

# 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（2015年）

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

## Infectious Agents (viruses) Surveillance Report in Miyazaki Prefecture, 2015

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

### 要旨

2015年に県内の医療機関より感染症発生動向調査の検体が541件搬入され、278件のウイルスが分離・検出された。2015/2016シーズンに検出されたインフルエンザウイルスは、AH1pdm09が26件、AH3亜型が1件、B型が20件の計47件であった。

2015年は、ほぼ1年を通してヒトライノウイルスが検出され、冬にヒトRSウイルスとヒトメタニューモウイルス、秋にヒトRSウイルスが検出された。エンテロウイルスでは、6月から12月にコクサッキーウイルスA6型が29例31件分離・検出され、4月から10月にコクサッキーウイルスA9型が24例25件検出された。

キーワード： インフルエンザウイルス，ヒトライノウイルス，ヒトRS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、2015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

2015年1月～12月にウイルスの検索を目的として搬入された541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

疱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) 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。

4) 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℃で保存した。

#### 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。

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。

ヘルペスウイルスについては、VanDevanter らの方法<sup>5)</sup>を参考に、nested 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 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 541 検体について検査した結果、278 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、コクサッキーウイルス A6 型及び RS ウイルスが多かった (表 1)。また、ヘルペスウイルス科の遺伝子検査を開始したので、ヘルペスウイルスの検出数が増加した (表 2)。

### 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 2015/2016 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、2016 年第 1 週 (1 月上旬) から増え始め、2016 年第 4 週 (1 月下旬) に流行発生注意報基準値 (10.0) を超え、第 9 週 (3 月上旬) にピークとなった。その後、第 14 週 (4 月上旬) には注意報基準値未満となった。

2015 年 9 月から 2016 年 6 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 26 件、AH3 亜型が 1 件、B 型が 20 件の計 47 件であった。B 型は山形系統が 11 件、ビクトリア系統が 9 件であった。

### 2 呼吸器 RNA ウイルス

ほぼ 1 年を通してヒトライノウイルス (hRV) が検出され、冬にヒト RS ウイルス (hRSV) とヒトメタニューモウイルス (hMPV)、秋に hRSV が検出された。

