

バイオトロンで飼育したコガタアカイエカの  
日本脳炎ウイルスによる実験的感染

七 条 明 久・三 舟 求真人・林 薫

長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学部門 (主任: 林 薫 教授)

和 田 義 人・小 田 力

長崎大学医学部医動物学教室 (主任: 和田義人教授)

大 森 南 三 郎

帝京大学医学部寄生虫学教室 (主任: 大森南三郎教授)

(Received for publication December 9, 1972)

Experimental Infection of *Culex tritaeniorhynchus*  
*summosus* Mosquitoes Reared in Biotron with  
Japanese Encephalitis Virus

**Akehisa SHICHIJO, Kumato MIFUNE and Kaoru HAYASHI**

*Department of Virology, Institute for Tropical Medicine,  
Nagasaki University*

(Director: Prof. Dr. K. Hayashi)

**Yoshito WADA and Tsutomu ODA**

*Department of Medical Zoology,  
Nagasaki University School of Medicine*

(Director: Prof. Dr. Y. Wada)

**Nanzaburo OMORI**

*Department of Parasitology, Teikyo University School of Medicine*

(Director: Prof. Dr. N. Omori)

### Abstract

The laboratory colonized mosquitoes (NF strain) of *Culex tritaeniorhynchus summorosus* were reared in indoor insectary biotron in which the astronomical day length, temperature and humidity were automatically regulated to change by daily cycle and change gradually by 5 days following the changes in the natural astronomical conditions from early August through the end of next May.

Adult female mosquitoes which emerged under various conditions were infected with Japanese encephalitis virus by allowing them to bite on 1 day old infected chickens or by feeding the mixture of rabbit blood and virus suspension and kept in controlled conditions of biotron continuously even after infection. At intervals after infection, 4 to 10 mosquitoes were harvested and a half of them was used for assay of the infectivity of the virus. Another half was processed for the samples of fluorescent antibody method and the distribution of viral antigen in mosquitoes was examined. The results obtained were as follows:

1. In preliminary experiment in which infected mosquitoes were kept in conventional incubators (defective of apparatus controlling the various natural conditions but able to keep constant temperatures), it was found that virus growth in infected mosquitoes was prolonged in time with lower temperatures, however, the virus replication still occurred even when the infected mosquitoes were kept at 15°C throughout the experiment.

2. The virus in mosquitoes which emerged and infected under the environments of before the end of September began to replicate from 3rd or 5th day after infection and reached the maximum titer on 7th or 10th day. The fluorescent viral antigen observed at first in a part of posterior midgut cells and gradually developed to all over the midguts. When the virus infectivity titer reached the maximum, the fluorescent viral antigen was distributed to fatbody cells, salivary gland cells and thoracic ganglion cells.

3. The virus growth in mosquitoes which emerged and infected under the environments of after the middle part of October was observed from 5th or 7th day after infection and the virus titer reached the maximum on 15th day. The virus titer in this case was constantly very much lower that of mosquitoes which emerged and infected in the conditions of before the end of September. The fluorescent viral antigen was observed only in the limited part of posterior midgut cells throughout of experiment, however, after the environments in biotron were changed to those of March from January, the fluorescent viral antigen was observed to develop to the whole cells of midguts, fatbody cells, thoracic ganglion cells and salivary gland cells.

## 緒 言

日本脳炎ウイルス（以下日脳ウイルスまたは単にウイルスという）による蚊の実験的感染は既に HURLBUT (1950), HALE et al. (1957), GRESSER et al. (1958), LaMotte (1960, 1963), MIFUNE (1965), 奈須等 (1966), DOI et al. (1967) 及び MUANGMAN et al. (1972) 等によって行われている。これら先人の業績は (1) 蚊体内のウイルス増殖に及ぼす外界温度の影響をみたもの、(2) 蚊体内のウイルス増殖の様式とウイルス抗原の分布を検索したものと大別される。このうち、LaMotte (1963) 及び MIFUNE (1965) は特に外気温の変化を考慮に入れて実験的感染蚊を種々の環境温度で飼育し蚊体内のウイルスの存続を検査し、次のような貴重な所見を得ている。即ち、蚊に一旦、感染が成立すればウイルスは低温時でも、その感染価に極端な低下をみないまま長期間に亘って蚊体内

に保たれることを明かにした。しかし、この種の実験には、なおウイルスの生態学という観点から蚊の吸血、産卵、羽化、越年など種々の生理的条件が考慮されねばならない。

我々は蚊の羽化及び吸血時の環境条件を考慮し出来るだけ自然の状態に近い生理的条件の蚊でウイルスによる実験的感染を行うことにした。先ず、長崎地方における最近5年間の気象を調査し、毎日の生物学的日長時間、気温、湿度を5日毎に平均して作ったプログラムを用いて1年間の気候環境をバイオトロンで再現した。このようなバイオトロンで種々の時期に孵化し羽化したコガタアカイエカ雌成虫を用いてウイルスを実験的に感染させ、蚊体内のウイルス増殖及びウイルス抗原の分布を調べたのでその成績を詳述する。

## 実 験 材 料 と 実 験 方 法

### (1) バイオトロン

バイオトロンは島津製作所製（特型バイオトロン）を用いた。長崎地方の過去5年間の資料から、5日毎の平均をとることによって1日の生物学的日長時間、温度及び湿度の3時間毎の値を結び変化曲線を定め、これによって1日の気候環境とした。その環境を5日間継続することで1プログラムとし、プログラムを連続的に変えることで1年間の気候環境を再現した。

