

炭酸ガスライトトラップを用いて捕集した蚊の日本脳炎ウイルス保有状況調査

太田茉莉、田崎穂波¹⁾、追立のり子²⁾、竹村明浩、平良雅克、西嶋陽奈、岡田峰幸³⁾、佐藤重紀

Survey on the possession of Japanese encephalitis virus in *Culex tritaeniorhynchus* collected with light trap

Mari OHTA, Honami TASAKI, Noriko OITATE, Akihiro TAKEMURA, Masakatsu TAIRA, Haruna NISHIJIMA, Mineyuki OKADA, Shigenori SATO

キーワード：日本脳炎、コガタアカイエカ、ライトトラップ
Keywords: Japanese encephalitis, *Culex tritaeniorhynchus*, Light trap

(令和 3 年 7 月 29 日受付 令和 3 年 9 月 28 日受理)

はじめに

日本脳炎は日本脳炎ウイルス (JEV) を保有した蚊に刺されることにより感染、発症する急性脳炎である。千葉県では厚生労働省の感染症流行予測調査事業の感染源調査で、県内産ブタの血液中の抗 JEV 抗体保有状況調査を毎年行っている。これまでに抗体の保有を確認しているが、2015 年 9 月には県内では 25 年ぶりに日本脳炎患者が発生したことから、県内に JEV が浸潤していると考えられる。JEV はブタの体内で増殖し、蚊が媒介して人に感染する。近年、生活環境の変化により、ブタの抗体陽性率と患者発生は必ずしも一致していないと言われているため²⁾、県内における感染リスクを把握する目的で、現行の感染源調査に加え、よりヒトの近くに存在する蚊の JEV 遺伝子保有状況を調査した。

材料と方法

1. 調査実施期間および蚊の捕獲地点

2019 年は、7 月 18 日から 10 月 3 日に県内の 5 エリアで、5 回または 6 回の捕獲を行った。2020 年は、7 月 7 日から 10 月 27 日に県内の 5 エリアで、7 回または 8 回の捕獲を行った。

2. 蚊の捕獲方法

蚊の捕獲には、ライトトラップ (猪口鉄工所製) を使用し、CO₂ による蚊の誘引のため、2 kg のドライアイスを用いた。トラップは調査実施日の 16 時頃から翌朝 9 時頃まで約 17 時間設置し、回収した蚊は -20°C または -80°C で保存した。調査実施期間終了後、実体顕微鏡下で形態学的に種を同定した³⁾。なお、*Culex pipiens pallens* (アカイエカ) と *Culex pipiens molestus* (チカイエカ) については形態学的な同定は困難であるため、アカイエカ群とした。また、保存状態が悪く、形態学的に種の同定ができなかった個体は属までの同定結果を記し、同定不能とした。蚊は調査日、調査地点、蚊の種類ごとに分け、メスの個体について 2019 年は 1 プール 10 個体を上限に、2020 年は 25 個体を上限にプール検体を作製した。

3. 蚊からのウイルス遺伝子検出

プール検体をペッスルで破碎し、500 μ L の PBS を加え、

3,000 \times g で 15 分間遠心し、その上清を検体とした。MagNA Pure LC RNA Isolation Kit-High Performance (Roche) を用いて RNA を抽出し、前木らの報告したプライマー、プローブセットを用いてリアルタイム PCR を実施した⁴⁾。