hRV が検出された 32 例のうち 27 例に上気道炎などの呼吸器症状があった。5 例は呼吸器症状の記載はなく、臨床診断名は発疹症、不明熱等であ

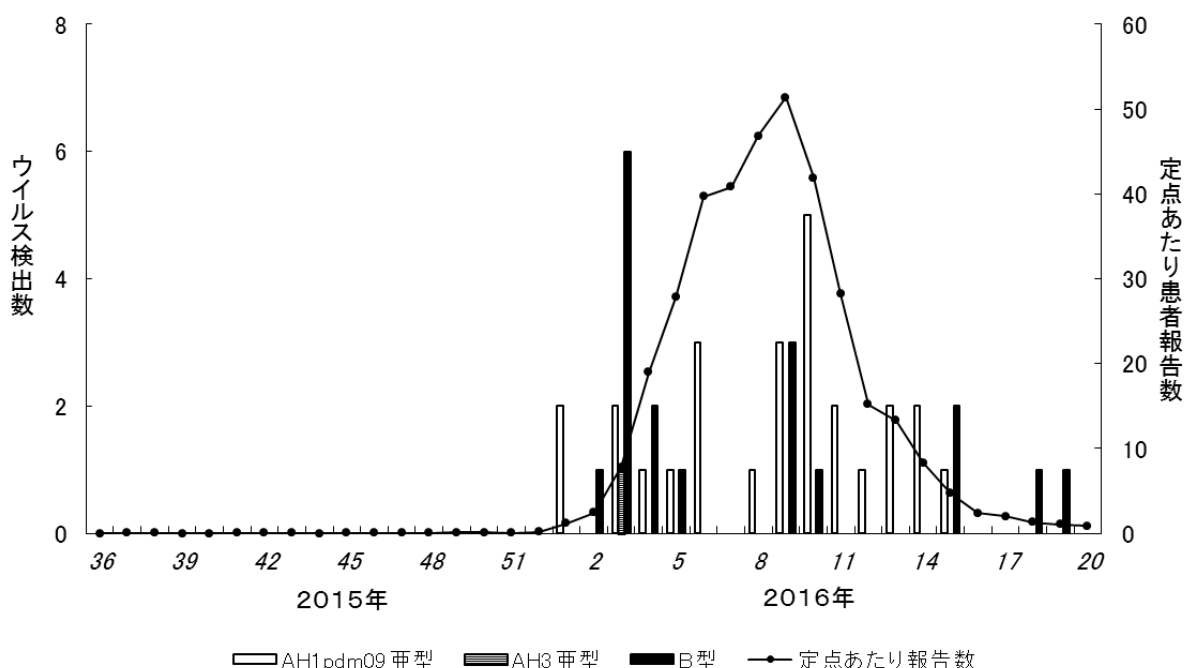


図1 インフルエンザのウイルス分離・検出数と定点あたり患者報告数の推移

った。年齢は、0歳16例、1歳6例、3歳1例、4歳4例、5歳1例、6歳2例、10歳代2例であった。hRSVは30例から検出され、29例に下気道炎、1例に上気道炎の症状があった。年齢は、0歳が22例と多く、1歳3例、2歳1例、3歳1例、4歳3例であった。hMPVは28例29件から検出され、25例が下気道炎、1例が上気道炎であった。2例はインフルエンザと診断されていた。年齢は、0歳10例、1歳5例、2歳4例、3歳2例、4歳4例、6歳1例、10歳代2例であった。また、重複感染が8例あり、hRVとhRSVが3例、hRVとhMPVが2例、hRSVとエンテロウイルスD68型が2例、hRSVとアデノウイルス2型が1例であった。

### 3 コクサッキーウイルスA6型

6月から12月にコクサッキーウイルスA6型が29例31件分離・検出された。本県では2011年に38件、2012年に12件、2013年に15件分離・検出されており、4年ぶりの流行であった。29例のうち24例25件が手足口病であった。ほかは上

下気道炎2例、発疹性疾患1例、脳症1例2件、小脳失調1例であった。また、4例ではヒトヘルペスウイルス6型など、他のウイルスも検出された。年齢は、1歳が17例と最も多く、0歳6例、2歳1例、3歳2例、5歳1例、10歳代2例であった。

### 4 コクサッキーウイルスA9型

4月から10月にコクサッキーウイルスA9型が24例25件検出された。過去10年間では、2006年に14件、2009年に8件、2012年に23件と3年おきに検出されている。24例のうち21例22件が発疹性疾患、残り3例が手足口病、風疹及び腸炎であった。年齢は1歳が12例と多く、0歳5例6件、2歳5例、3歳1例、4歳1例であった。

## 謝辞

2015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くださった、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, *Journal of Virological Methods*, 126, 53-63, (2005)
- 5) VanDevanter *et al.*: Detection and Analysis of Diverse Herpesviral Species by Consensus Primer PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (7), 1666-1671, (1996)

表 1 宮崎県における月別ウイルス検出数 (2015 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							1	1						2
Adenovirus 3	1			1										2
Adenovirus 54												2		2
Coxsackievirus A2							1							1
Coxsackievirus A6						5	14	8	1	1		2		31
Coxsackievirus A9				1	13	7	1	1	1	1				25
Coxsackievirus A10					2	2	1							5
Coxsackievirus A16	1			1		3								5
Coxsackievirus B4						1		1		2		3		7
Echovirus 3				2	2	4	8							16
Echovirus 16							1	1	2	2	2			8
Echovirus 18								1	2					3
Echovirus 25									1			1		2
Parechovirus 1							1		1		1			3
Enterovirus D68									5	2				7
Rhinovirus	1		5	4	2	4	2		1	7	2	4		32
Herpes simplex virus 1		1			1			2			1			5
Varicella-zoster virus					1		1					1		3
Cytomegalovirus							1	1			2			4
Human herpes virus 6					3	1	5			1	2	1		13
Human herpes virus 7					1									1
Parvovirus B19		1												1
Influenza virus A H1pdm09	1													1
Influenza virus A H3	20	3	1			1								25
Influenza virus B	1													1
Parainfluenza virus 1									1					1
Parainfluenza virus 3						2	1							3
RS virus	8	6	3					2	6	1	3	1		30
Human metapneumovirus	1	7	17	4										29
Human coronavirus								2						2
Norovirus G1									1					1
Norovirus G2										4				4
Dengue virus 1									2					2
Total	34	19	26	13	25	30	38	20	24	21	13	15		278

