

長崎県における日本脳炎の疫学調査(2002年度)

中村 まき子・平野 学・原 健志・野口 英太郎・平山 文俊

Epidemic of Japanese Encephalitis in Nagasaki Prefecture(2002)

Makiko NAKAMURA, Manabu HIRANO, Kenshi HARA, Hidetaro NOGUTI
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する。カブタ(時にトリ)カのサイクルで、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、ウイルス増殖動物としてのブタの感染状況が、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、けれん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、ブタ飼育環境の変化の3点がその大きな役割を担っていると考えられる。¹⁾

本県では、厚生労働省の定めた感染症流行調査実施要領に基づいて、毎年ブタの感染源調査を実施している。今年度は、ブタの血液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

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

調査客体

生後5~6ヶ月で県産1地区のブタ160頭の血清

調査事項

感染症流行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

採血場所

諫早食肉衛生検査所

2. 日本脳炎ウイルスの分離

検査材料

HI抗体陰性(HI抗体価<10)の豚血清20頭
検査手順

豚血清

12,000 r.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細胞を滅菌したPBS(-)で2回洗浄後、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(ハベスト)して、3,000 r.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う。
(2代目)

表1 平成14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		
7/9	20	12					3	4	1	40	75
7/16	20	13	1	1	1			1	3	35	60
7/23	20	1	1		2	2	2	3	9	95	66.7
8/6	20							2	18	100	20
8/19	20					1		5	14	100	0
8/27	20							5	15	100	0
9/4	20							4	16	100	0
9/10	20							6	14	100	0

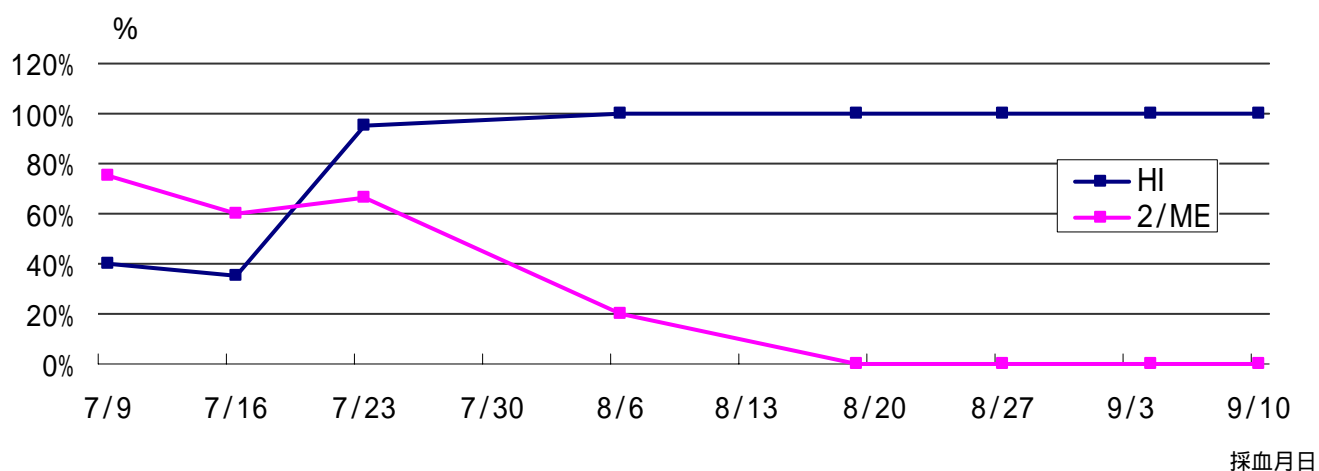


図1 HI抗体価陽性率及び2-ME感受性抗体陽性率の推移

3. RT-PCR 法による日本脳炎ウイルスの遺伝子検査

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。

Primer(5'to3') Product:142bp

JE-NS3-1S:

AGAGCGGGGAAAAAGGTCAT

JE-NS3-4R:

TTTCACGCTCTTTCTACAGT

反応条件

92・2分(熱変性)後、92・1分、53・1分、72・1分を35サイクル、72・5分、4で保存

RT-PCR産物は、3%アガロ-スゲルで電気泳動した後、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抗体価陽性率及び2-ME感受性抗体陽性率の推移を図1に示した。

7月9日に採血した20頭の豚のうち8頭がHI抗体陽性(陽性率40%)、そのうちの6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75%)が確認された。また、HI抗体陰性の豚血清について日本脳炎ウイルス分離を実施したところ、20頭のうち2頭から日本脳炎ウイルスが分離された。

ウイルス保有力が生後4~6ヶ月の免疫のないブタを吸血するとブタは感染し、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カ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2)。

今回の調査結果で、昨年に比べ³⁾1月程度早く日本脳炎ウイルスを保虫した有毒力が6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、ウイルスを媒介し感染を広めていったことが推察された。

M 1 2 3 4 M

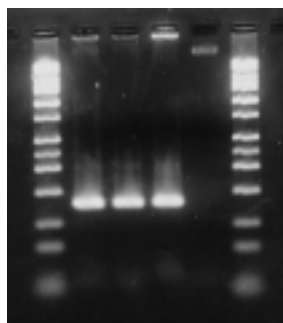


図2 (DNA fragments by RT-PCR)

M: マ - カ - (50 ~ 10,000 bp) レン: 1 ~ 2 : 豚血清から分離したウイルス 3 : JaGAr #01 株 (陽性対照) 4 : 蒸留水 (陰性対照)

2 . 日本脳炎ウイルス分離結果

HI 抗体価陰性の豚血清 20 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9日に採血した豚2頭から、日本脳炎ウイルスが分離された。

ウイルスの発育状態を示す CPE は、1 代目では認められなかったが、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どうかを確認するため 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

遺伝子検査については図2に示すとおり、2 頭の豚血清から分離し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 142 b p 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 倍と低かったが陽性反応を示したことから、2 頭の豚血清から分離されたウイルスは、日本脳炎ウイルスと判定した。

ま と め

1. 7月9日に採血した豚8頭から豚 HI 抗体が、そのうちの6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 75%) が最初に確認された。

2. 7月23日に採血した豚血清の抗体陽性率が、厚生労働省の定めた基準 (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 感受性抗体陽性豚が 1 頭でも検出された場合」と定める) に達した。
3. 豚 HI 抗体陰性の 20 頭の豚から、ウイルス分離を行ったところ、7月9日に採血した豚2頭から日本脳炎ウイルスが分離された。

謝辞：日本脳炎流行予測調査事業に御協力頂いた、日本フ - ドパッカ - 株式会社諫早工場長、全農諫早畜産駐在事務所長、諫早食肉衛生検査所長、他職員一同様に深謝致します。

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, 2002
- 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
- 3) 原 健志, 他: 長崎県衛生公害研究所報, 47, 88 ~ 90, 2001