福岡県衛生研究所研究報告

第4集　　昭和41年9月4日

目　　次

報　文

常盤　寛・大塚　悟・梶栗ミホ：非定型ならびに非病原性抗酸菌に関する研究.
1. ヒトおよびツベルクリン陽性乳牛からの分離……1—4

高橋克巳・山本英穂・大塚　悟・灘波豊愛：福岡市近郊におけるコガタアカイエカ—シロハシイエカ複合群のカからの日本脳炎ウイルスの分離……5—12

山本英穂・高橋克巳・真子憲治：1963年福岡市近郊におけるコガタアカイエカ—シロハシイエカ複合群の出現消長とその日本脳炎ウイルス保有状況（英文）……13—25

森　彬：水中の微量ペンタクロルフエノールの定量について……26—28

資　料

坂本サツキ・武原雄平・長谷川孝志：過去5年間の福岡県におけるインフルエンザ流行の推移……29—30

坂本サツキ・常盤　寛：溶連菌感染症としての抗ストレプトリジンO（ASLO）価の測定……30—32

山本英穂：福岡県筑紫郡一農村におけるカ調査成績……32

福岡県衛生研究所
福岡市天神1丁目5番3号

福岡衛研報

非定型ならびに非病原性抗酸菌に関する研究　1

ヒトおよびツベルクリン陽性乳牛からの分離

福岡県衛生研究所（所長：真子憲治博士）

常盤　寛・大塚　悟・梶栗ミホ

稲田[1]はツベルクリン陽性乳牛の各リンパ節および主要臓器から抗酸菌を高率に分離している．一般に結核菌以外の抗酸菌は，ヒトから分離される非定型抗酸菌をはじめ，自然界に分布する抗酸菌を含めれば数十種にのぼる．*Micobacterium kansassi* のようにヒトに対し比較的病原性の明らかにされたものもあるが，大部分の抗酸菌のヒトに対する病原性はもちろん，感染成立の機構さえ明確にされていない．しかし現在結核菌以外の抗酸菌による感染症例[2)3)]は多く，しかもこれらの抗酸菌が種々の抗結核剤に対して耐性である点注目される．今回ツベルクリン反応陽性乳牛の主要臓器から抗酸菌の分離を試み，その生化学的性状および病原性について検討を加え，さらに結核患者の喀痰から分離されたナイアシンテスト[4)]陰性の抗酸菌と自然界系抗酸菌との比較を行なったのでその結果を報告する．

実験材料および方法

実験材料：1963年にと殺したツベルクリン反応陽性の乳牛15頭を剖検し，無菌的に各臓器（肺，肝，脾，腎，乳門リンパ節，肺門リンパ節，腸間膜リンパ節および骨髄）を採取した．ヒトの場合は，結核患者の喀痰から分離を行なった．

実験方法：各材料の約1 gを無菌的に切り取り滅菌乳鉢でよく磨砕し乳剤として1% NaOH を加え10倍に希釈し，集菌してその0.1 m*l* を1%小川培地に塗抹した．一方材料の一部を培養直前にチール・ネルゼン法またはオーラミンO染色による螢光顕微鏡法によって抗酸菌の検索を行なった．アミダーゼ反応は戸田[5)]，今野[5)]の方法によった．

実験成績

1　抗酸菌の分離

乳牛15頭の各臓器の肉眼的所見，および臓器の直接塗抹による鏡検法でも抗酸菌は認められなかった．しかし培養検査では表1のとおり，6号株は2週目に集落平均4個（肺，肝）を，9号株は同じく2週目に灰白色のR型集落平均5個（骨髄）を，11号株は4週目に橙黄色の集落多数（肺，肝，骨髄）を，および12号株は8週以後はじめて灰白色の集落平均7個（腎，乳門リンパ節）を分離した．一方ヒトの喀痰から分離されたナイアシン陰性の白色集落を有するもの2株について検討した．

2　発育性状および生化学的性状

ウシ由来の抗酸菌（6号株，9号株，11号株，12号株）およびヒト由来の抗酸菌（A・Y 株，S・N 株）の初代発育性状についてみると，ウシ由来の9号株がR型集落を示した以外はすべてS型であり，発育速度はウシ由来の12号株が初代分離に8週以上を要したのに比べ他は1－2週以内に発育した，さらに発育温度域については12号株を除いてはすべて室温および41—45℃において発育可能であり，普通寒天にも発育可能であった．つぎに光発色性はすべて陰性，コード形成は12号株を除いては認められなかった．一方生化学的性状では，すべての菌株がニコチン酸を産生せず，抗煮沸性は12号株およびS・N株がそれぞれ8および5の Kf 値を示した以外は0.5—1であった．酵素反応はすべての抗酸菌がカタラーゼ陽性であり，うち11号株，9号株および A・Y 株は強陽性であった．アミダーゼ反応は表2のとおりすべて陰性であった．

Hiroshi TOKIWA, Satoru OTSUKA & Miho KAJIKURI : Studies on atypical and nonpathogenic acid-fast bacilli 1. Isolations of acid-fast bacilli from human beings and tuberculin-positive cows.

以上の諸性状からウシ由来の12号株は結核菌に近いと考えられるが，後述のとおり病原性が認められなかった．その他の6号株，9号株，11号株は純雑菌性抗酸菌と考えられる．またヒト由来の A·Y 株は Scotochromogens, S·N 株は Nonphotochromogens に属すると判定される．

3　動物に対する病原性

分離菌をモルモットおよびウサギの腹腔内に 5 mg/ml 接種し，4週目に剖検した結果は表3のとおりである．モルモットに対する病原性を検討したところ，ウシ由来株のほとんどは肉眼的病変を起こさず，4週目のツベルクリン反応は12号株が陽性を示したが，他の3株は陰性であった．

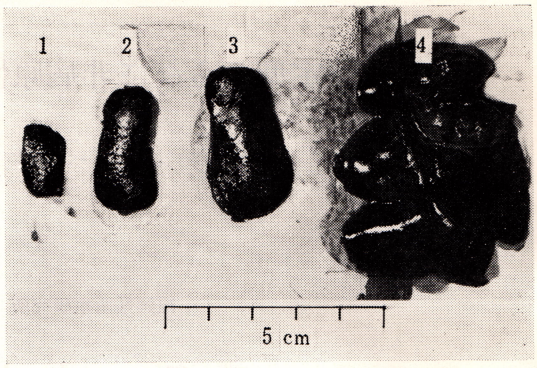


図 1　マウス脾，肝の剖検所見（S．N株）
1：対照，脾，　2：H_{37} Rv 株，脾，
3：S．N株，脾，4：S．N株，肝

表 1　ツベルクリン反応陽性乳牛からの抗酸菌の分離

材料	ツベルクリン反応陽性乳牛											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
肺	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−
肝	−	−	−	−	−	$+_3$	−	−	−	−	$+_{15}$	−
脾	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
腎	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	$+_1$
乳門リンパ節	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	$+_7$
腸間膜リンパ節	−	−	−	−	−	$+_1$	−	−	−	−	−	−
肺門リンパ節	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	$+_1$	−
骨髄	−	−	−	−	−	−	−	−	$+_5$	−	$+_3$	−

表 2　抗酸菌の生化学的性状

性状		ウシ由来				ヒト由来		対照
		6	9	11	12	A．Y	S．N	$H_{37}Rv$
発育	37℃	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋	＋＋	＋	＋＋
	42℃	＋	＋	＋	＋	＋	＋	−
	普通寒天	＋	＋	＋	−	＋	＋	−
集落	色	橙黄	灰白	淡黄	灰白	灰白	灰白	淡黄
	光発色性	−	−	−	−	−	−	−
	Cord 形成	−	−	−	＋	−	−	＋
生化学的性状	ナイアシン	−	−	−	−	−	−	＋
	中性紅	−	−	−	＋	−	＋	−
	Kf 値	2	0.5	1	8	1	5	5
酵素	カタラーゼ	＋	＋＋	＋＋＋	＋	＋＋＋	±	−
	ウレアーゼ	＋	＋	＋	−	＋	−	−
	フォルムアシダーゼ	−	−	−	−	−	−	−
	ニコチンアミダーゼ	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋

表 3 モルモットの局所に対する膿瘍形成，腫脹ならびにツベルクリン反応

局所		ウシ由来株 6	ウシ由来株 9	ウシ由来株 11	ウシ由来株 12	ヒト由来株 A・Y	ヒト由来株 S・N	対照 $H_{37}Rv$
肺	膿瘍	−	−	−	−	−	−	++
	腫脹	−	−	−	−	−	−	+
肝	膿瘍	−	−	−	−	−	+	−
	腫脹	−	−	−	−	−	−	−
脾	膿瘍	−	−	−	−	−	+	++
	腫脹	−	−	−	−	−	+	+
腎	膿瘍	−	−	−	−	−	+	−
	腫脹	−	−	−	−	−	−	−
リンパ節	鼠径	−	−	+	−	+	+	+
	腸間膜	−	−	+	−	+	+	+
腹膜		−	−	−	−	+	+	+++
ツベルクリン反応		−	−	−	+	−	−	+

一方ヒト由来株では S・N 株で肝，腎に数個の膿瘍形成が認められ，各リンパ節はわずかに腫脹したが，脾は比較的病変が著明で正常の脾に比べ約4倍に腫脹肥大し，辺縁は鋸歯状で数個の膿瘍形成が図1のように認められた．なおウサギに対する病原性はいずれも認められなかった．

4 抗生物質に対する感受性

ストレプトマイシン (SM) パラアミノサリチル酸 (PAS) イソニコチン酸ヒドラジッド (INH) の第一次抗結核剤のほか，カナマイシン (KM) に対する抗酸菌の感受性は大部分のものが完全耐性を示した．すなわち表4のとおり6号株は KM を除く3剤に耐性，9号株は SM, KM を除く他の2剤に耐性，11号株も同様に PAS, INH の2剤に完全耐性を示した．一方ヒト由来株ではわずかに KM に感受性を示すが他の薬剤には完全耐性であった．

表 4 抗生物質に対する感受性

菌株		SM 10	SM 100	PAS 1	PAS 10	INH 1	INH 5	KM 10	KM 100	対照
ウシ由来株	6	+++	+++	+++	++	+++	+	+	+	+++
	9	+	−	++	++	+++	+++	+	+	+++
	11	+	−	+++	+++	+++	+++	++	+	+++
	12	−	−	+++	+++	+++	+++	−	−	+++
ヒト由来株	A. Y	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	−	+++
	S. N	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++

注：抗生物質単位は μg/ml

考 察

稲田[1]はツベルクリン陽性乳牛の病変臓器から 9.6% の割合で白色系抗酸菌を分離し，一方無病変臓器からはマウス通過によって高率に分離したと述べている．著者らの乳牛からの分離は主として無病変材料であったが，15の検査例について4例の灰白色ならびに橙黄色系R型抗酸菌を分離した．これらの分離菌は Runyon[7] の分類に従えば第4群の Rapid growers に属するが，うち12号株は1%小川培地およびグリセリン無培地で約8週以上を要する緩徐発育菌であり，生物学的性状から結核菌に近似する抗酸菌である．自然界に分布する抗酸菌については戸田ら[8]，占部[9]のそれぞれイヌ，鳥獣からの分離例をはじめ多くの報告がみられるが，本菌の病原性，とくにヒトにおける感染発症機序については明らかでない．ウシ由来株はいずれもウサギ，モルモットに病変が認められず，ことに6号，9号，11号の各株は鑑別試験の結果から，雑菌性抗酸菌と考えられる，一方ヒト由来株は Scotochromogens および Nonphotochromogens に属すると判定された．Nonphotochromogens はモルモットおよびマウスに対する病原性を有するが結核特有の病変ではない．一般に非定型抗酸菌の病原性について特異的病変を形成しないという鏡山[10]の報告と一致する．しかし本菌を排出した患者が約2年間にわたり計11回の喀痰培養において連続5回，同菌を排出していることは注目される．つぎにツベルクリン反応についてみると，分離菌のうち12号株がモルモット接種後第4週目に陽性であったが，その他の抗酸菌は8週まで陽転していなかった．岡田[11]はヒト型ツベルクリンπと非定型抗酸菌πとの交差反応で疫学的考察を行ない，ことに非定型抗酸菌が現在多種類にのぼっているため，今後検討の余地のあることを指摘している．つぎに抗生物質感受性についてみると，分離菌の大部分は感受性が認められなかった．とくにヒト由来株は強い耐性を認め，しかも第二次抗結核剤に対しても強いことは注目される．

総 括

非定型ならびに非病原性抗酸菌の各性状を比較検討するため，ヒトおよびと殺乳牛からの抗酸菌の分離を行なった．従来ヒトから分離されるナイアシン陰性の抗酸菌については注目してきたが，本報では自然界系純雑菌性抗酸菌について若干の検討を加えた．

1 ヒトから分離した抗酸菌のうち1例は明らかに非定型抗酸菌と考えられ，菌株の諸性状に対する態度は，Runyon[7] の分類に合致する．

2 ウシ由来の菌株で12号株を除く他の3株は迅速発育菌である．しかし12号株は一部の性状において結核菌に近似する抗酸菌であるという興味ある知見を得た．

付記：本研究を行なうに際し，懇篤なご指導をいただいた当所細菌課長坂本サツキ博士に深謝する．

文　　献

1) 稲田寛一郎：牛結核に関する研究 (1)．京都府立医学大学雑誌 68(6)，1241-1248，**1960**.
2) 日比野　進：本邦における非定型抗酸菌及び同症の整理．日本医事新報 2086，29-33，**1964**.
3) 長田富香：患者より分離された非定型抗酸菌について．日本細菌学雑誌 15(1)，74-79，**1960**.
4) 今野　淳：ナイアシンテストとその展開．日本細菌学雑誌 20(7)，326-345，**1965**.
5) 戸田忠雄・武谷健二：抗酸菌分類のための簡単なウレアーゼテストについて．医学と生物学 55(6)，184—190，**1960**.
6) 今野　淳：未分類抗酸菌と結核菌の同定．日本胸部臨床 23(10)，663-671，**1964**.
7) Runyon, E. H.: Typical mycobacteria ; Their classification. Am. Rev. Resp. Dis. 91 (2)，288-289，**1965**.
8) 戸田忠雄・武谷健二・真子憲治・坂本サツキ・武原雄平：犬から分離せられた抗酸菌の研究 (1)．東京医事新誌 74(12)，723-724，**1957**.
9) 占部　薫・宮崎権八・大石定男・佐藤　功・大塚金吾：動物系抗酸菌の研究 1　家畜鼠および鶏の体内に於ける抗酸菌の分布とその分り．日本医学 3374，470-475，**1944**.
10) 鏡山松樹：非定型抗酸菌症の臨床病理学的観察．日本医事新報 2069，29-33，**1962**.
11) 岡田　博：本邦における非定型抗酸菌感染の疫学．日本医事新報 2074，13-23，**1964**.

