

3 調査研究

3・1 報 文

1) 熊本県内の日本脳炎ウイルス疫学調査について

大迫英夫 吉岡健太 戸田純子 日高直子^{※1}
原田誠也 西村浩一 鎌田龍星^{※2} 沢辺京子^{※3}

要 旨

ブタの日本脳炎ウイルス (JEV) の抗体調査の結果、本県における JEV 活動時期は主に 8 月～9 月であった。ブタと蚊から分離された JEV のエンベロープ遺伝子領域の系統樹解析で、韓国の蚊分離株 (2012 年) と熊本県のブタ分離株 (2009 年, 2010 年) の塩基配列が一致した。一方、大陸飛来性コガタアカイエカ (Ct) 調査の結果、3 個体が大陸型 Ct と判定された。また、Ct のミトコンドリア DNA の COI 遺伝子 PCR 産物の酵素処理後の切断パターンで日本型 Ct と大陸型 Ct の識別が可能であることが明らかとなった。

キーワード： 日本脳炎, ブタ, E 領域, コガタアカイエカ, CO I 遺伝子

はじめに

日本脳炎 (Japanese encephalitis : JE) は、主にコガタアカイエカ (*Culex tritaeniorhynchus* : Ct) によって媒介され、フラビウイルス科の日本脳炎ウイルス (*Japanese encephalitis virus* : JEV) によっておこるウイルス感染症であり、ヒトに重篤な急性脳炎をおこす。ブタが主な増幅動物である。ヒトの発病率は、100～1000 人に 1 人程度と考えられているが、いったん脳炎症状を起こすと、致死率は 20～40%前後と高く、回復しても半数程度は重度の後遺症が残るため、ワクチン接種や蚊の吸血を防ぐなどの感染防止対策が重要である。日本でのヒトの JE 発生は、近年、年間数名程度であるが、厚生労働省が実施している日本脳炎感染源調査では、西日本の多くの県で、夏場にブタでの JEV の新鮮感染が認められ、JEV の活動はいまだに活発である。また、2004 年から 2014 年までの都道府県別患者数は、熊本県が 10 名と最も多い状況である。

熊本県では、毎年 7 月～9 月にブタ血清の JEV 抗体検査を実施し、新鮮感染を示す 2-メルカプトエタノー

ル (2ME) 感受性抗体の検出と赤血球凝集抑制 (HI) 抗体保有率が 50%以上認められた時点で、県内に JE に対する注意喚起を行ってきたが、近年、注意喚起が患者発生後になる場合がある。

JEV はエンベロープ (E) 遺伝子領域で I～V 型に分類される。日本では 1990 年以前は III 型が主に検出されていたが、1990 年以降は I 型が主に検出されている。検出される主な遺伝子型が変化した原因は明らかにされていないが、海外の JEV 分離株と日本の分離株との比較から、なんらかの方法で海外から移入してきている可能性が指摘されている。その方法の一つとして JEV に感染した蚊が持ち込むことが考えられる。

近年、沢辺らの調査¹⁾により、ミトコンドリア DNA の *Cytochrome oxidase subunit I* (Co I) 遺伝子の解析により、中国大陸からの Ct 飛来が報告されている。

そこで、近年注意喚起が患者発生後になることから、県民に対して JE の適時的注意喚起の時期を科学的根拠に基づき見直すため、熊本県内での JEV

※1 現熊本県県南芦北振興局保健福祉環境部 ※2 山口大学共同獣医学部 ※3 国立感染症研究所

活動状況の調査を実施し、海外から JEV が侵入しているかを確認するため、大陸飛来性 Ct の JEV 保有の調査を行ったので報告する。

材料と方法

・**ブタ血清**：2009 年～2014 年の日本脳炎感染源流行予測調査事業で 7 月中旬～9 月上旬に週 1 回県内のと畜場で採取したブタ血清 1282 検体 (2011 年は 4 月～9 月) について、常法²⁾により HI 抗体価と 2ME 感受性抗体価を測定した。JEV 遺伝子検査は、ブタ血清から QIAamp ViralRNA Mini Kit で RNA を抽出し、cDNA 作成後、Real time PCR 法³⁾で行った。ウイルス分離には Vero9013 細胞を用いた。また、分離された JEV の E 領域の 1500 塩基について、シーケンス解析を実施した。

