

長崎県における日本脳炎の疫学調査 (2011 年度)

— 豚の日本脳炎ウイルスに対する抗体保有状況調査 —

吉川 亮、山口 顕徳、平野 学、吾郷 昌信

Epidemiological Study of Japanese Encephalitis in Nagasaki Prefecture

in the year 2011

— Surveillance of swine infected by Japanese Encephalitis Virus —

Akira YOSHIKAWA, Akinori YAMAGUCHI, Manabu HIRANO and Masanobu AGOH

Key words : Japanese Encephalitis, Arbovirus, Swine Infection, HI Antibody Positive Rate

キーワード : 日本脳炎、アルボウイルス、豚感染、HI抗体陽性率

はじめに

日本脳炎ウイルス (以下、JEV) は、Flavivirus 属に属し、コガタアカイエカが媒介するアルボウイルスである。その生態環は、蚊→豚 (時にトリ) →蚊の感染サイクルを形成しており、ヒトは JEV 感染の終末宿主である。従って、ウイルス増殖動物としての豚の感染状況が、ヒトへの感染を大きく左右するものと考えられる。

現在、日本脳炎の流行地は、東アジア、東南アジア、南アジアからオーストラリアにまで拡大し、年間数百万人の日本脳炎患者が発生している。発症すると定型的な脳炎を呈し、1~2 日で 40℃ 以上の高熱となる。頭痛、嘔吐、頸部硬直などの髄膜刺激症状が現れ、次いで意識障害、筋硬直、けいれん等の脳炎症状が出現する。

近年、本邦での日本脳炎確認患者は、1965 年以前と比べ激減しているが、その患者発生の強力な抑制因子としては、ヒトに対するワクチン接種による免疫賦与、コガタアカイエカの減少、豚飼育環境の変化の 3 点がその大きな役割を担っていると考えられる。¹⁾

本県では、厚生労働省の定めた感染症流行予測調査実施要領に基づいて、豚の感染源調査を毎年実施するとともに、昨年に引き続き、豚の血清から JEV 分離を実施したので、本年度の概要について報告する。

また、2010 年に続き、県内での患者発生報告があり、当センターにおいて確認検査を行ったので、併せて報告する。

調査方法

1. 感染源調査

①調査時期および回数

7 月初旬~9 月中旬の各旬 1 回、計 8 回実施した

②調査客体および検体

調査客体は、諫早市内で飼育された生後約 6 ヶ月の肥育豚から佐世保市と畜場において放血液を採取した 80 頭とし、検体は調査客体の血清とした。

③調査事項

感染症流行予測調査事業検査術式に従い、JEV 赤血球凝集抑制 (HI) 抗体の測定および 2-ME (2-Mercaptoethanol) 感受性抗体の測定を行った。

2. JEV 遺伝子検索

採血後の豚血清より QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA 抽出し、E 領域 (JEV-JaGAr 01 ; 978~2,477) に設定したプライマーセットおよび SuperScript III One Step RT-PCR システム (Invitrogen) を用いて 1 次増幅反応を行った後、その産物の一部を用いて 2 次増幅反応を行った。遺伝子増幅反応 (PCR) 条件およびプライマーを図 1 に示す。増幅産物は、アガロースゲル電気泳動を行って確認し、1 次増幅産物は 381 bp (JEV-JaGAr 01 ; 2,097~2,477)、2 次増幅産物は 326 bp (JEV-JaGAr 01 ; 2,124~2,449) の位置にバンドが確認されたものを陽性とした。

3. JEV の分離

ウイルス遺伝子の存在が確認された血清について、Vero 9013 細胞に接種して JEV の分離を行った。すなわち、24 ウェルマルチプレートに単層を形成させた Vero 9013 細胞を滅菌リン酸緩衝食塩水 (PBS) で 2 回洗浄した後、各ウェルに維持培養液 (2% 非働化牛胎児血清加 Eagle MEM) 900 μ l を加え、被検血清 100 μ l ずつ 2 ウェルにそれぞれ接種してウイルス分離を行った。炭酸ガス培養機 (37°C、5% CO₂、95% Air) 内で 7 日間培養して細胞変性効果 (CPE) の有無を判定し、明瞭な CPE が観察されなかった場合は、感染細胞の遠心上清を再度 Vero 9013 細胞に接種して盲継代を 1~2 回行った。

