

## 日本脳炎弱毒S-株ワクチンの豚死産予防試験

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	伊藤, 宏 ほか13名,
巻/号	27巻7号
掲載ページ	p. 331-334
発行年月	1974年7月

も見出せることがわかった。また、その分布状況についても、右肺に多く、尖葉、心葉に多く見られた。人における吸引性肺炎の代表は石灰粉末などの吸引による珪肺症であるが、有機物としてのモミガラや木粉の吸引による農夫病、キコリ病などが、STOFER (1960)<sup>3)</sup>によって総説されている。今後、家畜における一連の記載も必要となる。

現在、豚を初め家畜の飼養形態は、おのおの動物の生理機構を度外視する傾向も強まり、これまで問題にならなかった疾病も増えている。今回は例数も十分といえなかったが、さらに微生物学的見地からの考察を加えての研究が要求されよう。

### ま と め

豚の呼吸器疾患に粉餌給与が関与するかどうかについて

て調査、検索した結果、一応、粉餌の誤嚥または吸引が原因となる肯定的結果は得られなかった。

豚の吸引性肺炎病巣の一般的状況が把握され、記述された。

終わりに、本研究は第74回日本獣医学会で講演された。また、東京農工大学山本脩太郎前教授の指導を得た。ここに謝意を表す。なお、この研究の一部は昭和46年度文部省科学研究費の補助によったことを記す。

### 文 献

- 1) JOEST, E.: *Handbuch Spez. path. Anat. der Haustiere*, 3. Auflage, Bd. 7, pp. 187, Verlag Paul Parey (1962).
- 2) SMITH, F. M. & HAYWARD, A.H.S.: *J.Comp. Path.* 79, 237 (1969).
- 3) STOFER, A.R.: *Path. Microbiol.*, 24, 107 (1961).
- 4) WHITE, E. G.: *J.Path. Bact.*, 51, 458 (1940).

## 日本脳炎弱毒 S<sup>-</sup> 株ワクチンの豚死産予防試験

伊藤 宏\* 丸山典彦\* 丸山成和\* 山下武彦\* 鶴水 隆\* 越後貫正夫\* 松井清治\*  
布施絃一\*\* 荒木 宏\*\* 西 芳秀\*\* 山下正道\*\* 高島聖二\*\* 桜井靖彦\*\* 大竹清介\*\*

(昭和48年1月29日受付)

Prevention of Swine Stillbirth with Attenuated S<sup>-</sup> Strain Japanese Encephalitis Virus Vaccine  
HIROSHI ITO, N. MARUYAMA, S. MARUYAMA, T. YAMASHITA, T. TSURUMIZU, M. Ogonuki, S. MATSUI  
(Serum Research Institute, Prefecture of Chiba), Y. FUSE, H. ARAKI, Y. NISHI, M. YAMASHITA,  
S. TAKABATA, Y. SAKURAI and S. Otake (Eastern Livestock Hygiene Service  
Center, Prefecture of Chiba)

### SUMMARY

When inoculated with attenuated S<sup>-</sup> strain Japanese encephalitis virus vaccine, SPF pigs 1 month old presented no abnormal clinical signs, but retained antibody for a long time and resisted challenge with the high virulent AS-6 field strain. When inoculated with the same vaccine, pregnant SPF sows exhibited no clinical symptoms either. Autopsy on them revealed no abnormal fetuses and no virus was recovered from them.

In a field trial of this vaccine, the frequencies of occurrence of dead fetuses and sows giving birth to abnormal fetuses were lower in sows inoculated once or twice with this vaccine than in those inoculated with no vaccine. In conclusion, this vaccine is safe and well immunogenic for piglets and pregnant sows, and effective for the prevention of stillbirth to be caused by Japanese encephalitis virus in swine.