(受付 1966-4-15)

福岡市近郊におけるコガタアカイエカ－シロハシイエカ複合群のカからの日本脳炎ウイルスの分離

福岡県衛生研究所（所長：真子憲治博士）

高橋　克巳*1)・山本　英穂・大塚　悟・灘波　豊愛

日本脳炎媒介カに関しては，三田村・北岡らが主宰した研究グループによって行なわれた岡山市における一連の研究をはじめ，戦後，国立予防衛生研究所節足動物媒介ウイルス研究グループや406th MGL*2) および NAMRU*3) など米陸・海軍医学研究機関に関係した研究者たちにより，関東地方の数地点や台湾において，各種カからのウイルス分離による媒介カの日本脳炎ウイルス（以下 JEV）保有状況ならびにそれに関連する諸調査が数年にわたり続行され，日本脳炎の疫学上また節足動物媒介ウイルスの生態学上重要な知見が得られてきた．一方，九州，四国など日本西南部では，夏季に日本脳炎患者の大発生がしばしば各地にみられるにもかかわらず，当時日本脳炎媒介カに関する調査・研究としては金子[1)]が福岡市周辺で採集した数種のカからウイルス分離を試みて陰性成績を得た報告があるだけであった．

日本脳炎のヒト流行が媒介カのいろいろな生態学的要因の変動によりかなり影響されるであろうということはとうぜん考慮されなければならないし，また媒介カの生態は年によりまた地域によりかなり異なるであろう．このような観点から，われわれは当地域における日本脳炎のヒト流行に関与する要因を解析するため，まず媒介カに関する研究に着手し，1962年福岡市近郊で採集したカから3株の JEV を分離したのでその成績を報告する．

材料および方法

本報では，すでに多くの研究者によって確認されているように，*Culex tritaeniorhynchus* Giles コガタアカイエカをもっとも重要な日本脳炎媒介カとしてこれをおもな対象としたが，本種を同定，選別するうえに分類学上きわめて困難な問題に直面した．すなわち松尾[2)]が示し

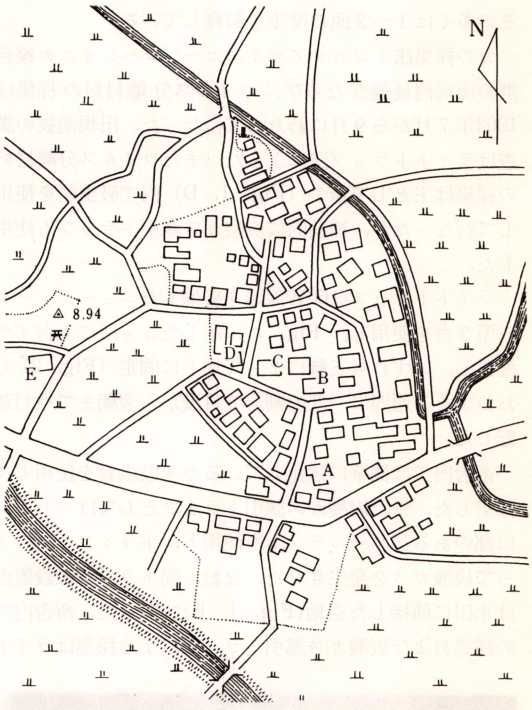


Fig. 1. A sketch-map showing the study site, Uchihashi hamlet, Kasuya-gun, Fukuoka Prefecture.
A, B and C : The places at which the light traps were located.
D : The cattle shelter in which mosquitoes were collected for virus isolation test.
E : The farm court on which carbon dioxide-baited trap was located.

Katsumi TAKAHASHI, Hideho YAMAMOTO, Satoru OTSUKA and Toyonaru NAMBA : Isolations of Japanese encephalitis virus from the mosquitoes of *Culex tritaeniorhynchus-vishnui* complex collected in the suburbs of Fukuoka City.

*1) 現所属：長崎県衛生研究所
*2) 406th Medical General Laboratory, Zama, Japan
*3) U. S. Naval Medical Research Unit, No. 2, Taipei, Taiwan

たように，コガタアカイエカは，とくに♀成虫において *Culex vishnui* (auct. nec Theobald, 1901) シロハシイエカと形態的にいちじるしく類似し両種を区別する決定的な特徴を欠いている．このような，形態的にきわめて近似した両種♀成虫を多数のカ成虫の選別作業において区別することは不可能であるから，本報で対象としたものは *Culex tritaeniorhynchus-vishnui* complex コガタアカイエカ—シロハシイエカ複合群として取り扱った．

場　所：福岡県粕屋郡大川町内橋部落を調査地点とした．本部落は福岡市の東北おおよそ3㎞の地点で，広大な水田地帯に取り巻かれた農村であり，86世帯を有し，その多くは1—2頭の役牛を飼育している．

カの採集法：コガタアカイエカ—シロハシイエカ複合群の出現消長調査ならびにウイルス分離材料の採集は1962年7月から9月にわたって行なった．出現消長の調査はライトトラップ法によった．またウイルス分離材料の採集は主として畜舎 (Fig. 1, D) 内で吸虫管を使用して行なったが，補助的に炭酸ガス誘引トラップも使用した．

ライトトラップは60W電球を装備したニュージャーシー型3台を使用し，Fig. 1 に示した3ヵ所に1台ずつ配置し，いずれも三脚によって地上に固定 (Fig. 2) し，おおよそ1週間に一度の割合で日没から翌朝まで点灯運転した．

畜舎内では側壁に休止しているカを吸虫管を使用して採集した．また炭酸ガス誘引トラップとしては一方に開口部のあるビニールテントを使用し，ドライアイスによって炭酸ガスを発生させた．なお，同トラップの設置点は水田に隣接した空地(Fig. 1, E)であった．畜舎内での採集および炭酸ガス誘引トラップによる採集はライトトラップの運転と同じ日に行ない，通常日没から3—4時間続行し，採集したカは採集法別，採集場所別にケージに移して実験室に持ち帰り一夜室温に放置した．

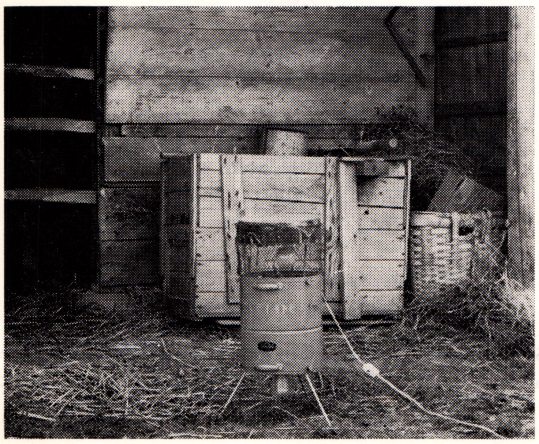


Fig. 2. A picture showing light trap operation at the cattle shelter B.

ウイルス分離：カ材料からのウイルス分離法は Buescher ら[3] および Matsuyama ら[4] の示した方法におよそ準じた．採集後一夜放置したカはエーテルで麻酔し，双眼解剖顕微鏡 (40×) 下で同定，コガタアカイエカ—シロハシイエカ複合群の♀個体だけを選別，ただちに100個体ずつを1プールとして乳鉢で摩砕，100個体あたり4 m*l* の希釈液ををを加えてカ乳剤を作製した．希釈液はペニシリン 500ut/m*l* およびストレプトマイシン 500μg/m*l* を含有する10% 初生ひな血清加リン酸緩衝食塩水 (pH 7.6) を使用した．カ乳剤は氷温で1時間放置したのち，初回 3,000 rpm, 10分間，引き続き 10,000rpm, 10分間 0 ℃で遠心分離してその上清をアンプルに封入，ドライアイスジャーに保存，ちくじ生後1週間以内の哺乳マウス1腹ずつに脳内接種した．接種量は哺乳マウス1匹あたり0.02m*l* で，また使用したマウスは大部分 gpc 系であったが一部分は ddn 系および雑系であった．カ乳剤を脳内接種された哺乳マウスは14日間観察し，この間に異常を示したものあるいは死亡したものは採脳し，その脳をチオグリコレート培地による無菌試験ののち他の哺乳マウス脳内に次代接種した．次代接種された哺乳マウスの発症例についてはそのひん死期に放血，採脳し，血清学的同定用抗原作製のためさらに3代目に継代した．なお，初代カ乳剤接種マウスで観察期間を耐過したものについては盲継代は行なわなかった．

分離ウイルスの血清学的同定：分離ウイルスの血清学的同定は，血球凝集反応 (HA)，血球凝集抑制反応(HI) および補体結合反応 (CF) によって行なった．なお JEV 標準株としては，中山予研株，JaGAr #01 株を用いた．

1) HA および HI：術式は Clarke ら[5] の方法を改変した予研法[6] に従い，血球はガチョウ血球を使用し，血清はアセトン処理後ガチョウ血球吸収を行なった．

分離ウイルス3株の抗原は前記 Clarke ら[5] の方法により作製した．すなわち感染発症哺乳マウス脳（哺乳マウス脳継代3代目）から蔗糖—アセトン法で抽出した．中山予研株，JaGAr #01 株抗原は Clarke ら[5] の方法で作製した化学及び血清療法研究所製のアセトン—エーテル抽出抗原を用いた．これらの抗原は使用時まで—20 ℃に保存した．

免疫血清は中山予研株，JaGAr #01 株および新しく分離したウイルスの一つ JaFAr-1462 株に対し，それぞれマウス高度免疫血清をつくり，供試まで—20℃に保

存した．

2）CF：術式は Kolmer 少量法[7] に従い，抗原，免疫血清は HA, HI の場合と同一ロットのものを用いた．血清は型のとおり60℃，20分間不活化後供試した．

成　　績

1　コガタアカイエカ—シロハシイエカ 複合群の 出現消長

Fig. 1 に示したライトトラップ設置点のうち，AとBは農家主屋とは別棟の牛舎，Cは農家主屋内に設けられた牛舎であったが，Aでは農作業の都合上しばしばライトトラップ設置位置が変更され，そのたびに捕集される個体数がかなり変動したし，Cでは捕集個体数がきわめて少なかったので，B牛舎においてライトトラップに捕集されたコガタアカイエカ—シロハシイエカ複合群の個体数の消長をJEV分離成績とともに Table 1 に示した．

Table 1 において，ライトトラップに捕集された個体数の消長とウイルス分離に供した個体数の消長の間に若干の差が認められるが，後者はウイルス分離材料をできるだけ多く得ることを目的として行なわれた採集成績であり，定量的に行なった結果ではない．

2　カ材料からのウイルス分離

調査期間中に畜舎内で，また炭酸ガス誘引トラップによって採集されたコガタアカイエカ—シロハシイエカ複合群 3,831♀♀，41プールについてウイルス分離を行なった結果，8月6日採集の 1,500♀♀，15プールのうちから3株のウイルスを分離できた．ウイルス陽性であった3プールの詳細をつぎに示すと

プール番号	採集月日	場　所	プールサイズ	プール内容 吸血前	プール内容 吸血後
14	6-Ⅷ-'62	牛舎D	100	0	100
17	6-Ⅷ-'62	牛舎D	100	76	24
22	6-Ⅷ-'62	炭酸ガス誘引トラップ	100	100	0

となり，吸血前，吸血後の個体と関係なくウイルス分離に成功した．8月6日採集材料15プールのうち，ウイルス陽性であった3プールは乳剤作製後24時間以内に哺乳マウスに脳内接種された5プール中のものであり，他の10プールは乳剤作製後11—19日間ドライアイスジャー中に凍結保存後哺乳マウスに脳内接種されたがウイルス分離はすべて不成功であった．

カ乳剤接種初代において，No.14プール接種哺乳マウスでは6匹中1匹が6日目に，No.17プール接種哺乳マウスでは6匹中1匹が5日目に，No.22プール接種哺乳マウスでは5匹中2匹が5日目に他の3匹は6日目に発症した．No.14プールおよびNo.17プールを接種された2腹の哺乳マウスでは，発症したおのおの1匹の他はすべて観察期間終了時までなんら異常を示さなかった．上記の発症マウスから得た脳はチオグリコレート培地72時間培養による無菌試験後おのおの10%脳乳剤の10^{-3}希釈液とし，次代哺乳マウスに脳内接種されたが，いずれも被接種哺乳マウスのすべてを4—5日目に発症させた．これら3株の分離当初および次代における被接種マウスの発症状況および潜伏期は Fig. 3 に示した．なお，上記3株の病因番号はOyaら[8]の方法に準じて，JaFAr-1462, JaFAr-1762, JaFAr-2262 (Japan, Fukuoka, Arthropod born－プール番号＋1962) とした．

Table 1.　The results of light trap collection and virus isolation tests.

Date of collection		Light trap collection	Virus isolation		
			No. of mosq.	No. of pool	Virus positive
Jul.	13	102	163	2	0
	19	182	722	8	0
	27	321	300	3	0
	31	999	1025	11	3
Aug.	6	1478	1500	15	0
	13	899	—	—	—
	20	342	121	2	0
Sept.	7	65	—	—	—
Total		4388	3831	41	3

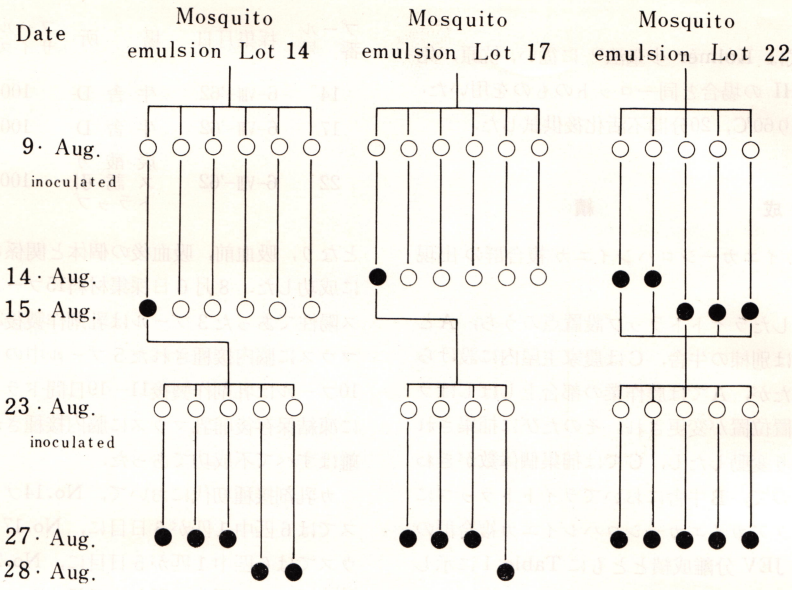


Fig. 3. Isolations of the 3 strains of Japanese encephalitis virus from the mosquito ploos No. 14, No. 17 and No. 22.

