希釈血液とみなしてブラック法で測定した。

HI抗体の検査は、血清0.2 mlを0.8 mlの硼酸緩衝液(PH 9.0)で希釈した5倍血清をカオリンで処理したのち、それぞれの接種ウイルス株で作ったA・E抗原を用い、その至適PHで常法によって試験を行なった。

## 10. ブタの感染試験

接種ウイルスは、「谷山S-2」株の継代歴の異なる3系統のウイルスと対照に「谷山S-1」株を加えた計4系のウイルスをそれぞれ3頭ずつ、4群のHPCD豚の左耳根部皮下にほぼ一定のウイルス量( $10^{5.2 \sim 5.7}$  TCID<sub>50</sub>/ml)を接種した。接種後、臨床症状とウイルス血症について調べるとともに、



各群とも2日、4日、6日目にそれぞれ1頭ずつ殺処分してウイルスの体内分布、抗体検査および中枢神経の病理組織学的検査を行なった。

### 10.1 臨床検査

午前9時と午後6時の2回検温を行ない、元気、食欲など一般症状および神経症状の有無について観察した。体重測定は試験前と殺処分時の2回行なった。

### 10.2 ウイルス血症の検索

ウイルス接種後、殺処分までは毎日1回採血して血中ウイルス量とその消長について調べた。採血は1,000倍のヘパリンを採血量の $\frac{1}{10}$ 加えて前大静脈から行ない、遠心分離後、血漿は使うまで $-80^{\circ}\text{C}$ に保存した。ウイルス検索は、ESK細胞の試験管培養法で行ない、培養メヂウムは臓器からのウイルス回収試験と同じものを使用した。

### 10.3 臓器からのウイルス回収試験

殺処分したHPCD豚の脳（大脳皮質、脳室、脳幹部、小脳の4ヵ所混合）、脊髄（頸、胸、腰部の3ヵ所混合）、リンパ節（浅頸部リンパ節と腸間膜リンパ節の混合）、肺、肝、脾、腎の各臓器を採取、秤量したのち $-80^{\circ}\text{C}$ に保存した。使用時に0.1%ウシ血清アルブミン加YLE液にカナマイシン $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 、ファンギーゾン $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$ を加えたもので10倍乳剤を作り、その遠心上液についてウイルス回収を行なった。

ウイルス検索は、ウイルス分離法に準じたESK細胞の試

験管培養法によって行なったが，維持メヂウムには Eagle<sup>52)</sup>液（日水製薬 K K 製）にウシ血清アルブミン 0.1 %， 2.95 % トリプトースホスヘイトブロス 10 %， 7.5 %  $\text{NaHCO}_3$  3 %，カナマイシン  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ，ファンギーゾン  $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  を加えたものを使用した。

#### 10.4 抗体検査

ウイルス接種後，2 日，4 日および 6 日の殺処分時の血清についてアセトン処理後，薬検中山株抗原<sup>2)</sup>を用いて H I 抗体を測定した。

#### 10.5 病理組織学的検査

試験豚の脳・脊髄を採取し，10 % 中性ホルマリンで固定した。常法によってパラフィン包埋したのち切片を作製し，ヘマトキシリン・エオジン染色によって中枢神経の病理組織学的検査を行なった。

## 実 験 成 績

### 1. おとり豚における抗体の消長とウイルス分離

1966年から1968年までの3年間、鹿児島市谷山地区（九州支場内）におとり豚をおき、流行前後の中和抗体およびHI抗体の消長について調べるとともに、ウイルス分離を試みることにより流行開始時期、および抗体感応について観察した。その成績は、図-1, 2および3に示した。

#### 1.1 おとり豚の抗体消長

3年間における抗体調査の結果、抗体の陽転時期は年次によって異なり、1966年は7月12日、1967年は7月4日、1968年は7月16日から抗体の陽転がみとめられたが、同一地区における抗体の陽転時期の年次による幅は、ほぼ2週間であった。中和抗体およびHI抗体は、いずれの年も同一豚ではほぼ同時に上昇し、陽転初期にはいずれのブタも2-ME感受性HI抗体が検出された。

抗体の陽転状況および抗体感応は、1966年と1968年ではそれぞれ3頭の同居豚がほぼ同時に陽転し、抗体価は高く、しかも長く持続した。これに反して1967年では、6頭の同居豚の抗体は一斉に陽転せず、全頭が陽転するまでに20日間を要した。さらに、中和抗体価およびHI抗体価は早期に低下する傾向がみとめられた。すなわち、陽転4～5週後には全頭のHI価が10倍、またはそれ以下に低下し、その後は低下と上昇をくりかえしながら、低い抗体価を持続した。

また、中和抗体でも陽転 4 ～ 5 週後には、6 頭中 4 頭の抗体価は 10 倍、またはそれ以下に低下した。そのうち 3 頭では再び上昇する傾向を示したが、中和価は 40 倍程度と低く、残りの 1 頭では陰転のまま経過した。なお、いずれの年次のブタでも不顕性感染に終り、発病したものはなく、体温その他の臨床所見にも異常はみとめられなかった。

図 1. 1966 年のおとり豚の抗体消長とウイルス分離

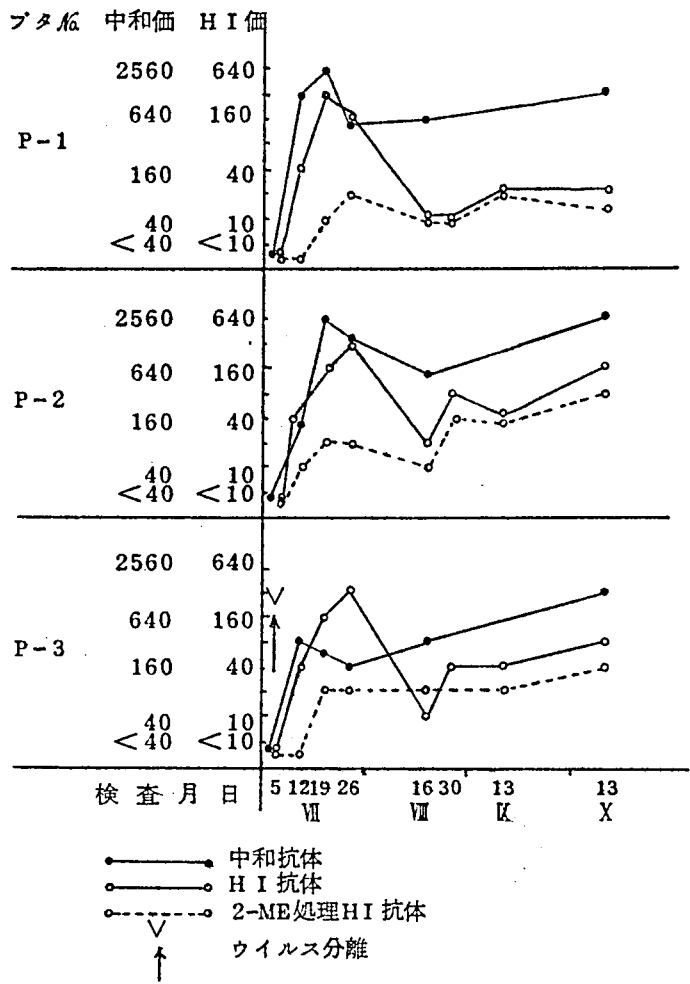


図 2. 1967年のおとり豚の抗体消長とウイルス分離

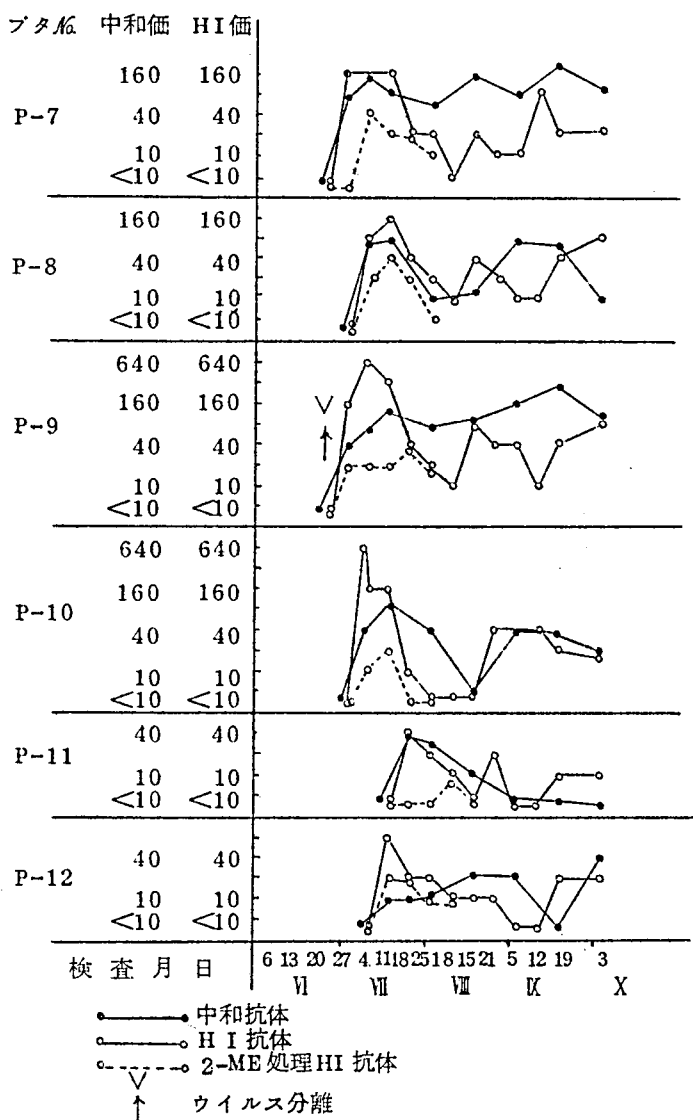
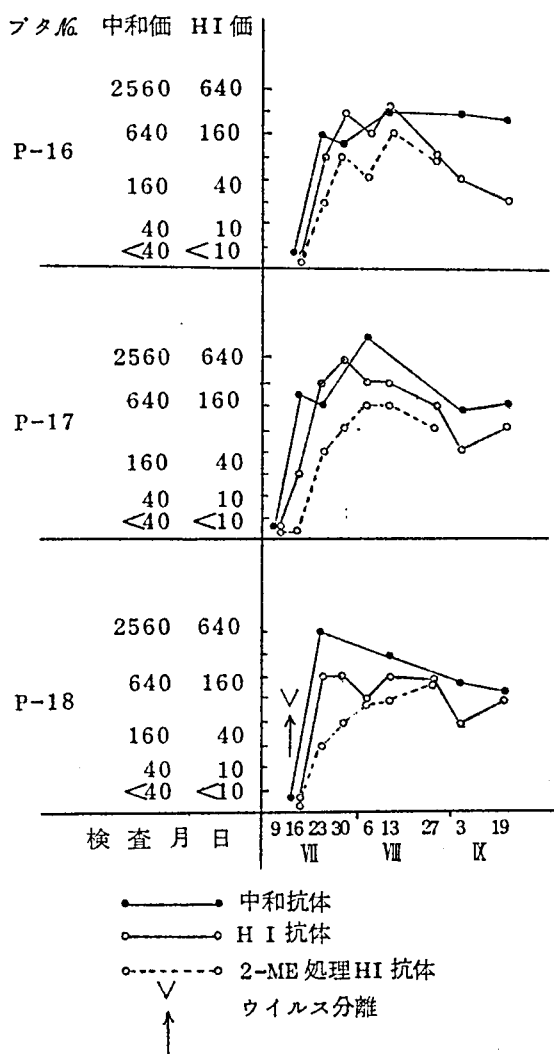


図 3. 1968年のおとり豚の抗体消長とウイルス分離



## 1.2 日本脳炎ウイルスの分離

ウイルス分離は、いずれもブタの抗体上昇1週前の血液から年次別に1株ずつ、計3株を分離した。すなわち、1966年は7月5日のブタの血液から「谷山S-1」株、1967年は6月27日のブタ血液から「谷山S-2」株、1968年には7月16日のブタ血液から「谷山S-3」株をそれぞれESK細胞を用いて分離したが、「谷山S-2」株はマウス脳内接種法でも分離した。

ウイルスの分離状況は、「谷山S-1」株および「谷山S-3」株では、培養初代の5～6日目にCPEと培養液のHA性が出現したが、「谷山S-2」株では培養初代の7日間培養ではCPEも培養液のHA性もみとめられなかった。そこで初代培養液を次代に継代した結果、培養3日目にCPEが出現した。しかし、培養液のHA性は培養6日目でもみとめられなかった。また、「谷山S-2」株の乳呑みマウス脳内接種法による分離では、接種後7～8日目に10匹中5匹が発症し、ウイルスが分離できた。

ウイルスが分離できたおとり豚の血中ウイルス量は、「谷山S-1」株および「谷山S-3」株の場合は $10^{3.0}$  PFU/ml, 「谷山S-2」株の場合は $10^{0.7}$  PFU/ml で、両者の間に著しい差がみられた。また、CPE出現時の培養液のウイルス量は、「谷山S-1」株および「谷山S-3」株では $10^{6.8\sim7.0}$  PFU/mlであり、「谷山S-2」株では $10^{6.0}$  PFU/mlとやや少なかった。

### 1.3 分離ウイルスの同定

新分離ウイルスについて血清学的同定試験を行なった。

既知日本脳炎ウイルス富士株と新分離株とのモルモット免疫血清による交差中和試験および交差H I 試験の結果、表1および2に示すように、いずれも交差反応が成立し、日本脳炎ウイルスと同定された。

表 1. 交 差 中 和 試 験

| ウイルス株  | 免 疫 血 清 |        |        |        |
|--------|---------|--------|--------|--------|
|        | 富 士 株   | 谷山S-1株 | 谷山S-2株 | 谷山S-3株 |
| 富 士 株  | 1,400*  | 730    | 1,200  | 450    |
| 谷山S-1株 | 1,200   | 730    | 660    | 380    |
| 谷山S-2株 | 1,000   | 1,300  | 1,000  | 550    |
| 谷山S-3株 | 1,200   | 860    | 780    | 570    |

※ 50% ブラック減少を示す血清の希釈倍数を示す。

C E細胞を用い、C E細胞継代11代ウイルスを使用した。

表 2. 交差血球凝集抑制試験

| ウイルス株  | 免 疫 血 清 |        |        |        |
|--------|---------|--------|--------|--------|
|        | 富 士 株   | 谷山S-1株 | 谷山S-2株 | 谷山S-3株 |
| 富 士 株  | 160*    | 160    | 160    | 160    |
| 谷山S-1株 | 160     | 160    | 160    | 160    |
| 谷山S-2株 | 160     | 160    | 320    | 160    |
| 谷山S-3株 | 160     | 80     | 160    | 160    |

