

1965年、長崎県における日本脳炎流行の疫学的研究

第1報 コガタアカイエカよりの日本脳炎ウイルス分離状況

長崎県衛生研究所(所長: 高橋克巳博士)

高橋克巳*, 松尾礼三**, 熊正昭
野口英太郎, 東房之

Studies on Epidemic of *Japanese encephalitis virus* in Nagasaki Prefecture, in the 1965 Season.

I Isolation of *Japanese encephalitis virus* from the vector mosquito of *Culex tritaeniorhynchus* Giles collected in Aino, Nagasaki prefecture, in 1965.

Katsumi TAKAHASHI, Reizo MATSUO, Masaaki KUMA,
Hidetaro NOGUCHI & Fusayuki HIGASHI

Nagasaki Prefectural Institute of Public Health
(Director : K. TAKAHASHI, M. D.)

Received for publication February 21, 1966

Abstract : The authors have reported an unusual pattern of infection of the vector mosquito of *Culex tritaeniorhynchus* with *Japanese encephalitis virus* (JEV) in 1964 in Aino-machi, Nagasaki prefecture, namely, the mosquito infected with JEV was seen in mid-May which was the notable early stage of the season. This fact was also verified by Hayashi et al, in 1964, who had succeeded in isolation of JEV from the mosquitoes collected in Omura district which is located 25 kilometers north east of Aino.

The problem whether this unusual pattern of the mosquito-infection in Nagasaki area is constant or not is remarkably interesting in relation to the ecology of JEV in Japan.

Therefore, viral isolations from the mosquitoes and observation on the seasonal fluctuation of the mosquito were again carried out at Aino in the season of 1965.

The results are as follows :

* 長崎大学風土病研究所講師兼務

** 長崎大学医学部細菌学教室, 長崎大学風土病研究所研究生
特別掲載 第25号

1) The pattern of the seasonal fluctuation of the mosquito in 1965 was fundamentally similar to that of 1964, but after the peak, seen in the beginning of August both 1964 and 1965, the dropping curve of the mosquito was gradual in contrast to that of 1964.

2) The mosquitoes which seemed to be hibernated females of *Culex tritaeniorhynchus* made their first appearance at livestock pens in the evening of April 14. During mid-April and mid-May a few mosquitoes were collected and there was no evidence of increase in number. Then, on May 24, simultaneously with the first appearance of the male mosquito, a large number of the mosquitoes was collected. This may suggest that the new mosquitoes emerged in this year for the first time.

3) The viral isolations were carried out from the mosquitoes collected from April 14 to October 1. A total of 38,443 mosquitoes were tested in 402 pools. The first mosquito infected with JEV was seen on June 21 and from that time on the viruses were continually isolated from the mosquitoes until July 20. During this period, a total of 46 strains of JEV were obtained and the peak of isolation rate was on July 7.

4) The isolation rate of JEV between the fed mosquitoes and the unfed mosquitoes which were differentiated by the naked eye at the collecting time did not show striking disparity.

5) It seems to be a constant phenomenon that the mosquitoes infected with JEV appear in the early stage of the season in Nagasaki area.

緒 言

私共は、さきに1964年、長崎県南高来郡愛野町順手部落において調査したコガタアカイエカ (*Culex tritaeniorhynchus* Giles, 以下*C. tritaen.*と略す。又単に蚊と称する。)の季節的消長と、その消長過程に出現する日本脳炎(以下JEと略す)ウイルス(以下Vと略す)保有蚊の関係が極めて特異な様相を呈した事を報告⁽¹⁾した。即ち日本⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾(沖縄⁽⁶⁾を含む)、台湾⁽⁷⁾における従来のこの種の調査報告に比べ、愛野町においてはJEV保有蚊の出現が、*C. tritaen.*の季節的消長のピーク(8月上旬)の約11週間前に当る5月19日と云う異常な早期であり、更に又、県下の人のJE確認第1号患者の発病日、7月14日と、この5月19日との間には約8週間の完全な空白期があった等の所見である。この様な特異な現象は、単に愛野町のみにおいて観察された所見ではなく、同年、愛野町より直線距離で北面に25km距る大村市黒丸郷部落で同様な調査を行なった林等の報告⁽⁸⁾でも見られ、同地ではJEV保有蚊の出現は愛野町よりやや遅れたが、やはり6月8日と云う早期であった。従って、1964年の長崎地方におけるJEV保有蚊の早期出現は、かなり普遍的な