### (2) ウイルス

当部門で1968年夏、野外で捕集したコガタアカイエカから分離し日脳ウイルスと同定した MP 3667-68 株のマウス脳内継代2～3代目のものを使用した。

### (3) コガタアカイエカの日脳ウイルスの感染

教室で継代保存されているコガタアカイエカ（NF系）の50代ないし70代目のものを実験に使用した。予備実験には  $10^{3.6}$  LD<sub>50</sub>/0.02ml のウイルス血症の豚を吸血させて感染した。本実験には8月中旬から10月上旬までの気候条件で羽化した蚊の場合、 $10^{3.2}$  または  $10^{4.0}$  LD<sub>50</sub>/0.02ml のウイルス血症の感染ヒナを吸血させ、また11月中旬の気候条件で羽化した蚊の場合、2日間飢餓させた後、 $10^{3.5}$  または  $10^{5.5}$  LD<sub>50</sub>/0.02ml のウイルスと脱繊維家兎血液を等量混合したものを綿に浸して吸引させ感染させた。実験には満腹となるまで吸血した蚊だけを使用し、吸血量が充分でなかった蚊及び吸血しなかった蚊は実験から除外

した。蚊1個体当りの吸血量は蚊が満腹したときの吸血量を0.002mlとし、血液のウイルス量が  $10^{3.6}$  LD<sub>50</sub>/0.02ml とすると  $10^{2.6}$  LD<sub>50</sub>/0.02ml と計算出来る。

### (4) ウイルスの感染価の測定

蚊体内のウイルスの測定は感染蚊2～5個体を1プールとし、0.75%牛血清アルブミン、200γ/ml ストレプトマイシン、200u/ml ペニシリン加0.01M 磷酸緩衝食塩水 pH7.2 の0.5ml または1ml で乳剤とした。これを4℃で10,000rpm 15分間遠心し、その上清を1腹8～10匹の哺乳マウス脳内に0.02ml ずつ接種した。Reed and Muench (1938) の方法でLD<sub>50</sub>を算定し、それから蚊1個体当りのウイルス量LD<sub>50</sub>/mosq. を計算した。

### (5) 蛍光抗体法

DOI et al. (1967) の方法に準じて行なった。即ち、感染及び非感染蚊を卵白とアラビアゴムを等量混合したものを媒体として包埋し、米国 Lipshow 社製のクリオスタット (Model No. 1200) で4ミクロンの凍結切片を作った。これをカバーガラス上で約5分間アセトン前処理し直接法によって蛍光染色した後、鏡検した。抗体の Fluorescein isothiocyanate (FITC) 蛍光色素のラベルは川村 (1967) の方法によった。

実 験 成 績

実 験 Ⅰ.

感染蚊の飼育温度とウイルス増殖との関係(予備実験)

日脳ウイルスの抗体のない豚に $10^{3.0}$  LD<sub>50</sub>/0.02mlのウイルスを5ml皮下接種し3日後に $10^{3.6}$  LD<sub>50</sub>/0.02mlのウイルス血症のときコガタアカイエカ雌成虫に吸血させた。吸血蚊を6群に分け30℃, 27℃, 24℃, 21℃, 18℃及び15℃で通常の恒温室で飼育した。1日, 3日, 5日, 7日, 10日及び14日目にそれぞれ5個体ずつ取り出し, これを1プールとして哺乳マウス脳内接種法でウイルスの感染価を測定した。その結果をまとめたものはFig. 1である。30℃, 27℃及び24℃での蚊体内のウイルス増殖はほとんど類似の様相を示し感染後6時間ないし12時間目のウイルスの感染価(図中には1日目の線上に記載した)は最低となり, 以後急速に増加し3日目で大体最高値に達している。21℃でのウイルスの増殖は24℃よりおくれ,

1日目,  $10^{2.0}$  LD<sub>50</sub>/mosq, 3日目,  $10^{3.0}$  LD<sub>50</sub>/mosqとわずかに増殖を示し7日目に $10^{5.5}$  LD<sub>50</sub>/mosqの最高値に達した。18℃では3日目 $10^{2.0}$  LD<sub>50</sub>/mosq, 15℃では $10^{1.0}$  LD<sub>50</sub>/mosq。以下で, 以後ゆるやかに増殖し, 18℃では7日目に $10^{5.0}$  LD<sub>50</sub>/mosq, 15℃では10日目に $10^{4.0}$  LD<sub>50</sub>/mosq.の最高値に達した。

Fig. 1から明かなように感染後6~12時間目のウイルスの感染価は温度が低いほど高い値を示している。これは温度が低くなるほど蚊体内での血液の消化に時間を要し, かつウイルスは血清で保護されているため生残ウイルスを表わしていることに注意しなければならない。しかし, この実験成績から言えることは, 吸血感染雌成虫を15℃の低温にさらしても, 18℃以上の温度の場合の増殖速度より著しくおくれるとはいえ, 蚊体内のウイルスは増殖するという注目すべき事実が明かにされたことである。

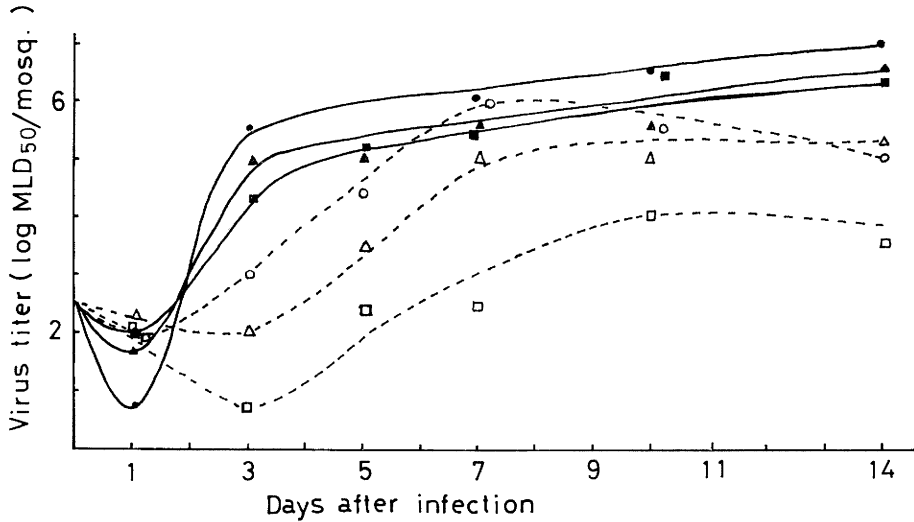


Fig. 1 Virus concentration of infected mosquitoes after incubation of various constant temperature. Symbols: ●, 30°C; ▲, 27°C; ■, 24°C; ○, 21°C; △, 18°C; □, 15°C.

