

# 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（2009年）

三浦美穂・北野智一・境田昌江\*<sup>1</sup>・山本正悟

## Infectious Agents (viruses) Surveillance Report in Miyazaki Prefecture, 2009

Miho MIURA, Tomokazu KITANO, Masae SAKAIDA, Seigo YAMAMOTO

### Abstract

On April 24, WHO announced that the new influenza was Public Health Event of International Concern. The virus [Influenza A(H1N1)pdm] spread in Japan wide from mid June, too.

In the surveillance of infectious agent (viruses), out of the 1,055 samples collected from sentinel clinics and hospitals, 650 viruses were detected by isolation method or polymerase chain reaction in Miyazaki Prefecture in 2009 and 89.7% of those detected viruses were identified as influenza virus. Four hundred ninety four, 35, 45 and 9 influenza viruses were typed to A(H1N1)pdm, AH1, AH3 and B, respectively and A(H1N1)pdm occupied almost all of the influenza viruses detected after June 17 when the first case infected with this type was diagnosed in Miyazaki Prefecture.

Nine strains of Echovirus type 9 were isolated and 7 of these strains were isolated from children less than 1 year old. The major symptoms were exanthema and bronchitis.

Eight strains of Coxsackievirus A9 were isolated between June and August and 7 of these strains were isolated from less than 1 year old children showing the symptom of aseptic meningitis or exanthema.

Two strains of Poliovirus were isolated from the feces of infants with diarrhea or gastroenteritis. These two strains were determined as the vaccine-derived Type1 and Type2 strains by sequence analysis.

Key words : Influenza virus, Influenza A(H1N1)pdm, Echovirus 9, Coxsackievirus A9

### はじめに

2009年4月12日に、肺炎による死亡者およびインフルエンザ様疾患の増加が、国際保健規則に基づいてメキシコから世界保健機関（WHO）に報告された。次いで、米国南カリフォルニアでこれまでにヒトから分離されたことのないインフルエンザウイルスが発見され、メキシコの患者から分離されたウイルスと同一であることが判明し、新型インフルエンザの発生が現実のものとなった。現在、WHOではウイルスを influenza A(H1N1)

pdm, 疾病名を Pandemic(H1N1)2009 と呼んでいる。

日本では2009年4月に「新型インフルエンザ（H1N1）」を感染症法に規定する新型インフルエンザ等感染症の類型に位置づけ、検疫体制を強化した。その結果、5月9日に成田空港の検疫によりカナダから帰国した高校生らから PCR で AH1pdm が検出された。

発生当初は感染症法に基づいた疑い例の全例検査と全数報告が行われ、当所でも一時は24時間体制での検査対応が求められた。また、7月24

日以降は既存のインフルエンザ定点サーベイランス・病原体サーベイランスに加えて、クラスター

当所では、2009年1月～12月迄にウイルスの検索を目的とし、新型インフルエンザのサーベイランスを含めて1,055件の検体が提供され、650株のウイルスが分離・検出された。分離株の89.7%がインフルエンザウイルスで、他ではエコーウイルス9型、コクサッキーウイルスA9型が比較的多く検出された。これらのウイルスについて、宮崎県における検出状況を報告する。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2010年2月までの解析を行った。

## 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、眼瞼結膜ぬぐい液、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 $\gamma$ /mlの割合で加えたもの〕に浮遊させ、3,000rpm 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、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0.2 $\mu$ m）を通し、分離材料とした。なお、検体は接種時まで-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

### 2 細胞

Caco-2, Vero, HEp-2, RD-18S細胞の4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Caco-2, Vero, HEp-2, RD-18S細胞に検体を1穴あたり30 $\mu$ lずつ接種して36 $^{\circ}$ 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）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。4～5代継代してもCPEが出現しなかった

（集団発生）サーベイランスと入院（重症例）サーベイランスが実施された<sup>1)</sup>。

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。

インフルエンザについては、国立感染症研究所の病原体検出マニュアル H1N1 新型インフルエンザ（2009年5月 ver.1, 2009年11月 ver.2）に従ってリアルタイムPCR法で検査を行った。