・**蚊の調査**：2012 年～2013 年 (期間：4～9 月に週 1 回 CO²トラップ設置時間：日没前～翌日午前中) に 3 か所の県内豚舎で捕獲された蚊約 23,000 個体 520 プール (捕獲場所と種類毎に 100 個体までを 1 プールとした) 及び 2013 年～2014 年の 7～9 月に熊本県農業研究センターに設置してある、稲の害虫であるウンカ類の飛来予測用ネットトラップで捕獲された蚊 13 個体を検査材料とした。JEV 遺伝子検査、ウイルス分離及び遺伝子解析はブタ血清と同様の方法で行った。さらに、国内型 Ct と大陸型 Ct を識別するため、ネットトラップ捕獲蚊は脚部から QIAamp DNA Mini Kit で DNA を抽出後、CO I 遺伝子をターゲットとした PCR⁴⁾を実施し、増幅産物の塩基配列を系統樹解析を実施した。また、大陸型 Ct が捕獲された日の風向をアメリカ海洋大気局 (NOAA) の HYSPLIT MODEL で確認した。さらに、大陸型 Ct の簡易識別法を検討するため、大陸型及び国内型 Ct の CO I 遺伝子 PCR 増幅産物に制限酵素 Hap II 及び Bcn I を 37℃30 分作用させ、切断パターンを比較した。

結果及び考察

・ブタ血清の JEV 抗体検査結果及び遺伝子検査結果

ブタ血清の JEV の HI 抗体陽性数、PCR 陽性数及び分離数を表 1 に示した。8 月～9 月に HI 抗体陽性数、PCR 陽性数及び JEV 分離数が多いことがわかった。JEV の新鮮感染を示す豚血清中の HI 抗体陽性率及び 2ME 感受性抗体陽性率を表 2 に示した。7 月の 3 回目以降の検査で 2ME 感受性抗体が認められ、遅くとも 3 回目以降の検査では、HI 抗体陽性率が 50% 以上になった。これらのことから、熊本県内では主に 7 月中旬以降から JEV の活動が始まり、8～9 月が最もブタ体内で

JEV が増殖する時期であることが分かった。一方、ブタの飼育地域別で HI 抗体陽性率を比較したところ、U 地域 (図 1-a) は 7 月下旬～8 月上旬には、HI 抗体陽性率が 50% 以上になるが、H 地区 (図 1-b) は年度によりバラツキはあるが、抗体は認められるが、抗体保有率が低い、又は抗体保有率が上昇する時期が 8 月下旬～9 月上旬になるなど、ブタの飼育地域毎で抗体価の推移に特徴が認められた (図 1)。西村ら⁵⁾は、2010 年 7 月～2011 年 3 月までのブタ血清中の JEV 抗体検査の結果から、ブタ飼育農場の豚舎構造などの飼育環境や周囲の環境の違いなどによる蚊の発生状況が JEV の抗体価の違いに影響していると推察している。今回の調査でも、U 地域と H 地域のように地域により、ある程度の JEV の活動時期に地域毎の流行パターンが認められ、豚舎周辺の環境要因が蚊の発生状況に影響し、JEV 抗体価の変動パターンに影響していることが推察された。

これらの調査結果を基に、熊本県の JE 注意喚起基準を U 地域のような JEV の HI 抗体陽性率が早期に上昇する地域のブタ血清を検査対象とし、従来基準 (2ME 感受性抗体の検出と HI 抗体陽性率が 50% 以上) から新基準 (HI 抗体陽性個体の確認又は JEV 遺伝子の確認した時) に変更した。

