

山梨県における日本脳炎ウイルス感染リスクについて

三橋 加世子 大沼 正行 浅川 洋美*

Infection Risk of *Japanese Encephalitis Virus* in Yamanashi Prefecture

Kayoko MITSUHASHI, Masayuki OONUMA and Hiroyoshi ASAKAWA

キーワード：日本脳炎ウイルス，抗体調査，遺伝子型

日本脳炎は日本脳炎ウイルス (Japanese Encephalitis Virus :以下 JEV) によって引き起こされ、感染者の多くは不顕性感染で終わるが、0.1~1%の割合で急性脳炎を発症し¹⁾死亡率が高く、また回復後も後遺症を残す疾患である。日本における患者発生は1967年までは年間千名を越えていたが、近年では年間10人未満となっている。JEVは、主に豚と蚊(日本では主にコガタアカイエカ)の間で感染環が維持されており、ウイルス血症を引き起こした豚を蚊が吸血しヒトを刺すことによって、ヒトへの感染が成立する。2005年5月よりワクチン接種の積極的勧奨の差し控えが勧告されていた²⁾が、2009年6月から乾燥細胞培養ワクチンを用いた予防接種が可能となった³⁾。

当初では毎年、感染症流行予測調査事業の一環として JEV の増幅動物である豚の抗体保有調査を実施し、本症の流行推定を行っている。ほぼ全国的に豚で抗体保有が見られており⁴⁾、JEV に感染したことが推察される。今回我々は2008年、2009年の2年間、抗体保有調査に加えて媒介蚊であるコガタアカイエカの発生動向調査、豚と蚊からのウイルス検出およびウイルスの遺伝子解析を行い、山梨県における日本脳炎ウイルスの感染リスクについて検討した。

材料および方法

1. 豚の抗体保有調査

7月から9月にかけて、県内で飼育されている豚の血清(6ヶ月齢)を用い、定法に従い⁵⁾赤血

球凝集抑制試験により JEV に対する抗体 (HI 抗体) と新鮮感染の指標とされる 2ME 感受性抗体を測定し、ウイルス増幅動物である豚の JEV 感染状況を調査した。

2. コガタアカイエカの発生動向調査

5月から11月にかけて、県内の甲府市、中央市および北杜市の3ヶ所で週一回ライトトラップ法による蚊の捕集を行い、JEVの媒介蚊であるコガタアカイエカの発生消長について調査した。

3. 豚および蚊からの JEV 検出

豚血清と捕集コガタアカイエカから培養細胞法を用いたウイルス分離と RT-PCR 法による遺伝子検出を実施した。コガタアカイエカは乳剤を作成して、遠心後その上清を検体とした。ウイルス分離は Vero9013 細胞、C6/36 細胞を用いて行った。遺伝子検出は QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN 社製) により RNA を抽出後、エンベロープ領域を目的としたプライマー (1st PCR には JE8K-S/JEER, nested PCR には JE8K inner-S/JE8K inner-C)⁶⁾ を用いて行った。なお、ウイルス分離で CPE が見られた検体については RT-PCR 法による確認を行った。

4. JEV の遺伝子解析

JEV が分離もしくは JEV の遺伝子が検出された検体について BigDyeTerminator v1.1 Cycle Sequence kit (ABI 社製) を用いてサイクルシーケンス反応を行い、ABI PRISM 310 Genetic Analyser (ABI 社製) により塩基配列を決定後、Clustal W を用い N-J 法による系統解析を行った。

* : 現 食肉衛生検査所

表 1 HI抗体保有状況

血清採取日	回数	検査頭数	HI抗体価							HI抗体保有率	2ME感受性抗体保有率
			<10	10	20	40	80	160	320		
2008 7 15	1	10	10							0 %	%
2008 7 30	2	10	10							0 %	%
2008 8 8	3	10	10							0 %	%
2008 8 20	4	10	10							0 %	%
2008 8 29	5	10	10							0 %	%
2008 9 8	6	10	10							0 %	%
2008 9 22	7	10	10							0 %	%
2008 9 29	8	10	2	3				1	4	80 %	100 %
2009 7 31	1	10	10							0 %	%
2009 8 11	2	10	10							0 %	%
2009 8 19	3	10	10							0 %	%
2009 8 25	4	10	10							0 %	%
2009 9 1	5	10	10							0 %	%
2009 9 10	6	10	10							0 %	%
2009 9 29	7	10	5					1	4	50 %	80 %

