

長崎県における日本脳炎の疫学調査(2016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、山下 綾香、三浦 佳奈、田栗 利紹

Epidemiological Study of Japanese Encephalitis in Nagasaki Prefecture (2016)

— Surveillance of swine infected by Japanese Encephalitis Virus —

Akira YOSHIKAWA, Ayaka Yamashita, Kana MIURA and Toshitsugu TAGURI

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」の感染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、ウイルス増幅動物としての豚の感染状況が、ヒトへの感染を大きく左右するものと考えられる。

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。発症すると典型的な脳炎を呈し、1~2 日で 40°C 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、筋硬直、けいれん等の脳炎症状が出現する。

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。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、豚の感染源調査を実施するとともに、日本脳炎の発生予防とまん延防止を図ることを目的とした「感染症流行予測調査事業(日本脳炎感染源調査)における注意喚起等実施要領(別紙)」に基づき、豚血清からの JEV 遺伝子の検出ならびに豚血清中の抗 JEV-IgM 抗体の測定を行っている。本年度の概要について報告する。

また、2013 年以来 3 年ぶりに県内での患者発生報告があり、当センターにおいて確認検査を行ったので、

併せて報告する。

調査方法

1 感染源調査

(1) 調査時期及び回数

7 月初旬~9 月中旬に計 8 回実施した。

(2) 調査対象及び検体

調査対象は、諫早市内で飼育された生後約 6 ヶ月の肥育豚から佐世保市と畜場において放血液を採取した 80 頭とし、検体は調査対象の血清とした。

(3) 調査事項

感染症流行予測調査事業検査術式に従い、JEV 赤血球凝集抑制(HI)抗体の測定及び 2-ME (2-Mercaptoethanol) 感受性抗体の測定を行った。

2 JEV 遺伝子検索

採血後の豚血清より QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA 抽出し、E 領域(JEV-JaGAR 01;978~2,477)に設定したプライマーセット及び SuperScript III One Step RT-PCR システム(Invitrogen)を用いて 1 次増幅反応を行った後、その産物の一部を用いて 2 次増幅反応を行った。遺伝子増幅反応(PCR)条件及びプライマーを図 1 に示す。増幅産物は、アガロースゲル電気泳動を行って確認し、1 次増幅産物は 381 bp (JEV-JaGAR 01; 2,097~2,477)、2 次増幅産物は 326 bp (JEV-JaGAR 01; 2,124~2,449)の位置にバンドが確認されたものを陽性とした。

3 JEV の分離

ウイルス遺伝子の存在が確認された血清について、Vero 9013 細胞に接種して JEV の分離を行った。すなわち、24 ウェルマルチプレートに単層を形成させた Vero 9013 細胞を滅菌リン酸緩衝食塩水 (PBS) で 2 回洗浄した後、各ウェルに維持培養液 (2% 非動化牛胎児血清加 Eagle MEM) 900 μ L を加え、被検血清 100 μ L ずつ 2 ウェルにそれぞれ接種してウイルス分離を行った。炭酸ガス培養機 (37°C、5% CO₂、95% Air) 内で 7 日間培養して細胞変性効果 (CPE) の有無を判定し、明瞭な CPE が観察されなかった場合は、感染細胞の遠心上清を再度 Vero 9013 細胞に接種して盲継代を 1~2 回行った。

4 JEV の確認

明瞭な CPE が観察された場合は、感染細胞の培養上清から抽出した RNA を鋳型にして NS3 領域に

設定されたプライマーセット²⁾を用いた PCR により JEV 遺伝子を確認した。PCR 反応条件を図 2 に示す。

増幅産物は、アガロースゲル電気泳動を行って確認し、162 bp (JEV-JaGAr 01; 5,739~5,900) の位置にバンドが確認されたものを陽性とした。

5 抗 JEV-IgM 抗体測定

HI 抗体測定を行った同一客体の血清を用いて抗 JEV-IgM capture ELISA により豚血清中の抗 JEV-IgM 抗体を測定した。ELISA の条件等は表 2 に示す。

