

長崎県における日本脳炎の疫学調査(2013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、吾郷 昌信

Epidemiological Study of Japanese Encephalitis in Nagasaki Prefecture in the year 2013

— Surveillance of swine infected by Japanese Encephalitis Virus —

Akira YOSHIKAWA, Fumiaki MATSUMOTO 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℃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、本年度より日本脳炎の発生予防とまん延防止を図ることを目的とした「感染症流行予測調査事業(日本脳炎感染源調査)における注意喚起等実施要領(別紙)」に基づき、豚血清からのJEV遺伝子の検出ならびに豚血清中の抗JEV-IgM抗体の測定を行ったので、本年度の概要について報告する。

また、2年ぶりに県内での患者発生報告があり、当センターにおいて確認検査を行ったので、併せて報告する。

調査方法

1. 感染源調査

調査時期および回数

7月初旬~9月中旬に計8回実施した

調査対象および検体

調査対象は、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、検体は調査対象の血清とした。

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 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(JEV-JaGAR 01;2,097~2,477)、2次増幅産物は326bp(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。

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。

5. 抗 JEV-IgM 抗体測定

HI 抗体測定を行った同一客体の血清を用いて抗 JEV-IgM capture ELISA により豚血清中の抗 JEV-IgM 抗体を測定した。ELISA の条件等は表 2 に示す。抗 JEV-IgM 抗体陽性は、P/N ratio 2.00 (陰性対照血清の吸光度測定値に対して豚血清の吸光度測定値が 2 倍以上)とした。

1 次増幅反応 (One step RT-PCR)

< primer set > JE8K-S : 5' ATGGAACCCCCCTTC 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
SS /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 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' TTTCACGCTCTTTCTACAGT 3' (JEV-JaGAr 01 ; 5,891-5,900)

< 組成 >

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

< 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.	1
4°C	∞	1

図2 JEV の PCR による確認

< anti JEV-IgM capture ELISA >

- 1) Dilute positive control sera, negative control sera and samples to 1:100 in PBS-T (PBS with tween 20) with 10% Block Ace (DS Pharma Biomedical).
- 2) Dilute anti Pig-IgM (BETHYL) to 1:100 in Carbonate-Bicarbonate Buffer (SIGMA).
- 3) Add 100 µl of diluted anti Pig-IgM to each well.
- 4) **Incubate overnight at 4°C.**
- 5) Wash wells 3 times with PBS-T.
- 6) Add 100 µl of Block Ace to each well.
- 7) Incubate at 37°C for 1 hr.
- 8) Wash wells 3 times with PBS-T.
- 9) Add 100 µl of diluted positive control sera, negative control sera and samples to each well.
- 10) Incubate at 37°C for 1 hr.
- 11) Wash wells 3 times with PBS-T.
- 12) Add 100 µl of JEV (JaGAr 01 strain) inactivated antigen to each well.
- 13) Incubate at 37°C for 1 hr.
- 14) Wash wells 3 times with PBS-T.
- 15) Add 100 µl of 6B6C-1 MAb (HRPO-conjugated anti-flavivirus IgG) to each well.
- 16) Incubate at 37°C for 1 hr.
- 17) Wash wells 3 times with PBS-T.
- 18) Add 100 µl of OPD (SIGMA) in Phosphate-Citrate Buffer (SIGMA)
- 19) Incubate at RT (room temperature) for 20 min under dark condition.
- 20) Add 100 µl of stop solution (1N H₂SO₄) to each well
- 21) Read OD 425nm and calculate **Positive/Negative (P/N) Ratio.**

$$P/N \text{ Ratio} = (\text{OD}_{425} \text{ of sample serum}) / (\text{OD}_{425} \text{ of negative control sera})$$
P/ N Ratio 2.00 is determined to positive

図3 抗 JEV-IgM 抗体測定条件

6. 日本脳炎患者確認試験

患者情報

諫早市在住 83 歳女性、近医を受診後、別の市内医療機関を紹介され入院。2013 年 9 月 7 日に発症、脳炎疑い(症状: 発熱、けいれん、意識障

害、血尿、蛋白尿)で種々の検査(9 月 10 日、日本脳炎 HI 抗体価 20 倍等)を実施するも原因が特定されなかったため、9 月 18 日に日本脳炎の検査依頼が行われた。転帰 9 月 20 日死亡。
 検体

2013年9月11日に採取された患者血清
検査項目

抗 JEV-IgM 抗体および JEV 遺伝子検査
抗 JEV-IgM 抗体は、国立感染症研究所ウイルス
第一部第二室高崎智彦博士より供与された IgM
capture ELISA for JE (Focus 変法 NIID) を用いて

測定し、P/N ratio 2.00(陰性対照血清の吸光度
測定値に対して患者血清の吸光度測定値が2倍
以上)を抗 JEV-IgM 抗体陽性とした。また、JEV
遺伝子検査は豚の JEV 遺伝子検索と同様の方法
で行った。

表1 2013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
7/2	10		6	4					100	-	
7/16	10		2	7			1		100	0	
7/23	10		8	1	1				100	0	
8/6	10							3	7	100	40
8/19	10						1	2	7	100	0
8/27	10						3	2	5	100	0
9/3	10						1	5	4	100	0
9/10	10				1		5	2	2	100	0