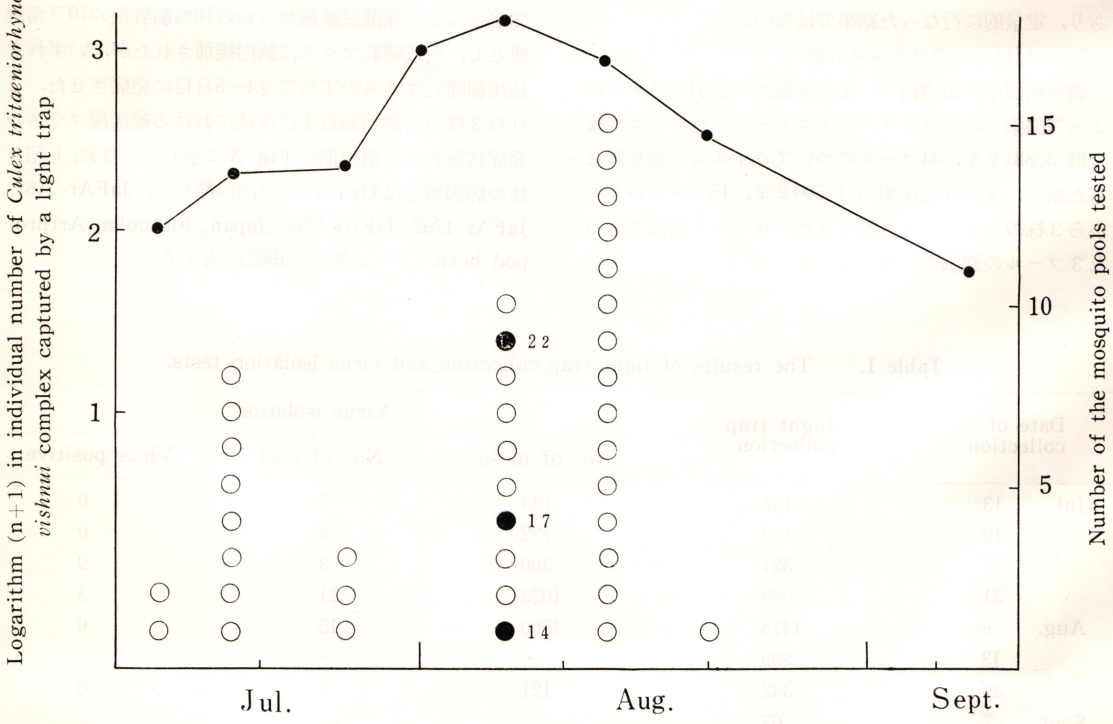


Fig. 4. Seasonal prevalence of the mosquitoes of *Culex tritaeniorhynchus-vishnui* complex and virus isolations from the same mosquitoes.
The solid circles showing successful isolations of Japanese encephalitis virus.

3 分離ウイルスの血清学的同定

1）HA 能およびその至適 pH：分離ウイルス3株 JaFAr-1462, JaFAr-1762 および JaFAr-2262 から作製した蔗糖—アセトン抗原の HA を pH 6.0—7.0 の6種類の VAD について行なった．Table 2 に示したように分離ウイルス3株の抗原はいずれもガチョウ血球をよく凝集し，最高値は 1：6,400—1：12,800 であったが，その至適 pH は JaFAr-1462 株抗原では6.6—6.8, JaFAr-1762 株抗原と JaFAr-2262 株抗原では6.6であった．

2）分離ウイルス3株と中山予研株，JaGAr #01 株との交差 HI：分離ウイルス株抗原が JEV 標準株である中山予研株，JaGAr #01 株の高度免疫血清に対してどのような反応を示すか，また分離ウイルスの一つ JaFAr-1462 株の高度免疫血清に対して，中山予研株，JaGAr #01 株および他の2株の分離ウイルスの抗原がどのような反応を示すかを交差 HI によって検討した．その結果，Table 3 に示したように，JaGAr #01 株免疫血清に対して同株抗原は 1：640，中山予研株抗原は 1：320で，分離ウイルス3株の抗原はいずれも JaGAr #01 株抗原と同値の 1：640を示した．中山予研株免疫血清に対しては同株抗原は 1：640，JaGAr #01 株抗原および分離ウイルス3株の抗原は 1：320 を示した．また分離ウイルスの一つ JaFAr-1462 株の免疫血清に対しては同株抗原では 1：640，他の2株の分離ウイルス抗原および JaGAr #01 株抗原は 1：640，中山予研株抗原は 1：320 を示した．すなわち分離ウイルス3株は JEV 標準株である中山予研株，JaGAr #01 株と同様な反応を示し，その反応態度は JaGAr #01 株に近いことが認められた．

3）分離ウイルス3株と中山予研株，JaGAr #01 株との交差 CF：抗原価の測定は日本脳炎患者血清とのボックスタイトレーションにより行ない，中山予研株抗原は 1：64，JaGAr #01 株抗原は 1：128，JaFAr-1462 株抗原は 1：64，JaFAr-1762 株抗原および JaFAr-2262 株抗原では 1：32が1単位であり，それぞれ4単位を使用した．分離ウイルス3株の抗原と中山予研株抗原，JaGAr #01 株抗原との交差 CF を行なった結果，Table 4 に示したように，JaGAr #01 株免疫血清に対しては同株抗原は 1：128，JaFAr-1462 株，JaFAr-1762 株および JaFAr-2262 株の各抗原は 1：128，中山予研株抗原は 1：64で，中山予研株免疫血清に対しては同株抗原は 1：64，JaGAr #01 株抗原および JaFAr-1762 株抗原，JaFAr-2262 株抗原は 1：32，JaFAr-1462 株抗原は 1：64であり，また JaFAr-1462 株免疫血清に対しては同株抗原では 1：64，JaGAr #01 株抗

Table 2. Hemagglutination test of the isolated strains with goose cells.

Antigen	pH	Hemagglutination titer (1:)							
		200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600
JaFAr-1462	6.0	+	+	+	+	+	−	−	−
	6.2	+	+	+	+	+	⊕	−	−
	6.4	+	+	+	+	+	⊕	−	−
	6.6	+	+	+	+	+	+	+	−
	6.8	+	+	+	+	+	+	⊕	−
	7.0	+	+	+	⊕	−	−	−	−
JaFAr-1762	6.0	+	+	+	+	−	−	−	−
	6.2	+	+	+	+	±	−	−	−
	6.4	+	+	+	+	±	−	−	−
	6.6	+	+	+	+	+	+	−	−
	6.8	+	+	+	+	+	±	−	−
	7.0	+	+	±	−	−	−	−	−
JaFAr-2262	6.0	+	+	+	+	−	−	−	−
	6.2	+	+	+	+	±	−	−	−
	6.4	+	+	+	+	±	−	−	−
	6.6	+	+	+	+	+	⊕	−	−
	6.8	+	+	+	+	+	−	−	−
	7.0	+	+	−	−	−	−	−	−

Table 3. Cross hemagglutination-inhibition test among Nakayama-NIH, JaGAr #01 and the isolated strains.

Antigen			Immune serum		
Strain	pH	16ut.	JaFAr-1462	JaGAr #01	Nakayama-NIH
JaFAr-1462	6.8	1 : 800	1 : 640	1 : 640	1 : 320
JaFAr-1762	6.6	1 : 400	1 : 640	1 : 640	1 : 320
JaFAr-2262	6.6	1 : 400	1 : 640	1 : 640	1 : 320
JaGAr #01	6.8	1 : 1600	1 : 640	1 : 640	1 : 320
Nakayama-NIH	6.4	1 : 800	1 : 320	1 : 320	1 : 640

Table 4. Cross complement-fixation test among Nakayama-NIH, JaGAr #01 and the isolated strains.

Antigen		Immune serum		
Strain	4 ut.	JaFAr-1462	JaGAr #01	Nakayama-NIH
JaFAr-1462	1 : 16	1 : 64	1 : 128	1 : 64
JaFAr-1762	1 : 8	1 : 64	1 : 128	1 : 32
JaFAr-2262	1 : 8	1 : 64	1 : 128	1 : 32
JaGAr #01	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 32
Nakayama-NIH	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 64

原，JaFAr-1762 株抗原，JaFAr-2262 株抗原は 1 : 64，中山予研株抗原は 1 : 32を示し，分離ウイルス3株と中山予研株および JaGAr #01 株とは相互によく反応することが認められた．

以上の HA，HI および CF の結果から，分離ウイルス3株 JaFAr-1462，JaFAr-1762 および JaFAr-2262 を血清学的に JEV と同定することは妥当と考えられる．

考　　察

コガタアカイエカ—シロハシイエカ複合群の♀個体から分離された3株のウイルスは，ガチョウ血球による HA の結果，また JEV 中山予研株，JaGAr #01株および分離ウイルスの一つ JaFAr-1462 株のそれぞれに対するマウス高度免疫血清によって交差的に行なった HI および CF の結果では JEV と同定された．これらの JEV 陽性であったカ材料はいずれも 8月6日採集のものであった．この時期は当地においてコガタアカイエカ—シロハシイエカ複合群の出現個体数がピークに達していたことが同時に行なわれたライトトラップによる調査成績から知られる．このことは，古く山田[9]，三田村ら[10)-14)] および福見ら[15)]が岡山における調査にもとづいて，いわゆる "山田の頂き" は患者発生におよそ1—3週間先行すると述べ，また "山田の頂き" と前後する時期に JEV 保有カを検出していることと一致するようである．いわゆる "山田の頂き" は各種カの採集総個体数のピークを指すものであるが，この "山田の頂き" 時にはそのほとんどがコガタアカイエカで占められることは前記研究者たちによってすでに明らかにされているから，これを本報におけるコガタアカイエカ—シロハシイエカ複合群の出現ピークとおおよそ対比することは可能と思われる．しかし本報では，接種材料の保存が不適当であったので，ウイルス分離ができなかった接種材料が必ずしも JEV 陰性であったとはいえないから，1962年に当地域においてどのような JEV 保有個体の出現パターンがあったか明らかでない．すなわち，JEV が分離された3プールは8月6日採集個体のうち，カ乳剤作製後24時間以内に哺乳マウスに脳内接種された5プールのうちのものであり，乳剤作製後11—19日間ドライアイスジャーに凍結保存されたのちに同様な方法で接種された同日（8月6日）採集個体からなるカ材料の他の10プールからはまったくウイルスを分離することができなかった．これは接種材料をカ乳剤のかたちで長期間ドライアイス中に凍結保存したためと考えられ，他の時期に採集したカ材料にも同様に10日以上の保存期間を経て哺乳マウス脳内接種されたものが少なくないから，これらのウイルス陰性例中にも JEV を保有する個体が含まれてい

た可能性が大きい．したがって，当地域のコガタアカイエカ—シロハシイエカ複合群のカに当時かなり高率のJEV汚染があったことが推定できる．すなわち，JEV陽性は8月6日採集材料15プール中3例であるが，カ乳剤作製後24時間以内に接種された同一条件のものだけについてみると5プール中3例陽性となり，かなり高い分離率となる．しかし，コガタアカイエカ—シロハシイエカ複合群の出現消長のピーク時にJEV保有個体の出現があったことは確かであるが，全調査期間中におけるJEV保有個体の出現期間については言及できなかった．

総括

1962年7月から9月にわたり，福岡県粕屋郡大川町内橋部落において，畜舎内で吸虫管を使用してコガタアカイエカ—シロハシイエカ複合群のカを採集しウイルス分離を行なうとともに，ライトトラップによる同複合群カの出現消長調査を行なってつぎの成績を得た．

1）ライトトラップで観察されたコガタアカイエカ—シロハシイエカ複合群の出現消長は7月下旬—8月上旬に顕著なピークが認められた．

2）全調査期間中にウイルス分離のために採集されたコガタアカイエカ—シロハシイエカ複合群のカ3,831♀♀，41プールから3株のウイルスが分離され，ガチョウ血球によるHAの成績，また既知のJEV 2株（中山予研株およびJaGAr #01株）のおのおのに対するマウス免疫血清と分離ウイルスの一つJaFAr-1462株に対するマウス免疫血清により交差的に行なったHIおよびCFの成績では，3株のいずれもJEVと同定された．

3）JEV陽性であった3プールはいずれも8月6日採集のものであり，この時期は同地域におけるコガタアカイエカ—シロハシイエカ複合群の出現消長のピーク時と一致した．

なお，本報では接種材料の保存が不適当であったため，調査期間中JEV保有個体が出現した期間についてはわからなかった．

付記：本研究を行なうに際し，終始有益な助言，援助をしてくださった国立予防衛生研究所の北岡正見博士，大谷明博士，奥野剛博士，緒方隆幸博士，高橋三雄博士ならびに武田薬品工業株式会社光工場細菌製剤部金子順一博士，山本繁夫博士に深謝する．また当研究室の文屋ハルエ技師の助力に対し謝意を表する．なお本報の要旨は第10回日本伝染病学会西日本地方会総会（久留米市，1962）において発表した．

文献

1) 金子廉次郎：流行性脳炎流行地に於ける蚊に就いての実験（第1報）．東京医事新誌 3005, 3188, **1936.**

2) 松尾喜久男：コガタアカイエカ *Culex tritaeniorhynchus* Gilesとシロハシイエカ*Culex vishnui* Theobald の分類学的研究．京都府立医科大学雑誌 65(3), 581-621, **1959.**

3) Buescher, E. L., Scherer, W. E., Rosenberg, M. Z., Gresser, I., Hardy, J. L. & Bullock, H. R.: Ecologic studies of Japanese encephalitis virus in Japan, II Mosquito infection. Amer. J. Trop. Med. & Hyg. 8 (6), 651-664, **1959.**

4) Matsuyama, T., Oya, A., Ogata, T., Kobayashi, I., Nakamura, T., Takahashi, A. & Kitaoka, M.: Isolation of arbor viruses from mosquitoes collected at live-stock pens in Gumma Prefecture in 1959. Jap. J. Med. Sci. & Biol. 13(4-5-6), 191-198, **1960.**

5) Clarke, D. H. & Casals, J.: Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with Arthropod-borne viruses. Amer. J. Trop. Med. & Hyg. 7(5), 561-573, **1958.**

6) 国立予防衛生研究所ウイルス・リケッチア部ウイルス第4室：日本脳炎ウイルスの血球凝集反応及び血清診断のための血球凝集抑制反応の新しい方法について．第2版，24p.，国立予防衛生研究所ウイルス・リケッチア部ウイルス第4室，東京，**1962.**

7) 国立予防衛生研究所ウイルス・リケッチア部ウイルス第4室：血清診断のためのウイルス補体結合反応（Kolmer）の少量法の術式について．18 p.，国立予防衛生研究所ウイルス・リケッチア部ウイルス第4室，東京，**1962.**

8) Oya, A., Okuno, T., Ogata, T., Kobayashi, I. & Matsuyama, T.: Akabane, a new arbor virus isolated in Japan. Jap. J. Med. Sci. & Biol. 14(3), 101-108, **1961.**

9) 山田信一郎：流行性脳炎ト蚊トノ関係．東京医学会雑誌 48(12), 176-183, **1933.**

10) 三田村篤志郎・北岡正見・森和雄・大久保薫：自然界の蚊における日本流行性脳炎病毒保有の証明．蚊媒介説の一新根拠．東京医事新誌 3076, 820-824, **1938.**

11) 三田村篤志郎・北岡正見・渡辺漸・天神智・細井輝彦・関応一・長畑一正・徐慶一郎・清水盈行：昭和13年に於ける岡山市の蚊の季節的消長並びにその有毒性について．東京医事新誌 3144/3145, 1980-1983, **1939.**

12) 三田村篤志郎・北岡正見・渡辺漸・天神智・水原敬介・仲里朝雄・清水盈行：昭和14年11月から15年10月までの期間中の岡山市に於ける蚊の出現

消長とその日本流行性脳炎病毒保有について，特に蚊の弱毒性と流行との関係について．日本医学及び健康保険 3270, 26-31, **1942**.

