

氏 名 (本籍)	黒 木 洋 (広 島)
学 位 の 種 類	獣 医 学 博 士
学 位 記 番 号	乙 第 47 号
学位授与の日付	昭和47年 1 月24日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	日本脳炎の発病と流行についての一考察
論文審査委員	(主査) 教授 齊 藤 保 二 (副査) 教授 越 智 勇 一 教授 今 井 信 実

論 文 内 容 の 要 旨

南九州における日本脳炎流行の実態を知り、さらに野外流行株の再検討を行なう目的で、1966 年から1968 年にわたってブタにおける抗体の陽転時期およびその消長について調べるとともに、ウイルス分離を行ない分離株の性状について検討した。

日本脳炎ウイルスの新分離株あるいは保存株間の性状差については、いくつかの報告があるが、ヒトおよび動物における感染状況あるいは疫学的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ない。

本論文は新弱毒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についてのべるとともに、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。

疫学的調査の結果、鹿児島市における流行開始時期は、年次によって差のあることはもとより、ブタの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 年の供試豚では一斉に抗体の陽転がみとめられず、1966 年および1968年のそれに比べて陽転化の進行がきわめて緩慢であった。また、感染豚の中和抗体価および血球凝集抑制価はともに低く、早期に抗体価が低下する傾向がみとめられ、他年次に比べて異なる現象と考えられた。

流行期のブタの血液から分離したウイルスは各年次に1株ずつ計3株で、それらはいずれも日本脳炎ウイルスと同定された。この分離株の性状を調べた結果、ブタの抗体感応のわかった1967年に分離した「谷山 S-2」株は、1966 年および1968 年の分離株に比べて鶏胎児細胞およびブタ腎継代細胞の培養において、ウイルス増殖がやや劣り、ウイルス活性および血球凝集素の耐熱性が弱かった。また、マウスおよびブタ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、かつ脳感染をおこしにくく、いわゆる末梢感染性の弱いウイルス株と考えられた。

従来から、日本脳炎ウイルス新分離株は、マウスおよびブタに対して末梢感染性が強いとされており、このたびの試験においても「谷山 S-2」株のほかは、いずれも末梢感染性が強く、先人の成績ともよく一致した。しかし、「谷山 S-2」株は分離当初のウイルスでありながら、末梢感染性が弱いという特性を有していることは興味ある事実である。

いっぽう、日本脳炎ウイルスは動物あるいは細胞継代することにより、容易に諸性状の変異をおこすことが知られており、分離株の弱毒性と弱毒株の野外における存在とを直接むすびつけることは方法論的に困難

をとまう。したがって今回、野外における弱毒株の存在を推定するにあたっては、できるだけ分離当初の継代歴の少ないウイルスを用い、他の分離株と比較するという方法を用いた。

マウスやブタの感染試験に供試した「谷山S-2」株は、マウスおよびブタ腎継代細胞を用いてそれぞれ分離し、数代継代したウイルスと、さらに鶏胎児細胞に11代継代したウイルスを使用した。末梢感染性においてウイルスの分離方法および継代歴による差異はほとんどなく、いずれも弱かった。また、「谷山S-1」株（1966年分離）および「谷山S-3」株（1968年分離）のマウスあるいはブタの感染試験においても「谷山S-2」株と同様な継代歴のウイルスを使用した。継代歴による末梢感染性には差異がなく、いずれも強かった。すなわち、この程度の継代歴では末梢感染性に差異が生じなかったことから、「谷山S-2」株の弱毒性は分離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。

以上のように、ブタにおける自然感染の実態を把握し、ブタの血液からウイルス分離を行ない、その性状について調べた結果、流行ウイルスのなかには病原性の弱いウイルス株があること、およびそ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明らかにされたものと考えられる。

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。今回のマウス感染試験においてもウイルス血症が検出できない弱毒株では、血球凝集抑制抗体の産生には大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をみとめた。また、ブタの感染試験においても、ほぼ同一ウイルス量を用いたにもかかわらず、接種後6日目の時点における血球凝集抑制抗体は、「谷山S-1」株接種豚では陽性値に達したが、弱毒株接種豚では抗体価は低く、陽性限界に達しなかった。

これらのことから、1967年におけるブタの抗体反応のわ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いが、著者の実験成績より日本脳炎の発病要因の一つとして宿主側の因子のほかに、流行株の病原性をも十分考慮する必要があることを初めて実証したことは、日本脳炎の疫学に新たな一つの問題を提起したと考えられる。

また、年次によって流行の大きさが異なることが経験されるが、今回、弱毒株の野外における存在をみとめたことにより、流行の大きさと関連性についても今後考慮する必要があるのではないかと考える。しかし、弱毒株の野外における出現機序、および出現頻度などについては全く不明であり、今後研究すべき一つの課題と思われる。

論文審査の結果の要旨

ウイルスが、流行毎にしばしば抗原性の変異を示すことは、人のインフルエンザなどでよく知られている。これら抗原変異の問題はウイルス病の発生、流行ならびに、これに対する予防、治療上で非常に重要な問題である。日本脳炎ウイルスについても同様であり、保存株と新分離株についての性状の差に関する報告はいくつか見られる。

