

資 料

## 2016 年度感染症流行予測調査結果 (日本脳炎, インフルエンザ, 風疹, 麻疹) の概要

矢野拓弥, 楠原 一, 中野陽子,  
小林章人, 赤地重宏

キーワード: 感染症流行予測調査, 日本脳炎, インフルエンザ, 風疹, 麻疹

### はじめに

本事業は 1962 年から「伝染病流行予測調査事業」として開始している。その目的は集団免疫の現状把握および病原体の検索等を行い、各種疫学資料と併せて検討することによって、予防接種事業の効果的な運用を図り、さらに長期的視野に立ち総合的に疾病の流行を予測することである。その後、1999 年 4 月「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」の施行に伴い、現在の「感染症流行予測調査事業」へと名称変更された。ワクチンによる予防可能疾患の免疫保有調査を行う「感受性調査」およびヒトへの感染源となる動物の病原体保有を調査する「感染源調査」を国立感染症研究所および県内関係機関との密接な連携のもとに実施している。これまでの本県の調査で、晩秋から初冬に日本脳炎ウイルス (JEV) に対する直近の感染を知る指標である 2-メルカプトエタノール (2-ME) 感受性抗体が出現<sup>1)</sup>したことなど興味深い現象が確認されてきた。また、以前は伝染病流行予測調査事業内で実施されていたインフルエンザウイルス調査において、1993/94 シーズンに分離されたインフルエンザウイルス B 型 (B/三重/1/93 株) が、ワクチン株に採用された等の実績がある。ヒトの感染症における免疫状態は、各個人、地域等、さまざまな要因で年毎に異なる。本年度採取できた血清は、同一人であっても毎年の免疫状態とは必ずしも同じではないことが推察される。これらのことはヒト血清だけでなく動物血清についても同様であり、毎年の感染症流行予測調査事業における血清収集は重要である。集団免疫の現状把握と予防接種事業の促進等、長期的な流行予測調査が感染症対策には不可欠であるので、本調査のような主要疾患についての免疫状態の継続調査は、感染症の蔓延を防ぐための予防対策として必要性は高い。以下に、2016 年度の感染症流行予測調査 (日本脳炎, インフルエンザ, 風疹, 麻疹) の結

果について報告する。

### 方 法

#### 1. 調査材料

##### 1) 豚の日本脳炎感染源調査材料

日本脳炎感染源調査の対象は、三重県志摩市磯部町近郊の豚舎で飼育された約 6 ヶ月齢の肉豚である。2016 年 6 月 24 日から 9 月 30 日の間に採血した 90 頭を調査材料とした (表 1)。なお、2014 年度まで対象としていた三重県度会郡玉城町内の養豚場が閉鎖もしくはウインドウレス化により、調査対象として良好でないと考えられたため、2015 年度より志摩市磯部町の開放型豚舎で飼育された豚を対象とし調査を継続することとした。

##### 2) 日本脳炎・ヒトインフルエンザ・風疹・麻疹感受性調査材料

ヒトの日本脳炎・インフルエンザ・風疹・麻疹感受性調査は、2016 年 4～9 月に県内の病院等で、採取された男性 130 名、女性 149 名の合計 279 名の血清検体を用いて抗体価測定を行った (表 2～5)。なお、感染症流行予測調査事業の実施要項に基づき採血時に本人または保護者から書面で本調査 (検体および対象者情報の使用) に同意を得た。

なお、日本脳炎の抗体価の測定には PAP (Peroxydase-antiperoxydase) 複合体を用いたフォーカス計数法を用い、インフルエンザ、風疹は赤血球凝集抑制 (Hemagglutination inhibition : HI) 試験、麻疹は粒子凝集反応 (Particle Agglutination : PA) 法を用いた。

##### 3) 豚のインフルエンザ感染源調査材料

三重県の中部に位置する津市で飼育された約6ヵ月齢の豚を対象とした。2016年11月29日(40頭)、2017年3月8日(60頭)に採取した計100頭の鼻腔拭い液を調査材料とした。