4. JEV の確認

明瞭な CPE が観察された場合は、感染細胞の培養上清から抽出した RNA を鋳型にして NS3 領域に設定されたプライマーセット²⁾を用いた PCR により JEV 遺伝子を確認した。PCR 反応条件を図 2 に示す。増幅産物は、アガロースゲル電気泳動を行って確認し、162 bp (JEV-JaGAr 01 ; 5,739~5,900) の位置にバンドが確認されたものを陽性とした。

5. 日本脳炎患者確認試験

①患者情報

患者 1 : 諫早市在住 64 歳男性、ワクチン接種・既往歴は不明。2011 年 8 月 24 日に発症し、

① 1 次増幅反応 (One step RT-PCR)

< primer set > JE8K-S : 5' -ATGGAACCCCTTC -3' (JEV-JaGAr 01 ; 2,097-2,111)
JEER : 5' -AGCAGGCACATTGGTCGCTA -3' (JEV-JaGAr 01 ; 2,458-2,477)

< 組成 >

	volume	final conc.
2× Reaction Mix	12.5 μ l	
primer (JE8K-S: 25 μ M)	0.2 μ l	0.2 μ M
primer (JEER: 25 μ M)	0.2 μ l	0.2 μ M
SSIII/Platinum Taq Mix	0.5 μ l	
DW (DNase/RNase free)	10.1 μ l	
extract RNA	1.5 μ l	
total	25 μ l	

< 反応条件 >

temp.	time	cycles
53°C	15 min.	1
94°C	2 min.	1
94°C	15 sec.	40
53°C	30 sec.	
68°C	1 min.	
68°C	5 min.	1
4°C	∞	1

② 2 次増幅反応 (2nd PCR)

< primer set > JE8K inner-S : 5' -ATCGTGGTTGGGAGGGGAGA-3' (JEV-JaGAr 01 ; 2,124-2,143)
JEER inner-C: 5' -AGCACACCTCCTGTGGCTAA-3' (JEV-JaGAr 01 ; 2,430-2,449)

< 組成 >

	volume	final conc.
10× EX Taq Buffer	2.5 μ l	
dNTP mixture (25 mM each)	2.0 μ l	0.2 mM each
primer (JE8K inner-S: 25 μ M)	0.2 μ l	0.2 μ M
primer (JEER inner-C: 25 μ M)	0.2 μ l	0.2 μ M
TaKaRa EX Taq HS	0.125 μ l	0.025 U/ μ l
DW (DNase/RNase free)	18.475 μ l	
1 st PCR products	1.5 μ l	
total	25 μ l	

< 反応条件 >

temp.	time	cycles
94°C	5 min.	1
94°C	15 sec.	25
53°C	30 sec.	
72°C	1 min.	
72°C	5 min.	1
4°C	∞	1

図 1 JEV 遺伝子の検索

< primer set > JE-NS3-1S: 5'-AGAGCGGGGAAAAAGGTCAT-3' (JEV-JaGAr 01 ; 5,739-5,758)
 JE-NS3-4R: 5'-TTTCACGCTCTTTCTACAGT-3' (JEV-JaGAr 01 ; 5,891-5,900)

< 組成 >

	volume	final conc.
2× Reaction Mix	12.5 µl	
primer (NS3-1S: 25 µM)	0.2 µl	0.2 µM
primer (NS3-4R: 25 µM)	0.2 µl	0.2 µM
SSIII/Platinum Taq Mix	0.5 µl	
DW (DNase/RNase free)	10.1 µl	
extract RNA	1.5 µl	
total	25 µl	

