

## 長崎県における日本脳炎の疫学調査(2005年度)

吉川 亮・中村 まき子・平野 学・原 健志

## Epidemic of Japanese Encephalitis in Nagasaki Prefecture (2005)

Akira YOSHIKAWA, Makiko NAKAMURA, Manabu HIRANO 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(時にトリ)蚊のサイクルを形成しており、ヒトは日本脳炎ウイルス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、ヒトの感染状況に關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。<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、豚の血清から日本脳炎ウイルス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

## 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

## 調査客体及び検体

調査客体は、県央地区の生後5~6ヶ月の肥育豚160頭、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より

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

採血場所

佐世保市と畜場

## 2. 日本脳炎ウイルスの分離

検査材料

HI抗体測定に用いた豚血清160頭分

検査手順

## 豚血清

3,000r.p.mで20分間遠心、上清を採取

24穴プレートに培養したVero(9013株)細胞を滅菌PBS(-)で2回洗浄後、細胞培養液(2%FBS加Eagle's MEM)を1穴に900μlずつ分注。

豚血清の上清100μlをプレート2穴に接種、36、7日間炭酸ガス培養器で培養。(1代目)

細胞変性効果(CPE)を7日間観察。

7日間観察して明らかなCPEが確認されない場合、細胞・細胞培養液を回収(ハーベスト)して、3,000r.p.mで20分間遠心後、上清を採取して、1代目と同じ操作を行う。(2代目へ)

なお、CPEが確認された場合、赤血球凝集(HA)試験及びRT-PCRによる確認を行った。

表1 平成17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		
7/12	20	18	1		1					10	100
7/19	20	12	2	5	1					40	100
7/26	20	15		3	2					25	100
8/9	20	5	1	2			1		11	75	83
8/17	20	1	1				1		17	95	67
8/23	20						1	4	15	100	100
9/7	20						3	9	8	100	25
9/13	20	6			2	1	2	4	5	70	7

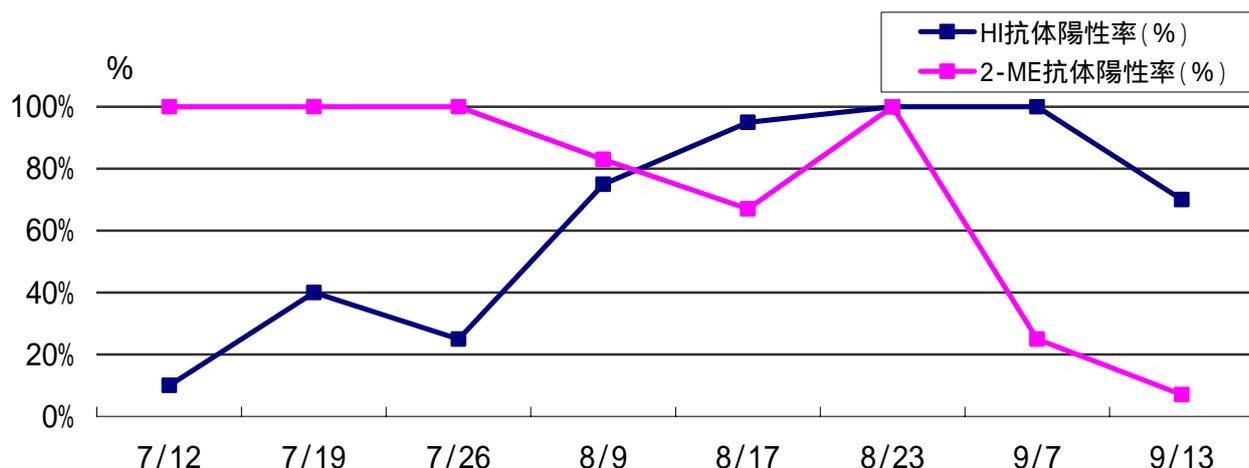


図1 HI抗体価陽性率及び2-ME感受性抗体陽性率の推移

採血月日

3. 日本脳炎ウイルス遺伝子検査(RT-PCR法)

RNAの抽出

RNA抽出キット(QIAamp Viral RNA Mini Kit :QIAGEN)でRNA抽出後、DNase処理及びcDNA作製は、ノロウイルスの検査法に準じた。

