

宮崎県の感染症発生動向調査事業におけるウイルス検出報告（2008年）

三浦美穂・岩切章^{*1}・山本正悟・塩山陽子^{*2}

Infectious Agents (viruses) Surveillance Report in Miyazaki Prefecture, 2008

Miho MIURA, Akira IWAKIRI, Seigo YAMAMOTO, Yoko SHIOYAMA

Abstract

In the surveillance of infectious agent (viruses), out of the 369 samples collected from sentinel clinics and hospitals, 122 viruses were detected by polymerase chain reaction or isolated in Miyazaki Prefecture in 2008.

During the 2008/2009 Influenza season, 58 influenza viruses were detected or isolated. The determined type of Influenza virus was A(H1), A(H3) and type B, and it was 33 (19.1%), 16 (9.3%) and 9 (5.2%), respectively.

Nineteen Echovirus type 5 were isolated from Children equal to or less than 4 years old that showed pyrexia and anthera. It was detected after an interval of 11 years since nine Echovirus type 5 were isolated in Miyazaki Prefecture in 1997.

Seventeen Coxsackievirus B5 were isolated from the aseptic meningitis patient. Twelve Coxsackievirus A16 were isolated from The foot-and-mouth disease patient.

Key words : Influenza virus, Echovirus 5, Coxsackievirus B5, Coxsackievirus A16

はじめに

2008/2009 インフルエンザシーズンは、オセルタミビル（商品名タミフル）に耐性のAH1型インフルエンザウイルスが全国各地から報告された。迅速診断キットでA型インフルエンザと診断された患者の60～70%はタミフル耐性のAH1型インフルエンザウイルスに感染していることから、医療機関における抗ウイルス薬を用いた治療に大きな影響が出ている¹⁾。

2008年1月～12月迄にウイルスの検索を目的として、369件の検体が病原体定点と協力医療機関から提供され、122株のウイルスが分離・検出された。検出数の多かったインフルエンザウイルス、エコーウイルス5型、コクサッキーウイルスB5型、コクサッキーウイルスA16型について、宮崎

県における検出数および全国との比較を行ったので報告する。なお、インフルエンザウイルスについては、流行期間の関係で2008/2009シーズンについて解析を行った。

材料と方法

1 分離材料

髄液は検体をそのまま分離に用いた。咽頭ぬぐい液、鼻汁、眼瞼結膜ぬぐい液、水疱液、気管内吸引液は細胞培養用維持培地 [1%牛胎児血清加Eagle's MEM（日水製薬）にペニシリン、ストレプトマイシンをそれぞれ100単位、100 γ /mlの割合で加えたもの] に浮遊させ、3000rpm 5分間遠心した上清を分離材料とした。便は細胞培養用維持培地で10%乳剤とした後、3000rpm 20分間遠心

微生物部 ^{*1}現 日向食肉衛生検査所 企画管理課 ^{*2}現 高千穂保健所

し、遠心上清を有機溶媒処理した後、さらに 3000rpm 20 分間遠心した上清を分離材料とした。なお、検体は接種時まで -80°C で保存した。

2 細胞

Caco-2, Vero, HEP-2, RD-18S 細胞の 4 種類を常時使い、麻疹が疑われる場合は Vero/hSLAM 細胞、インフルエンザウイルスが疑われる場合には一部 MDCK 細胞も併用した。

3 分離

96 穴マイクロプレート法で行った。単層培養した Caco-2, Vero, HEP-2, RD-18S 細胞に検体を 1 穴あたり $30\mu\text{l}$ ずつ接種して 36°C 約 30 分間吸着後、維持培地を $100\mu\text{l}$ ずつ加え、 CO_2 インキュベーターで 1 週間培養した。1 週間培養しても細胞変性効果 (CPE) の出現しなかったものについては、3 回凍結融解を行い、新しい細胞に継代した。2~5 代継代しても CPE が出現しなかったものはウイルス分離陰性とした。

4 同定および検出

分離ウイルスの同定は、中和試験、赤血球凝集抑制試験 (HI 試験)、ラテックス凝集試験、直接蛍光抗体法、および遺伝子検査で行った。

なお、分離されたインフルエンザウイルスの抗原性は国立感染症研究所から配布された抗 A/Brisbane/59/2007 (H1N1・ワクチン株)、抗 A/Uruguay/716/2007 (H3N2・ワクチン株)、抗 B/Malaysia/2506/2004 (ビクトリア系統)、抗 B/Brisbane/59/2007 (山形系統・ワクチン株) フェレット免疫血清を用いた HI 試験で調べた。