### ま え が き

日本脳炎(日脳)ウイルスに妊娠豚が感染した場合、死産をおこすことは、死産の胎児よりの日脳ウイルス分離、人工感染試験など、一連の研究により解明されている。しかも日脳ウイルスによる死産の多発は、わが

国の養豚に極めて重要な問題で、従来この予防対策として、不活化ワクチンが使用されてきている。このワクチンの効果について、接種量や接種回数など、一応の結論がなされ、より経済的、省力的なワクチンが要望されてきた。

われわれは、農林省家畜衛生試験場よりS<sup>-</sup>株の分与を受け、さらにクローニングしたウイルスで、生ワクチン

\* 千葉県血清研究所 (千葉縣市川市国府合2-6-1)

\*\* 千葉県東部家畜保健衛生所 (千葉県東金市川場1105-2)

を試作した。このワクチンについて基礎試験をおこない、有効性と安全性が確認されたので、さらに野外試験を千葉県東部家畜保健衛生所の管轄地区内で実施したので、これらの成績について報告する。

材料および方法

1) 豚：当研究所で生産されたランドレース種の SPF 豚で、30 日齢の子豚、および胎齢 40 日齢の妊娠豚を使用した。

2) 使用ウイルス株：農林省家畜衛生試験場より分与を受けたウイルスを牛腎初代培養細胞を用い、30°C で 7 日間培養し、その感染培養液を牛腎初代培養細胞を用いて限界希釈法により回収したウイルスを試作ワクチン作製の原株とした。なお、S<sup>-</sup> 株の原株である相良株、攻撃ウイルス株として AS-6 株を同場より分与を受け、基礎試験に使用した。

3) 弱毒ワクチン：日本脳炎抗体陰性の子牛非働化血清を 10% 添加したラクトアルブミンアール液 (LE 培地) で増殖させた牛腎初代培養細胞に、ワクチン原株ウイルスを接種し、30°C で 3 時間吸着したのちイーストエキストラクト 0.1%、牛アルブミンフラクション V 0.11% 添加した LE 培地を加え、35°C で 5~7 日間培養した培養液を採取し、メンブランフィルターで濾過後、分散媒 (ラクトース 10%、牛アルブミンフラクション V 0.8%) を加え、小びんに分注して凍結乾燥した。なお、このワクチンのウイルス力価は 10<sup>6.5</sup>TCID<sub>50</sub>/ml で、同ワクチンを野外試験に使用した。

4) ウイルス力価の測定：ウイルス材料を 10 倍段階希釈し、各希釈液を ESK 細胞培養試験管、あるいは哺乳マウス脳内に接種し、培養細胞は 30°C 7 日間回転培養し、細胞変性効果ならびに培養液の HA により、マウスは 2 週間観察して、KÄRBAR 法<sup>6)</sup> によって TCID<sub>50</sub> および LD<sub>50</sub> をもとめた。

5) HI 抗体価測定：採血は耳または頸静脈より濾紙法により、血清材料をカオリン処理し、抗原は CLARK & CASALS 法<sup>7)</sup> に準じて調製した薬検中山株を用い、HI 抗体価測定は常法に従った。

実験成績

I. 基礎試験

1) 子豚に対する安全性

1 カ月齢の 6 頭の子豚に、S<sup>-</sup> 生ワクチンを 2 ml、4 週間隔で 2 回接種した。その結果は図 1 に示すごとく、いずれの豚においても、体温の上昇、臨床的所見、およびウイレミーは認められなかった。対照として、1 頭の豚に相良株を 2 ml (10<sup>7.5</sup>TCID<sub>50</sub>/ml) 接種したが、接種後 3~4 日目に 3.0, 1.2 (LD<sub>50</sub>/0.01 ml) のウイレミーが認められ、4 日目に一過性の発熱も認められた。

