

長崎県における日本脳炎の疫学調査(2001年度)

原健志・石飛栄二・平野学・野口英太郎・平山文俊

Epidemic of Japanese Encephalitis in Nagasaki Prefecture(2001)

Kenshi HARA, Eiji ISHITOBI, Manabu HIRANO, Hidetaro NOGUCHI
and Fumitoshi HIRAYAMA

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 属のウイルスであり、コガタアカイエカが媒介し、蚊→豚(時に鳥)→蚊のサイクルで、生態環を作っている。ヒトは日本脳炎ウイルス感染の終末宿主であり、ウイルス増幅動物としての豚の感染状況及びコガタアカイエカの発生活長が、ヒトの感染状況を左右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、痙攣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。患者発生の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、豚飼育環境変化の三つの要素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、厚生労働省の感染症流行予測調査事業実施要領に基づき、日本脳炎流行予測調査として毎年度豚の感染源調査を実施している。今年度は、豚血液中の日本脳炎ウイルスに対する抗体価を測定するとともに、豚血液から日本脳炎ウイルスの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月上旬~9月中旬の各旬1回ずつ計8回。

(2)調査客体

県南地区で肥育された生後5~6ヶ月の豚144頭の血清。

(3)調査事項

感染症流行予測調査事業検査術式²⁾により

- (a) 日本脳炎赤血球凝集抑制(HI)抗体価の測定
- (b) 2-ME(2-Mercaptoethanol)感受性抗体価の測定

(4)採血場所

長崎県諫早食肉衛生検査所

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10倍以下)の豚60頭血清

(2)検査手順

豚血清

↓

12,000r.p.mで20分間遠心

ウイルス分離材料として上清を採取

↓

24穴プレートに培養したVero細胞を滅菌したPBS(-)で2回洗浄後、ウイルス分離材料の上清を1穴に100μlずつ接種した。ウイルスを細胞によく吸着させるため、30分間室温で吸着反応させた後、細胞培養液(2%GBUCO)を1穴に900μl分注し、36℃7日間炭酸ガス培養器で培養した。(1代目)

↓

ウイルスの増殖発育を調べるため、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は、細胞培養液を回収(ハーベスト)して、3,000r.p.mで20分間遠心し、上清を採取して、1代目と同じ操作を行って盲継代を実施。(2代目)

表1 平成13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		
7/10	20	20								0	0
7/17	20	18			1				1	10	50
7/25	20	17						2	1	15	66.7
8/7	20	4				1	3	5	7	80	62.5
8/13	20	1		1	1		1	4	12	95	44.4
8/20	20						1	1	18	100	0
9/4	10						1	3	6	100	0
9/18	14							7	7	100	0

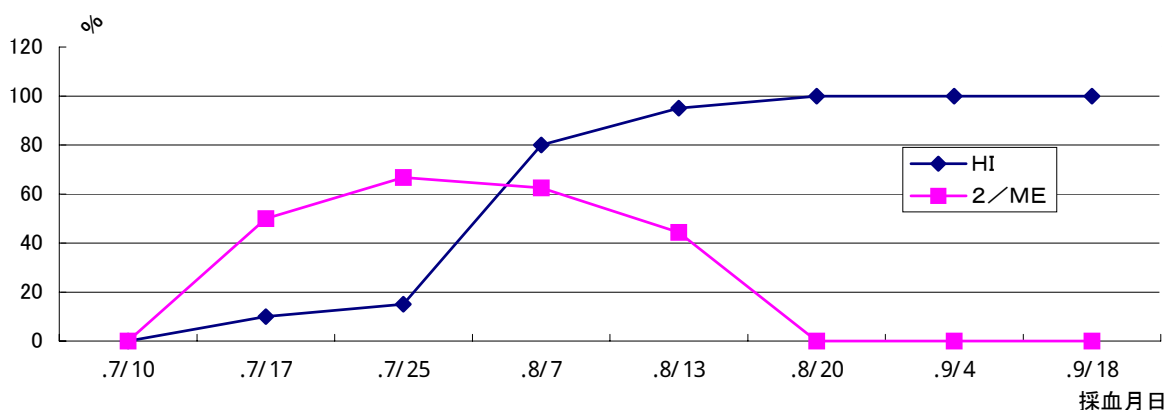


図1 HI抗体陽性率及び2-ME感受性抗体陽性率の推移

3. RT-PCR 法による日本脳炎ウイルスの遺伝子検査

(1)RNA の抽出

RNA 抽出キット(QIAamp Vival RNA Mini Kit :OIAGEN 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。

(2)Primer(5'to3') Product:142bp

JE- NS3- 1S:

AGAGCGGGGAAAAAGGTCAT

JE- NS3- 4R:

TTTCACGCTCTTTCTACAGT

(3)反応条件

92°C・2分(熱変性)後、1サイクルが92°C・1分、53°C・1分、72°C・1分のサイクルを35サイクル反復繰り返し、72°C・5分保持後、4°Cで保存。

RT-PCR 産物は、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、UV 照射下で142bpの位置にバンドが確認されたものを日本脳炎ウイルス遺伝子陽性とした。

調査結果及び考察

(1) 感染源調査結果

表1に豚HI抗体検査結果を、また図1にHI抗体陽性率及び2-ME感受性抗体陽性率の推移を示した。

7月17日に採血した20頭の豚のうち2頭がHI抗体保有陽性(陽性率10%)を示し、そのうちの1頭は豚感染開始の指標となる2-ME感受性抗体保有陽性(陽性率50%)であることが確認された。また、HI抗体陰性の豚血清については、日本脳炎ウイルスの分離を試み、10頭の豚から日本脳炎ウイルスが分離された。