実 験 Ⅱ.

(1) バイオトロンの環境条件とコガタアカイエカの羽化及びその吸血率

コガタアカイエカの孵化及び羽化の条件と蚊の吸血率の成績は Table 1 に示した。即ち, 8月上旬(Aug. E. (1))から10月下旬(Oct. L. (1))までの気候環境で孵化した group 1 から group 9 ま

では多少の発育期間のずれがあるにしても羽化し成虫となったが, 11月上旬(Nov. E. (1))以後の環境で孵化したものは遂に羽化をみるに至らなかった(group 10, 11, 12)。

group 1~6 の雌成虫はいずれも吸血能があって感染ヒナから30.6%ないし16.7%が吸血した。しかし, group 7, 8 及び9の雌成虫は吸血能がなく, 従って

Table 1. Condition of hatching, emergence and infecion of mosquitoes in biotron

Group No.	Hatching			Emergence			Feeding			
	Month, part (subpart)	Day length (hr:min.)	Mean air temp. (°C)	Month, part (subpart)	Day length (hr:min.)	Mean air temp. (°C)	Month, part (subpart)	Day length (hr:min.)	Mean air temp. (°C)	Feeding rate (%)
	1	Aug.E. (1)	14:53	28.4	Aug.E. (2)	14:44	28.4	Aug.M. (1)	14:35	28.4
2	Aug.M. (1)	14:35	28.4	Aug.M. (2)	14:25	28.4	Aug.L. (1)	14:15	27.9	24.3
3	Aug.L. (1)	14:15	27.9	Aug.L. (2)	14:04	27.4	Sep.E. (1)	13:54	27.2	20.0
4	Sep.E. (1)	13:54	27.2	Sep.E. (2)	13:43	26.5	—	—	—	—
5	Sep.M. (1)	13:33	24.5	Sep.M. (2)	13:23	22.9	Sep.L. (2)	13:03	21.0	30.6
6	Sep.L. (1)	13:13	22.1	—L. (1)	—13:13	—22.1	—	—	—	—
7	Oct.E. (1)	12:53	20.5	Oct.E. (1)	12:53	20.5	Oct.M. (1)	12:34	18.8	16.2
8	Oct.M. (1)	12:34	18.8	—E. (2)	—12:43	—18.8	—	—	—	—
9	Oct.L. (1)	12:14	17.4	Oct.M. (1)	12:34	18.8	Oct.M. (2)	12:24	18.8	0.0
10	Nov.E. (1)	11:56	16.7	—M. (2)	—12:24	—	—	—	—	—
11	Nov.M. (1)	11:40	13.8	Nov.E. (2)	11:47	15.9	—	—	—	—
12	Nov.L. (1)	11:28	12.1	Nov.E. (2)	11:47	15.9	Nov.M. (2)	11:34	13.8	0.0
				—M. (2)	—11:34	—13.8				
				No emergence						
				No emergence						
				No emergence						

Remarks : The sings of E., M. and L. mean the early, middle and late part of a month, which are divided into two subparts(1) and(2).

感染実験では2日間飢餓状態とした後、ウイルスを加えた脱繊維家兎血液を綿に浸して吸血させた。ただし、group 4, 7及び8は感染実験を行わなかった。

(2) 種々の気候条件で羽化し成虫となったコガタアカイエカの実験的感染と蚊体内のウイルスの消長

バイオトロンで飼育したコガタアカイエカ各集団のうち、蛍光抗体法だけで蚊体内のウイルス抗原を検索した group 1 及び蚊体内のウイルスの検索を行わなかった group 7 を除いて感染蚊体内のウイルス増殖の態度をまとめた成績は Fig. 2 の通りである。

group 2, 3 及び5は感染ヒナから吸血後、3日目すでにウイルス増殖の立上りを認め、 $10^{3.5} \sim 10^{4.5}$  LD<sub>50</sub>/mosq. を示した。7日目ないし10日目では  $10^{6.3}$  LD<sub>50</sub>/mosq. の最高値に達し、その後ウイルス感染価はゆるやかに低下するが、50日目ないし65日後でも  $10^{3.9} \sim 10^{4.6}$  LD<sub>50</sub>/mosq. であった。これに反し、group 6 及び9の場合、ウイルス増殖の立上りは前3者に比しておそく、吸血感染後7日目ないし10日目で  $10^{3.0} \sim 10^{3.3}$  LD<sub>50</sub>/mosq. を示し、15日目に  $10^{4.2} \sim 10^{4.5}$  LD<sub>50</sub>/mosq. の最高値となった。そして、その後のウイルス感染価はやや急速に低下の傾

向を示すが、group 6 では95日目でもなお、 $10^{2.0}$  LD<sub>50</sub>/mosq. また group 9 (Exp.1) では60日目に環境を3月中旬(平均気温10℃~14℃)に変えることによって蚊体内のウイルスは急激に増加し  $10^{5.0}$  LD<sub>50</sub>/mosq. を示すに至った。そしてバイオトロン内の気候温度の上昇(平均気温15℃~18℃)につれてウイルス感染価は  $10^{5.6} \sim 10^{6.3}$  LD<sub>50</sub>/mosq. となり group 2, 3 及び5の最高感染価と同程度と示すに至った。しかし、group 9 (Exp.1) の場合、40日目で  $10^{1.0}$  LD<sub>50</sub>/mosq. 以下であったものが60日目に環境温度を上昇させた後  $10^{5.0}$  LD<sub>50</sub>/mosq. までウイルスの増殖をみた事実から、先ず次の2項について検討する必要があると考えた。即ち、(1) 飼育中、温度を急激に上昇させなかった場合、 $10^{1.0}$  LD<sub>50</sub>/mosq. 以下のウイルス保有の状態が何時の気候条件まで続いたであろうか (2) 吸血感染時のウイルス量を更らに低くした場合どのような経過をとるであろうか。この2項について group 9 と同じような条件で羽化した蚊について実験的感染を反復した。その成績は Fig. 2 の group 9 (Exp.2.) に示したように、脱繊維家兎血液中のウイルス量を  $10^{3.5}$  LD<sub>50</sub>/0.02ml とし綿に浸して吸血させた場合、吸血直後に  $10^{2.3}$  LD<sub>50</sub>/mosq.