13) Mitamura, T. & Kitaoka, M.: Seasonal occurrence of mosquito in Okayama 1946 and infectivity of the mosquito with Japanese B encephalitis virus. Transovary infection of the virus in mosquito. Jap. Med. J. 3 (3), 141-145, **1950**.

14) Mitamura, T., Kitaoka, M. & Imai, M.: Seasonal occurrence of mosquito and its infectivity of Japanese B encephalitis virus in Okayama City 1942, relationship between the grade of epidemic and the infectivity of mosquito. Jap. Med. J. 3(3), 149-159, **1950**.

15) 福見秀雄・熊沢与市・芦田光三・長畑一正・景山博文・関応一・秋元寿恵美・森和雄：昭和12年夏季における岡山市の蚊族の季節的消長について．東京医事新誌 3076, 810-811, **1938**.

(受付　1966-4-20)

SUMMARY

In an attempt to learn the local pattern of the natural infection of the vector mosquitoes with Japanese encephalitis, a series of field studies was conducted in the suburbs of Fukuoka City, Uchihashi village, Kasuya-gun, during the period from July 13 to September 7, 1962.

The seasonal prevalence of the vector mosquitoes was measured by means of light trap collections. Three light traps were located respectively in cattle shelters, and they were operated from sunset to sunrise one night per seven to ten days. The mosquito infection was determined by means of virus isolation from the mosquito materials, which were collected with the aid of aspirators inside animal shelters and by a carbon dioxide-baited trap outdoors. The virus isolations were made by means of intracerebral inoculation of the emulsions of pooled mosquitoes into three- to seven-day-old suckling mice.

1) *Seasonal prevalence of the mosquitoes of* ***Culex tritaeniorhynchus-vishnui*** *complex* : Of the three mosquito collections made by the respective light traps, only one was satisfactory to indicate the population dynamics of the vector mosquitoes. The result indicates that the population of the vector mosquitoes was the most prevalent in the beginning of August. One of the other two mosquito collections failed in operating the light trap under uniform condition throughout, and the other was too poor in number of mosquito to indicate population dynamics.

2) *Virus isolations from the vector mosquitoes* : A total of 3,831 female mosquitoes of *Culex tritaeniorhynchus-vishnui* complex in 41 pools were available for virus isolation test through the whole period of study. Finally, the 3 pools of the mosquitoes collected on August 6 were found to be positive for virus. The three isolated strains were designated respectively as JaFAr-1462, JaFAr-1762 and JaFAr-2262, and were serologically identified as Japanese encephalitis virus by means of hemagglutination test with goose cells and of hemagglutination-inhibition and complement-fixation tests with the hyperimmune mouse sera against Nakayama-NIH, JaGAr #01 and one of the isolated strains JaFAr-1462.

Besides the three successful isolations above, it is presumable that more additional isolations might be successful in some of the other mosquito pools. In the present study, the mosquito materials had been stored in a dry ice jar until inoculation under condition of emulsion. The interval from emulsification to inoculation was over ten days in considerable number of the negative cases. Such long preservation of mosquito emulsion must make virus isolation unsuccessful. Consequently, the authors remain undefined as to the period and pattern of mosquito infection in that year, but may draw a conclusion that the mosquitoes infected with Japanese encephalitis virus must have densely distributed in this area at the peak time of the total population of the vector mosquitoes.

SEASONAL PREVALENCE AND JAPANESE ENCEPHALITIS VIRUS INFECTION OF *CULEX TRITAENIORHYNCHUS-VISHNUI* COMPLEX IN THE SUBURBS OF FUKUOKA CITY IN 1963.

Hideho YAMAMOTO, Katsumi TAKAHASHI*1) and Kenzi MANAKO

The Fukuoka Prefectural Institute of Public Health

(Director : Dr. Kenzi MANAKO)

The matters of epidemiological significance on the vector mosquitoes of Japanese encephalitis virus have been repeatedly demonstrated in Okayama City and in the certain areas of Kanto plain by the previous authors of Japan and by the scientists concerned with the medical research laboratories of U. S. Army or Navy, while, except for the negative result reported by Kaneko,[1] any attempt to learn these facts has been not undertaken in Shikoku and Kyushu, where large-sized outbreaks of human encephalitis have been frequently reported.

In 1962, the present authors[2] succeeded in isolating the certain strains of Japanese encephalitis virus from the wild-caught mosquitoes of *Culex tritaeniorhynchus-vishnui* complex, which has been generally accepted as the most suspected natural vector. In 1963, their investigations were designed to determine the seasonal prevalence, the time of infection and the infection frequency of the mosquitoes of *C. tritaeniorhynchus-vishnui* complex in the suburbs of Fukuoka City.

MATERIALS AND METHODS

In the present paper, the mosquitoes examined were confined to *Culex tritaeniorhynchus* Giles including some of *C. vishnui* (auct. nec Theobald, 1901).*2) *C. tritaeniorhynchus* has been well established by the previous authors as the principal vector of Japanese encephalitis virus, while so-called *C. vishnui* remains undetermined in vector effectiveness in Japan. Now a problem arises in distinguishing the adult mosquitoes of the two species. According to the extensive studies made by Matsuo,[3] the adult mosquitoes of the two species are, especially in female, hardly distinguishable from each other in their external features. Therefore, it will be suitable for convenience to treat the mosquitoes of the two species as *C. tritaeniorhynchus-vishnui* complex.

Study Site. The studies were carried out at Uchihashi village, Kasuya-gun, which is located 3 km northeast of Fukuoka City and is surrounded by the vast paddy field. The village has 86 households, the majority of which keep one or two head of cattle. In

*1) Present adress : Nagasaki Prefectural Institute of Public Health.

*2) Colless[4] pointed out that the Malaysian form of the mosquitoes which hitherto had been called *Culex vishnui* was apparently separable from the type specimen of *Culex vishnui* Theobald, 1901, and he established the new name *C. pseudovishnui* Colless, 1957 for the mosquitoes as a distinct species. Although the Japanese form of the so-called *C. vishnui* is also different from the Theobald's species, the senior of the present authors remains some question whether the Japanese form is exactly identical with the Malaysian form or not. For this reason, he deferred to apply the Colless' name *C. pseudovishnui* for the Japanese form of the mosquitoes.

1963, the 10 confirmed cases of Japanese encephalitis were reported in Kasuya-gun. *[1]

Collection of Mosquito. In order to determine the seasonal prevalence of the mosquito population, the periodical mosquito collections had been conducted in the period from May 28 to October 3, 1963 using New Jersey light traps equipped with 60 watt bulbs. In the period from May 28 to July 4, two light traps were operated at the points B and F (Fig. 2). Since July 16, another light trap was operated at the point H (Fig. 2), adding the preceding two. At the points B and F the light traps were located just before the entrance of the respective cattle shelters, and at the point H the light trap was located inside a fowl shelter, in which about 200 fowls had been raised. At every point, the light trap was hung from the beam of the animal shelter at 1.5 m above ground level (Fig. 3, B), and was operated one night per seven to ten days from sunset to sunrise.

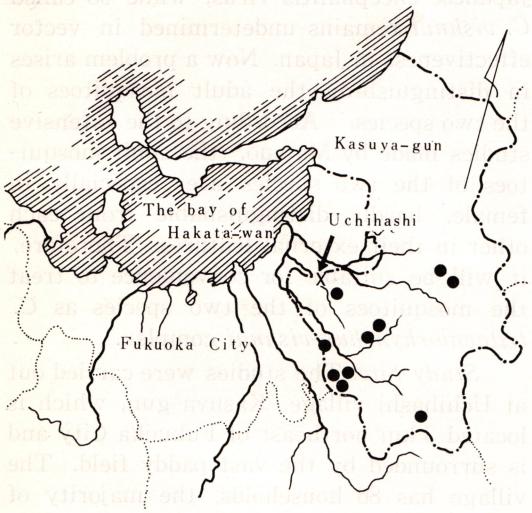


Fig. 1. Study site and incidence of the patients with Japanese encephalitis in Kasuya-gun in 1963.

Study site : Uchihashi village, Kasuya-gun, Fukuoka Prefecture. A solid circle representing a patient confirmed through serological tests.

For the purpose of providing materials for virus isolation test, the mosquitoes were collected in the same nights that the light traps were operated. The mosquito collections on this purpose were principally made with the aid of aspirators in animal shelters, and supplemented by a carbon dioxide-baited trap. In animal shelters, the mosquitoes resting on the walls were picked up with aspirators. The carbon dioxide-baited trap was set on the ground of the station house (Fig. 2, E). These two collecting works were usually started just before sunset and continued for about four hours. The mosquitoes collected were promptly transfered

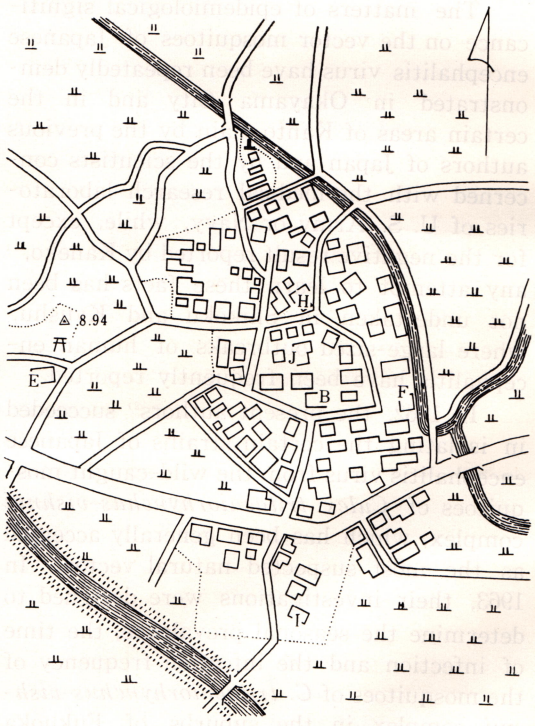


Fig. 2. A sketch-map showing the details of study site.

The light traps were located at B, F and H, the mosquito collecting with aspirators was carried out at I and J, and the carbon dioxide-baited trap was located at E.

B, F and J : Cattle shelter, E : Station house, H : Fowl shelter, I : Pig shelter

*[1] From the information of the Department of Health, Fukuoka-ken Administration.









Fig. 3. Study site and collecting spots.
A : Wide outlook of the village, B : Cattle shelter F, C : Fowl shelter H, D : Pig shelter I

into different cages by method and by source, and kept alive at room temperature until identification.

At the station house of the study site, the mosquitoes were anesthetized with ethel and identified under a binocular microscope using 40×diameters of magnification. After identification only the unengorged females of *C. tritaeniorhynchus-vishnui* complex were pooled in rubber-stoppered glass tubes and sealed with pieces of adhesive tape. The individual number of the mosquitoes contained in a pool did not exceed 200. The mosquito pools were immediately stored in a dry ice jar and brought to the laboratory next morning. In the laboratory the mosquito pools were stored in a mechanical deep freezer at −70°C until inoculation.

Virus Isolation from the Mosquitoes. The techniques employed were essentially those described by Buescher et al.,[5] as slightly modified by Matsuyama et al.[6] The pooled mosquitoes were triturated in a mortar with a pestle adding 5% chick serum in phosphate buffered saline (pH 7.6), which contained penicillin 500 ut/m*l* and streptomycin 500 μg/m*l*. The volume of diluent was approximately as follows:

1 m*l*	10 mosquitoes
2 m*l*	50 mosquitoes
4 m*l*	100 mosquitoes
6 m*l*	200 mosquitoes

After keeping the mosquito emulsion at 4°C for 60 minutes, it was centrifuged preliminarily at 3,000 rpm for 10 minutes and finally at 10,000 rpm for 30 minutes in a refrigated centrifuge. The resulted supernatant was inoculated intracerebrally (0.02 m*l*/mouse) into one litter of three- to five-day-old suckling mice of gpc race. The mice inoculated were observed daily for two weeks. If the mice exhibited any sign of central nervous system disturbance or died, their brains were removed, tested for bacterial and mycotic contamination with thioglycolate medium, and a part of them was inoculated intracerebrally into one or two litters of suckling mice for confirmation of virus isolation and for identification of the virus. The mosquito pools causing no disease within two weeks were regarded as negative for virus. Blind passages were not made.

Serological Confirmation of the Viruses Isolated. The transmissible agents isolated were tentatively identified by means of hemagglutination and hemagglutination-inhibition tests. The Okuno-Oya-Ito modification[7] of the original techniques described by Clarke and Casals[8] was applied in preparing hemagglutinating antigen and in executing the tests.

The hemagglutinating antigens were prepared from the infected mouse brains of the second to fifth passage by sucrose-acetone extraction, and processed to give a 25% solution of original brain weight when a dried powder was rehydrated with saline.

In all but two cases the cells were prepared from a goose and preserved in dextrose-gelatin-veronal. In the two cases of JaFAr-13363 and JaFAr-15363 the cells were prepared from one-day-old chicks.

For hemagglutination-inhibition test, hyperimmune mouse sera were prepared against each of the two established strains of Japanese encephalitis virus, Nakayama-NIH and JaGAr #01, and one of the isolated strains, JaFAr-11363. The Nakayama-NIH strain was obtained from the Chemo- and Sero-terapeutic Research Institute, Kumamoto at the multiple+36th mouse brain passage level, and the JaGAr #01 strain from the National Institute of Health of Japan, Tokyo at the fourth suckling mouse brain passage level. In this laboratory, the viruses of the former were passed through suckling mouse brains seven times, and those of the latter through suckling mouse brains twice.

