

長崎地方で捕集した *Aedes vexans nipponii* から日本脳炎
ウイルス及びA群アルボウイルスの分離

七条 明久, 三舟求真人, 陳 境津, 林 薫

長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学部門 (主任: 福見秀雄教授)

和田 義人, 伊藤寿美代, 小田 力, 大森南三郎

末永 敏, 宮城 一郎

長崎大学医学部医動物学教室 (主任: 大森南三郎教授)

長崎大学熱帯医学研究所衛生動物研究室 (主任: 大森南三郎教授)

(Received for Publication October 30, 1970)

Isolation of Japanese Encephalitis Virus and Group A Arboviruses
from *Aedes vexans nipponii* Caught in Nagasaki Area, Japan.

**Akehisa SHICHIJO, Kumato MIFUNE, Cheng Chung CHIN
and Kaoru HAYASHI**

Department of Virology, Institute for Tropical Medicine, Nagasaki University

(Director: Prof. Dr. H. FUKUMI)

**Yoshito WADA, Sumiyo ITO, Tsutomu ODA,
Nanzaburo OMORI, Osamu SUENAGA and Ichiro MIYAGI**

*Department of Medical Zoology, Nagasaki University of Medicine and Department
of Medical Zoology, Institute for Tropical Medicine, Nagasaki University*

(Director: Prof. Dr. N. OMORI)

Abstract

Four strains of Japanese encephalitis virus and 3 strains of group A arbovirus were isolated from mosquitoes of *Aedes vexans nipponii* caught in Nagasaki area during epidemic season from 1965 to 1968. The latter strains isolated were closely related to the strain MM 2021, Getah virus, a group A arbovirus. One of the isolates, MP 1805 strain, was found to be able to form plaques in primary chick embryo cell cultures with the plaque

size of 2 or 3 mm in diameter after 2 days incubation. By the method of plaque reduction, neutralizing antibodies against MP 1805 strain were detected in the sera of 4 of 47 cases which were acute febrile illness confirmed serologically as non-Japanese encephalitis and occurred during the period of epidemic season from 1964 to 1967. One of these 4 cases was found to have significant antibody rise in converescent serum.

は し め に

日本における日本脳炎（日脳）ウイルスの媒介蚊はコガタアカイエカが主役であることは多くの研究者の一致した見解である。従って日脳流行期における自然界のウイルス撒布を知る目的でしばしばコガタアカイエカに限ってウイルスの分離が行われ、分離効率や分離頻度によってウイルスの汚染を推測する方法がとられる。しかし、こうした自然界におけるウイルス撒布の推定のためには、ブタの日脳ウイルスに対する高い感受性とコガタアカイエカのブタに対する強い吸血嗜好性の両面から考えて、むしろブタの血球凝集抑制抗体（HI抗体）、特に2-メルカプトエタノール感受性抗体の保有率の上昇をウイルス汚染の指標とする方法が一般化している現況である。これはウイルスの分離よりHI抗体測定の方が実験手技の上でより簡便であることもその理由である。今日、日脳ウイルスの生態学の研究はコガタアカイエカを中心とした感染環の究明に重点が注がれているが、日脳ウイルスの越年の手がか

りとして行った越年雌コガタアカイエカからのウイルス分離は未だに成功していないし、早春及び晩秋における日脳ウイルスの出現、退潮にコガタアカイエカ以外のものの関与も想定してよい。

1964年以来、当研究所ウイルス学部門と当大学医学部医動物学教室との協同研究で日脳ウイルスの生態学が追究されてきたが、たまたま1965年、1967年及び1968年に *Aedes vexans nipponii* から日脳ウイルスが分離され、1967年にはA群アルボウイルスが検出された。上記のウイルス検出の時期は日脳流行盛期をずれる場合があることから日脳ウイルスの疫学的背景に *Aedes vexans nipponii* が果してどのように関与するかは今後の課題として残されねばならないと考える。ここに *Aedes vexans nipponii* からのウイルス検出の経過をまとめて報告し日脳ウイルス生態学のための一参考資料として記録にとどめることとする。