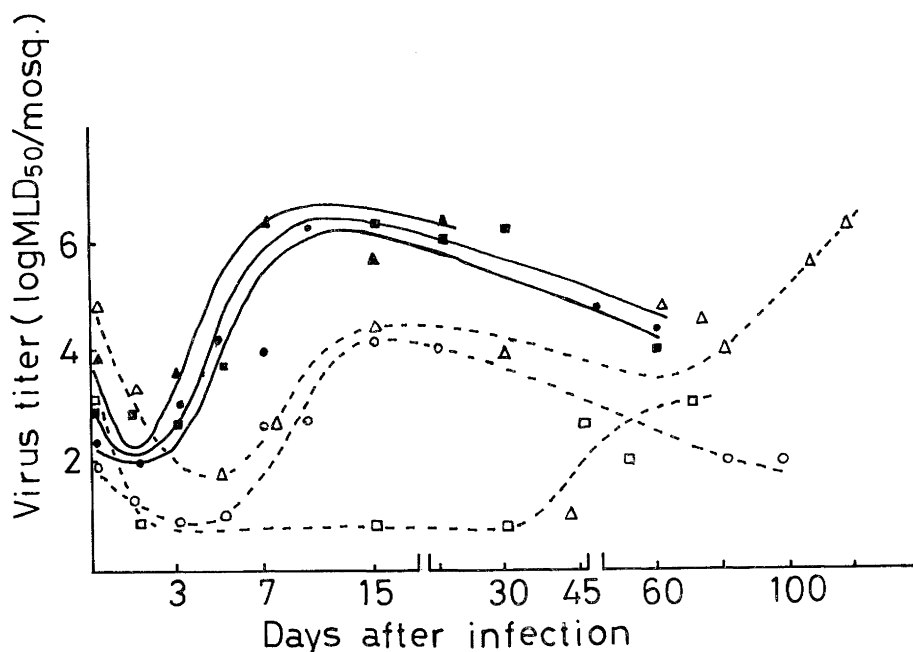


Fig. 2 Virus concentration in infected mosquitoes reared in various condition of biotron. Symbols: ●, group 2; ▲, group 3; ■, group 5; ○, group 6; △, group 9 (Exp.1); □, group 9 (Exp.2).

であったが1日目には  $10^{1.0}$  LD<sub>50</sub>/mosq. 以下となり30日間同じ状態であった。しかし、45日目に  $10^{2.7}$  LD<sub>50</sub>/mosq. となり46日目以後バイオトロンを3月中旬(平均気温10℃~14℃)の気候環境にすると蚊体内のウイルスは  $10^{3.5}$  LD<sub>50</sub>/mosq. まで増加した。

以上の実験成績から、10月上旬以後の気候環境で羽化した蚊 (group 6 及び9) の体内ウイルスの増殖は9月下旬以前の気候環境で羽化した蚊 (group 2, 3 及び5) のウイルス増殖より著しくおくれ、かつウイルス感染価も低い。この所見は通常の恒温室内で温度を変えて感染蚊を飼育した予備実験の成績とほとんど同じである。ただ、group 9 の場合のように、バイオトロン内の環境温度を上昇すると蚊体内のウイルスは急速に増殖することが新たに附加された所見である。group 9 について反復して行った実験では蚊体内のウイルスは長期間  $10^{1.0}$  LD<sub>50</sub>/mosq. 以下に保たれ45日目によりやく  $10^{2.7}$  LD<sub>50</sub>/mosq. を示した

が、これは感染ウイルス量ないし感染率が著しく低いためにみられた成績であろうと考えられた。

(3) 蛍光抗体法による蚊体内のウイルス抗原の検索

group 1, 2, 3, 5, 6 及び9について行った蚊体内のウイルス抗原の分布と気温の推移及び group 1 を除き蚊体内のウイルス増殖とを対比してそれぞれ Fig. 3, 4, 5, 6, 7 及び8に示した。

先ず Fig. 3, 4, 5, 及び6にみられる共通した所見は次のようであった。即ち、(1) ウイルス増殖の立上りと共に(吸血感染後3日目)後部中腸壁の1ヶ所ないし数ヶ所に特異蛍光を認め、日数の経過と共に蛍光は次第に中腸全壁に拡がった。(2) 吸血感染後10日ないし15日以後には唾液腺、脂肪組織、神経節及び卵巣にも特異蛍光を認めた。(3) 唾液腺の特異蛍光は50日以後でも認めたが、中腸や脂肪組織の特異蛍光は認められなくなる傾向を示した。