< 反応条件 >

temp.	time	cycles
50°C	30 min.	1
94°C	2 min.	1
94°C	15 sec.	
53°C	30 sec.	40
68°C	1 min.	
68°C	5 min.	1
4°C	∞	1

図2 JEV の PCR による確認

頭痛、発熱、嘔吐、意識障害、呼吸停止、四肢の弛緩性麻痺を認めた。その後意識は改善したものとのコミュニケーションは困難で人工呼吸器を離脱できず四肢麻痺も残存した。血清中のJEVに対するHI抗体価（急性期10倍未満、回復期160倍）の陽転を認め、JEV感染を確定した。

患者2：五島市在住39歳男性、ワクチン接種歴は不明。胆嚢摘出術と左下肢骨折手術の手術歴あり。2011年11月18日に発症し、発熱、頭痛、意識障害、異常行動などを呈し、当初、五島中央病院より急性脳炎として2011年11月24日に届出。その後、国立長崎医療センターに緊急搬送、呼吸停止・四肢麻痺・意識障害が強く、長期間人工呼吸器が必要だったが、その後自発呼吸が出現し、意識レベルも改善した。四肢麻痺は、継続しているため気管切開して加療中である。

②検体

患者1：2011年8月24日および25日に採取された髄液および、8月26日、9月7日および9月20日に採取された血清を使用した。

患者2：2011年11月24日および11月29日に採取された髄液および、11月24日、11月29日および12月13日に採取された血清を使用した。

③検査項目

抗JEV-IgM抗体およびJEV遺伝子検査
 抗JEV-IgM抗体は、昨年同様に国立感染症研

究所ウイルス第一部第二室高崎智彦博士より供与されたIgM capture ELISA for JE (Focus 変法NIID)を用いて測定し、抗JEV-IgM抗体陽性は、 $P/N \text{ ratio} \geq 2.00$ （陰性対照血清の吸光度測定値に対して患者血清の吸光度測定値が2倍以上）とした。また、JEV遺伝子検査はブタのJEV遺伝子検索と同様の方法および図3で示した方法³⁾で併せて行った。図3で示した方法の増幅産物は、アガロースゲル電気泳動を行って確認し、1次増幅産物は292 bp (JEV-JaGAr 01 ; 1,015~1,306)、2次増幅産物は194 bp (JEV-JaGAr 01 ; 1,076~1,269)の位置にバンドが確認されたものを陽性とした。

④患者2の追加検査

患者2については、抗JEV-IgM抗体の上昇が確認されなかったことから抗JEV-IgG抗体検査を行い、併せてJEV遺伝子が確認されたことからウイルス分離を追加検査として行った。検体は前述の検体に加え、2012年1月6日、2月2日、3月7日および4月3日に採取された血清を用いた。抗JEV-IgG抗体検査は、図4で示したanti-JEV IgG indirect ELISAで行い、IgG抗体の経時的推移を測定した。ウイルス分離はブタ血清からのウイルス分離と同様の方法で行った。

調 査 結 果 及 び 考 察

1. 感染源調査結果

豚HI抗体検査結果を表1に、HI抗体陽性率および2-ME感受性抗体陽性率の推移を図5に示

① 1次増幅反応 (One step RT-PCR)

< primer set > JEen37s-first: 5' -AAGGAGCCAGTGGAGCCACTT -3' (JEV-JaGAr 01 ; 1,015-1,035)
 JEen329c-first: 5' -TTCCCGAAAAGTCCACATCC -3' (JEV-JaGAr 01 ; 1,287-1,306)

< 組成 >

	volume	final conc.
2× Reaction Mix	12.5 µl	
primer (JEen37s-1st: 25 µM)	0.2 µl	0.2 µM
primer (JEen329c-1st: 25 µM)	0.2 µl	0.2 µM
SSIII/Platinum Taq Mix	0.5 µl	
DW (DNase/RNase free)	10.1 µl	
extract RNA	1.5 µl	
total	25 µl	

