

対馬における日本脳炎患者発生に伴う疫学調査(2017 年度)

— 媒介蚊の日本脳炎ウイルス感染状況調査 —

松本 文昭、山下 綾香、三浦 佳奈、田栗 利紹

Epidemiological Study of Japanese Encephalitis in Tsushima Island (2017)

— Surveillance of Mosquitoes as Vectors of Japanese Encephalitis Virus —

Fumiaki MATSUMOTO, Ayaka YAMASHITA, Kana MIURA, and Toshitsugu TAGURI

Key words : Japanese encephalitis, Arbovirus, *Culex tritaeniorhynchus*, Tsushima island
 キーワード : 日本脳炎、アルボウイルス、コガタアカイエカ、対馬

はじめに

日本脳炎は、主にコガタアカイエカが媒介する日本脳炎ウイルス (Japanese Encephalitis Virus, JEV) の感染によって起こるウイルス性脳炎である。豚等の JEV 増幅動物の感染血液を吸血した蚊がヒトを吸血することで感染が成立する。感染者の大半は不顕性感染であるが、発症すると初期に 40°C 以上の高熱、頭痛、嘔吐、および頸部硬直などの症状が現れ、次いで意識障害、筋硬直、およびけいれん等の急性脳炎の症状が出現する。本疾病は、その致命率は約 20～40%で、発症者の半数には重篤な後遺症が残ることから、公衆衛生上留意すべきヒトのウイルス性急性脳炎の一つである¹⁾。

1960 年代まで、本邦の日本脳炎患者報告数は年間 1,000 例を超えていた。しかし、1954 年より日本脳炎ワクチン接種が開始され、媒介蚊の減少などの環境要因の変化とも相まって、患者報告数は減少し、1990 年

代以降、国内の患者報告数は、10 名以下となった(図 1)。長崎県においても、2001 年から 2009 年までの 9 年間に患者は報告されなかったが、2010 年から 2013 年までの 4 年間に死亡例 1 名を含む患者 4 名が報告された。さらには、2016 年 8 月中旬から 9 月中旬にかけて、本県対馬市で死亡例 1 名を含む 4 名の日本脳炎患者の発生が立て続けに報告された。ウイルス増幅動物となる豚が飼育されていない地域で、同時期に 4 例もの日本脳炎が報告されることは極めて異例な事態であったため、発生直後の 2016 年 10 月に、対馬市内において、原因究明の調査を実施した。しかし、その結果、媒介蚊および新たな増幅動物として可能性のあるイノシシについて JEV の感染状況示す有用な証拠は得られなかった。これは、蚊の捕集時期がコガタアカイエカ発生ピークから外れており、捕集数が少なかったことが原因の 1 つとして考えられた。

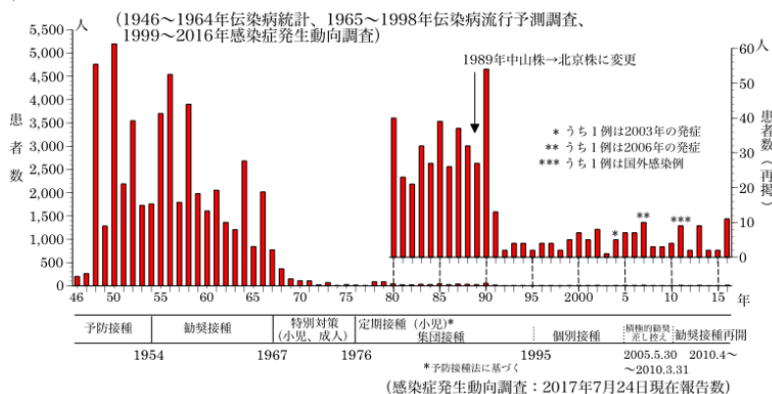


図 1 本邦における日本脳炎患者発生状況

(出典:国立感染症研究所 病原微生物検出情報)

＜ 捕集蚊のビーズ式破砕法 ＞

- 1) 2 mL スクリューキャップチューブにビーズ (Garnet Matrix および 1/4" Ceramic Sphere) を適量入れる
- 2) 2 mL ビーズ入り破砕チューブに MEM / 2HI-FBS を 1.0 mL 分注する
- 3) 2 mL ビーズ入り破砕チューブに調査日・地点、蚊の種類ごとに捕集した蚊を最大 20 匹ずつ入れる
- 4) 最大 20 匹/1pool として捕集蚊のプールを作製する
- 5) ビーズ式破砕機にかけ、蚊を破砕 (5,000 rpm, 20 sec)
- 6) 破砕後、速やかに 2 mL ビーズ入り破砕チューブを冷却遠心 (12,000 rpm, 3 min, 4°C)
- 7) 遠心中に保存用 2 mL スクリューキャップチューブに MEM / 2HI-FBS を 0.5 mL 分注しておく
- 8) フィルター (0.45 μm) をつけた注射筒に滅菌スポイトで遠心上清をすべて移す
- 9) 上清をフィルター濾過し、保存用 2 mL スクリューキャップチューブに移し、転倒混和
- 10) RNA 抽出に 140 μL、ウイルス分離に 200 μL 使用し、残りは凍結保存 (-80°C)

