

冬期における豚血液中からの日本脳炎ウイルスゲノムの検出

山西 重機・山中 康代・藤井 康三・亀山 妙子
三木 一男

Detection of Japanese Encephalitis Virus Genome from Swine Blood during Winter

Shigeki YAMANISHI, Yasuyo YAMANAKA, Koozou FUJII, Taeko KAMEYAMA and Kazuo MIKI

I はじめに

かつてわが国で、常在伝染病として恐れられた日本脳炎患者も激減し、近年は輸入感染症として海外からの患者、感染者移入を考慮さえしなくなってきた。

しかし夏期がくると例年の如くウイルス保有蚊の蔓延¹⁾²⁾が観察され、冬期間に蚊の活動の停止するわが国でウイルスは如にして存続するのであろうか。

先にわれわれは冬期間豚血液からPCRを用いて日本脳炎ウイルスゲノムを検出できることを報告した³⁾。そして冬期において豚間で新たな感染が起きていることを示唆する成績を得たが感染性ウイルスを分離することができなかった。

このことから今回も引き続いて行った豚血液中からの日本脳炎ウイルスゲノムの検索と検出ゲノムの確認について報告する。

II 材料および方法

1. 豚血液の採取

1994年12月から1995年1月に香川県内で飼育されていた豚(生後6~7ヶ月)から採血し、試料とした。また1993年6月から1994年5月に採血した日本脳炎ウイルスゲノム陽性豚血液を同定に用いた。

2. 日本脳炎ウイルスRNA抽出とcDNA合成

RNAの抽出はグアニジニウムチオシアネートを用いた方法で先に報告³⁾した手順に従った。

cDNAの合成反応は、抽出RNAに逆転写酵素(RAV-2, 宝酒造), Antisense primer, RT混合液(トリス塩酸, dNTP₅mix, KCl, MgCl₂, DTT)を加え50℃15分間反応させcDNAを作製した。

3. PCRによる増幅

nested PCR⁴⁾⁵⁾による1st (outer) PCRは, sense primer, antisense primer, KCl, Taq DNA合成酵素(宝酒造)を加

えて, Denature (94℃1分間), Annealing (50℃1.5分間), Extension (72℃2分間), finalextention (72℃5分間)の条件で40サイクル行った。

2nd (inner) PCRは, 1st PCR反応生成物に sense primer, antisense primer, PCR反応混合液(トリス塩酸, KCl, MgCl₂, dNTP₅mix), Taq DNA合成酵素を加え, Denature (94℃1分間) Annealing (60℃1.5分間), Extension (72℃2分間), final extention (72℃5分間)の条件で40サイクル行った。

PCR反応生成物は2%アガロース電気泳動をおこないエチジウムブロマイド染色でcDNA fragmentのバンドを確認した。

4. Oligonucleotide Primers

プライマーは日本脳炎エンベロープ蛋白コード領域⁶⁾(978~2477塩基)の中で表1に示すようにMurakamiらの報告⁷⁾に基づいた, JEP # 1~JEP # 4の2組および今回新たにJEP # 5~JEP # 12の4組の特定増幅部位を設定し, 宝酒造に合成を委託した。

またnested PCRをおこなうプライマーの組み合わせは表2によった。

5. 制限酵素による切断⁸⁾

制限酵素はFok-1, Nsp-1(宝酒造)を用いた。DNA fragmentの確認されたPCR反応生成物に, 添付緩衝液, 制限酵素を混合し, 37℃60分間反応させた。反応後ポリアクリルアミド電気泳動によって切断パターンを確認した。

プライマーJEP # 3/JEP # 4のPCR反応生成物181dpは, Fok-1により128bpと53bpに, Nsp-1により104bpと77bpに各々切断されるはずである。

6. 日本脳炎ウイルスの分離

PCRにより日本脳炎ウイルスゲノムを検出した血液についてC6/36細胞(ヒトスジシマカ由来細胞)⁹⁾, 乳のみマウス(生後48時間)脳内に接種¹⁰⁾を併用し常法に従った。

