

長崎県における日本脳炎の疫学調査(2003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 (2003)

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 属のウイルスに属し、コガタアカイエカが媒介する。蚊(時にトリ)蚊のサイクルで、生態環を形成している。ヒトは日本脳炎ウイルス感染の終末宿主であり、ウイルス増殖動物としてのブタの感染状況が、ヒトの感染状況を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、けれん等の脳症状が現れる。

近年、日本での日本脳炎確認患者は、1965年以前と比べ激減している。患者発生強力な抑制因子としては、ヒトに対してのワクチン接種による免疫賦与、コガタアカイエカの減少、ブタ飼育環境の変化の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、毎年ブタの感染源調査を実施しており、また、本年も昨年同様、ブタ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月上旬~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、生後5~6ヶ月で県央地区の肥育豚155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(2-Mercaptoethanol)感受性抗体の測定

採血場所

日本フードパッカー(株)諫早工場と畜場及び佐世保食肉センター(H15.8.4採血分のみ)

2. 日本脳炎ウイルスの分離

検査材料

HI抗体陰性(HI抗体価<10)の豚血清107頭
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)細胞を滅菌したPBS(-)で2回洗浄後、細胞培養液(2% eagle's MEM)を1穴に900µl分注し、上清100µlをプレート2穴に接種した。36、7日間炭酸ガス培養器で培養した。(1代目)

ウイルスの発育を調べるため、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15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		
7/1	20	20								0	0
7/15	20	20								0	0
7/29	17	17								0	0
8/4	20	12	1			1			6	40	100
8/12	20	15	3	2						25	0
8/26	20	9					1		10	55	72.7
9/2	20	6		2			1	1	10	70	41.7
9/16	18	8				1		4	5	55.6	0

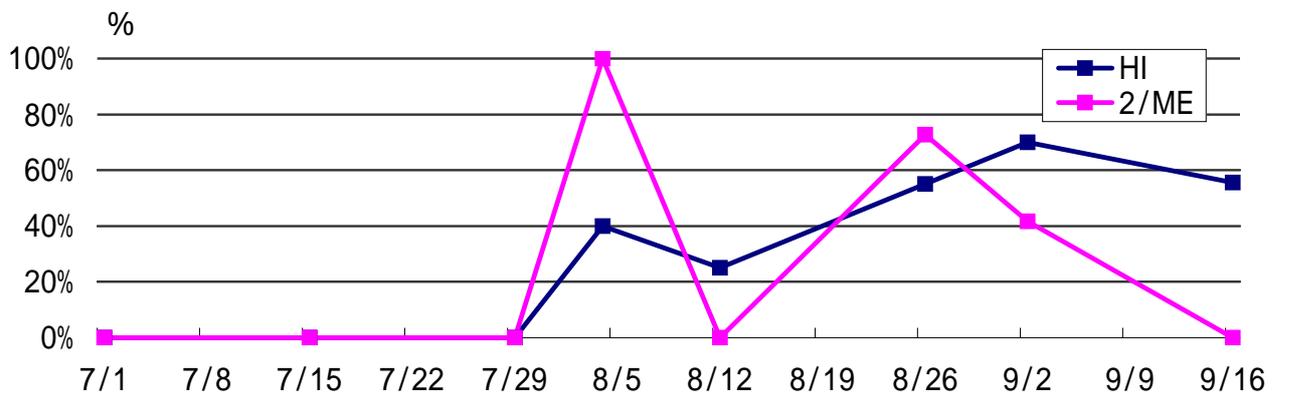


図1 HI抗体価陽性率及び2-ME感受性抗体陽性率の推移

採血月日

3. RT-PCR 法による日本脳炎ウイルスの遺伝子検査

RNAの抽出

RNA抽出キット(QIAamp Viral RNA Mini Kit:QIAGEN社)で、RNA抽出、DNase処理、cDNAの作成まで、キットの操作法に準じて検査を行った。

Primer(5'to3') Product:142bp

JE-NS3-1S:

AGAGCGGGGAAAAAGGTCAT

JE-NS3-4R:

TTTCACGCTCTTTCTACAGT

反応条件

92・2分(熱変性)後、92・1分、53・1分、72・1分を35サイクル、72・5分、4で保存

RT-PCR産物は、3%アガロ-スゲルで電気泳動した後、エチジウムブロマイド染色を行い、UV照射下で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抗体価陽性率及び2-ME感受性抗体陽性率の推移を図1に示した。

8月4日に採血した20頭の豚のうち8頭がHI抗体陽性(陽性率40%)、そのうちHI抗体価40倍以上の7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ヶ月の免疫のないブタを吸血するとブタは感染し、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²⁾。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月下旬頃から活動を開始し、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、例年に比べ³⁾1月程度ウイルス保有蚊の活動開始時期並びに感染を広げた時期が遅く、7月中に雨が多く、平均気温が例年より低かったことが影響として推察される。

M 1 2 3 4 M

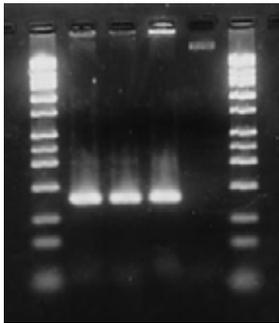


図2 (DNA fragments by RT-PCR)

M : マーカー(50~10,000 bp)
 1~2 : 豚血清から分離したウイルス
 3 : JaGA r #01 株 (陽性対照)
 4 : 蒸留水 (陰性対照)

2. 日本脳炎ウイルス分離結果

HI 抗体陰性の豚血清 107 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4日に採血した豚3頭、8月12日に採血した豚1頭から日本脳炎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、更に凝集反応が認められた検体についてRT-PCR法による遺伝子検査を行った。

遺伝子検査については図2に示すとおり、4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。また、赤血球凝集(HA)試験では、HA価は4~8倍と低かったが、陽性反応を示したことから4頭の豚血清から分離されたウイルスは、日本脳炎ウイルスと判定した。

まとめ

1. 8月4日に採血した豚8頭から豚HI抗体が、そのうちの7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. 豚HI抗体陰性の107頭の豚からウイルス分離を行ったところ、8月4日に採血した豚3頭、8月12日に採血した豚1頭から日本脳炎ウイルスが分離された。
3. 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、日本脳炎確認患者は、1965年以前と比べ激減しているが、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：日本脳炎流行予測調査事業に御協力頂いた、日本フードパッカー(株)諫早工場長、長崎県中央農業協同組合営農部長、諫早食肉衛生検査所長、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,2003
- 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