

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（2007年）

岩切章・三浦美穂・山本正悟・塩山陽子*

Infectious Agents (viruses) Surveillance Report in Miyazaki Prefecture, 2007

Akira IWAKIRI, Miho MIURA, Seigo YAMAMOTO and Youko SHIOYAMA

Abstract

In the surveillance of infectious agent (viruses), out of the total 276 samples collected from sentinel clinics and hospitals, 104 viruses were detected or isolated in Miyazaki Prefecture in 2007.

During the 2006/2007 Influenza season, 61 influenza viruses were isolated. Influenza A(H1) subtype isolated between June and August. In the winter season, Influenza A(H1) subtype were mainly isolated, and the eight A (H3), one B subtype were also isolated in the end of season.

Measles viruses were detected from the eight adult persons out of 20 cases of rash symptom patients. Measles virus genotype were classified into clade D5.

Twenty norovirus genotype II, three coxsackievirus B5, one rotavirus followed by two polioviruses were isolated from thirty-nine stool specimens out of infectious gastroenteritis patients. Two polioviruses were diagnosed oral polio vaccine type 3 like-poliovirus.

Key words : Influenzavirus, Measles virus, Poliovirus.

はじめに

感染症発生動向調査事業における病原体サーベイランス部門では、日頃から正確で適切な検査体制の準備が必要である。また、感染症健康危機管理の面からは、特に、高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒト感染疑い事例や麻疹のような感染力の強い原因ウイルスの検査では、より迅速な病原体の診断対応が望まれている。

2007年1月～12月迄には、ウイルスの検索を目的として、276件の検体が病原体定点と協力医療機関から提供され、106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、麻疹ウイルス、感染性胃腸炎ウイルスの検出状況及び流行状況について報告する。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2007/08シーズン

（2007年4月～2008年3月）について解析した。

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、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 \times 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 \times 20分間遠心し、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。

*微生物部 *企画管理課

2 細胞

Caco-2, HEp-2, Vero, 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 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 RD-18S, Hep-2, Vero, Caco-2 細胞に検体を 1 穴あたり 30 μ l ずつ接種して 36 $^{\circ}$ 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) 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 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、2007年4月から8月に分離されたインフルエンザの抗原性は、シーズン前に国立感染症研究所 (感染研) から配布された抗原解析用抗体キット [抗 A/Newcaledonia/20/99 (H1N1・ワクチン株)、抗 A/Hiroshima/52/2005 (H3N2・ワクチン株)、抗 B/Shanghai/361/2002 (山形系統株)、抗 B/Malaysia/2506/2004 (ビクトリア系統株・ワクチン株)] を用いた血球凝集抑制試験 (HI 試験) で、2007年12月～2008年3月に分離されたインフルエンザの抗原性は、同様の抗原解析用抗体キット [抗 A/Newcaledonia/20/99 に代え抗 A/Solomon Islamds/3/2006 を含む] を用いた HI 試験で調べた。

麻疹ウイルスの同定と遺伝子型別は病原体検出マニュアルに従い、NP 遺伝子をターゲットとした RT-PCR 産物の塩基配列を決定して行った。NV 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。

エンテロウイルスの遺伝子検査は、Oberste etc.¹⁾ の方法と篠原等の報告²⁾ 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、Gouvea etc の方法³⁾ に従い、RT-PCR 法により実施した。

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、2004 年度の報告⁵⁾ に準じて行い、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定し、BLAST を用いて相同性検索を行った。

結果及び考察

インフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、感染性胃腸炎ウイルスの検出状況は以下のとおりであった。

1 インフルエンザウイルス

2007/08 シーズンの定点当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、第3～12 週まで流行発生注意報基準値(10.0)を超え、第13週に注意報基準値を下回った。患者報告数のピークは、2008 年第 6 週で、昨年と比べ約 1 ヶ月以上早かった。シーズン中に、AH1 型 (ソ連型) が 52 株、AH3 型 (香港型) が 8 株、B 型が 1 株、計 61 株のインフルエンザウイルスが分離された。