材 料 と 方 法

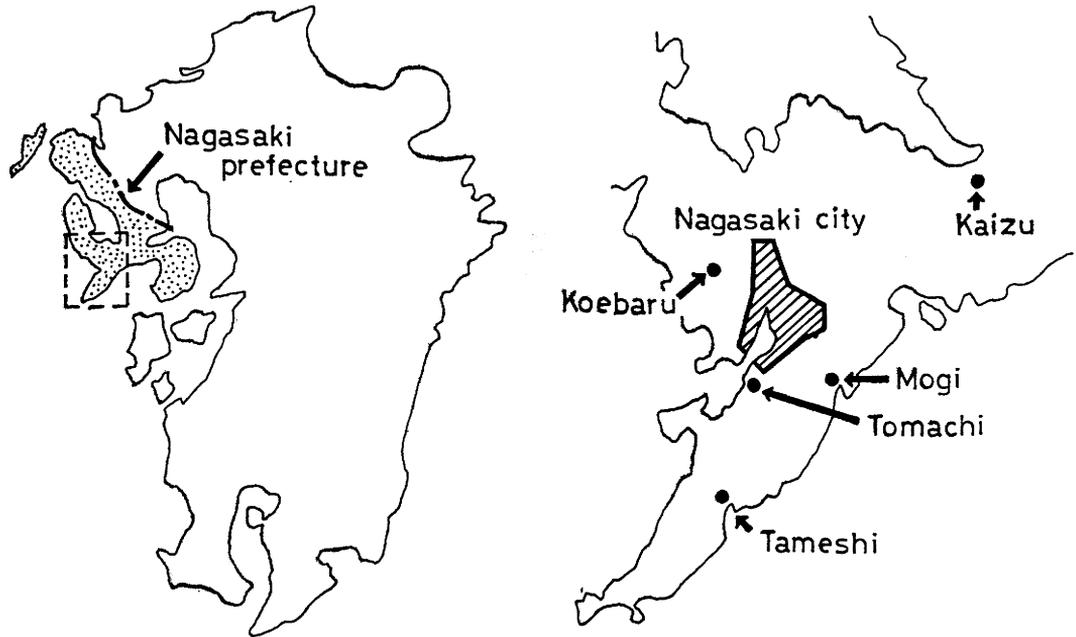
蚊の捕集：長崎市近郷で1965年には茂木、戸町、川平で、1967年には貝津、茂木、戸町、為石で、1968年には貝津、茂木、戸町、西山、木場崎及び小江原などで捕集した。ウイルスが検出された *Aedes vexans nipponii* は上記のうち、貝津、茂木、戸町、小江原、及び為石の5ヶ所で捕集されたものであって、Fig 1 に示した通りである。捕集蚊は3日ないし、5日間室温で飼育した後炭酸ガスで麻酔して分類し、ウイルス分離の時まで -70°C に凍結保存した。

ウイルスの分離及び同定：ウイルス分離は既報（林等、1965、1966）に記載したように哺乳マウス脳内接種法によった。分離ウイルスは福見等（1967）の方法で補体結合反応、マウスによる交叉中和試験によって同定した。

Plaque 形成及び中和抗体の検査：分離されたA群

アルボウイルスの plaque 形成試験は中村等（1963）の記載に従った、即ち、11日孵化ニワトリ胚をTrypsinで消化し、10%仔牛血清加 Hanks 液に再浮遊し7.5cmシャーレに分注、seeding し1日培養後の単層培養細胞を使用した。細胞を燐酸緩衝液で洗滌後、各階段希釈のウイルス液 0.2ml を接種し 37°C 1時間吸着させ double buffered Hanks 液で作成した Agar-overlay を重層し2日目に、plaque 数を算えた。中和試験には10倍希釈の被検血清と 100PFU/0.2ml のウイルス液を等量混合し 37°C 1時間保った後シャーレの単層培養細胞に混液の 0.4ml を接種し 37°C 1時間吸着を行い double buffered Hanks agar-overlay を重層した。2日培養後 plaque 数を算え50%減少率を求め中和抗体の有無を検定した。

Fig. 1 Outline of Kyushu island survey station in Nagasaki.



成績 と 考 察

***Aedes vexans nipponii* から日脳ウイルスの分離**：1967年はコガタアカイエカから日脳ウイルスが分離されたのは6月23日から7月27日の間であった。同年における *Aedes vexans nipponii* からの日脳ウイルスの分離は7月14日で日脳流行盛期である。また、1965年及び1968年におけるコガタアカイエカからの日脳ウイルスの分離は5月30日から9日6日及び7月23日から8月7日の間であった。両年における *Aedes vexans nipponii* から日脳ウイルスの分離例は6月12日及び7月22日で、コガタアカイエカからの最初のウイルス分離の時期とほとんど差がないことが注目された。この際、*Aedes vexans nipponii* から日脳ウイルスの分離は吸血液中に含まれる生残ウイルスに由来するものか或いは蚊体内での増殖ウイルスの検出であるかは重要な問題であるが、MP344を分離した蚊以外はドライアイスに誘引されたものであるので、捕集時には未吸血の状態であり、またMP344を分離した群には吸血直後のものも混在していたが、吸血液の消化のため捕集後3日ないし5日間、室温で飼育した後、分類、同定しウイルス分離の時期まで -70°C に凍結保存されたものであることを考慮すると *Aedes vexans nipponii* からの