## 2. 測定方法

### 1) 日本脳炎 HI 抗体測定

豚の動脈血をと殺時に試験管に採血し、遠心分離後の血清を HI 抗体測定に供した。被検血清はアセトン処理を行い、非特異的な凝集抑制物質を除去した後、100%ガチョウ血球 50 $\mu$ L を加え 4 $^{\circ}$ C で 15 分間静置した。その後 3,000rpm, 5 分間遠心分離した上清を測定用試料とした。試料をマイクロプレートの第 1 穴目に 25 $\mu$ L 入れ、第 2 穴目から 25 $\mu$ L ずつの 2 倍階段希釈を行い、JEV の HA 抗原 (JaGAr 01 株; デンカ生研製) を 4HA 単位に調製し 25 $\mu$ L ずつ加えた。4 $^{\circ}$ C にて一晚感作後、0.33% ガチョウ血球を 50 $\mu$ L 添加し、37 $^{\circ}$ C 孵卵器にて 60 分間静置後判定した。HI 抗体 10 倍以上を陽性とし、40 倍以上の血清について、2-ME 処理を行い、処理後の抗体価が処理前の 1/8 以下に減じたものを 2-ME 感受性抗体陽性とした<sup>2)</sup>。

### 2) ヒトの日本脳炎中和抗体測定

非動化 (56 $^{\circ}$ C, 30 分間) した被検血清 8 $\mu$ L を細胞培養液 72 $\mu$ L で 10 倍希釈し、中和抗体測定用血清とした。処理血清を 2 倍階段希釈し、日本脳炎ウイルス (Beijing-1 株; 100FFU/25 $\mu$ L) を処理血清 40 $\mu$ L に対して等量加えた。次に 37 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させた後、25 $\mu$ L を Vero (Osaka 株) 細胞に接種し、37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub> 下で 46 時間培養後に 99.5% エタノールで固定した。作成した固定細胞プレートを用いて PAP 複合体を用いたフォーカス計数法により測定した<sup>2,3)</sup>。

### 3) 豚からのインフルエンザウイルス分離

豚の鼻腔拭い液を 3,000rpm で 10 分間遠心分離し、上清から RNA を抽出し RT-PCR 法<sup>4)</sup> によるインフルエンザウイルス M 遺伝子の検出、あるいはイヌの腎臓由来細胞である Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞に上清を接種し、ウイルス分離を実施した<sup>5)</sup>。

### 4) ヒトインフルエンザ HI 抗体測定

被検血清 100 $\mu$ L に RDE (Receptor destroying enzyme) II 「生研」 (デンカ生研製) 300 $\mu$ L を

加えて 37 $^{\circ}$ C, 20 時間処理した。次に非動化 (56 $^{\circ}$ C, 60 分間) 後、滅菌生理食塩水を 600 $\mu$ L 添加し、100% ニワトリ血球 100 $\mu$ L を加え、室温で 60 分間静置した。その後 2,000rpm, 20 分間遠心分離し、その上清を HI 測定用処理血清とした。処理血清を 25 $\mu$ L ずつの 2 倍階段希釈を行い、不活化 HA 抗原 (4HA 単位) を 25 $\mu$ L ずつ加えた。室温で 60 分間静置後、使用赤血球 (0.5% ニワトリ赤血球) を 50 $\mu$ L 添加し 4 $^{\circ}$ C で 45 分間静置後に判定した。不活化 HA 抗原は A/California/7/2009 (H1N1pdm2009), A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2), B/Texas/2/2013 (ビクトリア系統), B/Phuket/3073/2013 (山形系統) を用いた。HI 抗体価は HI を起こした最高希釈倍数とし、抗体価 40 倍以上を陽性とした<sup>5)</sup>。なお、A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) の HI 試験には、0.75% モルモット赤血球を使用し 4 $^{\circ}$ C で 60 分間静置後に判定した。

### 5) 風疹 HI 抗体測定

風疹 HI 試験は被検血清 200 $\mu$ L に PBS (-) 600 $\mu$ L, 25% カオリン 800 $\mu$ L を加え混合後、室温で 20 分間静置した。2,000rpm, 20 分間遠心分離した。これに 50% 固定ニワトリ血球 50 $\mu$ L を加え、氷水中に 60 分間静置した。その後 2,000rpm, 20 分間遠心分離した上清を HI 測定用処理血清とした。処理血清を 25 $\mu$ L ずつの 2 倍階段希釈を行い、風疹 HA 抗原 (デンカ生研製) を 4 単位に調製後、25 $\mu$ L を加えて室温で 60 分間静置して抗原抗体反応を行った。0.25% 固定ニワトリ血球 50 $\mu$ L を加え 4 $^{\circ}$ C で 60 分間静置後判定した。HI 抗体価は HI を起こした最高希釈倍数とし、抗体価 8 倍以上を陽性と判定した<sup>6)</sup>。