リアルタイム PCR で陽性となった検体については、当所で独自に設計した、prM 領域をターゲットとしたプライマーである JEV-MF2 (5'-TGGAAAAGCAGTGGAAAAGAGTGT-3') および JEV-MR2 (5'-TTGTCGTTTGCCATGATTGTCAA-3') を用いて One step RT-PCR を実施した。PCR 条件は、2 \times Platinum SuperFi RT-PCR Master Mix (Applied Biosystems) 25 μ L、SuperScript IV RT Mix (Applied Biosystems) 0.5 μ L、50 μ M プライマー各 0.5 μ L、RNase free water 18.5 μ L、RNA 5 μ L の総量 50 μ L とし、50°C10 分、98°C2 分を 1 サイクル、98°C10 秒、50°C10 秒、72°C20 秒を 35 サイクル、72°C5 分を 1 サイクル行った。次に JEV-MF2、JEV-MR2 の内側に設計したプライマー (JEV-MF1: 5'-CATGTGGCTCGCGAGCTTGGC-3'、JEV-MR1: 5'-GTGGCTCCACTGGCTCCTT-3') を用い、Nested PCR を実施した。Nested PCR の条件は、10 \times Ex Taq Buffer (TaKaRa) 5 μ L、2.5mM dNTP Mixture (TaKaRa) 4 μ L、5U/ μ L TaKaRa Ex Taq (TaKaRa) 0.25 μ L、50 μ M プライマー各 0.5 μ L、RNase free water 37.75 μ L、1st PCR 産物 2 μ L の総量 50 μ L とし、95°C3 分を 1 サイクル、95°C30 秒、50°C45 秒、72°C45 秒を 35 サイクル、72°C5 分を 1 サイクル行った。得られた PCR 増幅産物について、ダイレクトシーケンシング法により塩基配列を決定した。得られた prM 領域 489 塩基について MEGA7 を用い、Neighbor-joining method (モデル: Kimura 2-parameter、ブートストラップ回数: 500) による系統樹解析を実施した。

4. ウイルス分離

ウイルス遺伝子が検出された検体について、C6/36 細胞を用いてウイルス分離を試みた。JEV 遺伝子陽性となったプール検体を 0.22 μ m フィルターで濾過し、24 ウェルプレートに単層を形成した C6/36 細胞に 100 μ L 接種した。28°C、5%CO₂ インキュベーター内で 1 時間吸着後、2%FBS 加 MEM を 1mL 加え、1 週間培養し、CPE を確認した。3 代継代を繰り返し、CPE が認められなかった場合も上清を回収し、リアルタイム

1) 現: 印旛保健所成田支所 2) 現: 習志野保健所 3) 現: 東総食肉衛生検査所

PCR を実施した。

結果および考察

捕獲したメスの蚊の種類と数は表-1、2 のとおりであった。

	印旛エリア	香取エリア	海浜エリア	京葉エリア	安房エリア	合計
コガタアカイエカ	48	235	24	8	2	317
アカイエカ群	43	14	85	10	2	154
ハマダライエカ	6	0	3	1	0	10
カラツイエカ	9	0	0	0	0	9
イエカ属種同定不能	9	3	4	0	0	16
ヒトスジシマカ	70	0	46	3	7	126
ヤマダシマカ	1	0	1	0	0	2
ヤマトヤブカ	1	0	1	0	0	2
オオクロヤブカ	0	0	0	19	0	19
キンバラナガハシカ	1	0	1	0	0	2
フタクロホシチビカ	0	0	1	0	0	1
シナハマダラカ	0	2	0	0	0	2
合計	188	254	166	41	11	660

	印旛エリア	香取エリア	海浜エリア	京葉エリア	山武エリア	合計
コガタアカイエカ	54	80	31	70	38	273
アカイエカ群	67	4	123	128	8	330
ハマダライエカ	2	0	0	1	0	3
カラツイエカ	0	1	0	0	0	1
イエカ属種同定不能	0	0	0	2	0	2
ヒトスジシマカ	59	3	6	6	2	76
トウゴウヤブカ	0	0	1	0	0	1
キンバラナガハシカ	1	0	0	0	0	1
ヤブカ属種同定不能	16	0	1	6	0	23
オオクロヤブカ	0	0	4	6	0	10
キンバラナガハシカ	1	0	0	3	0	4
シナハマダラカ	0	2	0	4	0	6
合計	200	90	166	226	48	730