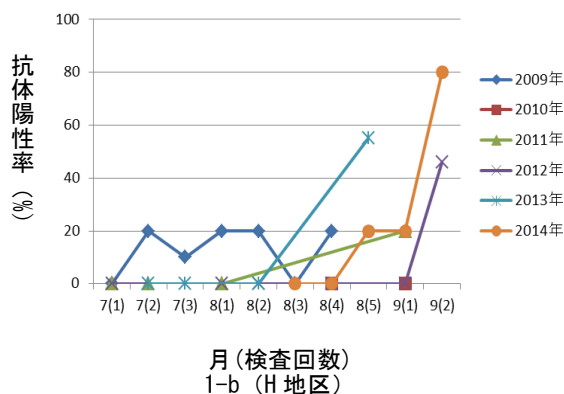
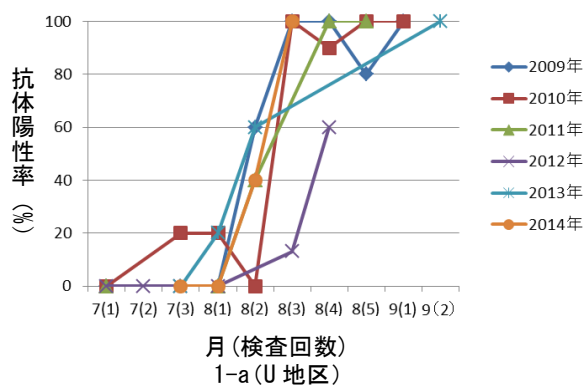


図 1 ブタ HI 抗体陽性率

・養豚場捕獲蚊の JEV 遺伝子検査結果

蚊は、約 22,700 個体採取され、そのうち約 20,000 個体が Ct であった(図 2)。月別では、8 月が最も多く全体の 58%を占めた(図 3)。PCR 検査は 520 検体検査し、28 検体が PCR 陽性となり、8 月に捕獲された 2 検体から JEV が分離された(表 3)。10 月までは Ct が捕獲されているが、10 月に JEV 遺伝子は確認されていない。Ct は秋以降に生まれた個体は、吸血及び繁殖行動が抑制されることが知られており、Ct が JEV を保有したまま越冬することは難しいと思われる。しかし、冬場でのブタの JEV 発生の報告⁶⁾や 12 月にイノシシから JEV が分離された報告⁷⁾もある。Ct が活動しない時期のこれらの事例には Ct 以外の蚊の関与が考えられた。

熊本県では JE 患者が 2004～2014 年までの間に、10 名発生しており、その発生時期は 8～9 月であり、ブタと蚊の JEV 活動状況と時期的に重なっている。原田ら⁸⁾は、熊本県での 2004～2010 年の自然感染率は 1.5%であると報告している。自然感染率は不明であるが、2010 年以降も熊本県内で、JE 患者が発生しているため、自然感染が持続していると思われる。

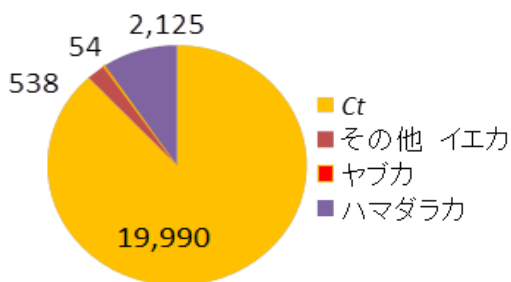


図 2 養豚場捕獲蚊の種類

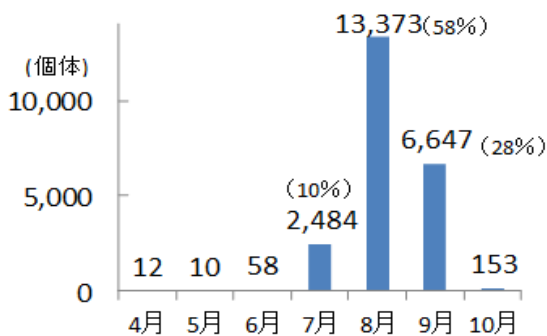


図 3 養豚場捕獲蚊の月別捕獲結果

・ネットトラップ捕獲蚊検査結果

ウシカ飛来予測用のネットトラップで、2013 年に 8 個体、2014 年に 5 個体の Ct が捕獲された(表 4)。これら 13 個体の JEV 遺伝子検査は陰性であった。一方、これらの CO I 遺伝子を系統樹解析した結果、2013 年の 7 月と 9 月の各 1 個体及び 2014 年 8 月の 1 個体が大陸型 Ct のクラスターに分類された(図 6)。大陸型 Ct 遺伝子を持つ蚊が捕獲された日の気流を確認したところ、2013 年 7 月と 2014 年 8 月は中国大陸南岸から、2013 年 9 月は朝鮮半島南岸からの気流があったことが確認された。沢辺らのグループの調査¹⁾でも、佐賀県や壱岐でこれら大陸型遺伝子を持つ Ct が確認されている。Ct は、蚊の中では飛翔能力が高いことが実験で証明されており¹⁾、気流にもよるが、大陸方面から飛来することは十分可能である。

