

# 長崎県における日本脳炎の疫学調査(2006-2007 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、平野 学、山口 顕徳、中村 まき子、吾郷 昌信、原 健志

### Epidemic Study of Japanese Encephalitis in Nagasaki Prefecture (2006-2007)

#### — Surveillance of swine infected by Japanese Encephalitis Virus —

Akira YOSHIKAWA, Manabu HIRANO, Akinori YAMAGUCHI, Makiko NAKAMURA,  
Masanobu AGOH and Kenshi HARA

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、ヒトの感染状況に関与していると考えられる。

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。症状は、定型的な脳炎で、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、筋強剛、けいれん等の脳症状が現れる。

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点はその大きな役割を担っていると考えられる。<sup>1)</sup>

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、毎年、豚の感染源調査を実施している。また、本年も昨年同様、豚の血清から JEV 分離を併行して実施したので、その概要について報告する。

#### 調査方法

##### 1. 感染源調査

###### ①調査時期及び回数

7 月初旬~9 月中旬の各旬1回ずつ計 8 回

##### ②調査客体及び検体

調査客体は、県央地区の生後約 6 ヶ月の肥育豚 232 頭(内訳;2006 年度 152 頭、2007 年度 80 頭)、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よる

- ・日本脳炎赤血球凝集抑制(HI)抗体の測定
- ・2-ME (2-Mercaptoethanol) 感受性抗体の測定

##### ④採血場所

佐世保市と畜場

#### 2. JEV の分離

##### ①検査材料

HI 抗体価の上昇がみられなかった豚血清 90 頭分(内訳;2006 年度 67 頭、2007 年度 23 頭)

##### ②検査手順

豚血液を 3,000 rpm, 20 分間遠心、上清を採取

↓

24 穴プレートに培養した Vero (9013) 細胞を滅菌 PBS(-)で 2 回洗浄後、細胞培養液(2%非動化 FBS 加 Eagle's MEM)を各穴に 900 μl ずつ分注

↓

被検血清 100 μl をそれぞれプレート 2 穴ずつ接種し、36 °C, 7 日間 CO<sub>2</sub> 培養器で培養(1日目)

↓

細胞変性効果(CPE)を7日間観察

↓

7 日間観察して明瞭な CPE が観察されない場合、細胞・培養液を回収して、3,000 rpm, 20 分間遠心

した上清を同様の操作で Vero (9013) 細胞に接種した (2 代目)。CPE が観察された場合は、RT-PCR により JEV の NS3 遺伝子領域を増幅 (142 bp) してウイルスの存在を確認

AGAGCGGGGAAAAAGGTCAT  
JE-NS3-4R:  
TTTCACGCTCTTTCTACAGT

3. JEV 遺伝子検索 (RT-PCR 法)

① RNA の抽出

RNA 抽出キット (QIAamp Viral RNA Mini Kit : QIAGEN) を用いてウイルス RNA 抽出を実施

② DNase 処理

DNase I (Invitrogen) のプロトコルに準じた

|      |                     |       |
|------|---------------------|-------|
| 〈組成〉 | 10× Reaction Buffer | 1 μl  |
|      | DNase I             | 1 μl  |
|      | DW                  | 3 μl  |
|      | Extract RNA         | 5 μl  |
|      | Total               | 10 μl |

|        |                     |
|--------|---------------------|
| 〈反応条件〉 | 室温 15min            |
|        | ↓ ←25mM EDTA 1 μ 添加 |
|        | 65°C 10min          |
|        | ↓                   |
|        | 4°C ∞ (保存)          |

③ 使用 Primer (5' to 3') Product : 142 bp

JE-NS3-1S:

表 1 2006 年度豚 HI 抗体陽性率調査結果

| 採血<br>月日 | 採血<br>頭数 | HI 抗体価 (倍) |    |    |    |    |     |     |      | HI 抗体陽<br>性率 (%) | 2-ME 抗体<br>陽性率 (%) |
|----------|----------|------------|----|----|----|----|-----|-----|------|------------------|--------------------|
|          |          | <10        | 10 | 20 | 40 | 80 | 160 | 320 | ≥640 |                  |                    |
| 7/11     | 20       | 20         |    |    |    |    |     |     |      | 0                | -                  |
| 7/18     | 20       | 20         |    |    |    |    |     |     |      | 0                | -                  |
| 7/25     | 20       | 20         |    |    |    |    |     |     |      | 0                | -                  |
| 8/8      | 20       | 7          | 4  |    | 1  |    | 1   |     | 7    | 65               | 89                 |
| 8/22     | 12       |            |    |    |    |    |     |     | 12   | 100              | 8                  |
| 8/28     | 20       |            |    |    |    |    |     |     | 20   | 100              | 0                  |
| 9/4      | 20       |            |    |    |    |    |     |     | 20   | 100              | 0                  |
| 9/19     | 20       |            |    |    |    |    |     | 2   | 18   | 100              | 0                  |

表 2 2007 年度豚 HI 抗体陽性率調査結果

| 採血<br>月日 | 採血<br>頭数 | HI 抗体価 (倍) |    |    |    |    |     |     |      | HI 抗体陽<br>性率 (%) | 2-ME 抗体<br>陽性率 (%) |
|----------|----------|------------|----|----|----|----|-----|-----|------|------------------|--------------------|
|          |          | <10        | 10 | 20 | 40 | 80 | 160 | 320 | ≥640 |                  |                    |
| 7/10     | 10       | 10         |    |    |    |    |     |     |      | 0                | -                  |
| 7/17     | 10       | 10         |    |    |    |    |     |     |      | 0                | -                  |
| 7/24     | 10       | 3          |    |    | 1  |    |     |     | 6    | 70               | 71                 |
| 8/7      | 10       |            |    |    |    |    |     |     | 10   | 100              | 30                 |
| 8/28     | 10       |            |    |    |    |    |     |     | 10   | 100              | 10                 |
| 9/4      | 10       |            |    |    |    |    | 1   | 7   | 2    | 100              | 0                  |
| 9/11     | 10       |            |    |    |    |    |     |     | 10   | 100              | 0                  |
| 9/18     | 10       |            |    |    |    |    |     |     | 10   | 100              | 0                  |