HI抗体は、抗体価≥10を陽性と判定。

結果および考察

1. 豚の抗体保有調査

豚の JEV に対する抗体保有状況を表 1 に示した。2008 年 2009 年ともに調査期間中 9 月の最終週で初めて抗体が検出された。また、新鮮感染の指標とされる 2ME 感受性抗体も 80% 以上と高い陽性率を示していた。抗体が検出されたこと、また 2ME 感受性抗体 (IgM 抗体) を保有していたことから、両年ともに 9 月の中旬以降に JEV の流行が始まっていたと推測された。

2. コガタアカイエカの発生動向調査

コガタアカイエカの捕集結果を表 2 に示した。捕集期間は 2008 年では中央市で 5 月と 7 月に、2009 年は中央市で 6 月から 8 月に、北杜市で 7 月とオスの蚊が 10 月に見られ、中央市では両年捕集された。甲府市では両年ともに捕集されず、既報⁷⁾⁸⁾と同様の結果となった。

3. 豚および蚊からの JEV 検出

2008 年 9 月 29 日採取の豚血清 1 検体から培養細胞法を用いたウイルス分離で JEV が分離された。この検体は、HI 抗体価は 10 以下だった。蚊から JEV は分離されなかった。また、RT-PCR 法による遺伝子検出は、蚊と豚血清全ての検体において検出されなかった。

表 2 コガタアカイエカの捕集状況

回収日	甲府市 中央市 北杜市		
	2008 5 29		1
7 10		1	
2009 6 4		1	
7 2			1
7 23		1	
7 30		1	1
8 27		2	
10 1			1(オス)

4. JEV の遺伝子解析

今回分離された JEV1 株について、エンベロープ領域の一部 (360bp) における系統樹の結果を図 1 に示した。相同性検索では、Sw/Kagawa/35/2004 と 99.7% の相同性があり、遺伝子型は I 型に属していた。

日本脳炎ワクチンは、1954 年から開始され、1967 ~1976 年に特別対策として小児にのみならず高齢者を含む成人に積極的にワクチン接種が行われた結果、日本脳炎患者は急激に減少し、1980 年代は年間数十人、1992 年以降は一桁となった。2003~2008 年の 6 年間に日本脳炎患者は合計 33 例報告され、すべての患者は関東以西で発生しており、特に患者が多かったのは九州および中国地方であった。しかし、愛知、石川、茨城県でも患者が発生し、広範囲な地域での JEV 感染が確認され注目されている⁴⁾。また、2005 年の日本脳炎ワクチンの使用の差し控えにより予防接種を受けていなかった 3 歳児の患者が熊本県で報告されていた。厚生労働省予防接種に関する検討会は、

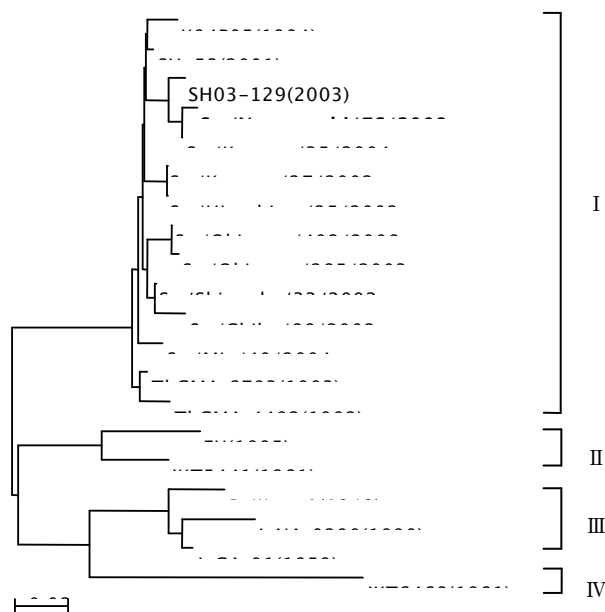


図 1. エンベロープ領域 (360bp) における系統樹 (N-J 法)