大陸型 Ct 2 個体と日本型 Ct のクラスターに分類された蚊の CO I 遺伝子 PCR 産物(図 4)に制限酵素 Hap II 及び Bcn I を作用させると、大陸型 Ct のみ切断された(図 5)。Ct の CO I 遺伝子 PCR 産物を制限酵素処理することで、大陸型と日本型 Ct の識別が可能であることがわかった。制限酵素処理は遺伝子解析よりも、効率的に多検体処理が可能である。この制限酵素処理による飛来性 Ct の確認は多検体の遺伝子を確認する場合のスクリーニング方法として十分活用できると考えられた。

・JEV 分離株系統樹解析結果

ブタ及び蚊から分離された JEV の E 領域系統樹解析の結果、分離株は全て I 型であった。また、熊本県の蚊分離株 (Mo/kumamoto/284/2012) が韓国蚊分離株 (Mo/South Korea/2010/JN587259) と同じクラスターに分類され、E 領域の相同性は 99%であった。さらに、この韓国で蚊から分離された株と熊本県でブタから分離された株 (Sw/kumamoto/125/2010, Sw/Kumamoto/94/2009) の E 領域の塩基配列が一致した(図 7)。JEV はこれまでの多くの研究者の調査結果から、海外から侵入してくる JEV とその地域で感染環を形成している JEV がいると考えられる。JEV の海外からの飛来については、南方からの渡り鳥の調査⁹⁾が過去に行われているが、著しく高い中和抗体を認めた個体の報告はあるが、ウイルス分離までには至っていない。今回の調査で捕獲された大陸性 Ct の遺伝子を持つ Ct からは JEV 遺伝子は確認されなかったが、韓国の蚊から分離された JEV と熊本県内のブタから分離された JEV の E 領域が一致したこと、及び大陸型 Ct が県内で確認されたことから、JEV が国内に侵入してくるルートとして、JEV を保有した蚊が飛来してくる可能性も考えられた。

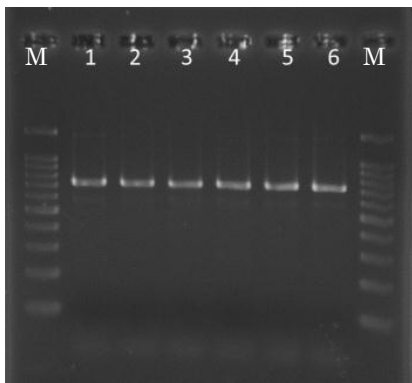
表3 養豚場捕獲蚊の月別 JEV 検査結果

月	2012		2013		合計	
	検体数 (PCR 陽性数)	分離数	検体数 (PCR 陽性数)	分離数	検体数 (PCR 陽性数)	分離数
4月			3(1)		3(1)	
5月			1(1)		1(1)	
6月	2		3(2)		5(2)	
7月	75		17(2)		92(2)	
8月	227(9)	1	50(8)	1	277(17)	2
9月	79(2)		35(3)		114(5)	
10月	19		9		28	
計	402(12)	1	118(16)	1	520(28)	2

表4 ネットトラップ蚊の捕獲結果

	7月	8月	9月	10月	計
2013年	3(1)	0	4(1)	1	8(2)
2014年	0	2(1)	1	2	5(1)