2019年は132プール(そのうちコガタアカイエカは42プール)、2020年は145プール(コガタアカイエカ45プール)を検査した。2020年9月に香取エリアで捕獲されたコガタアカイエカの1プールでJEV遺伝子(JEV/Mos/Chiba/24/2020)が検出された。prM領域の489塩基について、NJ法による系統樹解析を実施した結果、遺伝子型I型と決定された(図-1)。さらに、この蚊が捕獲されたエリアで飼育されたブタから検出されたJEV遺伝子(JEV/Sw/Chiba/13/2020)と比較したところ、両者の遺伝子配列は100%一致した。遺伝子型I型は1990年代以降、ブタから検出されるようになり、現在、国内で主に検出される遺伝子型である^{5)・6)}。このことから、県内のブタと蚊の間でJEVの感染環が成立している可能性が示された。

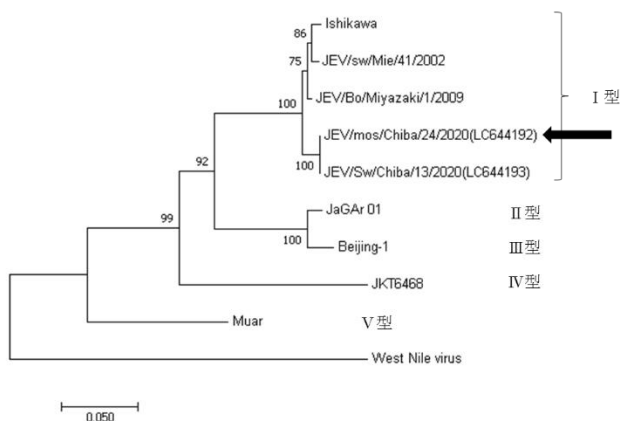


図-1 検出された JEV の prM 領域(489bp) の分子系統樹
矢印が本研究で検出された蚊の遺伝子

ウイルス分離では CPE は確認されず、回収した培養上清についてリアルタイム PCR を実施したところウイルス遺伝子の増幅は認められず、分離することはできなかった。

蚊の感染率を推定するため、Minimum infection rate (MIR) を「JEV 遺伝子陽性プール数÷検査に供したコガタアカイエカの個体数×1000」と定義し、算出したところ、本研究での MIR は 1.69 であった。これは、陽性プールに最低 1 個体の感染蚊が存在すると仮定した場合の、蚊 1000 個体中の感染個体数を表している。また、本研究と同様にコガタアカイエカから JEV 遺伝子を検出した研究における MIR は 0.41⁷⁾、1.13⁸⁾、1.04⁹⁾であった。一見、本研究での MIR は他の研究より高く見えるが、Murakami らの研究⁷⁾と Obara らの研究⁸⁾では、1 プールあたりの個体数が 50 であったため、実際の感染率より低く見積もられていると推察された。次に、プール陽性率(陽性プール数÷検査に供したプール数×100)で比較すると、本研究では 2.2%、他の研究では 1.9%⁷⁾、3.7%⁸⁾、1.9%⁹⁾となり、条件が異なると比較が困難であることが分かった。1600 個体の非感染蚊に 1 個体の感染蚊を入れたプール中からもウイルス遺伝子を検出できたという報告もあり¹⁰⁾、1 プールあたりの蚊の数の設定には議論の余地があると言える。

先に述べた他県の研究では^{7)・8)・9)}、養豚場で捕獲したコガタアカイエカを検査に供しているが、本研究では、鉄道の駅が近くにあるような比較的街中と言える場所で捕獲した蚊も検査に供したため、よりヒトに近いところで JEV 遺伝子保有蚊の存在が確認され、感染リスクがあることが示された。

また、流行予測調査では、2019 年は県内のブタ血液中の抗 JEV 抗体の上昇は認められなかったが¹¹⁾、2020 年は 8 月以降上昇がみられ、県内の JEV の活動が活発であったと考えられた。全国的に見ると、2019 年は日本脳炎患者が 8 名¹²⁾、2020 年は 5 名発生しており¹³⁾、県内での患者発生はなかった。

