

沖縄におけるコガタアカイエカ・シロハシイエカ混合群からの日本脳炎ウイルス分離について

疫学室 宇良宗輝・仲地国夫
衛生動物室 岸本高男・比嘉ヨシ子
下謝名和子・安里龍二

まえがき

日本脳炎(日脳)ウイルスは、鳥類、哺乳類、節足動物(特に *Culex tritaeniorhynchus*)等巾広い感染宿主域をもつことが判明している。沖縄では、米陸軍、海軍、(それぞれ1945)同海軍(1946 T.W. Simpsonら)によって、はじめて蚊族からの日脳ウイルス分離が試みられているが分離に用いるマウスの供給不足、凍結設備の不備等で、結果は失敗に終わったことが報告²⁾されている。その後Herlbutら(1960)³⁾、宇良ら(1971)⁴⁾による報告があり、日脳の主流期と目される5月から10月の間で分離されている。

われわれは、1972年から1973年にかけて、厚生省の委託を受け、蚊族の発消長を調べるとともにコガタアカイエカ、シロハシイエカ混合群を用いて、日脳ウイルス分離を行なった。一方日脳ウイルス越冬解決への手掛かりを得る目的で、冬期でも蚊の採集される沖縄本島の立地条件をとり入れ、1973年以来長崎大学熱帯医学研究所と提携して越冬蚊或は春先の蚊で、日脳ウイルス分離を継続して調査してきたので、その概況を包括して報告する。

調査方法

1) 蚊採集地 : 蚊の採集は、石川市字石川、名護市字為又(1972~1975)、恩納村字安富祖(1975)の3カ所で、定期、不定期で行なった。

2) 採集 : 蚊は、ドライアイス(時にはD法と略)、ライト・トラップ(時にはL法と略)で採集し、ドライアイスで蚊を誘引する場合は、原則として、日没30分前から、日没後1~2時間にわたって採集した。ライト・トラップは一調査箇所あたり1~2基を用い、日没から翌朝日の出まで作動して、豚舎で蚊の採集を行なった。気象条件が悪く、蚊の取れない日は、当日回収した。

3) 年次別採集地、採集期間および採集方法

1972年 : 石川および名護で7~11月にL法。

1973年 : 石川では、1~5月にDおよびL法、名護では5~10月までL法。

1974年 : 石川では1~4月にD、L法、名護では、1, 3, 5, 6, 10月にD, L法。

1975年 : 石川で1~3月および恩納で3~5月にD, L法で蚊を採集し、名護では4~5月にL法で採集した。

4) 蚊の分類 : 蚊は、クロロホルム、炭酸ガスで軽く麻酔するか、或は-80℃で凍結して、動きを止めてから分類した。日脳ウイルス分離には、吸血、未吸血の *Culex tritaeniorhynchus-vishnui* の雌成蚊を用いた。

5) 接種材料の調整 : 蚊乳剤は、1個体あたり0.02 ml~0.04 mlの希釈液(0.75% Bovine plasma albumin 加0.01 MBS PH 7.4にペニシリン 200 μ /ml、硫酸ストレプトマイシン 200

$\mu\text{g}/\text{ml}$ を加えたもの)を加え、テフロンホモジナイザーを用いて調整した。乳化後、4℃に15～30分間放置後冷凍遠心器を用いて10,000 rpm30分遠心し、遠心上清を日脳ウイルス分離材料とした。但し1973年3月から10月までは、冷凍遠心器の故障で、普通遠心器を用いて3,000 rpm5分で遠心した。

6) 日脳ウイルス分離と同定法

ウイルス分離は、生後2～4日令のDD系およびICR系(1974年以降)マウスを用い、1プールあたり1腹仔8匹の乳のみマウスの脳内に、0.02 ml あて接種し、14日間観察した。

日脳ウイルスの同定は、発症ウイルスについては2～3代断代して蔗糖アセトン抗原を作成し、標準日脳株(JaGAR #01)の5回腹腔接種で得られたマウス免疫血清で、HI反応を行なった。

調査結果

日脳ウイルス分離に供した、コガタアカイエカシロハシイエカ混合群雌成蚊数は、年次別、採集方法別等で表1～4に示した。すなわち1972年(表-1)は、L法で石川(1,708個体)および名護(6,610個体)で7月中旬から11月中旬まで採集された8,318個体、103プールについてウイルス分離を行ない、石川では23プール中5株、名護では80プール中1株の日脳ウイルスが分離された。石川での分離は、8月29～30日、1株、9月26～27日2株、10月3～4日、同20～21日にそれぞれ1株分離された。名護では、11月25～26日に分離された。

