

都内のブタにおける日本脳炎ウイルス感染状況（平成 17 年度）

田部井 由紀子*, 長谷川 道弥*, 岩崎 則子*, 岡崎 輝江*, 吉田 靖子*, 山田 澄夫**

Surveillance of Japanese Encephalitis Virus in Swine in Tokyo, Apr. 2005 - Mar. 2006

Yukiko Tabei*, Michiya Hasegawa*, Noriko Iwasaki*, Terue Okazaki*,
Yasuko Yoshida* and Sumio Yamada**

Keywords : 日本脳炎ウイルス Japanese encephalitis virus, ブタ swine, エンベロープ領域 envelope protein region, 遺伝子解析 genetic analysis

はじめに

日本脳炎は重篤な急性脳炎であり、世界全体においては少なくとも年間 5 万人の患者が発生し、1 万人が死亡している。患者の大部分が小児であること、罹患した際の死亡率が高いこと、死に至らない場合においても中枢神経系の重篤な後遺症を残すことから、世界保健機関（WHO）は、特に患者発生数の多いアジア地域において、日本脳炎は重大な公衆衛生上の問題のひとつであるとしている¹⁾。

日本における患者発生は、1967 年にワクチン接種が開始される以前には年間 1 千人にも達していたが、これ以降は激減し、近年では年間 10 人未満となっている²⁾。しかしながら、2002 年には定型的な脳炎症状までには至らない髄膜炎症状のみを呈した患者から日本脳炎ウイルスが検出されたという報告もあり³⁾、国内での患者発生は新たな展開を迎えている。また、現行の日本脳炎ワクチン接種者が急性散在性脳脊髄炎（Acute disseminated encephalomyelitis : ADEM）を発病したことから、厚生労働省は 2005 年 5 月から日本脳炎ワクチン接種の積極的勧奨を差し控えている⁴⁾。

このような状況の中において当センターでは、感染症流行予測調査事業によって都民の日本脳炎ウイルスに対する抗体保有調査（感受性調査）及び都内における日本脳炎ウイルスの動向監視（感染源調査）を 1965 年から継続して行っている⁵⁾。このうち感染源調査は、日本脳炎ウイルスの媒介蚊であるコガタアカイエカと増幅動物であるブタの間で感染環を構築していることに着目し、ブタの日本脳炎ウイルス感染状況を調査するための抗体検査及びウイルス分離試験並びにコガタアカイエカの消長と蚊からのウイルス分離試験によって、日本脳炎ウイルスの動向監視をしている。

平成 17 年度のブタにおける感染源調査において、ここ数年間に例をみない日本脳炎ウイルスの高い感染率を経験し、更にブタ血清 2 件から日本脳炎ウイルスを分離した。そこで本報では、ブタにおける日本脳炎ウイルス感染状況及び

分離されたウイルスの遺伝子解析結果について報告する。

材料と方法

1. 調査対象

調査対象は、平成 17 年度（2005 年 4 月～2006 年 3 月）の感染症流行予測調査事業における日本脳炎感染源調査を行う目的で、芝浦食肉検査所八王子支所において採取された都内で飼育されたブタの血清 1,000 件（1 回あたり 50 件×20 回）である。

2. 検査方法

1) 抗体検査

ブタ血清における日本脳炎ウイルスに対する抗体保有調査は、赤血球凝集抑制（Hemagglutination inhibition : 以下 HI）試験によって行った⁶⁾。すなわち、アセトンで処理した 10 倍希釈血清を 2 倍段階希釈し、これに 4 単位に調整した日本脳炎ウイルス（JaGAr 01 株）を加え 4℃で 1 晩静置後、0.33 %ガチョウ赤血球浮遊液を加えて 37℃で 1 時間反応させ、凝集の有無を確認した。HI 抗体価は赤血球凝集を抑制した血清の最高希釈倍数とし、HI 抗体価 10 倍以上を抗体陽性とした。また、感染初期の指標となる IgM 抗体の確認は、2-メルカプトエタノール（以下 2ME）を加え 37℃で 1 時間反応させた後、アセトン処理を行い、HI 抗体価を測定した。2ME 処理後の HI 抗体価が通常の方法で測定した HI 抗体価よりも 8 倍以上減少した場合を、2ME 感受性抗体（IgM 抗体）陽性とした。