※ 血球凝集を抑制する血清の最高希釈倍数を示す。

モルモット免疫血清とC E細胞継代11代ウイルス感染マウス脳のアセトン・エーテル抽出抗原を使用した。



## 2. 新分離株の生物学的ならびに物理化学的性状

主に新分離株と実験室保存株の C E 細胞継代 1 1 代ウイルスについて性状を対比しながら調べた。

### 2. 1 生物学的性状

#### 2. 1. 1 培養細胞におけるウイルス増殖

日本脳炎ウイルスの感受性細胞である C E 細胞と E S K 細胞を用いて調べた。

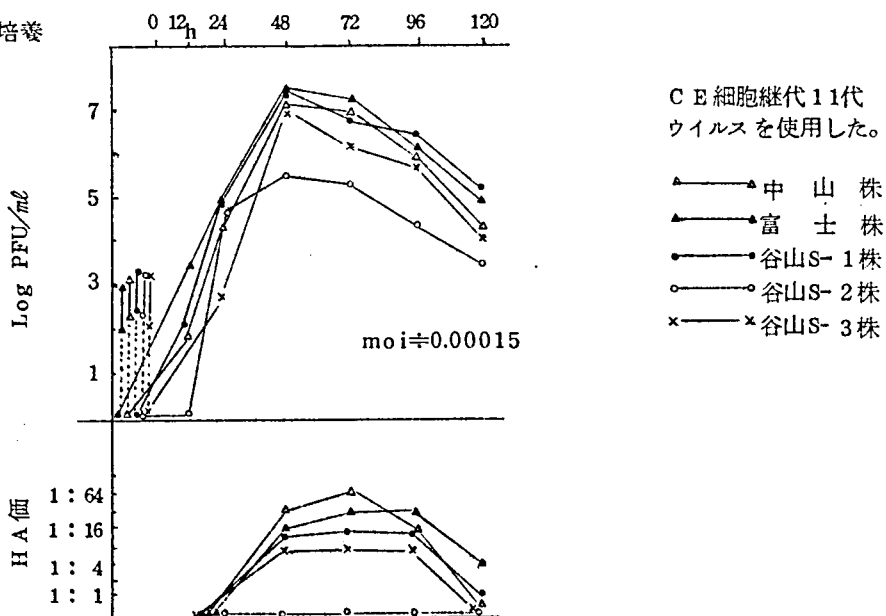
##### 2. 1. 1. 1 C E 細胞培養

図 - 4 に示すように、いずれの株でも  $37^{\circ}\text{C}$  培養よりも  $30^{\circ}\text{C}$  培養のほうが、増殖の立ち上りはやや遅れた。しかしながら、最高ウイルス価は高く、また、その下降もゆるやかであった。なかでも「谷山 S - 2」株は、増殖がわるく、増殖の立ち上りが遅れ、最高ウイルス価は  $10^{5.5\sim 6.0}$  PFU/ml と低く、培養液の H A 性は  $30^{\circ}\text{C}$  培養でわずかに出現したにすぎなかった。しかし他の 4 株では、増殖がよく、 $10^{7.0\sim 8.0}$  PFU/ml の最高ウイルス価を示し、培養液の H A 性の出現もよかった。

そこで、「谷山 S - 2」株の  $37^{\circ}\text{C}$  培養について接種ウイルス量をかえて増殖を調べた。図 - 5 に示すように、大量接種では増殖の立ち上りが早く、少量接種ではかなり遅れたが、その下降は大量接種に比べてゆるやかであった。しかし、最高ウイルス価は接種量と関係なく、いずれも  $10^{4.2\sim 4.4}$  PFU/ml と低く、培養液の H A 性もみとめられなかった。

図 4. CE 細胞におけるウイルス増殖

37 °C 培養



30 °C 培養

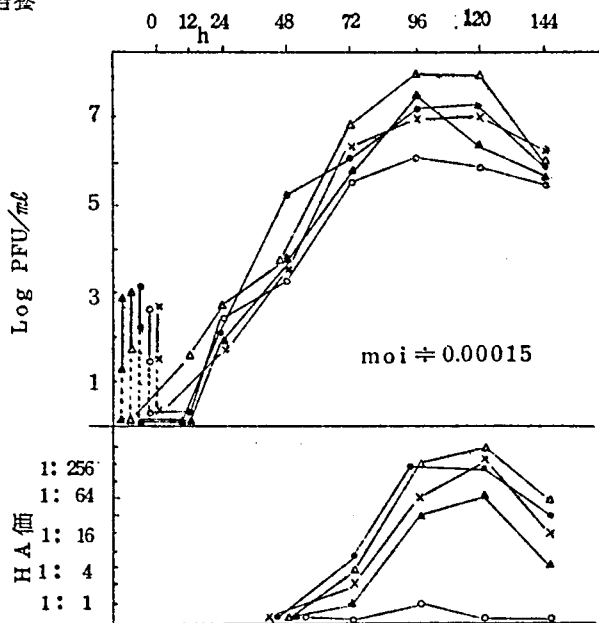
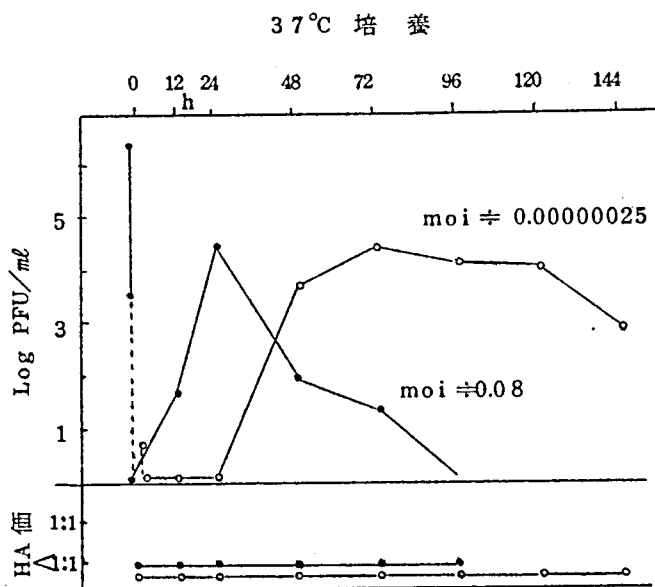


図 5. C E 細胞における接種量別による  
谷山 S - 2 株の増殖



C E 細胞継代 11 代ウイルスを使用した。

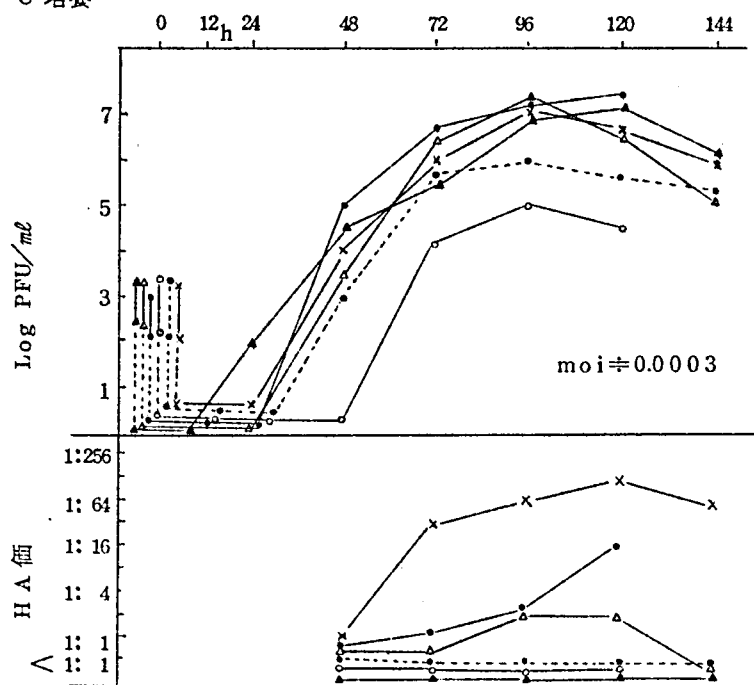
- — 大量接種
- — 少量接種

### 2. 1. 1. 2 E S K細胞培養

37°C培養における増殖を調べた。図-6に示すように、「谷山S-2」株では分離当初のウイルスでもCE細胞継代11代ウイルスでも増殖がわるく、増殖の立ち上りがかなり遅れ、最高ウイルス価は $10^{4.7\sim 6.0}$  PFU/mlと低く、培養液のHA性はみとめられなかった。これに反してCE細胞で11代継代した他の4株では、いずれも増殖がよく、増殖の立ち上りが早く、最高ウイルス価は $10^{7.0\sim 7.3}$  PFU/mlに達し、中山株を除き培養液のHA性の出現もよかった。

図 6. E S K細胞におけるウイルス増殖

37°C 培養



CE細胞継代11代ウイルスを使用したか、谷山S-2株はESK細胞継代3代ウイルスも供試した。

▲——▲ 中山株    ●——● 谷山S-1株    ○——○ 谷山S-2株  
△——△ 富士株    ○——○ 谷山S-2株 (ESK細胞3代)  
×——× 谷山S-3株

## 2. 1. 2 C F および H A 抗原性

### 2. 1. 2. 1 C F 抗原

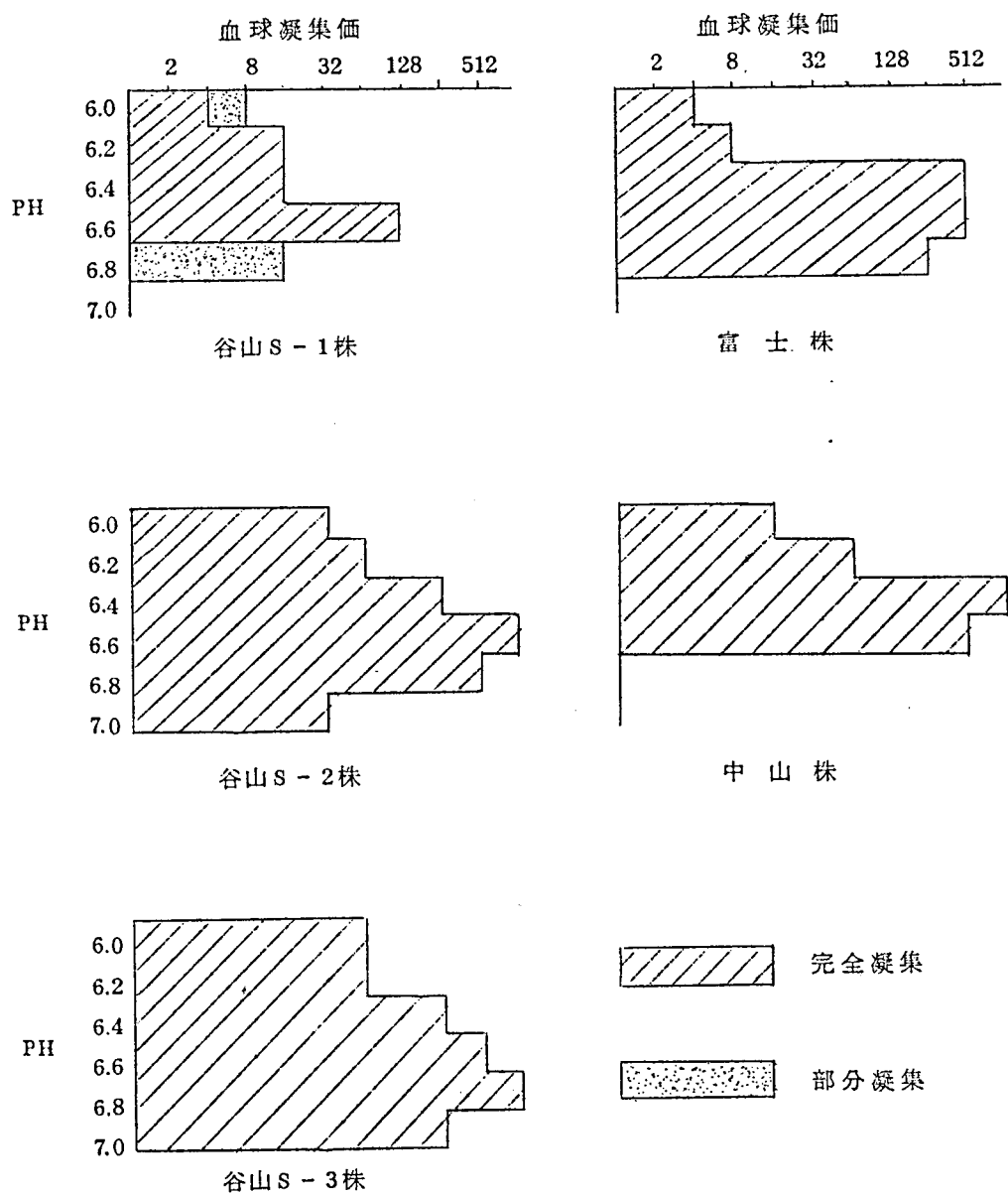
保存株と新分離株で作った A・E 抗原の 4 単位で測定した 8 単位の免疫血清を用いて、片面交差試験を行ない C F 抗原価を比較した。その結果、中山株および「谷山 S-2」株では抗原性が強く、16~32 倍の抗原価を示したが、「谷山 S-1」株、「谷山 S-3」株および富士株では弱く、4~8 倍の抗原価を示したにすぎなかった。このように株間の C F 抗原性に量的な差はみとめられたが、質的な差異はみとめられなかった。

### 2. 1. 2. 2 H A 抗原性

#### 2. 1. 2. 2. 1 H A の至適 P H 域

新分離株抗原と保存株抗原との間に差があり、図-7 に示すように、中山株および富士株抗原では 6.4 が至適であるのに比べ、新分離株抗原ではこれよりもやや高く、「谷山 S-1」株および「谷山 S-2」株は 6.6、「谷山 S-3」株では 6.8 であった。なお、C E 細胞培養ウイルス液を抗原として調べたが、A・E 抗原の場合と同様な P H 域を示した。

図 7. 血球凝集抗原の至適 P H 域



C E 細胞継代 11 代ウイルス感染マウス脳のアセトン・エーテル抽出抗原を使用した。

## 2. 1. 2. 2. 2 血球の種類とH A価

新分離株と保存株で作ったA・E抗原を用い、その至適PHにおいて、ほ乳動物と鳥類の血球の種類とH A価との関係について比べた。表-3に示すように、いずれの株でも鷓鴣、ハト、ニワトリ-2日令および75日令、ウマおよびウサギ血球では、ほぼ同程度の高いH A価を示したが、これに比べ2年鶏、ブタ、ヒツジ、モルモット、ラットおよびマウス血球では、H A価はかなり低く、とくにウシ血球ではいずれの株でも凝集しなかった。また、H A価の株間の差についてみると、2年鶏およびラットの血球においては、新分離株抗原は保存株抗原よりも、かなり低いH A価を示す傾向がみられた。

表 3. 血球の種類と血球凝集価

| 血球の種類 |      | 反応抗原と血球凝集価 |       |     |     |                   |
|-------|------|------------|-------|-----|-----|-------------------|
|       |      | 中          | 山     | 富   | 士   | 谷山S-1 谷山S-2 谷山S-3 |
| 鷓     | 鳥    | 1,024      | 2,048 | 256 | 512 | 1,024             |
| ハ     | ト    | 2,048      | 2,048 | 512 | 512 | 1,024             |
| ニ     | 2年   | 128        | 256   | 2   | 8   | 16                |
| ワ     | 75日  | 1,024      | 2,048 | 64  | 128 |                   |
| トリ    | 2日   | 1,024      | 2,048 | 256 | 256 | 1,024             |
| ウ     | マ    | 1,024      | 1,024 | 256 | 256 | 1,024             |
| ウ     | シ    | <2         | <2    | <2  | <2  | <2                |
| ブ     | タ    | 512        | 1,024 | 128 | 128 | 256               |
| ヒ     | ツジ   | 256        | 128   | 128 | 128 | 256               |
| ウ     | サギ   | 1,024      | 1,024 | 256 | 512 | 1,024             |
| モ     | ルモット | 512        | 256   | 256 | 256 | 512               |
| ラ     | ット   | 128        | 256   | 16  | 16  | 64                |
| マ     | ウス   | 512        | 512   | 32  | 128 | 128               |