1973年(表2)は、石川で1月下旬から、5月上旬までにD、L法で採集された2,467個体、30プールでは日脳ウイルスは、分離されなかった。名護では、5月中旬から10月下旬まで、と畜場採血と併行して、L法で採集された2,846個体、35プールで5株の日脳ウイルスが分離された。6月6～7日2株、6月21～22日および7月13～

14日にそれぞれ1株であった。

1974年(表3)は、石川で1月中旬から4月下旬までにD法で採れた759個体とL法で採れた611個体20プールを供試したが、日脳ウイルスは分離されなかった。名護では1月中旬から10月上旬までに、かなり非定期的にD、L法で採集された946個体15プールの蚊群から3株の日脳ウイルスが分離された。すなわち5月13～14日1株、6月10～11月に2株分離された。

1975年(表4)石川で2月上旬から3月上旬までに採れた17個体(2プール)と、3月上旬から5月下旬までに恩納でとれた759個体(20プール)では、日脳ウイルスは分離されなかった。名護では4月中旬から5月下旬にL法で採集された1,694個体41プール中5月12～13日の蚊群で1株分離された。

以上のことを表5でまとめると、日脳ウイルスは、5月から10月(12月は実施していない)の間で分離され、1月から4月までは分離されていない。分離率を、分離数と蚊のプール比でみると5月から10月までの分離率は、それぞれ8.0、98.5%、8.3%、3.4%、3.6%、13.0%で、6月は最も高い率を示した。

考察

沖縄では、1～2月でも、暖い日が続くことがあって、このような日には、夕方蚊の群飛(Swar ming)が、しばしば観察される。その頃、野外では、多数の蚊がドライアイスで誘引される。一方ライト・トラップで採集される蚊は殆んど吸血している。伊波(1971)¹⁾によれば沖縄のコガタアカイエカは、周年 gonoactivity があって、吸血、産卵を繰返している。

このような状況から判断すると、沖縄では、1月から4月にかけて採れるコガタアカイエカでも日脳ウイルスの分離は可能と思われるが、今日までのところ、この期間での日脳ウイルス分離例は

ない。

と殺豚血清を用いて、ウイルス分離を行なった最近の調査では(宇良 1975)⁵⁾、日脳ウイルスは、5月から9月までに分離され、4月、10月での分離はまれである。また、豚における最近の流行形態は、本島北部→中部→南部と変化し、数年前とは異なった様相を呈している。

1973年から1974年までは、石川の湿原地帯(かつての水田)で、冬場でも多数のコガタアカイエカが採集されたが、1975年は、ハマダラカ属ヤブカ属の多い割りには、コガタアカイエカの採れない状態が続き、蚊の採集場所としては不適と思われた。従って採集場所を、水稻作付が維持されている恩納村字安富祖に変更した。ところが、同部落では、家畜の飼育頭数は減少し、20数頭の豚が飼育されているのみで、他に家畜はみられない。名護市字為又は、那覇から60余料の距離にあって、連日通うわけにはいかない。従って、ドライアイスによる冬場の蚊の採集は、石川市或は恩納村で行なわざるを得なかった。

実験的には、日脳感受性豚は微量のウイルスでウイルス血症を伴うが、抗体保有豚では大量のウイルスを接種されても、ウイルスが検出されないことがある(宇良ら 1971)⁶⁾と殺豚では、年によっては1月から4月の間に2ME感受性抗体の検出されることがあって、新鮮感染を示唆するものであるが、この調査では、1月から4月までは日脳ウイルスは分離されていない。その理由としては、採集蚊の絶対数が少ないことであろう。その他に、採集地周辺で飼育されている動物相、その中でも特に豚の飼育規模、飼育形態、或はコガタアカイエカの発生源等の急激な変化等が挙げられる。また微量ウイルスの検出には、乳のみマウスでのメクラ継代が必要と思われる。要するに、流行閉期の日脳ウイルス分離は、蚊の吸血源および発生源に永續性のある地域(名護以北)で、調査されなければならないものと思われる。

要 約

豚舎或は野外で、ライト・トラップおよびドライアイスを用いて、石川市字石川、名護市字為又恩納村字安富祖で、1972年から1975年にわたって、定期、不定期に蚊を採集し、日本脳炎ウイルス分離を試み、次の結果を得た。

- 1) 吸血、未吸血のコガタアカイエカ-シロハシイエカ混合群 17,641 個体の雌成蚊、244 プールから 13 株の日脳ウイルスが分離された。
- 2) 日脳ウイルスは、5月中旬から 10 月下旬までの間に分離され、1月から4月までは分離されなかった。(12月は実施していない)
- 3) 日脳ウイルス分離数と蚊のプール比で、分離率をみると、5月 8.0%、6月 38.5%、7月 8.3%、8月 3.4%、9月 3.6%、10月 13.0%であった。