現象であったと考えられる。この長崎地方のJEV保有蚊早期出現が、年次的変動のない恒常的な現象であるか、どうかは我国におけるJEVの生態学上、疫学上頗る興味ある問題である。JEV保有蚊の出現パターンが長期に渉る調査によって、ほぼ確定されている他の地方、例えば関東平野では⁽³⁾⁽⁴⁾7月中旬以前には、蚊の発生数は多いにも拘わらずJEV保有蚊は発見されず、且、その出現は*C. tritaen.*の季節的消長のピークの後に現われると云う恒常性があるのに対し、関東平野より2ヶ月も早い5月中、下旬にJEV保有蚊が出現した長崎地方の1964年の現象に恒常性があるとすれば、両者のJEVによる蚊感染パターンは全く逆の関係にあり、この両パターン、各々の起因するメカニズムの差異は、基本的に我国の自然界におけるJEVの存在様式、乃至導入様式の違いを示唆するものと考えられる。

この意味から、私共は1964年に引き続き、1965年も愛野町において*C. tritaen.*よりJEVの分離を行なったので、以下その所見について述べる。

材料及び方法

1. 蚊採集地

1964年と全く同様に⁽¹⁾, 長崎県南高来郡愛野町順手部落の牛舎, 豚舎, 鶏舎において行なった。

2. 蚊採集方法

1964年の蚊採集と, その季節的消長の観察⁽¹⁾は, 同年5月19日より開始したが, その時点で既にかなり多数の *C. tritaen.* が発生しており, 同時にその採集蚊のプールより JEV が分離された為, それ以前の *C. tritaen.* の消長と, その JEV 保有状況は全く不明に終わったのに鑑み, 1965年は3月11日より採集を開始した。即ち, 昼間は順手部落周辺の叢林, 下籾, 田畑, 川堤, 旧防空壕等で *C. tritaen.* 成虫の潜伏場所の発見に努力し, 夜間は部落内の点灯した畜舎で, *C. tritaen.* の発見と採集を行なった。4月14日, 畜舎内で夜間初めて *C. tritaen.* の発見と採集を行なってからは, 昼間の作業は総て中止し, 夜間畜舎内採集のみを行なった。蚊の採集には, ドライアイス誘引法は全く行なわず,

自然な状態で夜間畜舎に出現する蚊のみについて行なった。 *C. tritaen.* の季節的消長の観察は, 1964年と全く同一箇所, 日没後2時間の定時間採集法によって行なった。

3. JEV分離法

1964年と同様に⁽¹⁾, 蚊体乳剤遠心上清を哺乳マウス (g.p.c.系, 生後3~5日) 脳内に接種し, JEV の分離を行なった。尚, 今回は採集蚊を総て採集時点で肉眼的に吸血蚊と未吸血蚊に分け, 各々, 1プール, 100匹を標準として, プールを構成した。

4. 分離V同定法

分離Vは, 総て哺乳マウス脳を2~3代継代通過して, その発症を確認すると共に, そのレベルで哺乳マウス脳より蔗糖アセトン抽出抗元を作成し, 各V株の至適赤血球凝集 pHを見, 更に抗 JaGAR # 01株及び中山 (NIH) 株マウス免疫血清を用いて赤血球凝集抑制反応を行ない, JEV の同定を行なった。

成 績

1. *C. tritaen.* の季節的消長

3月11日より11月5日迄の間に, 計34回に渉り, ほ

ぼ定期的に観察した *C. tritaen.* の季節的消長を図1に示した。

Table 1. Isolation of JEV from *Culex tritaeniorhynchus* collected in Aino, Nagasaki prefecture, in 1965.