ノロウイルスについては、マニュアル（平成15年11月5日付食安監発第1105001号）に従ってリアルタイム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>2)</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、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、Oberste等の方法<sup>3)</sup>と篠原等の報告<sup>4)</sup>に従い、RT-PCR法で行った。

C型肝炎ウイルスの遺伝子検査は、国立感染症研究所で実施している鈴木らの方法（未発表）を用い、RT-nested PCR法で行った。

ポリオウイルス分離株については、WHOの指針<sup>5)</sup>に基づきワクチン株のVP1全領域と塩基配列を比較し、野生株とワクチン株との鑑別を行った。

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あるいはMEGAを利用して系統樹解析を実施した。

## 結果および考察

### 1 インフルエンザウイルス

定点あ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。本県では2009年5月3日に新型インフルエンザの検査体制が整ったが、第22週（5月下旬）にはAH3型（香港型）が検出され、第25週（6月中旬）に初めて

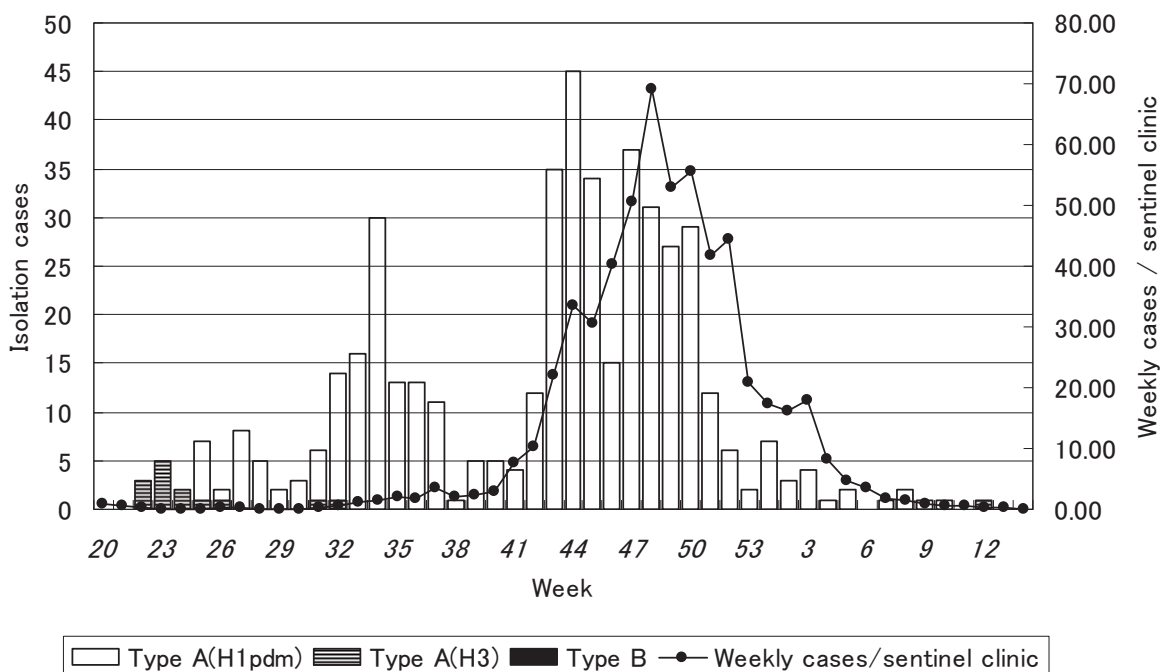
AH1pdm 型（新型インフルエンザ）が PCR で検出された。

患者報告数は、第 32 週から増え始め、第 42 週に流行発生注意報基準値（10.0）を超え、第 48 週にピークとなった。その後、2010 年第 3 週まで注意報基準値を超えた。