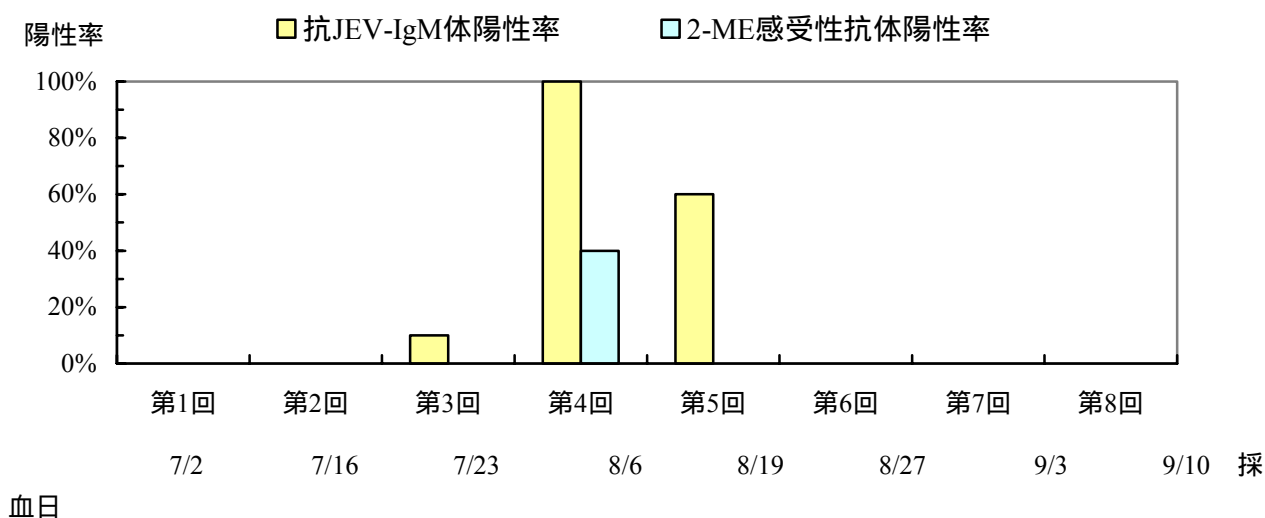


図4 豚の抗 JEV-IgM 抗体および 2-ME 感受性抗体陽性率の推移

調査結果 および 考察

1. 感染源調査結果

豚 HI 抗体および 2-ME 感受性抗体の検査結果を
表 1 に示す。

2013 年度は、7 月 2 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 6 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 10 頭のうち 4 頭(陽性率 40%)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、2013
年 7 月 23 日に採血した 1 頭の血清から JEV 遺伝子
が確認された。さらに、この血清を用いてウイルス分

離を実施したところ、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³⁾ことから、2013 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。

3. 抗 JEV-IgM 抗体測定結果

IgM capture ELISA による抗 JEV-IgM 抗体の測定結果を図 4 に示す。2013 年 7 月 23 日に採血した 1 頭から初感染の指標である抗 JEV-IgM 抗体陽性の個体を確認した。また、第 3 回から第 5 回(7 月 23 日、8 月 6 日および 8 月 19 日)調査において、2-ME 感受性抗体陽性率に比べ抗 JEV-IgM 抗体陽性率が高い結果が得られたことから、その地域における初感染を把握するうえでは、既存の HI 検査よりも IgM capture ELISA による IgM 抗体検出がより有用であることが明らかとなった。

5. 日本脳炎患者確認試験結果

確認検査を IgM capture ELISA for JE (Focus 変法 NIID) による抗 JEV-IgM 抗体測定および遺伝子検査により実施した。

患者血清から JEV 遺伝子は検出されなかったものの抗 JEV-IgM 抗体が検出され、被験患者は JEV に感染していることが確認された。

ま と め

1. 2013 年度は 7 月 2 日に採血した 10 頭から HI 抗体が、8 月 6 日に採血した 4 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. 7 月 23 日に採血した 1 頭の血清から JEV が分離された。
3. 7 月 23 日に採血した豚血清から PCR による JEV 遺伝子および抗 JEV-IgM 抗体陽性個体が各々 1 頭確認されたため、表 1 の要領に基づき医療政策課から県民に向けた注意喚気が行われた。
4. 県内の患者発生報告は 2011 年に続き 2 年ぶりとなったが、死亡事例としては 1997 年以来 16 年ぶりの報告となった。また、患者発生地域は 2010 年および 2011 年にも各 1 名の患者発生報告があった。
5. 確認試験を IgM capture ELISA for JE (Focus 変法 NIID) および RT-PCR により行った。患者血清から抗 JEV-IgM 抗体を検出した。
6. 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、2010 年度 1 名、2011 年度 2 名の患者報告に続き、本年度は 1 名の患者発生が確認された。さらに豚では依然 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、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) 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

(別紙) 感染症流行予測調査事業(日本脳炎感染源調査)における注意喚起等実施要領

第1 目的

国が実施する感染症流行予測調査において、長崎県が受託して実施している日本脳炎感染源調査(ブタ感受性調査)の結果を適切に公表し、県民へ周知することで、日本脳炎の発生予防とまん延防止を図る。

第2 注意喚起の実施

注意喚起は、日本脳炎感染源調査において次に掲げる項目のいずれかを満たした場合、速やかに実施する。

- 1) 調査客体(ブタ)のHI 抗体保有率が50%を超え、かつ2-ME感受性抗体を検出
- 2) PCR によるブタ血清からの日本脳炎ウイルス遺伝子の確認
- 3) IgM 捕捉ELISA による陽性個体(ブタ)の確認

第3 実施方法

1. 環境保健研究センターは検査結果が判明し次第、医療政策課へ検査結果及び基準を満たした旨を報告する。
2. 報告を受けた医療政策課は、保健所、一般社団法人長崎県医師会及び報道機関等に対して情報提供を行う。
3. 環境保健研究センターは感染症発生動向調査速報において、関係機関等への注意喚起に努める。
4. 情報提供を受けた保健所は、必要に応じて地域住民、関係機関等へ周知する。

附則 この要領は平成25年7月30日から施行する。