

長崎県における日本脳炎の疫学調査(2010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 2010

— 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、ウイルス増副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。発症すると典型的な脳炎を呈し、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、2001年以来9年ぶりに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

調査時期および回数

7月初旬~9月中旬の各旬1回ずつ計8回実施した調査客体および検体

調査客体は、諫早市内で飼育、出荷された生後約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。

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 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381bp(JEV-JaGAr 01;2,097~2,477)、2次増幅産物は326bp(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%非動

化牛胎児血清加 Eagle MEM) 900 µl を加え、被検血清 100 µl 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。

1 次増幅反応 (One step RT-PCR)

<プライマーセット> 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 >

	用量	最終濃度
2× Reaction Mix	12.5 µl	
primer (JE8K-S: 25 µM)	0.2 µl	0.2 µM
primer (JEER: 25 µM)	0.2 µl	0.2 µM
SS /Platinum Taq Mix	0.5 µl	
DW (DNase/RNase free)	10.1 µl	
抽出 RNA	1.5 µl	
total	25 µl	

< 反応条件 >

温度	時間	サイクル数
53	15 分 (RT)	1
94	2 分	1
94	15 秒	40
53	30 秒	
68	1 分	
68	5 分	1
4	∞ (保存)	1

2 次増幅反応 (2nd PCR)

<プライマーセット> 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 >

	用量	最終濃度
10× EX Taq Buffer	2.5 µl	
dNTP mixture (2.5 mM each)	2.0 µl	0.2 mM each
primer (JE8K inner-S: 25µM)	0.2 µl	0.2 µM
primer (JEER inner-C: 25µM)	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 次増幅産物	1.5 µl	
total	25 µl	

< 反応条件 >

温度	時間	サイクル数
94	5 分	1
94	15 秒	25
53	30 秒	
72	1 分	
72	5 分	1
4	∞ (保存)	1

図 1 JEV 遺伝子の検索

<プライマーセット> 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 >

	用量	最終濃度
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
SS /Platinum Taq Mix	0.5 µl	
DW (DNase/RNase free)	10.1 µl	
抽出 RNA	1.5 µl	
total	25 µl	

< 反応条件 >

温度	時間	サイクル数
50	30 分 (RT)	1
94	2 分	1
94	15 秒	40
53	30 秒	
68	1 分	
68	5 分	1
4	∞ (保存)	1

図2 JEV の PCR による確認

表1 2010年度豚 HI 抗体陽性率調査結果

採血 月日	採血 頭数	HI 抗体価 (倍)								HI抗体陽 性率(%)	2-ME 抗体 陽性率(%)
		< 10	10	20	40	80	160	320	640		
7/2	10			8	2					100	0
7/13	10		1	9						100	-
7/27	10			2	7		1			100	13
8/3	10		1	3	2		1	1	2	100	67
8/11	10			1					9	100	78
8/25	10						1	6	3	100	0
9/7	10						1	3	6	100	0
9/14	10								10	100	0