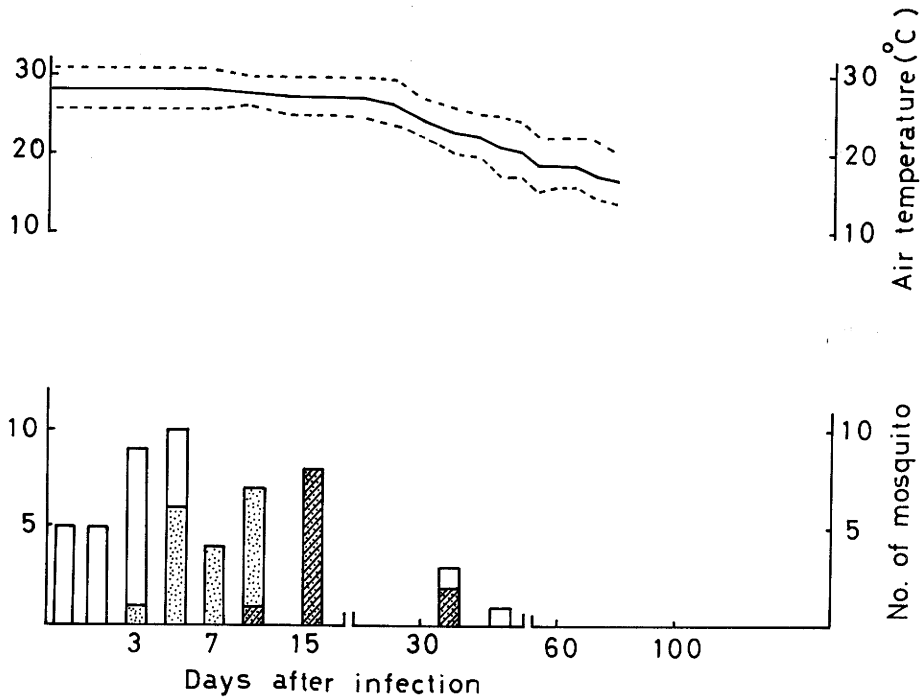


Fig. 3 Distribution of virus antigen in infected mosquitoes reared from the middle part of August to the late part of September (group 1). Remarks: □, Number of mosquito; ▨, Fluorescent antigen in midgut; ▩, Fluorescent antigen in salivary gland.

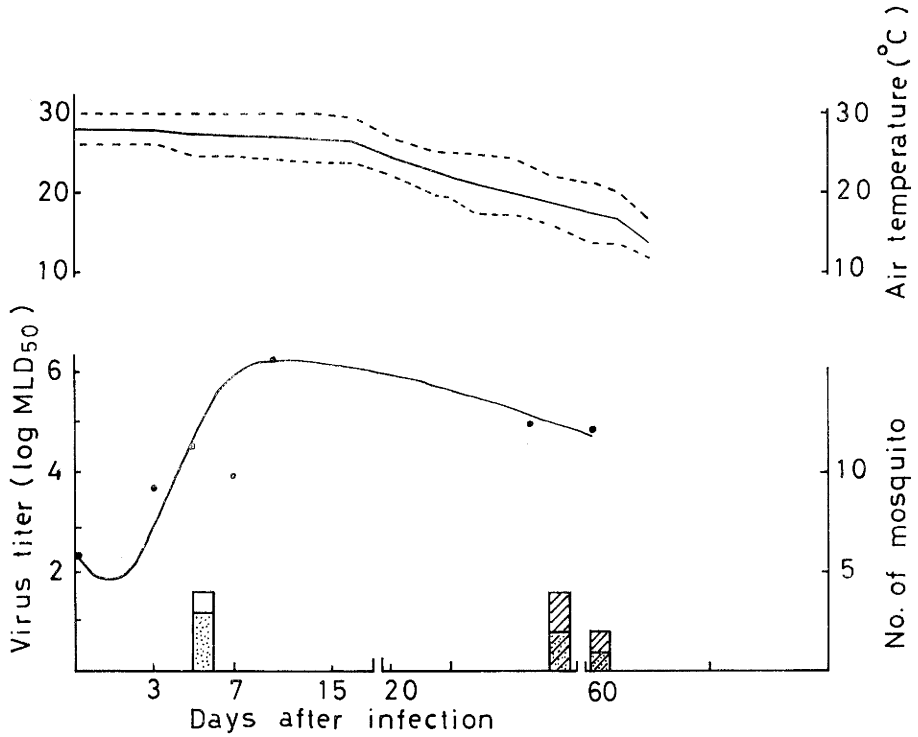


Fig. 4 Virus concentration and distribution of viral antigen in infected mosquitoes reared from the late part of August to the late part of October (group 2). Remarks: See Fig. 3.

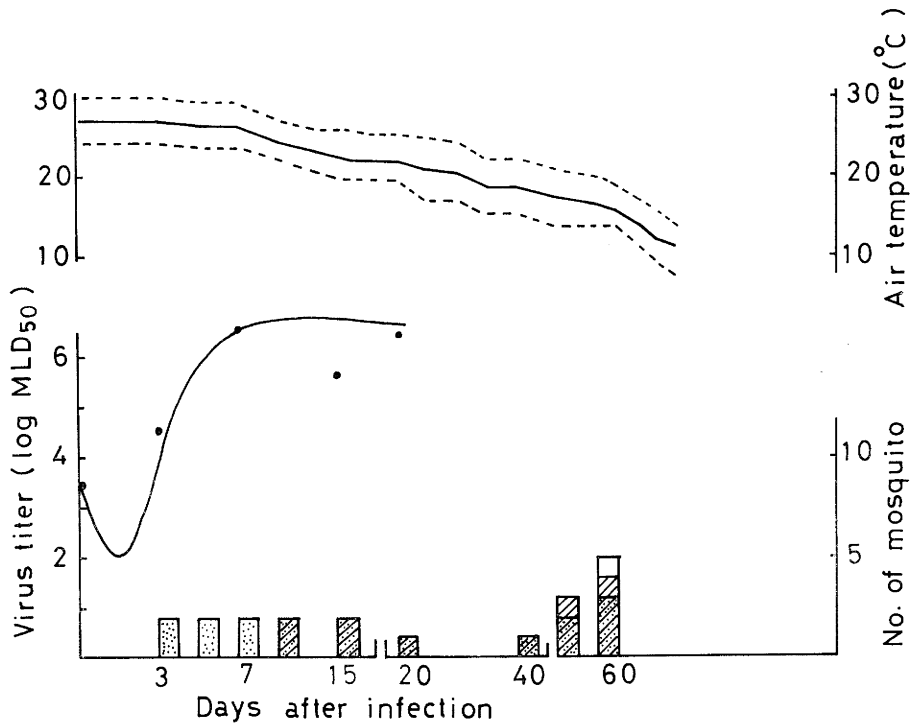


Fig. 5 Virus concentration and distribution of viral antigen in infected mosquitoes reared from the early part of September to the early part of November (group 3). Remarks: See Fig. 3.