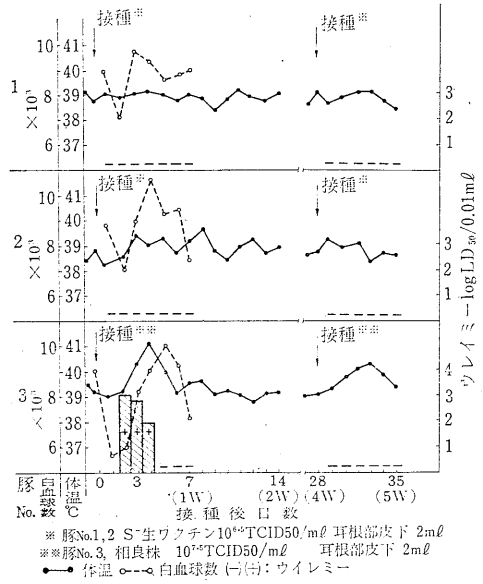


図 1 S<sup>-</sup> 生ウイルスワクチン接種による豚の反応 (SPF 30 日齢 ランドレース)

2) 妊娠豚に対する安全性

胎齢 40 および 42 日の 2 頭の妊娠豚に、S<sup>-</sup> 生ワクチン (含有ウイルス量 10<sup>6.5</sup>TCID<sub>50</sub>/ml) を 5 ml 1 回接種し、その後 2 週間にわたり、一般臨床的所見を観察し、接種後 1 週間、ウイレミーの有無をしらべたが、すべて陰性であった。観察終了後の解剖所見でも、2 頭の妊娠豚の胎児は、18 頭全例が生存し、異常は認められず、こ

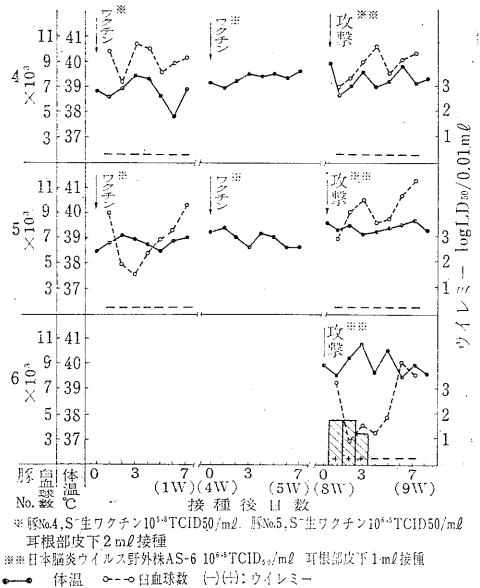


図 2 S<sup>-</sup> 生ウイルスワクチン接種による豚の感染防御試験 (SPF 30 日齢ランドレース)

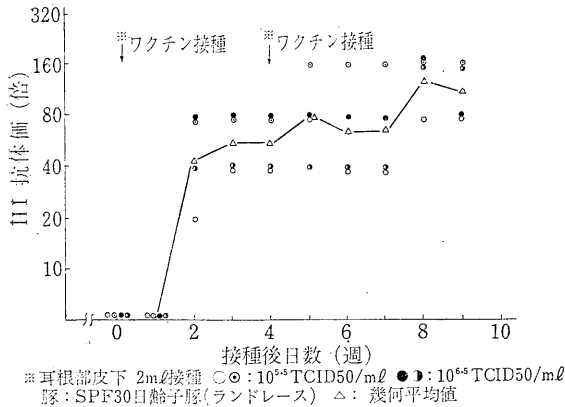


図3 S<sup>-</sup>生ウイルスワクチン接種による子豚におけるHI抗体産生

これらの胎児、胎盤および羊水からのウイルス回収もすべて陰性であった。

### 3) 子豚における抗体産生と感染防御

子豚の抗体産生および感染防御能は図2、図3に示すごとくである。含有ウイルス量が、 $10^{6.5}$ TCID<sub>50</sub>/mlのワクチンを2mlずつ、4週間隔で2回接種し、4週後にウイルス(AS-6株)で攻撃した。その結果、全例とも初回接種後2週目よりHI抗体の上昇を示し、2回接種後4~5週目にさらに若干上昇する傾向がみられた(図3)。攻撃後、対照豚には2日後より40℃以上の発熱、1日後より軽度のウレミアが3日間確認されたが、S<sup>-</sup>生ワクチン接種豚には、発熱、臨床所見およびウレミアはまったく認められなかった。