2007 年第 26～34 週 (6 月下旬～8 月下旬) には県内の宮崎市、都城市、高鍋町周辺でインフルエンザ患者の報告があり、宮崎市保健所管内の保育園・小学生および大人から計 10 株のインフルエンザウイルス A ソ連型が分離された。昨シーズンも、第 22～31 週に県内の保育園児・小中高校生の間でインフルエンザウイルス B 型による集団発生がみられており、県内で 2 シーズン連続で夏季にインフルエンザウイルスが分離された。なお、全国的には、2004/05 シーズン～2007/08 シーズンまで 3 シーズン連続して夏季に地域流行がみられている⁶⁾。

2007/08 シーズンには AH1 型に対するワクチン株が A/Solomon Islamds/3/2006 株に変更されたが、2007 年 12 月～2008 年 2 月に分離された AH1 型株は、ワクチン株 A/Solomon Islamds/3/2006 株と HI 試験で 4 倍以上の抗原性の

違いがみられた。

海外渡航後にインフルエンザ様症状を呈した患者の検査依頼が、昨年と同様に2件あった。11月にインドネシアバリ島に旅行中に発熱、咽頭痛を呈し、帰国後に医療機関を受診した例では、保健所の疫学調査で鶏との接触歴を有したことから要観察例としてインフルエンザ H5N1 の検査を行ったが、H5N1 は検出されずオルトレオウイルスが分離された。2008年3月にベトナムに旅行後、発熱、咽頭痛を呈し、県内の医療機関におけるインフルエンザ迅速診断キットで陽性となった1例では、ベトナムでの H5N1 の感染機会は確認されず、当所で行った検査でインフルエンザ AH3 型が分離された。分離ウイルスを用いた HI 試験では、同時期に県内で検出された AH3 型と同様の反応性を示した。県内では、2005年と2006年にも計3件の海外渡航後にインフルエンザを発症した患者の検査が依頼されており(表1)、今後も、同様の検査依頼が増えることが予想される。インフルエンザ防疫対策のためには流行しているウイルス株を早期に検出することが極めて重要なことであり、

通年的にウイルスを分離して詳細な解析を実施することが必要と思われる。

平成19年11月13日付宮崎県福祉保健部長通知に基づき、流行初期の集団発生事例(2008年1月13～15日に延岡保健所管内の小学校でインフルエンザの集団発生)について遺伝子診断による迅速検査とウイルス分離を行った。遺伝子検査で5検体からインフルエンザ AH1 型が検出されたが、5名中1名がタミフル、1名がリレンザ、3名が漢方薬を処方しており、漢方薬を処方していた3名のうち2名の咽頭ぬぐい液からインフルエンザウイルス AH1 型が分離された。

Fig.1 Weekly incidence of influenza per sentinel clinic and weekly cases of influenza virus isolation from the 19th week of 2007 through the 13th week of 2008 in Miyazaki