CE細胞継代11代ウイルス感染マウス脳のアセトン・エーテル抽出の10倍抗原を原とした。

## 2.2 物理化学的性状

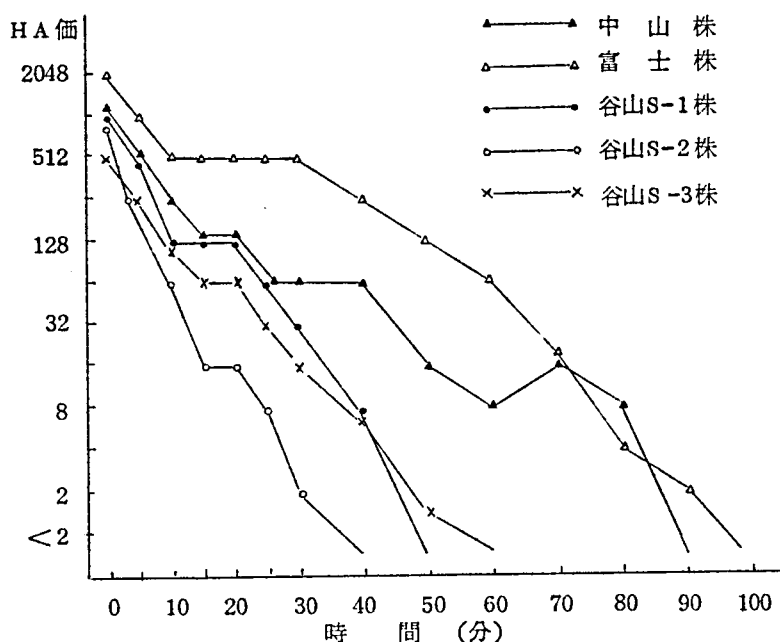
### 2.2.1 物理学的性状

#### 2.2.1.1 H A 素およびウイルスの耐熱性

##### 2.2.1.1.1 H A 素の耐熱性

新分離株および保存株の H A 抗原 (PH 9.0) を  $40^{\circ}\text{C}$  に加温して H A 素の不活化を調べた。図 - 8 に示すように、新分離株の H A 抗原性は保存株抗原に比べて早く消失し、耐熱性はかなり弱かった。なかでも「谷山 S - 2」株はとくに弱く、40 分で不活された。

図 8. 血球凝集素の耐熱試験



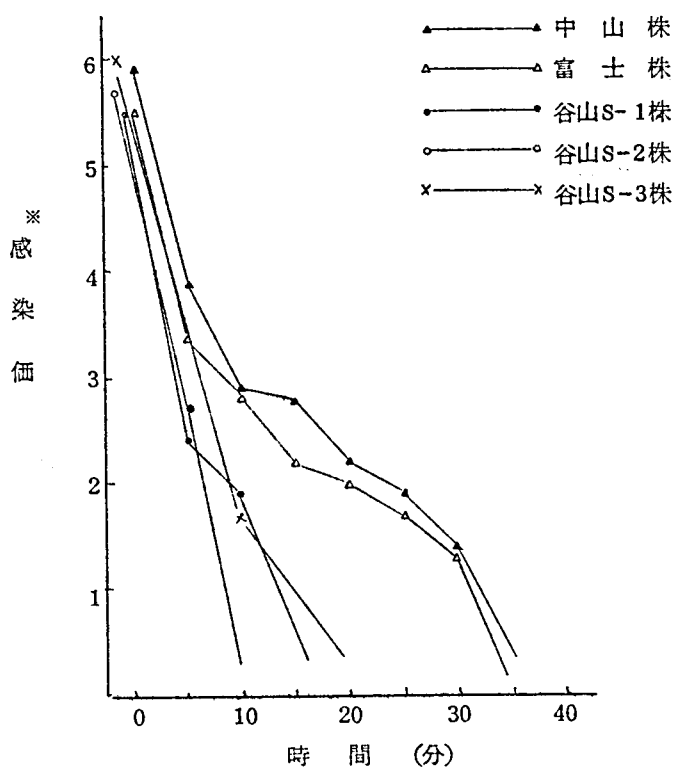
C E 細胞継代 11 代ウイルス感染マウス脳のアセトン・エーテル抽出抗原液 (PH 9.0) を  $40^{\circ}\text{C}$  で加熱した。



### 2. 2. 1. 1. 2 ウイルスの耐熱性

C E細胞培養ウイルス液を再蒸留水で10倍希釈（PH7.4に修正）し，50°Cで加熱して不活化を調べた。図-9に示すように，新分離株は保存株に比べて早く不活化され，なかでも「谷山S-2」株の耐熱性は，さらに弱く10分で不活化された。

図 9. ウイルス活性の耐熱性



※ Log PFU/ml

C E細胞継代11代ウイルスを再蒸留水（PH7.4）で10倍に希釈し，50°Cで加熱した。

## 2. 2. 1. 2 H A 素およびウイルスのプロタミン

### 沈降試験

表-4 に示すように、H A 素およびウイルスはプロタミン処理によって、いずれの株でも非沈降性であり、HA 価および感染価は対照のそれとほとんど変りがなかった。

表 4. プロタミン沈降試験

| ウイルス株  | 血 球 凝 集 価 <sup>※</sup> |      | 感 染 価 <sup>※※</sup> |     |
|--------|------------------------|------|---------------------|-----|
|        | 処 理                    | 対 照  | 処 理                 | 対 照 |
| 中 山 株  | 1280                   | 2560 | 6.2                 | 6.4 |
| 富 士 株  | 1280                   | 1280 | 5.2                 | 5.5 |
| 谷山S-1株 | 640                    | 640  | 5.4                 | 5.6 |
| 谷山S-2株 | 320                    | 640  | 4.5                 | 4.7 |
| 谷山S-3株 | 640                    | 320  | 4.8                 | 5.0 |

※ 血球凝集を示す抗原の最高希釈倍数を示す。

※※ Log PFU/ml

C E 細胞継代 11 代ウイルスを使用し、硫酸プロタミン (25mg/ml) で 4°C 30 分処理した。

## 2. 2. 2 化学的性状

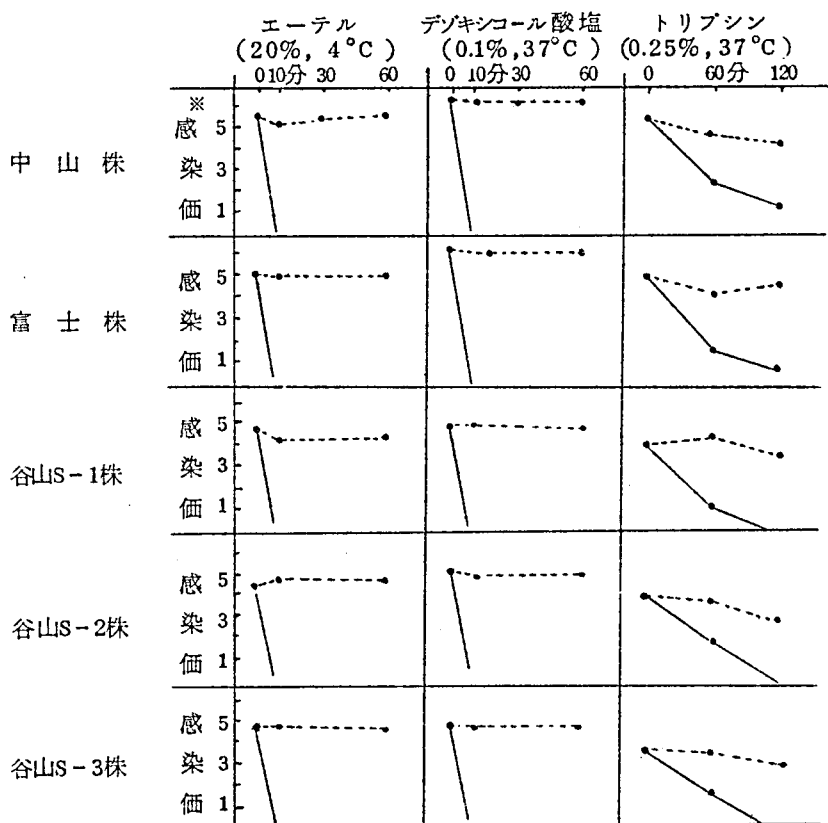
### 2. 2. 2. 1 エーテルおよびデゾキシコール酸塩 による不活化

エーテルおよびデゾキシコール酸塩によって、いずれの株でも10分以内に不活化された(図-10)。

### 2. 2. 2. 2 トリプシンによる不活化

37°Cで2時間のトリプシン感作で、新分離株はこの間にほとんど不活化されたが、保存株ではかなり抵抗を示し、ウイルス活性の残存がみとめられた(図-10)。

図10. ウイルスの不活化試験



※ Log PFU/ml, CE細胞継代11代ウイルスを使用した。

—●— 試験      - - - - - ● - - - - - 対照

### 3. 細胞ならびに動物に対する病原性

#### 3.1 細胞病原性

##### 3.1.1 C P E

新分離株および保存株のいずれでも，C E細胞の場合と異なり，E S K細胞ではC P Eがみられた。C P Eは最高ウイルス量に達する前からみとめられ，増殖の立ち上りのわるい「谷山S-2」株では，ほかの株に比べてC P Eの出現がやや遅れた。

C P Eの進行は，細胞シートの各所に光沢を失なった不整形に膨化した細胞集簇が散見されるようになり，この頃には培養液中に浮游細胞が次第に増加してくる。これらの変性細胞は円形化について顆粒化し，ついに細胞シート全域におよび細胞は変性脱落した。C P Eの程度には株間に差があり，中山株ではその程度がやや軽く，残存細胞がみとめられたが，新分離株および富士株では，いずれも強く現われ，C P Eをみとめてから通常24～48時間以内に細胞はガラス壁から脱落した。

C P Eの出現した単層培養のギムザ染色標本について鏡検すると，変性細胞は細胞形質の空胞化と核濃縮およびクロマチンの消失などの退行変性ならびに壊死の所見がみとめられた。

これらの所見は，対照のウイルス未接種細胞ではみとめられず，また免疫血清によって阻止された。

### 3. 1. 2 ブラック形成

C E細胞ではウイルス接種後3～4日目にブラックがみとめられた。C E細胞継代11代ウイルスでは2 mmの辺縁の不明瞭なブラックを作ったが，マウス脳継代ウイルスでは1 mm大のやや小さい辺縁の明瞭なブラックを作った。また，E S K細胞におけるブラック形成は，通常ウイルス接種後5日以降にみとめられ，C E細胞継代11代ウイルスでは2～3 mm大の辺縁の不明瞭なブラックを作った。

## 3. 2 動物に対する病原性

### 3. 2. 1 マウスに対する病原性

新分離株と保存株のC E細胞継代11代ウイルスと新分離株の分離当初のE S K細胞継代3代ウイルスについて，脳内および皮下接種による脳内感染性について感染価を比べた。また接種量別にウイルス血症と血中抗体の出現について調べた。

#### 3. 2. 1. 1 脳内および皮下接種による脳内感染性

脳内および皮下接種による感染価を調べた成績は表-5に示した。

表 5. マウスに対する病原性

| ウイルス株 継 代 歴  | 乳 呑 み マ ウ ス                         |     |                       | 成 熟 マ ウ ス |      |                       | 脳 内<br>感 染 性<br>(A-C) |     |
|--|-------------------------------------|-----|-----------------------|-----------|------|-----------------------|-----------------------|-----|
|  | 脳 内 ・ 皮 下                           |     | 末 梢<br>感 染 性<br>(A-B) | 脳 内 ・ 皮 下 |      | 末 梢<br>感 染 性<br>(C-D) |                       |     |
|  | (A)                                 | (B) |                       | (C)       | (D)  |                       |                       |     |
| 中 山 M <sub>7</sub> ,ESK <sub>3</sub> ,CE <sub>11</sub>   | 7.5 <sup>※</sup>                    | 5.8 | 1.7                   | 6.0       | <1.5 | >4.5                  | 1.5                   |     |
| 富 士 M <sub>123</sub> ,ESK <sub>3</sub> ,CE <sub>11</sub> | 8.8                                 | 6.7 | 2.1                   | 7.8       | <1.5 | >6.3                  | 1.0                   |     |
| 谷山S-1  | ESK <sub>3</sub>                    | 8.3 | 7.8                   | 0.5       | 6.7  | 2.5                   | 4.2                   | 1.6 |
|  | ESK <sub>3</sub> , CE <sub>11</sub> | 8.4 | 7.2                   | 1.2       | 7.5  | <1.5                  | >6.0                  | 0.9 |
| 谷山S-2  | ESK <sub>3</sub>                    | 7.7 | 5.1                   | 2.6       | 6.5  | <1.5                  | >5.0                  | 1.2 |
|  | ESK <sub>3</sub> , CE <sub>11</sub> | 8.3 | 4.5                   | 3.8       | 7.0  | <1.5                  | >5.5                  | 1.3 |
| 谷山S-3  | ESK <sub>3</sub>                    | 7.8 | 7.3                   | 0.5       | 7.0  | 3.2                   | 3.8                   | 0.8 |
|  | ESK <sub>3</sub> , CE <sub>11</sub> | 6.8 | 6.3                   | 0.5       | 6.0  | <1.5                  | >4.5                  | 0.8 |

※ Log LD<sub>50</sub>/ml

M～マウス, ESK～ブタ腎継代細胞, CE～鶏胎児細胞, 数字は継代数を示す。  
乳呑みマウスは1～3日令, 成熟マウスは28～32日令を供試した。

### 3. 2. 1. 1. 1 成熟マウス

新分離株および保存株の脳内接種では，継代歴と関係なく，いずれも脳内感染性は強く，株間の差異はほとんどみられなかった。しかし，脳内接種した場合に「谷山 S - 2」株は他の株に比べて潜伏期が 1 ～ 2 日長いことが経験されたが，発症後死亡するまでの経過には差がみられなかった。

皮下接種では，「谷山 S - 2」株は分離当初のウイルスでも保存株と同様に末梢感染性が弱く，脳内感染をおこさないが，ほかの分離株では分離当初のウイルスは，末梢感染性が強く，脳内感染による発症死がみられた。しかしながら，脳内接種に比べて感染価は低く， $10^{2.5 \sim 3.2} \text{LD}_{50}/\text{ml}$  であった。

### 3. 2. 1. 1. 2 乳呑みマウス

乳呑みマウスにおける脳内および皮下接種による感染価は，いずれの株でも成熟マウスのそれよりも高く，また脳内接種は皮下接種した場合に比べて，感染価はいずれの株でも高い結果がえられた。

病原性，すなわち末梢感染性について，脳内接種と皮下接種における感染価の差についてみると，「谷山 S - 2」株では分離当初のウイルスで 2.6 Log，CE 細胞継代 11 代ウイルスで 3.8 Log の差がみとめられ，末梢感染性がかなり弱かった。しかし，ほかの分離株では継代歴と関係なく，脳内および皮下接種による感染価の差はほとんどなく，いずれも末梢感染性が強かった。なお，保存株では中山株で 1.7 Log，富士株では 2.1 Log の差がみられた。すなわち，保存株の CE 細胞継代 11 代ウイルスと比べても，「谷

山 S - 2」株は末梢感染性が弱かった。

### 3. 2. 1. 2 ウイルス血症と血中抗体

新分離株と保存株の C E 細胞継代 1 1 代ウイルスを主に使用したが、「谷山 S - 2」株では分離当初の E S K 細胞継代 3 代ウイルスも供試した。

いずれの株でも接種ウイルス量をかえて、それぞれ 1 2 匹の 3 週令マウスに皮下接種したが、「谷山 S - 2」株では腹腔内接種も併用した。

ウイルス血症は、接種後 2 日目に接種量別に 6 匹のマウスについて調べたが、残りの 6 匹は 3 週間観察後、生存例については H I 抗体を調べ、接種ウイルス株、ウイルス血症の出現、生死および H I 抗体産生との相互関係について調べた。その成績は表 - 6 に示した。

