

## 3・2 資料

### 1) 日本脳炎調査(2010年度)

西村 浩一 清田 直子 原田 誠也

#### はじめに

日本脳炎(以下「JE」という。)はJEウイルス(以下「JEV」という。)を保有する蚊(主にコガタアカイエカ)の刺咬によりヒトに感染して起こる急性髄膜脳炎である。1950-60年代は全国で年間1000人を超える患者が発生していたが、1970年代以降には患者数は激減し、1992年以降になるとさらに患者数は減少して一桁台で推移するようになってきた<sup>1-3)</sup>。熊本県内でもここ10年の間では2006年を除くと多くても年間一人の患者発生に止まっている。

当研究所では厚生労働省の感染症流行予測事業の一環としてJEVのヒトにおける感受性調査と肥育ブタの感染源調査を実施している。さらに、夏季以外の時期においても肥育ブタの感染源調査を実施し、それら感染源調査に用いたブタ血清中からのJEV遺伝子検出及びJEV分離を併せて実施した。そこで、これらの調査結果について報告する。

#### 調査方法

##### 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

2010年7月12日から2011年3月25日までの間に、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546頭の放血液(原則として飼育業者別に5検体ずつ)を流行予測事業中の7月上旬~9月上旬の期間は1週間毎に20~35検体(流行予測事業対象感染源調査検体として20検体)を9回、それ以外の期間は一月につき50検体を目途に検体採取した。採取した血液は当研究所に持ち帰り血清を分離後、常法<sup>4)</sup>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 ブタ血清中のJEV分離及び遺伝子検出

HI抗体価測定に用いたブタ血清100 $\mu$ を単層培養したVero9013細胞に接種して3代まで継代培養し細胞変性効果(CPE)の出現を観察した。CPEが観察された細胞上清からJEV RNAを抽出しReal time PCR法で遺伝子型を決定した<sup>5)</sup>。

また、肥育ブタ中でのJEVの活動状況を把握するためブタ血清中からのJEV遺伝子検出をReal time PCR法で行った。

なお、ウイルス分離にはReal time PCR法でJEV遺伝子陽性であった検体のみを用いた。

#### 3 ヒトの中和抗体調査

2010年8月から10月にかけて年齢群別に採取したヒト血清275検体について、ブラック減少法<sup>4)</sup>により中和抗体価を測定した。なお、中和抗体価測定用の抗原はJaGAR#01株を使用した。

また、本年は同一検体をペルオキシダーゼ抗ペルオキシダーゼ(PAP)法<sup>6,7)</sup>でも測定し、フォーカス減少法とブラック減少法との相関関係を調査した。

#### 結果

##### 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

飼育地別のブタ血清中のHI抗体保有状況及びJEV遺伝子検出状況を表1に示した。本年度最も早くHI抗体が確認されたのは、7月12日に合志市の養豚場から搬入されたブタから採取した検体(抗体価1:10)であったが、それ以降この養豚場のブタからはHI抗体が1ヶ月以上確認されなかった。その後、7月26日からHI抗体陽性率は漸次増加し、8月30日には63%(流行予測事業対象検体では100%)となった。

次に、HI抗体価及び2ME感受性抗体保有率を表2に示した。2ME感受性抗体保有率は7月26日に50%を示し、翌週の8月2日には60%と最も高くなった。その後10月までは漸次減少し11月以降は2ME感受性抗体が検出されなくなった。

##### 2 ブタ血清中のJEV分離及び遺伝子検出

Vero9013細胞を用いウイルス分離を行った結果、表1中の網掛けで示した8月9日の植木町のA養豚場から1株及び植木町のB養豚場から2株が、8月23日の鹿本町及び合志市の養豚場からそれぞれ1株ずつJEVが分離された。いずれの養豚場でもJEVはHI抗体陽性率が100%となる前週に分離された。

