

# 長崎県における日本脳炎の疫学調査(2007年度)

原 健志、吉川 亮、山口 顕徳、平野 学、吾郷 昌信

## Epidemic of Japanese Encephalitis in Nagasaki Prefecture (2007)

Kenshi HARA , Akira YOSHIKAWA, Akinori YAMAGUTI, 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、豚感染、HI抗体陽性率

### はじめに

日本脳炎ウイルスは、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)→蚊のサイクルを形成しており、ヒトは日本脳炎ウイルス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、筋強剛、けいれん等の脳症状が現れる。

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、毎年、豚の感染源調査を実施している。また、本年も昨年同様、豚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

##### ①調査時期及び回数

7月初旬~9月中旬の各旬1回ずつ計8回

##### ②調査客体及び検体

調査客体は、県央地区の生後5~6ヶ月の肥育豚80頭、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

#### ④採血場所

佐世保市食肉衛生検査所

#### 2. 日本脳炎ウイルスの分離

##### ①検査材料

HI抗体価の上昇がみられなかった豚血清20頭分

##### ②検査手順

豚血清

↓

3,000r.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PBS(-)で2回洗浄後、細胞培養液(2%FBS加Eagle's MEM)を1穴に900μlずつ分注。

↓

豚血清の上清100μlをプレート2穴に接種。

36℃、7日間炭酸ガス培養器で培養。

(1代目)

↓

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・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代目へ)

なお、CPEが確認された場合、RT-PCRによる確認を行う。

表1 平成19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		
7/10	10	10								0	0
7/17	10	10								0	0
7/24	10	3			1				6	70	71
8/7	10								10	100	30
8/28	10								10	100	10
9/4	10						1	7	2	100	0
9/11	10								10	100	0
9/18	10								10	100	0

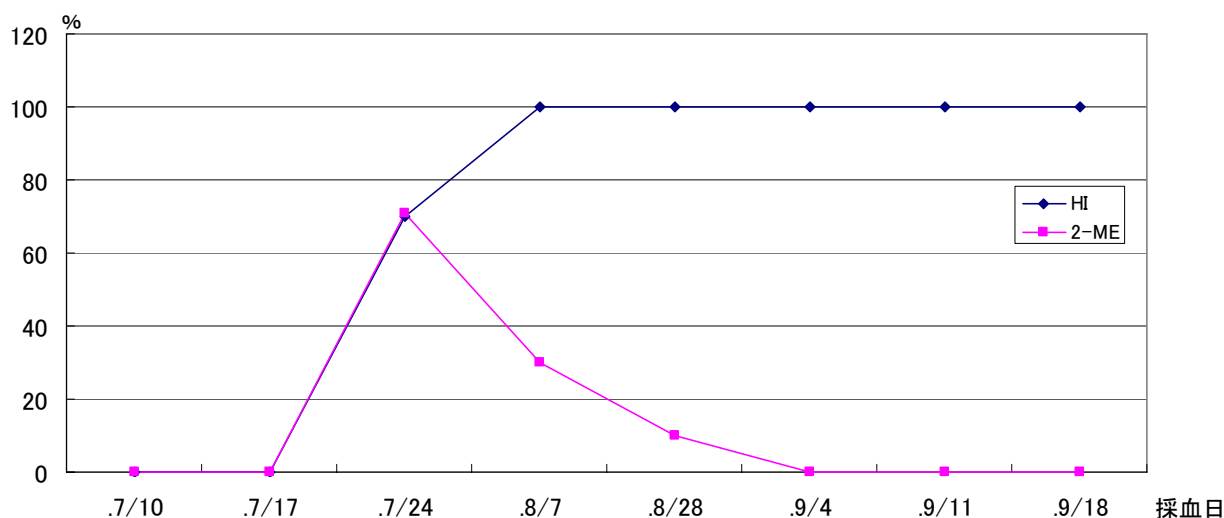


図1 HI抗体価陽性率及び2-ME感受性抗体陽性率の推移

3. 日本脳炎ウイルス遺伝子検査(RT-PCR法)

①RNAの抽出

RNA抽出キット(QIAamp Viral RNA Mini Kit: QIAGEN)でRNA抽出後、DNase処理及びcDNA作製は、ノロウイルスの検査法に準じた。

②使用Primer(5' to 3') Product: 142bp

JE-NS3-1S:

AGAGCGGGGAAAAAGGTCAT

JE-NS3-4R:

TTTCACGCTCTTTCTACAGT

③反応条件

92°C 2分

92°C 1分

53°C 1分

72°C 1分

72°C 5分

4°C ∞(保存)

35 サイクル

④電気泳動

PCR product 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、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抗体陽性率及び2-ME感受性抗体陽性率の推移を図1に示す。

7月24日に採血した豚10のうち7頭がHI抗体(IgM)陽性(陽性率70%)、そのうちHI抗体価40倍以上7頭のうち5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71%)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月初旬頃には活動を既に開始しており、9月初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。

## 2. 日本脳炎ウイルス分離及び遺伝子検査結果

HI 抗体価の上昇がみられなかった豚20頭の血清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1頭の血清からウイルスが分離された。

また、HI 抗体価の上昇がみられなかった豚20頭の血清及び分離されたウイルスについてRT-PCR法による遺伝子検査をおこなったところ、ウイルスが分離された同一のブタ血清から検出された遺伝子と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。

## まとめ

1. 7月24日に採血した豚7頭から豚HI抗体が、そのうちの5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71%)が最初に確認された。
2. HI 抗体測定に用いた豚20頭の血清からウイルス分離を行ったところ7月17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. 日本脳炎確認患者は、1965年以前と比べ激減しているが、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、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

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、佐世保市食肉センター株式会社及び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, 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