日脳ウイルスの分離例は蚊体内での増殖ウイルスに由来するものと理解してよいと思う。しかし、Hodes (1946) は別亜種である *Aedes vexans nocturnus* を用いた日脳ウイルスの実験的感染でウイルスの伝播の可能性を示しているが、Reeves and Hammon (1946) は *Aedes vexans* の原種を用いての実験的感染の不成功を報告している。従って地理的な感受性の変異については今後の問題として残されている。

いずれにしても1965年及び1968年の分離例のようにコガタアカイエカからの日脳ウイルスの最初の分離時期に一致して日脳ウイルス流行の早期である例があることは *Aedes vexans nipponii* の生態の追究と共に日脳ウイルスの生態の一面を知る上に重要な意義をもつものと考えられる。

***Aedes vexans nipponii* から日脳ウイルス以外のアルボウイルスの分離**：

Table 2に示すように、1967年には2ヶ所で捕集された *Aedes vexans nipponii* からそれぞれ日脳ウイルス以外のアルボウイルスが分離された。分離ウイルスは Ether 及び Sodium deoxycholate に感受性である (Table 3). Fig. 2 にA群アルボウイルスの Batai

Table 1. JE virus isolation from *Aedes vexans nipponii* mosquitoes caught in Nagasaki area.

Strains isolated	Number of mosquitoes in a pool	Date of mosquito collection	Method of mosquito collection	Place of mosquito collection
MP 259	200	June 12, 1965	Dry ice trap	Tomach
MP 344	65	July 14, 1965	Dry ice trap and with the aid of live-stockpen	Mogi
MP 2240	314	July 14, 1967	Dry ice trap	Kaizu
MP 3588	56	July 22, 1968	Dry ice trap	Koebaru

Mosquitoes of *Aedes vexans nipponii* were caught during the periods from May 8 to October 12 in 1965, from April 13 to September 5 in 1967 and from April 17 to October 12 in 1968.

Table 2 The isolation of non-JE virus from *Aedes vexans nipponii* mosquitoes caught in Nagasaki area, in 1967.

Strains isolated	Number of mosquitoes in a pool	Date of mosquito collection	Method of mosquito collection	Place of mosquito collection
MP 1805	300	June 7	Dry ice trap	Tameshi
MP 1903	300	June 15	Dry ice trap	Tameshi
MP 2327	67	July 28	Dry ice trap	Tomachi

antigen \ antisera	MM2222	MM2021	MP1805	MP1903	MP2327
MM2222					
AMM 2021					
MP 1805					
MP 1903					

ながら交叉反応を認めた。しかし、分離ウイルスの3株の抗血清に対し Getah ウイルス MM2021株は自原抗血清に対すると同じ程度に反応した。また Batai ウイルス MM2222株と分離ウイルスの間には交叉反応を認めなかった。哺乳マウス脳内接種法で行った交叉中和試験の成績は Table 4 に示されるように、分離株のうち MP1805株は A群アルボウイルスの Getah ウイルス M2021株に近縁であって JaGAR 01 株とは全く異なることが明かである。

Table 2 に示されるように分離ウイルスのうち MP

Table 3 Effect of ether and sodium deoxycholate on infectivity of non-JE virus strain MP 1805.

Chemicals	Infectivity (SMLD ₅₀)		Reduction of titer
	not treated	treated	
Ether	6.2	3.7	2.5
Sodium deoxycholate	5.8	1.5	4.3

Infectivity titer was expressed as logarithm of the suckling mouse LD₅₀ end point titer.

Table 4 Cross neutralization test of MP 1805 strain.

Virus	Original titer	Antiserum against		
		MM 2021	MP 1805	JaGAR 01
MM 2021	7.7	5.4 §	5.2	—
MP 1805	5.6	<3.0	<2.0	5.5

§The survival virus titer was expressed as logarithm of suckling mouse LD₅₀ after neutralization.