ノロウイルスについては、マニュアル (平成 15 年 11 月 5 日付食安監発第 1105001 号) に従いリアルタイム PCR 法で検査を行った。

麻疹ウイルスの同定と遺伝子型別は麻疹診断マニュアル (第 2 版, 平成 20 年 7 月) に従い、NP 遺伝子をターゲットとした RT-PCR 法で検査を行い、陽性のものは塩基配列を調べた。

エンテロウイルスの遺伝子検査は、Oberste 等の方法²⁾ と篠原等の報告³⁾ に従い、RT-PCR 法で行った。

A 群ロタウイルスの同定と血清型別遺伝子検査は、ウイルス性下痢症診断マニュアル (第 3 版,

平成 15 年 7 月) に従い、RT-PCR 法で行った。

ポリオウイルス分離株については、WHO の指針⁴⁾ に基づきワクチン株の VP1 全領域と塩基配列を比較した。

分離・検出されたウイルスの遺伝子解析は、ダイレクトシークエンス法で塩基配列を決定し、日本 DNA データバンク (DDBJ) の BLAST を用いて相同性検索を行い、CLUSTAL W を利用して行った。

結果および考察

1 インフルエンザウイルス

2008/2009 シーズンの定点あたり患者報告数の推移とウイルス分離状況は Fig. 1 に示すとおりであった。患者報告数は、2009 年第 2 週に流行発生注意報基準値 (10.0) を超え、第 4 週にピークとなった。第 8 週には 13.96 まで減少したが、その後増加し第 14 週まで注意報基準値を超えた。

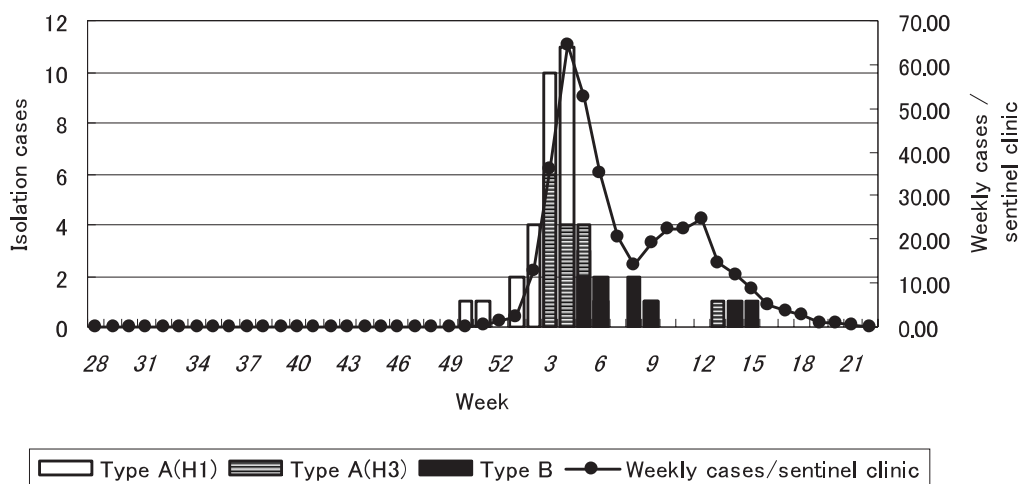
シーズン中に分離、検出されたのは、AH1 型 (ソ連型) が 33 検体、AH3 型 (香港型) が 16 検体、B 型が 9 検体の計 58 検体であった。2008 年第 50 週から 2009 年第 9 週に AH1 型が分離、検出された。AH3 型は遅れて 2009 年第 3 週から第 13 週に分離、検出された。B 型は 2009 年第 5 週から第 15 週に分離、検出された。

2008/2009 シーズンは AH1 型が 2 シーズン続けて流行の主流であったが、2007/2008 シーズンと大きく異なり、ノイラミニダーゼ (NA) 蛋白の 275 番目のアミノ酸がヒスチジンからチロシン (H275Y) に置換し、オセルタミビル耐性の AH1 型インフルエンザウイルスが全国的に蔓延した。耐性株の同定は、一般的に NA 遺伝子の塩基配列を解析し、耐性の遺伝子マーカー H275Y の有無を検討するものである。2007/2008 シーズンの耐性株の出現頻度は全国で 2.6% と極めて低い状況であったが、2008/2009 シーズンは全国各地における AH1 型分離株のほぼ 100% がオセルタミビル耐性株となっていた¹⁾。本県においても、2007/2008 シーズンには 0% であったが、2008/2009 シーズンには検査した 19 検体すべてがオセルタミビル耐性であった。分離された 14 株について HI 試験で抗原性解析を行った結果、ほとんどの耐性株の抗原性は、2008/2009 シーズンのワクチン株 (A/Brisbane/59/2007) に対して、8 倍以上と大