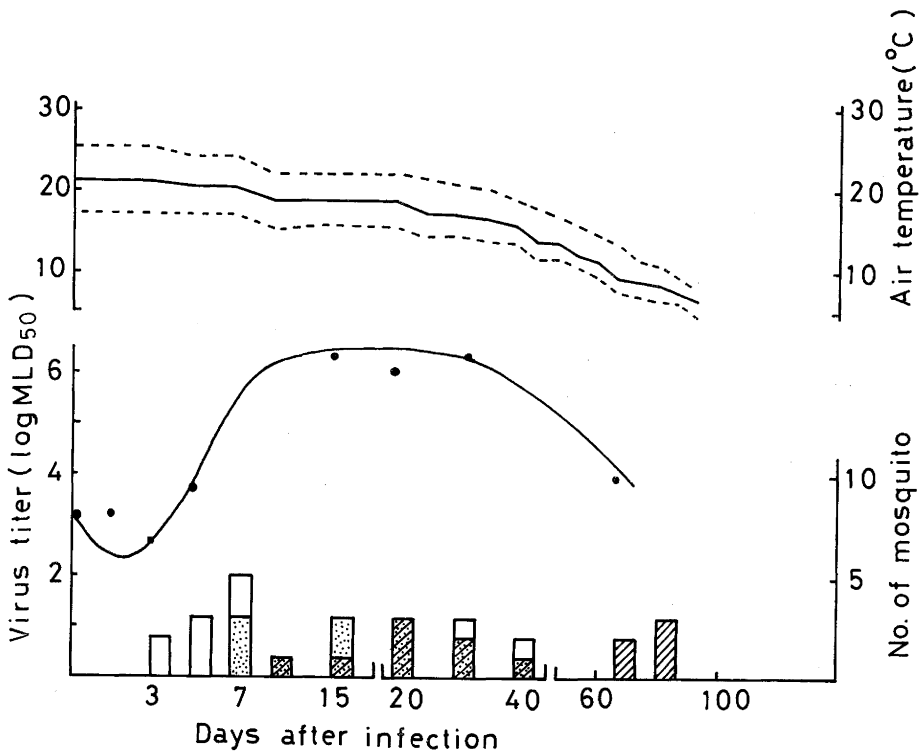


Fig. 6 Virus concentration and distribution of viral antigen in infected mosquitoes reared from the late part of September to the middle part of December (group 5). Remarks: See Fig. 3.

Fig. 7 及び 8 の場合、蚊体内のウイルス増殖の立上りは吸血感染後 7 日目であったが、既に感染後 4 日ないし 5 日目に後部中腸壁の 1 ケ所、あるいは 2~3 ケ所に特異蛍光を認めた。しかし、その後の経過では中腸壁細胞に特異蛍光の拡がりを認めず 60 日目でもなお中腸の一部に限局した蛍光をみるだけであった。そして、特に唾液腺や脂肪組織及び神経組織までウイルス抗原の拡がりを認めることはなかった。Fig. 8 の場合、60 日目にバイオトロンを 3 月中旬の環境条件とし、更らに連続的に 4 月及び 5 月の気候条件へと移行させた。気温上昇後 14 日目（吸血感染後 74 日目）に前部中腸壁に特異蛍光を認め、それと共に蚊体内のウイルス感染価も  $10^{5.0}$  LD<sub>50</sub>/mosq. を示すようになった。気温上昇後 23 日目（吸血感染後 83 日目）には脂肪組織や唾液腺にまで特異蛍光の拡がりを認めた。

以上の所見から明かなように、吸血感染時の蚊が 9 月中旬 (Sept. M. (2)) 以前に羽化したものでは蚊体内のウイルス増殖の立上りと平行して中腸後壁にウイルス抗原を最も早く認め、唾液腺や脂肪組織にも蛍光を認めるようになると蚊体内のウイルス増殖はほぼ最高値に達することが判かった。また 10 月上旬 (Oct. E. (1)) 以後に羽化した蚊の場合、特に group 9 の反復実験におけるように感染ウイルス量が低いと中腸細胞内のウイルス感染の進行は長期間に亘って抑制されるが、group 9 の初回及び反復の両実験から推察されるように感染ウイルス量または感染率の大小にかかわらず、ひとたび温度の上昇の機会があれば蚊体内のウイルスの増殖は急速に開始されるものと考えられる。