表1 日本脳炎ウイルスプライマーとcDNA増幅部位

CODE	SEQUENCE (5' → 3')	NUCLEOTIDE NUMBER
JEP # 1	CACAA CGAGA AGCGA GCTGA TAGTA	1218 - 1242
JEP # 2	CCCCA ACTTG CGCTG AATAA TTCCC	1458 - 1434
JEP # 3	GTGTG CAAAC AAGGC TTCAC TGATC	1248 - 1272
JEP # 4	TTTCC GAAGT GGTGG TTCCA TGCAC	1428 - 1404
JEP # 5	CTGGG AATGG GCAAT CGTGA C	987 - 1007
JEP # 6	TTTGA GGGTT ATCGA AGGAG CAT	1514 - 1492
JEP # 7	CTTGG GTGGA CTTGG TGCTA G	1033 - 1053
JEP # 8	GAGGG TTATC GAAGG AGCAT TG	1511 - 1490
JEP # 9	CTTGG GTGGA CTTGG TGCTA GA	1033 - 1054
JEP # 10	CCCGA AAAGT CCACA TCCGT TG	1304 - 1283
JEP # 11	GGAAT GGGCA ATCGT GACTT C	990 - 1010
JEP # 12	TCGTA TTTGA TGTTT TCTGG CTG	1390 - 1368

表2 nested PCRのプライマー組み合わせ

1 st PCR	2 nd PCR	Product (bp)
JEP # 1 - JEP # 2	JEP # 3 - JEP # 4	181
JEP # 5 - JEP # 6	JEP # 1 - JEP # 2	241
	JEP # 3 - JEP # 4	181
	JEP # 7 - JEP # 8	479
	JEP # 9 - JEP # 10	272
	JEP # 11 - JEP # 12	401
JEP # 7 - JEP # 8	JEP # 1 - JEP # 2	241
	JEP # 3 - JEP # 4	181

表3 豚血液中からの日本脳炎ウイルスゲノム検出とウイルス分離 (1994/95)

採血月日	検体数	RT-PCR		ウイルス分離
		1 st PCR	2 nd PCR	
12.14	20	0	3	0
1.13	20	0	2	0
1.25	20	0	3	0

7. 日本脳炎血球凝集抑制 (HI) 抗体と2-メルカプトエタノール (2 ME) 感受性抗体の検出

豚血清についてPCRによるゲノム検出と同時に1日齢ヒヨコ赤血球を用いた厚生省伝染病流行予測検査術式 (1978) によりHI抗体の検出を行った。さらに2 ME感受性を示した抗体を含む冬期間に採血された検体については、蔗糖密度勾配遠心法 (10~40% W/V) でグロブリン分画し、各フラクションについてELISA法¹¹⁾でIgG抗体価及びIgM抗体価を測定した。

III 成績

1. 豚血液中からの日本脳炎ウイルスゲノムの検出

表3に示すように冬期間の豚血液60例についてnested PCRでゲノム検出を行った。プライマーJEP # 1/2による1 st PCRでは全例陰性であったが、プライマーJEP # 3/4による2 nd PCRでは8例で181bpのバンドが確認できた。図1に1 st PCRの全陰性例と2 nd PCRによる181bpのバンドが検出された陽性例と陰性例を示した。

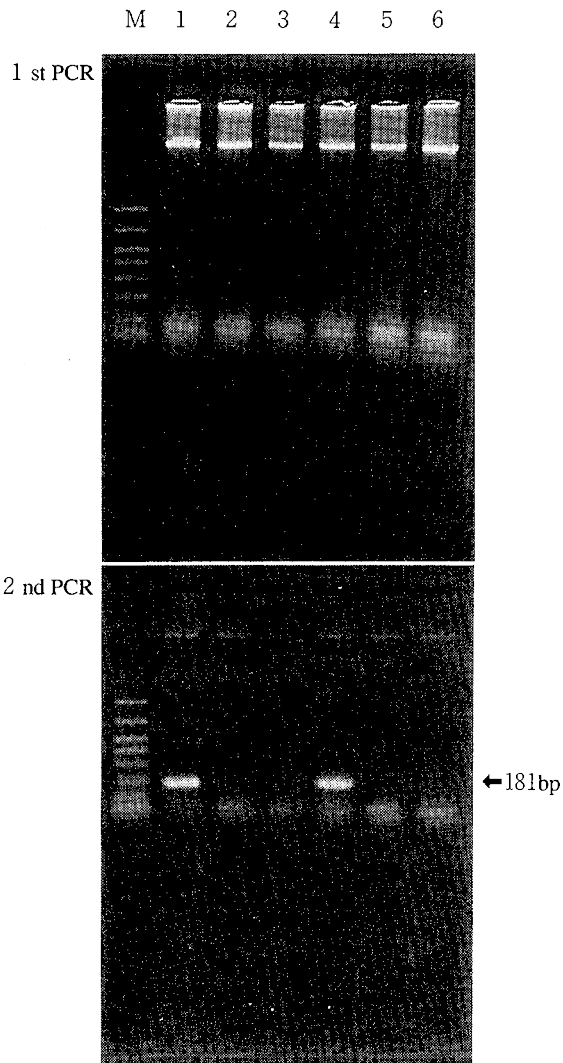
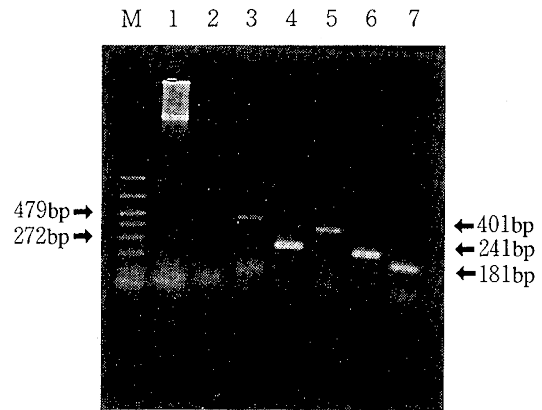