## II. 野外試験

基礎試験により安全性および有効性が認められたので、千葉県東部家畜保健衛生所管内の養豚地区を選定し、昭和46年4月から11月までの期間で実施した。

試験豚は昭和46年4月以前生まれの未經産豚を用い、生ワクチン( $10^{6.5}$ TCID<sub>50</sub>/ml)を接種した。246頭の試験対照豚は、あらかじめHI抗体の保有状況を調査し、N群(ワクチン非接種) V<sub>1</sub>群(ワクチン5ml 1回接種)、V<sub>2</sub>群(ワクチン2ml、4週間隔2回接種)さらにHI抗体既陽性のP群(ワクチン非接種群)に群別した。また、試験地に日脳の流行状況を予測する目的で抗体陰性の「オトリ豚」35頭を広範囲に配置して、7月より9月まで毎週採血し抗体の陽転状況を観察した。

### 1) 抗体保有状況

各群に約30頭を配置したが、流行期までに豚の移動がかなりあり、とくにP群は頭数の減少が余儀なくされた。野外試験の結果は表1に示すごとくである。試験地に配置した「オトリ豚」の50%陽転日は、この年の8月19日で、それより2週間前の8月5日を試験地の流

表1 未經産豚の各群別におけるHI抗体保有状況

	接種群		非接種群		
	V <sub>1</sub> 群	V <sub>2</sub> 群	N群	P群	
ワクチン接種後(流行期前)	HI抗体保有率*	16/28 (57.2)	26/29 (89.7)	1/23 (4.3)	8/8 (100)
	平均HI価**	34.4	53.0	<20	56.6
分娩後	HI抗体保有率	11/12 (91.0)	10/10 (100)	9/12 (75)	7/7 (100)
	平均HI価	37.1	44.0	16.9	475.5

( ) 内は%

N: 抗体陰性群 P: 抗体既陽性群 V<sub>1</sub>: S<sup>-</sup>生ワクチン1回接種群 V<sub>2</sub>: S<sup>-</sup>生ワクチン2回接種群

\*: 抗体保有頭数/検査頭数 \*\*: 幾何平均値

行開始日とみなした。流行開始前のワクチン接種後の抗体陽性率および平均HI価は、N群、23頭中1頭(4.3%)、20倍以下、V<sub>1</sub>群、28頭中16頭(57.2%)、34.4倍、V<sub>2</sub>群、29頭中26頭(89.7%) 53.0倍であった。分娩後の抗体追跡調査不能の母豚を除いて、それらの抗体保有率と平均HI価はN群、9/12(75%) 16.9倍、P群、7/7(100%) 475.5倍、V<sub>1</sub>群、11/12(91%) 37.1倍およびV<sub>2</sub>群、10/10(100%) 44.0倍であった。

### 2) 分娩状況

8月19日以前に種付けされ、8月5日以後に分娩した各群の分娩結果は表2に示すごとくである。死亡胎児出現率は、N群 35/167(21.0%)、V<sub>1</sub>群 5/151(3.3%)、

表2 未經産豚における分娩状況

	N群	P群	V <sub>1</sub> 群	V <sub>2</sub> 群
総分娩母豚数	16	8	18	13
正常胎児分娩母豚数	8	5	16	12
異常胎児分娩母豚数	8	3	2	1
総産子数	167	79	151	110
正産子数	132	73	146	106
死亡胎児数	35	6	5	4
異常胎児分娩母豚出現率 <sup>1)</sup>	50%	37.5%	11.1%	7.7%
死亡胎児出現率 <sup>2)</sup>	21%	7.6%	3.3%	3.6%
母豚1頭当たりの平均正産子数 <sup>3)</sup>	8.3	9.1	8.1	8.1