「谷山 S - 2」株では、分離当初のものでも、C E 細胞に継代したものでも  $10^{6.0}$  PFU/0.1 ml ウイルス量を皮下あるいは腹腔内に接種してもウイルス血症は検出されず、死亡例もなかった。また、H I 抗体陽転例はいずれの接種法でも、接種ウイルス量が  $10^{4.0}$  PFU/0.1 ml 以上のところでわずかにみとめられたにすぎなかった。しかし、ほかの分離株では少しの接種量 ( $10^{1.0}$  PFU/0.1 ml 以上) でもウイルス血症が検出され、死亡および H I 抗体陽転例もこれとよく平行した。いっぽう、保存株では接種量が  $10^{6.0}$  PFU/0.1 ml 以上のところでウイルス血症、死亡および H I 抗体陽転例がわずかにみとめられたにすぎなかった。



表 6. マウスにおけるウイルス血症と血中抗体

| ウイルス株 継代歴 ルート  | 試験区分                                   | 接種ウイルス量※ |         |         |         |         |         |
|--|--|----------|---------|---------|---------|---------|---------|
|  |  | 6.9-6.0  | 5.9-5.0 | 4.9-4.0 | 3.9-3.0 | 2.9-2.0 | 1.9-1.0 |
| 中山 M?, ESK <sub>3</sub> , CE <sub>11</sub> 皮下                | ウイルス血症                                 | 1/6      | 0/6     | 0/6     | 0/6     | 0/6     | 0/6     |
|  | 死 亡                                    | 1/6      | 0/6     | 0/6     | 0/6     | 0/6     | 0/6     |
|  | H I 抗体                                 | 0/5      | 0/6     | 0/6     | 0/6     | 0/6     | 0/6     |
| 富士 M <sub>153</sub> , ESK <sub>3</sub> , CE <sub>11</sub> 皮下 | ウイルス血症                                 | 1/6      | 0/6     | 0/6     | 0/6     | 0/6     | 0/6     |
|  | 死 亡                                    | 1/6      | 0/6     | 0/6     | 0/6     | 0/6     | 0/6     |
|  | H I 抗体                                 | 1/5      | 0/6     | 0/6     | 0/6     | 0/6     | 0/6     |
| 谷山S-1 ESK <sub>3</sub> , CE <sub>11</sub> 皮下                 | ウイルス血症                                 | 4/6      | 6/6     | 4/6     | 4/6     | 2/6     | 1/6     |
|  | 死 亡                                    | 5/6      | 5/6     | 3/6     | 2/6     | 3/6     | 0/6     |
|  | H I 抗体                                 | 1/1      | 1/1     | 1/3     | 1/4     | 1/3     | 0/6     |
| 谷山S-2  | ESK <sub>3</sub> 皮下                    | ウイルス血症   | 0/6     | 0/6     | 0/6     | 0/6     | 0/6     |
|  |  | 死 亡      | 0/6     | 0/6     | 0/6     | 0/6     | 0/6     |
|  |  | H I 抗体   | 1/6     | 2/6     | 1/6     | 0/6     | 0/6     |
|  | ESK <sub>3</sub> , CE <sub>11</sub> 皮下 | ウイルス血症   | 0/6     | 0/6     | 0/6     | 0/6     | 0/6     |
|  |  | 死 亡      | 0/6     | 0/6     | 0/6     | 0/6     | 0/6     |
|  |  | H I 抗体   | 0/6     | 1/6     | 1/6     | 0/6     | 0/6     |
|  | ESK <sub>3</sub> , CE <sub>11</sub> 腹腔 | ウイルス血症   | 0/6     | 0/6     | 0/6     | 0/6     | 0/6     |
|  |  | 死 亡      | 0/6     | 0/6     | 0/6     | 0/6     | 0/6     |
|  |  | H I 抗体   | 1/6     | 2/6     | 2/6     | 0/6     | 0/6     |
| 谷山S-3 ESK <sub>3</sub> , CE <sub>11</sub> 皮下                 | ウイルス血症                                 | 3/6      | 4/6     | 6/6     | 2/6     | 3/6     | 1/6     |
|  | 死 亡                                    | 4/6      | 5/6     | 3/6     | 3/6     | 1/6     | 0/6     |
|  | H I 抗体                                 | 1/2      | 0/1     | 3/3     | 2/3     | 1/5     | 1/6     |

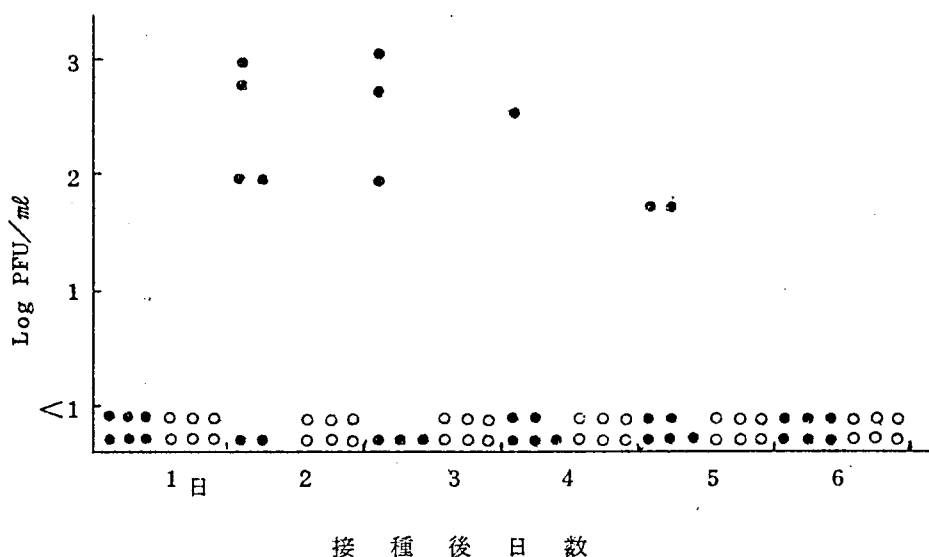
※ Log PFU/0.1 ml, M~マウス, ESK~ブタ腎継代細胞, CE~鶏胎児細胞, 数字は継代数を示す。

接種量別に 12 匹の 3 週令マウスの皮下に 0.1 ml 接種し, 6 匹は 2 日目にウイルス血症, 残りの 6 匹は 3 週間観察し, 生存例では H I 抗体を調べた。

そこでウイルス血症の消長について「谷山S-1」株 ( $10^{5.7}$  PFU/0.1ml) と「谷山S-2」株 ( $10^{6.0}$  PFU/0.1ml) を皮下に接種し、6日目まで毎日、それぞれ6匹について調べた。その結果は図-11に示した。

図 11. マウスにおける血中ウイルスの消長

- 谷山S-1株,  $10^{5.7}$  PFU/0.1ml, 皮下
- 谷山S-2株,  $10^{6.0}$  PFU/0.1ml, 皮下



CE細胞継代11代ウイルスを3週令マウスに接種したのち、毎日それぞれ6匹についてウイルス血症を調べた。

「谷山 S-2」株を接種したマウスでは、いずれの時期でもウイルス血症は検出されなかった。しかし「谷山 S-1」株では2日目からウイルス血症が検出され、2～3日目が検出率が高く、5日目まで検出されたが、6日目には検出できなかった。

血中ウイルス量は、いずれの株でも接種ウイルス量と関係がなく、 $10^{2.0 \sim 3.0}$  PFU/ml であった。

また、HI抗体も接種ウイルス量と関係がなく、いずれの株でも10～20倍のHI価を示すものが多かった。

### 3.2.2 HPCD豚に対する病原性

「谷山 S-2」株の継代歴の異なる3系統のウイルス（分離当初のウイルス、すなわち、ESK細胞継代3代ウイルスおよびマウス継代2代ウイルスとESK細胞継代3代後CE細胞継代11代ウイルス）と対照に「谷山 S-1」株（ESK細胞継代3代後マウス脳継代3代ウイルス）を加えて、計4系のウイルスを3頭ずつ4群のHPCD豚（4日令）の皮下に接種した。接種ウイルス量はいずれもほぼ同一である。接種後、臨床所見およびウイルス血症について調べるとともに、各群とも2日、4日および6日目に1頭ずつ殺処分してウイルス回収試験を行ない、ウイルスの体内分布、抗体検査ならびに中枢神経の病理組織学的検査を行なった。

#### 3.2.2.1 臨床所見

「谷山 S-2」株接種豚では、いずれも体温が不規則に変動したが、発熱する傾向はなく、発熱の徴候ははっきりせず、

その他臨床的にも全例無症状であった。しかしながら、「谷山 S - 1」株接種豚では、ウイルス接種後の経過にともない発熱したが、その他の臨床症状は 5 日目まではみとめられなかった。しかし、6 日目に残りの 1 頭は元気消失、しんせん、後軀麻痺などの神経症状を示し、「谷山 S - 2」株接種豚に比べて、臨床的にも重い症状を示した。なお、接種後 6 日までの体重増は、いずれのブタでも 300~500g 程度であった。

### 3. 2. 2. 2 ウイルス血症

表 - 7 に示すように、「谷山 S - 1」株接種豚では、接種後 1 日目からウイルス血症が検出され、その持続も長く（4 日間）、血中ウイルス量も多かったが、これに反して「谷山 S - 2」株接種豚では、ウイルス血症の出現がおくれ、その持続は短く（2 日間）、血中ウイルス量が少ないなど、ウイルス血症の程度が「谷山 S - 1」株接種豚に比べてかなり軽かった。

表 7. HPCD 豚におけるウイルス血症

| ブタ No | ウイルス株<br>継代歴 | 接種量<br>ルート | 接種後日数 |            |       |      |      |     |
|-------|--------------|------------|-------|------------|-------|------|------|-----|
|       |              |            | 1     | 2          | 3     | 4    | 5    | 6   |
| P-21  | 谷山 S-2       | 5.2※       | ※※※   | — K        |       |      |      |     |
| P-22  |              |            | —     | —          | <1.2※ | 2.5K |      |     |
| P-23  |              |            | —     | —          | <0.7  | 2.8  | —    | — K |
| P-24  | 谷山 S-2       | 5.5        | —     | ※※※<br>+ K |       |      |      |     |
| P-25  |              |            | —     | —          | —     | 2.7K |      |     |
| P-26  |              |            | —     | —          | —     | <1.2 | <0.7 | — K |
| P-27  | 谷山 S-2       | 5.7        | —     | — K        |       |      |      |     |
| P-28  |              |            | —     | —          | —     | 1.8K |      |     |
| P-29  |              |            | —     | —          | 3.0   | 4.3  | —    | — K |
| P-30  | 谷山 S-1       | 5.5        | 4.7   | 5.5K       |       |      |      |     |
| P-31  |              |            | 1.0   | 2.7        | 4.5   | 3.0K |      |     |
| P-32  |              |            | 2.5   | 2.8        | 4.5   | 4.7  | —    | — K |

※ Log TCID<sub>50</sub>/ml

※※ ウイルス血症陽性, 感染価算出不能

※※※ ウイルス血症陰性

ESK~ブタ腎継代細胞, CE~鶏胎児細胞, M~マウス, K~殺,  
数字は継代数を示す。

4 日令の HPCD 豚を供試した。

### 3. 2. 2. 3 ウイルスの体内分布

試験豚の諸臓器からのウイルス回収試験の成績は表－8に示した。

表 8. HPCD 豚におけるウイルスの体内分布

| ウイルス株<br>継 代 歴<br>接 種 ル ー ト<br>接 種 量<br>接 種 後 日 数 | 谷山 S-2           |                   |    |                                   |                   |    |                |     |    | 谷山 S-1                          |      |     |
|---|------------------|-------------------|----|-----------------------------------|-------------------|----|----------------|-----|----|---------------------------------|------|-----|
|   | ESK <sub>3</sub> |                   |    | ESK <sub>3</sub> CE <sub>11</sub> |                   |    | M <sub>2</sub> |     |    | ESK <sub>3</sub> M <sub>3</sub> |      |     |
|   | S C              |                   |    | S C                               |                   |    | S C            |     |    | S C                             |      |     |
|   | 5.2 <sup>※</sup> |                   |    | 5.5                               |                   |    | 5.7            |     |    | 5.5                             |      |     |
|   | 2                | 4                 | 6  | 2                                 | 4                 | 6  | 2              | 4   | 6  | 2                               | 4    | 6   |
| 脳   | ※※※              | <1.7 <sup>※</sup> | —  | —                                 | —                 | —  | —              | —   | —  | 3.6                             | —    | —   |
| 脊 髄   | —                | <1.7              | —  | —                                 | —                 | —  | —              | —   | —  | 3.8                             | —    | 4.0 |
| リンパ節  | —                | 3.3               | —  | <1.8                              | <2.8 <sup>※</sup> | —  | <2.5           | —   | —  | 4.3                             | <2.8 | +   |
| 肺   | —                | <2.6              | —  | —                                 | <1.7              | —  | —              | —   | —  | 4.0                             | <2.2 | —   |
| 肝   | —                | —                 | —  | <2.0                              | —                 | —  | —              | —   | —  | 4.3                             | +    | —   |
| 腎   | —                | <1.7              | —  | —                                 | —                 | —  | —              | —   | —  | 4.0                             | —    | —   |
| 脾   | —                | <1.7              | —  | <1.8                              | —                 | —  | —              | —   | —  | 4.7                             | <1.7 | —   |
| 血 液   | —                | 2.5               | —  | +                                 | 2.7               | —  | —              | 1.8 | —  | 5.5                             | 3.0  | —   |
| 血球凝集抑制価   | <5               | <5                | <5 | <5                                | <5                | 10 | <5             | <5  | 10 | <5                              | <5   | 40  |

※ Log TCID<sub>50</sub>/ml or g

※※ ウイルス陽性，感染価算出不能

※※※ ウイルス検出陰性

ESK～ブタ腎継代細胞，CE～鶏胎児細胞，M～マウス，数字は継代数を示す。  
4日令のHPCD豚を用い，皮下接種後2日，4日，6日殺例についてウイルス回収試験を行った。

「谷山 S - 1」株接種豚では、接種後 2 日目の脳・脊髄および体内諸臓器に高濃度のウイルスが検出された。一般に諸臓器からのウイルス回収が低下する 6 日目の殺例においても、脊髄からは多量のウイルスが検出された。このように、体内諸臓器とくに脳・脊髄におけるウイルス増殖がよく、中枢神経感染性が著しく強かった。

これに反して、「谷山 S - 2」株接種豚では、接種ウイルスが分離当初のものでも、CE 細胞で 11 代継代したのもでも、継代歴とは関係なく、体内諸臓器とくに脳・脊髄におけるウイルス増殖がわるく、中枢神経系の感染性がきわめて弱かった。すなわち、脳・脊髄では 9 頭中 1 頭から痕跡程度のウイルスが検出されたにすぎなかった。ほかの臓器ではリンパ節が 9 頭中 5 頭と検出率が高く、ウイルス量も比較的多かった。しかし、肺および脾ではそれぞれ 9 頭中 2 頭、肝および腎では 9 頭中 1 頭と検出率が低く、ウイルスは痕跡程度に検出されたにすぎなかった。

#### 3. 2. 2. 4 血中抗体

試験豚における血中抗体は、いずれの試験群も 2 日、4 日および 6 日目の殺例について H I 抗体を調べた。その結果、H I 抗体価は 4 日目まではいずれも 5 倍以下であったが、6 日目には抗体価の上昇がみとめられた。すなわち、「谷山 S - 1」株接種豚の 1 頭では 40 倍に達したが、「谷山 S - 2」株接種豚では、5 倍以下が 1 頭、10 倍が 2 頭みとめられ、いずれも陽性値に達しなかった。このように、「谷山 S - 2」