図1 豚血液中からの日本脳炎ウイルスゲノムの検出

2. 日本脳炎ウイルス検出ゲノムの確認

プライマー JEP # 3 / 4 による 2 nd PCR で 181bp のバンドを確認した 1993 / 94 年の 23 例と 1994 / 95 年の 8 例について、他のプライマーの組み合わせによる nested PCR でゲノムを確認した。

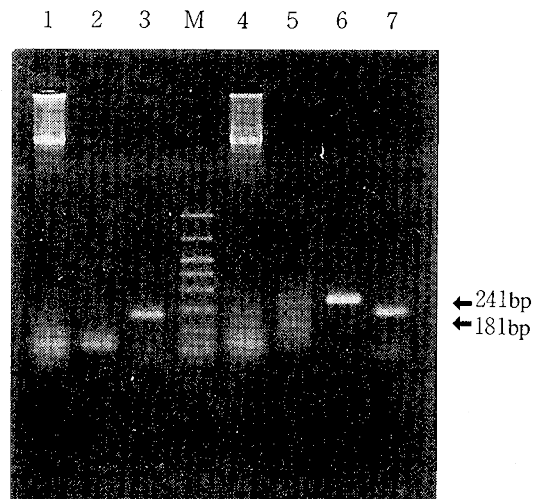
表 2 に示す各プライマーの組み合わせによって nested PCR を行ったところ、図 2 のように JEP # 5 / 6 プライマーによる 1 st PCR では陰性であったが、2 nd PCR で JEP # 1 / 2 プライマーを用いて 241bp、JEP # 3 / 4 プライマーを用いて 181bp、JEP # 7 / 8 プライマーを用いて 479bp、JEP # 9 / 10 プライマーを用いて 272bp、JEP # 11 / 12 プライマーを用いて 401bp、また図 3 のように JEP # 7 / 8 プライマーによる 1 st PCR では陰性であるが 2 nd PCR で JEP # 1 / 2 プライマーを用いて 241bp、JEP # 3 / 4 プライマーを用いて 181bps など全てで予想される位置にバンドを認めた。



M. マーカ

1. JEP # 5 / 6 プライマーによる 1 st PCR
この反応生成物で 2 ~ 7 の 2 nd PCR
2. JEP # 5 / 6 プライマーによる 2 nd PCR
3. JEP # 7 / 8 プライマーによる 2 nd PCR
4. JEP # 9 / 10 プライマーによる 2 nd PCR
5. JEP # 11 / 12 プライマーによる 2 nd PCR
6. JEP # 1 / 2 プライマーによる 2 nd PCR
7. JEP # 3 / 4 プライマーによる 2 nd PCR

図2 各プライマー組み合わせによる nested PCR



M. マーカ

1. JEP # 1 / 2 プライマーによる 1 st PCR
この反応生成物で 2 ~ 3 の 2 nd PCR
2. JEP # 1 / 2 プライマーによる 2 nd PCR
3. JEP # 3 / 4 プライマーによる 2 nd PCR
4. JEP # 7 / 8 プライマーによる 1 st PCR
この反応生成物で 5 ~ 7 の 2 nd PCR
5. JEP # 7 / 8 プライマーによる 2 nd PCR
6. JEP # 1 / 2 プライマーによる 2 nd PCR
7. JEP # 3 / 4 プライマーによる 2 nd PCR