Date collected	Number of mosquitoes	Number of pools	Pools positive	Isolation rate	
May	11	-	-	-	
	30	-	-	-	
April	7	-	-	-	
	14	7	1	0	
	16	34	1	0	
	19	6	1	0	
	22	24	1	0	
	27	92	1	0	
	30	26	1	0	
May	4	40	1	0	
	7	54	1	0	
	11	138	2	0	
	17	62	1	0	
	24	1,103	11	0	
	31	1,820	19	0	
June	8	1,130	12	0	
	10	1,952	20	0	
May	14	2,566	26	0	
	21	3,382	34	12	
July	28	2,052	21	14	
	7	1,236	13	10	
	14	920	10	6	
	20	2,075	23	4	
	28	2,118	23	0	
	August	4	5,304	54	0
August	13	3,979	40	0	
	23	2,603	27	0	
	September	2	4,000	40	0
	14	13	1	0	
	20	1,107	11	0	
September	30	300	3	0	
	October	1	300	3	0
Total	38,443	402	46	11.9%	

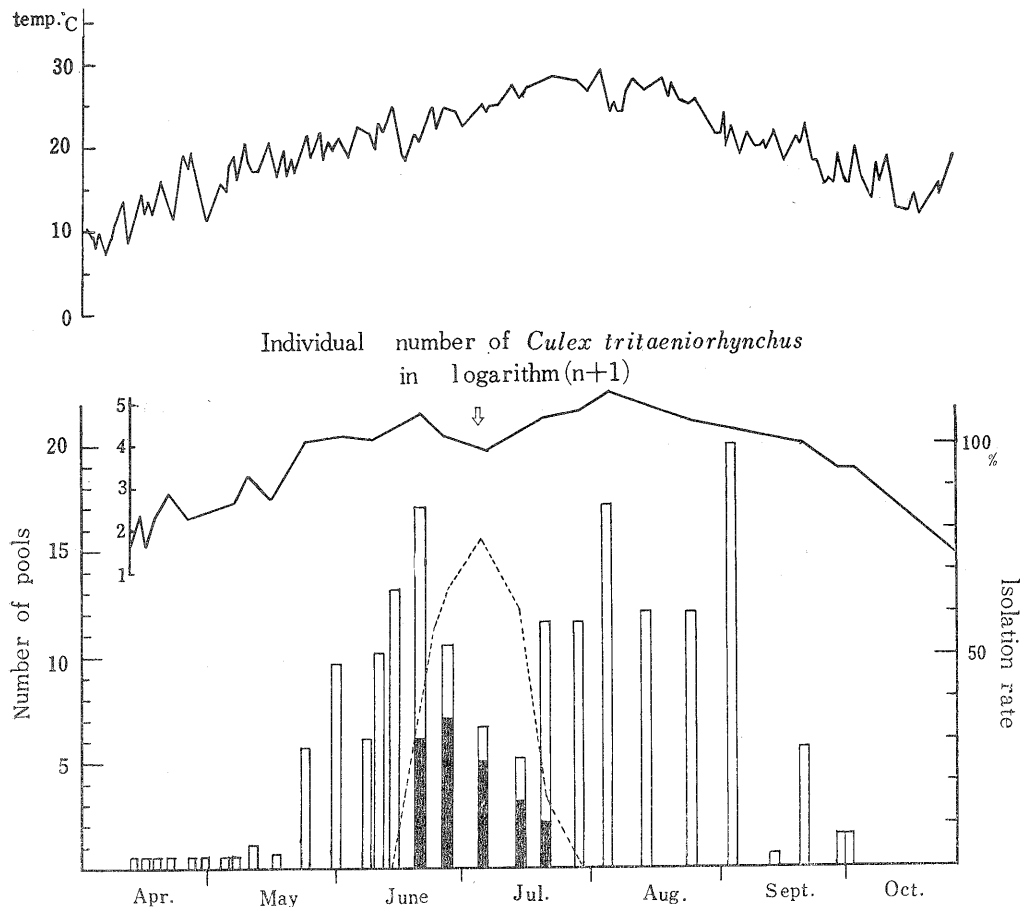


Fig. 1. Seasonal appearance and natural infection with JEV in *Culex tritaeniorhynchus* in Aino, Nagasaki prefecture, in 1965.

