

# 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（2014年）

三浦美穂 伊東愛梨 保田和里 野町太朗 元明秀成 永野喬子<sup>1)</sup>

## Infectious Agents (viruses) Surveillance Report in Miyazaki Prefecture, 2014

Miho MIURA, Eri ITO, Asato YASUDA, Taro NOMACHI, Hidenari GANMYO, Kyoko NAGANO

### 要旨

2014年に県内の医療機関より感染症発生動向調査の検体が562件搬入され、249件のウイルスが分離・検出された。2014/2015シーズンに検出されたインフルエンザウイルスは、AH1pdm09が1件、AH3亜型が43件、B型が1件の計45件であった。

麻疹ウイルスが4例10件分離・検出された。フィリピンに渡航歴のある患者とその家族も含まれていた。また、A型肝炎ウイルスが2011年以来3年ぶりに13件検出された。

2014年は、ほぼ1年を通してヒトライノウイルスが検出され、10月～12月にRSウイルスが検出された。ヒトライノウイルスとRSウイルスの重複感染が5例あった。

キーワード： インフルエンザウイルス，麻疹ウイルス，A型肝炎ウイルス

### はじめに

本県では1981年7月から感染症発生動向調査事業を開始し、感染症の発生状況の正確な把握と解析を行い、その結果を速やかに県民や医療関係者に提供・公表するなど、感染症の発生及びまん延の防止に努めている。当研究所は、感染症発生動向調査事業実施要領に基づき搬入された検体について、ウイルスの検索を行っており、2014年の病原体検出状況を取りまとめたので報告する。

### 材料と方法

2014年1月～12月にウイルスの検索を目的として搬入された562検体を検査材料とした。

#### 1 分離材料

1) 髄液及び血清は検体をそのままウイルスの分離に用いた。

2) 咽頭ぬぐい液，鼻汁，眼瞼結膜ぬぐい液，水泡液及び気管内吸引液は，細胞培養用維持培地

[1%牛胎児血清加 Eagle's MEM（日水製薬）にペニシリン及びストレプトマイシンをそれぞれ100単位，100 $\gamma$ /mLの割合で加えたもの]に浮遊させ3,000rpm 10分間遠心した上清を分離材料とした。

3) 凝固防止末梢血液（クエン酸ナトリウム又はEDTA加末梢血液）は，あらかじめFicoll-paque（比重1.077）3mLを分注した遠心チューブに2倍希釈した血液4mLを静かに重層し，1,300 $\times$ g，20分間遠心する。表層から順に血漿（約2倍希釈），末梢血単核球細胞（PBMC），比重液及び赤血球成分に分画されるので，PBMCを分離材料とした。

4) 尿は1,500rpm 10分間遠心した沈渣細胞を，2～3mLの細胞培養用維持培地に再浮遊させたものを用いた。

5) 便は，細胞培養用維持培地で10%乳剤とした後，3,000rpm 20分間遠心し，遠心上清をさらに12,000rpm 10分間遠心した後フィルター（ポアサイズ0.45 $\mu$ m）を通し，分離材料とした。

なお，検体は接種時まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存し，検体からの遺伝子検査には同じ材料を用いた。

## 2 細胞

Caco-2, Vero, HEp-2, RD-18S 及び RD-A 細胞の 5 種類を常時使い、麻疹が疑われる場合には Vero/hSLAM 細胞を、インフルエンザウイルスが疑われる場合には MDCK 細胞をそれぞれ併用した。

## 3 分離

細胞培養によるウイルス分離は 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 及び RD-A 細胞に検体を 1 穴あたり 30  $\mu$ L ずつ接種して 35°C 約 30 分間吸着後、維持培地を 100  $\mu$ L ずつ加え、CO<sub>2</sub> 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) が出現しなかった検体については、3 回凍結融解を行い、新しい細胞に継代した。4 ~ 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。CPE が出現した検体については 3 回凍結融解後、3,000rpm 10 分間遠心した上清をウイルス液として同定を行った。

## 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)、直接蛍光抗体法及び遺伝子検査で行った。

インフルエンザウイルスについては、国立感染症研究所のインフルエンザ診断マニュアル (平成 24 年 3 月) に従いリアルタイム RT-PCR 法で型別を行った。