抗 JEV-IgM 抗体陽性は、P/N ratio \geq 2.00 (陰性対照血清の吸光度測定値に対して豚血清の吸光度測定値が 2 倍以上) とした。

① 1 次増幅反応 (One step RT-PCR)					
< primer set > JE8K-S : 5' ATGGAACCCCCCTTC 3' (JEV-JaGAr 01; 2,097-2,111)					
JEER : 5' AGCAGGCACATTGGTTCGCTA 3' (JEV-JaGAr 01; 2,458-2,477)					
< 組成 >			< 反応条件 >		
	volume	final conc.	temp.	time	cycles
2 \times Reaction Mix	12.5 μ L		53°C	15 min.	1
primer (JE8K-S: 25 μ M)	0.2 μ L	0.2 μ M	94°C	2 min.	1
primer (JEER: 25 μ M)	0.2 μ L	0.2 μ M	94°C	15 sec.	
SSIII/Platinum Taq Mix	0.5 μ L		53°C	30 sec.	40
DW (DNase/RNase free)	10.1 μ L		68°C	1 min.	
extract RNA	1.5 μ L		68°C	5 min.	1
total	25 μ L		4°C	∞	1
② 2 次増幅反応 (2nd PCR)					
< primer set > JE8K inner-S : 5' ATCGTGGTTGGGAGGGGAGA 3' (JEV-JaGAr 01; 2,124-2,143)					
JEER inner-C : 5' AGCACACCTCCTGTGGCTAA 3' (JEV-JaGAr 01; 2,430-2,449)					
< 組成 >			< 反応条件 >		
	volume	final conc.	temp.	time	cycles
10 \times EX Taq Buffer	2.5 μ L		94°C	5 min.	1
dNTP mixture (25 mM each)	2.0 μ L	0.2 mM each	94°C	15 sec.	
primer (JE8K inner-S: 25 μ M)	0.2 μ L	0.2 μ M	53°C	30 sec.	25
primer (JEER inner-C: 25 μ M)	0.2 μ L	0.2 μ M	72°C	1 min.	
TaKaRa EX Taq HS	0.125 μ L	0.025 U/ μ L	72°C	5 min.	1
DW (DNase/RNase free)	18.475 μ L		4°C	∞	1
1 st PCR products	1.5 μ L				
total	25 μ L				

図 1 JEV 遺伝子の検索

< primer set > JE-NS3-1S : 5' AGAGCGGGGAAAAAGGTTCAT 3' (JEV-JaGAr 01;5,739-5,758) JE-NS3-4R : 5' TTTCACGCTCTTTCTACAGT 3' (JEV-JaGAr 01;5,891-5,900)					
< 組成 >			< 反応条件 >		
	volume	final conc.	temp.	time	cycles
2× Reaction Mix	12.5 μL		50°C	30 min.	1
primer (NS3-1S : 25 μM)	0.2 μL	0.2 μM	94°C	2 min.	1
primer (NS3-4R: 25 μM)	0.2 μL	0.2 μM	94°C	15 sec.	40
SSIII/Platinum Taq Mix	0.5 μL		53°C	30 sec.	
DW (DNase/RNase free)	10.1 μL		68°C	1 min.	
extract RNA	5 μL		68°C	5 min.	1
total	25 μL		4°C	∞	1

図2 JEV の PCR による確認

6 日本脳炎患者確認試験

(1) 患者情報

患者 1: 対馬市在住 80 代男性、近医を受診後、別の市内医療機関を紹介され入院。2016 年 8 月 31 日に発症、症状は発熱、麻痺および髄膜炎、既往症として前立腺癌、海外渡航歴なし

患者 2: 対馬市在住 70 代男性、2016 年 8 月 20 日に発症、症状は発熱、脳炎、髄膜炎および意識障害(後遺症あり)、既往症として胃癌および胸腺腫、海外渡航歴なし

患者 3: 対馬市在住 80 代女性、2016 年 8 月 31 日に発症、症状: 発熱、麻痺、髄膜炎、意識障害および中枢神経系症状、既往歴なし、海外渡航歴なし

患者 4: 対馬市在住 70 代男性、2016 年 9 月 15 日に発症、症状は発熱、麻痺、髄膜炎および意識障害、既往症として器質化肺炎および心房細動、海外渡航歴なし