### 6) 麻疹 PA 抗体測定

麻疹抗体の測定には市販キット (富士レビオ: セロディア-麻疹) の PA 法を用いた。被検血清を第 1 穴目に 25 $\mu$ L 入れ、第 12 穴目まで 2 倍階段希釈を行った。未感作粒子 25 $\mu$ L を第 2 穴目に、感作粒子 25 $\mu$ L を第 3 穴~第 12 穴目に加えた。マイクロプレートを混和し、120 分間静置後に判定した。16 倍以上を陽性とした<sup>7)</sup>。

## 結 果

感染症流行予測調査事業では、人の年齢別抗体調査による免疫保有状況 (感受性) および動

物（豚）に潜伏している病原体（感染源）の把握を目的として調査を実施している。2016年度に実施した調査結果は以下のとおりである。

### 1. 豚の日本脳炎 HI 抗体および 2-ME 感受性抗体の経時的推移

JEV に対する豚の血中 HI 抗体および 2-ME 感受性抗体の経時的推移を表 1 に示した。2016 年 6 月 24 日から 9 月 30 日の間に採血した豚（90 頭）を調査した結果、HI 抗体保有豚（10 倍以上）は 9 月 2 日以降の豚から 7 頭確認された。

最近の感染か否かを把握するための指標である 2-ME 感受性抗体は 9 月 30 日に採取された 2 頭から検出された。

### 2. ヒトの日本脳炎年齢別中和抗体保有状況

年齢群別の日本脳炎中和抗体保有率は 0-4 歳 34.1%、5-9 歳 100%、10-14 歳 95.8%、15-19 歳 90.3%、20-29 歳 90%、30-39 歳 68.2%、40-49 歳 28%、50-59 歳 5.3%、60 歳以上は 20%であった（表 2）。

### 3. 豚からのインフルエンザウイルス検出状況

2016 年 11 月 29 日（40 頭）および 2017 年 3 月 8 日（60 頭）に調査（豚：計 100 頭）を行ったが、インフルエンザウイルス遺伝子の検出もしくはウイルスは分離されなかった。

### 4. ヒトインフルエンザ年齢別 HI 抗体保有状況

2016/2017 シーズンのインフルエンザ流行期前の年齢別 HI 抗体保有率（40 倍以上）は A/California/ 7/2009（A/H1N1pdm2009）で 0-4 歳 22%、5-9 歳 81%、A/Hong Kong/4801/2014（A/H3N2 型）で 0-4 歳 12.2%、5-9 歳 52.4%であった。B 型の B/Texas/2/2013（ビクトリア系統）は 0-4 歳 4.9%、5-9 歳 0%で、B/Phuket/3073/2013（山形系統）は 0-4 歳 2.4%、5-9 歳 9.5%であった（表 3）。

### 5. 風疹年齢別 HI 抗体保有状況

男女合計の年齢群別の風疹 HI 抗体保有率は 0 歳 0%、1-4 歳 88.9%、5-9 歳 100%、10-19 歳 94.8%、20-29 歳 100%、30-39 歳 77.3%、40-49 歳 84%、50 歳以上は 73.5%であった。採血者全体の HI 抗体保有率は 88.5%で、男女別の抗体保有率は男性 87.7%、女性 89.3%であった（表 4）。

### 6. 麻疹年齢別 PA 抗体保有状況

年齢別の麻疹 PA 抗体保有率は 2-3 歳から 25-29 歳群および 40 歳群以上は 100%と高く推移していた。他の年齢群は 0-1 歳群 65%、30-39 歳群 95.5%で全体では 97.1%であった（表 5）。

### 謝 辞

感染症流行予測調査事業の実施にあたって、本事業の趣旨をご理解いただいた協力者 279 名（男性 130 名、女性 149 名）の方々に厚く御礼申し上げます。

### 文 献

- 1) 川田一伸, 福田美和, 小林真美, 矢野拓弥, 他:三重県における過去数年間の日本脳炎流行予測調査成績の解析, 三重衛研年報第 42 号 69-73 (1996).
- 2) 厚生労働省健康局結核感染症課, 国立感染症研究所 感染症流行予測調査事業委員会:日本脳炎, 感染症流行予測調査検査術式 27-39 (2002).
- 3) 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 (平成 18 年).
- 4) 国立感染症研究所:インフルエンザ診断マニュアル(第 3 版) (<http://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Influenza2014.pdf>)
- 5) 厚生労働省健康局結核感染症課, 国立感染症研究所 感染症流行予測調査事業委員会:インフルエンザ, 感染症流行予測調査検査術式 9-26 (2002).
- 6) 厚生労働省健康局結核感染症課, 国立感染症研究所 感染症流行予測調査事業委員会:風疹, 感染症流行予測調査検査術式 40-45 (2002).
- 7) 厚生労働省健康局結核感染症課, 国立感染症研究所 感染症流行予測調査事業委員会:麻疹, 感染症流行予測調査検査術式 47-52 (2002).