2) ウイルス分離試験

日本脳炎ウイルスの分離試験は、日本脳炎ウイルスに対する HI 抗体が検出され、かつ感染初期を示す 2ME 感受性抗体が確認された時期（流行時期）及びその前後の週に採取されたブタ血清 400 件のうちで、HI 抗体価が 10 倍または 10 倍未満であった 242 件を対象として、その 0.02 ml を乳飲みマウスの脳内に接種した。接種後 10 日間観察し、中枢神

* 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

** 東京都健康安全研究センター微生物部

表1. ブタ血清における日本脳炎HI抗体保有状況(JaGAR 01株)

搬入日 (17年度)	検査数	HI抗体価(倍)											抗体 保有率 (%)	2ME感受性 抗体保有率 (%)*	ウイルス 分離**		
		<10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	≥5120					
4月22日	50	50													0		
5月20日	50	50													0		
6月24日	50	50													0		
7月29日	50	50													0		
8月5日	50	50													0		
8月19日	50	50													0		
9月2日	50	48	2												4	0 (0/2)	0/50
9月9日	50	48				1				1					4	100 (2/2)	1/48
9月16日	50	45		1	1			1	2						10	80 (4/5)	0/45
9月30日	50	30			2	3	11	4							40	45 (9/20)	0/30
10月7日	50	25			1	1	6	10	7						50	68 (17/25)	0/25
10月14日	50	16	1	1			2	4	8	18					68	38 (12/32)	0/17
10月21日	50	14					1		10	16	9				72	19 (7/36)	1/14
10月28日	50	13					5	7	10	9	6				74	0 (0/37)	0/13
11月11日	50	19					2	11	14	4					62	0 (0/31)	
11月25日	50	15			1	4	12	15	3						70	0 (0/35)	
12月9日	50	20			1	4	6	16	3						60	0 (0/30)	
1月20日	50	19	1		2	15	10	3							62	0 (0/30)	
2月17日	50	25	1		3	2	9	7	3						50	0 (0/24)	
3月10日	50	40			3	6	1								20	0 (0/10)	

*2ME感受性抗体陽性数/HI抗体陽性数 (10倍以上)

**ウイルス分離数/供試血清数

抗体保有率及び2ME感受性抗体保有率は小数点以下を四捨五入して表記した

経症状等を呈したマウスの脳を採取して、10%乳剤を作製した。更に10,000 rpmで30分間遠心した脳乳剤の上清(以下:分離ウイルス液)は、日本脳炎ウイルスに対する既知抗血清を用いたHI試験によって同ウイルスの同定を行った⁶⁾。

3) 遺伝子解析

ウイルスRNAの抽出は、分離ウイルス液200 µlからセパゾンRVR(三光純薬)を用いて行い、滅菌蒸留水20 µlで再浮遊したものを供試RNAとした。

PCR法による遺伝子増幅は、既報⁷⁾に準じて行った。すなわち、供試RNA 5 µlに日本脳炎ウイルスのエンベロープ領域(以下E領域)を標的としたプライマーJEP#5(5'-CTGGGAATGGCAATCGTGAC-3')及びJEP#6(5'-TTTGAGGGTTATCGAAGGAGCAT-3')を用いて、42℃で60分間の逆転写反応後、94℃,1分間,53℃,1分間,72℃,1分間のPCR反応を30回行い、2%アガロースゲル電気泳動によって遺伝子増幅産物の長さが528 bpであることを確認した。次に、遺伝子増幅産物をQIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN)を用いて精製し、Big Dye terminator法によるシークエンス反応により遺伝子増幅産物の塩基配列を決定した。また、決定した塩基配列のうち500 bpについて、NCBIのデータベース上の日本脳炎ウイルスの塩基配列と比較し、N-J法による系統樹を作成した⁸⁾。

結果及び考察

1. ブタにおける日本脳炎ウイルス感染状況

平成17年度に採取したブタ血清における日本脳炎ウイルスに対する抗体保有状況を表1に示した。今回の調査において、初めて抗体が検出されたのは9月2日搬入分の血清2件(抗体価:10倍)からであった。次いで、9月9日搬入分の血清2件からも抗体が検出され(抗体価:40倍,320倍)。

