

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 (2022 年)

宮原加奈 成田翼 水流奈己 新田真依子 三浦美穂 吉野修司 古澤優¹⁾

Infectious Agents (viruses) Surveillance Report in Miyazaki Prefecture, 2022

Miyahara Kana, Narita Tsubasa, Tsuru Nami, Shinden Maiko,
Miura Miho, Yoshino Shuji, Furusawa Yu

要旨

2022 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 20,884 件搬入され、3,863 件のウイルスが分離・検出された。2022/2023 シーズンにインフルエンザウイルスが 2020 年 3 月以降、約 2 年ぶりに分離・検出された。

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，パレコウイルス 3 型

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、2022 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、2022 年は 2021 年同様、新型コロナウイルス感染症の感染拡大により、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

2022 年 1 月から 12 月にウイルスの検索を目的として搬入された 20,884 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 20,804 件、その他が 80 件であった。

1 分離材料

1) 髄液、血漿及び血清検体は、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、1,000g 2 分間遠心したものを分離材料とした。

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 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、遺伝子検査、中和試験及び直接蛍光抗体法で行った。ウイルス分離出来なかった検体は、検査材料より遺伝子検査を行った。

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 (第 4 版, 平成 30 年 12 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。

検査材料からの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 法を行った。

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、NCBI の BLAST を用いて相同性検索を行い、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、国立感染症研究所の新型コロナウイルス検出・分離マニュアル (令和 3 年 2 月 8 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。SARS-CoV-2 陽性となった検体は、一部を選択して変異株検査を実施し、デルタ株とオミクロン株の判別や、オミクロン株の系統の判別を実施した。1 月から 2 月はデルタ株とオミクロン株の判別を、4 月から 8 月はオミクロン株の BA.1・BA.2 系統と BA.4 系統・BA.5 系統の判別に L452R 変異の検出を用いた。4 月から 8 月には、オミクロン株の BA.1 系統と BA.2 系統の判別に TaKaRa のリアルタイム RT-PCR 法による ins214EPE 変異の検出を併用した。なお、新型コロナウイルスのゲノム解析は、国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター作成の新型コロナウイルスゲノム解読プロトコル (Qiagen 社 QiaSEQ FX 編 version 1.4(2022/01/27、NEB 社 ARTIC SARS-CoV-2 Companion Kit(ONT)編 version 1.6(2022/01/27) で実施した。

結果および考察

搬入された 20,884 検体について検査した結果、3,866 件のウイルスが分離・検出された (表 1)。

このうち、新型コロナウイルスが 3,836 件と最も多く、次いでパレコウイルス 3 型が多かった。また、2020 年 3 月以降、約 2 年ぶりにインフルエンザウイルス AH3 が分離・検出された。

1 新型コロナウイルス

1 月から 5 月までに 3,836 件のウイルスが検出された。(表 1) 4 月下旬より、新型コロナウイルス

スの行政検査が原則外部委託となったため、5 月から当所での検出件数が減少した。また、外部委託先より新型コロナウイルス陽性検体を収集し変異株検査やゲノム解析を実施した。(表 2, 3)

1 月から 3 月までは、オミクロン株の BA.1 系統が、4 月から 6 月はオミクロン株の BA.2 系統が、7 月から 12 月はオミクロン株の BA.5 系統が主流となり感染拡大した。(表 3)

オミクロン株は、ウイルスレセプター結合に関与するスパイク蛋白部分のアミノ酸変異が 30 カ所程度みられ、急激な感染拡大に影響を与えたと考えられた。

2 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 2022/2023 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、2022 年第 51 週(12 月下旬)から増え始め、2023 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 6 週(2 月上旬)にピークとなった、その後第 9 週(3 月上旬)には注意報基準値未満となった。その後、第 15 週(4 月中旬)まで下降傾向であったが、再度増加傾向が見られた。

2022 年 8 月から 2023 年 6 月中旬までに分離・検出されたインフルエンザウイルスは AH3 が 45 件、B 型が 2 件の計 47 件であった。B 型はすべてビクトリア系統であった。AH1pdm は 6 月中旬までには確認されなかった。