株接種豚では、「谷山 S - 1」株接種豚に比べて抗体感応がややわるかった（表 - 8）。

### 3. 2. 2. 5 中枢神経の病理組織学的所見

試験豚は、いずれも肉眼的には各臓器はもとより、中枢神経系においても病変はみとめられなかったが、組織学的検査では、いずれのブタでも中枢神経系に病変がみとめられた。

その所見の総括は、表 - 9 に示すように、「谷山 S - 1」株接種豚と「谷山 S - 2」株接種豚では、中枢神経病変の程度に差異がみとめられた。



表 9. HPCD豚における中枢神経の  
病理組織学的変化

| ブタ No. | ウイルス株 | 継代歴                                 | 接種後<br>日数 | 脳<br>膜<br>炎 | 膠増<br>細<br>胞殖 | 血管内<br>形細胞<br>周細胞<br>潤 | 神経<br>細胞性 | 充<br>血 | 出<br>血 |
|--------|-------|-------------------------------------|-----------|-------------|---------------|------------------------|-----------|--------|--------|
| P-21   |       |                                     | 2         | —           | —             | —                      | —         | —      | —      |
| P-22   | 谷山S-2 | ESK <sub>3</sub>                    | 4         | +           | +             | +                      | +         | —      | —      |
| P-23   |       |                                     | 6         | +           | +             | +                      | +         | +      | —      |
| P-24   |       |                                     | 2         | —           | —             | —                      | —         | —      | —      |
| P-25   | 谷山S-2 | ESK <sub>3</sub> , CE <sub>11</sub> | 4         | —           | —             | +                      | —         | —      | —      |
| P-26   |       |                                     | 6         | —           | +             | +                      | —         | —      | —      |
| P-27   |       |                                     | 2         | —           | —             | —                      | —         | —      | —      |
| P-28   | 谷山S-2 | M <sub>2</sub>                      | 4         | —           | —             | —                      | —         | —      | —      |
| P-29   |       |                                     | 6         | +           | +             | +                      | +         | +      | —      |
| P-30   |       |                                     | 2         | —           | +             | +                      | +         | +      | +      |
| P-31   | 谷山S-1 | ESK <sub>3</sub> , M <sub>3</sub>   | 4         | +           | +             | +                      | +         | +      | —      |
| P-32   |       |                                     | 6         | —           | +             | +                      | +         | +      | —      |

++～高度, +～中等度, +～軽度, — ～ 陰性

4日令の HPCD豚に皮下接種後, 各群とも2日, 4日, 6日目の殺例について  
病理組織学的検査を行った。

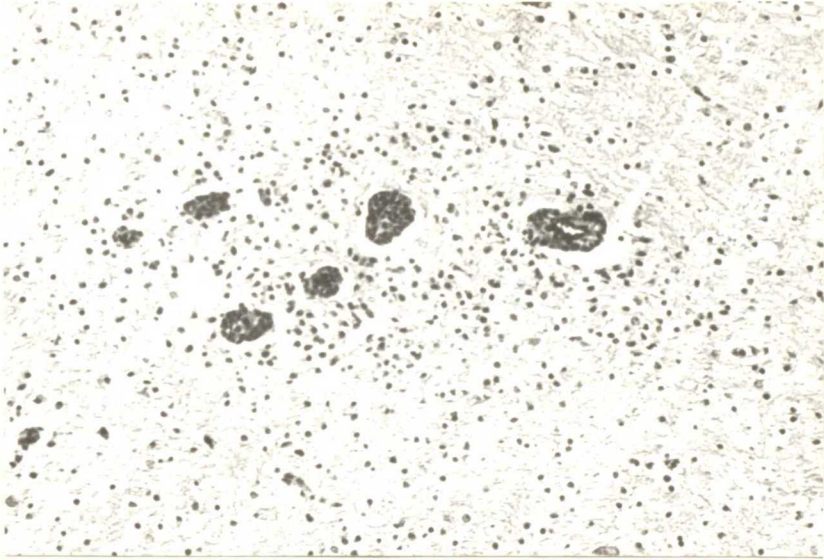
すすなわち、試験対照群の「谷山 S - 1」株接種豚では、脳膜炎、膠細胞の増殖、血管周囲性の円形細胞浸潤、神経細胞の変性、充血および出血などの病理組織変化が、すでにウイルス接種後 2 日目から始まり、4 日、6 日目の殺例の各部位にみとめられ、中枢神経病変の程度はかなり強かった（写真 - 1, 2, 3 および 4）。

これに反して、継代歴の異なる 3 系統の「谷山 S - 2」株接種豚では、病変の程度は軽く、いずれの継代株もウイルス接種後 2 日目の殺例では、中枢神経には変化がなかった。

4 日目の殺例には 1 例に中等程度の変化がみとめられたが、ほかの 2 例では病変が軽く、血管周囲性細胞浸潤のみのもの、あるいは変化のないものがあった。6 日目には 2 例に中等度の病変があり、ほかの 1 例では軽度の膠細胞の増殖、血管周囲性細胞浸潤のみがみとめられたにすぎなかった。

このように、「谷山 S - 2」株接種豚では中枢神経組織における病変の程度が軽く、「谷山 S - 1」株接種豚に比べてかなりの差がみとめられたが、「谷山 S - 2」株の分離方法および継代歴による病変の差異については、はっきりしなかった（写真 - 5, 6, 7, および 8）。

写真 - 1



「谷山 S - 1」株の E S K 細胞継代 3 代，マウス脳継代 3 代ウイルスの接種後 4 日目の殺例，側頭葉におけるグリア細胞の増殖と血管周囲性円形細胞浸潤，ヘマトキシリン・エオジン染色，100 倍。

写真 - 2

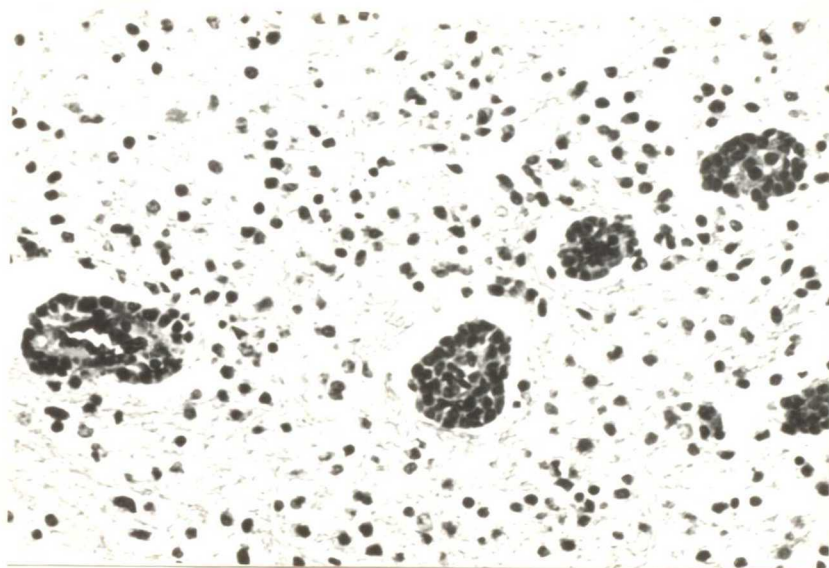
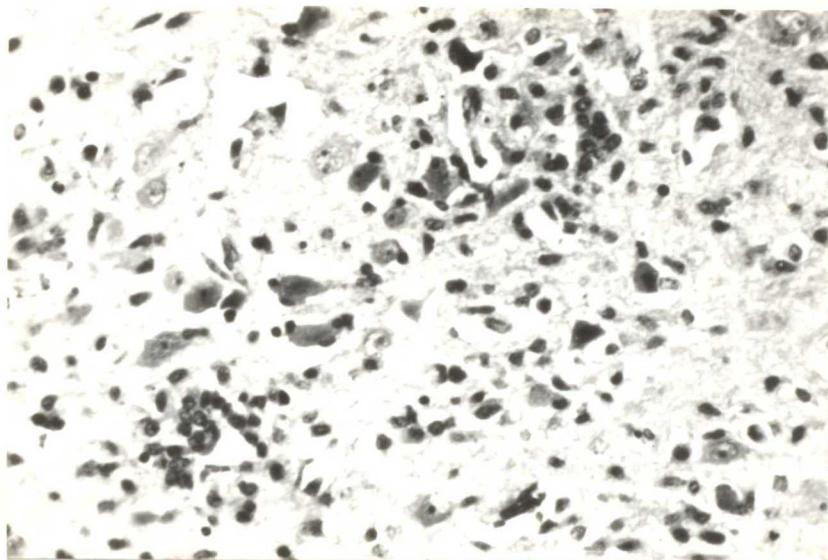


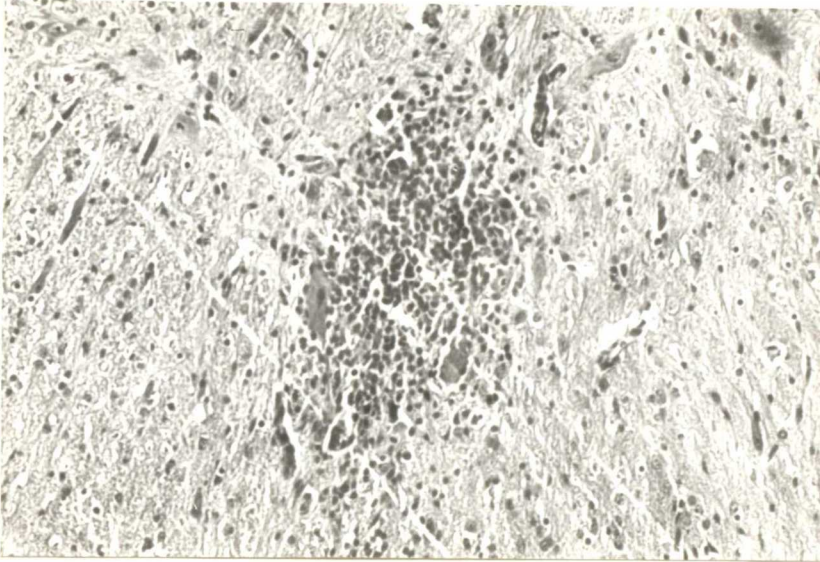
写真 - 1 の拡大，ヘマトキシリン・エオジン染色，  
200 程。

写真 - 3



「谷山 S - 1」株の E S K 細胞継代 3 代，マウス  
脳継代 3 代ウイルスの接種後 6 日目の殺例，側頭葉  
におけるグリア細胞の増殖，神経細胞の変性，血管  
周囲性円形細胞浸潤，ヘマトキシリン・エオジン染色，  
2 0 0 倍。

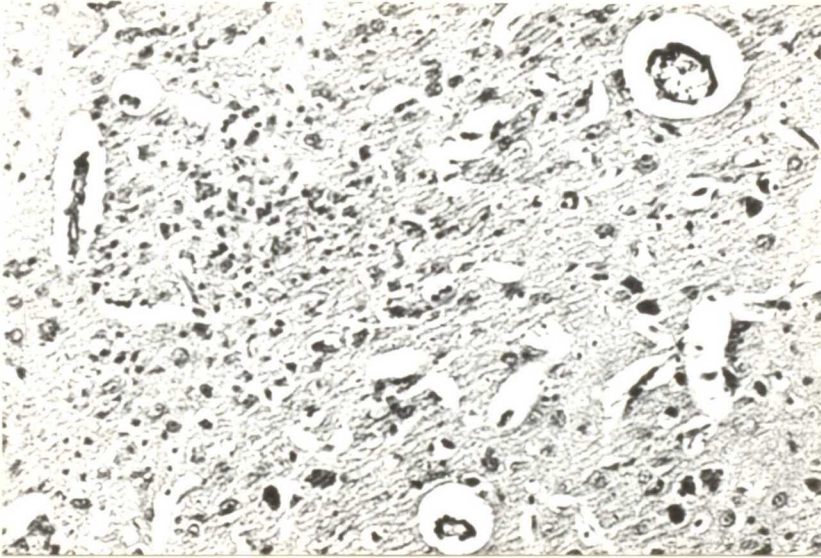
写真 - 4



「谷山 S - 1」株の E S K 細胞継代 3 代，マウス  
脳継代 3 代ウイルスの接種後 4 日目の殺例，脊髓に  
おけるグリア細胞の増殖，ヘマトキシリン・エオジ  
ン染色，1 0 0 倍。



写真 - 5



「谷山 S - 2」株の E S K 細胞継代 3 代ウイルスの接種後 4 日目の殺例，側頭葉におけるグリヤ細胞の増殖と血管周囲性円形細胞浸潤，ヘマトキシリン・エオジン染色，100 倍。

写真 - 6

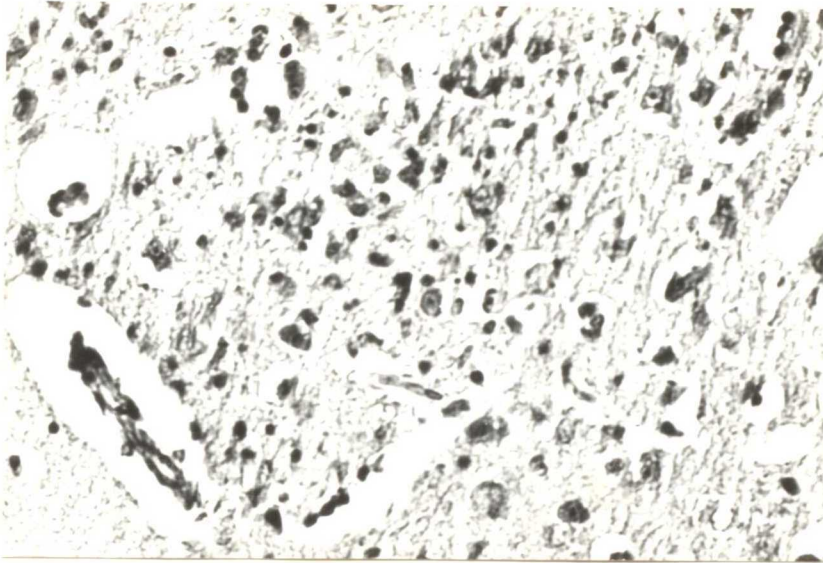
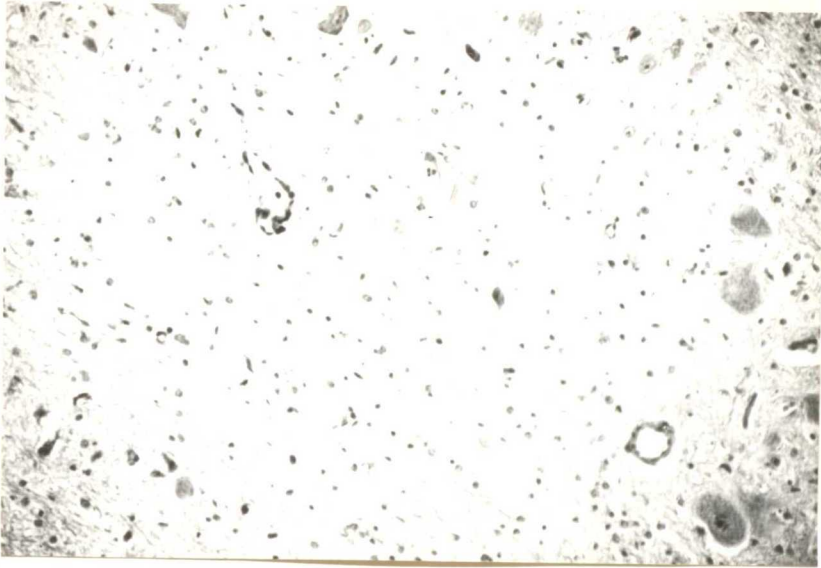


写真 - 5 の拡大，ヘマトキシリン・エオジン染色，  
200倍。



写真 - 7



「谷山 S - 2」株の E S K 細胞継代 3 代ウイルスの接種後 6 日目の殺例，脳橋における血管周囲性円形細胞浸潤，ヘマトキシリン・エオジン染色，100 倍。

