

長崎県における日本脳炎の疫学調査(2012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、松本 文昭、北川 由美香、山口 顕徳、吾郷 昌信

Epidemiological Study of Japanese Encephalitis in Nagasaki Prefecture

in the year 2012

— Surveillance of swine infected by Japanese Encephalitis Virus —

Akira YOSHIKAWA, Fumiaki MATSUMOTO, Yumika KITAGAWA, Akinori YAMAGUCHI,
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(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。発症すると定型的な脳炎を呈し、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するとともに、昨年に引き続き、豚の血清から JEV 分離を実施したので、本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、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(JEV-JaGAR 01;978~2,477)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。

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。

4. JEV の確認

① 1 次増幅反応 (One step RT-PCR)

< primer set > JE8K-S : 5' ATGGAACCCCTTC 3' (JEV-JaGAr 01; 2,097-2,111)
 JEER : 5' AGCAGGCACATTGGTCGCTA 3' (JEV-JaGAr 01; 2,458-2,477)

< 組成 >

	volume	final conc.
2× Reaction Mix	12.5 μ l	
primer (JE8K-S: 25 μ M)	0.2 μ l	0.2 μ M
primer (JEER: 25 μ M)	0.2 μ l	0.2 μ M
SSIII/Platinum Taq Mix	0.5 μ l	
DW (DNase/RNase free)	10.1 μ l	
extract RNA	1.5 μ l	
total	25 μ l	

< 反応条件 >

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

	volume	final conc.
10× EX Taq Buffer	2.5 μ l	
dNTP mixture (25 mM each)	2.0 μ l	0.2 mM each
primer (JE8K inner-S: 25 μ M)	0.2 μ l	0.2 μ M
primer (JEER inner-C: 25 μ M)	0.2 μ l	0.2 μ M
TaKaRa EX Taq HS	0.125 μ l	0.025 U/ μ l
DW (DNase/RNase free)	18.475 μ l	
1 st PCR products	1.5 μ l	
total	25 μ l	

< 反応条件 >

temp.	time	cycles
94°C	5 min.	1
94°C	15 sec.	
53°C	30 sec.	25
72°C	1 min.	
72°C	5 min.	1
4°C	∞	1

図 1 JEV 遺伝子の検索

< primer set > JE-NS3-1S : 5' AGAGCGGGGAAAAAGGTCAT 3' (JEV-JaGAr 01; 5,739-5,758)
 JE-NS3-4R : 5' TTTCACGCTCTTCTACAGT 3' (JEV-JaGAr 01; 5,891-5,900)

< 組成 >

	volume	final conc.
2× Reaction Mix	12.5 μ l	
primer (NS3-1S: 25 μ M)	0.2 μ l	0.2 μ M
primer (NS3-4R: 25 μ M)	0.2 μ l	0.2 μ M
SSIII/Platinum Taq Mix	0.5 μ l	
DW (DNase/RNase free)	10.1 μ l	
extract RNA	1.5 μ l	
total	25 μ l	

< 反応条件 >

temp.	time	cycles
50°C	30 min.	1
94°C	2 min.	
94°C	15 sec.	40
53°C	30 sec.	
68°C	1 min.	
68°C	5 min.	
4°C	∞	1

図 2 JEV の PCR による確認

表1 2012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		
7/3	10		2	7	1					100	0
7/10	10		8	2						100	-
7/24	10		5	5						100	-
8/7	10		10							100	-
8/13	10			8		1		1		100	100
8/21	10		2	1					7	100	86
9/4	10		1					3	6	100	22
9/11	10							1	9	100	20

陽性率

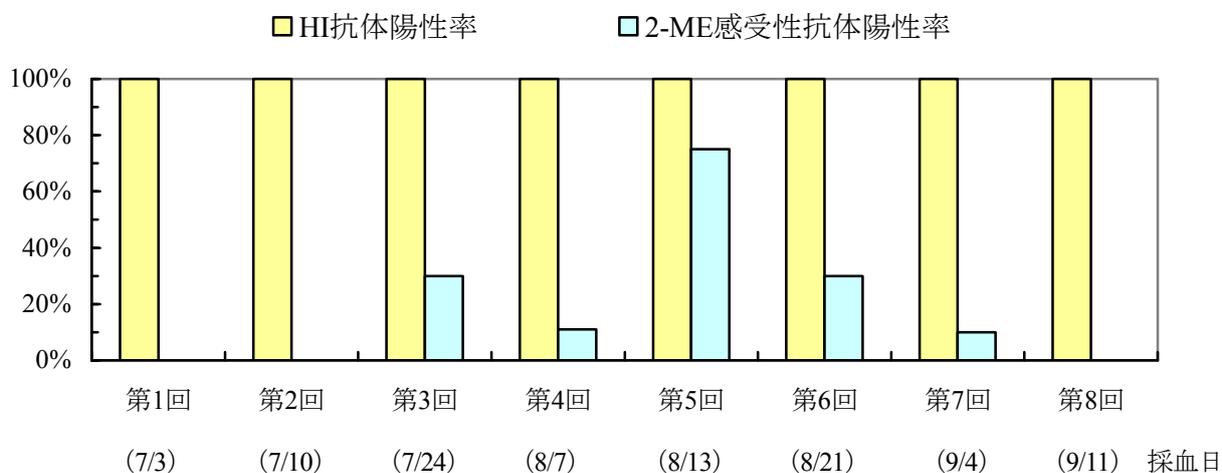


図5 HI 抗体価陽性率および 2-ME 感受性抗体陽性率の推移

調査結果および考察

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5に示す。

2012年度は7月3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%)。8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2頭のうち2頭(陽性率100%)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

豚血清中の JEV 遺伝子検索を行ったところ、2012年8月7日に採血した2頭、8月13日に採血した3頭および8月21日に採血した4頭の血清から JEV 遺伝子が確認された。さらに、これら9頭の血清からウイルス分離を実施したところ、8月7日に採血した1

頭、8月13日に採血した2頭および8月21日に採血した2頭の血清を接種した 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。

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、2012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. 2012年度は7月3日に採血した10頭からHI抗体が、8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。
2. 8月7日に採血した1頭、8月13日に採血した2頭および8月21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、ウイルス分離もできたことから、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および佐世保市食肉衛生検査所の関係各位、並びにIgM capture ELISA for JEを提供していただいた国立感染症研究所高崎智彦博士に感謝します。

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) Tanaka M: Rapid identification of flavivirus using the polymerase chain reaction. J Virol Methods, 41(3), 311-322 (1993)
- 3) 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・感染症マニュアル,1999