参 考 文 献

- 1) 伊波茂雄：沖縄本島に於ける日本脳炎の疫学と関連した、蚊族の吸血嗜好性及び季節的消長に関する研究 長崎大学熱帯医学 12(4) : 143 - 168 1971.
- 2) Hamon, W. W. D., & Tigertt, W. D. Isolations of Japanese B Encephalitic Virus from naturally infected *Culex tritaeniorhynchus* Collected in Japan. *Am. J. Hyg.* Vol. 50 : 51 ~ 56 1949.
- 3) Hurlbut, H. S. & Nibley C : Virus isolations from mosquitoes in Okinawa : *J. Med. Ent.* Vol. 1 No. 1 78 - 82, 1964.
- 4) 宇良宗輝, 比嘉弘正, 野原永宏 : 1971年における沖縄の日本脳炎流行状況について : 沖縄県公害衛生研究所報 7 110-128, 1973.
- 5) 宇良宗輝, 比嘉弘正, 野原永宏, 宮城隆一 : ヒトの疑似日本脳炎発生地周辺における家畜の日脳ウイルスに対する抗体の保有状況及びウイ

6) 宇良宗輝 : 昭和50年 沖縄におけるブタの

Table 1 Japanese Encephalitis virus isolation from *Culex tritaeniorhynchus-vishnui* complex, Okinawa, 1972.

Collected Areas	Date of collection	Collected by:		* No. of mosquitoes tested **	No. of pools	No. of virus isolated
		Light traps	Dry ice			
Ishikawa	11-12 July	346	*** N.D	346	4	0
"	18-19 July	62	"	62	1	0
Nago	3- 4 Aug.	200	"	200	2	0
Ishikawa	8- 9 Aug.	124	"	124	2	0
Nago	9-10 Aug.	800	"	800	8	0
Ishikawa	15-16 Aug.	13	"	13	1	0
Nago	24-25 Aug.	565	"	565	6	0
Ishikawa	29-30 Aug.	52	"	52	1	1
Nago	31 Aug.-1 Sept.	200	"	200	4	0
"	5- 6 Sept.	211	"	211	5	0
Ishikawa	12-13 Sept.	17	"	17	1	0
Nago	13-14 Sept.	1,555	"	1,555	16	0
"	19-20 Sept.	1,476	"	1,476	15	0
Ishikawa	19-20 Sept.	511	"	511	6	0
"	26-27 Sept.	200	"	200	2	2
Nago	27-28 Sept.	555	"	555	6	0
Ishikawa	3- 4 Oct.	200	"	200	2	1
Nago	11-12 Oct.	136	"	136	3	0
"	18-19 Oct.	250	"	250	5	0
Ishikawa	20-21 Oct.	133	"	133	2	1
"	25-26 Oct.	50	"	50	1	0
Nago	25-26 Oct.	263	"	263	3	1
"	1- 2 Nov.	140	"	140	3	0
"	8- 9 Nov.	49	"	49	1	0
"	15-16 Nov.	210	"	210	3	0
Total		8,318		8,318	103	6

Note * Dry ice collection was made at the first days of each dates.

** Live adult female.

*** N.D: Not done.

Table 2 Japanese Encephalitis virus isolation from *Culex tritaeniorhynchus-vishnui* complex, Okinawa, 1973.

Collected Areas	Date of collection	Collected by:		No. of mosquitoes	No. of pools	No. of virus isolated
		Light traps	Dry ice			
Ishikawa	29-30 Jan.	0	8	8	1	0
"	30-31 Jan.	33	17	50	1	0
"	31 Jan.-1 Feb.	79	2	81	1	0
"	5- 6 Feb.	553	105	658	7	0
"	9-10 Feb.	0	5	5	1	0
"	15-16 Feb.	382	14	396	5	0
"	2- 3 Apr.	470	2	472	5	0
"	10-11 Apr.	185	25	210	2	0
"	19-20 Apr.	270	5	275	3	0
"	7- 8 May	312	N.D	312	4	0
Nago	18-19 May	93	"	93	2	0
"	6- 7 Jun.	379	"	379	4	2
"	14-15 Jun.	90	"	90	2	0
"	21-22 Jun.	110	"	110	1	1
"	28-29 Jun.	238	"	238	3	0
"	4- 5 Jul.	136	"	136	2	0
"	13-14 Jul.	400	"	400	4	1
"	23-24 Jul.	38	"	38	1	0
"	2- 3 Aug.	487	"	487	5	0
"	12-13 Sept.	424	"	424	5	0
"	3- 4 Oct.	425	"	425	5	0
"	24-25 Oct.	26	"	26	1	0
Total		5,130	183	5,313	65	4

Table 3 Japanese Encephalitis virus isolation from *Culex tritaeniorhynchus-vishnui* complex, Okinawa, 1974.

