

長崎県における日本脳炎の疫学調査(2017年度)

—豚の日本脳炎ウイルスに対する抗体保有状況調査—

山下 綾香、三浦 佳奈、松本 文昭、小嶋 裕子、田栗 利紹

Epidemiological Study of Japanese Encephalitis in Nagasaki (2017)

—Surveillance of swine infected by Japanese Encephalitis Virus—

Ayaka YAMASHITA, Kana MIURA, Fumiaki MATSUMOTO, Hiroko OJIMA and Toshitsugu TAGURI

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

Key words: Japanese Encephalitis, Arbovirus, Swine Infection, HI Antibody Positive Rate

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。そこで、厚生労働省では毎年夏に、ブタの日本脳炎ウイルス抗体獲得状況から、間接的に日本脳炎ウイルスの蔓延状況を調べている。

近年、本邦の日本脳炎確認患者は、1965年以前と比べ激減しているが、日本脳炎の流行地は、東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¹⁾。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、豚の感染源調査を実施するとともに、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²⁾」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抗体の測定を行っている。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) 調査時期及び回数

7月初旬~9月中旬に計8回実施した。

(2) 調査対象及び検体

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。

(3) 調査事項

感染症流行予測調査事業検査術式に従い¹⁾、JEV赤血球凝集抑制(HI)抗体の測定及び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及び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)条件及びプライマーを図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¹⁾。

3 JEVの分離

Yoshikawa et.al.³⁾の方法に基づいて検体の豚血清を処理し、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1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 µLを加え、被検血清100 µL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、培養上清のPCRを行い確認した。

4 抗JEV-IgM抗体測定

HI抗体測定を行った同一検体の血清を用いて初

感染の指標とされる抗JEV-IgM capture ELISAにより豚血清中の抗JEV-IgM抗体を測定した³⁾。ELISAの条件等は図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 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 >				< 反応条件 >		
	volume	final conc.	temp.	time	cycles	
2× Reaction Mix	12.5 μ L		53°C	15 min.	1	
primer (JE8K-S: 25 μ M)	0.2 μ L	0.2 μ M	94°C	2 min.	1	
primer (JEER: 25 μ M)	0.2 μ L	0.2 μ M	94°C	15 sec.	40	
SSIII/Platinum Taq Mix	0.5 μ L		53°C	30 sec.		
DW (DNase/RNase free)	10.1 μ L		68°C	1 min.		
extract RNA	1.5 μ L		68°C	5 min.	1	
total	25 μ L		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 >				< 反応条件 >		
	volume	final conc.	temp.	time	cycles	
10× EX Taq Buffer	2.5 μ L		94°C	5 min.	1	
dNTP mixture (25 mM each)	2.0 μ L	0.2 mM each	94°C	15 sec.	25	
primer (JE8K inner-S: 25 μ M)	0.2 μ L	0.2 μ M	53°C	30 sec.		
primer (JEER inner-C: 25 μ M)	0.2 μ L	0.2 μ M	72°C	1 min.		
TaKaRa EX Taq HS	0.125 μ L	0.025 U/ μ L	72°C	5 min.	1	
DW (DNase/RNase free)	18.475 μ L		4°C	∞	1	
1 st PCR products	1.5 μ L					
total	25 μ L					

図1 JEV遺伝子の検索

< 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 μ L 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 μ L 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 μ L 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 μ L 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 μ L 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 μ L of OPD (SIGMA) in Phosphate-Citrate Buffer (SIGMA)
- 19) Incubate at RT (room temperature) for 20 min under dark condition.
- 20) Add 100 μ L of stop solution (1N H₂SO₄) to each well
- 21) Read OD 425 nm and calculate Positive/Negative (P/N) Ratio.

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

$$P/N \text{ Ratio} \geq 2.00 \text{ is determined to positive}$$

図2 抗JEV-IgM抗体測定条件

表1 2017年度豚HI抗体陽性率及び2-ME感受性抗陽性率体調査結果

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		
7/4	10				2	7	1			100	0
7/11	10			1	4	3	2			100	0
7/25	10			1	3	5			1	100	11
8/1	10			1	8				1	100	11
8/16	10					1	3	1	5	100	60
8/22	10							4	6	100	20
9/5	10					1	6	3		100	0
9/12	10					1	2	5	2	100	10