太字は今回の調査において検出された JEV 株

「JEV に感染するリスクがあり、ワクチンが果たす役割は重要」との提言をまとめ、2009 年からワクチン接種が可能となった。

本県での感染リスクを検討したところ、豚の JEV に対する抗体保有が見られたこと、また豚血清から JEV が分離されたことから、本県にも JEV が侵淫したことが示唆された。JEV には 5 種類の遺伝子型があり、豚血清から分離される遺伝子型は 1990 年頃までは III 型が主流であったが、近年では I 型が多く検出されている⁹⁾。本研究でも遺伝子解析により I 型が検出され、上記報告と同様であった。今回 JEV は 1 株のみの検出であったが、今後調査を継続して行うことで、県内での JEV の疫学を知ることが可能と考えられた。

JEV の感染源であるコガタアカイエカは、主に春から秋口まで捕集された。JEV 感染防止には蚊に刺されないことが重要である。JEV の侵淫時期は、9 月末に抗体が検出されたことから 9 月中旬であり、それ以降から蚊がいなくなる秋口までは JEV 感染に特に注意が必要と考えられた。

コガタアカイエカから JEV は検出されなかったが、JEV 遺伝子がコガタアカイエカから検出されたという報告¹⁰⁾がある。本調査で豚から抗 JEV 抗体が検出されたことから、JEV 保有蚊の存在も否定は出来ないと考えられた。

今回の調査から、県内には感染リスクがあることが確認できた。日本脳炎は特異的な治療法がない為、予防であるワクチンの接種や蚊の対策が必要である

ことが確認された。国内で患者報告があることや、ほぼ全国的に豚での抗体保有が見られることから、今後とも JEV の分離・遺伝子解析を継続的に行い、動向を注視する必要があると思われた。

まとめ

1. 豚の抗体保有調査から豚の JEV に対する抗体保有が兩年ともに 9 月の最終週で見られた。
2. コガタアカイエカの発生動向調査では、主に春から秋口まで捕集が見られた。
3. 豚血清から JEV が分離された。
4. 分離された JEV は遺伝子型 I 型に属しており、本県の JEV は近年国内で検出される遺伝子型と同一であった。

最後に、本調査実施にあたりご協力いただいた食肉衛生検査所および動物愛護指導センターの職員一同に深謝いたします。

参考文献

- 1) 竹上 勉: ウイルス, **53**, 25-30 (2003)
- 2) 定期の予防接種における日本脳炎ワクチン接種の積極的勧奨の差し控えについて (勧告), 平成 17 年 5 月 30 日付け健発第 0530001 号.
- 3) 予防接種実施規則の一部を改正する省令の施行について, 平成 21 年 6 月 2 日付け健発第 0602001 号.
- 4) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報 (月報), **30**, 151-152 (2009).
- 5) 厚生労働省: 感染症流行予測調査事業検査術式 (2002).
- 6) 国立感染症研究所: 病原体検査マニュアル (日本脳炎).
- 7) 高橋 史恵: 山梨衛公研年報, **52**, 46-55 (2008).
- 8) 高橋 史恵: 山梨衛公研年報, **53**, 42-55 (2009).
- 9) Nerome R. et. al: J Gen Virol, **88**, 2762-2768 (2007).
- 10) 小林 睦生: わが国における日本脳炎の現状と日本脳炎ワクチンの必要性の評価に関する緊急研究, 厚生労働科学研究費厚生労働科学特別事業報告書, 2005, 32-37.