④ One step RT-PCR

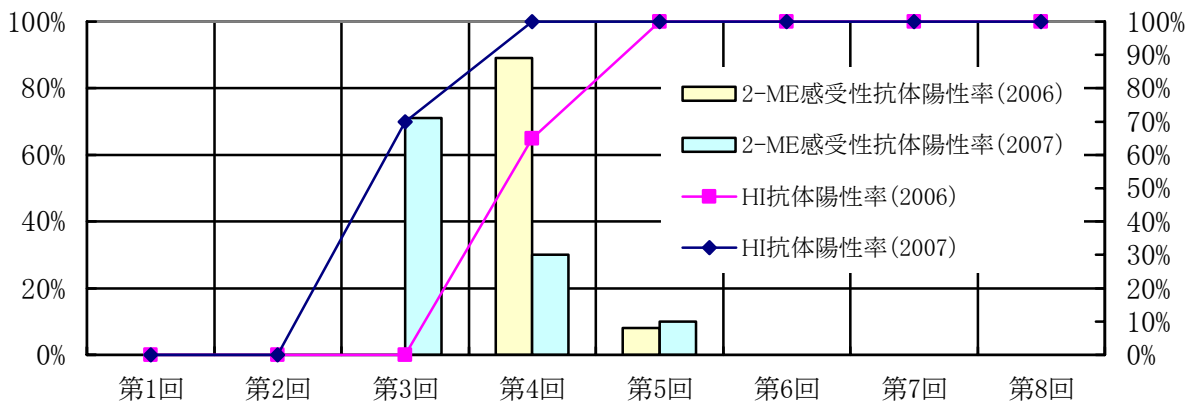
|      |                         |         |
|------|-------------------------|---------|
| 〈組成〉 | 2× Reaction Mix         | 12.5 μl |
|      | primer (NS3-1S: 25 μ M) | 0.2 μl  |
|      | primer (NS3-4R: 25 μ M) | 0.2 μl  |
|      | SSIII/Platinum Taq Mix  | 0.5 μl  |
|      | DW                      | 9.7 μl  |
|      | Template RNA            | 1.5 μl  |
|      | Total                   | 25 μl   |

|        |                |           |
|--------|----------------|-----------|
| 〈反応条件〉 | 53°C 15 分 (RT) | } 35 サイクル |
|        | 92°C 2 分       |           |
|        | 92°C 1 分       |           |
|        | 53°C 1 分       |           |
|        | 72°C 1 分       |           |
|        | 72°C 5 分       |           |
|        | 4°C ∞ (保存)     |           |

⑤ 電気泳動

PCR products は、2% アガロースゲルで 30 分電気泳動後、142 bp の位置にバンドが確認されたものを陽性とした。

図1 HI抗体価陽性率及び2-ME感受性抗体陽性率の推移



### 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(2006 年度)及び表 2(2007 年度)に、HI 抗体陽性率及び 2-ME 感受性抗体陽性率の推移を図1に示す。

2006 年度は 8 月 8 日に採血した豚 20 頭のうち 13 頭(陽性率 65%)、2007 年度は 7 月 24 日に採血した豚10頭のうち7頭(陽性率70%)が HI 抗体陽性となった。そのうち、HI 抗体価 40 倍以上となった 2006 年度 9 頭のうち 8 頭(陽性率 89%)、2007 年度 7 頭のうち 5 頭(陽性率 71%)から初感染の指標となる 2-ME 感受性抗体が検出された。

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<sup>2)</sup>。このことから今回の調査結果より長崎県では JEV を保有した蚊が 2006 年度には 7 月中旬頃、2007 年度には 7 月初旬頃には活動を既に開始しており、9 月初旬頃まで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ものと推察される。

#### 2. JEV 分離及び遺伝子検索結果

HI 抗体価の上昇がみられなかった 2006 年度 67 頭、2007 年度 23 頭の血清について JEV の分離を行ったところ、2006 年 8 月 8 日に採血した 2 頭、2007 年 7 月 17 日に採血した1頭の血清からウイルスが分離された。

CPE が観察された感染細胞の遠心上清について RT-PCR による JEV 遺伝子検索を行ったところ、JEV の標準株である JaGAr #01 株の NS3 遺伝子領域と

同じ 142 bpの目的とする位置にバンドが認められた。

#### まとめ

- 2006 年度は 8 月 8 日に採血した 13 頭、2007 年度は 7 月 24 日に採血した豚 7 頭から HI 抗体が、そのうち 2006 年度は 8 頭、2007 年度は 5 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。
- HI 抗体価の上昇がみられなかった豚血清(2006 年度 67 頭、2007 年度 23 頭)からウイルス分離を行ったところ、2006 年 8 月 8 日に採血した 2 頭、2007 年 7 月 17 日に採血した1頭から JEV が分離された。
- 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、豚では依然日本脳炎ウイルスに対する抗体保有及びウイルスが分離されたことから、現在も生活環境中に日本脳炎ウイルスは確実に維持されており、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及び佐世保市食肉衛生検査所長他職員一各位に深謝します。

#### 参考文献

- 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
- 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