

3・2 資 料

1) 日本脳炎調査 (2006年度)

原田 誠也 松尾 繁 中島 龍一

はじめに

日本脳炎(日脳)は日本脳炎ウイルス(JEV)を保有するコガタアカイエカの刺咬によって感染する急性髄膜脳炎である。日脳は重要な疾患であるため、厚労省の感染症流行予測事業で、ヒトの中和抗体保有状況調査と肥育ブタの感染状況調査が行われている。また、日脳は「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」では4類感染症に分類され、患者の全数届け出義務が課せられている。

2006年度、当所ではヒトの中和抗体調査とブタの感染状況調査の双方を実施するとともに、ブタの感染状況調査に用いた血清からJEVの分離を試みた。また、本県における日脳患者発生数は、1991年度以降、毎年度1名以下で推移していたが、2006年度は3名の患者が発生した。そこで、2006年度に実施した感染症流行予測事業の調査結果と患者情報を併せて報告する。

材料と方法

1 ブタ血清の赤血球凝集抑制(HI)抗体及び2メルカプトエタノール(2ME)感受性抗体調査

2006年7月中旬から9月中旬にかけて、県内の養豚場から熊本畜産流通センター(菊池市七城町)に搬入された肥育ブタの放血液(飼育地別に5検体ずつ、1回につき20検体)を、ほぼ1週間ごとに9回、計180検体採取した。採取した血液は、本所に持ち帰って血

清を分離後、常法¹⁾によりHI抗体価と新鮮感染の指標である2ME感受性抗体価を測定した。

2 ヒトの日脳中和抗体調査

2006年8月から10月にかけて年齢群別に25名ずつ採取したヒト血清225検体について、常法¹⁾により中和抗体価を測定した。なお、中和抗体測定用の抗原はJaGAr#01株を使用した。

3 ブタ血清からのJEV分離・同定及び遺伝子型決定

HI抗体価測定に用いたブタ血清を維持培地で5倍に希釈し、単層培養したVero 9013細胞(24ウェルプレート法)とC6/36細胞(チューブ法)に接種した。それぞれ3代継代培養し、細胞変性効果(CPE)が認められた細胞の培養上清からRT-PCR法¹⁾でJEVを同定した。また、分離されたJEVは国立感染症研究所(感染研)に送付し、遺伝子型決定を行なった。

4 日本脳炎患者調査

2004年度、2005年度の各1名に続き、2006年度は9月に3名の日脳患者発生届出があった。入手できた患者2名の臨床検体(①:急性期及び回復期血清,②:急性期髄液)を感染研に送付し、IgM捕捉ELISAによる抗体の確認、ウイルス分離及びRT-PCR法等によるJEV遺伝子検出を行なった。

表1 飼育地別ブタのHI抗体保有状況及びJEV分離状況

採血月日	熊本市及び周辺町	菊池郡大津町	菊池市旭志	菊池市その他	山鹿市鹿本町	山鹿市その他	鹿本郡植木町	合志市	HI抗体陽性数(%)	2ME感受性抗体保有率(%)
7/10		0/5	0/5		0/5		0/5		0/20 (0%)	(0%)
7/24		0/5	0/5			0/5	0/5		0/20 (0%)	(0%)
7/31	0/5		0/5	0/5			0/5		0/20 (0%)	(0%)
8/7	0/5		0/5				0/5	1/5	1/20 (5%)	(0%)
8/21			0/5		0/5		0/5	0/5	0/20 (0%)	(0%)
8/28			0/5		3/5		4/5	0/5	7/20 (35%)	(100%)
9/4			0/5		5/5		5/5	5/5	15/20 (75%)	(85%)
9/11			0/10		5/5		5/5		10/20 (50%)	(10%)
9/25			1/5		5/5		5/5	2/5	13/20 (65%)	(13%)
合計(%)	0/10 (0)	0/10 (0)	1/50 (2)	0/5 (0)	18/30 (60)	5/5 (0)	19/45 (42)	8/25 (32)	51/180 (28)	