表 1 飼育地別ブタの HI 抗体保有状況及び JEV 遺伝子検出状況

採血月日	熊本市	熊本市	山鹿市 鹿本町	上天草市	合志市	菊池郡 大津町	その他	HI 抗体 保有率	2ME 感受 性抗体保 有率
	植木町 (A 養豚場)	植木町 (B 養豚場)							
2010 年 7 月 12 日	0/5	0/5	0/5		1/5			5%	
2010 年 7 月 20 日			0/5		0/5	0/5	0/10	0%	
2010 年 7 月 26 日	2/5 (1)	0/5	0/5	0/5	0/5			8%	50%
2010 年 8 月 2 日	2/5 (3)	0/5	0/5				3/9 (2)	21%	60%
2010 年 8 月 9 日	0/5 (3)	0/5 (3)		1/5 (1)	0/5		0/5	4%	
2010 年 8 月 16 日	5/5 (2)	5/5	2/5 (5)	0/5 (1)	0/5		5/5 (1)	57%	41%
2010 年 8 月 23 日	4/5 (2)	5/5	4/5 (3)	3/5 (2)	2/6 (4)		0/5	58%	39%
2010 年 8 月 30 日	5/5	5/5	5/5	1/5 (3)	5/5 (1)		1/10	63%	14%
2010 年 9 月 6 日		5/5	5/5 (1)	3/5	4/5		2/16(2)	53%	16%
2010 年 10 月			5/5	14/20	5/5	5/5	9/10	84%	3%
2010 年 11 月	3/8		9/9	3/5		13/19	9/9	74%	0%
2010 年 12 月	4/5		8/10	9/15		8/15	3/5	64%	0%
2011 年 1 月	0/5		8/10	5/20		5/10	1/5	38%	0%
2011 年 2 月	3/10		2/5	3/15		3/15	1/5	24%	0%
2011 年 3 月	1/9			0/10		0/21	0/10	2%	

HI 抗体陽性数/検査頭数 ( ) 内は JEV 遺伝子検出数 ■ : JEV が分離されたロット

表 2 ブタの HI 抗体価及び 2ME 感受性抗体保有率

採取月日	検査 頭数											HI 抗体 保有率	2ME 感受性 抗体保有 率
		<10	10	20	40	80	160	320	640	1280			
2010 年 7 月 12 日	20	19	1									5%	
2010 年 7 月 20 日	25	25										0%	
2010 年 7 月 26 日	25	23	1		1							8%	50%
2010 年 8 月 2 日	24	19				1	3		1			21%	60%
2010 年 8 月 9 日	25	24	1									4%	
2010 年 8 月 16 日	30	13		1	1	6	8	1				57%	41%
2010 年 8 月 23 日	31	13			5	3	7	3				58%	39%
2010 年 8 月 30 日	35	13			2	8	9	2		1		63%	14%
2010 年 9 月 6 日	36	17			2	3	6	7	1			53%	16%
2010 年 10 月	45	7		1	5	9	13	9	1			84%	3%
2010 年 11 月	50	13	1		2	10	16	8				74%	0%
2010 年 12 月	50	18	7	4	7	5	7	2				64%	0%
2011 年 1 月	50	31	4	7	4	4						38%	0%
2011 年 2 月	50	38	2	4		5	1					24%	0%
2011 年 3 月	50	49	1									2%	

一方、JEV 遺伝子は 7 月 26 日に植木町の A 養豚場のブタから初めて検出され、その後、同養豚場では 8 月 23 日まで検出が続いた。また、植木町の B 養豚場

では 8 月 9 日のみ、鹿本町では 8 月 16 日から 9 月 6 日まで、上天草市では 8 月 9 日から 8 月 30 日まで、合志市では 8 月 23 日及び 8 月 30 日に JEV 遺伝子が検出