N: 抗体陰性群 (対照群)

P: 抗体陽性群

V<sub>1</sub>: S<sup>-</sup>生ワクチン1回接種群

V<sub>2</sub>: S<sup>-</sup>生ワクチン2回接種群

1): 異常胎児分娩母豚数/総分娩母豚数

2): 死亡胎児数/総産子数

3): 正産子数/総母豚数

死亡胎児出現率: N-P、V<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>、N-P、N-V<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>、有意差有り。P-V<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>、V<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>、有意差なし (χ<sup>2</sup>検定: 1%以下の危険率)

V<sub>2</sub> 群 4/110(3.6%) および P 群 6/79(7.6%)であった。Z<sup>2</sup> 検定の結果、P と V<sub>1</sub>、V<sub>2</sub> 群および V<sub>1</sub> と V<sub>2</sub> 群を除き、1%以下の危険率で各群間に有意差が認められた。母豚1頭あたりの平均正産子数(総正産子数/総母豚数)は V<sub>1</sub>、V<sub>2</sub> 群が 8.1 頭、N 群 8.3 頭および P 群は 9.1 頭であり、平均産子数(総産子数/総母豚数)は N 群 10.4 頭、V<sub>1</sub> 群 8.3 頭、V<sub>2</sub> 群 8.5 頭および P 群が 9.8 頭であった。

各群の異常胎児分娩母豚出現率は N 群 8/16(50%)、P 群 3/8(37.5%)、V<sub>1</sub> 群 2/8 (11.1%) および V<sub>2</sub> 群 1/3 (7.7%) であった。

## 考 察

近年日本脳炎の細胞培養継代で、本ウイルスの弱毒化の研究が急速に進歩し、井上<sup>9)</sup> は m 株を、佐沢<sup>11)</sup> および守本<sup>9)</sup> は S<sup>-</sup> 株を、竹原<sup>10)</sup> は at 株をそれぞれ作出した。これら3株は「日本獣医学会生ワクチン研究協議会」の規定条件に合致し、野外に適用してもよいことが認められた。S<sup>-</sup> 株もワクチン化が進み、安全性<sup>10)</sup> が確認され、また、野外応用試験<sup>2, 15)</sup> がされてきた。当研究所作製の S<sup>-</sup> 生ウイルスワクチンについて、新たに「弱毒株を生ワクチンとして野外に適用する場合の安全性の基準」にもとづいて検討し、SPF 豚を用いて、子豚、妊娠豚およびその他の安全性の条件に合致し、安全性が確認されたので、野外応用試験を実施した。野外応用試験において、S<sup>-</sup> 生ワクチンの予防効果を死亡胎児出現率でみると、P 群 7.6%、S<sup>-</sup> 生ワクチン接種の V<sub>1</sub> 群 3.3%、および V<sub>2</sub> 群 3.6%に比べ非接種群は 21%と非常に高い死亡胎児出現率を示したことは、S<sup>-</sup> 生ワクチンが日本脳炎感染を防御し、高力価ワクチン<sup>7, 8)</sup> に比べ死産予防に著しい効力を有するものと考えられる。また、異常胎児出産母豚出現率、死亡胎児出現率は、P 群、V<sub>1</sub> 群、および V<sub>2</sub> 群の間には有意差を認めないが、N 群との間には有意差が認められた。これは S<sup>-</sup> 生ワクチン接種により異常胎児の出現をおさえたものと考えられる。母豚の流行前の抗体保有状況と分娩状況の関係<sup>12)</sup> は HI 抗体陽性の母豚では、抗体陰性の母豚に比べ死亡胎児出現率は低く、平均産子数は高かった。S<sup>-</sup> 生ワクチン接種方法については、日本脳炎流行開始前に耳根部皮下 5 ml 1 回ないし 2 ml 2 回接種方法でも同等の効果が期待できる。5 ml 1 回接種法は、労費ともに実用的にすぐれているものと考えられる。藤崎<sup>2)</sup> および杉森<sup>15)</sup> の野外試験成績と以上の成績から、S<sup>-</sup> 生ワクチンは日本脳炎ウイルスによる死産予防にかなりの効果があることが明らかになった。今後、死産予防をより完全にするためには、日本脳炎ウイルス以外の原因<sup>3, 4)</sup> などによって起こる死産の研究をまたねばならない。とくに今回の野外試験においても、日本脳炎ウイルス以外の原因かと