Groups of 20 to 30 adult mice were immunized intraperitoneally with living virus of the respective strains. In each group, the mice received three injections at seven- to ten-day intervals and one injection twenty-day after the third; a mouse received 0.2m*l* of 10^{-3} dilution of infected suckling mouse brain at the initial injection, and the equal volume of 10^{-1} dilution of the same material at the second to the fourth injec-

tion. The mice were bled a week following the fourth injection. The sera were pooled by group and stored at −20° C until tested. When employed for hemagglutination-inhibition test, the sera were treated with pre-chilled acetone, not inactivated, and absorbed with goose cells.

RESULTS

Seasonal Prevalence of the Mosquito Population

The results of the light trap collections at the three points B, F and H are presented in Table 1 and illustrated in Fig. 4. Amongst the three points, the number of the mosquitoes collected was not so significantly different that it characterized each point, and its seasonal fluctuation was approximately parallel.

In the cattle shelters (B and F), the mosquitoes of *C. tritaeniorhynchus-vishnui* complex collected were engorged females in larger numbers, while in the fowl shelter (H) those were unengorged females in the largest numbers. In all the points, the male specimens formed a very small proportion of the whole mosquitoes collected.

Table 1. The number of the mosquitoes of *Culex tritaeniorhynchus-vishnui* complex collected in the three light traps.

Date mosq. collection		Light trap					
		B		F		H	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀
May	28	0	1	0	0	—	—
Jun.	12	0	0	0	1	—	—
	25	0	3	0	5	—	—
Jul.	4	0	1	1	3	—	—
	16	0	13	11	172	0	23
	24	0	22	6	140	0	123
	29	5	182	3	525	—	—
Aug.	6	—	—	22	1843	0	834
	13	0	490	11	1630	1	215
	20	1	151	5	566	—	—
	30	0	4	0	26	0	6
Sept.	9	1	54	0	89	0	4
	16	0	7	0	25	0	1
Oct.	3	0	0	0	0	0	0

In the period from the end of May to the middle of July, a small number of specimens of *C. tritaeniorhynchus-vishnui* complex were collected by the light traps. The number of the specimens collected in that time was 14♀♀ and 1♂ in total. The first detection of male specimens was on July 4. The number of the mosquitoes collected by the light traps increased abruptly in the end of July, and became the most abundant in the beginning of August. It reduced significantly in the end of August, and again increased a little on September 9. This little re-eminence was observed also in the mosquito collections made for virus isolation test. On October 3, in any of the three light traps the mosquito was not found, and only 3♀♀ were secured with aspirators in a cattle shelter.

Virus Isolation from the Mosquitoes

A total of 12,569 mosquitoes in 77 pools were available for virus isolation tests throughout the whole period of study. The results of virus isolation tests are summarized in Table 2. The overwhelming majority of the mosquitoes tested were collected with the aid of aspirators in animal shelters. Although a great number of mosquitoes were found in the carbon dioxide-baited trap in early August, only 347♀♀ of them were tested in 2 pools. In the other time than that, the trap attracted only a few specimens of *C. tritaeniorhynchus-vishnui* complex.

In the earlier season, the period from May 28 to July 24, 688 mosquitoes were collected and tested in 9 pools, and they were exclusively negative for virus. The initial isolation of virus was made in one of the 9 pools made up of the 1,545 mosquitoes collected on July 29, but no virus was recovered from the 4 pools made up of the 564 mosquitoes collected on August 2. In the subsequent period from August 6 to 20, 8,087 mosquitoes were collected and tested in 41 pools. As the result of the tests, 27 of these mosquito pools were positive for virus. In the later period, the number of the mosquitoes tested became smaller with

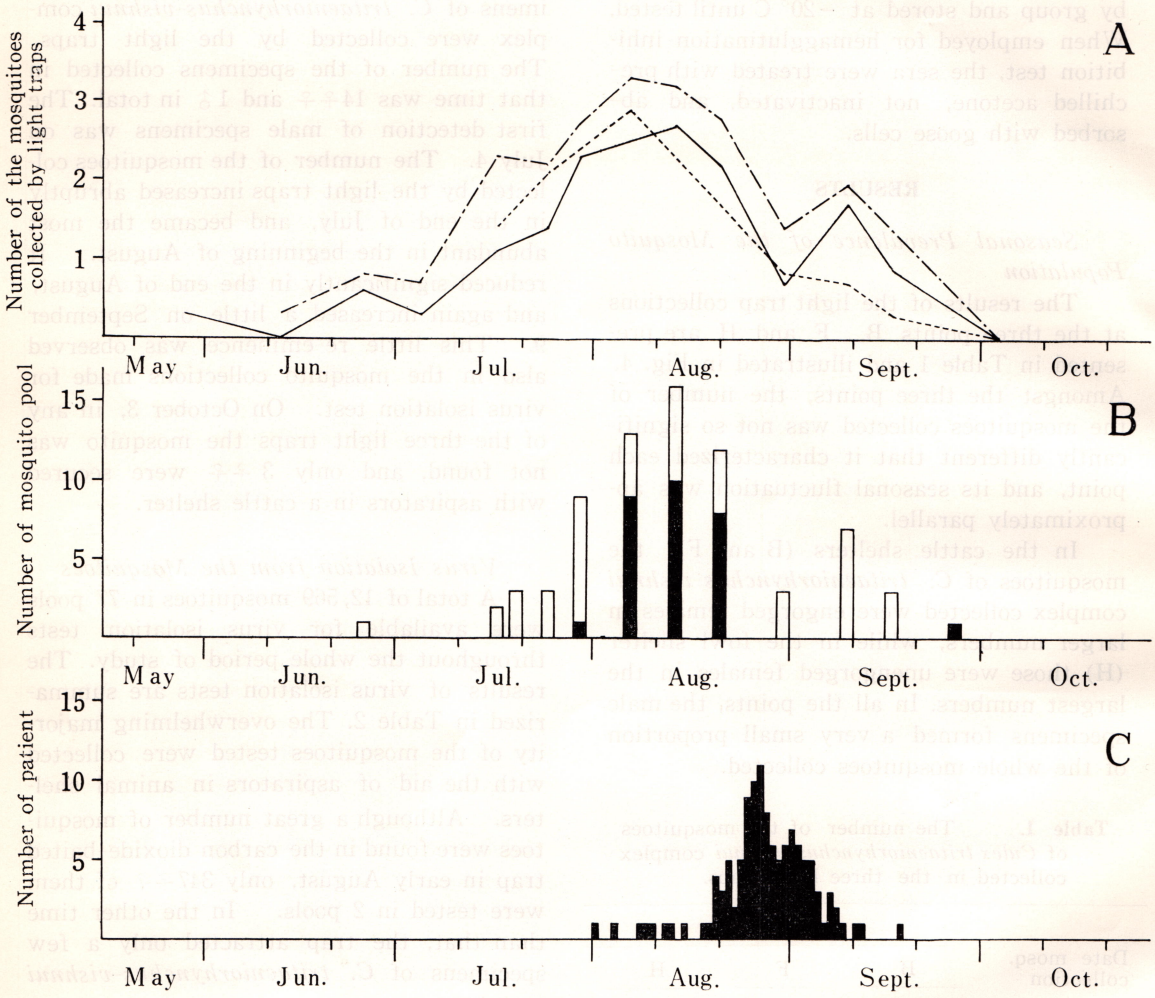


Fig. 4. Seasonal prevalence and Japanese encephalitis virus infection of the vector mosquitoes at the study site and Japanese encephalitis epidemic in Fukuoka Prefecture in 1963.

A : Seasonal prevalence of the vector mosquitoes, *Culex tritaeniorhynchus-vishnui* complex. Graphical representations were made from the results of light trap collections. The solid line showing the result in the cattle shelter B, the chain that in the cattle shelter F, and the broken that in the fowl shelter H. The indecies are expressed as the logarithm of the number of mosquito plus 1.

B : Virus isolations from the vector mosquitoes. A solid part showing the number of the positive pools for virus.

C : Daily occurrence of the patients with Japanese encephalitis, who were confirmed through serological tests. The data are from the publication by Manako et al.[20]

the rapid decrease in the mosquito population. The 13 pools made up of the 1,674 mosquitoes collected on August 30 and September 9 and 16 were exclusively negative for virus, but one pool containing 10 mosquitoes collected on September 26 was positive for virus. Thereafter virus isolation was not made owing to extreme scantiness of mosquito material.

Finally 29 strains of virus were isolated from the mosquitoes of *C. tritaeniorhynchus-vishnui* complex. The isolated strains are designated as JaFAr (Japan, Fukuoka, Arthropod born)-No. of mosquito pool plus 1963 according to the manner proposed by Oya et al.[9]

Table 2. Isolation of Japanese encephalitis virus from the mosquitoes of *Culex tritaeniorhynchus-vishnui* complex.

Date mosq. coll.	Number of mosq.	Number of pool	Virus positive	Isolation rate (%)
May 28	1	1	0	0
Jun. 12	0	—	—	—
25	13	1	0	0
Jul. 4	3	—	—	—
16	112	2	0	0
19	211	3	0	0
24	352	3	0	0
29	1545	9	1	11.1
Aug. 2	564	4	0	0
6	2484	13	9	69.2
13	3153	16	10	62.5
20	2450	12	8	66.7
30	151	3	0	0
Sept. 9	1186	7	0	0
16	337	3	0	0
26	10	1	1	100
Oct. 3	3	—	—	—

Table 3. Comparison among the isolation rates in various mosquito sources.

Mosquito source	Number of mosq.	Number of pool	Virus positive	Isolation rate (%)
Pig shelter	4645	27	10	37.0
Cattle shelter	5785	35	15	42.9
Fowl shelter	842	5	2	40
Carbon dioxide-baited trap	347	2	1	50
Mix	950	9	1	11.1

A comparison of virus isolation rate among different mosquito sources is given in Table 3.

Serological Confirmation of the Viruses Isolated

Hemagglutinating antigens were prepared from all of the 29 strains isolated. With these antigens, the series of hemagglutination tests and hemagglutination-inhibition tests were completed. For the reference, Nakayama-NIH and JaGAr #01 antigens were simultaneously tested. As the result of hemagglutination tests carried out at pH 6.2, 6.4, 6.6, 6.8 and 7.0, every antigen of the isolated strains was found to have a good titer of hemagglutination. In all cases, the maximum titer of hemagglutination was found at pH 6.6 or at pH 6.6 to 6.8. In this respect, the antigens were clearly differentiated from the Nakayama-NIH antigen, but preferably related to the JaGAr #01 antigen. The hemagglutination pattern of each antigen was presented in Table 4, referring to those of the Nakayama-NIH and JaGAr #01 antigens.

Employing 8 units of the above antigens, a series of hemagglutination-inhibition tests was performed with the hyperimmune mouse sera against Nakayama-NIH, JaGAr #01 and JaFAr-11363 strains. Both the two sera against Nakayama-NIH and JaGAr #01 strains inhibited the hemagglutinating activity of all the antigens of the isolated strains, and also the serum against JaFAr-11363 strain inhibited those of the Nakayama-NIH and JaGAr #01 antigens. Moreover, the serum against JaFAr-11363 strain inhibited the hemagglutinating activity of the other antigens of the isolated strains as well as the homologous one. The reciprocal titers of the three sera against each of the antigens tested were given in Table 5, in which the difference among the strains was hardly recognizable.

Table 4. Result of the hemagglutination tests with the antigens of the 29 isolated strains.

Strain	Antigen	Mouse brain passage	Hemagglutination titer at pH					
			6.0	6.2	6.4	6.6	6.8	7.0
Nakayama-NIH	AEFD		3200	6400	**12800**	3200	800	—
JaGAr #01	SAFD	6	—	6400	12800	**25600**	**25600**	6400
JaFAr-11363	SAFD	3	—	12800	12800	**25600**	12800	3200
JaFAr-11963	SAFD	4	—	3200	6400	**12800**	**12800**	3200
JaFAr-12163	SAFD	4	—	1600	3200	**6400**	**6400**	3200
JaFAr-12263	SAFD	4	—	3200	12800	**25600**	12800	3200
JaFAr-12463	SAFD	2	—	3200	6400	**12800**	**12800**	6400
JaFAr-12563	SAFD	4	—	6400	12800	**12800**	**12800**	1600
JaFAr-12663	SAFD	3	—	3200	6400	**12800**	6400	800
JaFAr-12963	SAFD	3	—	3200	6400	**12800**	**12800**	1600
JaFAr-13263	SAFD	3	—	3200	6400	**12800**	6400	3200
*JaFAr-13363	SAFD	3	—	400	800	**3200**	**3200**	1600
JaFAr-13863	SAFD	2	—	1600	3200	**12800**	6400	1600
JaFAr-13963	SAFD	2	—	1600	6400	**12800**	6400	1600
JaFAr-14163	SAFD	3	—	800	1600	**3200**	1600	800
JaFAr-14263	SAFD	3	—	1600	3200	**6400**	3200	800
JaFAr-14363	SAFD	3	—	1600	3200	**12800**	6400	1600
JaFAr-14463	SAFD	3	—	1600	3200	**12800**	6400	1600
JaFAr-14563	SAFD	2	—	3200	6400	**12800**	6400	3200
JaFAr-14763	SAFD	3	—	6400	12800	**25600**	12800	3200
JaFAr-14963	SAFD	2	—	3200	6400	**12800**	**12800**	3200
JaFAr-15163	SAFD	3	—	3200	6400	**25600**	12800	3200
*JaFAr-15363	SAFD	2	—	1600	3200	**6400**	**6400**	1600
JaFAr-15463	SAFD	2	—	800	3200	**6400**	**6400**	3200
JaFAr-15563	SAFD	2	—	3200	6400	**12800**	**12800**	3200
JaFAr-15663	SAFD	2	—	3200	6400	**25600**	12800	3200
JaFAr-15763	SAFD	2	—	3200	6400	**12800**	6400	3200
JaFAr-15963	SAFD	2	—	3200	6400	**12800**	**12800**	3200
JaFAr-16263	SAFD	3	—	3200	6400	**12800**	6400	3200
JaFAr-16463	SAFD	2	—	800	1600	**3200**	1600	800
JaFAr-17863	SAFD	4	—	3200	12800	**25600**	**25600**	3200

Abbreviations. AEFD : Freeze-dried acetone-ethel antigen, which was supplied from the Chemo- and Sero-terapeutic Research Institute, Kumamoto. SAFD : Freeze-dried sucrose-acetone antigen

* One-day-old chick erythrocytes were applied

Table 5. Result of the hemagglutination-inhibition tests with the hyperimmune mouse sera and the antigens of the 29 isolated strains.