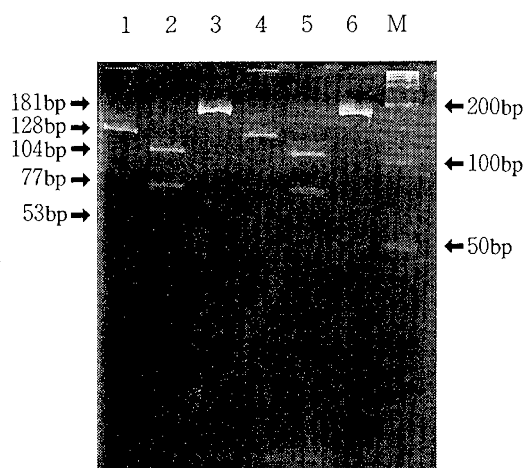
図3 各プライマー組み合わせによる nested PCR

3. 制限酵素による切断

プライマー JEP # 3 / 4 による PCR 反応生成物 181bp を制限酵素 Nsp - 1 及び Fok - 1 で切断した。図 4 に 7 月と 3 月採血検体でそれぞれ示したように Nsp - 1 では 104bp と 77bp に、Fok - 1 では 128bp と 53bp にそれぞれバンドが認められ全例で予想された位置で確認できた。

表4 豚血液中の年間をととした日本脳炎HI抗体保有状況 (1993~1994)

月	件数	HI抗体価								2ME感受性抗体		
		<10	10	20	40	80	160	320	640	1	1/2	1/4
6	50	50										
7	20	20										
8	20	19			1					1		
9	20	5		1		1	5	5	3		2	12
10	20	2			2	4	8	3	1	4	5	9
11	20	9		3		5	3				3	5
12	20	14	1				3	2			1	4
1	40	25	5	3	1	3	1	2			3	4
2	40	31	7			2					2	
3	40	38	2									
4	40	37	1			1	1				2	
5	40	39	1									



M. マーカ
 1. Fok-1 処理 (7月採血検体)
 2. Nsp-1 処理
 3. 未処理
 4. Fok-1 処理 (3月採血検体)
 5. Nsp-1 処理
 6. 未処理

図4 PCR反応生成物の制限酵素による切断パターン

4. 日本脳炎ウイルスの分離

C6/36細胞と乳のみマウスを併用してプライマーJEP#3/4による2nd PCRでゲノムを検出した豚血液からウイルス分離を行った。表3に示すように、日本脳炎ウイルスは分離できなかった。

5. 日本脳炎HI抗体と2-ME感受性抗体の推移

豚血清371例のHI抗体、2-ME感受性抗体の年間推移を表4に示した。HI抗体は冬期間でも低率であるが検出することができ、2-ME感受性抗体も9~1月まで確認できた。また冬期間の2ME感受性抗体検出例については、蔗糖密度勾配遠心法でグロブリン分画し、図

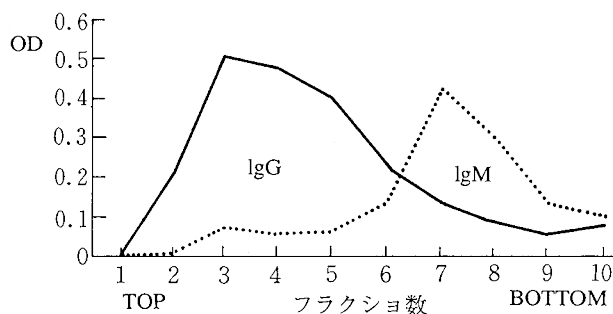


図5 蔗糖密度勾配遠心法によるグロブリン分画

5に示すようにIgM抗体であることを確認した。

IV 考察

主として温帯に位置するわが国の冬期間における日本脳炎ウイルスの存続様式は、よく知られていないが、周囲を海によって隔絶され、冬期間に蚊の活動の休止するわが国で日本脳炎ウイルスは如何にして存続するのであろうか。

常在地からのウイルス保有蚊移入、ウイルス感染渡り鳥の飛来、ウイルス保有蚊の成虫のままの越冬、また他の脊椎動物たとえばコウモリ、けつ歯類、冷血動物(へび、カエル、トカゲなど)にウイルスが潜伏感染して越冬するなど¹²⁾の説がある。