まとめ

2020 年に捕獲したコガタアカイエカから JEV 遺伝子 I 型が検出され、ヒトに近いところで JEV 遺伝子保有蚊の存在が確認された。引き続き、発生状況を注視するとともに、基本的な日本脳炎への予防方法である、蚊に刺されない対策(肌の露出を避ける、忌避剤の使用、網戸の設置等)および予防接種の推進等を徹底する必要がある。

謝辞

蚊の捕獲に協力していただいた施設の皆様に深謝いたします。

引用文献

- 1) 荒畑幸絵,北澤克彦,西村竜哉,本田昭仁: 2015 年夏に千葉県で発生した日本脳炎の乳児例,IASR,38, 153-154(2017).
- 2) ブタの日本脳炎抗体保有状況 - 2021 年度速報 -, 国立感染症研究所 (URL : <https://www.niid.go.jp/niid/ja/je-m/2075-idsc/yosoku/sokuhou/10567-je-yosoku-rapid2021-5.html>)
- 3) 津田良夫: 蚊の観察と生態調査(株式会社北隆館), I - XX (2013).

- 4) Maeki, T., Tajima, S., Kyaw, A. K., Matsumoto, F., Miura, K., Yamashita, A., et al. Comparison of Neutralizing Antibody Titers against Japanese Encephalitis Virus Genotype V Strain with Those against Genotype I and III Strains in the Sera of Japanese Encephalitis Patients in Japan in 2016., *Jpn. J. Infect. Dis.*, 71, 360-364(2018).
- 5) Nga, P. T., del Carmen Parquet, M., Cuong, V. D., Ma, S. P., Hasebe, F., Inoue, S., et al. : Shift in Japanese encephalitis virus (JEV) genotype circulating in northern Vietnam: implications for frequent introductions of JEV from Southeast Asia to East Asia. *Jornal of General Virology.*, 85, 1625–1631(2004).
- 6) Yoshida, Y., Tabei, Y., Hasegawa, M., Nagashima, M., Morozumi, S. : Genotypic analysis of Japanese encephalitis virus strains isolated from swine in Tokyo, Japan. *Jpn J Infect Dis*, 58, 259-261 (2005).
- 7) Murakami, M., Hori, K., Kitagawa, Y., Oikawa, Y., Kamimura, K., Takegami, T. : An Ecological Survey of Mosquitoes and the Distribution of Japanese Encephalitis Virus in Ishikawa Prefecture, Japan, between 2010 and 2014. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 70, 362-367 (2017).
- 8) Obara, M., Yamauchi, T., Watanabe, M., Hasegawa, S., Ueda, Y., Matsuno, K., et al. : Continuity and change of Japanese encephalitis virus in Toyama prefecture, Japan. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, 84(5), 695-708(2011).
- 9) Yoshikawa, A., Nabeshima, T., Inoue, S., Agoh, M., Morita, K. : Molecular and serological epidemiology of Japanese encephalitis virus (JEV) in a remote island of western Japan: an implication of JEV migration over the East China Sea. *Tropical Medicine and Health*, 44:8(2016).
- 10) Tang, Z., Yamada, H., Kraupa, C., Canic, S., Busquets, N., Talavera, S., et al. : High sensitivity of one-step real-time reverse transcription quantitative PCR to detect low virus titers in large mosquito pools. *Parasites Vectors*, 13:460(2020).
- 11) 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疫学センター : 令和元年度感染症流行予測調査報告,124-150(2021).
- 12) 感染症発生動向調査感染症週報(2019年第52週),厚生労働省/国立感染症研究所(URL : <https://www.niid.go.jp/niid/images/idsc/idwr/IDWR2019/idwr2019-52.pdf>)
- 13) 感染症発生動向調査感染症週報(2020年第52週・第53週),厚生労働省/国立感染症研究所(URL : <https://www.niid.go.jp/niid/images/idsc/idwr/IDWR2020/idwr2020-52-53.pdf>)