Collected Areas	Date of collection	Collected by:		No. of mosquitoes tested	No. of pools	No. of virus isolated
		Light traps	Dry ice			
Nago	15-16 Jan.	63	N.D	63	1	0
Ishikawa	24-25 Jan.	3	0	3	1	0
"	27-28 Jan.	0	19	19		
"	29-30 Jan.	74	110	184	2	0
"	31 Jan.-1 Feb.	23	0	23	1	0
"	1- 2 Feb.	22	0	22	1	0
"	15 Feb.	N.D	16	16	1	0
"	16 Feb.	"	46	46	1	0
"	17 Feb.	"	85	85	1	0
"	18 Feb.	"	156	156	2	0
Nago	19-20 Feb.	56	19	75	1	0
Ishikawa	21-22 Feb.	N.D	9	9	1	0
"	22-23 Feb.	265	167	432	4	0
"	2- 3 Mar.	38	6	44	1	0
Nago	4- 5 Mar.	148	78	226	3	0
Ishikawa	4- 5 Mar.	N.D	93	93	1	0
"	22 Mar.	"	8	8	1	0
"	25 Mar.	"	44	44		
"	20-30 Mar.	186	0	186	2	0
Nago	8- 9 May	91	N.D	91	1	0
"	13-14 May	143	"	143	2	1
"	21-22 May	38	"	38	1	0
"	27-28 May	103	"	103	2	0
"	5- 6 Jun.	65	"	65	1	0
"	10-11 Jun.	122	"	122	2	2
"	4- 5 Oct.	20	"	20	1	0
Total		1,460	856	2,316	35	3

Table 4 Japanese Encephalitis virus isolation from *Culex tritaeniorhynchus-vishnui* complex, Okinawa, 1975.

Collected Areas	Date of collection	Collected by:		No. of mosquitoes tested	No. of pools	No. of virus isolated
		Light traps	Dry ice			
Ishikawa	4- 5 Feb.	1	0	1	1	0
"	7- 8 Feb.	0	5	5		
"	24-25 Feb.	0	6	6	1	0
"	4- 5 Mar.	0	5	5		
Onna	7- 8 Mar.	0	5	5	1	0
"	9-10 Mar.	5	5	10		
"	12-13 Mar.	230	113	343	7	0
"	14-15 Mar.	18	2	20	1	0
"	17-18 Mar.	9	43	52	1	0
"	18-19 Mar.	11	27	38	1	0
"	24-25 Mar.	1	20	21	1	0
"	13-14 Apr.	12	N.D	12	1	0
Nago	13-14 Apr.	41	"	41	1	0
"	20-21 Apr.	132	"	132	3	0
Onna	20-21 Apr.	17	"	17	1	0
"	29-30 Apr.	68	"	68	2	0
Nago	29-30 Apr.	300	"	300	6	0
"	12-13 May	97	"	97	2	1
Onna	12-13 May	25	"	25	1	0
"	20-21 May	57	"	57	1	0
Nago	20-21 May	143	"	143	3	0
"	27-28 May	205	"	205	4	0
Onna	27-28 May	91	"	91	2	0
Total		1,463	231	1,694	41	1

Table 5. Japanese Encephalitis virus isolation from Culex tritaeniorhynchus-vishnui Complex Okinawa, 1972-1975.

	1972		1973		1974		1975		Total	
	No. of Mosq. tested	No. of Pools virus Isolated	No. of Mosq. tested	No. of Pools virus Isolated	No. of Mosq. tested	No. of Pools virus Isolated	No. of Mosq. tested	No. of Pools virus Isolated	No. of Mosq. tested	No. of Pools virus Isolated
January	N D		139	3	292	5	0	N D	431	8
February	"		1,059	13	841	12	0	12	1,912	26
March	"		N D		415	6	0	494	909	19
April	"		957	10	186	2	0	570	1,713	26
May	"		405	6	375	6	1	618	1,398	25
June	"		817	10	187	3	2	N D	1,004	13
July	408	5	574	7	N D			"	982	12
August	1,954	24	487	5	"			"	2,441	29
September	4,525	51	424	5	"			"	4,949	56
October	1,032	16	451	6	20	1	0	"	1,503	23
November	399	7	N D		N D			"	399	7
December	N D		"		"			"		
Total	8,318	103	5,313	65	2,316	35	3	1,694	17,641	244
		6		4						1