考えられる抗体陽性豚の死産がみられた地区もあり、豚パルボウイルスなどの抗体調査、ワクチン開発に研究を進めなければならないと考える。

## 結 論

われわれは農林省家畜衛生試験場より分与を受けた日本脳炎弱毒 S<sup>-</sup> ウイルスについて、クローニングを行ない、得られたウイルスを用いて、生ワクチンを作製し、「弱毒株を生ワクチンとして野外に適用する場合の安全性の基準」にもとづいて、豚接種試験、感染防御試験、その他の基礎試験を実施し、1カ月齢の子豚による接種試験で、発熱、臨床所見、およびウイレミーも認められず、まったく無反応に経過した。HI 抗体の上昇は接種2週後より認められ、かなり長期間持続することがわかった。ワクチン接種豚の感染防御も認められた。胎齢40日前後の妊娠豚に対しても、接種後2週間観察したが、発熱、臨床所見、およびウイレミーの異常は認められなかった。安全性についても、条件に合致することを確認したので、野外応用試験を実施した。予防効果を死亡胎児出現率でみると、P 群 7.6%、V<sub>1</sub> 群 3.3% および V<sub>2</sub> 群 3.6%で、非接種 N 群は 21%の高率を示した。異常胎児分娩母豚出現率および死亡胎児出現率も、各群間に著明な差が認められた。

終わりに、ご指導とご校閲をいただいた、農林省家畜衛生試験場藤崎優次郎博士に深謝いたします。

## 文 献

- 1) CLARKE, D. H. and CASALS, J.: *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 7, 561~573 (1958).
- 2) 藤崎: 日獣学誌, 71, 3 (1971).
- 3) 藤崎: 日獣学誌, 73, 22 (1972).
- 4) 藤崎: 日獣学誌, 73, 23 (1972).
- 5) INOUE, Y.K.: *Bull. Wild. Hith organ*, 30, 181~185 (1964).
- 6) KARRER, G.: *Arch. Exp. Pharm.* 162, 480~483 (1931).
- 7) 川窪, 竹原, 中村(肇), 中村(稔), 木下, 木内, 飯田, 藤井: 日本養豚研誌, 6, 86 (1969).
- 8) 川窪, 竹原, 中村(肇), 三井, 中村(稔), 飯田, 木内, 溝口, 藤井, 松井: 日獣学誌, 69回日獣学会 (1970).
- 9) 守本, 杉森, 三浦, 藤崎, 佐沢, 渡辺: 水曜会記事, 17, 4~5 (1968).
- 10) 守本, 杉森, 三浦, 渡辺, 藤崎, 北岡, 森井: 水曜会記事, 19, 31~32 (1970).
- 11) 佐沢, 杉森, 守本, 三浦, 渡辺: *Nat. Inst. Anim. Hith Quart.*, 9, 74~82 (1969).
- 12) 杉森: 家畜試年報, 9, 57~60 (1969).
- 13) 杉森: 日獣学誌, 71, 4 (1971).
- 14) 椿, 升, 小幡, 島田: 北里実験医学, 13, 71(1950).
- 15) TAKEHARA, K., MITUI, T., NAKAMURA, H. & NAKAMURA, J.: *NIBS Bull. Biol. Res.* 8, 11(1969).

× × ×