われわれは先に極微量かつ迅速診断法として近年開発されたPCR¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾を応用して、冬期間における豚血液から日本脳炎ウイルスゲノムを検出確認³⁾した。

豚血液からウイルスゲノムを直接検出することは培養によるウイルス分離と同じく豚における感染を示唆する事実であると考えられる。

使用した日本脳炎ウイルス特異的プライマーは、エンペロープ蛋白のコード領域⁶⁾(978~2477塩基)のなかで、先に用いたJEP#1/2, JEP#3/4と、今回、新たに検出ゲノム確認のためにJEP#5/6, JEP#7/8, JEP#9/10, JEP#11/12を設定した。

豚血液中からのゲノム検出のnested PCRにはJEP, 1/2による1st PCR, JEP, 3/4による2nd PCRで行った。

今回の1994~95年冬期間の豚血液中からのゲノム検出は前回同様に1st PCRでは全例で検出できなかった。しかし2nd PCRによって8例で181bpの日本脳炎ウイルスに特異的なcDNA fragmentを検出した。

しかし陽性対象として行った日本脳炎標準ウイルス(JaGAR-01, 中山株)では1st PCRで241bp, 2nd PCRで181bpがそれぞれ確認できた。

これはわれわれの行ったPCR感度が⁷⁾村上らの報告⁷⁾よりもやや低いこと、1st PCRで特異的なcDNA fragmentを検出できなかったのは、検体として全血液を用いたために、赤血球中のヘムに由来するポルフィリンがインヒビターとして作用したものととして考えられる¹⁶⁾。

今回の検討では、と畜場における検体採取の利便性からやむを得ず全血液を検体としたものであり、このことは今後さらに検討したいと考える。

日本脳炎ウイルスPCR反応生成物の確認方法については、各種プライマーの組み合わせによりPCRを行うと同時にDNA制限酵素Fok-1, Nsp-1の切断パターンによって同定した。

また今回、1月に採取された検体からIgM抗体を2例確認することができ、冬期間中に新しい感染がおきていることを補足的にも証明できた。

日本脳炎ウイルスゲノム検出は国内初めてのことであ

る。しかし冬期間における媒介動物、豚個体間の感染がどのように起こるかという問題は不明のままである。

気候的条件が影響するのか、なぜ、血液中ウイルスの感染力が弱くまた微量なのかについて引き続き検討する必要がある。

文 献

- 1) 中村央, 吉田政弘, 木村明名のほか: 大阪府公衛研所報 公衆衛生編, 31, 39-46 (1993)
- 2) 山本忠雄, 三木一男, 山西重機: 四国公衆衛生学会誌, 34, 256-260 (1989)
- 3) 山西重機, 藤井康三, 亀山妙子, 池尻久仁子, 三木一男: 香川県衛研所報, 21, 19-23 (1993)
- 4) 岡慎一: 日本臨床(特別号); 50, 96-103 (1992)
- 5) 松本豊海, 茶山一影, 熊田博光: 日本臨床(特別号), 50, 274-278 (1992)
- 6) Sumiyoshi H, Mori C, Fuke I et al: Virology, 161, 487-510 (1987)
- 7) Murakami S, Takahashi Y, Yoshida S et al: J Med Virol, 43, 175-181 (1994)
- 8) David AM, Greg AF: DNAサイエンス, 清水信義, 長野敬訳, 第1版, 231-241, 医学書院, 東京(1993)
- 9) 五十嵐章: 熱帯医学, 22, 255-264 (1980)
- 10) 大谷明, 清水文七: ウイルス実験学各論, 国立予防衛生研究所編, 第2版, 183-224, 丸善, 東京(1982)
- 11) 山西重機, 山本忠雄, 高樹正浩ほか: 岡山医学会誌, 97, 25-29 (1985)
- 12) 宮本勉: 医科ウイルス大学, 大里外啓郎, 359-366, 南江堂, 東京(1992)
- 13) 田中静吾, 上田國寛: 医学のあゆみ, 162, 503-506 (1992)
- 14) Saiki RK, Scharf S, Faloona F et al: Science, 230, 1350-1354 (1985)
- 15) 森田公一, 田中真理子, 五十嵐章: 臨床とウイルス, 18, 322-325 (1990)
- 16) Higuchi R: PCR Technology, Erlich HA ed, 31-38, Stockton Press, New York (1989)