表3 ヒトの中和抗体保有率

年齢区分 (歳)	検査数	中和抗体価								中和抗体 保有率
		<10	10	20	40	80	160	320	640	
0-4	52	40	1		3	1	3	2	2	23%
5-9	39	16	1	1	2	2	3	3	11	59%
10-14	25	6				2	5	2	10	76%
15-19	26	4		1	3	1	2	6	9	85%
20-29	27	4		3	4	1	4	4	7	85%
30-39	27	9	2	6	2	2	5	1		67%
40-49	27	12	2	4	6	1	1	1		56%
50-59	27	11	3	7	3	2	1			59%
60	25	10	1	4	4		1	2	3	60%
計	275	112	10	26	27	12	25	21	42	59%

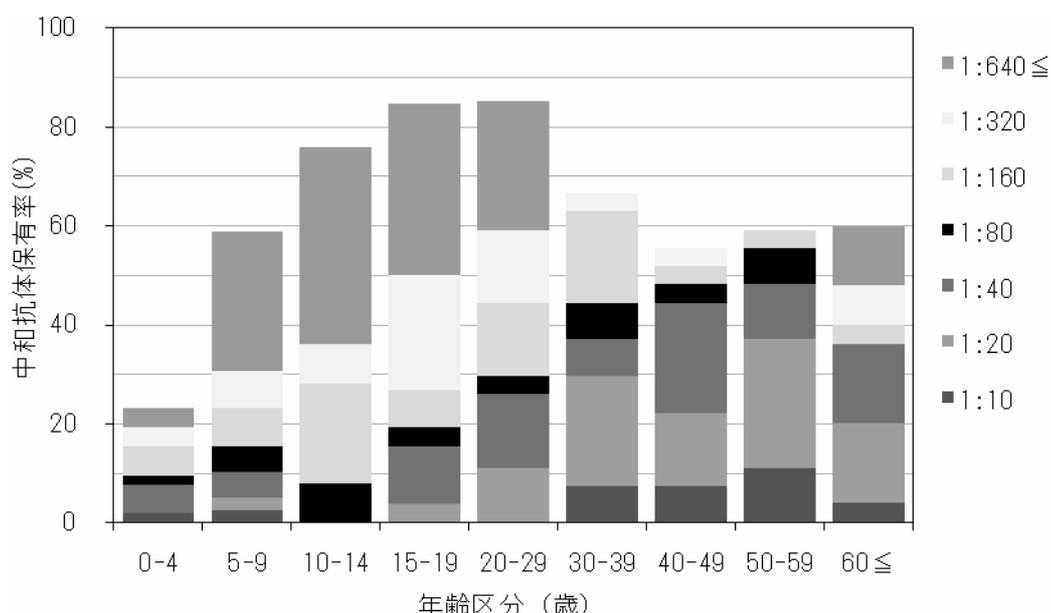


図1 ヒトの中和抗体保有状況

された。なお、分離された JEV の遺伝子型はすべて I 型であった。

### 3 ヒトの中和抗体調査

ヒトは 10 倍以上の JEV 中和抗体価があれば自然感染を阻止できるといわれている。2010 年度にブラック法で測定したヒトの年齢階級別中和抗体価を表 3 に、抗体保有状況を図 1 に示した。中和抗体保有率は年齢とともに増加し 20 歳代で最高の 85% となったが、それ以降は 40 歳代で 56% まで減少したものの、50 歳代以上では 60% 前後に微増した。

また、PAP 法及びブラック法で測定した中和抗体価の比較結果を表 4 に示した。中和抗体がブラック法で

は陰性であり PAP 法では陽性となった検体は 4 検体（全検体の 1.5%）、逆に PAP 法で陰性でブラック法で陽性となった検体は 18 検体（6.7%）であった。

### 考察

JEV に対する HI 抗体が最初に確認されたのは 7 月 12 日に合志市の養豚場から搬入された 5 頭のうちの 1 頭のブタからであり、その抗体価は 1:10 であった。しかし、この養豚場からこれ以降 8 月 22 日まで HI 抗体を保有するブタは確認されなかった。抗体価が 1:10 と低かったことと長期間にわたり HI 抗体を保有するブタが確認されなかったことから、この時検出された HI