< 反応条件 >

temp.	time	cycles
53°C	15 min.	1
94°C	2 min.	1
94°C	15 sec.	
53°C	30 sec.	40
68°C	1 min.	
68°C	5 min.	1
4°C	∞	1

② 2次増幅反応 (2nd PCR)

< primer set > JEen98s-second: 5' -CATGGCAAACGACAAACCAAC -3' (JEV-JaGAr 01 ; 1,076-1,096)
 JEen301c-second: : 5' -CAGTRAAGCCTTGTTCACAC -3' (JEV-JaGAr 01 ; 1,248-1,269)

< 組成 >

	volume	final conc.
10× EX Taq Buffer	2.5 µl	
dNTP mixture (25 mM each)	2.0 µl	0.2 mM each
primer (JEen98s-2nd: 25 µM)	0.2 µl	0.2 µM
primer (JEen301c-2nd: 25 µM)	0.2 µl	0.2 µM
TaKaRa EX Taq HS	0.125 µl	0.025 U/µl
DW (DNase/RNase free)	18.475 µl	
1 st PCR products	1.5 µl	
total	25 µl	

< 反応条件 >

temp.	time	cycles
94°C	5 min.	1
94°C	15 sec.	
53°C	30 sec.	25
72°C	1 min.	
72°C	5 min.	1
4°C	∞	1

図3 患者材料からの JEV 遺伝子の検出

Steps	Reagents	Concentration	Volume	Condition
Antigen Coating	JEV-Beijing strain (NIID)	x10	100 µl	4°C, overnight
Blocking	Block Ace (Meiji)	Original Conc.	100 µl	37°C, 1hr.
Samples /Positive Control	Sera	x40	100 µl	37°C, 1hr.
Secondary antibody	HRPO conjugated anti Human IgG (BETYL)	x10,000	100 µl	37°C, 1hr.
Substrate	OPD (Sigma)	Original Conc.	100 µl	RT, 20min.
Stop	1N H ₂ SO ₄ (Nacalai Tesque)	Original Conc.	100 µl	
Read				492 nm

図4 患者血清の抗 JEV-IgG 抗体の測定 (anti-JEV IgG indirect ELISA)

表 1 2011 年度豚 HI 抗体陽性率調査結果

採血 月日	採血 頭数	<10	10	20	HI 抗体価 (倍)					HI 抗体 陽性率 (%)	2-ME 抗体 陽性率 (%)
7/5	10		4	6						100	-
7/12	10		3	6	1					100	0
7/26	10				2	4	1		3	100	30
8/5	10			1	8				1	100	11
8/9	10			2		1			7	100	75
8/23	10								10	100	30
9/6	10								10	100	10
9/13	10								10	100	0

