

冬期における豚の血液および脾臓単核球からの 日本脳炎ウイルスゲノムの検出

山西 重機・来 美由紀・山中 康代・亀山 妙子・三木 一男

Detection of Japanese Encephalitis Virus Genome in Mononuclear
Cells from Blood and Spleen of Swine during Winter

Shigeki YAMANISHI, Miyuki RAI, Yasuyo YAMANAKA, Taeko KAMEYAMA and Kazuo MIKI

I はじめに

日本脳炎 (JE) ウイルスが日本のような北方温帯地域において冬期間どのような機序で保存され、翌年の夏に流行を開始するかという「越冬機序」についてはこれまで種々な説が提唱¹⁾されてきた。

これらの説は、JEウイルスが毎年東アジアの温暖な常在流行地から持ち込まれるとする「外來說」と日本国内の流行巣において通年維持されるとする「国内土着説」の2つに分けられる。

これらに関して北海道において実施された高島ら²⁾の豚におけるJEウイルスの疫学調査の成績は、本ウイルスが国内で土着して越冬することを強く示唆している。

また、我々は先にJEウイルスゲノムを高感度に検出できるreverse transcription-coupled polymerase chain reaction (PCR)³⁾を用いることによって、冬期間の豚血液からウイルスゲノムを検出確認できることを報告⁴⁾した。このことから夏期間に感染したウイルスが冬期間、豚体内で保存され持続感染している可能性が強く示唆された。

今回、JEウイルスが豚体内で持続され、越冬する可能性について、特に豚体内の如何なる細胞で、冬期間維持・存続されているか、血液と脾臓から単核球を分画し、PCRを用いてウイルスゲノムの検出を試みた。

II 材料および方法

1. 豚血液と脾臓の採取

1995年7月から1996年3月に香川県内でそれぞれ飼育されていた豚(生後6~7ヶ月)から採取した血液160例、脾臓60例を用いた。

また1996年7月から1997年3月に香川県内でそれぞれ飼育されていた繁殖用豚(生後3~4年)から採取した同一豚の血液と脾臓87例も同時に実験に用いた。

2. 豚血液からの単核球の分画

アルスバー液を加えて採血し、2000rpm 20分遠心、白

血球層を回収し、RPMI培地に浮遊した。これをフィコールバックに重層し1500rpm 15分遠心、単核球層を回収し、RPMI培地に浮遊、再び1200rpm 10分遠心、沈渣をRPMI培地に浮遊、さらに1000rpm 10分遠心、沈渣をRPMI培地に浮遊した。そして10000rpm 10分遠心し、沈渣をRPMI培地に浮遊し、これを分画単核球とし実験まで-80℃に保存した。

3. 脾臓からの単核球の分画

脾臓は細切し、ペニシリン、ストレプトマイシン加PBS(-)で洗浄、ステンレスメッシュで潰し、RPMI培地に浮遊させた。これを2000rpm 10分遠心、中間細胞層を回収し、RPMI培地に浮遊、これをフィコールバックに重層し、以下の手順は血液と同様に処理した。

4. 血液および単核球からのJEウイルスRNAの抽出

前報告⁴⁾と同様に、抽出はグアニジニウムチオシアネートを用いて行った。

5. cDNAの合成とPCR法

前報告⁴⁾と同様に、cDNAの合成は逆転写酵素(RAV-2)を用いて行った。

またnested PCRの第1段階PCRは熱変成(94℃, 1分間), アニーリング(50℃, 1.5分間), 伸長反応(72℃, 2分間), 最終伸長反応(72℃, 5分間)で第2段階PCRは熱変成(94℃, 1分間), アニーリング(60℃, 1.5分間), 伸長反応(72℃, 2分間), 最終伸長反応(72℃, 5分間)の条件でそれぞれ30サイクルで行った。

III 成績

1. 豚血液由来材料からのJEウイルスゲノムの検出

1995年7~11月の期間に毎月20頭ずつ採血した100例について全血液, 血漿, および血液由来単核球についてNested PCRによってJEウイルスゲノムの検出を行った。

その結果, 表1に示すように全血液では, 9月の20例中5例, 10月の20例中2例, 11月の20例中1例からウイルスゲノムが検出された。

表1 豚血液および血液由来単核球からの日本脳炎ウイルスゲノムの検出

採血年月日	検体数	検 体 区 分		
		全血液	血漿	血液由来単核球
1995. 7.24	20	ND*	0	0
1995. 8.21	20	ND	0	0
1995. 9.26	20	5	0	3
1995.10.18	20	2	0	0
1995.11.15	20	1	ND	0
計	100	8	0	3