写真 - 8



「谷山 S - 2」株のマウス脳継代 2 代ウイルスの  
接種後 6 日目の殺例，血管周囲性円形細胞浸潤，ヘ  
マトキシリン・エオジン染色，200 倍。

日本脳炎ウイルスによるブタの自然感染の実態を知り、さらに流行株の再検討を行なう目的で、1966年から1968年までの3年間、南九州の1地区におとり豚を配置して流行前後における中和抗体およびH I 抗体の消長について調べるとともに、おとり豚の血液からウイルス分離を行ない、抗体の陽転時期およびおとり豚の抗体感応と分離株の性状との関連性について検討した。

その結果、抗体の陽転時期はもとより、抗体の陽転状況とその消長にも年次によって差異があり、1967年は同居豚でも一斉に抗体が陽転せず、しかも中和抗体価およびH I 抗体価が早期に低下する傾向がみられ、他年次の所見と比べてかなり異なった現象であると考ええる。佐沢ら<sup>35)</sup>は1967年、愛知県、栃木県および宮崎県下で行なったブタの個体別H I 抗体消長検査の成績で、抗体が一斉に陽転しなかったことを報告しており、年次によってはこのような異なった流行様相を示すと考えられるが、年次と地域による流行様相の差がどのような要因によって起ったかについての検討は、蚊との関係についてはなされているが、それ以外についてはなされていないようである。

従来から、日本脳炎の流行様相を支配する重要な因子である有毒蚊の発生は、気象条件によって大きく支配されることが知られている。さきに著者ら<sup>13)</sup>は、鹿児島市における年次

別気象状況と流行様相との関連について検討した結果、流行開始と気温とは密接な関係がみとめられたが、1967年のような流行様相を示したことについては、気象条件からものはっきりしなかった。このように、流行様相あるいは発病を支配する因子については不明な点が多く、各地においてさらに詳細な要因分析を行なう必要があるものと考える。

このたび流行期のブタの血液から年次別に1株ずつ、計3株のウイルスを分離したが、新分離ウイルスはプロタミン処理で非沈降性であり、<sup>72)</sup> エーテル<sup>44)</sup>、デゾキシコール酸塩<sup>69)</sup> およびトリプシン処理<sup>70), 48)</sup> で保存株と同様にいずれも不活化され、アルボウイルスB群の性状と一致し、血清学的にはいずれも日本脳炎ウイルスと同定された。

新分離株と実験室保存株との性状には差異があり、HA抗原の至適PH域では新分離株抗原が保存株抗原に比べてやや高く<sup>25), 26)</sup>、いずれの株でもウシ血球は凝集せず、その他大部分の血球とHA価との関係においては、佐沢<sup>36)</sup>の中山株および富士株における成績と一致した。しかし、2年鶏およびラットの血球では新分離株抗原が保存株抗原に比べてHA価が低い傾向を示した。

また、HA素およびウイルスの耐熱性は新分離株が保存株に比べて弱いこと<sup>25)</sup>、およびウイルスのトリプシン不活化では保存株が新分離株よりも抵抗性を示すこと<sup>70)</sup>、などは従来の報告と一致した。とくに新分離株のなかで1967年に分離した「谷山S-2」株は、HA素およびウイルスの耐熱性が

ほかの新分離株よりもやや弱かった。

さらに、ウイルス増殖性において「谷山 S-2」株は、CE細胞および ESK細胞においてほかの新分離株および保存株に比べてウイルス増殖がやや劣り、培養液の H A 素の産生がわるかった。従来から、ウイルス増殖と H A 素産生との間には密接な関係があること、およびこれらは培養の諸条件によってかなり左右されることが知られている<sup>4),50),51),67)</sup>。そこで今回の試験では、いずれの供試株も同一培養条件で、しかも同時に比較する方法で実施したにもかかわらず、CE細胞における「谷山 S-2」株の増殖は、CE細胞継代 1 1 代ウイルスを用いて、接種ウイルス量および培養温度をかえた場合でも、ほかの株の CE細胞継代 1 1 代ウイルスの増殖に比べてわるかった。いっぽう、ESK細胞を用いた場合でも同様に、「谷山 S-2」株の CE細胞継代 1 1 代ウイルスおよび ESK細胞継代 3 代ウイルスのいずれにおいても増殖が劣ることから、ほかの供試株に比べて増殖性のわるいウイルス株と判断され、ウイルスが分離できた当初から培養液に H A 素が産生しにくかったことは、ウイルス増殖性の劣ることによるものと考えられる。

このように、「谷山 S-2」株の 2, 3 の性状においてほかの株に比べて差異がみとめられたので、さらにその病原性について検討を行なった。

新分離株の病原性については、マウスと HPCD豚を使用し、皮下接種法による末梢からの中樞神経感染性、すなわち、末

梢感染性<sup>17)</sup> を指標にしてほかの株と比較しながら検討した。

1967年に分離した「谷山S-2」株は、他年次に分離した「谷山S-1」株(1966年分離)および「谷山S-3」株(1968年分離)に比べて、マウスおよびHPCD豚に皮下接種した場合、体内諸臓器におけるウイルス増殖が劣り、とくに中枢神経感染性が弱く、脳病変も軽く、また臨床的にも異常をみとめないことから、いわゆる末梢感染性(病原性)の弱いウイルス株と考えられた。

従来から、日本脳炎ウイルスの新分離株は、マウスやブタに対する末梢感染性の強いことが、大谷ら<sup>22)</sup>、奥野ら<sup>25)</sup>、Rohitayodhinら<sup>62)</sup>、中村ら<sup>59)</sup>、清水ら<sup>34)</sup>、児玉ら<sup>57)</sup>、佐沢ら<sup>66)</sup>、竹原ら<sup>68)</sup>によって知られている。今回の試験で「谷山S-2」株を除く、ほかの分離株ではいずれも末梢感染性が強く、これまでの報告に一致した。中村ら<sup>64)</sup>によると、新分離株は成熟マウスに対して末梢感染性が強いとしながらも、その程度には差があり、かなり弱いウイルス株のあることをみとめているが、「谷山S-2」株は分離当初から皮下接種した場合、成熟マウスを発症させない点で末梢感染性がさらに弱いという特性のあることは、はなはだ興味ある事実である。

いっぽう、日本脳炎ウイルスは動物、発育鶏卵、あるいは培養細胞で継代培養を行なうことによって、容易に諸性状の変異がおこることが知られている。なかでも病原性変異では、ワクチン株を目的とした人工変異弱毒株の作出過程をみても明らかなように、発育鶏卵<sup>61)</sup>、ハムスター腎細胞<sup>33),68),62),46),37)</sup>、

マウス胎児皮膚筋細胞<sup>56)</sup> およびウシ腎細胞<sup>66)</sup>などで継代培養することにより弱毒変異株がえられていること、また、これらの変異株をマウスで継代<sup>33), 66), 68)</sup>、あるいは培養条件をかえることにより<sup>63)</sup>、容易に親株の病原性(毒力)にもどることなどから、日本脳炎ウイルスは変異しやすい特性を有するものと考えられる。Rohitayodihinら<sup>62)</sup>の弱毒株作出試験によれば、新分離株はマウス継代された古典的な中山株よりもマウスに対する病原性の低下がおこりやすいことを述べている。このことは、新分離株の病原性を論ずる場合、ウイルス株の継代歴についてはとくに留意する必要があることを示唆するものと考えられる。したがって、新分離株の弱毒性と弱毒株の野外での存在と直接むすびつけることには方法論的に困難をとまらう。そこで私が今回、野外における弱毒株の存在を推定するにあたっては、ブタの自然感染の実態を観察するとともに、血液からウイルス分離を行ない、できるだけ継代歴の少ない分離当初のウイルスを材料とし、同一継代歴のほかの新分離株と比較するという方法を用いた。

マウスおよびHPCD豚の感染試験に使用した「谷山S-2」株は、マウスとESK細胞を用いてそれぞれ分離し、数代継代したウイルスとさらにCE細胞で11代継代したウイルスであるが、末梢感染性においてウイルスの分離方法および継代による差は、ほとんどなく、いずれも病原性が弱かった。いっぽう、「谷山S-1」株および「谷山S-3」株では、「谷山S-2」株とほぼ同様な継代歴のウイルスを使用した

が、分離当初のものはもとより、CE細胞継代11代ウイルスでも末梢感染性は強く、継代歴による差異はみられなかった。すなわち、この程度の継代ではいずれの株でも末梢感染性に変化がみられなかったことから「谷山S-2」株が分離の過程およびその後の継代によって弱毒化した可能性は少ないものと考えられる。このような実験成績から、野外における弱毒株の存在と、そのような株によるブタの自然感染のある事実が明らかにされたものと考えられる。

「谷山S-2」株については、その弱毒性をはじめとして、HA素およびウイルス活性の耐熱性が弱く、さらに培養細胞におけるウイルス増殖が劣り、HA素の産生がわるいなど、ほかの株に比べてかなり異なった性状がみとめられた。これらの性状は、たがいに関連性があるのではないかと考えられた。

「谷山S-2」株のような株が分離され、その特異な性状を確認することができ、またその野外における存在を考察することができたことは、おとり豚を用いて自然感染の実態を把握するとともに、それらのブタの血液から培養細胞やマウスを用いて同一材料から同時にウイルス分離を行ない、継代の進まないうちにその性状を調べたことが一つの理由になると考えられる。

弱毒株を分離した1967年のおとり豚では、血中ウイルス量がきわめて少なく、また、これらの豚群では他年次のそれに比べて抗体感応が劣ったが、ウイルスの体内諸臓器におけ



る増殖性，いわゆる末梢感染性と免疫賦与力とは，かなり関連の深いことが知られている。たとえば，佐沢ら<sup>66)</sup>のHPCD豚における弱毒変異株（S'株）の接種試験の成績によると，親株（相良株）に比べてH I抗体の出現がおくれ，さらに抗体価が低いことを報告している。今回，弱毒株（「谷山S-2」株）のマウス感染試験において，H I抗体産生には多量の接種ウイルスを要したが，強毒株である「谷山S-1」株および「谷山S-3」株では，少量のウイルス接種でも抗体産生がみとめられた。また，HPCD豚の感染試験においても，ほぼ同一ウイルス量を接種したにもかかわらず，接種後6日目の時点におけるH I抗体価は「谷山S-1」株接種豚では陽性値に達したが，「谷山S-2」株接種豚ではいずれも陽性値に達しなかった。このことは，病原性と抗体感応とは密接な関係があることを示唆するので，1967年のおとり豚の抗体感応のわるかった要因の一つとして，「谷山S-2」株のような弱毒株が野外に存在したことが考えられる。

日本脳炎の発病要因については不明な点が多く，これまでにマウスを用いた感染実験で，藤江ら<sup>3)</sup>は飢餓状態，あるいはコーチゾン投与により，また渡辺ら<sup>43)</sup>はNaClを投与することにより，宿主に種々なストレスを加えて発病を促進する報告があるが，著者の実験成績により，日本脳炎の発病要因として宿主側の因子のほかに，ウイルス側の因子，すなわち野外流行株の病原性をも十分考慮する必要があること初めて実証したことは，日本脳炎の疫学に一つの問題を提起したと

考えられる。

さらに、年次によっては流行の大きさ、すなわち患者やブタ流死産の発生が異なることが経験されるが、弱毒株の野外における存在と流行の大きさとの関連についても、今後考慮する必要があるのではなかろうかと考えられる。しかし、弱毒株の野外における出現の機転および出現頻度については全く不明であるが、日本脳炎ウイルスは変異しやすいことから、自然界におけるウイルスの継代維持に關与する宿主の影響が考えられる。今回の弱毒株が流行開始が早いとされている鹿児島市において<sup>20),13)</sup>、しかも流行開始時に分離されたことは、日本脳炎ウイルスの越冬様式あるいは流行にともなって毒力が変異する可能性について考え合せると、はなはだ興味がもたれるところである。

流行株の病原性の問題は、自然界でウイルスの継代宿主となる動物種とその条件、および常にコガタアカイエカと相互継代が行なわれている事実がどのような意義をもっているかななどの問題は、研究すべき今後の一つの課題と思われる。

## 総括ならびに結論

1966年から1968年までの3年間、南九州の1地区におとり豚を配置して、ブタの日本脳炎ウイルスによる自然感染の実態ならびに野外流行株の性状について調べるとともに、両者の関連性について検討した。その成績は次のように要約される。

1. おとり豚の抗体の陽転時期はもとより、抗体の陽転状況とその消長にも年次によって差異のあることがみとめられた。すなわち、1967年は同居豚でも一斉に抗体が陽転せず、抗体価は低く、早期に中和抗体およびHI抗体が低下する傾向がみとめられ、1966年と1968年の所見とは異なる現象がみとめられた。

2. おとり豚の血液から年次別に1株ずつ、計3株の日本脳炎ウイルスを分離したが、「谷山S-2」株を分離した1967年のブタでは、他年次のブタに比べて血中ウイルス量がきわめて少なく、ウイルス分離にはESK細胞で2代の継代を要した。この「谷山S-2」株は、他年次の分離株に比べて耐熱性が弱く、培養細胞におけるウイルス増殖が劣り、HA素の産生がわるかった。さらに、マウスやHPCD豚に皮下接種した場合、ウイルスの体内増殖性、とくに中枢神経感染性が弱く、いわゆる末梢感染性（病原性）が弱かった。このように、他年次の分離株とは、かなり性状の異なった弱毒株が自

自然界に存在すること、およびこのようなウイルス株によるブタの自然感染のある事実がわかった。

3. 弱毒株が分離されたおとり豚群では抗体感応が劣ったが、HPCD豚における弱毒株の感染試験でも抗体の産生がわるく、またマウスの感染試験においても、抗体産生には多量の接種ウイルスを要し、病原性と抗体感応とは密接な関係がみとめられた。このことは、野外における日本脳炎の流行様相を左右する要因について考える場合、流行ウイルス株の病原性についても考慮する必要のあることを示唆する。これらのことは、さらに1967年の流行様相が1966年や1968年とちがったことの一部説明ができそうである。

4. 日本脳炎の発病要因については、不明な点が多く、宿主側のいろいろな要因が考えられているが、著者の証明した野外における弱毒株の存在という事実は、宿主側の因子のほかにウイルス側の因子、すなわち、流行ウイルス株の病原性をも発病要因の一つとして考える必要のあることを初めて示唆した。

以上のことから、日本脳炎の疫学に一つの問題を提起したと考えられる。

## 謝

## 辞

おわりに、この研究の機会を与えられました前家畜衛生試験場長藤田潁吉博士，前九州支場長 旭 興正博士ならびに九州支場長石原忠雄博士に敬意を表します。

本論文のご校閲とご助言をたまわりました麻布獣医科大学教授斎藤保二博士ならびに前家畜衛生試験場研究第二部長波辺守松博士に深甚なる謝意を表します。

また，平素ご指導いただきました九州支場研究室長林 重美博士，病理組織学的検査をお願いしました九州支場森脇 正博士，ご助言とご援助をいただきました家畜衛生試験場ウイルス第二研究室長藤崎優次郎博士，ご援助いただきました前ウイルス第二研究室長佐沢弘士博士，ご協力いただきましたウイルス第二研究室杉森 正 技官，守本富昭技官，三浦康男技官，ならびに九州支場職員各位に感謝いたします。