() :大陸型 Ct



大陸型 Ct : 1, 2 日本型 Ct : 3, 4
 シナハマダラカ : 5 ユスリカ : 6 M: マーカー

図4 CO I 遺伝子 PCR 泳動結果

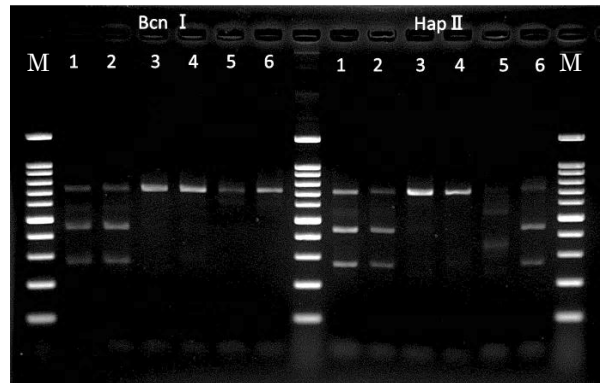


図5 CO I 遺伝子制限酵素処理後の泳動結果

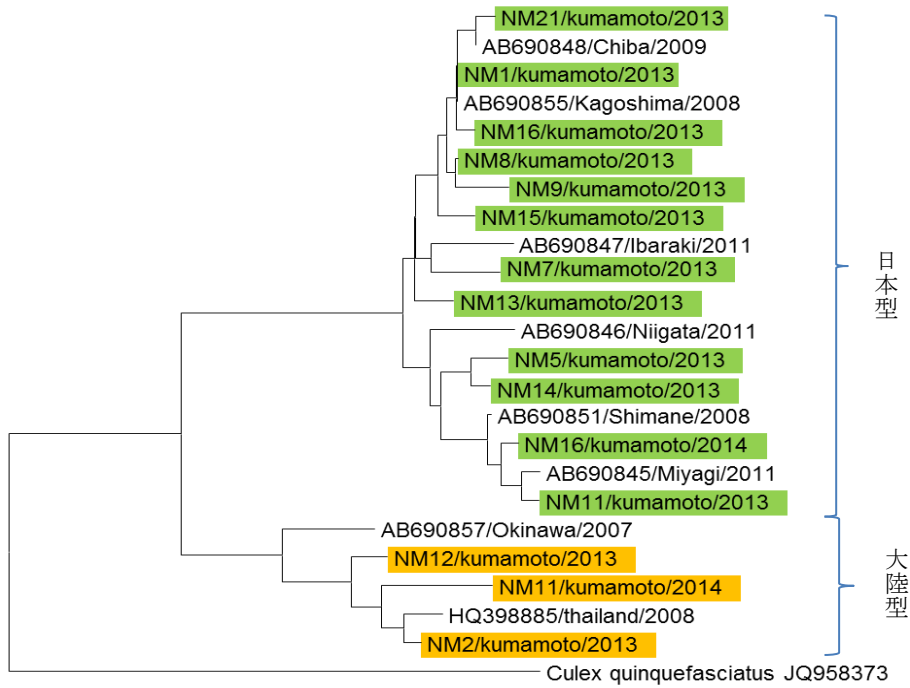


図 6 Ct の COI 遺伝子系統樹解析

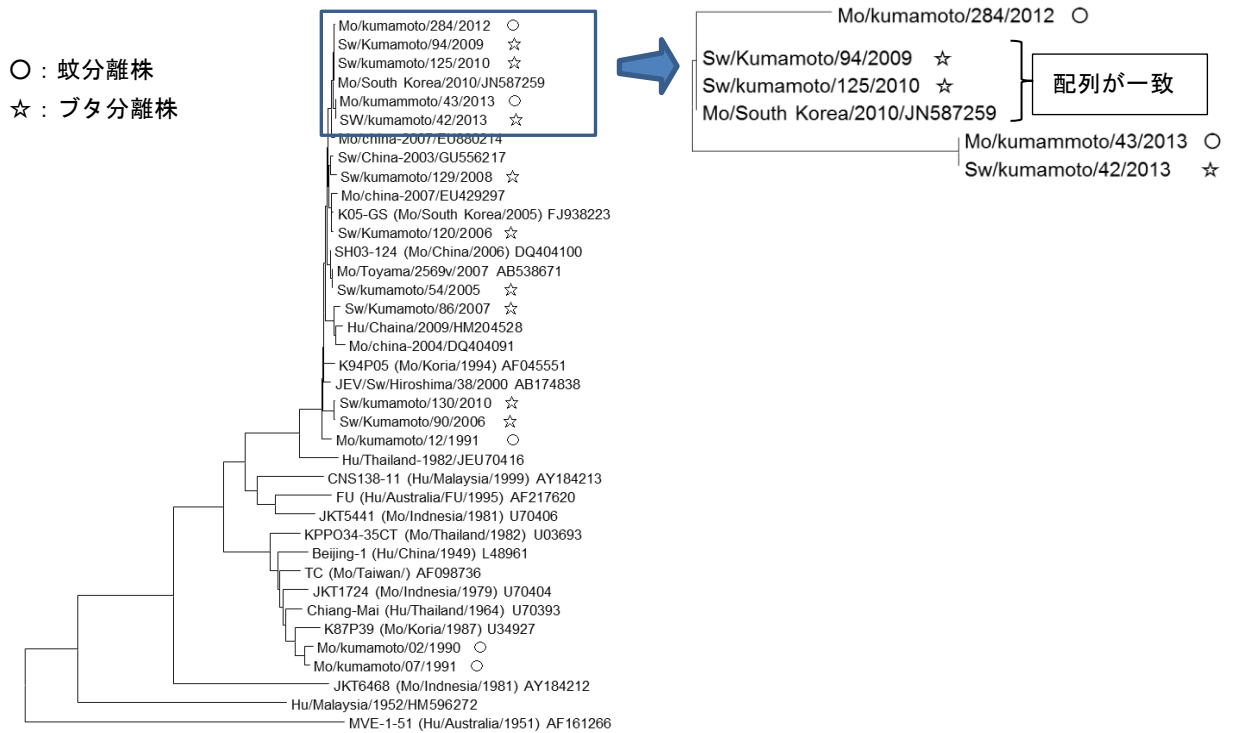


図 7 JEV の E 遺伝子領域の系統樹解析結果

まとめ

熊本県内では主に7月中旬以降から JEV の活動が始まり、8~9月が最もブタ体内で JEV が増殖する時期であることが分かった。ブタの JEV 抗体検査で、ブタの飼養地域毎で抗体価の推移に特徴が認められた。今回の調査結果を基に、熊本県の JE 注意喚起基準を JEV の HI 抗体陽性率が早期に上昇する地域のブタ血清を検査対象とし、従来基準（2ME 感受性抗体の検出と HI 抗体陽性率が 50%以上）から新基準（HI 抗体陽性個体の確認又は JEV 遺伝子の確認した時）に変更した。

分離された JEV の E 領域系統樹解析の結果、韓国蚊分離株（Mo/South Korea/2010/JN587259）と熊本県でブタから分離された株（Sw/Kumanoto/125/2010 Sw/Kumamoto/94/ 2009）の E 領域の塩基配列が一致した。