HI抗体陽性数/検査頭数

□ : JEVが分離されたロット

表2 ブタのHI抗体及び2ME感受性抗体保有率

採血月日	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			≥640
7/10	20	20									
7/24	20	20									
7/31	20	20									
8/7	20	19	1						5%		
8/21	20	20									
8/28	20	13				2		2	3	35%	100%
9/4	20	5	1	1		1		4	8	75%	85%
9/11	20	10					3	6	1	50%	10%
9/25	20	7				3	8	2		65%	8%
合計	180	134	2	1		6	11	14	12		

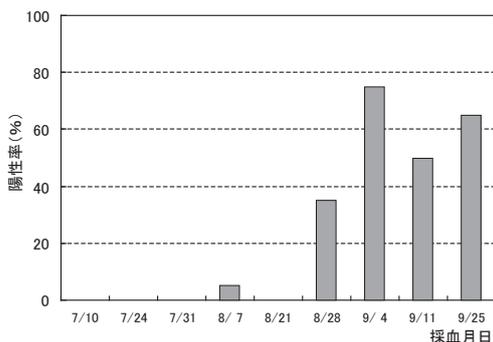


図1 ブタのHI抗体保有状況

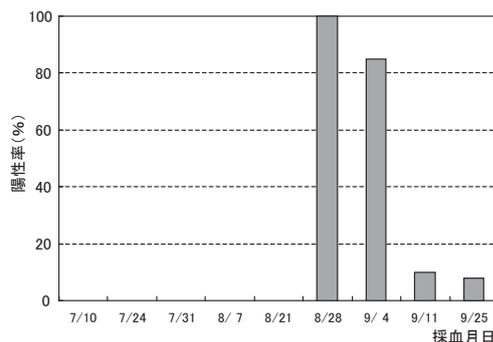


図2 ブタのHI抗体保有状況

結果

1 ブタ血清のHI抗体及び2ME感受性抗体調査

飼育地別のブタ血清のHI抗体保有状況を表1に示す。2006年度に最も早くHI抗体が確認されたのは、8月7日に合志市の養豚農家から採取した検体で、5検体中1検体のみHI抗体価10倍を示した。その後、8月28日に山鹿市(鹿本町)と鹿本郡(植木町)のブタから採取した10検体中7検体がHI抗体陽性、かつ2ME感受性抗体陽性で、すべてが新鮮感染であった。ブタの肥育農家が多い菊池市や周辺市町の中でも、ブタがJEVに感染する時期や比率は飼育地で差があり、9回とも採血できた菊池市旭志地区のブタは、9月25日の1検体のみがHI抗体陽性であった。このことから、旭志地区のブタは他の地区のブタより感染時期が2~3週間遅く、かつ感染率も低いことが確認された。

次に、ブタのHI抗体及び2ME感受性抗体保有率を表2、図1及び図2に示した。HI抗体保有率は、8月28日に35%、9月4日の75%まで上昇したが、その後減少し、2006年も100%には至らなかった。一方、2ME感受性抗体は8月28日に100%を示したが、9月4日の85%から急激に減少し、9月25日には8%となった。従って、2006年のJEVの活動は、2005年より約1ヶ月遅い8月中旬ごろから始まったと推測さ

れた。この原因として、2006年度は7月中旬以降に九州地方で大雨が降り続いたことから、コガタアカイエカの幼虫が流された可能性が示唆された。近年、ブタのHI抗体陽性率は低く^{2), 3)}、新鮮感染が遅れる傾向にある。しかし、今回の調査から明らかなように、ブタの飼育地域による感染時期や感染率の差も存在する。ブタの飼育形態や環境の変化、コガタアカイエカの増殖に必要な水田の減少などにより、環境中のウイルス濃度が地域により異なっているものと推定される。