Remarks : The solid parts of the rods show the numbers of the mosquito pools yielded JEV. The dotted line indicates the isolation rate of JEV from the mosquitoes.

3月11日, 同30日, 4月7日の採集では, 昼間, 夜間共に *C. tritaen.* を発見する事は出来なかった. 唯 *Culex pipiens pallens* は, 3月11日昼間, 竹籾横の石垣で1匹採集され, 又同日夜間鶏舎でも1匹採集されており, 更に3月30日は旧防空壕内で昼間40匹採集されている. *Anopheles sinensis* は3月30日, 初めて夜間牛舎で採集された.

C. tritaen. は4月14日, 夜間牛舎と鶏舎で小数採集され, 以後, 毎回恒常的に発見採集されたが, 5月上旬迄はその各採集個体数は概ね100匹以下で, その数も著るしい増減を見ないが, 5月中旬頃より増加の傾向が見られ, 5月24日に初めて採集蚊数は一躍1,000匹代となり, 同時にこの日に *C. tritaen.* が最初に発見された. これ以後は *C. tritaen.* は徐々に増加して, 6月下旬に先ず小さい山をつくり, それから逆に減少の傾向を見せて, 7月中旬には小さな谷をつくるが,

7月下旬よりは再び急激な増加を見せて8月上旬から同中旬に涉って最高のピークを作る. 8月下旬よりは徐々に減少し, ゆるやかな下降線を描き乍ら, 11月5日にも尚小数の残存が発見された,

2. JEV分離

4月14日より10月1日迄の間に採集された *C. tritaen.* からの JEV 分離成績は, 表1, 及び図1, に示す様に, 被検蚊の総数, 38,443匹, 402プールから46株の JEV が分離された. 最初に JEV が分離されたのは, 6月21日の採集蚊からで, 以後, 7月20日迄の間は連続して毎回採集蚊から JEV が分離された. この間, 分離率が最高を示したのは7月7日の10/13 (77.0%) で, この前後, 6月28日より7月14日迄の間は, 常に分離率は60%以上の高い率を示した.

この6月21日より7月20日迄の間の採集蚊より JEV が分離された期間に, JEV 分離に供された

Table 2. Comparison among the isolation rate in fed and unfed female of *Culex tritaeniorhynchus* collected in Aino, Nagasaki prefecture, in 1965.

Date collected	Unfed <i>Culex tritaeniorhynchus</i>			Fed <i>Culex tritaeniorhynchus</i>			
	No. of pools	positive pools	Isolation rate	No. of pools	positive Pools	Isolation rate	
June	21	13	5	38.4%	21	7	33.3%
	28	3	2	66.6%	18	12	66.6%
July	7	2	0	0	11	10	91.0%
	14	2	1	50.0%	8	5	62.5%
	20	7	1	14.3%	16	3	18.7%
Total	27	9	33.3%	74	37	50.0%	

*C. tritaen.*の吸血蚊と未吸血蚊, 各々の JEV 分離率を比較すると, 表 2 に示す様に, 吸血蚊プールの JEV 分離率は, 未吸血蚊プールのそれに比べ, 両者間に顕著な分離率の差を見ない。寧ろ, 吸血蚊プールの分離率の方が, 総体的に未吸血蚊プールの分離率より若干高い傾向が見られた。

7月28日以降, *C. tritaen.*の季節的消長が最大のピークを示す8月中を通じて, 極めて多数の蚊が JEV 分離に供されたが, 全く JEV は分離されなかった。

考

私共の 1964 年の調査成績より⁽¹⁾, 長崎地方における *C. tritaen.* の季節的消長で特に重要な問題は, *C. tritaen.* 越冬成虫の出現, 乃至吸血活動開始時期と, この越冬蚊と新生蚊の出現における両者の世代交替期の把握である。