いずれの患者も脳炎疑いで種々の検査を実施するも原因が特定されなかったため、9 月 21 日に日本脳炎の検査依頼が行われた。

(2) 検体

患者 1: 2016 年 9 月 21 日に採取された患者血清

患者 2: 2016 年 8 月 20 日、8 月 27 日および 9 月 9 日に採取された髄液および 2016 年 9 月 21 日に採取された患者血清

患者 3: 2016 年 9 月 1 日および 9 月 13 日に採取された髄液および 2016 年 9 月 21 日に採取された患者血清

患者 4: 2016 年 9 月 21 日に採取された患者血清

(3) 検査項目

JEV 遺伝子検索および抗 JEV-IgM 抗体価測定を行った。

JEV 遺伝子検索は豚の JEV 遺伝子検索と同様の方法および図 4 で示した方法³⁾で併せて行った。図 3 で示した方法の増幅産物は、アガロースゲル電気泳動を行って確認し、1 次増幅産物は 292 bp (JEV-JaGAr 01; 1,015~1,306)、2 次増幅産物は 194 bp (JEV-JaGAr 01; 1,076~1,269) の位置にバンドが確認されたものを陽性とした。

抗 JEV-IgM 抗体は IgM capture ELISA for JE (Focus 変法 NIID) を用いて測定し、P/N ratio ≥ 2.00 (陰性対照血清の吸光度測定値に対して患者血清の吸光度測定値が 2 倍以上) を抗 JEV-IgM 抗体陽性とした。

(4) 国立感染症研究所による確認検査

当該事例は公衆衛生上非常に大きい問題であることから国立感染症研究所に確認検査を依頼した。

< anti JEV-IgM capture ELISA >

- 1) Dilute positive control sera, negative control sera and samples to 1:100 in PBS-T (PBS with tween 20) with 10% Block Ace (DS Pharma Biomedical).
- 2) Dilute anti Pig-IgM (BETHYL) to 1:100 in Carbonate-Bicarbonate Buffer (SIGMA).
- 3) Add 100 μL of diluted anti Pig-IgM to each well.
- 4) Incubate overnight at 4°C.
- 5) Wash wells 3 times with PBS-T.
- 6) Add 100 μL of Block Ace to each well.
- 7) Incubate at 37°C for 1 hr.
- 8) Wash wells 3 times with PBS-T.
- 9) Add 100 μL of diluted positive control sera, negative control sera and samples to each well.
- 10) Incubate at 37°C for 1 hr.
- 11) Wash wells 3 times with PBS-T.
- 12) Add 100 μL of JEV (JaGAr 01 strain) inactivated antigen to each well.
- 13) Incubate at 37°C for 1 hr.
- 14) Wash wells 3 times with PBS-T.
- 15) Add 100 μL of 6B6C-1 MAAb (HRPO-conjugated anti-flavivirus IgG) to each well.
- 16) Incubate at 37°C for 1 hr.
- 17) Wash wells 3 times with PBS-T.
- 18) Add 100 μL of OPD (SIGMA) in Phosphate-Citrate Buffer (SIGMA)
- 19) Incubate at RT (room temperature) for 20 min under dark condition.
- 20) Add 100 μL of stop solution (1N H₂SO₄) to each well
- 21) Read OD 425 nm and calculate Positive/Negative (P/N) Ratio.

$$P/N \text{ Ratio} = (\text{OD}_{425} \text{ of sample serum}) / (\text{OD}_{425} \text{ of negative control sera})$$

$$P/N \text{ Ratio} \geq 2.00 \text{ is determined to positive}$$

図3 抗 JEV-IgM 抗体測定条件

① 1次増幅反応 (One step RT-PCR)

< primer set > JEen37s-first : 5' AAGGAGCCAGTGGAGCCACTT 3' (JEV-JaGAr 01;1,015-1,035)
 JEen329c-first : 5' TTCCCGAAAAGTCCACATCC 3' (JEV-JaGAr 01;1,287-1,306)

< 組成 >

	volume	final conc.
2× Reaction Mix	12.5 μL	
primer (JEen37s-1st: 25 μM)	0.2 μL	0.2 μM
primer (JEen329c-1st: 25 μM)	0.2 μL	0.2 μM
SSIII/Platinum Taq Mix	0.5 μL	
DW (DNase/RNase free)	10.1 μL	
extract RNA	1.5 μL	
total	25 μL	

< 反応条件 >

temp.	time	cycles
53°C	15 min.	1
94°C	2 min.	1
94°C	15 sec.	40
53°C	30 sec.	
68°C	1 min.	
68°C	5 min.	1
4°C	∞	1