日本脳炎ウイルスを保有する蚊が、日本脳炎ウイルスに対して免疫を保有していない生後4~6ヶ月の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。このウイルス血症を起こしている時期の豚を吸血した蚊は、吸血によるウイルス取り込みによってウイルス感染が成立し、10~13日の潜伏期を経てウイルスを媒介するようになる¹⁾。

今回の豚の日本脳炎HI抗体価測定及び2-ME感受性抗体価測定の調査結果でも、昨年と同様に³⁾日本脳炎ウイルスを保有した有毒蚊が7月上旬頃から活動を

開始し 8 月中旬頃まで豚を吸血しながら、蚊→豚→蚊の自然界サイクルの中でウイルスを媒介散布し、感染を広めていったことが推察された。

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 P N M

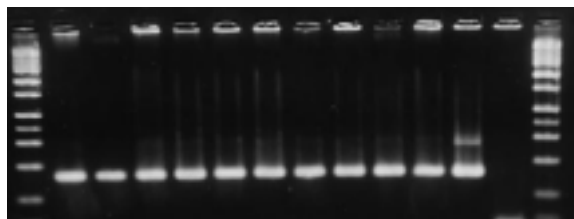


図2 (DNA fragments by RT-PCR)

M : マーカ (50~ 10,000 bp) レン: 1~ 2 : 7 月 17 日に採血した豚血清から分離したウイルス レン: 3 ~ 10 : 7 月 25 日に採血した豚血清から分離したウイルス P : JaGAR #01 株 (陽性対照) N : 蒸留水 (陰性対照)

厚生労働省は、日本脳炎汚染地区に指定するための基準として、「豚の HI 抗体陽性率が 50%を越え、且つ 2-ME 感受性抗体保有豚が1頭でも検出された場合」と定めており、8月7日に採血した豚血清の検査結果で、HI 抗体陽性豚が 16 頭(陽性率 80%)、そのうちの 10 頭に 2-ME 感受性抗体保有(陽性率 62.5%)が確認され、本県は、8月9日付けで県内全域を日脳汚染地区に指定した。全国で今年度は 2 番目の早さで指定され、県内住民には、テレビ、新聞等を通じて日本脳炎に対する注意が報道喚起された。

県内における平成12年度日本脳炎ワクチン接種率は、第1期の初回接種で1回目 62.3%、2回目 61.3%、追加接種で 53.4%、第2期 82.4%、第3期 61.0%であった。⁴⁾

ヒトに対してのワクチン接種による免疫賦与は、患者発生の強力な抑制因子であり、患者発生の殆どが幼少児と高齢者に偏っていることから、幼小児に対するワクチン接種率の向上及び高齢者へのワクチンの追加接種が予防対策上非常に重要である。

(2) 日本脳炎ウイルス分離結果

HI 抗体価陰性の豚血清 60 頭について日本脳炎ウイルスの分離を行ったところ、7月 17 日に採血した豚2頭及び7月 25 日に採血した豚8頭の 10 頭から、日本脳炎ウイルスを分離した。

ウイルスの増殖発育状態を示す CPE は、1 代目では認められなかったが、盲継代を行って2代目で確認さ

れた。

CPE が確認された検体については、日本脳炎ウイルスか否かを確認するため RT-PCR 法による遺伝子検査と 0.33%ガチョウ血球を用いて赤血球凝集(HA)試験を行った

図2に示す遺伝子検査結果のとおり、10 頭の豚血清から分離され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。また、赤血球凝集(HA)試験では、HA 価は 4~ 16 倍と低かったが HA 活性が認められたことから、10 頭の豚血清から分離されたウイルスは、日本脳炎ウイルスであると判定した。

まとめ

- (1) 7月 17 日に採血した豚2頭が日本脳炎ウイルスに対する HI 抗体を保有し、そのうちの 1 頭に豚感染開始の指標となる 2-ME 感受性抗体保有(陽性率 50%)が最初に確認された。
- (2) 8月 7 日に採血した豚血清の HI 抗体陽性率が、厚生労働省の定めた基準に達したことから、長崎県は8月9日付けで県内全域を日本脳炎汚染地区に指定した。
- (3) 日本脳炎ウイルスに対する HI 抗体陰性の 60 頭の豚について、ウイルス分離を試みたところ、7月 17 日に採血した豚2頭、及び7月 25 日に採血した豚 8頭の合計 10 頭の豚から日本脳炎ウイルスが分離された。

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 株式会社諫早工場長、全農諫早畜産駐在事務所長、長崎県諫早食肉衛生検査所長、その他前記施設の関係職員一同に深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 小早川隆敏:改定・感染症マニュアル,株式会社マクガイヤ、東京都、239~ 240, (1999)
- 2) 厚生省保健医療局結核難病感染症課感染症対策室:伝染病流行予測調査事業検査術式、59~ 80, (1986)
- 3) 平野 学, 他:長崎県における日本脳炎の疫学調査(2000 年度), 長崎県衛生公害研究所報,46,107~ 109, (2000)
- 4) 厚生労働省大臣官房統計情報部:平成12年度地域保健・老人保健事業報告(地域保健編)、615, (2000)