※ 作業は可能な限りドライアイス上もしくは氷冷中で行う

図 2 媒介蚊のホモジネイト作製方法

そこで、今回、新たに、2017 年 4 月から 9 月の対馬において、JEV の主たる媒介蚊であるコガタアカイエカの発生活長把握及び JEV 保有状況の把握を目的として、日本脳炎媒介蚊の捕集調査を行ったのでその結果を報告する。

調査方法

1 媒介蚊調査

(1) 調査時期および場所

2017 年 4 月から 9 月にかけて各月 1 回調査し、調査協力に関する承諾が得られた 2016 年の患者宅周辺 1 箇所および牛舎・鶏舎近傍の 3 箇所を調査地点とした。

(2) 調査対象および捕集方法

コガタアカイエカ以外からの媒介も想定し、調査対象は UV ライトトラップおよびドライアイス CDC トラップにて捕集された蚊とした。夕方に設置したトラップを翌朝速やかに回収し、トラップ中の捕集蚊は分類・同定を行うまでドライアイス下で保存した。

(3) 調査事項および分類・同定

分類・同定した蚊を調査日、調査地点、蚊の種類および雌雄ごとに集計し、各調査地点の媒介蚊捕集状況を把握するとともに、捕集したすべての蚊について JEV 遺伝子検索およびウイルス分離を行った。

捕集された蚊の分類・同定は長崎大学熱帯医学研究所病害動物学分野に依頼した。分類・同定後の捕集蚊はホモジネイト作製まで凍結 (-80°C) 状態で保存した。

捕集された媒介蚊は最大 20 匹を 1 プールとして調査日、調査場所、蚊の種類、雌雄および吸血の有無ごとにプール作製を行った (図 2)。

2 JEV 遺伝子検索

作製した媒介蚊 920 プールのホモジネイト上清より QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出し、既報³⁾に基づき JEV の遺伝子検索に供した。

3 JEV の分離

捕集された媒介蚊 920 プールのホモジネイト上清について、既報³⁾に基づき Vero 9013 細胞を用いた JEV 分離に供した。

調査結果及び考察

1 捕集媒介蚊調査結果

調査期間中に各調査地点において捕集された媒介蚊の捕集結果を表 2 に示す。

コガタアカイエカは、14,274 匹捕集された全ての蚊のうち 6,192 匹であり、昨年度と比較し多くのコガタアカイエカが捕集できた。捕集地点によって差はあるが、6 月が最も個体数が多く、8 月に再度増加していた。本調査の結果、対馬市では 6 月に発生のピークがあり、8 月以降はキンイロヤブカが優勢になると考えられた (図 2)。媒介蚊の発生活長を正確に把握するためには、今後も調査データを蓄積する必要がある。

2 捕集媒介蚊の JEV 遺伝子検索及び分離結果

捕集媒介蚊 920 プール中の JEV 遺伝子検索およびウイルス分離試験の結果、JEV 遺伝子は検出されず、ウイルスも分離されなかった。しかし、日本脳炎が続発した地域の周辺調査における一定量の感染媒介蚊の探索によっても JEV 感染源の究明につながらな

かったことは、同疾病の感染源調査の難しさを示している。

近年、対馬に最も近い韓国では、媒介蚊調査において、ワクチン株 (Genotype 3) とは異なる Genotype 5 の JEV の検出が報告されている⁴⁾。また、比嘉ら⁵⁾が本調査で得られたサンプルの一部 (捕集蚊の脚部) を使って、コガタアカイエカのミトコンドリア DNA の一部、COI (Cytochrome oxidase submit I) 遺伝子の解析による大陸型コガタアカイエカの分類⁶⁾を試みたところ、大陸型の遺伝子を持つコガタアカイエカが対馬島内に広く分散していることが確認された。沢辺らの調査⁷⁾でコガタアカイエカは蚊の中では飛翔能力が高く、ジェット気流に乗って飛来するルートが示唆されていること、同調査において佐賀県や壱岐で大陸型遺伝子を持つコガタアカイエカが確認されていること、また大迫らの調査⁷⁾では熊本県においても大陸型の遺伝子を持つコガタアカイエカ検出されていることから国境を接する対馬市においても同様の機序で大陸由来のコガタアカイエカが飛来することが懸念される。