## 参 考 文 献

1. 相沢主税, 吉岡勇雄, 山岸郭郎, 笠原四郎: 日本脳炎ウイルスの抗原分析に関する研究, ウイルス, 10, 6~10, 1968.
2. 藤江 昇, 倉田一明, 沢田 実: 日本脳炎ウイルスの同一株における抗原性の変異について, 動物医薬品検査所年報, 2, 67~77, 1961.
3. 藤江 昇, 渡辺守松: 日本脳炎発生機転に関する研究 第4報, 飢餓の感染及び免疫に及ぼす影響について, ウイルス, 5, 26, 1955.
4. 藤永 恵: 猿腎継代細胞 (MK<sub>2</sub>細胞) における日本脳炎ウイルスの研究, 日本細菌学雑誌, 17, 990~992, 1962.
5. 石田 弘, 今村直彦, 市原鶴雄: 日本脳炎ウイルス中山株の抗原変異に関する研究, 日本細菌学雑誌, 15, 1089~1090, 1960.
6. 今野二郎, 遠藤好喜, 我妻 仁, 宇留野勝水, 野家美夫, 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, 医学のあゆみ, 53, 113~118, 1965.
7. 今野二郎, 遠藤好喜, 石田名香雄: ブタおよびヒトにおける日本脳炎抗体の季節変動—ことに流行初期におけるメルカプトエタノール感受性抗体の出現について, 医学のあ

- ゆみ, 58, 703~708, 1966.
8. 笠原四郎, 上田守長, 岡本 豊, 吉田静雄, 浜野麓一郎, 山田良三: 流行性脳炎の実験的研究, 日本医事新報, 687号, 3362~3364, 1935.
  9. 小林一郎: 日本脳炎ウイルスの2株間に存在する免疫学的差異について, ウイルス, 9, 475~482, 1959.
  10. 国立予防衛生研究所編: 組織培養法, ウイルス実験学総論, 117~147, 丸善, 東京, 1964.
  11. 国立予防衛生研究所編: 日本脳炎ウイルス, ウイルス実験学各論, 124~160, 丸善, 東京, 1967.
  12. 国立予防衛生研究所編: 補体結合反応, ウイルス実験学総論, 196~228, 丸善, 東京, 1964.
  13. 黒木 洋, 林 重美: 南九州における日本脳炎流行の様相について, 日本獣医師会雑誌, 22, 423~429, 1969.
  14. 柏崎 守, 波岡茂郎, 湯本健吾, 柴田重考, 赤池洋二: 無菌豚の飼育に関する研究 1. 飼育装置および子豚摘出について, 実験動物, 16, 85~92, 1967.
  15. 城井尚義, 安藤啓三郎, 佐藤久蔵, 大久保 薫, 中山富雄, 市川 収, 山田 誠: 吾邦に於ける馬の流行性脳炎の原因学的研究, 実験医学雑誌, 21, 117~146, 1937.
  16. 中村惇治, 高松泰人, 宮本 猛: 子豚における日本脳炎経鼻感染試験並びにワクチン応用試験, 日本獣医協会雑誌, 3, 240~244, 1950.
  17. 中村惇治: 日本脳炎の感染論, ウイルス, 18, 262, 1968.

18. 西村千昭，野村正子，北岡正見：日本脳炎ウイルスの血球凝集素，補体結合抗原及び最小感染因子について，ウイルス，14，243，1964.
19. 農林省家畜衛生試験場研究第二部ウイルス第二研究室編：日本脳炎の血球凝集反応ならびに血球凝集抑制試験，1970.
20. 信藤謙蔵，倉田一朗，佐藤修治，貝塚一郎，小林信達，佐沢弘士，近常正輝，高村 礼：濾紙に吸着した血液による日本脳炎血球凝集抑制反応に関する研究Ⅱ，1965年に実施した豚の感染時期の地域差に関する連続試験，動物医薬品検査所年報，5，69～74，1967.
21. 大谷 明，韓 行徳，佐々木治子，北岡正見：中和反応からみた日本脳炎ウイルスの株間による差異，ウイルス，15，265，1965.
22. 大谷 明，佐々木治子，小林正美：日本脳炎ウイルスの病原性変異に関する研究第1報，マウスにおける実験感染にみられるウイルス株の変異について，ウイルス，12，131～132，1962.
23. 奥野 剛：日本脳炎ウイルスの血清免疫学的研究，ウイルス，15，215，1965.
24. 奥野 剛，近藤 明，鈴木 誠，伊東寿子：日本脳炎ウイルスの血球凝集抑制反応および血球凝集抑制抗体吸収による抗原分析，特に1935～1965年間の分離12株間にみられる免疫学的異同について，ウイルス，13，63，1963.



25. 奥野 剛, 近藤 明, 鈴木 誠, 伊東寿子: 日本脳炎ウイルスのいろいろな分離株から作った血球凝集抗原の生物学的性状について, ウイルス, 13, 63, 1963.
26. 奥野 剛, 近藤 明, 鈴木 誠: 日本脳炎ウイルス(JEV)の血球凝集素(HAin)の鷺鳥血球への吸着, ウイルス, 14, 251, 1964.
27. 緒方隆幸, 北岡正見, 韓 行徳, 大谷 明: 日本脳炎ウイルス中山株といわれる3系統株間相互間にみられる感染防御試験及び血球凝集抑制反応の差異について, ウイルス, 14, 153, 1964.
28. 六反田藤吉, 石田 弘, 今村直彦, 酒白光郎, 熊野正巳: 日本脳炎ウイルスの研究Ⅱ, 日本脳炎既知株と冬季分離株(熊本60-J)との抗原性比較成績について, 日本細菌学雑誌, 16, 172, 1961.
29. 清水武彦, 望月 宏, 須川章夫, 岡崎和夫, 松本 稔: 牛の日本脳炎の研究1, 日本脳炎ウイルスによる牛の自然感染例, 家畜衛生試験場研究報告, 23, 111~118, 1951.
30. 清水武彦, 川上善三: 豚の流行性死産について(特に日本脳炎との関係について)第1編, 自然材料について, 家畜衛生試験場研究報告, 22, 117~128, 1949.
31. 清水武彦, 川上善三: 豚の流行性死産について(特に日本脳炎との関係について)第Ⅱ編, 日本脳炎ウイルスの仔豚に対する感染試験, 家畜衛生試験場研究報告, 22, 151~158, 1954.

32. 清水武彦, 川上善三, 福原 進, 松本 稔: 妊娠ブタの日本脳炎ウイルスによる実験的死産, 家畜衛生試験場研究報告, 30, 51~66, 1955.
33. 清水文七, 寺島東洋三: 日本脳炎ウイルスの病原性変異に関する研究, ウイルス, 13, 5~10, 1963.
34. 清水文七: 日本脳炎ウイルスの哺乳マウスに対する病原性に関する研究, ウイルス, 13, 61, 1963.
35. 佐沢弘士, 三浦康男, 黒木 洋, 林 重美, 渡辺守松: 抗体陽転よりみた日本脳炎流行の様相について, 家畜衛生試験場水曜会記事, 16, 70~71, 1967.
36. 佐沢弘士: 日本脳炎ウイルスの血球凝集反応補遺, 家畜衛生試験場年報Ⅱ, 23~25, 1959.
37. 坂井千三: ハムスター腎細胞による日本脳炎ウイルスの培養, 慶応医学, 37, 438~448, 1960.
38. 田淵英一, 細田哲哉, 秋山 綽, 成田亮一: 山羊日本脳炎に就いて, 家畜衛生試験場研究報告, 23, 165~173, 1951.
39. 田淵英一, 細田哲哉, 秋山 綽, 成田亮一: 青森県並岩手県下に於ける豚の流行性死産について, 家畜衛生試験場研究報告, 22, 129~140, 1949.
40. 田島正典, 椿 精一: 冬季に発生した豚脳炎の2例—特に形態学的変化に就て, 獣医畜産新報, 48, 625~627, 1950.
41. 高橋克巳, 井上幸重, 佐々木文存, 児玉和夫: 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,  
ウイルス, 18, 416, 1968.
42. 渡辺守松, 藤江 昇, 佐藤修司, 鈴木勝夫: 日本脳炎ウイルスの抗原変異に関する実験的研究, ウイルス, 4, 227~230, 1954.
43. 渡辺守松, 藤江 昇: マウスの日本脳炎感染に対するNaの増強作用について, ウイルス, 8, 224~226, 1958.
44. Andreus, C. H. and Horstman, D. M.: The susceptibility of virus to ethyl ether, J. Gen. Microbiol., 3, 290-297, 1949.
45. Buescher, E. L. and Scherer, W. F.: Ecological studies of Japanese encephalitis virus in Japan IX, Epidemiologic correlations and conclusions, Am. J. Trop. Med. Hyg., 8, 719-722, 1959.
46. Bhatt, P. H. and Work, T. H.: Tissue culture studies on arbor viruses of the Japanese B - West Nile complex, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 96, 213-218, 1959.
47. Clarke, D. H. and Casals, J.: Techniques for hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses, Am. J. Trop. Med. Hyg., 7, 561-573, 1958.
48. Chang, P.: The inactivation of group B arthropod-borne animal virus by protease, Virology, 6, 129-136, 1958.
49. Dulbecco, R. and Vogt, M.: Plaque formation and isolation

- of pure lines with poliomyelitis virus, J. Exptl. Med. 99, 167-182, 1954.
50. Darwish, M. A. and Hammon, W. McD.: Studies on Japanese encephalitis virus vaccine from tissue culture VI, Development of a hamster kidney tissue culture inactivated vaccine for man (1) Obtaining maximum titers of virus using an attenuated strain of OCT - 541 J. Immunol. 96, 691-698, 1966.
51. Darwish, M. A. and Hammon, W. McD.: A high titered hemagglutinin in tissue culture prepared from Japanese B encephalitis virus, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 122, 809-813, 1966.
52. Eagle, H.: Amino acid metabolism in mammalian cell culture, Science, 130, 432-437, 1959.
53. Fogh, J. and Lund, O. R.: Continuous cultivation of epithelial cell strain (FL) from human amniotic membrane, Proc. Soc. Exptl. Med. 94, 532-537, 1957.
54. Hale, J. H. and Lee, L. H.: A serological investigation of six encephalitis virus isolation in Malaya, Brit. J. Exptl. Path., 35, 426-433, 1954.
55. Hashimoto, N. and Prince, A. M.: Kinetic studies on the neutralization reaction between Japanese encephalitis virus and antiserum, Virology, 19, 261-272, 1963.

56. Inoue, K. Y.: An attenuated mutant of Japanese encephalitis virus, Bull. Wld. Hlth. Org., 30, 181-185, 1964.
57. Kodama, K., Sasaki, N. and Inoue, K. Y.: Studies of lived attenuated Japanese encephalitis vaccine in swine, J. Immunol., 100, 194-200, 1968.
58. Melnick, J. L. and Riordan, J. T.: Poliomyelitis virus in tissue culture IV, Protein-free nutrient media in stationary and roller culture, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 81, 208-213, 1952.
59. Nakamura, H. and Nakamura, J.: Infectivities of strain of Japanese B encephalitis virus for mice by intraperitoneal inoculation, J. Med. Sci. Biol., 16, 47-49, 1963.
60. Ozaki, Y. and Tabeyi, K.: Studies on neutralization of Japanese encephalitis virus I, Application of kinetic neutralization to the measurement of the neutralizing potency of antiserum, J. Immunol., 98, 1218-1223, 1967.
61. Okuno, T.: Isolation and passage in one-day eggs of Japanese B Encephalitis (JBV) virus resulting in attenuation of its mouse pathogenicity, Jap. J. Med. Sci. Biol., 12, 71-78, 1959.
62. Rohitayodhin, S. and Hammon, W.: Studies on Japanese B encephalitis virus vaccine from tissue culture II, Development of an attenuated strain of virus, J. Immunol., 89,

589-596, 1962.

63. Rohitayodhin, S. and Hammon, W. McD.: Studies on Japanese B encephalitis virus vaccine from tissue culture III, Further selection and testing of attenuated virus line from OCT-541, J. Immunol. 89, 823-832, 1962.
64. Scherer, W. F., Moyer, J. J., Isumi, T., Gresser, I. and McCown, J.: Ecologic studies of Japanese encephalitis virus in Japan IV, Swine infection, Am. J. Trop. Med. Hyg., 8, 696-706, 1959.
65. Scherer, W. F., Buescher, E. L., Flemings, M. B., Noguchi, A. and Scanlon, J.: Ecologic studies of Japanese encephalitis virus in Japan III, Mosquito factors. Zootropism and vertical flight of *Culex tritaeniorhynchus* with observation of variations in collections from animal-baited trap in different habitats, Am. J. Trop. Med. Hyg., 8, 665-677, 1959.
66. Sazawa, H., Sugimori, T. Morimoto, T., Miura, Y. and Watanabe, M.: Response of swine to an attenuated strain of Japanese encephalitis virus obtained by passage in bovine kidney cell culture, Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart., 9, 74-82, 1969.
67. Sugimori, T., Morimoto, T., Miura, Y. and Sazawa, H.: Hemagglutination of Japanese encephalitis virus produced in embryonic swine kidney cell culture, Nat. Inst. Anim. Hlth.

- Quart., 9, 55-64, 1969.
68. Takehara, K., Mitsui, T., Nakamura, H. and Nakamura, J.:  
Studies on Japanese encephalitis live virus vaccines I,  
Development of attenuated strain of virus by serial passage  
in hamster kidney cell culture, NIBS Bull. Biol. Res., 8,  
11-22, 1969.
69. Theiler, M.: Action of sodium deoxycholate on arthropod-  
borne virus, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 96, 380-382, 1959.
70. Takehara, M., and Hotta, S.: Effect of enzymes on partial-  
ly purified Japanese B encephalitis and related arbor viruses,  
Science, 134, 1878-1879, 1961.
71. Underwood, G. E.: Studies on measles virus in tissue  
culture I, Growth rate of various cell and development of a  
plaque assays, J. Immunol., 83, 198-205, 1959.
72. Warren, J., Weil, M. L., Russ, S. B. and Jeffries, H.:  
Purification of certain virus by use of protamine sulfate,  
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 72, 662-664, 1949.

( SUMMARY IN ENGLISH )

A STUDY OF ONSET & PREVALENCE  
OF JAPANESE ENCEPHALITIS

By Hiroshi KUROGI

FOREWORD

For the purpose of grasping the realities of Japanese encephalitis in the southern Kyushu district and further reexamining epidemic field strains, during the period from 1966 to 1968 the author investigated into the time of change to positive of antibody as well as its vicissitudes in pigs and at the same time, isolated virus and examined the properties of isolated strains.

Though a number of reports have been published on the difference in properties among newly isolated strains or known conserved strains of Japanese encephalitis virus, there is no report examining the same in the light of relations between the conditions of infection or epidemiological findings in man and animal and the properties of isolated strains.

In view of the facts that the condition of prevalence or animal antibody response varies with year and region and that the greater part of animals and patients infected with Japanese encephalitis virus end in latent infection, with those falling



ill being quite small in number, the author assumed possible differences in pathogenecity among epidemic field strains causing or not causing an onset of the disease in relation to the conditions of a host and carefully studied this matter. As a result, "Taniyama S-2" strain isolated from pigs in 1967 having been slow in change to positive of antibody and poor in antibody response was found to be a virus strain weak in the so-called "peripheral infection" in mouse and pig, being lower in heat resistance and inferior in virus proliferation in cultured cell in comparison with other isolated strains, showing that there are virus strains weak in pathogenecity among epidemic field strains and natural infection with such strains in pigs is possible.

The discovery of such a new epidemiological fact is considered to be attributable partly to the author's having grasped the realities of natural infection in pigs, isolated at the same time virus from their blood and examined the properties of virus soon after isolation being not advanced in succession.

In this paper, the procedure of isolation of low virulent strains and the result of virological studies of biological and immunoserological properties will be described, the epidemiological significance of isolation of low virulent strains

and the pathology of infection with Japanese encephalitis virus being also discussed.

## EXPERIMENTAL RESULTS

### 1. Vicissitude of antibody in natural-infected pigs & isolation of virus:

During 3 years from 1966 to 1968, the author provided experimental pigs in the Kagoshima City and observed the time of commencement of prevalence and antibody response in examining the vicissitudes of neutralizing antibody and hemagglutination-inhibiting antibody (HI antibody) and undertaking virus isolation.