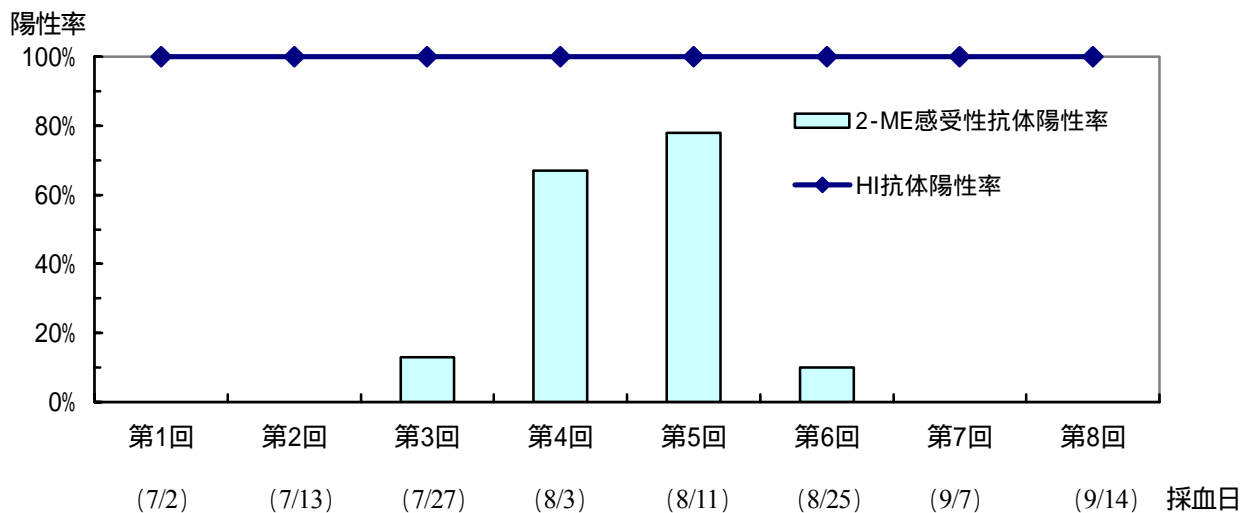


図3 HI 抗体価陽性率および 2-ME 感受性抗体陽性率の推移

5. 日本脳炎患者確認試験

患者情報

諫早市在住 86 歳男性、平成 22 年 8 月 28 日に発症、9 月 1 日に脳炎疑い(症状:発熱、項部硬直、意識障害)で市内病院に転院、9 月 10 日に検査結果(日本脳炎 HI 抗体価 80 倍、2-ME 処理 40 倍で日本脳炎 IgM 抗体陽性と判断)をもって日本脳炎と診断された。

検体

平成 22 年 9 月 1 日(急性期)および 17 日(回復期)に採取された患者血清

検査項目

抗 JEV-IgM 抗体および JEV 遺伝子検査
 抗 JEV-IgM 抗体は、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 ratio 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で行った。

調査結果および考察

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1に示す。

2010 年度は 7 月 2 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 27 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 8 頭のうち 1 頭(陽性率 13%)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

2008 年度、2009 年度同様に 2010 年度も第 1 回調査(7 月 2 日)より既に HI 抗体価の上昇が 100%となったことから、豚血清中の JEV 遺伝子検索を行ったところ、2010 年 8 月 3 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、この 2 頭の血清からウイルス分離を実施したところ、ともに 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³⁾ことから、2010 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感染を拡大していた可能性が推察される。

2010 年 8 月下旬、9 年ぶりに県内での患者発生報告があり、確認検査を従来の抗 JEV-HI 抗体測定から IgM capture ELISA for JE (Focus 変法 NIID) による抗 JEV-IgM 抗体測定に変更して行うとともに遺伝子検査も併せて実施した。JEV 遺伝子は検出されなかったが、抗 JEV-IgM 抗体が急性期および回復期血清から検出され、被験患者は報告どおり JEV に感染していることが確認された。

今回、IgM capture ELISA が HI 抗体測定に比較して、迅速、簡便、高感度かつ高精度の検査系であることが確認できたことから、今後は、IgM capture ELISA に切り替えて確認検査を実施す

る予定である。

ま と め

1. 2010 年度は 7 月 2 日に採血した 10 頭から HI 抗体が、7 月 27 日に採血した 1 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. 2010 年 8 月 3 日に採血した 2 頭の血清から JEV が分離された。
3. 2001 年以来 9 年ぶりに県内での患者発生報告があった。確認試験を IgM capture ELISA for JE (Focus 変法 NIID) により行い、急性期および回復期血清から抗 JEV-IgM 抗体を検出した。
4. 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、本年度、9 年ぶりに 1 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), 311-322 (1993)
- 3) 厚生省保健医療局結核感染症課, 改定・感染症マニュアル, 1999