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¹⁾ 山中康代¹⁾ 亀山妙子¹⁾ 三木一男¹⁾
 宮本千加子²⁾ 高島郁夫³⁾

- 1) 香川県衛生研究所 (〒760 高松市朝日町 5-3-105)
 2) 金沢市保健所 (〒920 金沢市駅西第 2 土地区画整理事業地 103 街区 1)
 3) 北海道大学大学院獣医学研究科 (〒060 札幌市北区北 18 条西 9 丁目)

(1997 年 4 月 30 日受付・1997 年 8 月 15 日受理)

要 約

豚 (6～7 カ月齢) における日本脳炎 (JE) ウイルスの持続感染の可能性を明らかにする目的で、血液と脾臓から Nested PCR により JE ウイルスゲノムの検出を試みた。金沢市で 1993 年 9 月～1994 年 2 月に調べた豚 50 頭中血液陽性検体は、9 月に 10 例中 4 例、10 月に 11 例中 2 例、11 月に 9 例中 2 例、12 月に 10 例中 3 例であった。2 月の 10 例の血液からはウイルスゲノムを検出できなかったが、3 例の脾臓単核球からウイルスゲノムが増幅された。いっぽう、香川県では、1995 年 7 月～1996 年 3 月に採取した豚 160 頭の血液について検索したところ、陽性血液検体は 9 月に 5 例、10 月に 2 例、11 月に 1 例で、1 月、2 月、3 月の各 20 例からはウイルスゲノムが検出されなかったが、脾臓単核球からは 1 月に 1 例、2 月に 2 例、3 月に 1 例でウイルスゲノムが増幅された。以上の成績から、冬期間に JE ウイルスが豚の血液あるいは脾臓単核球に持続感染している可能性が示唆された。

——キーワード：日本脳炎、単核球、ウイルスの越冬。

-----日獣会誌 50, 731～734 (1997)

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されてきた [4]。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。JE ウイルスの越冬に関して、北海道で実施された Takashima ら [7] の豚における疫学調査の成績は、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、われわれは先に JE ウイルスゲノムを高感度に検出できる reverse transcription (RT)-coupled polymerase chain reaction (PCR) [3] を用いることによって、冬期間の豚血液中からウイルスゲノムを検出確認できることを報告した [8]。これらの成績から夏期間に感染した JE 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て越冬するとすれば、ウイルスはどのような細胞で冬期間維持・持続されているかを知るため、2 つの地域でいろいろな時期に採血し、血液と脾臓から単核球を分画して PCR を用いて JE ウイルスゲノムの検出を試みた。

材 料 お よ び 方 法

豚血液と脾臓の採取：1993 年 9 月～1994 年 2 月の期間に金沢市内で 50 頭および 1995 年 7 月～1996 年 3 月の期間に香川県内で 160 頭の豚 (生後 6～7 カ月) からそれぞれ血液と脾臓を採取した。

豚血液からの単核球の分画：ヘパリンソーダー^{a)}を加えて採血し、2,000rpm, 20 分間遠心後、白血球層を回収し、RPMI 培地^{b)}に浮遊した。これをフィコールパック^{b)}に重層し、1,500rpm, 15 分間遠心、単核球層を回収した。これを RPMI 培地に浮遊し、再び 1,200rpm, 10 分間遠心後、沈渣を RPMI 培地に浮遊した。さらに、1,000rpm, 10 分間遠心し、沈渣を RPMI 培地に浮遊した。浮遊液を 10,000rpm, 10 分遠心し、沈渣を RPMI 培地に浮遊し、これを分画単核球検体として実験まで -80℃ に保存した。

脾臓からの単核球の分画：脾臓は細切し、ペニシリンおよびストレプトマイシン加 PBS (－) で洗浄し、ステンレスメッシュで潰して、RPMI 培地に浮遊し、これを 2,000rpm, 10 分間遠心後、中間細胞層を回収して、

a) 和光純薬, 大阪. b) Pharmacia, U.S.A.