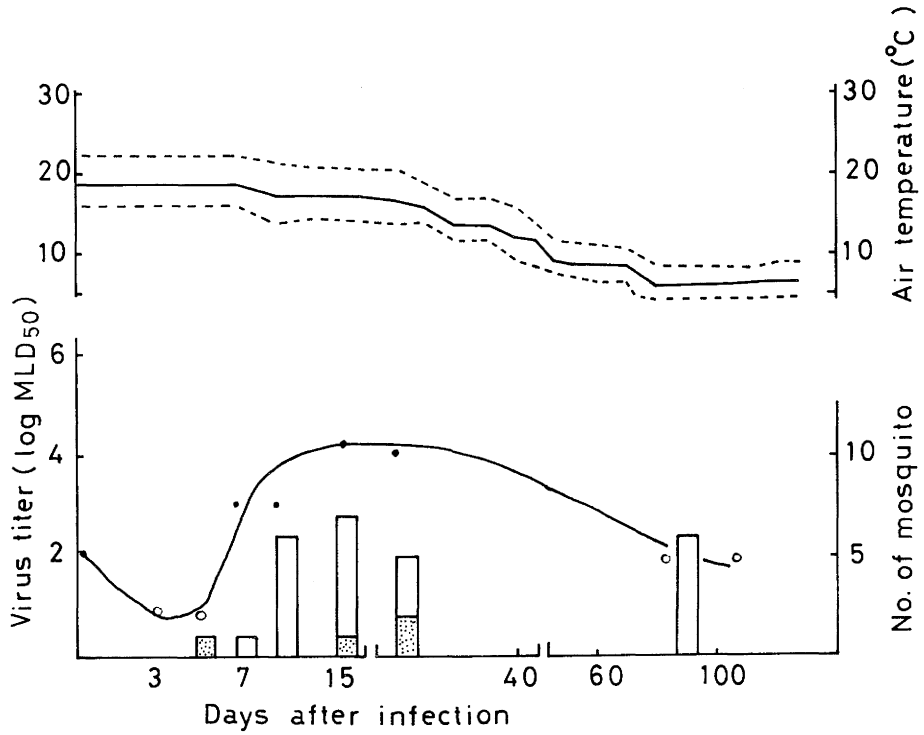


Fig. 7 Virus concentration and distribution of viral antigen in infected mosquitoes reared from the middle part of October to the middle part of January (group 6). Remarks : See Fig. 3.

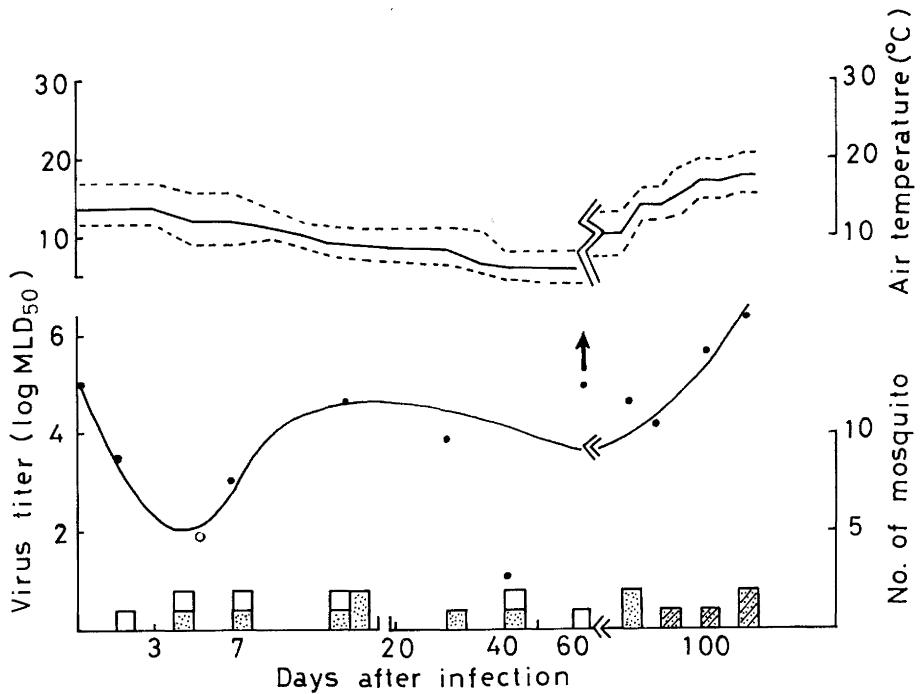


Fig. 8 Virus concentration and distribution of viral antigen in infected mosquitoes reared from the middle part of November to the early part of May (group 9, Exp. 1). Remarks : See Fig. 3.

## 考 察

LaMotte (1963) は *Culex quinquefasciatus* に  $10^{1.4} \sim 10^{1.8}$  LD<sub>50</sub>/mosq. を感染させ 26.5°C で 25 日間飼育した後、10°C に 25 日及び 47 日間飼育しても  $10^{1.9} \sim 10^{4.7}$  LD<sub>50</sub>/mosq. のウイルスを保有していたという。また、*Culex pipiens* に  $10^{3.6}$  LD<sub>50</sub>/0.03 ml のウイルスを含んだ血液を吸血させ 26.5°C で 3 日間飼育し 10°C で 61 日間保つと  $10^{1.5}$  LD<sub>50</sub>/mosq. 以下でウイルスは検出出来ないが、26.5°C に 1 日飼育すると 5 個体中 3 個体、5 日間飼育では全個体から  $10^{4.0} \sim 10^{5.0}$  LD<sub>50</sub> LD/mosq. のウイルスが検出されたと述べている。

MIFUNE (1965) は野外蚊から孵化、羽化したコガタアカイエカを用い  $10^{4.4}$  または  $10^{5.5}$  LD<sub>50</sub>/0.02 ml のウイルスを含んだ血液を吸引させ感染し、屋内及び野外の自然気候下で飼育した。1964年10月27日から翌年5月15日まで201日間に越年生残したコガタアカイエカは感受性豚にウイルス血症を起し得るという事実を提示した。

我々は予備実験で 15°C でも蚊体内のウイルスは増殖するという事実を認め、次いで出来るだけ自然界に近い環境条件で実験を行った。その結果、(1) 9 月中旬以前の環境で羽化した蚊の場合、蚊体内のウイルス増殖と平行してウイルス抗原の分布は中腸壁後部の一部から次第に中腸全壁に、更らに脂肪組織、神経細胞、唾液腺へと拡がり、(2) 10 月中旬以後の環境で羽化した蚊の場合、蚊体内のウイルス増殖はおくれ、ウイルス感染価も低く、かつウイルス抗原は中腸壁の一部に局限して認められる。しかし、ひとたび気温が上昇するとウイルス増殖は急速に行われ、ウイルス抗原も脂肪組織、唾液腺へと及んで行く。以上の 2 つの感染の様相が観察された。