かつ感染初期を示す2ME感受性抗体(IgM抗体)が初めて検出された。これ以降に搬入された血清における抗体保有率は、表1に示したとおり9月16日搬入分で10%、9月30日で40%、10月7日で50%と上昇し、10月28日にピークである74%を示し、それ以降2月まで50~70%の範囲で推移した。2ME感受性抗体については、9月9日から10月21日搬入分まで検出され、2ME感受性抗体保有率としては、2ME感受性抗体が初めて検出された9月9日搬入分の100%をピークに、9月16日で80%、10月7日で45%と減少し、それ以降10月21日まで検出された。

日本脳炎ウイルスは、コガタアカイエカによってヒトやブタに媒介されるため、その感染流行時期は夏期である。今回の調査結果においてもブタにおける日本脳炎ウイルス感染の流行時期は、2ME感受性抗体が陽性であった時期からみると9月から10月であったことが推察された。ここ数年、抗体保有率、抗体価共に低く、2ME感受性抗体も検出されない、いわゆる日本脳炎ウイルス侵淫度の低さを示唆する調査結果が続いていた⁵⁾。しかしながら、平成17年度の調査結果では、抗体保有率、抗体価共に高く、更に2ME感受性抗体が2ヶ月に亘って検出された。今回の調査対象としたブタは、食用であるため全てが生後6ヶ月程度までのものである。このため、抗体を保有していたブタは、過去における感染でなく17年度におけるウイルス感染によって抗体を保有したと考えられる。したがって、平成17年度の都内におけるブタの日本脳炎ウイルス感染流行は、過去数年間に於いて最も大規模であったことが示唆された。

2. ブタ血清からのウイルス分離試験

流行時期とその前後の週において、HI抗体価が10倍または10倍未満であった242件について乳飲みマウス脳内接種

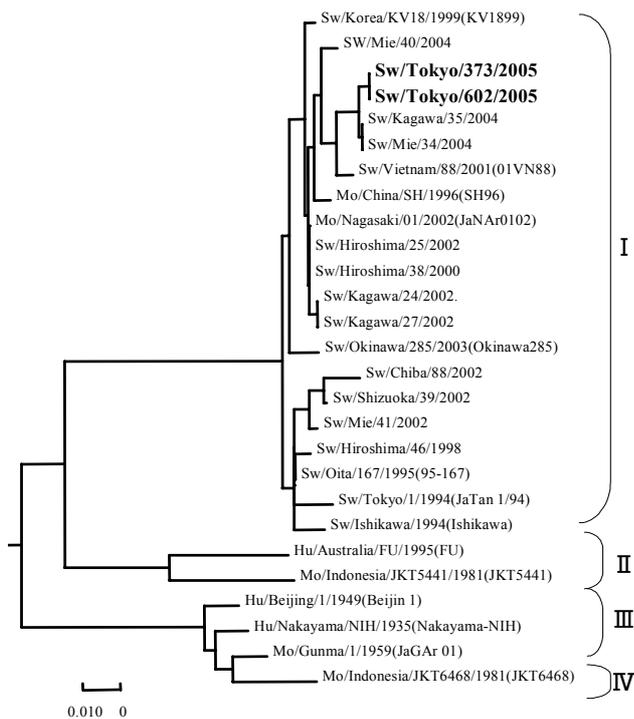


図 1. 日本脳炎ウイルス分離株のE領域(500 bp)における分子系統樹

ウイルス株名は、由来(Sw:ブタ, Mo:蚊, Hu:ヒト)/国名/株名/年の順に記した

による日本脳炎ウイルス分離試験を行った結果、9月9日搬入分 (Sw/Tokyo/373/2005) 及び 10月21日搬入分 (Sw/Tokyo/602/2005) のブタ血清から各々1株ずつ、計2株を分離した (表1)。

3. 分離した日本脳炎ウイルスの遺伝子解析

今回、分離した日本脳炎ウイルス2株についてのE領域500 bpにおける系統樹解析の結果を図1に示した。2株のウイルスは100%相同性を示し、遺伝子型はI型に属していた。また、NCBIのデータベース上の登録株と比較すると、2004年に香川県及び三重県で分離されたウイルス (Sw/Kagawa/35/2004株, Sw/Mie/34/2004株) に99.6%と最も高い相同性を示した。しかしながら、2002年に香川県で分離された Sw/Kagawa/24/2002株には98.0%、同年、三重県で分離された Sw/Mie/41/2002株には97.4%と、2004年に分離されたウイルスよりも相同性が低いことから、ウイルスの変異は地域性よりも検出年の関与の方が大きいことが推察された。

