

## 長崎県における日本脳炎の疫学調査(2009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、山口 顕徳、平野 学、吾郷 昌信

## Epidemiological Study of Japanese Encephalitis in Nagasaki Prefecture (2009)

## — Surveillance of swine infected by Japanese Encephalitis Virus —

Akira YOSHIKAWA, Akinori YAMAGUCHI, Manabu HIRANO and Masanobu AGOH

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、ブタ感染、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、ウイルス増副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点が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、豚の感染源調査を毎年実施している。また、あわせて豚の血清から JEV 分離を実施したので、2009年度の概要について報告する。

## 調査方法

## 1. 感染源調査

## ①調査時期および回数

7月初旬~9月中旬の各旬1回ずつ計8回実施した

## ②調査客体および検体

調査客体は、諫早市内で飼育、出荷された生後約

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従い、JEV 赤血球凝集抑制(HI)抗体の測定および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 領域に設定したプライマーセットおよび 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)条件およびプライマーを図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381bp、2次増幅産物は326bp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、各ウェル維持培養液(2%非動化牛胎児血清加 Eagle MEM) 900 μlを加え、被検血清 100 μl 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。37℃、5%炭酸ガス下で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、142 bp の位置にバンドが確認されたものを陽性とした。

① 1 次増幅反応 (One step RT-PCR)

<プライマーセット> JE8K-S : 5' ATGGAACCCCTTC 3'  
 JEER : 5' AGCAGGCACATTGGTCGCTA 3'

<組成>

<反応条件>

<組成>		用量	<反応条件>		
			温度	時間	サイクル数
2× Reaction Mix		12.5 μl	53 °C	15 分 (RT)	1 サイクル
primer (JE8K-S: 25 μM)		0.2 μl	94 °C	2 分	1 サイクル
primer (JEER: 25 μM)		0.2 μl	94 °C	15 秒	40 サイクル
SSIII/Platinum Taq Mix		0.5 μl	53 °C	30 秒	
DW (DNase/RNase free)		10.1 μl	68 °C	1 分	
抽出 RNA		1.5 μl	68 °C	5 分	1 サイクル
total		25 μl	4 °C	∞ (保存)	1 サイクル

② 2 次増幅反応 (2nd PCR)

<プライマーセット> JE8K inner-S : 5' ATCGTGGTTGGGAGGGGAGA 3'  
 JEER inner-C : 5' AGCACACCTCCTGTGGCTAA 3'

<組成>

<反応条件>

<組成>		用量	<反応条件>		
			温度	時間	サイクル数
10× EX Taq Buffer		2.5 μl	94 °C	5 分	1
dNTP mixture (25 mM each)		2.0 μl	94 °C	10 秒	25
primer (JE8K inner-S: 25μM)		0.2 μl	53 °C	30 秒	
primer (JEER inner-C: 25μM)		0.2 μl	72 °C	1 分	
TaKaRa EX Taq Mix		0.125 μl	72 °C	5 分	1
DW (DNase/RNase free)		18.475 μl	4 °C	∞ (保存)	1
1 次増幅産物		1.5 μl			
total		25 μl			

図 1 JEV 遺伝子の検索

<プライマーセット> JE-NS3-1S : 5' AGAGCGGGGAAAAAGGTCAT 3'  
 JE-NS3-4R : 5' TTTCACGCTCTTCTACAGT 3'

<組成>

<反応条件>

<組成>		用量	<反応条件>		
			温度	時間	サイクル数
2× Reaction Mix		12.5 μl	50 °C	30 分 (RT)	1
primer (NS3-1S: 25 μM)		0.2 μl	94 °C	2 分	1
primer (NS3-4R: 25 μM)		0.2 μl	94 °C	15 秒	40
SSIII/Platinum Taq Mix		0.5 μl	53 °C	30 秒	
DW (DNase/RNase free)		10.1 μl	68 °C	1 分	
抽出 RNA		1.5 μl	68 °C	5 分	1
total		25 μl	4 °C	∞ (保存)	1

図2 JEV の確認

表1 2009年度豚HI抗体陽性率調査結果

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
7/1	10			7	3					100	0
7/14	10		7	1					2	100	50
7/28	10		1	3	1				5	100	67
8/4	10		1			1			8	100	89
8/11	10				1				9	100	40
8/25	10								10	100	10
9/1	10							1	9	100	0
9/8	10					1	1	4	4	100	60

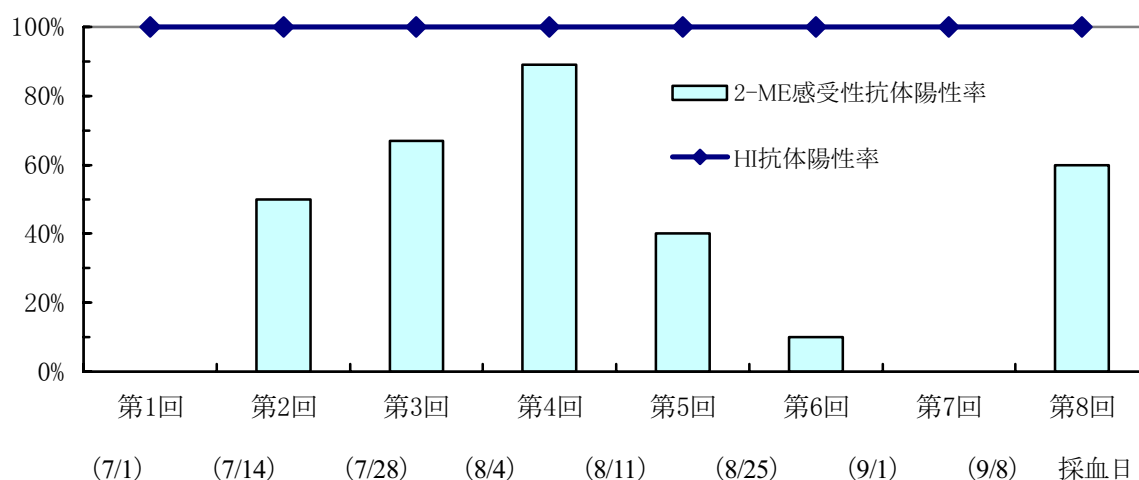


図3 HI 抗体価陽性率および 2-ME 感受性抗体陽性率の推移

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 抗体陽性率および 2-ME 感受性抗体陽性率の推移を図1に示した。

2009年度は7月1日に採血した豚10頭のうちすべて(陽性率100%)がHI抗体陽性となった。7月14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2頭のうち1頭(陽性率50%)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。

2. JEV 遺伝子検索および分離結果

前年度同様に 2009 年度も第 1 回調査(7 月 1 日)より既に HI 抗体価の上昇が 100%となったことから、豚血清中の JEV 遺伝子検索を行ったところ、2009 年 7 月 28 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 2 頭の血清からウイルス分離を実施したところ、ともに CPE が観察され、PCR で

も JEV の標準株 JaGAr #01 株と同様に NS3 領域 142 bp の産物が増幅されたことから、JEV の分離が確認された。

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<sup>2)</sup>ことから、2009 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。

まとめ

1. 2009 年度は 7 月 1 日に採血した 10 頭から HI 抗体が、7 月 14 日に採血した 1 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。

2. 2009年7月28日に採血した2頭の血清からJEV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ものの、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、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中央農業協同組合、佐世保食肉センター株式会社および佐世保市食肉衛生検査所長他関係職員各位に深謝します。

#### 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