The time of change to positive of antibody varied with the year, being the 12th of July in 1966, the 14th of July in 1967 and the 16th of July in 1968. As for the situation of turning positive of antibody, in 1966 and 1968 those pigs living together, 3 heads each, turned positive nearly at the same time, antibody valence being high and continuing for a long period of time. On the other hand, in 1967 it took 20 days for all of the 6 pigs living together to turn positive and yet neutralizing and HI antibodies were low in valence, each tending to decline earlier. In the meantime, in any year, no pigs fell ill, all resulting in inapparent infection.

From the blood a week before rise in antibody, one strain per year, in the result a total 3 strains were isolated during from 1966 to 1968. That is, "Taniyama S-1" strain was isolated from pig blood on the 5th of July in 1966, "Taniyama S-2" strain from pig blood on the 27th of June in 1967 and "Taniyama S-3" strain from pig blood on the 16th of July in 1968, using embryonic swine kidney (ESK) cell respectively. "Taniyama S-2" strain was isolated also by means of mouse intracerebral inoculation.

In "Taniyama S-1" strain and "Taniyama S-3" strain, cytopathogenic effect (CPE) and hemagglutinating (HA) antigenicity appeared on the 5th to 6th day of primary culture, but in the case of "Taniyama S-2" strain CPE could not be observed during 7-days after inoculation in primary culture. However, on the 3rd day of secondary culture CPE appeared, but HA antigenicity could not be seen. In the case of intracerebral inoculation of suckling mouse, crisis was observed in 5 of 10 mice on the 7th to 8th day after inoculation and virus could be isolated.

As regards viremia in newly virus-isolated pigs, there was a conspicuous difference between "Taniyama S-2" strain and other strains, with "Taniyama S-1" and "Taniyama S-3" strains showing a value of  $10^{3.0}$  PFU/ml as against  $10^{0.7}$  PFU/ml of "Taniyama S-2" strain. The quantity of virus in the culture

solution at the time of appearance of CPE was  $10^{6.8-7.0}$  PFU/ml in "Taniyama S-1" and "Taniyama S-3" strains as against  $10^{6.0}$  PFU/ml of "Taniyama S-2" strain, being somewhat smaller.

Three strains of newly isolated virus were all identified as Japanese encephalitis virus as a result of the cross neutralizing and cross hemagglutinating-inhibition tests by means of guinea pig immunoserum of Fuji strain of Japanese encephalitis virus.

## 2. Biological & physico-chemical properties of newly isolated strains

Proliferation of virus in culture cell was examined using chick embryo (CE) cell and ESK cell as cells sensitive to Japanese encephalitis virus.

As for virus proliferation in CE cell culture, both the strains conserved in the laboratory (Nakayama & Fuji strains) and newly isolated strains were somewhat slower in rise of proliferation, but higher in the maximum virus valence and more gentle in its descent in the case of culture at  $30^{\circ}\text{C}$  than at  $37^{\circ}\text{C}$ . In particular, compared with other strains, "Taniyama S-2" strain was poor in proliferation at any culture temperature as well as in the appearance of HA antigenicity. Further, in the case of large volume inoculation culture and small volume

inoculation culture, there was no difference in the degree of proliferation between the both.

In respect of virus proliferation in the case of ESK cell culture, similar to the case of CE cell, "Taniyama S-2" strain was inferior in proliferation to other 4 strains.

As regards complement fixing (CF) antigenicity, Nakayama and "Taniyama S-2" strains were higher in antigenicity, but "Taniyama S-1", "Taniyama S-3" and Fuji strains were lower, with quantitative differences (but no qualitative differences) being observed.

There was a difference in the optimum pH range of HA antigenicity between the conserved strains and the newly isolated strains, 6.4 being optimum pH for Nakayama and Fuji strains as against 6.6 in the case of "Taniyama S-1" and "Taniyama S-2" strains and 6.8 in the case of "Taniyama S-3" strain.

HA antigenicity of the conserved and newly isolated strains were examined in respect of the types and HA values of red blood cells of mammalia and aves. All the strains showed nearly equivalent high HA values in the red blood cells of goose, pigeon, chicken (2 days and 75 days old), horse and rabbit, but HA values were considerably low in the red blood cells of 2-year old domestic fowl, pig, sheep, guinea pig, rat and mouse. In particular, all the strains were HA-negative in the red

blood cells of cattle. There were differences in HA value among the strains, with the newly isolated strains showing considerably lower HA values than the conserved strains in the red blood cells of 2-year old domestic fowl and rat.

To examine heat resistance of hemagglutinin (HA in), HA antigen solution with pH 9.0 was heated at 40°C and HA antigenicity of the newly isolated strains disappeared earlier than the conserved strains, being considerably lower in heat resistance. "Taniyama S-2" strain was further lower in heat resistance than other strains.

When CE cell culture virus solution was diluted 10 times (to pH 7.4) with redistilled water and heated at 50°C, heat resistance of virus was inactivated earlier in the case of newly isolated strains than the conserved strains, with "Taniyama S-2" strain being inactivated earliest.

In the protamine precipitation tests of HA in and virus, the both did not precipitate, HA value and infectivity titer being little different from those of the control group. When treated with ether and desoxycholate, inactivation was effected within 10 minutes in the case of any virus strains.

When treated with trypsin, the newly isolated strains were mostly inactivated by 2 hours of sensitization at 37°C, whereas residual virus activity was observed in the conserved strains.

### 3. Pathogenicity upon cells and animals

In any of the strains, cytopathogenic effect (CPE) was observed in ESK cell different from the case of CE cell. CPE appeared before reaching the maximum virus value, but in "Taniyama S-2" strain poor in rise of proliferation, it appeared somewhat later.

In examining Giemsa stain preparations, degenerative changes such as vacuolization of cell character, pycnosis and disappearance of chromatin, etc. and destruction were observed.

These observations were not obtained in the case of non-inoculated cells and were checked by immunoserum. The formation of plaque was found on the 3rd to 4th day after virus inoculation in CE cells. In the case of the 11th CE cell passage of virus, plaques about 2 mm in diameter and having an obscure outline were formed, whereas in the case of mouse brain passage of virus, plaques about 1 mm in diameter and having an obscure outline were formed. On the other hand, in the case of ESK cells, they were observed normally 5 days or more after virus inoculation, with plaques 2 to 3 mm in diameter having an obscure outline being formed in the case of the 11th CE cell passage of virus. In either cell, however, no difference could be observed between strains in respect of size and form of plaques.

Pathogenicity for mouse was examined in respect of the 11th CE cell passage of virus and post-isolation the third ESK cell passage of virus of conserved and newly isolated strains, as to intracerebral infectivity in the case of intracerebral and subcutaneous inoculations of mouse. Further, viremia and the appearance of antibody in blood were examined per dose of inoculation.

In the case of intracerebral inoculation of adult mouse, both the conserved and newly isolated strains showed a strong intracerebral infectivity and there was no difference in infectivity titer among different passage level and strain. In the case of subcutaneous inoculation, "Taniyama S-2" strain, similar to the conserved strains, had no peripheral infectivity even in the case of virus immediately after isolation, whereas other newly isolated strains showed strong peripheral infectivity and death due to intracerebral infection was observed in the case of virus immediately after isolation. However, in comparison with intracerebral inoculation, the infectivity titer was lower  $10^{2.5-3.0}$  LD 50/ml.

The infectivity titer due to intracerebral and subcutaneous inoculations of suckling mouse was higher in the case of any strains than that of adult mouse and further, intracerebral inoculation brought about a higher infectivity titer than



subcutaneous inoculation. The difference in infectivity titer between intracerebral and subcutaneous inoculations was 2.6 log in "Taniyama S-2" strain immediately after isolation and 3.6 log in the 11th CE cell passage of virus, being weak in peripheral infection. However, in the case of other newly isolated strains, irrespectively of generations there was scarcely any difference in infectivity titer between intracerebral and subcutaneous inoculations, whereas differences were observed in the conserved strains, being 1.7 log in the case of Nakayama strain and 2.1 log in the case of Fuji strain.

Viremia and blood antibody were examined using the 11th CE cell passage of virus of the conserved and newly isolated strains, and further using post-isolation the third ESK cell passage of virus jointly in the case of "Taniyama S-2" strain.

Three-week old mice, 12 each, were inoculated subcutaneously in different inoculation doses of virus, jointly using intraperitoneal inoculation in the case of "Taniyama S-2" strain. "Taniyama S-2" strain, immediately after isolation and CE cell passage of virus as well, was inoculated in a dose of  $10^6$  PFU/0.1 ml, but viremia was negative, involving no case of death. In the case of inoculum dose exceeding  $10^{4.0}$  PFU/0.1 ml, a little HI antibody was detected. In the case of other newly isolated strains, even a small inoculum dose ( $10^{1.0}$  PFU/0.1 ml

or over) caused viremia and turning positive of HI antibody and the cases of death were also observed. On the other hand, in the case of conserved strains, inoculum doses of over  $10^{6.0}$  PFU/0.1 ml led to only a small number of cases of viremia, death and change to positive of HI antibody.

As to the vicissitudes of viremia, "Taniyama S-1" strain ( $10^{5.7}$  PFU/0.1 ml) and "Taniyama S-2" strain ( $10^{6.0}$  PFU/0.1 ml) of the 11th CE cell passage of virus were inoculated subcutaneously and examination of viremia was made of 6 mice every day until the 6th day after inoculation. As a result, no viremia was detected in "Taniyama S-2" strain, whereas it appeared in "Taniyama S-1" strain on and after the 2nd day, reaching a high detection rate on the 2nd and 3rd days and being detected till the fifth day. Blood virus level was  $10^{2.0-3.0}$  PFU/ml independently of inoculum doses. Further, HI value too was independent of inoculum doses, mostly ranging from 1:10 to 1:20.

As above, "Taniyama S-2" strain is inferior in virus proliferation in mouse body and intracerebral infectivity in the case of subcutaneous inoculation, being considered to be the strain low in the so-called "peripheral infection".

Concerning pathogenicity upon hysterectomy produced colostrum deprived (HPCD) pigs, a total of 4 lines of virus, that is, 3 lines of virus of "Taniyama S-2" strain (the 3rd ESK cell

passage of virus, the 2nd mouse passage of virus and the 11th CE cell passage of virus by way of the 3rd ESK cell passage) and "Taniyama S-1" strain (the 3rd mouse passage of virus by way of the 3rd ESK cell passage) as the control, were inoculated subcutaneously into 4 groups (3 heads each) of HPCD pigs (4-day old). After inoculation, one pig each from the respective groups was sacrificed on the 2nd, 4th and 6th days, but till such time of sacrifice, clinical observation and examination of viremia were made, while in respect of the sacrificed cases the virus recovery test was conducted to examine distribution within the body and the quantity of virus.

As for clinical findings, in those pigs being inoculated with "Taniyama S-2" strain, body temperature fluctuated quite irregularly, but there was no indication of fever, with all the cases presenting no symptoms. The control pigs inoculated with "Taniyama S-1" were attacked with fever with the lapse of time after inoculation, but other clinical symptoms could not be observed till the 5th day. However, on the 6th day, the remaining one pig presented such nervous symptoms as fall into low spirits, tremor and hind limb paralysis, etc.

In the pigs inoculated with "Taniyama S-1", viremia was detected on and after the 1st day of inoculation, continuing long (for 4 days) and the blood virus level was high, whereas

in the case of the pigs inoculated with "Taniyama S-2" strain, appearance of viremia was delayed and continued for a short time (2 days) and the blood virus level was low, the degree of viremia being lower in comparison with "Taniyama S-1" strain.

As for distribution of virus in the body, in the pigs inoculated with "Taniyama S-1" strain virus was detected at high concentrations in the brain, spinal cord and various internal organs on the 2nd day after inoculation. Even on the 6th day when recovery of virus from the spinal cord normally becomes difficult due to rise in antibody titer, a large quantity of virus was detected in the spinal cord. As above, proliferation in various internal organs and especially in brain and spinal cord was conspicuous and the central nervous system infected quite intensively. On the contrary, in the case of the pigs inoculated with "Taniyama S-2" strain, independently of passage history, that is, regardless of whether the virus inoculated was the one immediately after isolation or posterior CE cell passage, proliferation in various internal organs and especially in brain and spinal cord was poor, with the central nervous system being infected only weakly. That is, virus was detected in brain and spinal cord in only one of 9 pigs. In respect of other organs, the virus detection rate was high in the lymphnode, with virus being detected in 5 of 9 pigs

at relatively high concentrations. The detection rate was low in lung and spleen (virus being detected in 2 of 9 pigs) as well as in liver and kidney (1 of 9 pigs), with only traces of virus having been detected respectively.

As for blood antibody in the experimental pigs, the cases sacrificed on the 2nd, 4th and 6th days in each experimental group were examined for HI antibody. As a result, HI antibody was found to be less than 1:5 till the 4th day in any cases, but a rise in antibody titer was observed on the 6th day. That is, it reached 1:40 in one of the pigs inoculated with "Taniyama S-1" strain, whereas in the case of the pigs inoculated with "Taniyama S-2" strain, it was less than 1:5 in one pig and 1:10 in 2 pigs, antibody production being somewhat lower.

From the above-mentioned it can be said that in comparison with "Taniyama S-1" strain, "Taniyama S-2" strain (even the virus immediately after isolation) is inferior in proliferation of subcutaneously inoculated virus in various internal organs, low in the degree of viremia and weak in peripheral infection. This is same as in the case of mouse.

#### SUMMARY

During 3 years from 1966 to 1968, the realities of natural infection of pigs with Japanese encephalitis virus and the

properties of prevalent field strains in the southern Kyushu district were examined and the relationship between the both was studied. The results can be summarized as follows:

1. Not only the time of change to positive of pig antibody, but also the condition of turning positive of antibody and its vicissitudes were found to vary with the year. That is, in 1967, antibody did not turn positive simultaneously even among the pigs living together, showing low antibody titer, and the tendency of early decline of neutralizing antibody and HI antibody was observed, being the phenomenon different from the findings in 1966 and 1968.
2. From pig blood, one strain per year or a total of 3 strains of Japanese encephalitis virus were isolated. In the pigs from which "Taniyama S-2" strain was isolated in 1967, the blood virus level was extremely low in comparison with that in other years, requiring two generations for isolation of virus by means of ESK cells. Compared with strains isolated in other years, the "Taniyama S-2" strain was lower in heat resistance, inferior in virus proliferation in culture cell and poor in HAI production. Further, when subcutaneously inoculated into mouse and HPCD pig, proliferation of the virus within the body and in particular, infectivity upon

the central nervous system and the so-called "peripheral infection" were inferior. A new fact that a low virulent strain considerably different in properties from other strains is existing in the natural world has thus been found.

3. In the pig group from which low virulent strains were isolated, antibody response was inferior and also antibody production was found to be poor as a result of the low virulent strain infection test of HPCD pigs and further the mouse infection test required a high dose of inoculation virus for production of antibody, with a close relationship being observed between pathogenicity and antibody response. This suggests the necessity of taking into consideration the pathogenicity of epidemic virus strain when studying the factors controlling the pattern of prevalence of Japanese encephalitis in the field. Further, the above-mentioned seems to be capable of partly accounting for the difference in the pattern of prevalence in 1967 from those in 1966 and 1968.
4. Concerning the factors involved in the onset of Japanese encephalitis, there are many unknown factors and though various factors on the part of a host are being considered,

the fact of existence of low virulent strains in the field as proven by the author has for the first time suggested the necessity of taking into account, besides the factors on the part of a host, the factors on the part of virus, that is, the pathogenicity of virus strain as one of the factors involved in the onset.

In view of the above-mentioned, the present study is deemed to have posed a problem to the epidemiology of Japanese encephalitis.