

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（2020年）

宮原加奈 三浦美穂 西田倫子 三好めぐみ 杉本貴之 古澤 優¹⁾

Infectious Agents (viruses) Surveillance Report in Miyazaki Prefecture, 2020

Miyahara Kana, Miura Miho, Nishida Michiko, Miyoshi Megumi,
Sugimoto Takayuki, Furusawa Yu

要旨

2020年に県内の医療機関等より感染症発生動向調査の検体が7,190件搬入され、438件のウイルスが分離・検出された。2020/2021シーズンにインフルエンザウイルスは検出されなかった。

キーワード：新型コロナウイルス、インフルエンザウイルス

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、2020年の病原体検出状況を取りまとめたので報告する。

ただし、2020年は新型コロナウイルス感染症の流行により、新型コロナウイルス感染症疑い以外の検体の受け入れを縮小せざるを得ない状況であった。

材料と方法

2020年1月～12月にウイルスの検索を目的として搬入された7,190検体を検査材料とした。そのうち、新型コロナウイルス感染症疑いの検体が7,058件で遺伝子検出のみを実施しており、ウイルス分離は「感染研・地衛研専用」SARS-CoV-2 遺伝子検出・ウイルス分離マニュアル Ver.1.0（令和2年12月1日版）に従い、実施

予定である。

1 分離材料

1) 髄液、血しょう及び血清検体は、そのまま分離材料とした。

2) 咽頭ぬぐい液、鼻咽頭ぬぐい液、鼻汁、気管内吸引液、喀痰及び唾液は、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 γ /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分離材料とした。

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 μ m）を通し分離材料とした。

5) 唾液（サリベット：ザルスタット）は、1,000g2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℃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 μ L ずつ接種して 35°C 約 30 分間吸着後、維持培地を 100 μ L ずつ加え、CO₂ 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 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、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、ノロウイルス病原体検出マニュアル (第 1 版, 令和元年 6 月) 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¹⁾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 3.4 版, 平成 29 年 4 月) に従い、N 遺伝子をターゲットとしたリアルタイム 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²⁾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 法で行った。

パレコウイルスについては、吉富らの報告³⁾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⁴⁾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⁵⁾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、ダイレクトシーケ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。

新型コロナウイルスは、「感染研・地衛研専用」SARS-CoV-2 遺伝子検出・ウイルス分離マニュアル Ver.1.0 (令和 2 年 12 月 1 日版) に従い、リアルタイム one-step RT-PCR 法で SARS-CoV-2 遺伝子検出を行った。

結果および考察

搬入された 7,190 検体について検査した結果、438 件のウイルスが分離・検出された (表 1)。

1 新型コロナウイルス

2 月から 12 月にかけて 362 件のウイルスが検出された。7 月は 1 事例、8 月は 2 事例、12 月は 4 事例の感染者集団事例が発生したため検出件数が多くなった。

2 インフルエンザウイルス

2020/2021 シーズン (2020 年 9 月から 2021 年 5 月まで) に分離・検出されたインフルエンザウイルスはなかった。2019 年から 2021 年における定点あたり患者報告数の推移を図 1 に示す。2020/2021 シーズンは流行のピークもなく、流行開始の指標である、1.00 人週を超えた週はなかった。

3 エコーウイルス 9 型

6 月から 7 月にかけてエコーウイルス 9 型が 5 例分離・検出された。5 例のうち発熱・発疹性疾患の患者は 4 例であった。残りの 1 例は下気道炎であった。年齢は、0 歳が 3 例と最も多く 1 歳が 1 例、2 歳 1 例であった。

4 A型肝炎ウイルス

4月から11月にかけてA型肝炎ウイルスが6例検出された。検出された6例全て黄疸・肝機能障害の患者であった。6例のうち、牡蠣や二枚貝の喫食歴有りが3例、無しが1例、不明が2例であった。1例はアフガニスタン渡航歴のある患者であった。

謝辞

2020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。また、新型コロナウイルス感染症の流行による事業制限へもご理解と協力をいただき感謝申し上げます。

参考文献

1) Oka T, Katayama K, Hansman GS, et al.

Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Medical Virology* 2006 ; 78(10) : 1347-1353.

2) 篠原美千代, 内田和江, 島田慎一 他. 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* 1999 ; 73(8) : 749-757.

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* 2012 ; 39 : 99-100.

4) S. Bellau-Pujol, A.Vabret, L.Legrand. Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses. *Journal of Virological Methods* 2005 ; 126 : 53-63.

5) VanDevanter, P.Warrener, L.Bennett. Detection and Analysis of Diverse Herpesviral Species by Consensus Primer PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 1996 ; 34 (7) : 1666-1671.