2 ヒトの日脳中和抗体調査

ヒトは日脳中和抗体価が10倍以上あれば自然感染を阻止できるとされている。2006年度に測定した年齢群別の日脳中和抗体価の分布を表3に、抗体保有率のグラフを図3に示す。2006年度は近年の検査結果とかなり異なっていた。例年25~40%程度の保有率であった0~4歳群が64%を示し、320倍以上の高い抗体価を示した検体が25検体中10検体も確認された。中でも例年ほとんど抗体検出のない0~2歳児で、18名中7名が320倍以上の高抗体価を示した。2005年5月以来日本脳炎の予防接種は行なわれていないため、この0~2歳児の高抗体価保有はJEVの不顕性感染によるものと推定された。一方、5~9歳群及び10~14歳群は共に48%で、近年の検査結果より10

表3 ヒトの日脳中和抗体保有率

年齢区分	検査人数	中和抗体価									中和抗体保有率
		<10	10	20	40	80	160	320	≥640		
0-4	25	9	1	2		1	2	2	8	64%	
5-9	25	13		1	1		2	2	6	48%	
10-14	25	13		2	1		2	3	4	48%	
15-19	25			1	1		5	2	16	100%	
20-29	25	7	2	5	4	2	3	1	1	72%	
30-39	25	7	5	7	3	1	1	1		72%	
40-49	25	11	4	6	3	1				56%	
50-59	25	13		5	4	2	1			48%	
≥60	25	9	1	3	7	2	3			64%	
合計	225	82	13	32	24	9	19	11	35		

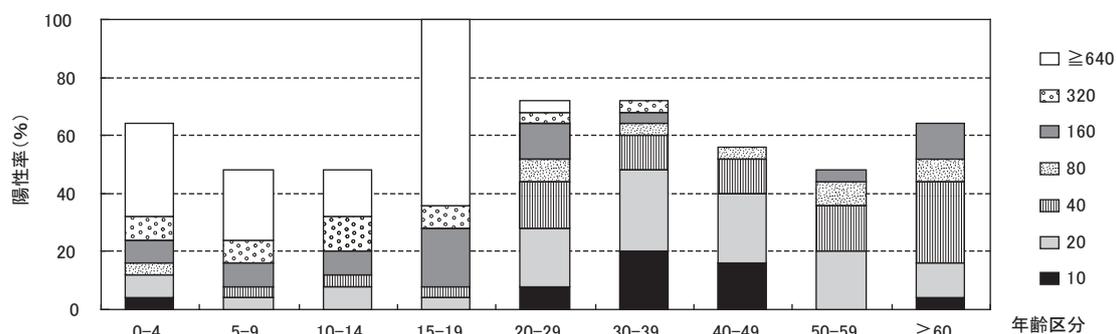


図3 ヒトの日脳中和抗体保有状況

表4 日本脳炎患者情報および検査所見

	2006年		
	1例目	2例目	3例目
住 所	熊本県	熊本県	熊本県
年齢・性別	65歳/女性	3歳5ヶ月/男性	48歳/女性
海外渡航歴	なし	なし	なし
発病年月日	2006/9/2	2006/9/10	2006/9/10
臨床症状	発熱, 意識障害, 痙攣, 頸部硬直, 筋硬直	下痢, 頭痛, 発熱, 意識障害, 頸部硬直	発熱, 意識障害, 痙攣
転 帰	回復	回復	回復
居住地と養豚場の関係	近隣2km以内に豚舎なし	近隣2km以内に豚舎なし	近隣2km以内に豚舎なし
HI抗体価	20 (9/4血清) 320 (9/15血清)	<10 (9/12血清) 320 (9/29血清)	160 (9/12血清) 1280 (9/28血清)
IgM捕捉ELISA	+ (9/4血清) + (9/15血清)	- (9/12髄液)	NT
ウイルス分離	-	-	"
RT-PCR	+	+	"
Real Time PCR	+	+	"
JEV遺伝子型	I型	I型	"

NT: Not tested

～30%低かったが、原因は不明であった。以降の年齢群では15～19歳で100%となり、その後50～59歳まで漸減し、60歳以上で再び上昇に転じた。640倍以上の高い抗体価は0～4歳児群から15～19歳群に多く、特に15～19歳群で最も多く認められていることから、ワクチン接種のブースター効果が確認された。