ノロウイルスについては、ノロウイルスの検出法 (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。

サポウイルスについては、岡らのリアルタイム PCR 法<sup>1)</sup>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、N 及び H 遺伝子をターゲットとした RT-PCR 法で行った。

A 型肝炎ウイルスについては、A 型肝炎ウイルスの検出法について (平成 21 年 12 月 1 日付食安監発 1201 第 1 号) に従い RT-PCR 法で行った。

エンテロウイルスの遺伝子検査は、篠原らの報告<sup>2)</sup>に従い RT-PCR 法で行った。分離されたエンテロウイルスについては、国立感染症研究所の手

足口病病原体検査マニュアルに従って RT-PCR 法を行い同定した。

パレコウイルスについては、吉富らの報告<sup>3)</sup>に従い RT-PCR 法で行った。

ヒト RS ウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ヒトライノウイルス、パラインフルエンザウイルス 1 型~4 型、ヒトコロナウイルス OC43 及び 229E の 9 種類の呼吸器 RNA ウイルスの遺伝子検査は、Bellau-Pujol らの方法<sup>4)</sup>を参考に、multiplex RT-PCR 法で行った。

分離・検出されたウイルスの一部について、ダイレクトシーケンシング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 又は MEGA を利用して系統樹解析を実施した。

## 結果および考察

搬入された 562 検体について検査した結果、249 件のウイルスが分離・検出され、このうちインフルエンザウイルスが最も多く、次いでライノウイルスが多かった。また、A 型肝炎及び輸入麻疹が全国各地で認められ、本県でも検査依頼が増えた。

### 1 インフルエンザウイルス

インフルエンザウイルスについては、流行期間の関係で 2014/2015 シーズンについて解析を行った。

定点あたり患者報告数とウイルス検出数の推移を図 1 に示す。患者報告数は、2014 年第 50 週 (12 月中旬) から増え始め、2015 年第 1 週 (1 月上旬) に流行発生注意報基準値 (10.0) を超え、第 3 週にピークとなった。その後、第 9 週 (2 月下旬) には注意報基準値未満となった。

2014 年 9 月から 2015 年 4 月までに分離・検出されたインフルエンザウイルスは AH1pdm09 が 1 件、AH3 亜型が 43 件、B 型が 1 件の計 45 件であった。B 型は山形系統であった。