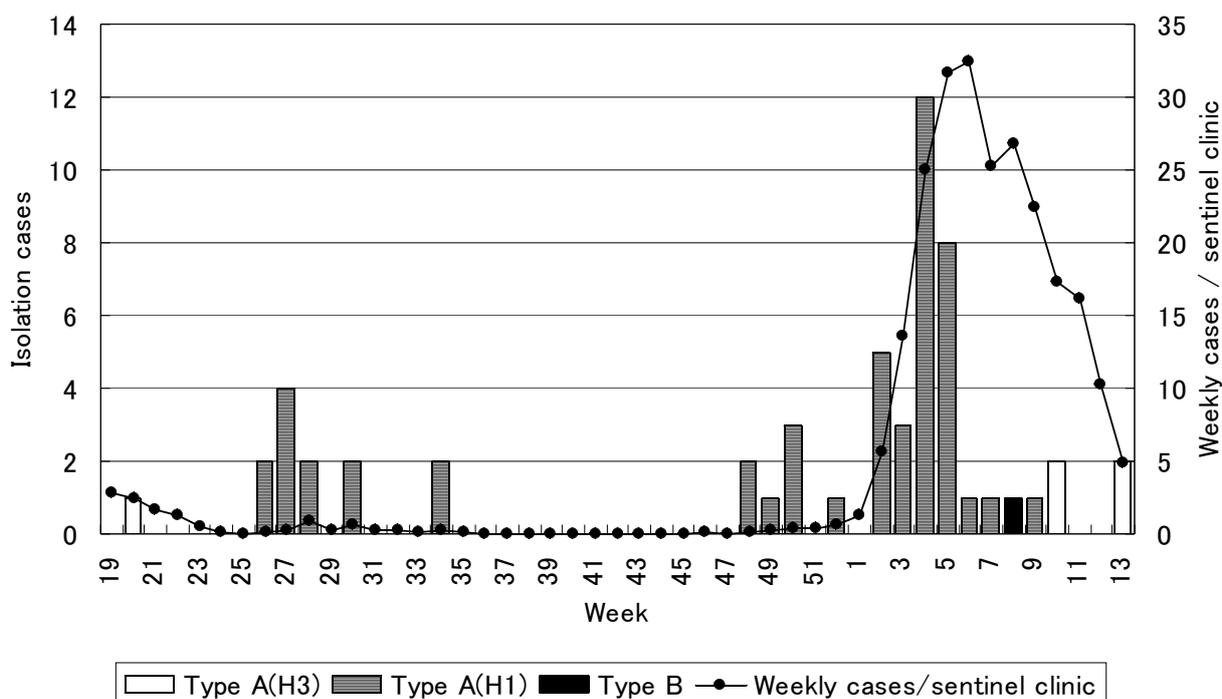


Table 1 Inspeccion of influenza viruses from overseas travelers.

	Case 1	Case2	Case 3	Case 4	Case 5
Day	2005/12/29	2006/1/12	2006/7/21	2007/11/19	2008/3/8
Destination	Thailand	Thailand	China	Indonesia	Viet Nam
Symptoms	pyrexia (40.3°C) pharyngitis	pyrexia (39.2°C) pharyngitis	pyrexia (39.7°C) pharyngitis	pyrexia (39°C) pharyngitis	pyrexia (38.5°C) pharyngitis
Diagnotis kit	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
Virus	influenza AH3	influenza AH3	influenza AH1	orthoreovirus	influenza AH3

2 麻疹ウイルス

2007年5月～11月の間に、20名の麻疹(疑い)の検査依頼があり、そのうち8名が陽性であった。患者の年齢は、17歳が1名、20歳～29歳が6名、30歳が1名で、そのうち2名が同一の家族内感染であった。保健所から麻疹ウイルスの検査依頼があった場合、当所では、より迅速な保健行政対応に資するため、2006年からRT-PCR法を行い迅速な結果の還元を行っている。陽性であった8検体は、全てRT-PCR法とウイルス分離ともに陽性であった。一方、麻疹ウイルスが検出されなかった12検体については、他のウイルスも検出されなかった。検出された8株のうち6株について塩基配列を決定し遺伝子型を検討した結果、全てD5型であった。当所では、2003年に24株のH1型麻疹ウイルスが検出されて以来の分離例である。D5型は、全国的には、2006年に茨城県(9件)、千葉県(13件)、沖縄県(18件)から報告され、2007年には5月をピークに2～12月に27都道府県から報告されている⁷⁾。

3 感染性胃腸炎ウイルスの原因ウイルス

感染症発生動向調査事業に伴い、便58検体の検査依頼があった。うち39検体が感染性胃腸炎を主な臨床症状とする症例で、NVが20検体、コクサッキーウイルスB5型(Cox B5)が3検体、A群ロタウイルスが1検体およびポリオウイルスが2検体から検出あるいは分離された。