3 ブタ血清からのJEV分離・同定

C6/36細胞及びVero 9013細胞で2～3代継代した結果、表1に網掛けで示したロットのHI抗体陰性の検体から9株のJEVが分離された。なお、遺伝子解析の結果、すべて遺伝子型I型であった。

4 日本脳炎患者調査

本県では、2000年度以降、患者発生届出はなかったが、2004年度、2005年度の各1名に続き、2006年度は3名の発生届出があった。患者の情報及び検査所見を表4に示す。1例目は65歳の女性、2例目は3歳5ヶ月の男児及び3例目は48歳の女性で、3人とも9月に入ってから発症している。臨床症状は発熱、意識障害、痙攣等脳炎症状等の典型的な脳炎症状がみられたが、全員回復した。なお、3人とも居住地の2km以内に豚舎はない。この中で、2例目の患者は3歳児5ヶ月の幼児であり、日脳ワクチンの勧奨差し控えのためワクチン未接種であった。彼は重篤な脳炎症状を呈していたが、呼吸管理と脳低温療法により約20日間で急性期を脱し、約1ヵ月後に退院した。退院時は右上肢の麻痺が残っていたが、リハビリを経て自由な歩行とコミュニケーションが可能であり、軽いものは右手でつかめるようである⁵⁾。

3名の検査所見では、それぞれ急性期と回復期のペア血清によるHI抗体価の有意の上昇が確認されていた。血清が入手できた1例目の検体は感染研にてIgM捕捉ELISAでも抗体陽性が確認された。また、2006年の1例目の急性期血清及び2例目の急性期リコールから、リアルタイムPCR法及びネステッドRT-PCR法にてJEV遺伝子が検出された。シークエンスの結果、両方とも遺伝子型I型のJEVであり、最近ブタ血清から分離されたJEVと同一の遺伝子型であった。このことから、本県でも現在流行しているJEVの遺伝子型はI型が主流であることが判明した。

考 察

わが国の日脳患者数は国の流行予測事業による調査が開始された1965年度以降、1966年度に2000人を超えピークとなったが、その後減少し、1992年度以降は一桁台で推移している。ところが、近年、久しく患者発生のなかった地域で患者が発生するなど、日本脳炎患者発生状況の変化が報告⁴⁾されている。本県でも2000年以降、患者発生のない年が続いていたが、2004年、2005年に各1名、2006年は3名の患者が発生した。さらに、ブタ血清からのJEV分離成績でも、2005年に3株、2006年には9株が分離されたことから、JEVの環境濃度の再上昇が懸念される。

また、患者とブタから検出されたJEVの遺伝子型は、以前国内で流行していたⅢ型ではなく、すべてI型であった。I型は1990年代初期に日本に侵入したことが判明⁶⁾している。しかし、比較的新しい遺伝子型であるため、Ⅲ型に比べ抗原性や病原性の解析が不十分である。よって、患者やブタ及び蚊などから積極的にウイルス分離を行ない、抗原性や病原性の解析を実施していくことが肝要である。

日本脳炎の予防にはワクチンの接種が最も効果的であるが、2005年5月の日本脳炎ワクチン積極的勧奨の差し控え勧告以来、事実上ワクチンの接種が中止されたままである。今回の調査からも明らかのように、本県ではブタの間で依然としてJEVの流行が認められ、ワクチン未接種の幼児の患者も発生していることから、予防接種の早期再開が望まれる。

参 考 文 献

- 1) 厚生労働省：感染症流行予測調査事業検査術式(2002)。
- 2) 原田誠也，濱洲大輔，荒平雄二，甲木和子：熊本県保健環境科学研究所報，**34**，61 (2004)。
- 3) 原田誠也，濱洲大輔，中島龍一：熊本県保健環境科学研究所報，**35**，71 (2005)。
- 4) 病原微生物検出情報，**24**，149 (2003)。
- 5) 小田修司：日経メディカル，**3**，32 (2007)。
- 6) 病原微生物検出情報，**24**，153 (2003)。