表 1. 日本脳炎ウイルスに対する豚 HI 抗体および 2-ME 感受性抗体保有状況

採血日 (2016年)	調査数	HI抗体価							HI抗体	2-ME感受性抗体	
		< 10	10	20	40	80	160	320	≥ 640	陽性数	陽性数/検査数
6月24日	10	10							0		
7月 1日	10	10							0		
7月 8日	10	10							0		
7月15日	10	10							0		
7月22日	10	10							0		
8月 5日	10	10							0		
8月12日	10	10							0		
9月 2日	10	9						1	1	0/1	0
9月30日	10	4					2	4	6	2/6	33
計	90	83					2	5	7	2/7	28.6

表 2. 日本脳炎ウイルスに対するヒトの中和抗体保有状況

年齢区分	調査数	陽性数
0-4歳	41	14 (34.1%)
5-9歳	21	21 (100%)
10-14歳	24	23 (95.8%)
15-19歳	72	65 (90.3%)
20-29歳	40	36 (90%)
30-39歳	22	15 (68.2%)
40-49歳	25	7 (28%)
50-59歳	19	1 (5.3%)
60歳～	15	3 (20%)
合計	279	185 (66.3%)

( )内は抗体保有率.

表 3. ヒトインフルエンザ年齢別 HI 抗体保有状況 (40 倍以上)

年齢区分	調査数	陽性数			
		A/California /7/2009 (A/H1N1pdm2009)	A/Hong Kong /4801/2014 (A/H3N2亜型)	B/Texas/2/2013 (ビクトリア系統)	B/Phuket/3073/2013 (山形系統)
0-4歳	41	9(22%)	5(12.2%)	2(4.9%)	1(2.4%)
5-9歳	21	17(81%)	11(52.4%)	0(0%)	2(9.5%)
10-14歳	24	16(66.7%)	15(62.5%)	3(12.5%)	12(50%)
15-19歳	72	65(90.3%)	44(61.1%)	15(20.8%)	46(63.9%)
20-29歳	40	32(80%)	17(42.5%)	3(7.5%)	27(67.5%)
30-39歳	22	17(77.3%)	9(40.9%)	3(13.6%)	9(40.9%)
40-49歳	25	13(52%)	10(40%)	4(16%)	8(32%)
50-59歳	19	10(52.6%)	4(21.1%)	3(15.8%)	4(21.1%)
60歳～	15	2(13.3%)	3(20%)	0(0%)	4(26.7%)
合計	279	181(64.9%)	118(42.3%)	33(11.8%)	113(40.5%)

( )内は抗体保有率.

表 4. 風疹年齢別 HI 抗体保有状況

年齢区分	男 性		女 性		合計(男性・女性)	
	調査数	陽性数	調査数	陽性数	調査数	陽性数
0歳	2	0(0%)	3	0(0%)	5	0(0%)
1-4歳	22	19(86.4%)	14	13(92.9%)	36	32(88.9%)
5-9歳	8	8(100%)	13	13(100%)	21	21(100%)
10-19歳	42	40(95.2%)	54	51(94.4%)	96	91(94.8%)
20-29歳	20	20(100%)	20	20(100%)	40	40(100%)
30-39歳	9	7(77.8%)	13	10(76.9%)	22	17(77.3%)
40-49歳	10	6(60%)	15	15(100%)	25	21(84%)
50歳～	17	14(82.4%)	17	11(64.7%)	34	25(73.5%)
合計	130	114(87.7%)	149	133(89.3%)	279	247(88.5%)

( )内は抗体保有率.

表 5. 麻疹年齢別 PA 抗体保有状況

年齢区分	調査数	陽性数
0-1歳	20	13(65%)
2-3歳	13	13(100%)
4-6歳	15	15(100%)
7-9歳	14	14(100%)
10-14歳	24	24(100%)
15-19歳	72	72(100%)
20-24歳	23	23(100%)
25-29歳	17	17(100%)
30-39歳	22	21(95.5%)
40歳～	59	59(100%)
合計	279	271(97.1%)

( )内は抗体保有率.