上記の所見を、先ず蚊体内におけるウイルスの感染

価と環境温度との関係だけの観点からみれば我々の今回の実験は低温下でも蚊体内のウイルスは存続し得るという LaMotte (1963) 及び MIFUNE (1965) の実験成績の追認の域を出ない。しかし、出来るだけ自然界に近い条件で特に 8 月中旬以後の種々の気候環境下で孵化、羽化したコガタアカイエカの体内におけるウイルスの増殖及びウイルス抗原の分布が自然界に近い環境条件の推移によってどのような修飾をうけるかという観点からは上記の(1)及び(2)の所見は新たに重要な意義を提示したものと考えることが出来る。

LaMotte (1960) はウイルス感染後日を追って感染蚊の腹部、胸部、頭部のウイルス感染価を検査し、最も早く、かつ高いウイルス感染価は腹部にみられ、次いで胸部、頭部の順であったという。DOI et al.

(1967) は蛍光抗体法で感染蚊体内のウイルス抗原の分布を検査し、感染初期は中腸、脂肪組織に、後期には唾液腺、胸部及び腹部に特異蛍光を認め、腹部では感染の日数が経つと共に蛍光が認められなくなることを述べている。LaMotte (1960) 及び DOI et al. (1967) の所見は我々の実験成績では (1) の場合に相当して認められた。

MAUNGMAN et al. (1972) はコガタアカイエカ及び *Culex fuscocephala* について  $2.6 \times 10^{3.0}$  PFU/0.3ml のウイルス血症にあるヒナを吸血させ 25°C ないし 27°C での蚊体内のウイルス増殖を検査した。その際、最低感染量を測定し 8PFU/mosq. で感染が成立し 10 日以内に  $10^{5.0}$  PFU/mosq. に達することを明かにした。従って、本実験に使用した教室継代保存のコガタアカイエカとは生態学的に違いがあるとも考えられる野外蚊を使用し、MAUNGMAN et al. の成績を参照して最低感染量を求めた後、今後の実験を進める必要があるものとする。

## 結 言

長崎地方における最近 5 年間の毎日の気温、湿度、日照時間を平均し、5 日ごとのプログラムを作成して、1 年間の気候環境を再現したバイオトロンでコガタアカイエカを飼育し、日脳ウイルスの実験的感染を行った、実験成績を要約すると次のようである。

(1) 蚊体内におけるウイルスの増殖は環境温度が低くなるほど遅く、かつウイルス量も低下するが、15°C

でもなお感染蚊体内のウイルスは増殖しウイルスが検出される。

(2) 8 月上旬から 10 月上旬の気候環境下で羽化した雌成虫は吸血能を有しているが、10 月中旬以後 11 月中旬までの気候条件では羽化しても吸血能がなく、11 月上旬に孵化したものは羽化しなかった。

(3) 9 月下旬以前の気候環境で吸血感染したものは

蚊体内のウイルス増殖も3日ないし5日で立上りを示し7日ないし10日で最高に達した。蛍光抗体法によるウイルス抗原も中腸後壁から次第に拡大し、ウイルス量が最高に達した頃には神経細胞や唾液腺内にもウイルス抗原が証明された。

(4) 10月中旬以後の気候環境で吸血感染させたものは蚊体内のウイルス増殖の立上りはおくれ5日ない

し7日目となり、15日目で最高に達するが、そのウイルス量は9月下旬以前のものより著しく低い。またウイルス抗原は中腸にのみ局限して検出されたが、温度の上昇と共にウイルス量も増加し、ウイルス抗原も腹部と胸部中腸から脂肪組織及び唾液腺への拡がりとして認められた。

## 文

## 献

(1) Doi, R., Shirasaka, A. and Sasa, M. : The mode of development of Japanese encephalitis Virus in the mosquito *Culex tritaeniorhynchus summorosus* as observed by the fluorescent antibody technique. Jap. J. Exp. Med., 37 (3), 227-238, 1967.

(2) Gresser, I., Hardy, J. L. and Scherer, W. F. : The growth curve of Japanese encephalitis virus in the vector mosquito of Japan, *Culex tritaeniorhynchus*. Jap. J. Exp. Med., 28(4), 343-348, 1958

(3) Hale, J. H., Colless, D. H. and Lim, K. A. : Investigation of the Malaysian form of *Culex tritaeniorhynchus* as a potential vector of Japanese B encephalitis virus on Singapore Island. Ann. Trop. Med. & Parasitol., 51, 17-25, 1957

(4) Hurlbut, H. S. : The transmission of Japanese B encephalitis by mosquitoes after experimental hibernation. Am. J. Hyg., 51, 265-268, 1950.

(5) 川村明義：微生物検査必携；厚生省監修，日本公衆衛生協会，695-771，東京，1967。

(6) LaMotte, L. C., Jr. : Japanese B encephalitis virus in the organs of infected mosquitoes. Am. J. Hyg., 72, 73-87, 1960.

(7) LaMotte, L. C., Jr. : Effect of low environmental temperature upon Japanese B encephalitis virus multiplication in the mosquito. Mosquit. News, 23 (4), 330-335, 1963.

(8) Muangman, D., Edelman, R., Sullivan, M. J. and Gould, D. J. : Experimental transmission of Japanese encephalitis virus by *Culex fluscocephala*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 21 (4), 482-486, 1972.

(9) Mifune, K. : Transmission of Japanese encephalitis virus to susceptible pigs by mosquito of *Culex tritaeniorhynchus* after experimental hibernation. Endem. Dis. Bull. Nagasaki., 7 (3), 178-197, 1965

(10) 奈須壮兆，北岡正見，高橋三雄：コガタアカイエカにおける日本脳炎ウイルスの分布に関する電子顕微鏡的研究，ウイルス 16 (6)，35-36，1966。

(11) Reed, L. J. and Muench, H. : A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am. J. Hyg., 27, 493-497, 1938