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

表1 豚の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とウイルス分離（1993年および1994年、金沢市）

材料	採取月日	検体数	ウイルスゲノムの検出			ウイルス分離	
			単核球			血清	単核球
			P	C	R		
			第1回	第2回			
血液	1993. 9. 30	10	0	4	1	1	
血液	1993. 10. 30	11	1	2	0	0	
血液	1993. 11. 30	9	0	2	0	0	
血液	1993. 12. 21	10	0	3	ND*	0	
血液	1994. 2. 12	10	0	0	ND	0	
計		50	1	11	1	1	
脾臓	1994. 2. 12	10**	0	3	ND	0	

*ND：検査しなかった

**：血液採取豚と同一個体の材料

RPMI 培地に浮遊し、フィコールパックに重層した。以後の手順は血液からの単核球の分画と同様に処理した。

血液および単核球からの JE ウイルス RNA の抽出：前報告[8]と同様に、抽出はグアニジニウムチオシアネート^{a)}を用いて行った。

cDNA の合成と PCR 法：前報告[8]と同様に、cDNA の合成は逆転写酵素 (RAV-2)^{o)}を用いて行った。また nested PCR における第1回および第2回 PCR は前報告[8]と同様に行った。

JE ウイルスの分離：血液または単核球を Vero E-6 細胞の単層培養に接種し、37℃で14日間観察した。培養後、細胞をスライドグラスに固定し、単クローン性抗体を用いた蛍光抗体法によりウイルス抗原の存在の確認を行った[7]。

成 績

金沢市内の豚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と JE ウイルスの分離：表1に示したように、1993年9月～1994年2月の期間に採取した豚血液由来単核球50例の検体については、ウイルスゲノムは第1回 PCR では10月の1例のみから検出されたが、第2回 PCR では9月～12月までの11例から検出された。月別の検出状況は、9月の10例中4例、10月の11例中2例、11月の9例中2例、12月の10例中3例が陽性であったが、2月の材料からは検出されなかった。しかし、2月に採血した豚と同一豚の脾臓由来単核球10例については、第2回 PCR で3例からウイルスゲノムが検出された。したがって、以降の試験では第2回 PCR の成績を示した。

また、それぞれの材料について同時に行ったウイルス

表2 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（1995年、香川県、Nested PCR によった）

採血月日	検体数	日本脳炎ウイルスゲノム陽性検体数		
		全血液	血漿	血液由来単核球
7. 24	20	ND*	0	0
8. 21	20	ND	0	0
9. 26	20	5	0	3
10. 18	20	2	0	0
11. 15	20	1	ND	0
計	100	8	0	3

*ND：検査しなかった

表3 豚の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（1996年、香川県、Nested PCR によった）

採取月日	検体数	日本脳炎ウイルスゲノム陽性検体数			
		全血液	血漿	血液由来単核球	脾臓由来単核球
1. 17	20	0	0	0	1
2. 20	20	0	0	0	2
3. 25	20	0	0	0	1
計	60	0	0	0	4

分離では、9月採血の血液由来単核球1例からウイルスが分離され、この例では同時にウイルスゲノムも検出された。

1995年における香川県内の豚血液からの JE ウイルスゲノムの検出：1995年7月～11月の期間に毎月20頭ずつ採血し、合計100例の豚の全血液、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2に示したように、全血液では9月に5例、10月に2例、11月に1例からウイルスゲノムが検出された。血液由来単核球では9月の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。

1996年における香川県内の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3に示したように1996年1月～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1例、2月の2例、3月の1例からそれぞれ検出された。

