

対馬における日本脳炎患者発生に伴う疫学調査

— 媒介蚊およびイノシシの日本脳炎ウイルス感染状況調査 —

吉川 亮、山下 綾香、三浦 佳奈、松本 文昭、田栗 利紹

2016年8月から9月にかけて対馬で日本脳炎患者が4名続発する事例が発生した。その原因究明のため媒介蚊およびウイルス増幅動物と考えられるイノシシについて調査を行ったが、媒介蚊およびイノシシのサンプルから日本脳炎ウイルスを検出することができず、有用な証拠は得られなかった。しかしながら、患者発生防止の観点から、次年度以降も原因究明に向けた調査を継続する必要がある。

キーワード：日本脳炎、アルボウイルス、コガタアカイエカ、イノシシ、対馬

はじめに

日本脳炎は日本脳炎ウイルス(以下、JEV)の感染により引き起こされる急性ウイルス性脳炎である。感染した場合、多くは不顕性感染となるが、発症すると1~2日で高熱(40°C以上)、頭痛、嘔吐、頸部硬直などの髄膜炎症状が現れ、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。発症時の死亡率は20~40%とされ、回復しても重篤な後遺症を残すことが多い公衆衛生上留意すべき疾患である¹⁾。

また、本疾患は主にコガタアカイエカが媒介するアルボウイルス感染症としても知られており、「蚊→豚(時に野鳥)→蚊」の感染サイクルを形成している²⁾。豚は主なJEVのウイルス増幅動物とされ、豚の感染状況により各地域のJEV侵淫状況を探知できると考えられている³⁾。

1990年代以降、本邦での日本脳炎患者報告数は、10名以下で推移しており、本県でも2001年から2009

年までの9年間患者報告がない時期が続いた。しかしながら本県では2010年に1名、2011年に2名と患者報告が続き、2013年には1997年以来16年ぶりに死亡例1名が報告された。

このようななか患者報告こそ少数であるが重篤な事例の多い日本脳炎において、2016年8月中旬から9月中旬にかけて対馬市内で4名の日本脳炎患者(表1)が続発するという稀有な事例が発生した。

今回、対馬市にはウイルス増幅動物となる豚が飼育されておらず、1991年以降患者発生報告もなく、さらには対馬市における媒介蚊に関する継続的な調査データもなかったことから、日本脳炎患者続発事例の原因究明を目的に媒介蚊および新たな増幅動物として可能性のあるイノシシについてJEVの感染状況、特にJEVのウイルス分離を主とした調査を行ったので、その概要を報告する。

表1 日本脳炎患者情報

	患者1	患者2	患者3	患者4
発症日	2016.8.31	2016.8.20	2016.8.31	2016.9.15
発生場所	対馬市	対馬市	対馬市	対馬市
年齢	80歳代	70歳代	80歳代	70歳代
性別	男性	男性	女性	男性
症状	発熱、髄膜炎、脳神経麻痺、運動失調	発熱、髄膜炎、意識障害、脳炎、脳症	発熱、頭痛、嘔吐、髄膜炎、意識障害、脳症	発熱、頭痛、髄膜炎、意識障害、脳炎、運動失調
検査日(国立感染症研究所確認検査日)および検査結果	2016.9.23 (2016.9.29) RT-PCR(-) IgM抗体(+)	2016.2.23 (2016.9.29) RT-PCR(-) IgM抗体(+)	2016.2.23 (2016.9.29) RT-PCR(-) IgM抗体(+)	2016.2.23 (2016.9.29) RT-PCR(-) IgM抗体(+)
予後	入院治療中	死亡	入院治療中	入院治療中

調査方法

1 媒介蚊調査

(1) 調査時期および場所

2016年10月6日夕方～7日朝にかけて対馬市内患者宅周辺4箇所および牛舎・鶏舎3箇所、2016年10月7日夕方～8日朝にかけて患者宅周辺1箇所および牛舎・鶏舎2箇所の計2日間、のべ10箇所を実施した。

(2) 調査対象およびトラップ設置

調査対象はUVライトトラップおよびドライアイスCDCトラップにて捕集された蚊とした。

トラップ設置は長崎大学熱帯医学研究所病害動物学分野の蚊の専門家の意見を参考に、患者宅周辺では対馬保健所(対馬振興局保健部)、牛舎・鶏舎では対馬家畜保健衛生所(対馬振興局家畜衛生課)、それぞれ立会いのもと行った。