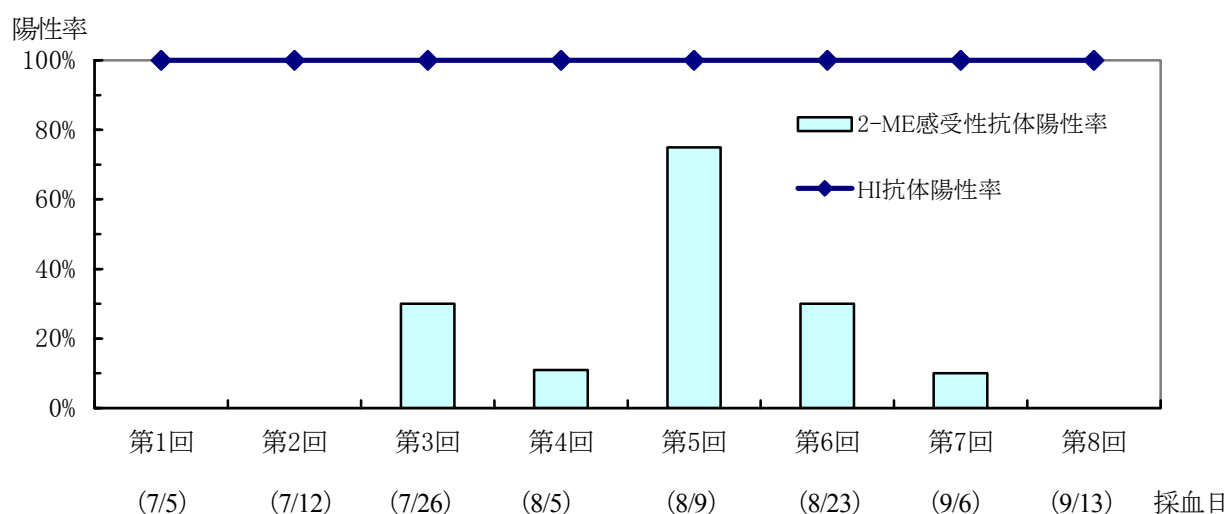


図 5 HI 抗体価陽性率および 2-ME 感受性抗体陽性率の推移

す。2011 年度は 7 月 5 日に採血した豚 10 頭すべて（陽性率 100%）が HI 抗体陽性となった。7 月 26 日に採血した豚 10 頭において、HI 抗体価 40 倍以上となった 10 頭のうち 3 頭（陽性率 30%）から初感染の指標となる 2-ME 感受性抗体が検出された以後もすべての個体において JEV の感染が確認された。

2. JEV 遺伝子検索および分離結果

豚血清中の JEV 遺伝子検索を行ったところ、2011 年 7 月 12 日に採血した 2 頭、7 月 26 日に採血した 1 頭および 8 月 5 日に採血した 2 頭の血清から JEV 遺伝子が確認された。さらに、これら 5 頭の血清からウイルス分離を実施したところ、8

月 5 日に採血した 2 頭の血清を接種した Vero9013 細胞から CPE が観察され、PCR でも JEV の標準株 JaGAr 01 株と同様に NS3 領域 162 bp の産物が増幅されたことから、JEV の分離が確認された。

保毒蚊が生後 4～6 ヶ月の免疫のない豚を吸血することで豚は JEV に感染し、2～3 日の潜伏期を経て約 3 日間持続するウイルス血症を起こす。このウイルス血症時に吸血した新たな蚊がウイルスに感染し、10～13 日の潜伏期を経てウイルスを媒介するようになる⁴⁾ことから、2011 年度の本県では JEV を保有した蚊が 6 月には活動を既に開始し、9 月以降も豚を吸血してウイルスを媒介しながらブタへの感染を拡大していたものと思われる。