事件発覚当時の調査と同様に、今回の調査においても対馬市における JEV の活動実態を把握することは出来なかった。しかし、対馬で日本脳炎が連続した事実は確かであり、今後も当地における媒介蚊の調査は可能な限り続けていく必要がある。さらに、豚が飼育されていない対馬では JEV の増幅動物が確認されていないために、蚊だけではなく JEV の増幅動物として考えられるイノシシや野鳥にも着目し、幅広い調査を行うことが重要である。

今回、長崎県内で連続した日本脳炎対策として、今後もこれまで同様に感染症流行予測調査等により県内の JEV の流行状況を把握し、適宜注意喚起を行うとともに、ハイリスク者である高齢者および小児 (3 歳未満) への積極的なワクチン接種により患者発生の防止に繋げていく必要がある。

まとめ

- ・2017年4月～9月に患者宅周辺および牛舎・鶏舎で実施した媒介蚊調査で合計 14,274 匹を捕集した。そのうちコガタアカイエカは 6,192 匹であった。コガタアカイエカの発生が最も多く確認されたのは6月であった。
- ・媒介蚊調査で捕集された蚊から JEV 遺伝子は検出されず、ウイルス分離もできなかった。
- ・今回の媒介蚊調査からは感染経路、感染源等の原因究明につながる結果は得られなかった。

・長崎県で連続した JEV 事例から、現在も生活環境中に JEV は確実に維持されていると考えられ、県内の新たな患者発生を防止するために日本脳炎対策の確実な実施が求められる。

謝辞

媒介蚊捕集調査で捕集された蚊の分類・同定を実施していただいた長崎大学熱帯医学研究所 病害動物学分野の砂原俊彦先生、比嘉由紀子先生、二見恭子先生、現地蚊捕集に協力いただいた畜産農家および対馬保健所の関係各位に感謝する。

参考文献

- 1) Takayama J., Japanese encephalitis. World Health Organization. Home/News/Fact sheets/Detail, <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/japanese-encephalitis> (2018.7.27 アクセス)
- 2) 厚生労働省健康局結核感染症課、国立感染症研究所感染症疫学センター:平成 27 年度(2015 年度)感染症流行予測調査報告書, 118-131 (2015).
- 3) 吉川 亮、三浦 佳奈、松本 文昭、田栗 利紹:長崎県環境保健研究センター所報, **61**, 125-130 (2015).
- 4) Lei cao *et al*: Low Protective Efficacy of the Current Japanese Encephalitis Vaccine against the Emerging Genotype 5 Japanese Encephalitis Virus, *PLOS Neglected Tropical Diseases*, Published online 2016 May 3, doi: 10.1371/journal.pntd.0004686.
- 5) 比嘉ら:2017 年 長崎県における大陸型コガタアカイエカの生息調査, 第 53 回日本脳炎ウイルス生態学研究会発表抄録, (2018).
- 6) 沢辺ら:日本脳炎ウイルスの国内越冬と海外飛来, 化学療法の領域, **30**, 39-49 (2014).
- 7) 大迫ら:熊本県内の日本脳炎ウイルスの疫学調査について, 平成 26 年度熊本県保健環境科学研究センター所報, **44**, 21-27 (2014).