牛舎・鶏舎への設置は、あらかじめ対馬家畜保健衛生所にて家畜防疫に関する講習を受け、現地(牛舎・鶏舎)では対馬家畜保健衛生所の指示に従って行った。

設置したトラップは翌朝速やかに回収し、トラップ中の捕集蚊は分類・同定を行うまでドライアイス下で保存した。

(3) 調査事項および分類・同定

分類・同定した蚊を調査日、調査場所、蚊の種類および雌雄ごとに集計し、各調査場所の媒介蚊捕集状況を把握するとともに、捕集したすべての蚊について JEV 遺伝子検索およびウイルス分

離を行った。

捕集された蚊の分類・同定は長崎大学熱帯医学研究所病害動物学分野助教の砂原俊彦先生、比嘉由紀子先生および二見恭子先生の3名により行われた。分類・同定後の捕集蚊はホモジネイト作製までドライアイス下もしくは凍結(-80°C)状態で保存された。

捕集された媒介蚊は最大20匹を1プールとして調査日、調査場所、蚊の種類および雌雄ごとにプール作製を行った。

捕集媒介蚊のホモジネイトの作製方法は図1に示す。

2 イノシシ調査

(1) 調査時期および場所

2016年10月～11月に対馬市で行なった。

(2) 調査対象および検体

調査対象は対馬市内で捕獲されたイノシシ19頭とした。検体はイノシシ解体処理時に採取された血液を対馬保健所にて遠心分離してえられた血清とした。

採取されたイノシシ血清は当センター送付まで対馬保健所で凍結(-30°C)保存された。

(3) 調査事項

捕獲されたイノシシについてJEVに対する血中抗体(抗JEV-IgMおよび抗JEV-IgG)価測定、JEV遺伝子検索およびウイルス分離を行った。

< 捕集蚊のビーズ式破碎法 >

- 1) 2 mL スクリューキャップチューブにビーズ(Garnet Matrix および 1/4" Ceramic Sphere)を適量入れる
- 2) 2 mL ビーズ入り破碎チューブに MEM / 2HI-FBS を 1.0 mL 分注する
- 3) 2 mL ビーズ入り破碎チューブに調査日・地点、蚊の種類ごとに捕集した蚊を最大 20 匹ずつ入れる
- 4) 最大 20 匹/1pool として捕集蚊のプールを作製する
- 5) ビーズ式破碎機にかけ、蚊を破碎(5,000 rpm、20 sec)
- 6) 破碎後、速やかに 2 mL ビーズ入り破碎チューブを冷却遠心(12,000 rpm、3 min、4°C)
- 7) 遠心中に保存用 2 mL スクリューキャップチューブに MEM / 2HI-FBS を 0.5 mL 分注しておく
- 8) フィルター(0.45 μm)をつけた注射筒に滅菌スポイトで遠心上清をすべて移す
- 9) 上清をフィルター濾過し、保存用 2 ml スクリューキャップチューブに移し、転倒混和
- 10) RNA 抽出に 140 μL、ウイルス分離に 200 μL 使用し、残りは凍結保存(-80°C)

※ 作業は可能な限りドライアイス上もしくは氷冷中で行う

図1 媒介蚊のホモジネイト作製方法

3 JEV 遺伝子検索

捕集された媒介蚊 245 プール(調査日、調査場所、蚊の種類および雌雄別に最大 20 匹を 1 プールとして作製)のホモジネイトおよび採取されたイノシシ 19 頭の血清より QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出し、既報⁴⁾に基づき遺伝子検索を実施した。

4 JEV の分離

捕集された媒介蚊 246 プールのホモジネイトおよび捕獲されたイノシシ 19 頭の血清について、Vero 9013 細胞に接種して JEV の分離を既報⁴⁾に基づき行った。

ウイルス分離の確認は上記検体を接種した感染細胞の培養上清から RNA を抽出し、既報⁴⁾に基づき PCR により JEV 遺伝子を確認した。

5 JEV に対する抗体価測定

(1) 抗 JEV-IgM 抗体価

捕獲されたイノシシ 19 頭の血清を用いて抗 JEV-IgM capture ELISA によりイノシシ血清中の抗 JEV-IgM 抗体を測定した。ELISA の条件および抗 JEV-IgM 抗体陽性の判定基準等は既報⁴⁾に準じた。

(2) 抗 JEV-IgG 抗体価

捕獲されたイノシシ 19 頭の血清を用いて抗 JEV-IgG indirect ELISA によりイノシシ血清中の抗

JEV-IgG 抗体を測定した。ELISA の条件等は図 2 に示す。

抗 JEV-IgG 抗体陽性は、陰性コントロール血清の抗体価を 100 倍とし、サンプルの抗体価が 300 倍以上を示した場合、陽性とした。抗体価は陽性コントロールの 2 倍段階希釈(100 倍から 102,400 倍まで)により検量線を作成し、サンプル抗体価を算出した。