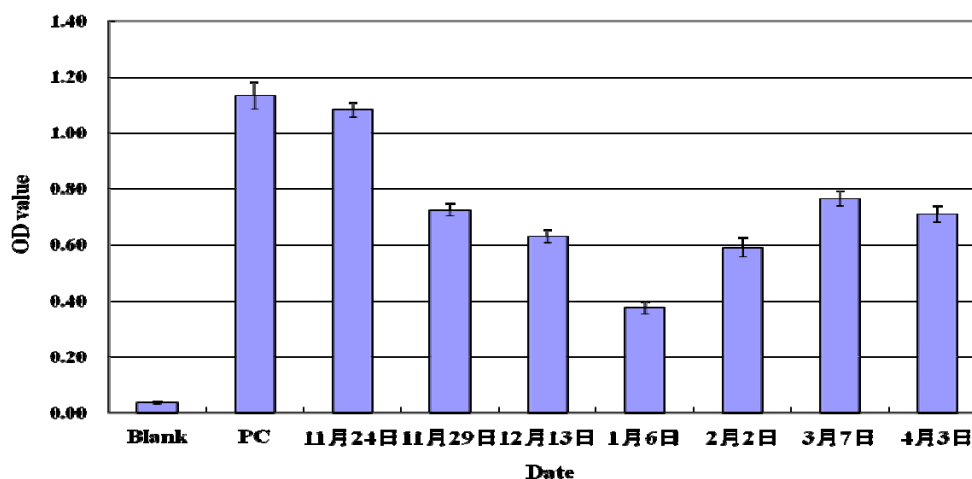


図6 患者2の抗JEV-IgG抗体の推移

3. 日本脳炎患者確認試験結果

確認検査を昨年と同様に IgM capture ELISA for JE (Focus 変法 NIID) による抗 JEV-IgM 抗体測定を行うとともに遺伝子検査も併せて実施した。

患者1は、血清(急性期、回復期)から抗 JEV-IgM 抗体が、髄液中より JEV 遺伝子が各々検出され、被験患者は報告どおり JEV への感染が確認された。

患者2では、血清(急性期、回復期、発症約1ヶ月後)から抗 JEV IgM 抗体は検出されなかったが、髄液および血清中から JEV 遺伝子が検出され、被験患者は JEV 感染が確認された。

患者2の抗 JEV-IgG 抗体の追加検査の結果を図6に示す。患者2は発症後6日で高い IgG 抗体を保有していたことから、過去にワクチン接種もしくは自然感染歴があったものと推測された。また、11月24日の髄液、11月29日の髄液および血清、12月13日の血清から JEV が分離された。

今回、患者1が2010年に報告された患者と同時期・同地区で発生したことが確認された。また、患者2が他の地域では日本脳炎の非流行期といえる11月に発生したことから、本県では、温暖な日が続くようであれば、晩秋から初冬にかけてでも JEV 感染の危険性は十分にあることが確認された。

ま と め

1. 2011年度は7月5日に採血した10頭から HI 抗体が、7月26日に採血した3頭から初感染の指標となる 2-ME 感受性抗体が最初に確認された。

2. 2011年8月5日に採血した2頭の血清から JEV が分離された。

3. 昨年2001年以来9年ぶりに県内での患者発生報告があった諫早市で同地域、同時期に2年連続して患者発生報告があった。さらに11月には1989年以来22年ぶりに五島市で患者報告があった。

4. 確認試験を IgM capture ELISA for JE (Focus 変法 NIID) および RT-PCR により行い、患者1(諫早市)では急性期および回復期血清から抗 JEV-IgM 抗体、髄液から JEV 遺伝子を検出した。患者2(五島市)では抗 JEV-IgM 抗体は確認できなかったが、血清および髄液から JEV 遺伝子が検出された。

5. 患者2の追加検査結果から、ワクチン接種もしくは自然感染歴があったと推測された。さらに髄液および血清から JEV が分離された。

6. 日本脳炎確認患者は、1965年以前と比べ激減しているものの、昨年度に続き、本年度は2名の患者発生が確認された。さらに豚では依然 JEV に対する抗体保有が確認されたことから、現在も生活環境中に JEV は確実に維持されており、新たな患者発生を防止するためにも県民に対する日本脳炎の注意喚起は今後も必要である。

謝 辞

感染症(日本脳炎)流行予測調査事業にご協力いただいた長崎県中央農業協同組合、佐世保食肉センター株式会社および佐世保市食肉衛生検査所の関係各位、並びに IgM capture ELISA for JE を提供していた

だいた国立感染症研究所高崎智彦博士に感謝します。

参 考 文 献

- 1) 厚生労働省健康局結核感染症課,感染症流行予測調査事業検査術式,2004
- 2) Tanaka M: Rapid identification of flavivirus using the polymerase chain reaction. J Virol Methods, 41(3),

長崎県環境保健研究センター所報 57, (2011) 資料

311-322 (1993)

- 3) Kuwayama M, et al: Japanese Encephalitis Virus in Meningitis Patients, Japan. Emerging Infectious Disease, 11(3), 471-473 (2005)
- 4) 厚生省保健医療局結核感染症課,改定・感染症マニユアル,1999.