1964年の愛野町における調査では, 5月19日以前のこれ等の状況は全く不明で, その為, 5月19日に採集された蚊から JEV が分離された時, その時点での JEV 保有蚊が, 越冬蚊か, 或は新生蚊かの判断は, その蚊が JEV を獲得した時期を推定するのに関連して極めて重要な事であるが, その手掛りが皆目なく, 可能性を推測する事すら出来なかった。1965年は, この経験に鑑み 3月11日より調査を開始し, *C. tritaen.* の初期季節消長を自然な状態で把握するのに意を払った。その結果, *C. tritaen.* は *Culex pipiens pallens* や *Anopheles sinensis* に比べると, 夜間畜舎への出現, 或はその吸血行動の開始はやや遅れ, 4月7日より4月14日迄の間に初めて出現するものと思われる所見を得た。この成績は, 1965年, 長崎地方で *C. tritaen.* 越冬成虫の採集を, 主としてドライアイス誘引法を用い, 広範囲に実施した大森等の報告⁽⁹⁾の, 愛野町で最初に夜間畜

舎1965年は, *C. tritaen.* より分離された V は, 総て JEV と同定され, non-JEV の *arbovirus* は全く分離されなかった。

3. 分離 JEV の血清学的性状

1965年, *C. tritaen.* より分離された46株の JEV は, 総て赤血球凝集能の至適 pH (pH dependency) は, pH 6.6~6.8で, その赤血球凝集抑制反応の性状と共に, 何れも JaGAR 型と判定された。

察

舎で *C. tritaen.* が採集されたのは, 4月9日であったと云う成績とよく一致する。長崎地方における *C. tritaen.* のその年の最初の出現は, 藤崎等⁽¹⁰⁾の1952年, 1956年の諫早地方での調査, 及び大利等⁽¹¹⁾の1951年の長崎市市内での調査等でも, 4月中, 下旬となっており, 愛野町の1965年私共, 及び大森等⁽⁹⁾の調査を加える時, 概ね, 長崎県本土南部地域では, *C. tritaen.* はかなり恒常的に4月上旬頃より出現すると云えるであろう。

次に *C. tritaen.* の初期季節消長で, 何時頃までの蚊が完全に越冬蚊で占められるのか, 又, 新生蚊の出現は何時頃から始まるか, 更に両者が混在し移行するのは何時頃か等の問題については, 遺憾乍ら私共は, 採集蚊の解剖学的観察を行っていないので言及する事は出来ない。1964年は, 5月19日第1回の採集時点で950匹採集され, 以後1,000匹以上の採集が持続したが, 1965年は5月24日に初めて1,000匹代の採集が行なわれ, 以後9月上旬まで1,000匹以上の採集が続いている。両年のこの時間的遅速は僅少であり, 愛野町における新生蚊の確実な出現はかなり恒常的に5月中旬乃至下旬と推測される。この新生蚊出現以降の

C. tritaen. の季節的消長は、1964年と1965年では基本的な差異は認められない。即ち、6月下旬に見られる小さな山、それに引き続き起る7月中旬頃の小さな谷、更に8月上旬に起る最大のピーク等は、両年に共通して見られた現象であった。唯、1965年は1964年に比べ、8月中旬以後の減少カーブの傾斜がゆるやかであった事が若干特異的であった。1964年は、8月中旬の台風14号の影響の為か、それ以後は急激な *C. tritaen.* の減少を認めたが、1965年は8月上旬のピークが、同月中、下旬に向って持続される傾向にあり、9月に入って初めてその減少が著明になったが、それも急激には消失せず、ゆるやかな曲線を描き乍ら11月5日迄続いた。斯様に、1965年の *C. tritaen.* の季節消長は、1964年に比べると、消長後半における減少曲線の傾斜が緩やかであった事が注目された。

以上の様な、1964年と1965年の愛野町における *C. tritaen.* の季節的消長の比較において、兩年の間に基本的なパターンに差が認められなかった事を前提にすれば、1964年5月19日の時点で発見された JEV 保有蚊が越年蚊であったか、又は新生蚊であったかの判断、乃至推定は依然として困難である。何故ならば、5月中、下旬の時点は、愛野町においては、越年蚊と新生蚊の混在期であり新生蚊の優占度が急激に昂まりつつある時期とは云え、尚越年蚊の存在を完全に否定する事は出来ないからである。この点は尚、今後の実証的追求に俟たなければならない。