表 2 捕集蚊の分類・同定結果ならびに遺伝子検索およびウイルス分離結果

場所	分類結果	4月		5月		6月		7月		8月		9月		合計
		捕集数	調査結果 PCR 分離	捕集数	調査結果 PCR 分離	捕集数	調査結果 PCR 分離	捕集数	調査結果 PCR 分離	捕集数	調査結果 PCR 分離	捕集数	調査結果 PCR 分離	
地点1	コガタアカイエカ	18	-	1	-	28	-	22	-	11	-	54	-	134
	イエカ属(コガ タアカイエカ除	6	-	11	-	0	-	18	-	1	-	45	-	81
	ヤブカ属	23	-	154	-	906	-	621	-	263	-	3,758	-	5,725
	ハマダラカ属	3	-	10	-	16	-	19	-	1	-	21	-	70
	その他	0	-	0	-	0	-	276	-	0	-	185	-	461
地点2	コガタアカイエカ	0	-	44	-	115	-	21	-	12	-	3	-	195
	イエカ属(コガ タアカイエカ除	0	-	0	-	2	-	0	-	5	-	2	-	9
	ヤブカ属	0	-	13	-	8	-	7	-	12	-	171	-	211
	ハマダラカ属	0	-	0	-	9	-	14	-	2	-	0	-	25
	その他	0	-	2	-	5	-	0	-	5	-	1	-	13
地点3	コガタアカイエカ	0	-	30	-	225	-	24	-	22	-	0	-	301
	イエカ属(コガ タアカイエカ除	0	-	2	-	21	-	0	-	5	-	0	-	28
	ヤブカ属	0	-	15	-	14	-	3	-	48	-	10	-	90
	ハマダラカ属	0	-	0	-	0	-	1	-	7	-	0	-	8
	その他	0	-	0	-	4	-	1	-	0	-	0	-	5
地点4	コガタアカイエカ	5	-	29	-	4,330	-	92	-	1,103	-	3	-	5,562
	イエカ属(コガ タアカイエカ除	3	-	2	-	196	-	43	-	432	-	0	-	676
	ヤブカ属	18	-	21	-	36	-	64	-	68	-	4	-	211
	ハマダラカ属	2	-	0	-	65	-	219	-	171	-	0	-	457
	その他	0	-	3	-	0	-	5	-	3	-	1	-	12
合計	78		337		5,980		1,450		2,171		4,258		14,274	

地点 1: 牛舎近傍, 地点 2: 鶏舎近傍, 地点 3: 患者宅周辺, 地点 4: 牛舎・鶏舎近傍

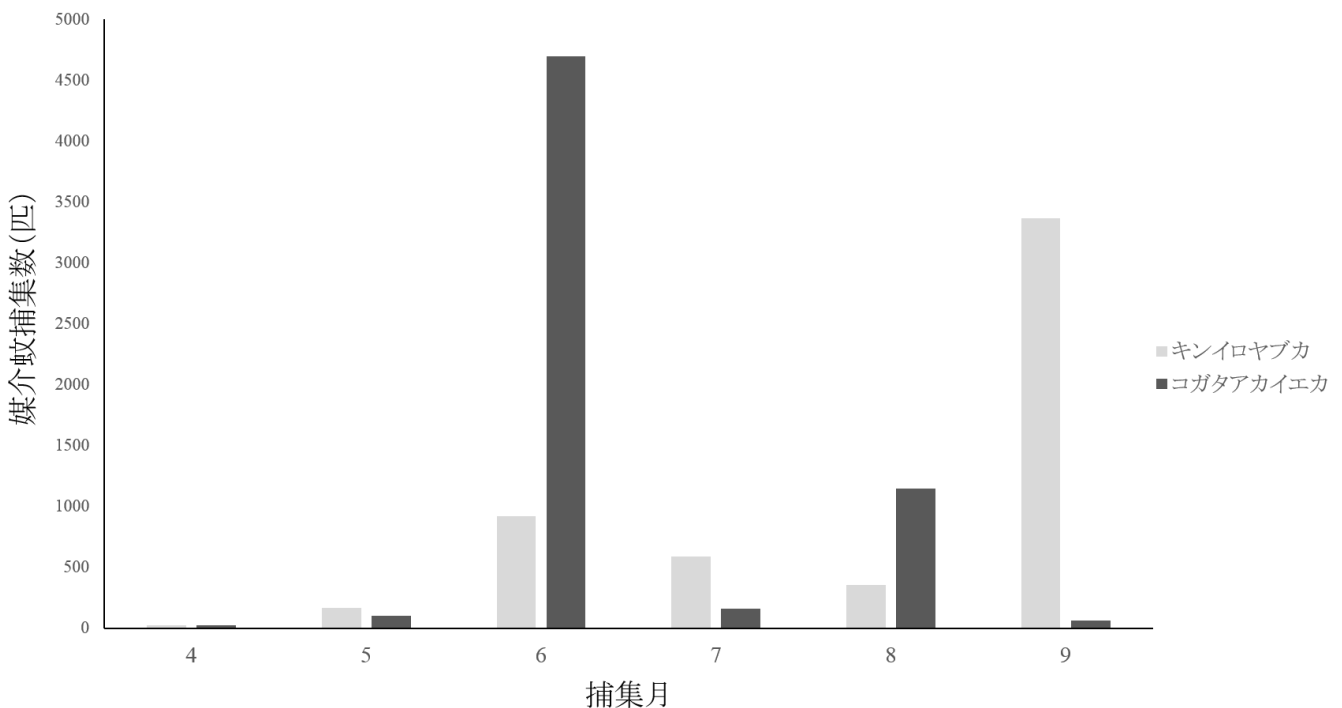


図 3 対馬市におけるコガタアカイエカの月別捕集数の推移