

## 長崎県における日本脳炎の疫学調査(2004年度)

吉川 亮・中村 まき子・平野 学・原 健志・益田 宣弘

## Epidemic of Japanese Encephalitis in Nagasaki Prefecture (2004)

Akira YOSHIKAWA, Makiko NAKAMURA, Manabu HIRANO, Kenshi HARA  
and Nobuhiro MASUDA

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

キーワード : 日本脳炎、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→豚(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

## ①調査時期及び回数

7月中旬~9月中旬の各旬1回ずつ計7回

## ②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133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り

- ・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

日本フードパッカー(株)諫早工場と畜場

## 2. 日本脳炎ウイルスの分離

## ①検査材料

HI抗体陰性(HI抗体価&lt;10)の豚血清57頭

## ②検査手順

豚血清

↓

12,000r.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% Eagle's MEM)を1穴に900μl分注し、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)

↓

倒立型顕微鏡で細胞変性効果(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)

表 1 平成16年度豚HI抗体検査結果

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		
7/20	20	9	1	3	5	2				55.0	28.6
7/27	17	5	4	3	4	1				70.6	20.0
8/6	20	12	3	4			1			40.0	100
8/10	20	12	2	2	2		2			40.0	50.0
8/17	19	15		1		1			2	21.0	100
8/24	17	4	2	1	1			2	7	76.5	90.0
9/14	20								20	100	15.0

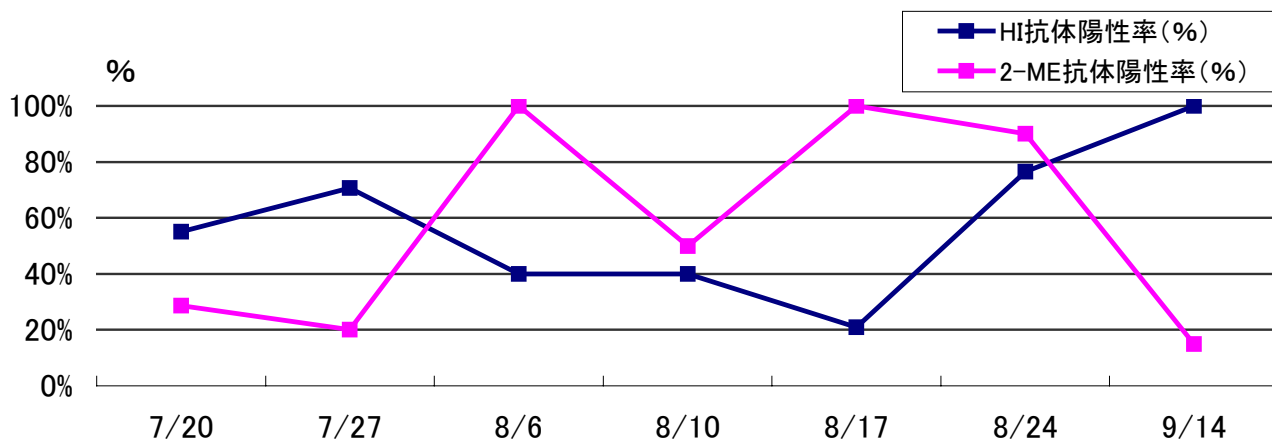


図1 HI抗体陽性率及び2-ME感受性抗体陽性率の推移

採血月日

3. 日本脳炎ウイルス遺伝子検査 (RT-PCR 法)

①RNA 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 の作製は、ノロウイルスの検査法に準じた。

②使用 Primer(5'to3') Product:142 b p

JE-NS3-1S :

AGAGCGGGGAAAAAGGTCAT

JE-NS3-4R :

TTTCACGCTCTTTCTACAGT

③反応条件

92°C 2分

92°C 1分

53°C 1分

72°C 1分

72°C 5分

4°C ∞ (保存)

35 サイクル

④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 20 日に採血した豚 20 のうち 11 頭が HI 抗体陽性 (陽性率 55%)、そのうち HI 抗体価 40 倍以上 7 頭のうち 2 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 28.6%) 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 月中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>にも関わらず、例年<sup>3)</sup>に比べ HI 抗体陽性率の立ち上がりが 8 月中旬まで鈍ったのは、調査客体の飼育された豚舎が、比較的高所にあったことが原因として推察される。

まとめ

1. 7月20日に採血した豚11頭から豚HI抗体が、そのうちの2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28.6%）が最初に確認された。
2. 豚HI抗体陰性の57頭の豚からウイルス分離を行ったところ8月6日、8月10日及び8月24日に採血した豚それぞれ1頭（計3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にも必要である。

謝辞：日本脳炎流行予測調査事業に御協力頂いた、富岡雄二（生産者）様、日本フードパッカー（株）諫早工場長及び諫早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

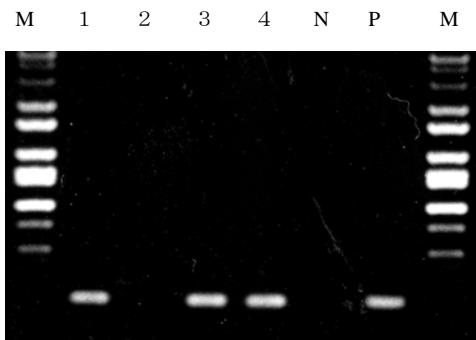


図2 (DNA fragments by RT-PCR)

M	:	Marker (50~10,000 bp)
1	:	豚血清から分離したウイルス (8/6 採血)
2	:	豚血清から分離したウイルス (8/10 採血)
3	:	豚血清から分離したウイルス (8/10 採血)
4	:	豚血清から分離したウイルス (8/24 採血)
N	:	Negative Control
P	:	Positive Control (JaGA r #01 株)

2. 日本脳炎ウイルス分離結果

HI抗体陰性の豚血清57頭について日本脳炎ウイルスの分離を行ったところ、8月6日に採血した豚1頭、8月10日に採血した豚2頭、8月24日に採血した豚1頭の計4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。

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%ガチョウ血球を用いて赤血球凝集(HA)試験を行い、その後、凝集反応が認められた検体については、RT-PCR法による遺伝子検査を行った。

HA試験では、HA価は2~4倍と低かったが、4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。

しかしながら、遺伝子検査については図2に示すとおり、3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JaGA r #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が、残りの1頭(8月10日に採血分)については確認できなかった。

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。