*ND：検査しなかった

血液由来単核球では、9月の20例中3例からのみ検出された。しかし血漿からはいずれの月においても検出されなかった。

2. 豚血液と血液および脾臓由来単核球からのJEウイルスゲノムの検出

表2に示したように1996年1～3月の冬期間に毎月20頭ずつ採血し、全血液、血漿および血液由来単核球について、また同時にこれらの豚の脾臓単核球についてそれぞれNested PCRによってウイルスゲノム検出を行った。

その結果、この期間中ウイルスゲノムは全血液、血漿および血液由来単核球のいずれからも検出されなかったが、脾臓由来単核球では、1月の20例中1例、2月の20

表3 繁殖用豚からの日本脳炎ウイルスゲノムの検出

採取年月日	検査数	検 体 区 分	
		血液由来単核球	脾臓由来単核球
8. 7.18	9	0	1
8. 8.27	10	0	0
8. 9.19	10	0	0
8.10.17	10	0	0
8.11. 7	10	0	0
8.12.12	10	0	0
9. 1.23	8	0	0
9. 2.20	10	0	0
9. 3. 6	10	0	0
計	87	0	1

例中2例、3月の20例中1例からそれぞれ検出された。

3. 繁殖用豚からの血液および脾臓由来単核球からのJEウイルスゲノムの検出

1996年7月～1997年3月に採取した繁殖用豚など、87例の血液と脾臓由来単核球についてNested PCRによってウイルスゲノム検出を行った。

表3に示すように、7月に脾臓由来単核球から1例のみ検出された。

表2 豚血液と血液および脾臓由来単核球からの日本脳炎ウイルスゲノムの検出

採取年月日	検体数	検 体 区 分			
		全血液	血漿	血液由来単核球	脾臓由来単核球
1996. 1.17	20	0	0	0	1
1996. 2.20	20	0	0	0	2
1996. 3.25	20	0	0	0	1
計	60	0	0	0	4

表4 繁殖用豚血液からの経時的日本脳炎ウイルスゲノムの検出

番号	性別	生年月日	8. 6.28採血			8.11. 6採血		
			血液	血漿	単核球	血液	血漿	単核球
1	オス	7. 8.16	—	—	—	—	—	—
2	オス	7. 3.15	—	—	—	—	—	—
3	オス	7. 1.22	—	—	—	—	—	—
4	メス	6. 2. 1	—	—	—	ND	ND	ND
5	メス	7. 1.21	—	—	—	—	—	—
6	メス	5.12. 9	—	—	—	ND	ND	ND
7	メス	5. 1. 4	—	—	—	—	—	—
8	メス	4. 1.20	—	—	—	—	—	—
9	メス	5. 4. 1	—	—	—	—	—	—
10	メス	4. 9. 4	—	—	—	—	—	—
11	メス	6. 9.13	—	—	—	—	—	—
12	メス	6. 2.26	—	—	—	—	—	—

4. 繁殖用豚血液からの経時的JEウイルスゲノムの検出

野外で飼育されている同一固体での豚の経時的変化をみる目的で1996年6月と11月に採血し、それぞれ分画し、Nested PCRによってウイルスゲノム検出を行った。

表4に示したように全例でウイルスゲノムは検出できなかった。

5. JEウイルス各株との塩基配列比較について

表5に、JEウイルス各株と第2段階PCRの増幅産物181bpについてシーケンスを行いそれぞれの塩基配列

を比較して示した。

用いたPCR増幅ウイルスゲノムKagawa 1は、1995年10月採血の全血液から、Kagawa 3は、1996年3月の脾臓由来単核球から、Kagawa 4は、1996年7月の脾臓由来単核球から、Kagawa 7は、1993年11月の血液由来単核球から増幅されたもので、この領域の塩基配列を比較した。