図4 患者材料からの JEV 遺伝子の検出

② 2次増幅反応 (2nd PCR)

< primer set > JEen98s-second : 5' CATGGCAAACGACAAACCAAC 3' (JEV-JaGAR 01; 1,076-1,096)
 JEen301c-second:: 5' CAGTRAAGCCTTGTTTGCACAC 3' (JEV-JaGAR 01; 1,248-1,269)

< 組成 >

	volume	final conc.	< 反応条件 >		
10× EX Taq Buffer	2.5 μL		temp.	time	cycles
dNTP mixture (25 mM each)	2.0 μL	0.2 mM each	94°C	5 min.	1
primer (JEen98s-2nd: 25μM)	0.2 μL	0.2 μM	94°C	15 sec.	25
primer (JEen301c-2nd: 25μM)	0.2 μL	0.2 μM	53°C	30 sec.	
TaKaRa EX Taq HS	0.125 μL	0.025 U/μL	72°C	1 min.	
DW (DNase/RNase free)	18.475 μL		72°C	5 min.	1
1 st PCR products	1.5 μL		4°C	∞	1
total	25 μL				

図 4 患者材料からの JEV 遺伝子の検出(つづき)

表 1 2016 年度豚 HI 抗体陽性率及び 2-ME 感受性抗体陽性率体調査結果

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		
7/5	10		6	4						100	-
7/12	10		2	7	1					100	0
7/26	10		8	2						100	-
8/5	10		2	8						100	-
8/16	10			10						100	-
8/23	10		1	9						100	-
9/6	10		10							100	-
9/13	10		2	1	1				6	100	2

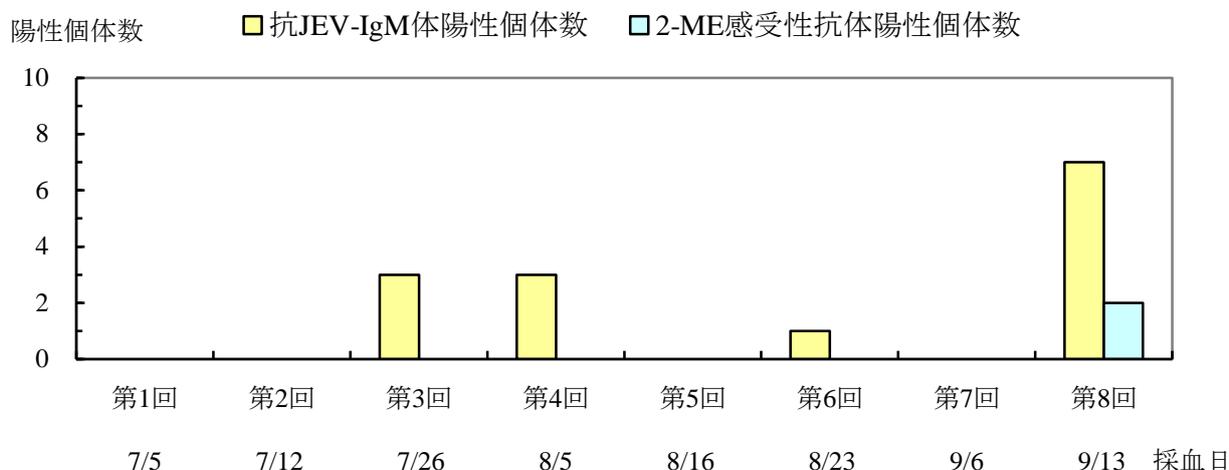


図 4 豚の抗 JEV-IgM 抗体及び 2-ME 感受性抗体陽性個体数の推移

調査結果及び考察

1 感染源調査結果

2016年度豚 HI 抗体陽性率及び 2-ME 感受性抗体陽性率調査結果を表 1 に示す。

2016年度は、7月5日に採血した豚 10頭すべてが HI 抗体陽性となった(陽性率 100%)。9月13日に採血した豚 10頭において、HI 抗体価 40倍以上となった7頭のうち2頭(陽性率 28.6%)から初感染の指標となる 2-ME 感受性抗体が検出された以後もすべての個体において JEV の感染が確認された。

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⁴⁾ことから、2016年度の本県では JEV を保有した蚊が6月には活動を既に開始し、9月以降も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可能性が推察される。