NVの検出された検体は、都城市、延岡市、宮崎市、清武町および都農町の基幹定点医療機関等からの検査依頼であった。患者の年齢は、0歳～4歳が8名、60歳以上が8名、10歳代が1名、30歳代が1名、40歳代が2名で、重症例の乳幼児の嘔吐下痢症患者と成人の入院患者の院内感染防止の為にNV感染を疑う検査依頼と思

われた。検出されたNVは、全てNVG IIであった。全国的には、2006年9月～2007年5月に発生し、NVG IIの遺伝子型まで確認された312事例中298事例(約96%)で、G II/4が検出されている⁸⁾。

2007年11月には、我が国で初めてイムノクロマト法によるNVの迅速診断キットが開発された。検出感度の面で、低濃度のノロウイルス排泄の場合は問題があるが、院内感染予防のための迅速診断には有効な方法と考えられる。

家族内食中毒疑い事例で、3人の乳幼児の便検体からCox B5が検出された。当初、NV、サポウイルス、アストロウイルス、A群ロタウイルス、アデノウイルスの検査を行ったが陰性であった。その後、ウイルス分離を行った結果、Caco-2細胞にエンテロ様CPEを呈するウイルスが分離された。Oberste etc.¹⁾と篠原等の報告²⁾に従い、エンテロウイルス検出系のRT-PCR反応を行った結果、それぞれのプライマー(189/011ペアとP2/E33ペア)で陽性バンドが検出され、得られた増幅産物を用いシーケンズ反応を行ったところ、Cox B5と同定された。国立感染症研究所から配布されたEpi抗血清を用いた中和試験でも同様に同定された。

5月に発生した家族内感染事例で、4歳の急性胃腸炎患者の便検体からserotype3(G3型)のA群ロタウイルスが検出された。2004年1月以降、国立感染症情報センターのオンラインシステムでのA群ロタウイルスのG血清型別の報告が可能になっているが、2007年の全国の地研からの報告では、G I型が64株と最も多く、次いでG3型が52株検出されている。

10月と11月に、それぞれ、下痢、嘔吐、無熱性けいれんを呈した2名(1歳児)の便検体からポリオウイルスが検出された。始めに行ったりアルタイムPCR法によりNVG IIが検出されたが、ウイルス培養後数日でRD-18s, Veroおよび

Caco-2 細胞にエンテロウイルス様 CPE が観察された。聞き取り調査で2事例の患者はともにポリオワクチンを接種しており、1例はワクチン後11日、もう1例はワクチン接種59日後に採取された便検体であった。分離株は、Sabin ワクチン株と VP1 全領域の塩基配列を比較した結果、いずれも VP1 領域の99%以上の塩基配列がワクチン株ポリオ3型と一致し、ワクチン由来株と確認された。

謝 辞

2007年度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検体採取に御協力頂いた医療機関の諸先生方に深謝致します。

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、海老原記念病院、大森内科、県立こども療育センター、県立日南病院、県立延岡病院、県立宮崎病院、こおりやま医院、古賀総合病院、国民健康保険高原病院、国立病院機構都城病院、済生会日向病院、志久病院、せき診療所内科呼吸器科、高山内科、田中内科、都農町国民健康保険病院、野崎病院、村田内科胃腸科、丸山クリニック、三宅小児科医院、宮崎市小児診療所、宮崎大学医学部付属病院、湯地内科、わたなべ小児科

参考文献

- 1) 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)
- 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及びエンテロウイルス71型の検査方法の検討, 感染症学雑誌, 73, 7 49-757 (1999)
- 3) Vera Gouvea, Roger I. Glass, Patricia Woods,

KOki Taniguchi, H Fred Clark, etc., : Polymerase Chain Reaction Amplification and Typing of Rotavirus Nucleic Acid from Stool Specimens. J. Clin. Microbiol 28(2):276-282 (1990)