使用Primer(5 to3) Product:142bp

JE - NS3 - 1S:

AGAGCGGGGAAAAAGGTCAT

JE - NS3 - 4R:

TTTCACGCTCTTTCTACAGT

反応条件

92	2分	} 35サイクル
92	1分	
53	1分	
72	1分	
72	5分	
4	(保存)	

電気泳動

PCR product は、3%アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイド染色を行い、142bpの位置にバンドが確認されたものを陽性とした。

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抗体陽性率及び2-ME感受性抗体陽性率の推移を図1に示した。

7月12日に採血した豚20のうち2頭がHI抗体陽性(陽性率10%)、そのうちHI抗体価40倍以上1頭のうち1頭から豚感染開始の指標となる2-ME感受性抗体陽性(陽性率100%)が確認された。

ウイルス保有蚊が生後4~6ヶ月の免疫のない豚を吸血すると豚は感染し、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では、日本脳炎ウイルスを保有した蚊が7月初旬頃には活動を既に開始しており、9月中旬頃まで豚を吸血しながらウイルスを媒介し感染を広めたことが推察される。

また、ウイルス保有蚊の活動開始時期は例年どおり<sup>3)</sup>であったと推察される。

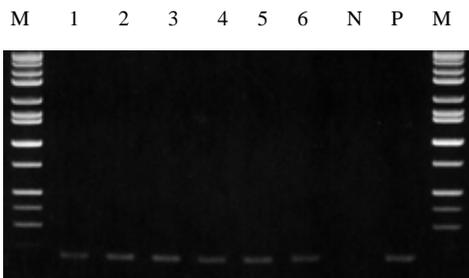


図2 (DNA fragments by RT-PCR)

M	: Marker (50 ~ 10,000 bp)
1	: 豚血清から分離したウイルス(7/26 採血)
2	: " (7/26 採血)
3	: " (7/26 採血)
4	: " (8/9 採血)
5	: " (8/9 採血)
6	: " (8/17 採血)
N	: Negative Control
P	: Positive Control (JaGAR #01 株)

## 2. 日本脳炎ウイルス分離結果

HI 抗体測定に用いた豚 160 頭の血清について日本脳炎ウイルスの分離を行ったところ、7月26日に採血した豚3頭、8月9日に採血した豚2頭、8月17日に採血した豚1頭の計6頭からウイルスが分離された。

ウイルスの発育状態を示す CPE は、1代目から確認されたが、十分なウイルス量を得るため盲継代を行った後、十分な CPE が観察されたところで細胞・細胞培養液を回収した。

CPE が確認された検体については、日本脳炎ウイルスを確認するため 0.33% ガチヨウ血球を用いた HA 試験を行うとともに RT-PCR 法による遺伝子検査も行った。

HA 試験では、HA 価は 2 倍程度と低かったが、6 頭の豚血清から分離したウイルスでいずれも凝集反応を示した。

また、遺伝子検査については図2に示すとおり、6 頭の豚血清から分離したウイルスの遺伝子は、日本脳炎ウイルスの標準株である JaGAR #01 株の遺伝子と同じ 142bp の目的とする位置にバンドが認められた。

従って、CPE と HA 試験で凝集反応が確認でき、かつ RT-PCR も陽性であった 3 頭の豚血清から分離されたウイルスについては、日本脳炎ウイルスと判定した。

## まとめ

1. 7月12日に採血した豚2頭から豚 HI 抗体が、そのうちの1頭から豚感染開始の指標となる 2-ME 感受性抗体陽性(陽性率 100%)が最初に確認された。
2. HI 抗体測定に用いた豚 160 頭の血清からウイルス分離を行ったところ 7月26日、8月9日及び8月17日に採血した豚(計6頭)から日本脳炎ウイルスが分離された。
3. 日本脳炎確認患者は、1965 年以前と比べ激減しているが、HI 抗体価の上昇並びに 2-ME 感受性抗体陽性確認及び日本脳炎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保持されており、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、佐世保市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同様に深謝します。

## 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) 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
- 3) 原 健志, 他: 長崎県衛生公害研究所報, 47, 88 ~ 90, 2001