2 JEV 遺伝子検索及び分離結果

豚血清中の JEV 遺伝子検索を行ったところ、2016年9月6日に採血した2頭の血清から JEV 遺伝子が確認された。さらに、この血清を用いてウイルス分離を実施したところ、血清を接種した Vero9013 細胞に CPE が出現し、培養上清の PCR でも JEV の標準株 JaGAr 01 株と同様に NS3 領域 162 bp の産物が増幅されたことから、分離されたウイルスは JEV であることが確認された。

3 抗 JEV-IgM 抗体測定結果

豚の抗 JEV-IgM 抗体及び 2-ME 感受性抗体陽性個体数の推移を図 4 に示す。2016年7月26日に採血した3頭から初感染の指標である抗 JEV-IgM 抗体陽性の個体を確認した。また、この2016年7月26日に採血された同一検体を用いて行った HI 検査では、2-ME 感受性抗体陽性個体は検出されなかったことから、その地域における初感染を把握するうえでは、既存の HI 検査よりも IgM capture ELISA による IgM 抗体検出がより有用である。

4 日本脳炎患者確認試験結果

確認検査を IgM capture ELISA for JE (Focus 変法 NIID) による抗 JEV-IgM 抗体測定および遺伝子検査により実施した。

4名の患者血清および髄液から JEV 遺伝子は検出されなかったものの抗 JEV-IgM 抗体がいずれの検体から検出され、被験患者は JEV に感染している

ことが確認された。

まとめ

- 2016年度は7月7日に採血した10頭から HI 抗体が、9月13日に採血した2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。
- 9月6日に採血した2頭の血清から JEV が分離された。
- 2016年度は7月26日に採血した豚血清から抗 JEV-IgM 抗体陽性個体が3頭確認されたため、別紙の要領に基づき医療政策課から県民に向けた注意喚起が行われた。
- 県内の患者発生報告は2010年に1名、2011年に2名、2013年の1名(死亡例)に続き3年ぶりとなった。ただし、対馬市での患者発生は1960年代以来であり、4名の患者が続発したことは近年非常に珍しく、感染経路、感染源等の原因究明が求められた。
- 確認試験を IgM capture ELISA for JE (Focus 変法 NIID) および RT-PCR により行った。患者4名の血清および髄液から抗 JEV-IgM 抗体を検出した。当該結果は国立感染症研究所にて実施された結果と同様であった。
- 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、2010年度1名、2011年度2名の患者報告に続き、2013度は1名の患者発生(死亡例)が確認された。さらに豚では依然 JEV に対する抗体保有が確認されたことから、現在も生活環境中に JEV は確実に維持されており、新たな患者発生を防止するためにも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の関係各位に感謝する。

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
- Tanaka M: Rapid identification of flavivirus using the polymerase chain reaction. J Virol Methods, 41(3), 311-322 (1993)
- Kuwayama M, et al: Japanese Encephalitis Virus in

Meningitis Patients, Japan. Emerging Infectious Disease, 11(3), 471-473 (2005)

4) 厚生省保健医療局結核感染症課,改定・感染症マニユアル,1999

(別紙) 感染症流行予測調査事業(日本脳炎感染源調査)における注意喚起等実施要領

第1 目的

国が実施する感染症流行予測調査において、長崎県が受託して実施している日本脳炎感染源調査(ブタ感受性調査)の結果を適切に公表し、県民へ周知することで、日本脳炎の発生予防とまん延防止を図る。

第2 注意喚起の実施

注意喚起は、日本脳炎感染源調査において次に掲げる項目のいずれかを満たした場合、速やかに実施する。

- 1) 調査客体(ブタ)のHI 抗体保有率が50%を超え、かつ2-ME感受性抗体を検出
- 2) PCR によるブタ血清からの日本脳炎ウイルス遺伝子の確認
- 3) IgM 捕捉ELISA による陽性個体(ブタ)の確認

第3 実施方法

1. 環境保健研究センターは検査結果が判明し次第、医療政策課へ検査結果及び基準を満たした旨を報告する。
2. 報告を受けた医療政策課は、保健所、一般社団法人長崎県医師会及び報道機関等に対して情報提供を行う。
3. 環境保健研究センターは感染症発生動向調査速報において、関係機関等への注意喚起に努める。
4. 情報提供を受けた保健所は、必要に応じて地域住民、関係機関等へ周知する。

附則 この要領は平成25年7月30日から施行する。