これまでの国内における流行ウイルスの遺伝子型はIII型が主流であったが、馬らの報告⁹⁾によると1990年代前半から近隣諸国の流行型であったI型が国内でも分離され初めた。更に現在ではブタ血清から分離されるウイルスの主流はI型となっている¹⁰⁾。東京都においては1994年にブタ血清から国内で初めてI型を分離 (Sw/Tokyo/1/1994株: JaTan 1/94株) しているが¹¹⁾、同じI型においても今回分離したウイルスと比較すると97.0%の相同性であった。

同一の遺伝子型間においても塩基配列の相違があることは、株の連続変異によってなのか、年によって異なる塩基

配列のウイルスが侵入しているのかは現状では不明である。その解明のためには、引き続きブタ血清からのウイルス分離試験及び遺伝子解析を行い、ブタが感染している日本脳炎ウイルスの動向及び流行する遺伝子型の変化を監視することが必要であろう。

近年、国内においてブタ血清から分離される日本脳炎ウイルスの遺伝子型はI型が主流であるが、桑山ら³⁾は2002年に無菌性髄膜炎患者の髄液からI型及びIII型の遺伝子を検出している。したがって、今後、遺伝子型によるウイルスの抗原性の違いやヒトに対する病原性の違いなどについての検討も必要となってくると思われる。更に、現在のところワクチン接種の積極的勧奨が差し控えられてはいるが、現行のワクチン株はIII型のBeijin-1株であるため、現状のようなブタにおけるI型主流の傾向が今後も継続されるようであれば、都民の日本脳炎ウイルスに対する免疫保有調査についても、同遺伝子型ウイルスを用いた抗体検査を追加するなどの、ウイルス側及び宿主(ヒト)側双方における監視体制を強化していく必要がある。

ま と め

都内で飼育されたブタの日本脳炎ウイルス感染状況を把握するため、日本脳炎ウイルスに対する抗体保有調査及びウイルス分離試験を行った。その結果、抗体保有率は9月から上昇し、最大で74%を示した。感染初期を示すIgM抗体が9月～10月の期間に採取されたブタ血清から検出されたことから、同期間が平成17年度の東京都におけるブタの日本脳炎ウイルス感染の流行時期であったことが示唆された。また、同期間に採取されたブタ血清から日本脳炎ウイルスが2株分離され、遺伝子解析の結果から、両株の遺伝子型は近年、国内のブタ血清から分離される主なウイルスと同一型のI型であることが確認された。

また、今回の調査によって得られたブタにおける感染率の上昇傾向が1年限りで終息するのか、次年以降も継続するのかは、都内における日本脳炎ウイルスの動向把握の観点から極めて興味深いところである。

文 献

- 1) Japanese encephalitis vaccine. *Weekly epidemiological record*, **73**, 337-344, 1998.
- 2) 厚生労働省健康局結核感染症課, 国立感染症研究所感染症情報センター: 平成16年度 感染症流行予測調査報告書, 92-113, 2006.
- 3) Kuwayama, M., Ito, M., Takao, S., et al.: *Emerg. Infect. Dis.*, **11**(3), 471-473, 2005.
- 4) 厚生労働省健康局結核感染症課長勧告 “定期的予防接種における日本脳炎ワクチン接種の積極的勧奨の差し控えについて” 平成17年5月30日健感発第0530001号.
- 5) 東京都福祉保健局健康安全室感染症対策課, 東京都健康安全研究センター: 平成16年度 感染症流行予測調査報告書, 1-6, 2006.

- 6) 国立予防衛生研究所学友会：ウイルス実験学 各論，
124-162, 1967, 丸善株式会社, 東京.
- 7) 山西重機, 藤井康三, 亀山妙子, 他：日本獣医師会雑誌, **10**, 803-808, 1995.
- 8) 田部井由紀子, 長島真美, 長谷川道弥, 他：東京衛研年報, **54**, 32-35, 2003.
- 9) Ma, S., Yoshida, Y., Makino, Y., *et al.* : *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **69**, 151-154, 2003.
- 10) 厚生労働省科学研究費補助金 平成 15 年度 新興・再興感染症研究事業 節足動物媒介性ウイルスに対する診断法の確立, 疫学及びワクチン開発に関する研究 研究報告書, 70-74, 2004.
- 11) Yoshida, Y., Tabei, Y., Hasegawa, M., *et al.*: *Jpn. J. Infect. Dis.*, **58**, 259-261, 2005.