表2 宮崎県におけるウイルス検出数の推移（2006年～2015年）

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	計
Adenovirus 1	2		1	2			2	4	1	1	13
Adenovirus 2	1		1	4		2	4	1	4	2	19
Adenovirus 3	2		1		2	2		2		2	11
Adenovirus 4								2			2
Adenovirus 5					1		2				3
Adenovirus 6							1		1		2
Adenovirus 11								1			1
Adenovirus 31							1				1
Adenovirus 41								1			1
Adenovirus 54										2	2
Adenovirus NT							1				1
Coxsackievirus A 2					1	1				1	3
Coxsackievirus A 4					1	1	3		11		16
Coxsackievirus A 5							1				1
Coxsackievirus A 6		2		1		38	12	15		31	99
Coxsackievirus A 8								2			2
Coxsackievirus A 9	14			8			23			25	70
Coxsackievirus A 10									2	5	7
Coxsackievirus A 14								1	1		2
Coxsackievirus A 16			12		2	14		3	2	5	38
Coxsackievirus B 1				2		19					21
Coxsackievirus B 2	1			7	2			4			14
Coxsackievirus B 3				2				7	3		12
Coxsackievirus B 4		7					3			7	17
Coxsackievirus B 5		4	17				5	1	8		35
Echovirus 3					7					16	23
Echovirus 5			19								19
Echovirus 6			8			4	2				14
Echovirus 7				3							3
Echovirus 9	2			9		10	2				23
Echovirus 11				3							4
Echovirus 14									2		2
Echovirus 16										8	8
Echovirus 18	46						6	35		3	90
Echovirus 19								4			4
Echovirus 25		2			14			1	1	2	20
Echovirus 30	3	3	3					9			18
Parechovirus 1									7	3	10
Parechovirus 3									5		5
Poliovirus 1	2			1		1					4
Poliovirus 2				1							1
Poliovirus 3		2	2								4
Enterovirus D68										7	7
Enterovirus 71	7	6		1	14			3	15		46
Group Enterovirus			1								1
Rhinovirus				2		12	14	10	32	32	102
Herpes simplex virus 1	3	1	3	5	1	4	2	2	4	5	30
Varicella-zoster virus			3							3	6
Cytomegalovirus										4	4
Human herpes virus 6										13	13
Human herpes virus 7										1	1
Hepatitis A Virus						1			13		14
Hepatitis C Virus				6							6
Parvovirus B19								1		1	2
Influenza virus A H1pdm09				494	52	55			20	1	622
Influenza virus A H1		23	34	35							92
Influenza virus A H3	37	18	9	45	60	41	90	32	47	25	404
Influenza virus B	32	7	1	9	3	8	7	4	27	1	99
Parainfluenza virus 1							1		1	1	3
Parainfluenza virus 2							1				1
Parainfluenza virus 3									5	3	8
RS virus						2	10	3	21	30	66
Human metapneumovirus						6	3	1	3	29	42
Human coronavirus							1			2	3
Measles virus		8	1				19		10		38
Mumps virus	1				1	1	1				4
Rubella virus								26			26
Rotavirus		1	1			2					4
Norovirus	24	21	5	9	14	11	4	1	1	5	95
Sapovirus				1			2		1		4
Dengue virus 1								2		2	4
Dengue virus 2					2						2
Dengue virus 3								2			2
Chikungunya virus						1					1
Orthoreovirus		1									1
Total	177	106	122	650	177	236	223	180	249	278	2398