表4 ブラック法及びPAP法で測定した中和抗体価の比較

抗体価		ブラック法							計	
		<10	10	20	40	80	160	320		640
PAP法	<10	105	7	9	2					123
	10	4	3	13	7	1				28
	20			3	15	1	1			20
	40				2	9	5	1		17
	80						13	6		19
	160						6	10	6	22
	320							4	16	20
	640								20	20
計		109	10	25	26	11	25	21	42	269

抗体は母豚からの移行抗体であったのではないかと推察された。7月12日の次にHI抗体が確認されたのは7月26日であった。この時期には2ME感受性抗体及びJEV遺伝子も同時に確認された。そのため、県内で実際にJEVが活動を開始したのはこの時期からであったと思われる。

また、飼育ブタ中のJEV遺伝子は植木町のA養豚場では約1ヶ月検出されたのに対してB養豚場では採血期間中1回しか検出されなかった。このため、同じ地域の養豚場でも飼育環境、蚊の発生動向、周辺環境等の違いがJEVの活動に大きく影響しているのではないかと推察された。

ところで、0~4歳の年齢階級の中和抗体保有率は2006年には64%であったが、2005年5月からのJE予防接種の積極的勧奨差し控え勧告後、2007年及び2008年にはそれぞれ4%及び9%と著しく減少した<sup>8,9)</sup>。しかし、2009年は29%、2010年は23%と中和抗体保有率は増加した<sup>10)</sup>。このことは、2009年6月から「乾燥細胞培養日本脳炎ワクチン」の接種が可能となり、また、2010年4月からJE予防接種(第1期)の積極的勧奨が再開されたことが影響しているのではないかと考えられた。

中和抗体をブラック法及びPAP法で測定した結果を比較したところ、PAP法での測定値がブラック法のそれより低い傾向にあった。Watanabeらはブラック法とPAP法とで測定した結果は94.1%の一致率であったと述べている<sup>11)</sup>。今回、当研究所で行った比較では91.8%の一致率であり、Watanabeらの報告より若干低い一致率となった。Watanabeらの結果では中和抗体価がブラック法で陰性でありPAP法で陽性となる例はなかったが、今回当研究所で行った測定結果では269検体中4例あった。この結果が一致率の差に影響が出たものと思われる。しかし、この4例のPAP法で測定した抗体

価はすべて1:10でありフォーカスのカウント次第では陰性となる境界線上にあるものばかりであったことから、Watanabeらの結果とほとんど一致していると考えられた。PAP法はブラック法に比べると一度に多くの検体を測定できる利点があるため、来年度から中和抗体測定にはPAP法を採用したいと考えている。

#### 文献

- 1) 国立感染症研究所感染症情報センター：病原微生物検出情報，30，147-148（2009）。
- 2) 国立感染症研究所感染症情報センター：病原微生物検出情報，24，149-150（2003）。
- 3) 国立感染症研究所感染症情報センター：病原微生物検出情報，20，185-186（1999）。
- 4) 厚生労働省：感染症流行予測調査事業検査術式（2002）。
- 5) 高崎智彦：厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）平成20年度分担研究報告書，81-84（2009）。
- 6) Y.Okuno, T.Fukunaga, M. Tadano, Y. Okamoto, T. Ohnishi and M. Takagi, Arch. Virol. 86, 129-135（1985）。
- 7) 国立感染症研究所：PAP法を応用したフォーカス計数法による日本脳炎中和抗体価測定法〔第六版〕。
- 8) 原田誠也，松尾繁，中島龍一：熊本県保健環境科学研究所報，37，82（2007）。
- 9) 西村浩一，原田誠也：熊本県保健環境科学研究所報，38，58（2008）。
- 10) 清田直子，西村浩一，原田誠也：熊本県保健環境科学研究所報，39，64（2009）。
- 11) Kanako Watanabe, Chika Hirokawa, Miyako Kon, Tsutomu Tamura and Makoto Nishikawa, Jpn. J. Infect. Dis., 61, 424（2008）。