大きく変異していた。しかし、国立感染症研究所の行った抗原性解析の結果では、抗原性はワクチン株に類似しており、インフルエンザワクチンはオセルタミビル耐性 AH1 型インフルエンザウイルスにも有効とされた¹⁾。

AH3 型インフルエンザについては、12 株について抗原解析した結果、ワクチン株に類似していた。B 型のワクチン株は山形系統であり、分離された B 型 7 株はすべて山形系統であったが、抗原性はワクチン株に対して大きく変異していた。

Fig.1 Weekly incidence of influenza per sentinel clinic and weekly cases of influenza virus isolation from the 28th week of 2008 through the 22nd week of 2009 in Miyazaki



2 エコーウイルス 5 型

2008 年はエコーウイルス 5 型が 19 株分離された。本県では 1997 年に 6 株分離されて以来、11 年ぶりの検出であった。4 月から 7 月にかけて分離され、ピークは 6 月であった (Table 1)。全国的には、2006 年に 17 株、2007 年に 13 株、2008 年に 36 株と分離数が多くなっていた。

主な臨床症状は、発熱 15 例 (78.9%)、発疹 13 例 (68.4%) であった。年齢は、0 歳 11 例 (57.9%)、1 歳 4 例 (21.1%)、2 歳 2 例 (10.5%)、4 歳 2 例 (10.5%) で、すべて 4 歳以下であった。

分離株は、Caco-2、RD-18S 細胞で CPE が認められ、国立感染症研究所より分与された EP95 パネル抗血清による中和試験で同定可能であった。

3 コクサッキーウイルス B5 型

日本では、毎年夏季に無菌性髄膜炎の流行がみられ、例年、起因ウイルスはエコーウイルス、コクサッキー B 群などのエンテロウイルスが 80~90% を占める。エンテロウイルスによる髄膜炎は基本的に予後良好であるが、まれに急性脳炎を起こすことがある。エコーウイルスの各型と EV71 は数年~数十年の間隔を空けて流行する特徴があ

るが、コクサッキーウイルス B2~5 の各型は毎年コンスタントに分離されている⁵⁾。

本県では、2008 年にコクサッキーウイルス B5 型が 17 株分離された。臨床症状は無菌性髄膜炎が 5 例 (52.9%) と最も多く、年齢は 0 歳 4 例、4 歳 1 例と低年齢からの分離が多くなっていた。無菌性髄膜炎以外では、手足口病 2 例、夏風邪 1 例、肺炎 1 例などであった。

4 コクサッキーウイルス A16 型

コクサッキーウイルス A16 型は、エンテロウイルス 71 型とともに手足口病の主要な原因ウイルスのひとつで、毎年数多く分離されている。手足口病は、口唇粘膜および手足の指先にあらわれる発疹を特徴とする発熱性疾患で、予後のよい一般的なエンテロウイルス感染症である⁶⁾。

本県での 2008 年のコクサッキーウイルス A16 型の分離数は 12 株であった。11 例が手足口病と診断されており、残りの 1 例もエンテロウイルス感染疑いであった。コクサッキーウイルス A16 型の同定は、単味抗血清を用いた中和試験で行った。中和試験で同定できなかった 3 株は、PCR およびシーケンスを行い同定した。

エンテロウイルス 71 型については、2008 年は分離されなかった。

1990 年代後半以降、東アジア地域では、エンテロウイルス 71 型による大規模な手足口病の流行時に小児の急性死症例が多発し、大きな社会問題となっている。2008 年の 3～6 月には、中国本土で、大規模な手足口病が発生し、短期間に 20 名以上の急性死例が報告された。エンテロウイルス 71 型による手足口病は、コクサッキーウイルス A16 型による手足口病の臨床症状と区別できないが、エンテロウイルス 71 型による手足口病流行時には、無菌性髄膜炎や脳炎等、中枢神経合併症の頻度が高くなることから、我が国の調査でも明らかになっている。そのため、手足口病重症例・急性脳炎のサーベイランスが重要である⁶⁾。

謝辞

2008 年の感染症発生動向調査事業において検査材料を提供して下さった、感染症発生動向調査事業定点医療機関ならびに献体採取にご協力いただいた医療機関の諸先生方に深謝いたします。

感染症発生動向調査協力医療機関（50 音順）
池田台クリニック、県立日南病院、県立延岡病院、
県立宮崎病院、済生会日向病院、清和会共立病院、
高嶋医院、三宅小児科、宮崎大学医学部附属病院
小児科、宮崎市小児診療所、わたなべ小児科