考 察

JE ウイルスの北方温帯地域における越冬機序につい

^{o)} 宝酒造、東京。

て、北海道における疫学調査から、Takashima ら [7] は本ウイルスが特定の流行巣で局地的に越冬することを示した。また、著者ら [8] は香川県における調査において、冬期間の豚の血液から高率に JE ウイルスゲノムが検出されることを報告した。本研究ではこれらの所見をさらに確認するため、調査地区を金沢市と香川県の 2 地区に設定し、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得られたが (表 1)、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 [3]、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、金沢市内の 9 月～12 月に、JE ウイルスゲノムは血液由来単核球から、さらに香川県内の 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。また香川県内の 1 月～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、金沢市の 2 月の検体 10 例中 3 例、香川県の 1 月～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 年の香川県の成績で認められたように、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のかなどは不明であり、今後の検討を要

する。

Mathur ら [1] 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 [2]。また、Sharma ら [6] 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同一傾向を示すものであり、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。

われわれは先の報告 [7, 8] で、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 感受性の HI 抗体 (IgM 抗体) が検出される個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の疑問について、実験感染豚または野外で飼育されている豚の同一個体から、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。

引用文献

- [1] Mathur A, Arora KL, Rawat S, et al : J Gen Virol, 67, 381-385 (1986)
- [2] Mathur A, Chaturvedi UC, Kulshreshtha R : J Gen Virol, 70, 461-465 (1989)
- [3] Murakami S, Takahashi Y, Yoshida S, et al : J Med Virol, 43, 175-181 (1994)
- [4] Rosen L : Annu Rev Microbiol, 40, 395-414 (1986)
- [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] Sharma S, Mathur A, Prakash V, et al : Clin Exp Immunol, 85, 85-89 (1991)
- [7] Takashima I, Hashimoto N, Ouchi N, et al : Am J Med Hyg, 38, 420-427 (1988)
- [8] 山西重機, 亀山妙子, 三木一男, 他 : 日獣会誌, 48, 803-808 (1995)

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

Shigeki YAMANISHI*, Yasuyo YAMANAKA, Taeko KAMEYAMA, Kazuo MIKI,
Chikako MIYAMOTO and Ikuo TAKASHIMA

* Kagawa Prefectural Institute of Public Health, 5-3-105 Asahi-machi, Takamatsu 760, Japan

SUMMARY

Possible persistent infection of Japanese encephalitis (JE) virus was investigated by detecting the virus genome using nested PCR from the blood or spleen of 6 to 7-month-old swine. In Kanazawa city, blood mononuclear cells were collected from 50 cases in September 1993 to February 1994, and 4 of 10 in September, 2 of 11 in October, 2 of 9 in November, 3 of 10 in December, were positive for the virus genome. In February 1994, the virus genome was amplified in splenic mononuclear cell samples of 3 of 10 cases, which were negative for virus genome in blood mononuclear cell samples. On the other hand, in Kagawa Prefecture where 160 cases were examined from July 1995 to March 1996, the virus genome was detectable from the blood samples in 5 of 20, 2 of 20 and one of 20 in September, October, and November, respectively. The virus genome was detected in January, February and March in spleen mononuclear cells from 4 cases, which were negative in the blood samples. These results suggested that JE virus persistently infected the mononuclear cells of blood and spleen of swine during the winter period.

—Key words : Japanese encephalitis, mononuclear cell, virus overwintering.

—J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 50, 731~734 (1997)

日本獣医公衆衛生学会誌編集委員会委員

【編集委員】

◎金内 長司 (麻布大学獣医学部)
○金子 賢一 (東京農工大学農学部)
伊藤喜久治 (東京大学農学部)
高島 郁夫 (北海道大学獣医学部)
山本 茂貴 (国立公衆衛生院)

杉本 千尋 (北海道大学獣医学部)
松坂 尚典 (岩手大学農学部)
後藤 公吉 (新潟県衛生公害研究所)

【編集専門委員】

藤原 公策 (日本大学生物資源科学部)

【専門審査委員】

柚木 弘之 (元鹿児島大学農学部)
平 詔亨 (農林水産省家畜衛生試験場)
明石 博臣 (農林水産省家畜衛生試験場)

(◎委員長, ○副委員長)

編集人 日本獣医公衆衛生学会
会長 植村 興