調査結果及び考察

1 捕集媒介蚊調査結果

2016 年 10 月 6 日夕方～7 日朝にかけて患者宅周辺 4 箇所および牛舎・鶏舎 3 箇所、2016 年 10 月 7 日夕方～8 日朝にかけて患者宅周辺 1 箇所および牛舎・鶏舎 2 箇所の計 2 日間、のべ 10 箇所で実施した媒介蚊の捕集結果を表 2 に示す。

コガタアカイエカは、2016 年 10 月 6 日夕方～7 日朝にかけて患者宅周辺 4 箇所および牛舎・鶏舎 3 箇所、2016 年 10 月 7 日夕方～8 日朝にかけて患者宅周辺 1 箇所および牛舎・鶏舎 2 箇所で 2,546 匹捕集された蚊のうち 53 匹の合計 4,155 匹中 152 匹であった。

捕集時期が 10 月であり、コガタアカイエカ発生のピークから外れているためコガタアカイエカの捕集数が少なかったと考えられた。

< anti JEV-IgG indirect ELISA >

- 1) Dilute JEV inactivated antigen to 1:10 in coating buffer.
- 2) Add 100 μ L of diluted JEV inactivated antigen to each well.
- 3) Incubate overnight at 4°C
- 4) Wash wells 3 times with PBS- T
- 5) Add 100 μ L of Blackace to each well.
- 6) Incubate at 37°C for 2 hrs.
- 7) Wash wells 3 times with PBS-T
- 8) Dilute positive control sera, negative control sera and samples to 1:100 in PBS-T-10% Blockace
- 9) Add 100 μ L of diluted sera to each well.
- 10) Incubate at 37°C for 1 hr.
- 11) Wash wells 3 times with PBS-T
- 12) Add 100 μ L of detecting antibody (Anti-IgG(H+L), Swine, Goat-Poly, HRP) to each well
- 13) Incubate at 37°C for 1 hr.
- 14) Wash wells 3 times with PBS-T
- 15) Add 100 μ L of substrate (OPD) to each well
- 16) Incubate at RT for 20 min under dark condition.
- 17) Add 100 μ L of stop solution (1N H₂SO₄) to each well
- 18) Read OD 450 nm and calculate.

サンプルの抗 JEV-IgG 抗体価は陽性コントロールの希釈系列より得られる検量線より陰性コントロールの抗体価を 100 倍として算出する
算出されたサンプルの抗 JEV-IgG 抗体価が 300 倍以上となった場合を陽性とした

図 2 抗 JEV-IgG 抗体測定条件

2 捕集媒介蚊の JEV 遺伝子検索及び分離結果

捕集媒介蚊 246 プール中の JEV 遺伝子検索およびウイルス分離を実施したところ、JEV 遺伝子検出およびウイルス分離はできなかった。

コガタアカイエカ以外からの媒介も想定し、すべての捕集蚊を調査したが、今回の調査では JEV 遺伝子検出およびウイルス分離ができず、対馬で侵淫している JEV について把握することができなかった。

今後は媒介蚊調査を継続し、患者発生の要因である媒介蚊の発生消長を把握するとともに対馬において侵淫している JEV を探知し、ウイルス性状を解析していく必要がある。

3 捕獲イノシシの JEV 遺伝子検索及び分離結果

捕獲イノシシ 19 頭の血清中の JEV 遺伝子検索

およびウイルス分離を実施したところ、JEV 遺伝子検出およびウイルス分離はできなかった。

本県では 2007 年から 2016 年までに約 500 頭の捕獲イノシシを調査してきたが、これまで JEV 遺伝子を確認できた個体はいなかった。その理由としては約 60%のイノシシが JEV に既感染であり抗体を保有していたことや捕獲時期が冬季(11 月～翌年 3 月)中心で蚊の活動と外れていることなどが考えられる。しかしながら、2008 年 12 月に兵庫県で捕獲されたイノシシから JEV が分離された事例などが報告されており、特に豚の飼育がない対馬においては今後も JEV の媒介動物として調査を継続する必要がある。