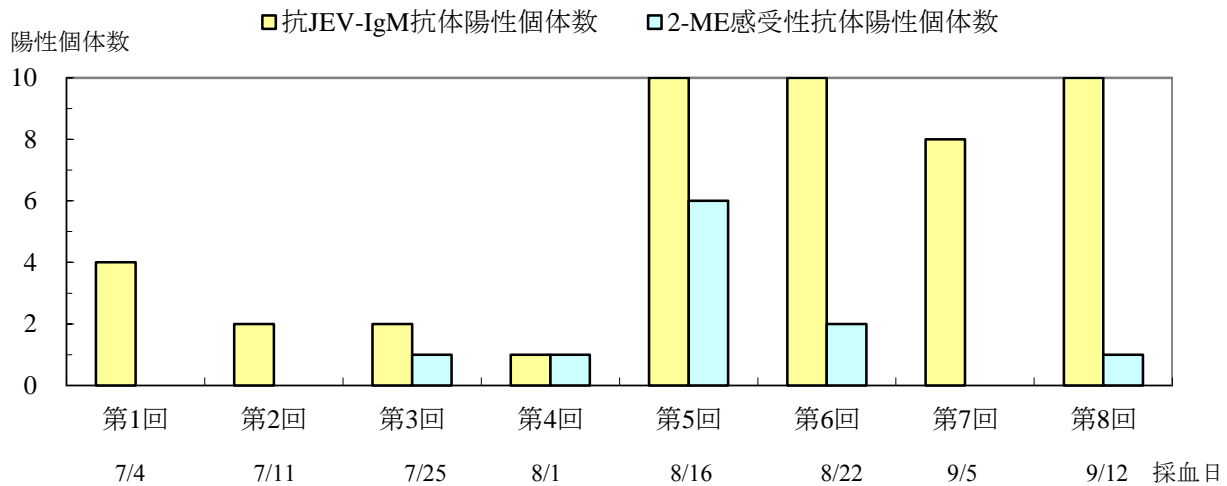


図3 豚の抗JEV-IgM抗体及び2-ME感受性抗体陽性個体数の推移

調査結果及び考察

1 感染源調査結果

2017年度豚HI抗体陽性率及び2-ME感受性抗体陽性率調査結果を表1に示す。

2017年度は、7月4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%)。7月25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9頭のうち1頭(陽性率11%)から初感染の指標となる2-ME感受性抗体が検出された。

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、2017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。

また、今回はHA試験の際に、JEV抗原とガチョウ血球とで血球凝集反応がみられないという問題が生じた。昨年度使用していた検査実績のある試薬が残っていたため、新旧の試薬を組み合わせながら検討を行った結果、ウシ血清アルブミン(BSA)が原因であることが判明した。改善策として、BSAを卵白アルブミン(EA)に変更して実験を行い、これまでと同等の検査結果が得られた。今後、BSAを使用することで血球凝集反応がみられなかった原因について探る必要があると考えられる。

2 JEV遺伝子検索及び分離結果

豚血清中のJEV遺伝子検索を行ったところ、

2017年7月25日に採血した2頭及び8月1日に採血した1頭の血清からJEV遺伝子が確認された。しかし、これらの血清を含む全ての豚血清につ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は確認されず、培養上清からもPCR増幅産物は検出されなかった。

3 抗JEV-IgM抗体測定結果

豚の抗JEV-IgM抗体及び2-ME感受性抗体陽性個体数の推移を図3に示す。2017年7月4日に採血した4頭から抗JEV-IgM抗体陽性の個体を確認した。また、この2017年7月4日に採血された同一検体を用いて行ったHI検査では、2-ME感受性抗体陽性個体は検出されなかったことから、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と考えられた。

まとめ

- 2017年度は7月4日に採血した10頭からHI抗体が、7月25日に採血した1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。
- 7月25日に採血した2頭の血清及び8月1日に採血した1頭の血清からJEV遺伝子が確認されたが、JEVは分離されなかった。
- 2017年度は7月4日に採血した豚血清から抗JEV-IgM抗体陽性個体が4頭確認されたため、実施要領²⁾に基づき医療政策課から県民に向けた注意喚起が行われた。

おわりに

2017年度に日本脳炎確認患者は報告されなかったが、依然として豚では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いることがわかった。

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及び佐世保市食肉衛生検査所の関係各位に感謝する。

参 考 文 献

1) 国立感染症研究所: 日本脳炎ウイルス検出マニ

ュアル(2013).

2) 吉川亮, 他: 長崎県環境保健研究センター所報62, 159-165(2016).

3) Yoshikawa, A. et al: Molecular and serological epidemiology of Japanese encephalitis virus (JEV) in a remote island of western Japan: an implication of JEV migration over the East China Sea, *Tropical Medicine and Health* 44:8, 1-10(2016).

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).