Strain	Antigen	VAD pH	16 ut	Antiserum (Mouse)		
				Nakayama-NIH 4 inj. No. 2412	JaGAr #01 4 inj. No. 2648	JaFAr-11363 4 inj. No. 2292
Nakayama-NIH	AEFD	6.4	1 : 800	7	5	6
JaGAr #01	SAFD	6.8	1 : 1600	5	6	5
JaFAr-11363	SAFD	6.6	1 : 1600	5	5	6
JaFAr-11963	SAFD	6.8	1 : 800	5	6	6
JaFAr-12163	SAFD	6.8	1 : 400	5	5	5
JaFAr-12263	SAFD	6.6	1 : 1600	6	6	6
JaFAr-12463	SAFD	6.8	1 : 800	5	5	5
JaFAr-12563	SAFD	6.8	1 : 800	5	6	6
JaFAr-12663	SAFD	6.6	1 : 800	5	6	6
JaFAr-12963	SAFD	6.8	1 : 800	5	6	6
JaFAr-13263	SAFD	6.6	1 : 800	5	5	5
*JaFAr-13363	SAFD	6.8	1 : 200	4	5	—
JaFAr-13863	SAFD	6.6	1 : 800	5	6	5
JaFAr-13963	SAFD	6.6	1 : 800	5	5	6
JaFAr-14163	SAFD	6.6	1 : 200	5	5	5
JaFAr-14263	SAFD	6.6	1 : 400	6	6	6
JaFAr-14363	SAFD	6.6	1 : 800	5	5	5
JaFAr-14463	SAFD	6.6	1 : 800	5	5	5
JaFAr-14563	SAFD	6.6	1 : 800	5	6	6
JaFAr-14763	SAFD	6.6	1 : 1600	5	6	6
JaFAr-14963	SAFD	6.6	1 : 800	5	5	5
JaFAr-15163	SAFD	6.6	1 : 1600	5	5	6
*JaFAr-15363	SAFD	6.6	1 : 400	5	5	—
JaFAr-15463	SAFD	6.6	1 : 400	5	5	5
JaFAr-15563	SAFD	6.8	1 : 800	5	5	5
JaFAr-15663	SAFD	6.6	1 : 1600	5	5	5
JaFAr-15763	SAFD	6.6	1 : 800	5	5	5
JaFAr-16263	SAFD	6.6	1 : 800	5	6	6
JaFAr-16463	SAFD	6.6	1 : 200	5	5	6
JaFAr-17863	SAFD	6.8	1 : 1600	5	5	5

Abbreviations. Refer to those in Table 4.

* The tests were carried out in a separate series with chick cells and the separate lots of sera. Sera employed : Anti-Nakayama-NIH mouse serum, 4 injections, No. 423; Anti-JaGAr #01 mouse serum, 4 injections, No. 471.

The titer of hemagglutination-inhibition is represented by the number of serum dilution tube (twofold dilution). The initial dilutions of the three sera are 1 : 40.

DISCUSSION

The mosquito collection made by the carbon dioxide-baited trap and that made by picking up in animal shelters were inadequate to estimate the seasonal prevalence of the vector mosquitoes. The carbon dioxide-baited trap failed to produce adequate numbers of the mosquitoes in the early and late seasons. This was satisfactory only in mid-summer. Recently Omori et al.[10] demonstrated that carbon dioxide-baited trap was superior in obtaining a large number of the mosquitoes of *C. tritaeniorhynchus* especially in early spring. The discrepancy between the two results may be due to environmental difference at the place where the traps were located. The mosquito collection made by picking up with aspirators in animal shelters was of great advantage to provide an adequate number of the mosquitoes alive for virus isolation tests, but it was found to be unfavourable to measure the mosquito population. The collecting works in this way had been prosecuted rather freely in time and place in order to obtain as abundant the mosquitoes as possible.

Compared with the mosquito collections mentioned above, the mosquito collection made by the light traps was reliable to estimate the seasonal prevalence of the mosquito population, because it had been operated throughout the whole period under uniform condition. The results of the three light trap collections were approximately similar, regardless of the fact that the light traps were operated respectively at different animal shelters. It can readily be understood that the results from the two cattle shelters were similar, as the environmental elements were essentially equivalent between the two cattle shelters B and F. However, it will be noteworthy that the mosquitoes were collected in large numbers at the fowl shelter H as in the cattle shelters. As a general rule, it is well accepted that the mosquitoes of *C. tritaeniorhynchus* are less attractable to fowl. The above fact was probably caused by phototropism to trap light or chemotropism to carbon dioxide gas exhaled from an army of fowls. This interpretation may be supported by the other fact that the most of the mosquitoes collected in the fowl shelter H were unengorged females while those in cattle or pig shelters were engorged ones.

The possible curves of seasonal prevalence of the mosquitoes were illustrated in Fig. 4. The curves apparently show that the mosquitoes occurred predominantly during the period from the end of July to the middle of August and that the peak of occurrence was in the beginning of August. The population of the vector mosquitoes was abruptly decreased in the end of August and increased again a little in the beginning of September. The abrupt depression in the end of August may be caused to the extensive application of insecticide for rice pest control. In this area the first extensive control for rice pests was carried out on July 23 and the second on August 25. Then, the little re-eminence of the mosquito population may be recognized as a recovery from damage caused by the insecticide application.

On the other hand, the results of virus isolation tests showed that the infected mosquitoes were densely distributed in this area through the prevailing season of the mosquitoes.

The initial isolation of the virus was made from the mosquitoes collected on July 29, but none was from those collected on August 2. This fact suggests that the proportion of infected mosquitoes to total population was not sufficiently grown yet in that time. Subsequently, the number of the infected mosquitoes had grown very rapidly. In the period from August 6 to 20 the isolation rate exceeded 60 per cent. This value gives 1 : 299 of minimum infection frequency, assuming that only one infected mosquito was contained in each pool. Although it is rather difficult, owing to the difference in pool size, to make an accurate comparison among the infection frequencies demonstrated by the various authors, the value ranks high among those hitherto reported.

Since August 30, the results seemingly

represent obvious wane of mosquito infection in accordance with declining of the mosquito population. This is probably resulted from smaller numbers of the materials tested. However, one successful isolation was made from the 10 mosquitoes collected on September 26. Although this is the latest isolation of Japanese encephalitis virus from mosquitoes in Japan except Okinawa[11] as regards the date of mosquito collection, such successful isolations in the later season have been already demonstrated by Buescher et al.[5] at Sagiyama heronry in 1956. In their paper, one was made from the mosquitoes collected by a heron-baited magoon trap on September 14 and the other from those by a pig-baited magoon trap on September 21. These evidences reveal rather a fact that some of the mosquitoes infected in midsummer had survived until autumn season than a fact that some mosquitoes were newly infected. According to the serological surveys made by Scherer et al.,[12] Tamasaki et al.[13)-14)] and Kawakubo,[15)-16)] swine, the most suspected amplifier, fed in epidemic areas acquire specific antibody at a rate of 90 per cent or more by late summer at latest. Therefore, the possibility that some mosquitoes acquired virus in autumn season becomes smaller. In contrast, Gresser et al.[17] showed the evidence that the infected mosquitoes of *C. tritaeniorhynchus* were as capable of surviving for three to four weeks as normal ones. Aside from the scattered isolations made in late July and late September, it appears demonstrative that the prevailing time of mosquito infection was the about two to three weeks from the beginning to the end of August.

There is a problem whether the infected mosquitoes were, even in a study site, predominantly found around a particular place or not. In connection with this problem, Arai et al.[18] showed an interesting result that the isolation rate was far higher in a confined group of the mosquitoes which were collected around a cattle shelter on one particular day of late July than in the others. For this problem, the authors can not draw any conclusion, but a comparison of isolation rate among the mosquito groups classified by source shows no significant difference. Probably the mosquito infection in this area occurred simultaneously all over the area. The distribution of infected mosquitoes, however, undergoes a great change with the lapse of time. The most convincing approach to the problem will be to determine the dispersion of the vector mosquitoes.

In 1963, a large-sized outbreak of human encephalitis occurs in and around Fukuoka Prefecture. One hundred and twenty patients were serologically diagnosed as Japanese encephalitis in the department of serology of the institute. The further studies on human encephalitis in Fukuoka Prefecture have been presented by Manako et al.[19] All the patients with serological confirmation occurred between August 1 and September 18. The vast majority of the patients were during the about four weeks from August 18 to September 12, and the peak of occurrence in late August. As is well known, it has been asserted by Mitamura et al.[20] and Wang et al.[21] that the mosquito infection occurs two-week prior to human epidemics. Also recognized is, in the present study, the interval of about two weeks between the median times of the two phenomena.

Judging from the facts discussed above, the essential feature of the mosquito infection in the present paper is similar to those presented by Wang et al.[21] and by Hurlbut[22] in Taipei area, Taiwan, but is somewhat differable from those by Buescher et al.[5] in Kanto plain, Japan.

SUMMARY

Since 1962, a series of studies to analyse the mode of mosquito infection with Japanese encephalitis virus in the suburbs of Fukuoka City has been progressed in Uchihashi village, Kasuya-gun, which is located 3 km northeast of Fukuoka City. In the present paper, both the seasonal prevalence and the pattern of natural infection of the vector mosquitoes, *Culex tritaeniorhynchus-vishnui* complex, are en-

tirely presented throughout the period from May 28 to October 3 in 1963.

The seasonal prevalence of the mosquito population was indicated by the individual numbers of the mosquitoes collected by light traps. The mosquito infection was determined by means of virus isolation from the mosquitoes collected in animal shelters and those collected by a carbon dioxide-baited trap.

1) *Seasonal prevalence of the vector mosquitoes*: The results of the three light trap colletions were approximately similar to each other. They apparently indicate that the mosquito population was explosively increased in late July and was rapidly decreased between the end of August and the beginning of September. The most predominant time of the mosquitoes was found in the beginning of August.

2) *Natural infection of the vector mosquitoes*: As the result of the virus isolation tests with the 12,569 female mosquitoes of *C. tritaeniorhynchus-vishnui* complex in 77 pools, 29 strains of virus were isolated. Of the 29 strains, 27 came from the mosquitoes collected between August 6 and 20, one from those collected on July 29, and the other from those collected on September 26. Aside from the two additional isolations, it will be determined that the prevailing time of mosquito infection was during the two to three weeks from the early part to the lete part of August.

3) *Correlation between the mosquito infection and the human epidemic*: The larger number of the patients confirmed through serological tests occur during August 18 to September 12. Then the mosquito infection is approximately two-week prior to the human epidemic, as compared the median times of the two phenomena.

Acknowledgements: The authors wish to express their gratitude to Dr. Masami Kitaoka, Dr. Akira Oya, Dr. Takeshi Okuno, Dr. Takayuki Ogata and Dr. Mitsuo Takahashi of the National Institute of Health of Japan, not only for their valuable suggestions, but also for their interest and encouragement. Thanks are also due to Dr. Jun'ichi Kaneko and Dr. Shigeo Yamamoto of the Hikari Plant of Takeda Chemical Industries, Ltd. for supplying a large number of mice for this study, and to Mr. Toyonaru Namba and Mrs. Harue Bunya of the laboratory for generous assistance in carrying out the study.

Abstract of this study was presented at the 16th anual meeting of the Japan Society of Sanitary Zoology, Kumamnto, 1964.

REFERENCES

1) Kaneko, R.: [An attempt to isolate the etiological agent of Japanese B encephalitis from mosquitoes in epidemic areas.] Tokyo Iji-shin-shi 3005, 3188, **1936** (Japanese).

2) Takahashi, K., Yamamoto, H., Otsuka, S. & Namba, T.: Isolations of Japanese encephalitis virus from the mosquitoes of *Culex tritaeniorhynchus-vishnui* complex collected in the suburbs of Fukuoka City. Rep. Fukuoka Pref. Inst. Pub. Heal. 4, 5-12, **1966** (Japanese with English abstract).

3) Matsuo, K.: Taxonomic studies on *Culex tritaeniorhynchus* Giles and *Culex vishnui* Theobald. J. Kyoto Pref. Med. Univ. 65 (3), 581-621, **1959** (Japanese with English abstract).

4) Colless, D. H.: Notes on the Culcine mosquitoes of Singapore. II. The *Culex vishnui* group (Diptera, Culicidae), with descriptions of two new species. Ann. Trop. Med. & Parasit. 51(1), 87-101, **1957**.

5) Buescher, E. L., Scherer, W. F., Rosenberg, M. Z., Gresser, I., Hardy, J. L. & Bullock, H. R.: Ecologic studies of Japanese encephalitis virus in Japan. II. Mosquito infection. Amer. J. Trop. Med. & Hyg. 8 (6), 651-664, **1959**.

6) Matsuyama, T., Oya, A., Ogata, T., Kobayashi, I., Nakamura, T., Takahashi, M. & Kitaoka, M.: Isolation of arbor viruses from mosquitoes collected at live-stock pens in Gumma Prefecture in 1959. Jap. J. Med. Sci. & Biol. 13 (4-5-6), 191-198, **1960**.

7) Okuno, T., Oya, A. & Ito, T.: The identification of Negishi virus presumably new member of Russian spring-summer encephalitis virus family isolated in Japan. Jap. J. Med. Sci. & Biol. 14(2), 51-59, **1961**.

8) Clarke, D. H. & Casals, J.: Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. Amer. J. Trop. Med. & Hyg. 7(5), 561-573, **1958**.

9) Oya, A., Okuno, T., Ogata, T., Kobayashi, I. & Matsuyama, T.: Akabane, a new arbor virus isolated in Japan. Jap. J. Med. Sci. & Biol. 14(3), 101-108, **1961.**

10) Omori, N., Wada, Y., Kawai, S., Ito, S., Oda, T., Suenaga, O., Nishigaki, J., Hayashi, K. & Mifune, K.: Preliminary notes on collection of hibernated females of *Culex tritaeniorhynchus* in Nagasaki. Endem. Dis. Bull. Nagasaki 7(2), 147-153, **1965.**

11) Hurlbut, H. S. & Nibley, Jr. C.: Virus isolations from mosquitoes in Okinawa. J. Med. Ent., 1(1), 78-83, **1964.**

12) Scherer, W.F., Moyer, J. T., Izumi, T., Gresser, I. & McCown, J.: Ecologic studies of Japanese encephalitis virus in Japan. VI. Swine infection. Amer. J. Trop. Med. & Hyg. 8(6), 698-706, **1959.**

13) Tamasaki, K., Kawakubo, A. & Kutii, T.: Japanese B encephalitis of swine in Ibaraki Prefecture. I. Serum neutralizing antibodies of slaughtered swine. Sci. Rep. Fac. Agr. Ibaraki Univ. 2, 1-5 (Japanese with English abstract).

14) Tamasaki, K., Kutii, T. & Kawakubo, A.: An epizootical survey on Japanese B encephalitis among swine in Ibaraki Prefecture : Shift of neutralizing antibodies and occurrence of still-birth and abortion. J. Jap. Vet. Med. Ass. 13(7), 313-316, **1960** (Japanese).

15) Kawakubo, A.: Studies on neutralizing antibodies of swine serum against Japanese B encephalitis virus. Bull. Azabu Vet. Coll. 9, 185-195, **1961** (Japanese with English abstract).