本論文は未だ検討されて居らない日本脳炎ウイルスの疫学的所見と新分離株の性状の関連を取扱い、ブタについて南九州地方における流行期に新弱毒株を分離し、その分離要約とウイルスの生物学的および免疫血清学的性状について検討した結果を述べ、かつ、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。

I 流行期の抗体調査

鹿児島における流行の開始時期は年により差があることはもとより、ブタの抗体の陽転状況とその消長も年により差があることが認められた。すなわち、1967年の供試ブタでは抗体の陽転が一斉には起らず、1966年と1968年に比較して陽転化の進行がきわめて緩徐であり、また感染ブタの中和抗体価と血球凝集抑制価とはともに低く、早期に抗体価が低下する傾向が認められ、1966、1968の両年に比べて異なる現象であった。

II ウイルス分離とその性状

実験方法：実験動物としておとりブタ（非流行期に生れた5～6ヶ月令、抗体のないもの）を用い、流行期にこれらのブタからの血液をニワトリ胎児およびブタ腎培養細胞に接種してウイルス分離を行った。

分離ウイルス株の生物学的性状については培養細胞におけるウイルス増殖、補体結合抗原性および血球凝集抗原性を検査し、物理化学的性状についてはウイルスおよび血球凝集素の耐熱性、プロタミン沈降試験、エーテルおよびデソキシコール酸塩による不活化試験を行った。又、細胞および動物に対する病原性をしらべるため、前者では培養細胞に対するCPE、ブラック形成を、後者については成熟マウス、乳呑みマウス、HPCDブタ（開腹摘出人工哺育ブタ）を用い、マウスには脳内と皮下に、ブタには皮下にウイルスを接種して感染、発病の状況、ウイルス血症、ウイルス体内分布、血中抗体などをしらべた。ブタについては更に、剖検して各臓器と中枢神経の病理組織所見をしらべた。尚、これらの分離株の性状を比較する場合、日本脳炎ウイルスは動物あるいは細胞で継代することにより容易に諸性状の変異をおこすので、分離株の弱毒性とその野外における存在を直接むすびつけるため、出来るだけ分離当初の継代歴の少ないウイルスを用い、他の分離株と比較する方法を行った。

実験結果：流行期のブタの血液から分離したウイルスは各年1株ずつ、計3株で、それらはいずれも日本脳炎ウイルスと同定された。これらの分離ウイルス株の性状はブタの抗体の感応の悪かった1967年に分離した「谷山S-2」株は1966年および1968年の分離株に比較してニワトリ胎児細胞とブタ腎継代細胞で増殖がやや劣り、ウイルス活性および血球凝集素の耐熱性も弱かった。またマウスおよびブタに皮下接種した場合、体内諸臓器におけるウイルスの増殖が劣り、かつ脳の感染をおこしにくく、いわゆる末梢感染性の弱いウイルス株と考えられた。これは従来、日本脳炎ウイルスの新分離株が、マウスおよびブタに対し末梢感染性が強いとされて居たことに反する結果であって、興味ある所見と考えられた。マウスやブタの感染試験に用いた「谷山S-2」株はマウスおよびブタ腎継代細胞を用いて分離し、数代継代したウイルスと更にニワトリ胎児細胞に11代継代したウイルスを用いたが、末梢感染性には両者の間で差異がなく、いずれも弱かった。このことは「谷山S-1」株（1966年分離）および「谷山S-3」（1968年分離）についても同様で、継代数にかかわらず末梢感染性はいずれも強かった。すなわち、この程度の継代歴では末梢感染性に影響がなかったので「谷山S-2」株の弱毒性は分離過程および、その後の継代により弱毒化した可能性が少いと考えられた。

以上のように、著者はブタにおける自然感染の実態を把握し、ブタの血液からウイルス分離をおこない、その性状を調べた結果、流行ウイルスのなかには病原性の弱いウイルス株があること、およびそのようなウイルス株によるブタの自然感染のある事実を明らかにした。また、更にウイルスの体内諸臓器における増殖性、すなわちいわゆる末梢感染性と免疫賦与力との密接な関係を考え、今回の実験において、ウイルス血症の検出出来ない弱毒株が血球凝集抑制抗体産生に対し、他の強毒二株に比べ大量の接種ウイルスを要するこ

とを認めた。ブタの感染試験においても強毒株と同一ウイルス量を用いた場合、弱毒株が抗体価において陽性値に達しないことを認めた。これらのことが1967年におけるブタの抗体感応のわかった要因の一つとした「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と結論して居る。

上記の実験結果は日本脳炎の発病要因の一つとして宿主側の因子のほかに流行株の病原性も十分考慮する必要のあることを初めて実証したものであり日本脳炎の疫学に新たな問題を提起し、予防獣医学上、きわめて価値のある業績であり、獣医学博士の学位を授与するに値するものであることを認める。