

## 感染症流行予測調査事業における日本脳炎感染源調査概要 (平成20年度、平成21年度)

微生物課 増本久人 平野敬之 吉武俊一 南 亮仁  
江口正宏 船津丸貞幸 武田裕二 吉川信治

キーワード：日本脳炎ウイルス 感染源調査 豚血清 HI抗体価 RT-PCR法

### 1 はじめに

日本脳炎は、日本脳炎ウイルスを媒介する蚊であるコガタアカイエカの刺咬によって感染する重篤な急性脳炎である。日本脳炎は 1999 年 4 月に施行された「感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律（感染症法）」に基づく感染症発生動向調査において全数届出の 4 類感染症とされ、サーベイランスが実施されている。佐賀県では感染症流行予測調査事業の一環として、平成 20 年度と平成 21 年度に豚の血清を対象に感染源調査（日本脳炎ウイルス HI 抗体価保有調査など）を実施し、同時に豚血清中から RT-PCR 法による遺伝子検出を試み、豚における日本脳炎ウイルス感染の浸淫度について調査したので報告する。

### 2 材料および方法

#### 1) 感染源調査

本調査は日本脳炎の増幅動物である豚の感染状況を知る目的で実施されているが、平成 20 年度、21 年度のそれぞれ 7 月上旬から 9 月中旬までの計 8 回、1 回につき 10 頭、合計 80 頭のブタについて調査を実施した。検査術式は、感染症流行予測調査事業検査術式<sup>1)</sup>により HI 抗体価（赤血球凝集抑制試験）を測定した。また、同時に初期感染（IgM 抗体）の指標となる 2-メルカプトエタノール（2-ME）処理法による感受性抗体価についても測定調査を行った。

#### 2) 遺伝子検出（RT-PCR 法）

平成 20 年度、21 年度の感染源調査で使用した一部のブタ血清について RT-PCR 法による遺伝子検出を試みた。病原体検出マニュアル<sup>2)</sup>に準じて実施し、豚血清 500  $\mu$ l からは、QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN, USA) を使用して RNA を抽出し、DNase 処理および RT 反応にて cDNA の合成後、日本脳炎ウイルス遺伝子のエンベロップ（E）領域を標的とし、下記の各プライマーを用いて PCR 反応を行い増幅産物の陽性バンド<sup>3)</sup>（326bp）の検出を試みた。

- ・ 1st. PCR プライマー組合せ

(JESK-S:5' ATG GAA CCC CCC TTC 3' )

(JEER:5' AGC AGG CAC ATT GGT CGC TA 3' )

- ・ Nested PCR プライマー組合せ

(JESK inner-S:5' ATC GTG GTT GGG AGG GGA GA 3' )

(JEER inner-S:5' AGC ACA CCT CCT GTG GCT AA 3' )

## 3 結果

## 1) 平成20年度感染源調査(表1)(図1)

豚のHI抗体価保有率の上昇は、平成19年度は8月上旬にHI抗体価の上昇が見られたのに対して、平成20年度は8月中旬採血分の調査でHI抗体陽性率が80%を超えて、高い抗体陽性率を保持したまま調査最終の9月中旬には100%のHI抗体価保有率を示した。

また、2-ME感受性抗体保有率(IgM抗体)についてはHI抗体価保有率が80%を示した8月中旬に88%、8月下旬に67%の2-ME感受性抗体保有率の上昇を見たが、その後、9月以降の調査では2-ME感受性抗体保有率は確認できなかった。