ネットトラップ捕獲 Ct の 3 個体が大陸型 Ct に分類され、熊本県内で大陸性 Ct 飛来を確認した。JEV 遺伝子はこれらから検出されなかったが、JEV の系統解析結果及びネットトラップ捕獲 Ct の結果から、JEV を保有した蚊が飛来してくる可能性が考えられた。また、Ct の CO I 遺伝子 PCR 産物に制限酵素 Hap II 及び Bcn I を作用させると、大陸型 Ct のみ切断されることから、制限酵素処理は、飛来性 Ct の確認のための、スクリーニング方法として十分活用できると考えられた。

文献

- 1)化学療法の領域：vol.30.No2.(2014)
- 2)厚生労働省：感染症流行予測調査事業検査術式（2002）
- 3)高崎智彦：厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）平成 20 年度分担研究報告書 81-84（2009）
- 4) Folmer O, et all , Molecular Marine Biology and Biotechnology. 1994;3:294-297
- 5)西村浩一，清田直子，原田誠也：熊本県保健環境科学研究所報 No40. (2010)
- 6)山西重機：日本獣医師会雑誌 48, p.803（1995）
- 7)冬季に捕獲されたイノシシからの日本脳炎ウイルスの分離 IASR.Vol. 30 p. 156-157: 2009 年 6 月
- 8)高崎智彦：厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）平成 20 年度~平成 22 年度 総合報告書 34-39（2011）
- 9) 旭興正：日本細菌学雑誌，8(3)，(1953)