### 2 麻疹ウイルス

2013 年末~2014 年にかけてフィリピンを中心としたアジア諸国からの輸入例が全国で急増した。

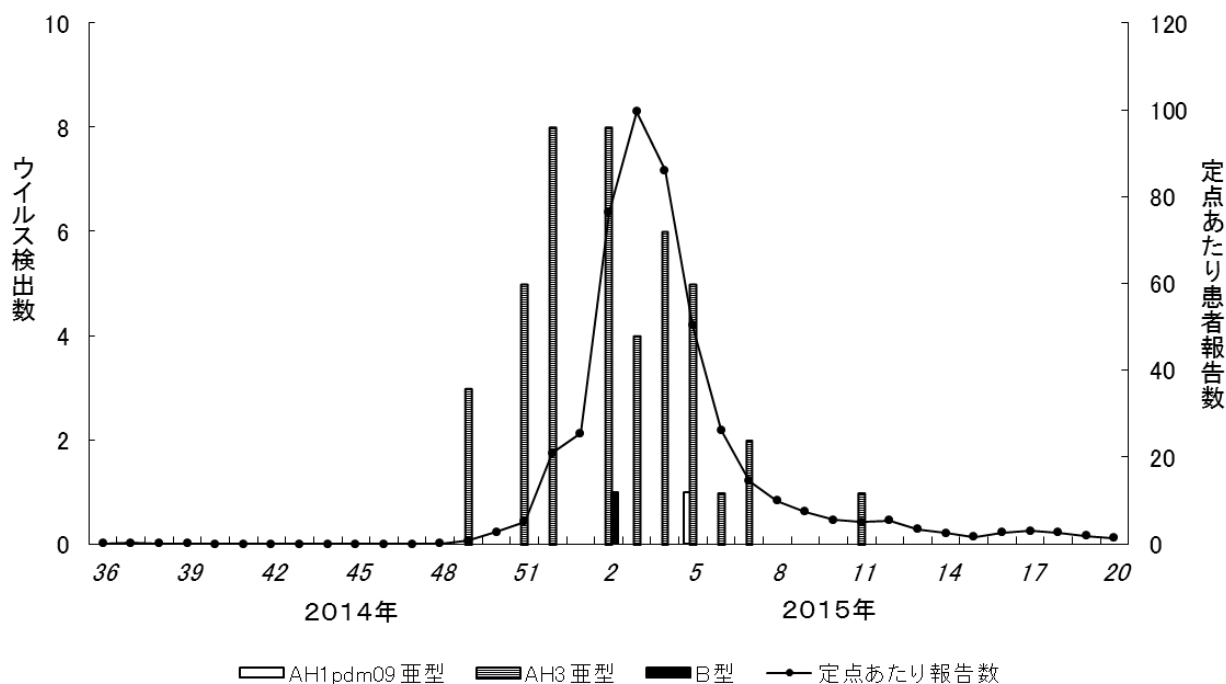


図1 インフルエンザのウイルス分離・検出数と定点あたり患者報告数の推移

本県では4名の患者が発生し10件のウイルスが分離・検出された。このうち2名はフィリピンに渡航歴があり、1名は他県で感染した例であった。残り1名は渡航歴のある患者の家族であった。

4名の患者から検出されたN遺伝子増幅産物についてダイレクトシーケンスを行い、得られた塩基配列の一部について系統樹解析を実施した結果、B3型麻疹ウイルスに分類された。フィリピンでは2013年～2014年にB3型が流行している。

### 3 A型肝炎ウイルス

2014年は、全国でA型肝炎の報告数が増加し、ここ10年で最も発生数の多い年になった<sup>5)</sup>。

本県でも3年ぶりに13例からA型肝炎ウイルスが検出された。男女別で見ると、男性6例、女性7例であった。年齢は、20歳代3例、40歳代1例、50歳代3例、60歳代6例と60歳代が多かった。

13例のPCR増幅産物についてダイレクトシーケンスを行い、塩基配列を決定した。得られた塩基配列を過去のデータベースと比較し系統樹解析を実施した結果、遺伝子型はIAであった。

A型肝炎の多くは汚染された食材などを介する経口感染であるが、潜伏期間が2～6週間と長いいため食材などの感染源についての調査は非常に困

難である。13例について、保健所による聞き取り調査が行われたが、感染源の特定はできなかった。

### 4 呼吸器RNAウイルス

2014年は、ほぼ1年を通してライノウイルスが検出された(表1)。検出された32例のうち30例に下気道炎の症状があった。2例は呼吸器症状の記載はなく、臨床診断名は不明熱及び脳炎・脳症であった。また、重複感染が9例あり、4例がRSウイルスとの重複感染、ほか5例はRSウイルス及びアデノウイルス1型、インフルエンザウイルスAH3亜型、パラインフルエンザ3型、コクサッキーウイルスA4型、アデノウイルス2型との重複感染で、それぞれ1例であった。年齢は0歳22例、1歳7例、2歳2例、3歳1例であった。

10月～12月にRSウイルスが21例検出され、全ての例で下気道炎が認められた。重複感染はライノウイルスで記載した以外はなかった。年齢は0歳15例、1歳4例、3歳1例、8歳1例であった。

### 謝辞

2014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並びに検体採取にご協力いただいた医療機関の先生方に深謝いたします。

### 参考文献

- 1) Oka T, Katayama K, Hansman GS, Kageyama T, Ogawa S, *et al.* : Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction, *Journal of Medical Virology*, 78(10), 1347-1353, (2006)
- 2) 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)
- 3) 吉富秀亮, 石橋哲也, 世良暢之 : 福岡県におけるヒトパレコウイルス検出状況, *福岡県保健環境研究所年報第 39 号*, 99-100, (2012)
- 4) S. Bellau-Pujol *et al.* : Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses, *J Virol Methods*, 126, 53-63, (2005)
- 5) 国立感染症研究所 : 2014 年の A 型肝炎流行状況について, *病原微生物検出情報*, Vol.36 No. 1(No.419), 3-4, (2015)

表 1 宮崎県における月別ウイルス検出数 (2014 年)