表1 平成20年度 豚のHI抗体価保有状況調査結果

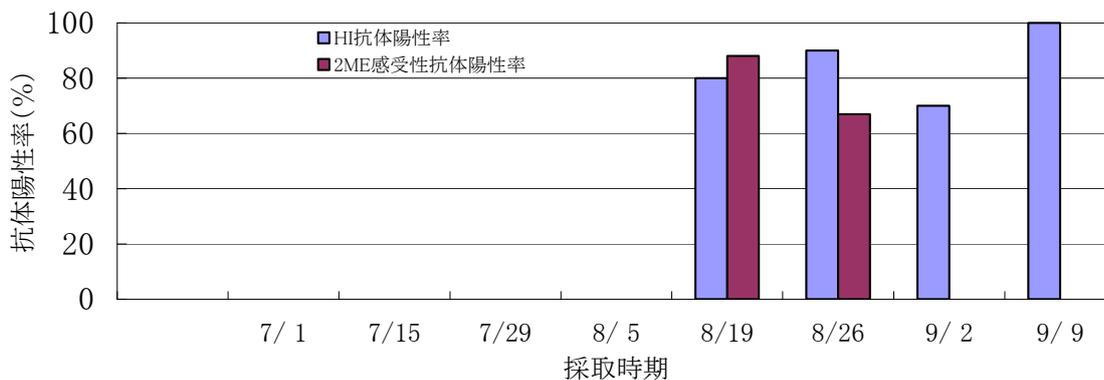
| 採血<br>月日 | 検査<br>頭数 | HI抗体価 |    |    |    |    |     |     | HI抗体<br>陽性率 | 2ME感受性抗<br>体陽性率 |          |
|----------|----------|-------|----|----|----|----|-----|-----|-------------|-----------------|----------|
|          |          | <10   | 10 | 20 | 40 | 80 | 160 | 320 |             |                 | ≥640     |
| 7/ 1     | 10       | 10    |    |    |    |    |     |     |             | 0%              | 0%(0/0)  |
| 7/15     | 10       | 10    |    |    |    |    |     |     |             | 0%              | 0%(0/0)  |
| 7/29     | 10       | 10    |    |    |    |    |     |     |             | 0%              | 0%(0/0)  |
| 8/ 5     | 10       | 10    |    |    |    |    |     |     |             | 0%              | 0%(0/0)  |
| 8/19     | 10       | 2     |    |    | 1  |    | 1   | 2   | 4           | 80%             | 88%(7/8) |
| 8/26     | 10       | 1     |    |    | 1  | 1  |     | 2   | 5           | 90%             | 67%(6/9) |
| 9/ 2     | 10       | 3     |    |    |    | 1  |     |     | 6           | 70%             | 0%(0/7)  |
| 9/ 9     | 10       |       |    |    |    | 1  | 1   | 3   | 5           | 100%            | 0%(0/10) |

\*HI抗体陽性=1:10以上

\*\*2-ME感受性抗体陽性=HI抗体価1:40以上

図1 平成20年度 豚のHI抗体保有率と2-ME感受性抗体保有率の出現推移

豚の日本脳炎抗体保有率(平成20年度)



## 2) 平成20年度遺伝子検出(RT-PCR法)結果

平成20年度の豚血清のHI抗体価保有率と感染初期を示す2-ME感受性抗体保有率(IgM抗体)の保有率及び上昇を示した地区の8月中旬の豚血清5件についてRT-PCR法を試みたが、日本脳炎ウイルスの遺伝子検出は確認できなかった。

3)平成21年度感染源調査(表2)(図2)

平成21年度の豚血清のHI抗体価保有率の上昇は、平成20年度と同時期の8月中旬に50%の抗体陽性率を示した。8月下旬の調査ではHI抗体陽性を示す豚が確認できなかったが、その後、9月上旬に50%、9月中旬に40%のHI抗体陽性率の連続上昇を示した。