この181bpの塩基配列間では夏期間、冬期間検出ウイルスゲノムに相違点はみられなかった。

表5 日本脳炎ウイルス各株との塩基配列比較

	1248				
Nakayama S982	GTGTGCAAAC	AAGGCTTCAC	TGATCGTG	TGGGGCAACG	GATGTGGACT
Mie-44-1	-----	-----	-----T	-----N	-----
JaOH0566	-----	-----	-----	-----	-----
JaGAR-01	-----	-----	-----	-----	-----
Bei-1	-----	-----	-----	-----	-----
JaOH0173	-----	-----	-----	-----	-----
JaOH3767	-----	-----T	-----	-----	-----
Kagawa 1	-----	-----	-----	-----	-----
Kagawa 3	-----	-----	-----	-----	-----
Kagawa 4	-----	-----	-----	-----	-----
Kagawa 7	-----	-----	-----	-----	-----
Nakayama S982	TTTCGGAAG	GGAAGCATTG	ACACATGTGC	AAAATTCTCC	TGCACCAGTA
Mie-44-1	-----	-----	-----	-----	-----C-
JaOH0566	-----	-----	-----	-----	-----C-
JaGAR-01	-----	-----	-----	-----	-----C-
Bei-1	-----	-----T-----	-----	-----	-----G-
JaOH0173	-----	-----	-----	-----	-----G-
JaOH3767	-----	-----T-----	-----	-----	-----A-
Kagawa 1	-----	-----	-----	-----	-----G-
Kagawa 3	-----	-----	-----	-----	-----G-
Kagawa 4	-----	-----	-----	-----T	-----G-
Kagawa 7	-----	-----	-----	-----	-----G-
Nakayama S982	AGGCGATTGG	GAGAACAATC	CAGCCAGAAA	ACATCAAATA	CGAAGTTGGC
Mie-44-1	-A-----	A-----	-----	-----	-----
JaOH0566	-A-----	-----	-----	-----	-----A-----
JaGAR-01	-A-----	A-----	-----	-----	-----
Bei-1	-A-----	-----	-----	-----	-----
JaOH0173	-A-----	-----	-----	-----	-----
JaOH3767	-A-----	-----	-----	-----	-----
Kagawa 1	-----	G-----	-----	-----	-----
Kagawa 3	-----	G-----	-----	-----	-----
Kagawa 4	-----	G-----	-----	-----	-----
Kagawa 7	-----	G-----	-----	-----	-----
Nakayama S982	ATTTTTGTGC	ATGGAACCAC	CACTTCGGAA	AA	
Mie-44-1	-----	-----	T-----	---	
JaOH0566	-----	-----G-----	T-----	---	
JaGAR-01	-----	-----	-----	---	
Bei-1	-----	-----	-----	---	
JaOH0173	-----	-----	-----	---	
JaOH3767	-----	-----	-----	---	
Kagawa 1	-----	-----	-----	---	
Kagawa 3	-----	-----	-----	---	
Kagawa 4	-----	-----	-----	---	
Kagawa 7	-----	-----	-----	---	

表6 PCR増幅領域のアミノ酸配列

	385					
Nakayama S982	VCKQGFTDRG	WGNGCGLFGK	GSIDTCAKFS	CTSKAIGRTI	QPENIKYEVG	IFVHGTTS
Mie-44-1	-----	-X-----	-----	-----	-----	-----
JaOH0566	-----	-----	-----	-----	-----K--	-----A--
JaGar-01	-----	-----	-----	--R-----	-----	-----
Bei-1	-----	-----	-----	--R-----	-----	-----
JaOH0173	-----	-----	-----	--R-----	-----	-----
JaOH3767	-----I--	-----	-----	--R-----	-----	-----
Kagawa 1	-----	-----	-----	--R-----	-----	-----
Kagawa 3	-----	-----	-----	--R-----	-----	-----
Kagawa 4	-----	-----	-----	--R-----	-----	-----
Kagawa 7	-----	-----	-----	--R-----	-----	-----

6. PCR増幅領域のアミノ酸配列比較について

アミノ酸番号417番が中山株、北京株で共通に変異をおこしている個所であり、この増幅領域に含まれる。

表6にPCR増幅領域のアミノ酸配列をJEウイルス各株と検出した4例を比較して示した。

検出ウイルスゲノムは全て北京株類似のタイプであった。

IV 考 察

冬期間におけるJEウイルスの存続様式についてはこれまで種々の説が述べられていながら、現在のところ北方温帯地域で毎年、どのようにして夏期間に再流行を繰り返すのか、よく知られていないが仮説としては、ウイルスが毎年、北方地域に導入されるとする外来説。また、ウイルスが脊椎動物宿主内もしくは無脊椎動物宿主内で越冬する国内土着説などが提唱¹⁾されている。高島ら²⁾は、北海道でJEウイルスが特定の流行巣で保持され、局地的に越冬することを疫学調査から指摘している。

我々も、先に高感度のPCR³⁾を用いることで冬期間である1～5月の豚血液中から12例のウイルスゲノムを検出確認し報告した⁴⁾。このことは冬期に豚間でのウイルスゲノムの存在が初めて直接的に証明されたことであり、新たな感染もしくは持続感染の可能性が強く示唆された。

本研究ではこれらの所見をさらに確認するため、JEウイルスが豚体内で潜伏する部位と細胞につき検討を加えた。

本研究で、Nested PCRによるJEウイルスゲノム検出率は培養細胞を用いた感染性JEウイルス検出率より高い成績がえられたが、用いたNested PCRは10PFUに相当するJEウイルスの検出が可能であり⁵⁾、Nested PCRは感染性ウイルス粒子、非感染性ウイルス粒子さらにはウイルスゲノムそのものも検出可能なため、より高い検出率を示したものと推定される⁵⁾。