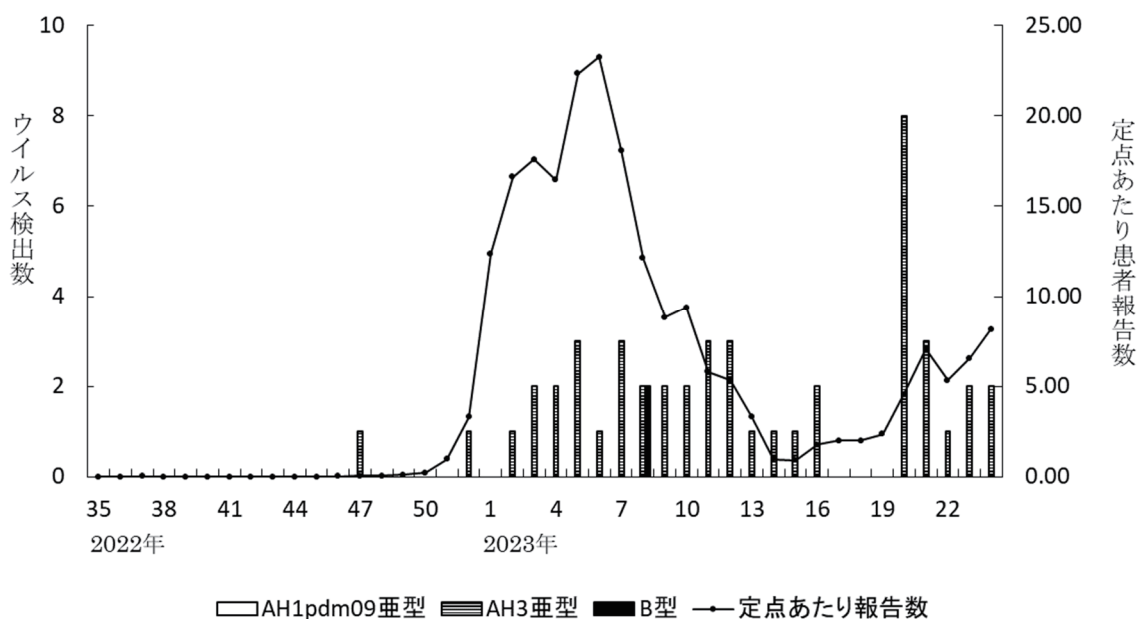


図 1 インフルエンザのウイルス分離・検出数と定点あたり患者報告数の推移

3 パレコウイルス 3 型

5 月から 6 月にかけてパレコウイルス 3 型が 10 例、11 月にパレコウイルス 1 型が 1 例検出された。11 例すべて 39℃以上の発熱や発疹の症状を有し、2 例は呼吸器症状があった。年齢は、3 ヶ月未満が 10 例、1 歳が 1 例であった。

謝辞

2022 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。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;78:1347-1353.
- 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;73:749-757.
- 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) Bellau-Pujol S, Vabret A, Legrand L, et al. 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 D.R, Warrener P, Bennett L, et al. Detection and Analysis of Diverse Herpesviral Species by Consensus Primer PCR . Journal of Clinical Microbiology 1996;34:1666-1671.

表 1 宮崎県における月別ウイルス検出数 (2022 年)

ウイルス名	月												計	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
Adenovirus 1	1													1
Coxsackievirus A6								1		1				2
Parechovirus 1											1			1
Parechovirus 3					4	6								10
Rhinovirus		1		1	1							2		5
Cytomegalovirus			1					1						2
Human herpes virus 6			1	1	2						1			5
Human herpes virus 7						1								1
Influenza virus A H3											1	1		2
RS virus						1								1
SARS-CoV-2	608	914	1,029	1,282	3									3,836
Total	609	915	1,031	1,284	10	8	0	2	0	1	5	1		3,866

表 2 宮崎県における新型コロナウイルス月別変異株検出件数 (2022 年)

		月												計
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
L452R	陽性 : BA.4・BA.5系統	4*	0	—	0	0	2	367	628	—	—	—	—	997
変異	陰性 : BA.1・BA.2系統	126	45	—	82	424	153	200	56	—	—	—	—	1,086
ins214EPE	陽性 : BA.1系統	—	—	—	4	17	0	0	0	—	—	—	—	21
変異	陰性 : BA.2系統	—	—	—	22	408	167	646	368	—	—	—	—	1,611

※全てデルタ株

表 3 宮崎県における新型コロナウイルス系統別ゲノム解析数 (2022 年)