また、初期感染の指標となる2-ME感受性抗体価保有率(IgM抗体)については、9月上旬に40%と9月下旬に75%の2-ME感受性抗体価保有率の上昇を確認した。

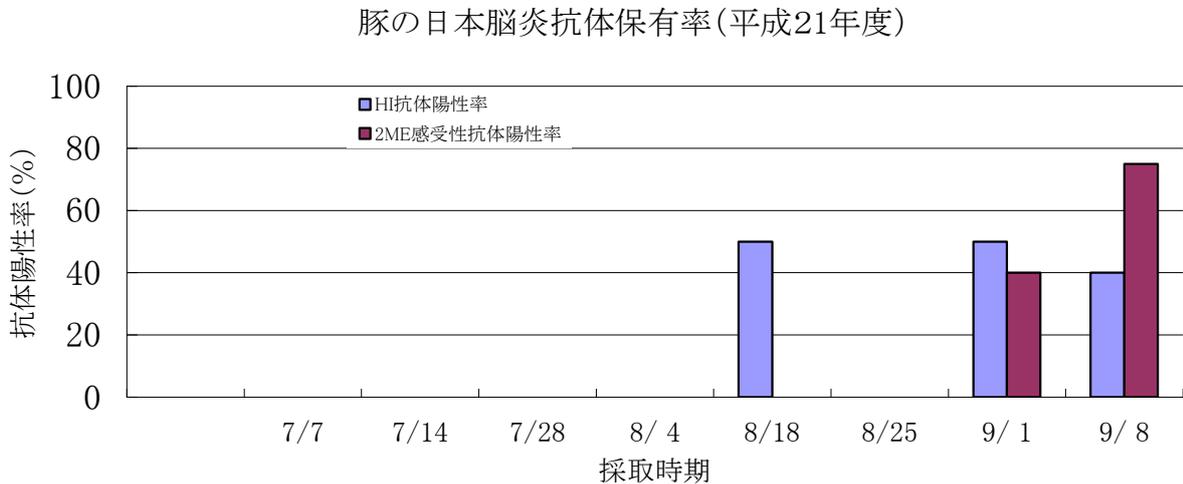
表2 平成21年度 豚のHI抗体価保有状況調査結果

| 採血月日 | 検査頭数 | HI抗体価 |    |    |    |    |     |     |      | HI抗体陽性率 | 2ME感受性抗体陽性率 |
|------|------|-------|----|----|----|----|-----|-----|------|---------|-------------|
|      |      | <10   | 10 | 20 | 40 | 80 | 160 | 320 | ≥640 |         |             |
| 7/7  | 10   | 10    |    |    |    |    |     |     |      | 0%      | 0%(0/0)     |
| 7/14 | 10   | 10    |    |    |    |    |     |     |      | 0%      | 0%(0/0)     |
| 7/28 | 10   | 10    |    |    |    |    |     |     |      | 0%      | 0%(0/0)     |
| 8/4  | 10   | 10    |    |    |    |    |     |     |      | 0%      | 0%(0/0)     |
| 8/18 | 10   | 5     |    |    |    | 2  | 2   | 1   |      | 50%     | 0%(0/5)     |
| 8/25 | 10   | 10    |    |    |    |    |     |     |      | 0%      | 0%(0/0)     |
| 9/1  | 10   | 5     |    |    | 1  |    |     | 1   | 3    | 50%     | 40%(2/5)    |
| 9/8  | 10   | 6     |    |    |    |    | 2   | 1   | 1    | 40%     | 75%(3/4)    |

\*HI抗体陽性=1:10以上

\*\*2-ME感受性抗体陽性=HI抗体価1:40以上

図2 平成21年度 豚のHI抗体保有率と2-ME感受性抗体保有率の出現推移



4)平成21年度遺伝子検出(RT-PCR法)結果

平成21年度の豚血清のHI抗体価保有率と感染初期を示す2-ME感受性抗体保有率(IgM抗体)の保有率及び上昇を示した地区の9月上旬の豚血清5件についてRT-PCR法を試みたが、日本脳炎ウイルスの遺伝子検出は確認できなかった。

#### 4 考察

日本脳炎ウイルス感染による患者の発生は、予防ワクチンや生活環境の様々な変化などにより、感染患者は激減し、近年では数名の発生を見るにいたっている状況である。その中でも日本脳炎ウイルスによる患者発生の多くが西日本地区で発生しており、特に中国・九州地方に日本脳炎の患者発生届けが多く報告されている。県内での日本脳炎患者の発生届出は平成17年度の8月に60歳台女性患者の届出がされた以降、平成18年度から21年度まで患者発生の届出はなかった。