今回、このように高感度なNested PCRを用いて経時的にJEウイルスゲノムの検出を試みたところ、7月～11月

に全血液と血液由来単核球から検出されたが、血漿からは検出されなかった。また1～3月までに、全血液、血漿および血液由来単核球からウイルスゲノムは検出されなかった。

そこで同時期に採取した脾臓について単核球からのウイルスゲノム検出を試みたところ、1～3月の検体60例中4例に陽性が認められた。

これらの成績から、JEウイルスは豚体内の血液細胞の単核球に持続感染し、さらに冬期間は脾臓の単核球に潜伏することが示唆された。

また1995年の成績でも認められたように、全血液におけるウイルスゲノム検出率は血液由来単核球における検出率より高かったことにより、JEウイルスゲノムは単核球以外の血液細胞にも存在する可能性も考えられた。

1月～3月にはJEウイルスゲノムが血液では検出されず、脾臓の単核球で検出された理由として、夏期間にコガタアカイエカの吸血により、JEウイルスに感染した後に出現する中和抗体または細胞性免疫が、血液の単核球からのウイルス排除に作用した可能性も考えられる。しかし、JE特異的免疫機構がいかにして単核球のJEウイルスに作用するのか、なぜ脾臓単核球中のウイルスには作用しないかなどは不明であり、今後の検討を要する。

mathurら⁶⁾は、JEウイルスが妊娠マウスにおいて16週間持続できたことを報告し、さらに、実験的な潜伏感染マウスの脾臓内のTリンパ球からウイルスが再活性化することを報告している⁷⁾。また、Sharmaら⁸⁾は、JEウイルスに感染し、その後再発した患児の末梢血単核球からJEウイルスを分離している。

これらの報告は、われわれの今回の成績と一致するものであり、これまで急性感染症と考えられていたJEウイルス感染において、持続感染と再活性化が起こりうることを示唆している。

豚は自然界で夏期にJEウイルスの増幅動物として重要な役割を果たしている。今回の成績から冬期間にもJEウイルスが豚の脾臓の単核球で持続感染している可能性が

示されたので、本ウイルスの越冬機序を解明する上で豚における持続感染をさらに詳細に検討する必要がある。

高島らは²⁾、本ウイルスの流行期以前の早春または冬期間に、豚集団内で2-ME感受性HI抗体(IgM抗体)が検出される固体の存在を観察している。このような豚では前年の流行期に感染したJEウイルスが持続感染しており、翌年に再活性化したのか、さらにどのような機構により再活性化するのかなど疑問について、実験感染豚または野外で飼育されている豚の同一固体から、経時的に材料を採取して解析することが今後の課題と考えられる。

文 献

- 1) Rosen L: The natural history of Japanese encephalitis virus. *Ann Rev Microbiol* 40: 395-414, 1986
- 2) Ikuo Takashima, Takutoshi Watanabe, Naoto Ouchi, and Nobuo Hashimoto: Ecological studies of Japanese encephalitis virus in Hokkaido: Interepidemic outbreaks of swine abortion and evidence for the virus to overwinter locally. *Am J Trop Med*

Hyg 38, 420-427, 1988

- 3) Murakami S, Takahashi Y, Yoshida S, Isao Fuke, Kozo Ohmac, Chisato Mori, Mitsuo Takagi, Akihisa Takamizawa, and Hirota Okayama: Highly sensitive detection of viral RNA genomens in blood specimens by an optimized reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Med Viro* 143, 175-181, 1994
- 4) 山西重機, 藤井康三, 亀山妙子, 三木一男: 冬期における豚血中からの日本脳炎ウイルスゲノムの検出. *日獣会誌* 48, 803-808, 1995
- 5) 坂岡博, 本藤良, 川名尚: 遺伝子増幅PCR法, 基礎と新しい展開, 藤永恵 編, 75-83, 共立出版, 東京1992
- 6) Asha Mathur, K.L. Arora, S. Rawat and U. C. Chaturvedi: Persistence latency and reactivation of Japanese encephalitis virus infection in mice. *J gen Virol* 67, 381-385, 1986
- 7) Asha Mathur, R. Kulshreshtha and U. C. Chaturvedi: Evidence for latency of Japanese Encephalitis virus in T lymphocytes. *J gen Virol* 70, 461-465, 1989
- 8) S. Sharma, A. Mathur, V. Prakash, R. Kulshreshtha, R. Kumar and U. C. Chaturvedi. Japanese encephalitis virus latency in peripheral blood lymphocyte and recurrence of infection in children: *Clin Exp Immunol* 85, 85-89, 1991