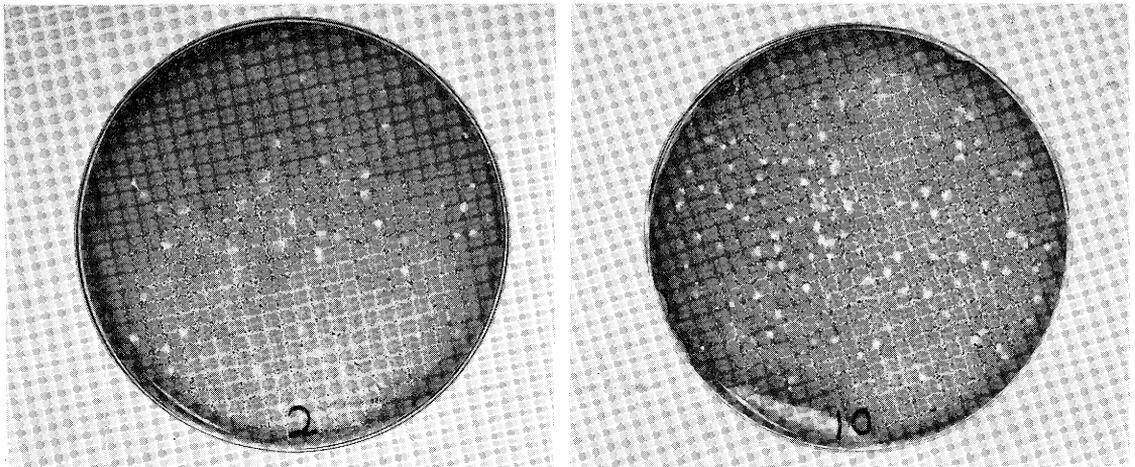


Fig. 3 Plaque formation of MP 1805 strain in primary chicken embryo cell culture. The size of plaques was given 2~3 mm in diameter after 2 days incubation.

告し、中村等 (1960) は 2 株の Sagiya 類似ウイルス、Scherer et al. (1962) は 2 株の Sagiya ウイルス及び Getah ウイルス、Hurlbut and Nilbley (1964) は 1 株の Sagiya ウイルスをそれぞれ報告している。このような事実は特に日本における *Aedes vexans nipponii* が関与するアルボウイルスの生態を今後更らに追究する必要があることを示しているものと考えらる。

分離ウイルスの plaque 形成とその血清疫学：

MP1805株を用い孵化ニワトリ胚細胞による plaque 形成を試みた。ウイルス接種後 double buffered

Hanks agar-overlay を重層し 2 日間の培養後の plaque の大きさは 2 mm 前後であった。4 日ないし 5 日間の培養では plaque の大きさは 4 mm 前後に及んだ。2 日培養後の感染価は 7.4×10^5 PFU/ml を示した。

Stimm and Henderson (1969) は PS-Y15 細胞を用い Getah ウイルスは 4 日目に plaque が出現し plaque の径は最大 2 mm となると述べているが、これは使用細胞及び Agar-overlay の差異による結果であろうと考えられる。

1964年から1967年に至る 4 年間に発生した急性熱性疾患患者の対血清のうち日脳ウイルスに対する HI 抗体

Table 5. Detection of neutralizing antibody against the antigen of MP 1805 strain by plaque reduction test.

Year	Number of cases tested	Number of sera confirmed antibody	
		acute stage	converescent stage
1964	6 §	0	1
1965	22	2	2
1966	9	0	0
1967	10	1	1
Total	47	3	4

§ ...The sera was obtained from cases of acute febrile illness which were confirmed no HI antibody against JE virus.

が検出されなかった47件について plaque reduction test を行ったところ、4件はMP1805株に対する抗体が証明され、そのうち1件は抗体上昇をも認めることが出来たが、本分離ウイルスの病原的意義は今後の調査及び実験的研究に俟たねばならない (Table 5)

1957年 Scherer et al. (1962) によつて Getah ウイルスが日本で分離され、その後も繰返えし検出されている。中村等 (1967) は Getah ウイルス MM

2021株に対する年令別抗体分布を調査したところ、全体の1%が抗体を保有し特に高年令層では4.2%という高い陽性率を示したことを記録している。長崎地方では急性熱性疾患患者という特殊な症例についての調査であるが前記のように47件中4件は既往に本ウイルスに暴露されたものと推定することが出来たが、このような事実は日本におけるアルボウイルスの研究の一環として究明されねばならぬ問題である。

お わ り に

関東地方から沖縄に至る広い範囲において *Aedes vexans nipponii* から Sagiyama 及び Sagiyama 類似ウイルス、Akabane ウイルス、Getah ウイルスなど種々のアルボウイルスが分離されているが、長崎地方では1965年、1967年及び1968年に *Aedes vexans nipponii* から日脳ウイルスが分離された。捕集蚊は未吸血のものか或いは吸血直後のものを含む場合も分類同定の前3日ないし5日間は室温で飼育されているので吸血液中の生残ウイルスに由来するとするよりむしろ