系統名	月												計
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
デルタ株 AY.29	2											2	
BA.1	234	223	178	83	5								723
BA.2			52	133	129	48	34	13			3		412
BA.2.3				26	31	44	36	5			1		143
BA.2.3.20											4	1	5
BA.2.10				3	11	2	3	1					20
BA.2.12.1						2	2	2					6
BA.2.13							1						1
BA.2.18							1						1
BA.2.24					19	12	5	1	25				62
BA.2.29				1	7	29	3						40
BA.2.75												1	1
オミクロン株											1	8	9
BN												4	4
BM												1	1
BR													
BA.4.1							5	1					6
BA.5						4	1						5
BA.5.1							4	12	1	5	10	9	41
BA.5.2							54	68	27	69	30	16	264
BA.5.2.1							25	131	38	10	30	21	255
BF.1							1	3	5				9
BF.5							1	62	37	12	29	31	172
BF.7											1	7	8
BF.10										3	1		4
BF.11										14	1	4	19
BF.12								8					8
BF.13												1	1
BA.5.3.1						1	34	43	14	5	12	7	116
BE.1							3	10	1				14
BQ											1	8	9
BA.5.5							1	3					4
混合感染								2					2
Total	236	223	230	246	202	142	214	365	148	118	124	119	2367

表 4 宮崎県におけるウイルス検出数の推移 (2013 年～2022 年)

ウイルス名	年										計
	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	
Adenovirus 1	4	1	1		5	2	2		1	1	17
Adenovirus 2	1	4	2	1	4	2	2		1		17
Adenovirus 3	2		2	1	1		2	2			10
Adenovirus 4	2										2
Adenovirus 5				1	2						3
Adenovirus 6		1			1		1		5		8
Adenovirus 11	1										1
Adenovirus 31				1							1
Adenovirus 35						1					1
Adenovirus 41	1										1
Adenovirus 54			2								2
Adenovirus NT				1			3				4
Coxsackievirus A2			1		3						4
Coxsackievirus A4		11				1	2	1			15
Coxsackievirus A5				1			1				2
Coxsackievirus A6	15		31	5	36	5	20			2	114
Coxsackievirus A8	2										2
Coxsackievirus A9			25			2					27
Coxsackievirus A10		2	5		9		3				19
Coxsackievirus A14	1	1									2
Coxsackievirus A16	3	2	5	22		2					34
Coxsackievirus B1					5						5
Coxsackievirus B2	4				1						5
Coxsackievirus B3	7	3				4	1				15
Coxsackievirus B4			7				4				11
Coxsackievirus B5	1	8		13			12				34
Echovirus 3			16								16
Echovirus 5					2						2
Echovirus 6				5	1				17		23
Echovirus 7					1						1
Echovirus 9				6	2	5		5			18
Echovirus 11		1				4					5
Echovirus 14		2									2
Echovirus 16			8	7							15
Echovirus 18	35		3	29	4	13					84
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				1	18
Parechovirus 3		5		29	2	3	11			10	60
Parechovirus 6					1						1
Parechovirus NT							3				3
Poliovirus 1											0
Enterovirus D68			7			2					9
Enterovirus 71	3	15			3	12					33
Rhinovirus	10	32	32	29	35	13	13	3	2	5	174
Herpes simplex virus 1	2	4	5	2	9	6	2	1	1		32
Herpes simplex virus 2					1						1
Varicella-zoster virus			3	3	2						8
Cytomegalovirus			4	3	1	1	1	1		2	13
Epstein-Barr virus						1					1
Human herpes virus 6			13	8	9	12	8	10	1	5	66
Human herpes virus 7			1	1	3	1		2		1	9
Hepatitis A virus		13			1	19		6			39
Parvovirus B19	1		1	7		6					15
Influenza virus A H1pdm09		20	1	26	36	18	55	32			188
Influenza virus A H3	32	47	25	17	84	32	31			2	270
Influenza virus B	4	27	1	20	50	42	2	7			153
Parainfluenza virus 1		1	1	9	4		4	1			20
Parainfluenza virus 2											0
Parainfluenza virus 3		5	3	13	7	4	4		1		37
Parainfluenza virus 4					1						1
RS virus	3	21	30	18	6	6	2	1	1	1	89
Human metapneumovirus	1	3	29	4	8	2	2	1			50
Human coronavirus			2		2	4					8
Measles virus		10			5		2				17
Mumps virus				4	2				1		7
Rubella virus	26					6	2				34
Rotavirus					2						2
Norovirus	1	1	5	6	4		1	1			19
Sapovirus		1									1
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			2				3
SARS-CoV-2								362	1,260	3,836	5,458
Total	180	249	278	308	359	232	205	438	1,291	3,866	7,406