今回の感染源調査でも平成20年度と21年度は共に、豚の日本脳炎ウイルス感染のHI抗体価保有率の上昇時期が、例年<sup>7)8)</sup>に比べ3週から1ヶ月ほど遅い立ち上がりを示した。また、豚の初期感染(IgM抗体)の指標である2-ME感受性抗体の出現時期も遅く、日本脳炎ウイルスによる汚染注意報発令基準値である抗体価上昇率の50%を越えたのは平成20年度が8月中旬と8月下旬で、平成21年度9月上旬と9月中旬の短い期間に続けて抗体価上昇率を認めた。このことから平成20年度と21年度の9月以降に日本脳炎ウイルスによる感染が蔓延する危険性が心配されたが、両年度内に日本脳炎ウイルス感染による患者の発生届出はなかった。しかし、このような測定結果であっても豚と蚊の間では日本脳炎ウイルスによる感染環が形成されている状況に変わりはなく継続して監視することが重要である。

遺伝子検出については、前年の平成17年度に感染源調査に用いた豚血清80件中、4件から近年、国内の流行型と報告<sup>4)6)</sup>されている日本脳炎ウイルス遺伝子の1型を検出<sup>8)</sup>した経緯から、引き続き日本脳炎ウイルス遺伝子の検出を試みた。平成20年度は豚のHI抗体価と2-ME感受性抗体率の上昇が見られた8月中旬調査の豚血清5件についてのみ遺伝子検査を試みたが陰性であった。

平成21年度は本調査時期に新型インフルエンザ(H1N1pdm)発生による遺伝子検査対応に追われたこともあり、2-ME感受性抗体保有率の上昇を見た9月下旬調査時の豚血清5件について遺伝子検査を試みたが、結果は全て陰性であった。しかし、今後も日本脳炎ウイルスの病態・疫学的解明には遺伝子解析による型分類・変異・型別流行状況など積極的に取り組むことも重要な分野であると思われる。

現在のところ日本脳炎ワクチン接種の積極的勧奨が差し控えられているため、日本脳炎ウイルスの増幅動物における豚血清の抗体価保有調査からは抗体陽性を示す豚が確認され日本脳炎ウイルスに感染するリスクが依然として高いことから、県民に対して日本脳炎感染の浸淫を監視し注意喚起を促す手段として、本事業の豚における感染源調査の継続と調査情報の迅速な還元が必要不可欠であると思われる。

#### 謝辞

この度、日本脳炎ウイルスにおける感染症流行予測調査(感染源)事業にご協力を賜った(社)佐賀県畜産公社及び食肉衛生検査所職員の皆様に厚く御礼を申し上げます。

#### 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) 国立感染症研究所、地方衛生研究所全国微生物協議会編：病原体検出マニュアル
- 3) 厚生労働省健康局結核感染症課：平成19年度感染症流行予測調査報告書、2007
- 4) 国立感染症研究所感染症情報センター：日本脳炎 1999～2002、IASR、24(7)、149-155、2003
- 5) 国立感染症研究所感染症情報センター：日本脳炎 2003～2008、IASR、30(6)、147-158、2009

- 6) 高崎智彦：国立感染症研究所ウイルス第一部 日本脳炎ホームページ公開, 2009
- 7) 田部井由紀子ほか：都内のブタにおける日本脳炎ウイルス感染状況（平成17年）.  
東京健安研セ年報, Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. P. H. , 57, 87-90, 2006
- 8) 佐賀県衛生薬業センター所報：感染症流行予測調査事業（平成16年度）, 29, 119-122, 2006
- 9) 佐賀県衛生薬業センター所報：感染症流行予測調査事業（平成17年度）, 29, 123-125, 2006
- 10) 佐賀県衛生薬業センター所報：感染症流行予測調査事業（平成18年度、平成19年度）, 30,  
108-111, 2008