蚊体内での増殖ウイルスの検出であると考えられる。また1967年には *Aedes vexans nipponii* から Getah 類似ウイルス3株が分離され、その分離の時期は日脳流行の早期と晩期に相当していることが注目された。

以上のように *Aedes vexans nipponii* が関与するアルボウイルスの生態学的研究、特に日脳ウイルスの疫学に占める *Aedes vexans nipponii* の役割は緊急を要する研究課題であると思う。

参 考 文 献

1) 福見秀雄, 林薫, 三舟求真人, 氏家淳雄, 末永敏, ニッ木浩一, 松尾幸子, 宮城一郎: 東アフリカにおけるウイルス病, 寄生虫病及びそれに伴う媒介昆虫の研究. I ウイルス学研究特にアルボウイルスの疫学的研究, 熱帯医学 9(3): 127-135, 1967.

2) Hayashi, K., Mifune, K., Shichijo, A., Kawasoe, H., Matsuo, S., Futatsuki, K., Omori, N., Wada, Y., Ito, S., Kawai, S., Nishigaki, S.,

Abe, Y., Makiya, K. and Kamizono, Y.: Ecological Studies on Japanese Encephalitis Virus. Isolation of Japanese encephalitis virus from mosquitoes collected in Nagasaki and Kagoshima districts, Japan, in 1965. End. Dis. Bull. Nagasaki Univ., 8: 61-73, 1966.

3) Shichijo, A., Mifune, K., Hayashi, K., Wada, Y., Ito, S., Kawai, S., Miyagi, I. and Oda, T.:

Ecological Studies on Japanese Encephalitis Virus. Survey of virus dissemination in Nagasaki area, Japan, in 1966 and 1967. *Tropical Medicine*, **10**: 168-180, 1968.

4) **Hayashi, K., Mifune, K., Shichijo, A., Wada, Y., Nishigaki, S. and Omori, N.** : Ecological Studies on Japanese Encephalitis Virus. Results of investigations in the Nagasaki area, Japan, in 1968. *Tropical Medicine*, **11**: 212-220, 1970.

5) **Hodes, H. L.** : Experimental Transmission of Japanese B Encephalitis by Mosquitoes and Mosquito Larvae. *Proceedings of the Meetings of the Johns Hopkins Medical Society*, January 14, 1946.

6) **Hurlbut, H. S. and Nibley, C.** : Virus Isolation of from Mosquitoes in Okinawa. *J. Med. Ent.*, **1**: 78-83, 1964.

7) **Nakamura, M. and Ueno, Y.** : Infections Ribonucleic Acid of Japanese B Encephalitis Virus. Optimal conditions for its extraction and for plaque formation in chick embryo cell monolayers and some biologic [properties. *J. Immunol.*, **91**: 136-143, 1963.

8) 中村忠義, 松山達夫, 奥野剛, 大谷明 : アルボウイルスの抗体保有調査, *医学のあゆみ*, **60**: 72-73, 1967.

9) **Oya, A., Okuno, T., Ogata, T., Kobayashi, I. and Matsuyama, T.** : Akabane, a New Arbovirus Isolated in Japan. *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, **14**: 101-108, 1961.

10) **Reeves, W. C. and Hammon, W. McD.** : Laboratory Transmission of Japanese B Encephalitis Virus by Seven Species (Three Genera) of North American Mosquitoes. I. *Exptl. Med.*, **83**: 185-194, 1946.

11) **Scherer, W. F., Funkenbush, M., Buescher, E. L. and Izumi, T.** : Sagiyama Virus, a New Group A Arthropod Borne Virus from Japan. 1. Isolation, immunologic classification and ecologic observation. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, **11**: 255-268, 1962.

12) **Stimm, T. B. and Henderson, J. R.** : Arbovirus Plaquing in a Clon Line (PS-Y15) of Porcine Kidney. *Appl. Microbiol.*, **17**: 246-249, 1969.

13) **Wada, Y., Kawai, S., Ito, S., Oda, T., Nishigaki, S., Omori, N., Hayashi, K., Mifune, K. and Shichijo, A.** : Ecology of Vector Mosquitoes of Japanese Encephalitis, Especially of *Culex tritaeniorhynchus*. 1. Results obtained in 1965. *Tropical Medicine*, **9**: 45-57, 1967.