- 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世界的行動計画 第2版, 2, ウイルス, Vol. 5 5(1), (2005)
- 5) 岩切章, 元明秀成, 山本正悟 : ノロウイルス (NV) による食中毒事例における感染経路の究明と糞便中の NV の排泄期間, 宮崎県衛生環境研究所年報, 16, 41-44 (2004)
- 6) 国立感染症研究所・感染症情報センター : <特集>インフルエンザ 2006/07 シーズン : 病原微生物検出情報, Vol. 28 (11), (2007)
- 7) 国立感染症研究所感染症情報センター 病原微生物検出情報事務局 : <速報>麻疹ウイルス分離・検出状況 2007年~2008年
- 4) 国立感染症研究所・感染症情報センター : <速報>ノロウイルス感染集団発生2006/07シーズン (2007年5月31日現在報告数)

Table 2 Monthly changes of isolation number of viruses in Miyazaki Prefecture, 2007

Virus	Month												Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Coxsackievirus B5									1	3			4
Coxsackievirus A6							2						2
Coxsackievirus B4						1	6						7
Echovirus 30										2		1	3
Echovirus 25						1	1						2
Enterovirus 71	1	2	1	1		1							6
Herpes simplex virus 1												1	1
Influenza virus A H1			3	2		2	8	2			2	4	23
Influenza virus A H3	6	8	2	1	1								18
Influenza virus B	4	3											7
Measlesvirus					2	1	2	1	2				8
Orthoreovirus											1		1
Norovirus G2	1	3								3	6	8	21
A group Rotavirus					1								1
Poliovirus 3										1	1		2
Total	12	16	6	4	4	6	19	3	3	9	10	14	106

Table 3 Detection number of viruses in Miyazaki Prefecture, 1998–2007

	Year										Total
	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	
Adenovirus 1	1	3	1	3	4	1	4	2	2		21
Adenovirus 2	4	4	6	8	3	3	6	4	1		39
Adenovirus 3	16	12	2	39	11	2	24	1	2		109
Adenovirus 4		2		1	1						4
Adenovirus 5		2	2	2	2			1			9
Adenovirus 6			3				1				4
Adenovirus 7	34	1									35
Adenovirus 11	1		1					1			3
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	17			13	1	38			14		66
Coxsackievirus A 10			5			1					6
Coxsackievirus A 16	5	4	2	20	6	17	19	2			75
Coxsackievirus A 24v						3					3
Coxsackievirus B 2	3	1			4			1	1		10
Coxsackievirus B 3	1	1	1	9				9			21
Coxsackievirus B 4	1	6			2					7	16
Coxsackievirus B 5	5		2			4				4	15
Echovirus 3				9				1			10
Echovirus 4			2								2
Echovirus 6	1	10					4				15
Echovirus 9	1	1	114			33		3	2		154
Echovirus 11	5	7		8		1					21
Echovirus 13					66						66
Echovirus 16						12	13				25
Echovirus 17		1									1
Echovirus 18	12	4	8	49				5	46		124
Echovirus 22	4										4
Echovirus 25		1	30				8			2	41
Echovirus 30	54					1	2		3	3	63
Poliovirus 1		4		3	1	1			2		11
Poliovirus 2		2	1	2	3	2					10
Poliovirus 3	2	2	2		1	1				2	10
Enterovirus 71	6	15	4			1	3		7	6	42
Parvovirus	1										1
Herpes simplex virus 1	3	12	7	12	11	5	9	3	3	1	66
Varicella-zoster virus	1										1
Influenza virus A H1			60	19	27			1		23	130
Influenza virus A H3	80	67	29	47	59	37	23	18	37	18	415
Influenza virus B		38		78	12	23	4	18	32	7	212
RS virus	1		1			2		2			6
Measles virus	2	2	1	5	2	24				8	44
Mumps virus	4			3	16			3	1		27
Rubella virus				1							1
Rotavirus	3	3	4			1		3		1	15
Astrovirus	1										1
Norovirus	1	5		1		8	3	15	24	21	78
Orthoreovirus										1	1
Total	270	219	297	342	237	228	125	93	177	106	2094