16) Kawakubo, A.: Results of the 1961 survey on antibody against Japanese B encephalitis virus of swine sera. J. Jap. Vet. Med. Ass. 16(8), 301-304, **1963.**

17) Gresser, I., Hardy, J. L., Hu, S. M. K. & Scherer, W. F.: Factors influencing transmission of Japanese B encephalitis virus by a colonized strain of *Culex tritaeniorhynchus* Giles, from infected pigs and chicks to susceptible pigs and birds. Amer. J. Trop. Med. & Hyg. 7(4), 365-373, **1958.**

18) Arai, H., Buei, K., Ueba, N., Maeda, A., Hashimoto, K., Terashima, I. & Shioji, M.: [Epidemiological studies on Japanese encephalitis II.] Proc. Osaka Pub. Heal. Inst., Ed. Air and Pub. Heal. 2, 16-20, **1965** (Japanese).

19) Manako, K., Otsuka, S. & Yamamoto, H.: [Mosquito infection, swine infection and epidemic of Japanese encephalitis in Fukuoka Prefecture.] 16th Ann. Meeting, Nishi-Nippon Branch, Jap. Assoc. Inf. Dis. **1965.**

20) Mitamura, T., Kitaoka, M. & Imai, M.: Seasonal occurrence of mosquito and its infectivity of Japanese B encephalitis virus in Okayama City 1942, relationship between the grade of epidemic and the infectivity of mosquito. Jap. Med. J. 3(3), 149-159, **1950.**

21) Wang, S. P., Grayston, J. T. & Hu., S. M. K.: Encephalitis on Taiwan. III. Virus isolations from mosquitoes. Amer. J. Trop. Med. & Hyg. 11(1), 141-148, **1962.**

22) Hurlbut, H. S.: The pig-mosquito cycle of Japanese encephalitis virus in Taiwan. J. Med. Ent. 1(3), 301-307, **1964.**

(Received Apr. 10, 1966)

水中の微量ペンタクロルフェノールの定量について

福岡県衛生研究所（所長：真子憲治博士）

森　　彬

水田の除草剤として近年多く使用されているペンタクロルフェノール（PCP）は，河川水を原水とする飲料水への汚染がしばしば問題となる．

PCP の定量についてはいろいろな方法[1-7]があり水中の PCP の定量は，上出ら[8]によって二，三の方法が比較検討されている．また農薬衛生試験法[9]や工場排水試験法[10]（以下公定法という）にも収載されている．

水中の PCP を定量する場合に他の共雑物から分離する必要があるため，有機溶媒で抽出する方法や蒸留による方法が行なわれている．著者は蒸留法について検討し，留出量その他について若干の知見を得た．すなわち公定法に収載されている蒸留法によれば，試料水 500m*l* を蒸留して留液450m*l*をとり，これにキシレン10m*l*を加えて振り，PCP をキシレンに転溶させ，キシレン 5 m*l* をとって呈色操作を行なっている．この方法は蒸留に時間がかかり，操作も繁雑で微量の場合には誤差が大きい欠点がある．そこで必要な留出量ならびに留出液に直接呈色試薬を加えて定量する方法を検討し，好結果を得たので報告する．

試薬および装置

1　試薬

PCP 標準液：PCP（三井化学株式会社から譲り受けたもの）をベンゼンで再結晶したのち，その 500mg を 0.1*N* 水酸化ナトリウム液 50m*l* に溶かし，水を加えて 1*l* とする．この溶液は 1 m*l* 中 PCP 0.5mg を含み，これを水でうすめて 10μg/m*l* の液をつくり標準液とした．

緩衝液：Palitsch 海水用ホウ酸混合液すなわち0.2*M* ホウ酸の0.05*M* 塩化ナトリウム溶液と0.05*M* ホウ砂溶液を混合して pH 6.12，6.45，6.65，6.80，6.90，7.00，7.10，7.20，7.30，7.70 の10種のものをつくった．

4-アミノアンチピリン試液：0.2%水溶液

赤血塩試液：10%水溶液

キシレン：試薬特級

2　装置

光電分光光度計：日立 EPU-2A 型

pH 計：日立堀場M-4型

定　量　法

1　定量操作

試料水 500m*l* を 1*l* のフラスコにとり，リン酸 5 m*l* を加え，すり合わせ蒸留装置を用いて蒸留する．留出液 200m*l* を250m*l* の有栓メスシリンダーにとり，緩衝液（pH 7.0）15m*l* および塩化ナトリウム 5 g を加えて溶かし，0.2% 4-アミノアンチピリン試液7m*l* を加えて 1 回転倒してまぜ，ただちに10%赤血塩試液3m*l* およびキシレン 5m*l* を加えて約30秒間はげしく振りまぜる．5—10分間静置して分離したキシレン層を注意してとり，脚部に脱脂綿をつめた漏斗でロ過し，10㎜のセルにとり，キシレンを対照として 574mμ における吸光度を測定する．別に水 200m*l* について同様に操作して空試験値を求め，測定値から空試験値を差し引いてあらかじめ作成した検量線から PCP の含量を求める．水道など塩素処理を行なった検水には，硫酸第一鉄を加えて遊離塩素を消去したのち蒸留する．

2　検量線の作成

PCP 標準液の 1 m*l*，2 m*l*，3 m*l*，5 m*l*，7 m*l*，10m*l*

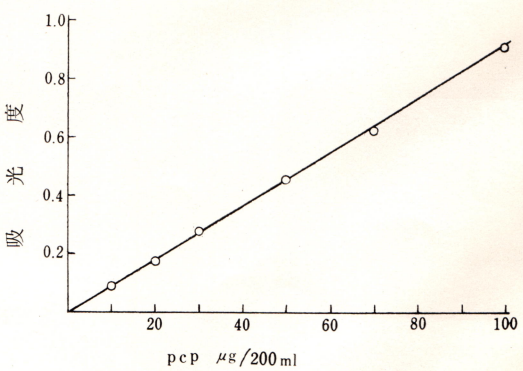


図 1　PCP の検量線

Akira MORI : Colorimetric determination of pentachlorophenol in water.

をあらかじめ約150m*l* の水を入れた250m*l* の有栓メスシリンダーにとり，水を加えて200m*l*とする．緩衝液（pH 7.0）15m*l*および塩化ナトリウム 5 g を加えて溶かし，以下前に述べた定量操作に従って呈色させ 574mμ における吸光度を測定して図１の検量線を得た．

定量条件の検討

1 緩衝液の pH および添加量

PCP の定量には0.025%炭酸ナトリウム液や *M*/15 リン酸二ナトリウム液が使用されているが，秋定[11]の報告したホウ酸緩衝液について検討したところ，もっとも感度が良好であったので，これについて至適 pH 範囲および添加量を調べた．その結果は表１および表２に示すとおりで，pH 7.0±0.1 の範囲でもっとも良好な結果を示す．また添加量は10—20m*l*の間で一定の吸光度を示すので pH 7.0 の緩衝液を15m*l*加えることにした．

2 試薬量

0.2% 4-アミノアンチピリン試薬と 10% 赤血塩試液の添加量を各種組み合わせて定量操作を行ない，吸光度を測定した結果は表３のとおりで，0.2% 4-アミノアンチピリン試液 6 —8m*l* および10%赤血塩試液 3 —4m*l* の範囲で最高の吸光度を示したので0.2% 4-アミノアンチピリン試液 7 m*l* および10赤血塩試液 3 m*l* を行なうことにした．

3 留出量

50μg および 100μg の PCP を含む試料水 500m*l* をとり，おのおのについてリン酸酸性で蒸留し，留出液100m*l*をとり水を加えて200m*l*とする．この液を定量操作に従って定量する．同様にして留出量 150m*l*, 160m*l*, 170m*l*, 180m*l*, 190m*l*, 200m*l*, のおのおのをとった場合について定量した．その結果図２に示すように 170m*l*以上留出量をとればよいことがわかった．

4 塩素処理した試料水中の定量

水道水は塩素滅菌処理を行なうので，PCP は塩素処理によってすみやかに分解され，給水中に入ってくることはほとんどない．しかし混入の有無を調べるときはそのまま蒸留すると遊離塩素も留出してくるため呈色を妨害して定量することができないので，蒸留前に硫酸第

表 1 緩衝液の pH の吸光度に対する影響（PCP 50μg）

pH	吸光度（574mμ）	pH	吸光度（574mμ）
6.12	0.410	7.00	0.455
6.45	0.435	7.10	0.455
6.65	0.440	7.20	0.440
6.80	0.445	7.30	0.410
6.90	0.455	7.70	0.240

表 2 緩衝液（pH 7.0）添加量の吸光度（574mμ）に対する影響

PCP量（μg）	緩衝液添加量（m*l*）					
	5	10	15	20	25	30
50	0.435	0.440	0.455	0.455	0.435	0.425
100	0.860	0.905	0.910	0.910	0.855	0.840

表 3 試薬添加量による影響（PCP 50μg）

10%赤血塩試液添加量（m*l*）	0.2% 4-アミノアンチピリン添加量（m*l*）				
	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0
2	0.435	0.440	0.445	0.450	0.450
3	0.440	0.442	0.450	0.455	0.450
4	0.430	0.442	0.448	0.452	0.448
5	0.420	0.430	0.442	0.445	0.445

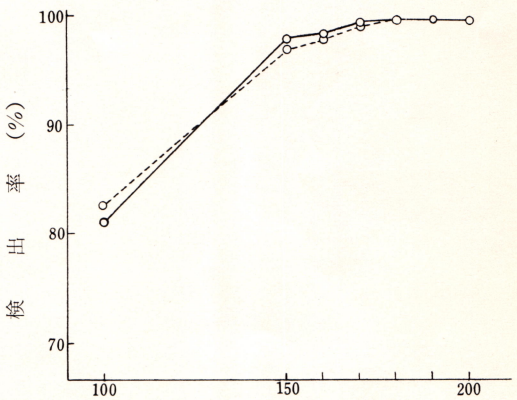


図 2 留出量による影響
—○— 50μg, …○… 100μg

表 4 回収実験

PCP添加量（μg）	回収率（%）				
	1	2	3	4	5
20	100.0	98.9	102.8	97.8	98.3
50	98.9	99.5	98.2	101.1	96.7
100	96.7	100.5	99.5	98.8	99.1

99.12±1.07%（危険率 5%）

一鉄またはモール塩を加え，遊離塩素を消去してから蒸留を行なえば PCP だけ留出して定量が可能となる．

回　収　実　験

河川水に一定既知量の PCP を添加してのち定量法に従って定量した結果は，表4に示すとおりで満足すべき結果を得た．

む　す　び

農薬衛生試験法および工場排水試験法中の PCP 定量法を検討して，蒸留時間を短縮し，留出液に直接呈色試薬を加えることによって簡単に精度よく水中の PCP を定量することができた．

文　献

1) 沼田一：ペンタクロロフェノールの比色定量について．衛生化学　4，94-96，**1956**.
2) 川原哲城・後藤真康・佐藤六郎：PCP の分析．農薬生産技術　7，19-26，**1962**.
3) 水谷泰久：ポーラログラフ法によるペンタクロルフェノールの定量．分析化学 11，395-396，**1962**.
4) N. F. Skelly : Gradient elution in the separation of chlorophenols by ion exchange. Anal. Chem. 33，271-273，**1961**.
5) 河合聡：イオン交換クロマトグラフ法によるペンタクロルフェノールの分離定量．分析化学 12，1191—1192，**1963**.
6) 秋定辰夫：0-トリジンによるペンタクロルフェノールの比色定量．分析化学 12，611-614，**1963**.
7) 鈴木郁生・加藤せえ：ペンタクロルフェノールおよび関連化合物の薄層クロマトグラフィー．衛生試験所報告　81，51-52，**1963**.
8) 上出小弥太・永井廸夫・長船雅子：PCP による飲料水の汚染，その分析法と除去法について．大阪府立公衆衛生研究所公衆衛生部報告　7，19-22，**1962**.
9) 厚生省薬務局編：農薬衛生試験法．53-56，**1964**.
10) 日本工業規格：工場排水試験法（JIS K 0102）．43-44，**1964**.
11) 秋定辰夫：PCP 剤中のテトラクロルフェノール，ペンタクロルフェノールの比色定量．分析化学 13，547-553，**1964**.

（受付　1966-4-20）

資　料

過去5年間の福岡県における インフルエンザ流行の推移

福岡県衛生研究所（所長：真子憲治博士）

坂本サツキ・武原　雄平・長谷川孝志

1961年から1965年の5年間に福岡県で流行したインフルエンザの型の推移はつぎのとおりである．

ウイルス分離

衛生検査指針にしたがってインフルエンザウイルスを分離・同定した結果を表1に示した．1963年にはインフルエンザの流行はみられなかった．1964年には血清学的検査によってB型の流行を認めたが，ウイルスを分離することはできなかった．