1965年の愛野町における *C. tritaen.* よりの最初の JEV 分離時期、6月21日は、1964年の5月19日に比べ約1ヶ月遅れたが、それでも同年全国各地で行なわれた蚊よりの JEV 分離時期に比べると非常に早い。然し、林等⁽¹²⁾が長崎市周辺地区で行なった1965年の JEV 蚊感染調査では、最初に蚊より JEV が分離されたのは、市内戸町の5月30日で、引続き6月上、中旬に涉り各地で採集蚊より JEV が分離され、1964年の愛野町⁽¹⁾、大村市⁽⁸⁾で観察されたのと、ほぼ同様な所見が得られている。従って、長崎地方の自然界における JEV 保有蚊の出現時期は、その特定地区の多少の年次的変動は別として、総体的には、既知の他府県地方に比べると非常に早期であり、然もその特異なパターンには恒常性があると考えられる。

1965年、愛野町における蚊からの JEV 分離率が最

高を示した7月7日は、1964年のそれに比べると約10日間遅れている。又最終分離時期は、1965年の7月20日を、1964年の7月6日に比べると、約2週間の遅れであった。この様な愛野町における現象は、林等⁽¹²⁾の大村、諫早地区における同様な調査成績と極めてよく一致しており、総体的に長崎県本土県南地域では、JEV 蚊感染が1965年の方が1964年に比べ時間的に遅延している様相が伺われた。然し、JEV 保有蚊の密度と関連する分離率は、1965年の方が1964年より明らかに高く、最高分離率では約2倍大きかったと推定される。

夜間畜舎において採集される *C. tritaen.* の中には、明らかに吸血直後と肉眼的に判定されるものが多く、これ等の蚊体乳剤ははかなり濃厚な赤血色を呈する。しかも *C. tritaen.* を採集した畜舎の家畜は、多くは生後数夏を経過した成牛が主で、豚も第2報で述べる様に7月上旬以降は、ほぼ100%既に JEV の感染を受けており、従って蚊体乳剤を材料として哺乳マウス脳内接種法により JEV 分離を行なう時、材料中の JEV が蚊の吸血々液に由来する JEV 中和抗体によって不活化される可能性がある。更に又、逆に採集時吸血直後の蚊では、同夜直に種類同定後ドライアイス中に凍結保存される為、viremia 血液を吸血した蚊では、その血中 JEV がそのまま分離される可能性もある。この様な両者の可能性は、蚊よりの JEV 分離に何等かの影響を与える事が考えられる。然し、吸血蚊、未吸血蚊を各々別々にプール構成し、その JEV 分離率を比較した結果は、両グループ間に顕著な分離率の差がなく、寧ろ全般的には吸血蚊からの JEV 分離率の方が高く、第一の可能性は殆んど無視してもよい様に思われる。この事は、中和抗体が接種材料中に存在していても、蚊体乳剤作製時の稀釈液添加によって中和抗体が大きく稀釈されたり、或は又蚊体の凍結保存、乳剤作製、接種の全過程を通じて慎重な低温操作を行なう為 JEV の中和抗体結合が起らない等の理由によるものであろう。第二の可能性については私共の成績は明瞭でない。この点は尚今後検討を要する問題である。

以上述べた様な1965年の長崎県における蚊の JEV 保有状況と、人の JEV 流行との関連については、第3報で述べる。

摘 要

1965年3月11日より、同11月5日迄の間、県下南高来郡愛野町畜舎において、*C. tritaen.* の季節的消長を

観察すると共に、同年4月14日より10月1日迄の間に採集した *C. tritaen.* ♀, 38,443匹, 402プール (1プー

ル、100匹を標準とする)より哺乳マウス脳内接種法により J E V 分離を行ない、次の所見を得た。

1) *C. tritaen.* が最初に夜間畜舎に出現し、同時に吸血行動を行なっているのが発見されたのは4月14日であり、5月24日には蚊の出現と共に急激に採集個体蚊数が増加し、以後6月下旬に小さい山をつくり、7月中旬の一時的減少後又急激に増加して、8月上旬に最大のピークを作り、以後徐々に減少し、11月5日にも尚小数の残存を認めた。この季節的消長は、1964年5月19日以後の消長に比べ大差を認めなかった。