ウイルス名	月												計
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Adenovirus 1												1	1
Adenovirus 2								2		1		1	4
Adenovirus 6					1								1
Coxsackievirus A4						1	2	8					11
Coxsackievirus A10										1	1		2
Coxsackievirus A14								1					1
Coxsackievirus A16										1		1	2
Coxsackievirus B3							3						3
Coxsackievirus B5						3	4		1				8
Echovirus 11							1						1
Echovirus 14				2									2
Echovirus 25			1										1
Parechovirus 1					1		2	1	3				7
Parechovirus 3					1	3	1						5
Enterovirus 71		1	2	7	4	1							15
Rhinovirus		3	3	1	1	2	2	2	2	3	5	8	32
Herpes simplex virus 1	1	1		1			1						4
Hepatitis A Virus			13										13
Influenza virus A H1pdm09	4	7	2	4	2	1							20
Influenza virus A H3	25	3	1	1				1				16	47
Influenza virus B	12	7	3	3		2							27
Parainfluenza virus 1			1										1
Parainfluenza virus 3						2	1	1				1	5
RS virus										3	6	12	21
Human metapneumovirus			3										3
Measles virus	6	1						3					10
Norovirus G2	1												1
Sapovirus												1	1
Total	49	23	29	19	10	15	17	19	6	9	12	41	249

表2 宮崎県におけるウイルス検出数の推移（2005年～2014年）

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	計
Adenovirus 1	2	2		1	2			2	4	1	14
Adenovirus 2	4	1		1	4		2	4	1	4	21
Adenovirus 3	1	2		1		2	2		2		10
Adenovirus 4									2		2
Adenovirus 5	1					1		2			4
Adenovirus 6								1		1	2
Adenovirus 11	1								1		2
Adenovirus 31								1			1
Adenovirus 41									1		1
Adenovirus NT								1			1
Coxsackievirus A 2						1	1				2
Coxsackievirus A 4						1	1	3		11	16
Coxsackievirus A 5								1			1
Coxsackievirus A 6				2	1		38	12	15		68
Coxsackievirus A 8									2		2
Coxsackievirus A 9		14			8			23			45
Coxsackievirus A 10										2	2
Coxsackievirus A 14									1	1	2
Coxsackievirus A 16	2			12		2	14		3	2	35
Coxsackievirus B 1					2		19				21
Coxsackievirus B 2	1	1			7	2			4		15
Coxsackievirus B 3	9				2				7	3	21
Coxsackievirus B 4			7					3			10
Coxsackievirus B 5			4	17				5	1	8	35
Echovirus 3	1					7					8
Echovirus 5				19							19
Echovirus 6				8			4	2			14
Echovirus 7					3						3
Echovirus 9	3	2			9		10	2			26
Echovirus 11					3					1	4
Echovirus 14										2	2
Echovirus 18	5	46						6	35		92
Echovirus 19									4		4
Echovirus 25			2			14			1	1	18
Echovirus 30		3	3	3					9		18
Parechovirus 1										7	7
Parechovirus 3										5	5
Poliovirus 1		2			1		1				4
Poliovirus 2					1						1
Poliovirus 3			2	2							4
Enterovirus 71		7	6		1	14			3	15	46
Group Enterovirus				1							1
Rhinovirus					2		12	14	10	32	70
Herpes simplex virus 1	3	3	1	3	5	1	4	2	2	4	28
Varicella-zoster virus				3							3
Hepatitis A Virus							1			13	14
Hepatitis C Virus					6						6
Parvovirus									1		1
Influenza virus A H1pdm09					494	52	55			20	621
Influenza virus A H1	1		23	34	35						93
Influenza virus A H3	18	37	18	9	45	60	41	90	32	47	397
Influenza virus B	18	32	7	1	9	3	8	7	4	27	116
Parainfluenza virus 1								1		1	2
Parainfluenza virus 2								1			1
Parainfluenza virus 3										5	5
RS virus	2						2	10	3	21	38
Human metapneumovirus							6	3	1	3	13
Human coronavirus								1			1
Measles virus			8	1				19		10	38
Mumps virus	3	1				1	1	1			7
Rubella virus									26		26
Rotavirus	3		1	1			2				7
Norovirus	15	24	21	5	9	14	11	4	1	1	105
Sapovirus					1			2		1	4
Dengue virus 1									2		2
Dengue virus 2						2					2
Dengue virus 3									2		2
Chikungunya virus							1				1
Orthoreovirus			1								1
Total	93	177	106	122	650	177	236	223	180	249	2213