参考文献

- 1) 国立感染症研究所：＜速報＞2008/09 インフルエンザシーズンにおけるインフルエンザ（A/H1N1）オセルタミビル耐性株（H275Y）の国内発生状況〔第 2 報〕，病原微生物検出情報，Vol. 30 No. 4（No. 350），101-106，（2009）
- 2) Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA: Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1, J Clin Microbiol, 37 (5):1288-1293, (1999)
- 3) 篠原 美千代, 内田 和江, 島田 慎一, 後藤 敦: コクサッキーウイルス A16 型及びエンテロウイルス 71 型の検査法の検討, 感染症学雑誌, 73 (8), 749-757, (1999)
- 4) 清水 博之, 吉田 弘, 宮村 達男: 野生株ポリオウイルスの実験室封じ込めに関する WHO 世界行動計画 第 2 版, ウイルス, 55 (1), 161-178, (2005)
- 5) 国立感染症研究所：＜特集＞無菌性髄膜炎関連エンテロウイルスの動向 2008 年 12 月現在, 病原微生物検出情報, Vol. 30 No. 1 (No. 347), 1-3, (2009)
- 6) 国立感染症研究所：東アジアにおけるエンテロウイルス 71 型感染症の流行, 病原微生物検出情報, Vol. 30 No. 1 (No. 347), 9-10, (2009)

Table 1 Monthly changes of isolation number of viruses in Miyazaki Prefecture, 2008

Virus	Month												Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Group Enterovirus						1							1
Adenovirus 1			1										1
Adenovirus 2						1							1
Adenovirus 3							1						1
Coxsackievirus A16			1	3	5	1	2						12
Coxsackievirus B5				2	2		2	5	6				17
Echovirus 5				1	7	8	3						19
Echovirus 6						2	1			3	2		8
Echovirus 30							2	1					3
Herpes simplex virus 1						1	1				1		3
Varicella-zoster virus					1	2							3
Influenza virus A H1	25	7										2	34
Influenza virus A H3	1	5	2				1						9
Influenza virus B	1												1
Measlesvirus									1				1
Orthoreovirus													0
Norovirus G2	3		2										5
A group Rotavirus 1			1										1
Poliovirus 3										2			2
Total	30	12	7	6	15	16	13	6	7	5	3	2	122

Table 2 Detection number of viruses in Miyazaki Prefecture, 1999–2008

	Year										Total	
	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008		
Group Enterovirus											1	1
Adenovirus 1	3	1	3	4	1	4	2	2			1	21
Adenovirus 2	4	6	8	3	3	6	4	1			1	36
Adenovirus 3	12	2	39	11	2	24	1	2			1	94
Adenovirus 4	2		1	1								4
Adenovirus 5	2	2	2	2			1					9
Adenovirus 6		3				1						4
Adenovirus 7	1											1
Adenovirus 11		1					1					2
Adenovirus NT			2	1	2							5
Coxsackievirus A 2	1		1		2							4
Coxsackievirus A 4		5	3	1	1							10
Coxsackievirus A 5				1								1
Coxsackievirus A 6	8		4	1	2	2			2			19
Coxsackievirus A 8		4		1								5
Coxsackievirus A 9			13	1	38			14				66
Coxsackievirus A 10		5			1							6
Coxsackievirus A 16	4	2	20	6	17	19	2			12		82
Coxsackievirus A 24v					3							3
Coxsackievirus B 2	1			4			1	1				7
Coxsackievirus B 3	1	1	9				9					20
Coxsackievirus B 4	6			2					7			15
Coxsackievirus B 5		2			4				4	17		27
Echovirus 3			9				1					10
Echovirus 4		2										2
Echovirus 5										19		19
Echovirus 6	10					4				8		22
Echovirus 9	1	114			33		3	2				153
Echovirus 11	7		8		1							16
Echovirus 13				66								66
Echovirus 16					12	13						25
Echovirus 17	1											1
Echovirus 18	4	8	49				5	46				112
Echovirus 22												0
Echovirus 25	1	30				8			2			41
Echovirus 30					1	2		3	3	3		12
Poliovirus 1	4		3	1	1			2				11
Poliovirus 2	2	1	2	3	2							10
Poliovirus 3	2	2		1	1				2	2		10
Enterovirus 71	15	4			1	3		7	6			36
Parvovirus												0
Herpes simplex virus 1	12	7	12	11	5	9	3	3	1	3		66
Varicella-zoster virus										3		3
Influenza virus A H1		60	19	27			1		23	34		164
Influenza virus A H3	67	29	47	59	37	23	18	37	18	9		344
Influenza virus B	38		78	12	23	4	18	32	7	1		213
RS virus		1			2		2					5
Measles virus	2	1	5	2	24				8	1		43
Mumps virus			3	16			3	1				23
Rubella virus			1									1
Rotavirus	3	4			1		3		1	1		13
Astrovirus												0
Norovirus	5		1		8	3	15	24	21	5		82
Orthoreovirus									1			1
Total	219	297	342	237	228	125	93	177	106	122		1946