2) *C. tritaen.* より J E V が分離されたのは、6月21日より7月20日迄の間で、この間、分離率が最高を

示したのは7月7日である。これを1964年の所見に比べると分離期間の時間的遅延が顕著であったが、分離率は1965年の方が高かった。

3) 採集時肉眼的に判定した吸血蚊と未吸血蚊の別々に構成したプールからの J E V 分離率は両群間に顕著な差を認めなかった。

摺筆に当り、御助言、御校閲を賜った風土病研究所、福見秀雄教授、未公刊資料の御教示を受けた大森南三郎教授、林薫助教授、並びに御助言を賜った国立予防衛生研究所北岡正見博士、大谷明博士、及び御協力御鞭撻を賜った長崎県衛生部、福田千代太郎長、洪江有明課長をはじめ関係者各位に深甚の謝意を表する。

文 献

1) **Takahashi, K., Matsuo, R., Kuma, M., & Noguchi, H.** : Studies on mosquito infection with Japanese encephalitis virus in 1964 in Nagasaki Prefecture. *Endem. Dis. Bull. Nagasaki.*, 7 (3) : 165-177, Sept. 1965.

2) **Buesher, E. L., Scherer W. F., Rosenberg, M. Z., Gresser, I., Hardy, J. L., & Bullock H. R.** : Ecologic studies of Japanese encephalitis in Japan. II. Mosquito infection. *Am. J. Trop. Med. & Hyg.*, 8 : 651-674. 1959.

3) 大谷明, 高橋三雄, 緒方隆幸, 片岡政夫, 奥野剛, 松山達夫, 中村忠義 : 群馬県におけるコガタアカイエカの日本脳炎ウイルス保有の年度別変化と、その人の日本脳炎流行との関係について。第11回日本ウイルス学会総会講演要旨。12. 1963.

4) 大谷明, 高橋三雄, 緒方隆幸, 奥野剛 : 節足動物媒介ウイルスに関する研究。1, 1963年度における野外研究。国立予防衛生研究所年報。XVII. : 75-76. 1963.

5) **Yamamoto, H., Takahashi, K., & Manako, K.** : Brief note on the natural infection of *Culex tritaeniorhynchus* Giles with Japanese encephalitis virus in Fukuoka Prefecture in the year 1963. unpublished records.

6) **Hurlbut, H. S., & Nibley, Jr.**

C. : Virus isolation from mosquitoes in Okinawa. *J. Med. Ent.*, 1, 78-83. 1964.

7) **Wang, S. P., Grayston, J. T., & Hu, S. M. K.** : Encephalitis on Taiwan. II Virus isolation from mosquito. *Am. J. Trop. Med. & Hyg.*, 11 : 141-148. 1962.

8) **Hayashi, K., Mifune K., Motomura, I., Matsuo, S., Kawasoe, H. & Futatsuki, K.** : Isolation of Japanese encephalitis virus from mosquitoes collected in Omura district, Nagasaki Prefecture, in 1964. *Endem. Dis. Bull. Nagasaki.*, 7 (3) : 155-164. 1965.

9) **Omori, N., Wada, Y., Kawai, S., Ito, S., Oda, T., Suenaga, O., Hayashi, K. & Mifune, K.** : Preliminary note on the collection of hibernated female of *Culex tritaeniorhynchus* in Nagasaki. *Endem. Dis. Bull. Nagasaki.*, 7 (2) : 147-153. June, 1965.

10) 藤崎利夫, 横尾秀典 : 1952年と1956年に於ける諫早地方での蚊族の季節的消長について。長崎医学雑誌。32 (11) : 1, 446-1, 450, 1957.

11) 大利茂久, 下釜勝 : 長崎市内の牛舎における蚊族の季節的消長。長崎医学雑誌, 28 (9) : 1, 020-1, 026, 1953.

12) 林薫, 大森南三郎 : 未公刊資料。