また、イノシシ以外にも JEV の増幅動物として知られる野鳥の調査についても今後検討を要する。

表 2 捕集蚊の分類・同定結果ならびに遺伝子検索およびウイルス分離結果

調査場所	同定・分類結果	10月6日夜～7日朝				10月7日夜～8日朝			
		捕集数	作製 プール数	調査結果		捕集数	作製 プール数	調査結果	
				PCR	分離			PCR	分離
家1	シロハシイエカ	1	1	-	-	0	-	-	-
	キンイロヤブカ	1	1	-	-	2	1	-	-
	カラツイエカ	0	-	-	-	1	1	-	-
	ハマダラナガスネカ	0	-	-	-	1	1	-	-
	ハマダラカ属(同定不能)	0	-	-	-	2	1	-	-
家2	オオクロヤブカ	4	1	-	-	実施せず			
	リバースシマカ	2	1	-	-	実施せず			
家3	コガタアカイエカ	1	1	-	-	実施せず			
	オオクロヤブカ	1	1	-	-	実施せず			
家4	コガタアカイエカ	2	1	-	-	実施せず			
農1	コガタアカイエカ	2	1	-	-	実施せず			
	オオクロヤブカ	2	1	-	-	実施せず			
農2	コガタアカイエカ	0	-	-	-	1	1	-	-
	オオクロヤブカ	2	1	-	-	3	2	-	-
	イエカ属(同定不能)	4	1	-	-	0	-	-	-
	蚊(同定不能)	4	2	-	-	0	-	-	-
	キンイロヤブカ	0	-	-	-	10	2	-	-
	ハマダラカ属(同定不能)	0	-	-	-	1	1	-	-
	シマカ(同定不能)	0	-	-	-	4	2	-	-
	合計	1,609	100			2,546	146		
農3	コガタアカイエカ	94	7	-	-	52	3	-	-
	キンイロヤブカ	1,462	74	-	-	2,429	123	-	-
	シナハマダラカ	2	1	-	-	0	-	-	-
	ハマダラカ属(同定不能)	19	2	-	-	16	3	-	-
	シマカ(同定不能)	2	1	-	-	0	-	-	-
	ヤブカ族(同定不能)	3	1	-	-	8	2	-	-
	オオクロヤブカ	1	1	-	-	0	-	-	-
	チョウセンハマダラカ	0	-	-	-	1	1	-	-
	ミナミハマダライエカ種群	0	-	-	-	1	1	-	-
	蚊(同定不能)	0	-	-	-	14	1	-	-

※(PCR)-:JEV 遺伝子検出せず、(分離)-:ウイルス分離せず

4 抗 JEV-IgM 抗体測定結果

捕獲イノシシの抗 JEV-IgM 抗体の有無を表 3 に示す。初感染の指標である抗 JEV-IgM 抗体陽性の個体は確認できなかったことから捕獲直近の 10 月～11 月ではイノシシ～蚊の感染サイクルは確認されなかった。

5 抗 JEV-IgG 抗体測定結果

捕獲イノシシの抗 JEV-IgM 抗体の有無を表 3 に示す。感染歴の指標となる抗 JEV-IgG 抗体陽性の個体は 19 頭中 6 頭 (31.6%) であった。

以前の調査では県内で捕獲されたイノシシ約 300 頭のうち約 60% の個体が抗 JEV-IgM 抗体要請であり、対馬で捕獲されたイノシシでも 13 頭中 9 頭 (69.2%) の個体が陽性であったことに比べると、今回の事例においてイノシシが積極的に関与したとは言いがたかった。

しかしながら今回調査した個体は比較的若年が多く含まれていることから感染率が低い結果となったことも考えられ、今後も引き続き調査が必要である。

ま と め

- 2016 年 10 月 6 日～8 日の 2 日間で患者宅周辺および牛舎・鶏舎で実施した媒介蚊調査で合計 4,155 匹を捕集した。そのうちコガタアカイエカ 152 匹であった。
- 媒介蚊調査で捕集された蚊から JEV 遺伝子は検出されず、ウイルス分離もできなかった。
- 2016 年 10 月～11 月の間に対馬市内で捕獲されたイノシシから JEV 遺伝子は検出されず、ウイルス分離もできなかった。
- 初感染の指標である抗 JEV-IgM 抗体陽性のイノシシは確認できず、感染歴の指標となる抗 JEV-IgG 抗体陽性のイノシシは 19 頭中 6 頭 (31.6%) であったイノシシの抗体調査から、今回の日本脳炎続発事例に積極的に関与した証拠は得られなかった。
- 県内の患者発生報告は 2010 年に 1 名、2011 年に 2 名、2013 年の 1 名 (死亡例) に続き 3 年ぶりとなった。ただし、対馬市での患者発生は 1960 年代以来であり、4 名の患者が続発したことは近年非常に珍しく、感染経路、感染源等の原因究明が求められた。