表 1　年次別インフルエンザウイルス分離状況

年	インフルエンザウイルス	
	A_2	B
1961	0	2
1962	14	0
1963	—	—
1964	0	0
1965	5	0

赤血球凝集抑制試験（HI）

図1から図5に示すとおり，1961年にはB型，1962年には A_2 型，1964年にはB型，1965年には A_2 型ウィルスによる流行を認めた．

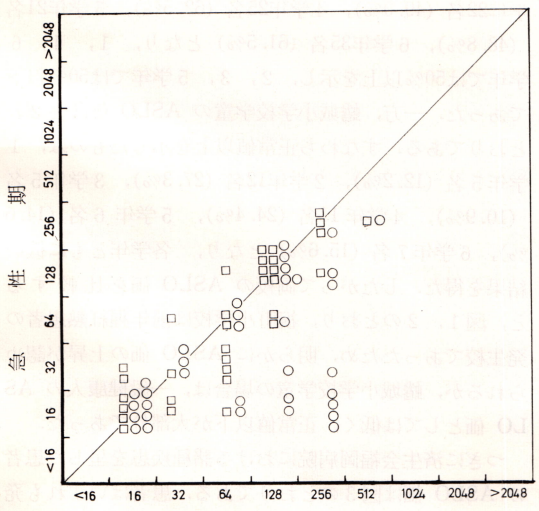


図 1　1961年のインフルエンザのHI抗体価（1：　）
使用抗原：□A_2／足立株
○B／Lee 株

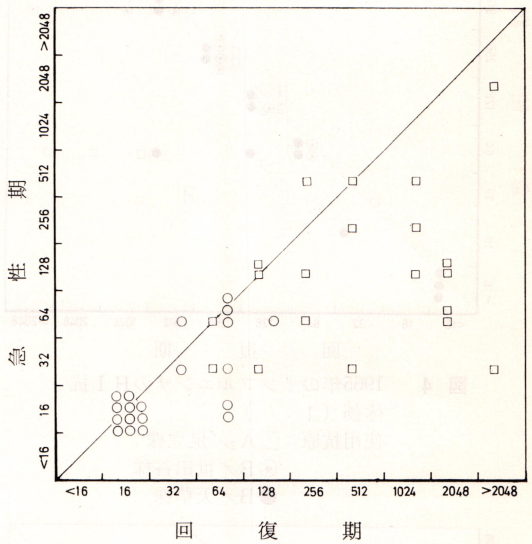


図 2　1962年のインフルエンザのHI抗体価（1：　）
使用抗原：□A_2／足立株
○B／Lee 株

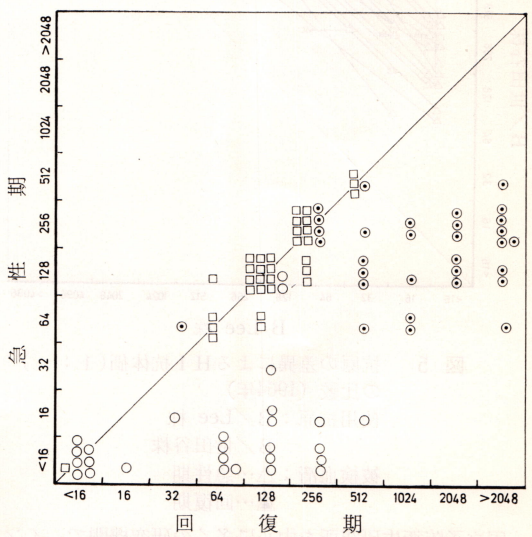


図 3　1964年のインフルエンザのHI抗体価（1：　）
使用抗原：□A_2／足立株
○B／Lee 株
⊙B／世田谷株

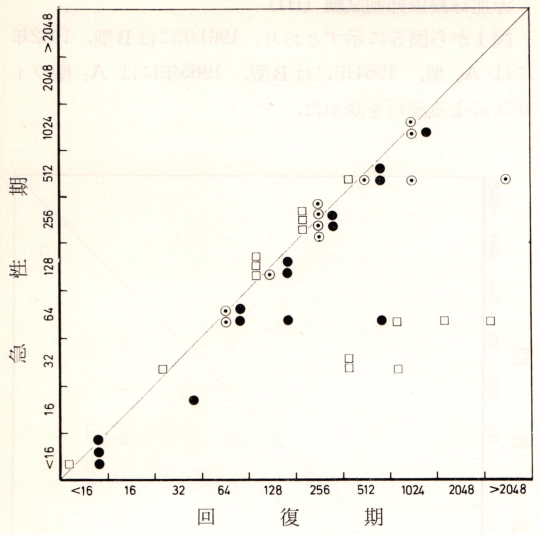


図 4　1965年のインフルエンザのＨＩ抗体価（１：　）
使用抗原：□A_2／足立株
◉Ｂ／世田谷株
●Ｂ／天草株

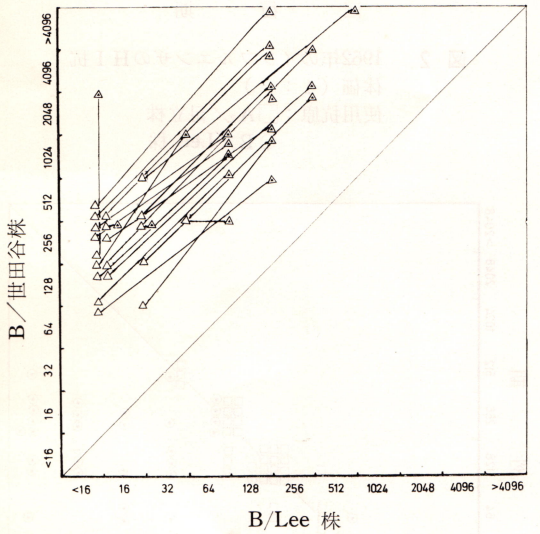


図 5　抗原の差異によるＨＩ抗体価（１：　）の比較（1964年）
使用抗原：Ｂ／Lee 株
Ｂ／世田谷株
被検血清：△…急性期
▲…回復期

国立予防衛生研究所を中心に多くの研究機関で，インフルエンザウイルスの抗原変異に関する検討がなされているが，著者らも1964年のＢ型流行時の患者血清のHI価をＢ型 Lee 株とＢ型世田谷株で測定した結果，図３および図５に示すとおり，両抗原間に明らかな差異があることを認めた．したがって，これまで当所で HI の標準抗原として使用していた A_2 型足立株およびＢ型 Lee 株だけでは不十分であることが判明したので，1964年以降の HI 用抗原にはＡ型およびＢ型とも，国内で最も新しく分離されたウイルスを国立予防衛生研究所から譲り受けて併用している．

溶連菌感染症としての抗ストレプトリジンO（ASLO）価の測定

福岡県衛生研究所（所長：真子憲治博士）

坂本サツキ・常盤　寛

1964年，われわれは小学校学童の ASLO 価を測定するため，溶連菌の流行地区および非流行地区の学童を対象に調査を行なった．一方，諸疾患をともなった患者の ASLO 価の成績についても合わせて報告する．

対象：流行地区対象は北九州市立祝町小学校（八幡区）学童267名で，同校では前年猩紅熱の小流行を認めた．一方，非流行地区対象は従来溶連菌感染の認められなかった甘木市立蜷城小学校学童262名であった．

成績：現在一般健康人の正常 ASLO 価は 166u/m*l* と考えられている．これを基準とすると，祝町小学校学童の ASLO 価は表１のとおりで，正常値以上を示したものは１学年９名（52.8%），２学年21名（45.6%），３学年22名（49.0%），４学年25名（62.5%），５学年21名（48.8%），６学年35名（61.5%）となり，１，４，６学年では50%以上を示し，２，３，５学年では50%以下であった．一方，蜷城小学校学童の ASLO 価は表２のとおりである．すなわち正常値以上を示したものは，１学年５名（12.2%），２学年12名（27.3%），３学年５名（10.9%），４学年11名（24.4%），５学年６名（14.6%），６学年７名（15.6%）となり，各学年ともに低い結果を得た．したがって両校の ASLO 価を比較すると，図１，２のとおり，祝町小学校は前年猩紅熱患者の発生校であったため，明らかに ASLO 価の上昇が認められるが，蜷城小学校学童の場合は，一般健康人の ASLO 価としては低く，正常値以下が大部分であった．

つぎに済生会福岡病院における諸種疾患を呈した患者の ASLO 価は図３のとおりである．患者はいずれも発病初期の ASLO を測定したためにその値は低かった．ASLO 測定を行なった49例について臨床診断別にみると，急性腎炎12例，リウマチ熱９例，多発関節痛９例，ロイコ・ロイマチス８例，神経痛６例，診断不明４例および骨髄炎１例の順であった．なお，本調査を行なうに

表 1　祝町小学校学童の ASLO 価

学年	ASLO 価 (u/ml)												
	<12	12	50	100	125	166	250	333	500	625	833	1250	計
1	3	5	1	1	7	4	4	3	1	1	3	3	36
2	7	4	6	6	2	4	8	7	1	0	1	0	46
3	0	7	4	9	3	3	6	9	2	1	0	1	45
4	0	2	3	5	5	6	10	8	1	0	0	0	40
5	1	4	4	10	3	4	9	3	0	2	0	3	43
6	0	2	3	9	8	8	16	5	3	2	1	0	57
計	11	24	21	40	28	29	53	35	8	6	5	7	267

表 2　蜷城小学校学童の ASLO 価

学年	ASLO 価 (u/ml)										
	<12	12	50	100	125	166	250	333	500	625	
1	3	8	16	4	5	0	4	0	1	0	41
2	4	8	9	6	5	7	3	1	1	0	44
3	1	9	13	10	8	4	0	1	0	0	46
4	2	7	11	9	5	5	4	0	2	0	45
5	1	4	17	4	9	4	0	2	0	0	41
6	1	7	13	12	5	6	1	0	0	0	45
計	12	43	79	45	37	26	12	4	4		262

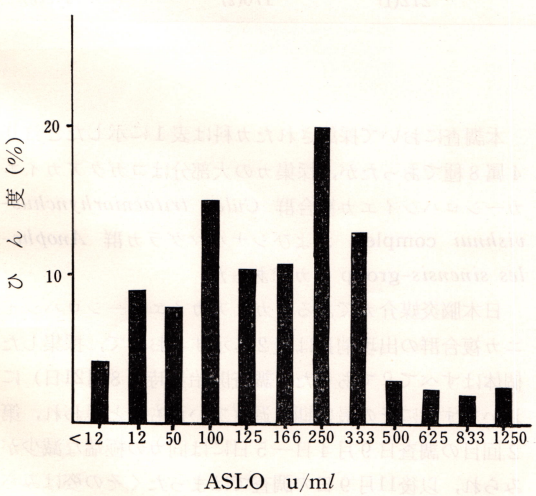


図 1　祝町小学校学童の平均ＡＳＬＯ価

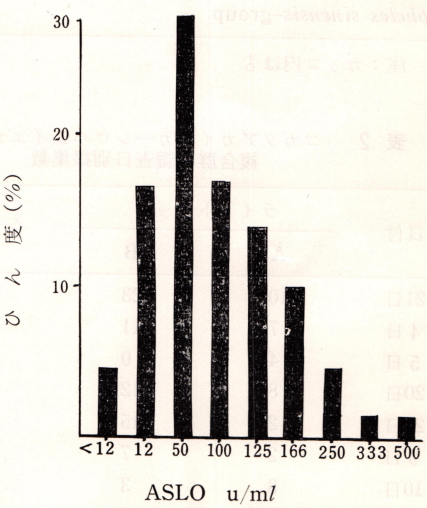


図 2　蜷城小学校学童の平均ＡＳＬＯ価

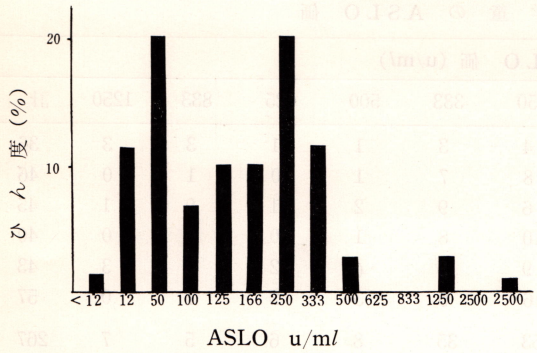


図 3　溶連菌感染疑似患者のＡＳＬＯ価

あたりつぎの文献を参考にした．

富岡一・斉藤誠・寺田真：抗ストレプトリジンOの正常価．日本伝染病学会雑誌　35（9），591—595，**1961**．

福岡県筑紫郡一農村における カ 調 査 成 績

福岡県衛生研究所（所長：真子憲治博士）

山　本　英　穂

日本脳炎媒介カに関する研究を開始するに先立って，1961年，福岡県筑紫郡筑紫町岡田部落においてカ類の棲息種類およびその出現消長の予備調査を行なったのでその成績を報告する．

同部落は純農村であり，その周囲は水田地帯である．調査はニュージャーシー型ライトトラップ2台（60W電球装備）を使用し，それぞれのライトトラップは牛舎入口近くの地上に固定した．調査期間は8月21日から11月9日までであった．

表 1　カ　採　集　成　績

種別	ライトトラップ A	ライトトラップ B	合計
Culex tritaeniorhynchus-vishnui complex	241	111	352
Culex pipiens pallens Coquillett		1	1
Culex bitaeniorhynchus Giles	1		1
Culex whitmorei (Giles)	22	1	23
Culex vorax Edwards	1		1
Aedes vexans nipponii (Theobald)	1		1
Armigeres subalbatus (Coquillett)	1	1	2
Anopheles sinensis-group	272(1)	170(2)	442(3)

注：カッコ内は♂

表 2　コガタアカイエカ—シロハシイエカ複合群の調査日別採集数

調査日付	ライトトラップ A	ライトトラップ B	合計
8月21日	210	23	233
9月4日	7	11	18
5日	4	0	4
20日	8	12	20
21日	2	15	17
10月9日	2	7	9
10日	8	3	11
11月9日	0	0	0

本調査において採集されたカ科は表1に示したとおり4属8種であったが，採集カの大部分はコガタアカイエカ—シロハシイエカ複合群 *Culex tritaeniorhynchus-vishnui* complex およびシナハマダラカ群 *Anopheles sinensis*-group のカであった．

日本脳炎媒介カであるコガタアカイエカ—シロハシイエカ複合群の出現消長は表2に示すとおりで，採集した個体はすべて♀であった．調査開始当時（8月21日）においてすでにその最盛期は過ぎていたものと思われ，第2回目の調査日9月4日—5日には同カの極端な減少がみられ，以後11月9日の調査ではまったくその姿はみられなかった．

福岡県衛生研究所研究報告　第4集

昭和41年9月1日印刷
昭和41年9月4日発行

発行所：福岡県衛生研究所
福岡市天神1丁目5番3号

印刷所：福岡印刷株式会社
福岡市舞鶴一丁目2番5号

編集委員：真子憲治
森彬
武原雄平
森本昌宏
山本英穂
平古場朗
長谷川孝志

THE REPORT
OF
THE FUKUOKA PREFECTURAL INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH

No 4 Sept. 4, 1966

CONTENTS

ORIGINAL PAPERS

TOKIWA, H., OTSUKA, S. & KAJIKURI, M.: Studies on atypical and nonpathogenic acid-fast bacilli 1. Isolations of acid-fast bacilli from human beings and tuberculin-positive cows. ..... 1— 4

TAKAHASHI, K., YAMAMOTO, H., OTSUKA, S. & NAMBA, T.: Isolations of Japanese encephalitis virus from the mosquitoes of *Culex tritaeniorhynchus-vishnui* complex collected in the suburbs of Fukuoka City. ..... 5—12

YAMAMOTO, H., TAKAHASHI, K. & MANAKO, K.: Seasonal prevalence and Japanese encephalitis virus infection of *Culex tritaeniorhynchus-vishnui* complex in the suburbs of Fukuoka City in 1963. ..... 13—25

MORI, A.: Colorimetric determination of pentachlorophenol in water. ..... 26—28

NOTES

SAKAMOTO, S., TAKEHARA, Y. & HASEGAWA, T.: Annual change of the epidemic type of influenza virus in Fukuoka Prefecture during 1961-1965. ..... 29—30

SAKAMOTO, S. & TOKIWA, H.: An examination of anti-streptolysin O for Streptococcus in school children. ..... 30—32

YAMAMOTO, H.: Mosquito collections in a farm village of Chikushi-gun, Fukuoka Prefecture. 32

THE FUKUOKA PREFECTURAL INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH

No. 5-3, 1 chome, Tenjin, Fukuoka, Japan

Rep. Fukuoka Pref.
Inst. Pub. Heal.