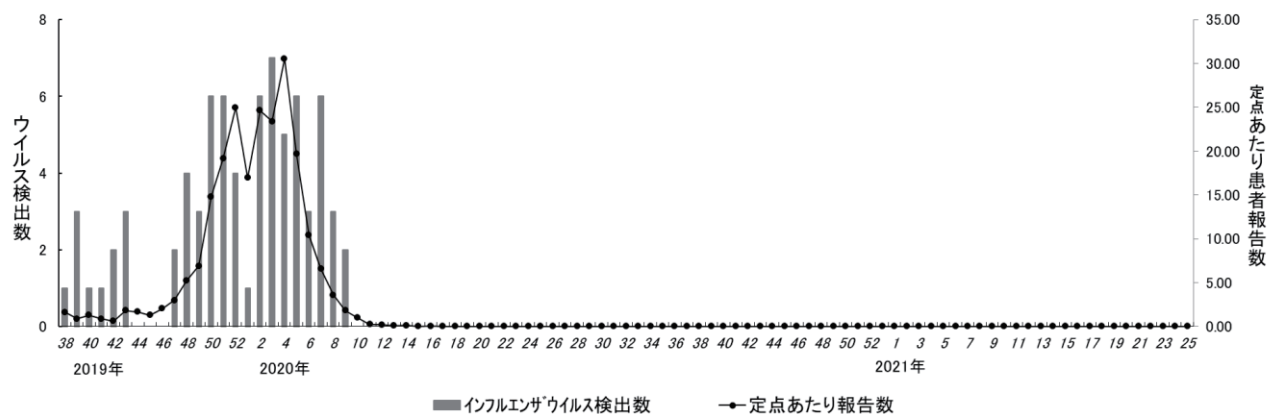


図1 2019年から2021年における定点あたり患者報告数の推移

表1 宮崎県における月別ウイルス検出数（2020年）

ウイルス名	月												計	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
Adenovirus 3		2												2
Coxsackievirus A4						1								1
Echovirus 9						2	3							5
Echovirus 30		2												2
Rhinovirus										1	2			3
Herpes simplex virus 1											1			1
Cytomegalovirus					1									1
Human herpes virus 6	1			1	1	2		1	1	1	2			10
Human herpes virus 7	1											1		2
Influenza virus A H1pdm09	22	10												32
Influenza virus B	3	4												7
Parainfluenza virus 1				1										1
RS virus												1		1
Human metapneumovirus		1												1
Norovirus	1													1
Hepatitis A Virus				1			2	1		1	1			6
SARS-CoV-2			7	34	13		86	117	1	1	5	98		362
Total	28	19	8	36	15	5	91	119	2	4	12	99		438

表2 宮崎県におけるウイルス検出数の推移 (2011年～2020年)

	計										
	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	
Adenovirus 1		2	4	1	1		5	2	2	17	
Adenovirus 2		2	4	1	4	2	1	4	2	22	
Adenovirus 3		2		2		2	1	1	2	12	
Adenovirus 4			2							2	
Adenovirus 5		2				1	2			5	
Adenovirus 6		1		1			1		1	4	
Adenovirus 11			1							1	
Adenovirus 31		1				1				2	
Adenovirus 35								1		1	
Adenovirus 41			1							1	
Adenovirus 54					2					2	
Adenovirus NT		1				1			3	5	
Coxsackievirus A 2	1				1		3			5	
Coxsackievirus A 4	1	3		11				1	2	19	
Coxsackievirus A 5		1				1			1	3	
Coxsackievirus A 6	38	12	15		31	5	36	5	20	162	
Coxsackievirus A 8			2							2	
Coxsackievirus A 9		23			25			2		50	
Coxsackievirus A 10				2	5		9		3	19	
Coxsackievirus A 14			1	1						2	
Coxsackievirus A 16	14		3	2	5	22		2		48	
Coxsackievirus B 1	19						5			24	
Coxsackievirus B 2			4				1			5	
Coxsackievirus B 3			7	3				4	1	15	
Coxsackievirus B 4		3			7				4	14	
Coxsackievirus B 5		5	1	8		13			12	39	
Echovirus 3					16					16	
Echovirus 5							2			2	
Echovirus 6	4	2				5	1			12	
Echovirus 7							1			1	
Echovirus 9	10	2				6	2	5	5	30	
Echovirus 11				1				4		5	
Echovirus 14				2						2	
Echovirus 16					8	7				15	
Echovirus 18		6	35		3	29	4	13		90	
Echovirus 19			4							4	
Echovirus 25			1	1	2	9	2			15	
Echovirus 30			9						3	2	14
Parechovirus 1				7	3	4	2	1		17	
Parechovirus 3				5		29	2	3	11	50	
Parechovirus 6							1			1	
Parechovirus NT									3	3	
Poliovirus 1	1									1	
Enterovirus D68					7			2		9	
Enterovirus 71			3	15			3	12		33	
Rhinovirus	12	14	10	32	32	29	35	13	13	3	193
Herpes simplex virus 1	4	2	2	4	5	2	9	6	2	1	37
Herpes simplex virus 2							1				1
Varicella-zoster virus					3	3	2				8
Cytomegalovirus				4	3	1	1	1	1	1	11
Epstein-Barr virus								1			1
Human herpes virus 6					13	8	9	12	8	10	60
Human herpes virus 7				1	1	1	3	1		2	8
Hepatitis A Virus	1			13			1	19		6	40
Parvovirus B19			1		1	7		6			15
Influenza virus A H1pdm09	55			20	1	26	36	18	55	32	243
Influenza virus A H3	41	90	32	47	25	17	84	32	31		399
Influenza virus B	8	7	4	27	1	20	50	42	2	7	168
Parainfluenza virus 1		1		1	1	9	4		4	1	21
Parainfluenza virus 2		1									1
Parainfluenza virus 3				5	3	13	7	4	4		36
Parainfluenza virus 4							1				1
RS virus	2	10	3	21	30	18	6	6	2	1	99
Human metapneumovirus	6	3	1	3	29	4	8	2	2	1	59
Human coronavirus		1			2		2	4			9
Measles virus		19		10			5		2		36
Mumps virus	1	1				4	2				8
Rubella virus			26					6	2		34
Rotavirus	2						2				4
Norovirus	11	4	1	1	5	6	4		1	1	34
Sapovirus		2		1							3
Dengue virus 1			2		2				1		5
Dengue virus 2											0
Dengue virus 3			2			2			1		5
Dengue virus NT									2		2
Chikungunya virus	1					1			2		4
SARS-CoV-2										362	362
Total	236	223	180	249	278	308	359	232	205	438	2,708