表 3 捕獲イノシシの JEV 遺伝子検索、ウイルス分離および抗体価測定結果

番号	採取日	年齢	性別	体重	検査項目			
					PCR	分離	IgM 抗体	IgG 抗体価
1	2016.10.14	2 才ぐらい	♀	36 kg	検出せず	分離せず	陰性	<100
2	2016.10.17	2 才ぐらい	♂	28 kg	検出せず	分離せず	陰性	<100
3	2016.10.18	2 才ぐらい	♀	20 kg	検出せず	分離せず	陰性	<100
4	2016.10.18	2 才ぐらい	♂	22 kg	検出せず	分離せず	陰性	<100
5	2016.10.19	2 才ぐらい	♀	30 kg	検出せず	分離せず	陰性	<100
6	2016.10.25	2 才ぐらい	♀	18 kg	検出せず	分離せず	陰性	<100
7	2016.10.25	2 才ぐらい	♂	39 kg	検出せず	分離せず	陰性	<100
8	2016.10.26	2 才ぐらい	♀	20 kg	検出せず	分離せず	陰性	陽性
9	2016.11.1	2 才ぐらい	♀	29 kg	検出せず	分離せず	陰性	<100
10	2016.11.1	2 才ぐらい	♂	36 kg	検出せず	分離せず	陰性	陽性
11	2016.11.2	2 才ぐらい	♂	19 kg	検出せず	分離せず	陰性	陽性
12	2016.11.2	2 才ぐらい	♀	36 kg	検出せず	分離せず	陰性	<100
13	2016.11.4	2 才ぐらい	♂	20 kg	検出せず	分離せず	陰性	<100
14	2016.11.4	2 才ぐらい	♂	49 kg	検出せず	分離せず	陰性	陽性
15	2016.11.11	2 才ぐらい	♀	28 kg	検出せず	分離せず	陰性	<100
16	2016.11.11	2 才ぐらい	♂	64 kg	検出せず	分離せず	陰性	<100
17	2016.11.14	2 才ぐらい	♂	36 kg	検出せず	分離せず	陰性	<100
18	2016.11.24	2 才ぐらい	♂	32 kg	検出せず	分離せず	陰性	陽性
19	2016.11.28	2 才ぐらい	♂	26 kg	検出せず	分離せず	陰性	陽性

6 今回の媒介蚊調査およびイノシシ調査からは感染経路、感染源等の原因究明につながる結果はえられなかったが、次年度以降、再発防止に向けた日本脳炎に関する調査を実施する必要がある。

7 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、2013 年度 1 名(死亡例)の患者発生に続き、2016 年度は 4 名の患者(1 名死亡例)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を行うとともに、高齢者および小児(3 歳未満)への積極的なワクチン接種の奨励について必要であることが再確認された。

謝 辞

媒介蚊捕集調査にご協力いただいた長崎大学熱帯医学研究所の森田公一所長、同研究所病害動物学分野の砂原俊彦先生、比嘉由紀子先生、二見恭

子先生、現地蚊捕集に協力いただいた畜産農家および対馬振興局、イノシシ血清サンプル採取に協力いただいた対馬市役所および対馬保健所の関係各位に感謝する。

参 考 文 献

- 1) World Health Organization (WHO). Fact sheet No. 386. In: Japanese encephalitis. World Health Organization (WHO). 2015.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs386/en/>. Accessed 10 Jan 2016.
- 2) Morita K, Nabeshima T and Buerano C.C.: Japanese encephalitis. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz, 34(2), 441-452 (2015)
- 3) 厚生労働省健康局結核感染症課、国立感染症研究所感染症疫学センター:平成26年度(2014年度)感染症流行予測調査報告書、120-129 (2014)
- 4) 吉川 亮、三浦 佳奈、松本 文昭、田栗 利紹:長崎県環境保健研究センター所報 61、125-130 (2015)

Epidemiological Study of Japanese Encephalitis in Tsushima Islands — Surveillance of vector mosquitoes and wild boars infected by Japanese Encephalitis Virus —

Akira YOSHIKAWA, Ayaka YAMASHITA, Kana MIURA, Fumiaki MATSUMOTO
and Toshitsugu TAGURI

From August to September 2016, four Japanese encephalitis cases occurred frequently in Tsushima Islands. In order to clarify the cause of these cases, we epidemiologically investigated vector mosquitoes and wild boars considered to be animal reservoirs, but we could not detect Japanese encephalitis virus, and no useful evidence was obtained. However, on the viewpoint of prevention and control of Japanese encephalitis, it is necessary to continue doing epidemiological study of vector mosquitoes and wild boars for clarification of the cause.

Key words : Japanese Encephalitis, Arbovirus, *Culex tritaeniorhynchus*, Wild boar, Tsushima Islands