2010 年 2 月までに分離されたインフルエンザウイルスは AH1pdm 型が 542 株、AH3 型が 15 株であった。このうち AH1pdm 型分離株の 6 株について国立感染症研究所で抗原性解析が行われ、国内初の分離株 A/Narita/（成田）/1/2009（孵化鶏卵および MDCK 細胞で分離したウイルス）と米国 CDC から供与されたワクチン株 A/California/7/2009 に対するフェレット抗血清および七面鳥血球を用いて HI 試験が実施された。解析した分離株 6 株はいずれもこれらの抗血清に対してホ

モの株と同じか 2~4 倍程度異なる反応性を示したが、抗原性は均一であった。また、孵化鶏卵分離株と MDCK 細胞分離株の間には HI 試験で抗原性の違いは見られなかった。国立感染症研究所で行った国内分離株の抗原性解析の結果も同様に差異は見られなかった。また、諸外国における分離株も A/California/7/2009 類似株がほとんどを占め、世界中の新型 A(H1N1)pdm ウイルスの抗原性は均一で、ワクチン株 A/California/7/2009 と類似していたと言える。新型 A(H1N1)pdm ウイルスの HA 遺伝子系統樹解析により、国内外で分離されたすべての株は A/Narita/（成田）/1/2009 株および A/California/7/2009 株を含む単一のクラスターに属し、遺伝的にも均一であることが示された<sup>6)</sup>。

Fig.1 Weekly incidence of influenza per sentinel clinic and weekly cases of influenza virus isolation from the 20th week of 2009 through the 14th week of 2010 in Miyazaki



## 2 エコーウイルス 9 型

2009 年はエコーウイルス 9 型が 9 株分離された (Table 1)。本県では 2000 年に 114 株、2003 年に 33 株分離され、2005 年と 2006 年にも 2~3 株分離されており、3 年ぶりの検出であった (Table 2)。全国的には、2000 年に 250 株、2002 年に 170 株、2003 年に 128 株、2005 年に 101 株分

離されたが、その後は例年 40~60 株ほど分離されていた。

主な臨床症状は、発疹 8 例、気管支炎 1 例で、年齢は 0 歳 4 例、1 歳 3 例、3 歳 1 例、16 歳 1 例であった。

分離株は、Caco-2, RD-18S 細胞で CPE を示し、国立感染症研究所より分与された EP95 パネ

ル抗血清による中和試験で同定可能であった。

### 3 コクサッキーウイルス A9 型

コクサッキーウイルス A 群, コクサッキーウイルス B 群, エコーウイルスなどのエンテロウイルスは, いわゆる夏風邪の原因ウイルスで, 夏から秋にかけて流行し, 乳幼児に多い特徴がある。

本県では, 2009 年にコクサッキーウイルス A9 型が 8 株分離された (Table 1)。2006 年に 14 株分離されて以来 3 年ぶりの検出であった (Table 2)。全国的にも 2006 年, 2009 年の分離数が多くなっていた。月別の検出数をみると, 本県では 6~8 月に分離されており, 全国的にも 6~8 月に分離数が多くなっていた。

主な臨床症状は, 発疹 5 例, 無菌性髄膜炎 1 例, 咽頭炎 1 例, ショック症状 1 例で, 年齢は 0 歳 5 例, 1 歳 2 例, 5 歳 1 例であった。

2009 年の全国の無菌性髄膜炎患者から検出されたウイルスは, コクサッキーウイルス B3 型, エコーウイルス 6 型, コクサッキーウイルス A9 型が上位を占めていた。

また, Caco-2, Hep-2, RD-18S 細胞で CPE を示し, 市販の抗血清を用いた中和試験で同定された分離株は 2 株のみであった。残りの 6 株は中和試験が困難であったため, 塩基配列を決定し, 遺伝子解析で同定された。今後, これらの難中和性の株については, 免疫血清の作製が必要である。

### 4 その他

#### 1) 麻疹ウイルス

麻疹疑いで 15 検体が提出されたが, いずれも陰性であった。このうち 1 例から単純ヘルペスウイルス 1 型が検出された。

#### 2) C 型肝炎ウイルス

医療機関において透析治療を受けている患者の HCV 感染が報告された。この新規感染者および同施設で透析治療を受けている慢性 C 型肝炎患者 2 名の血清から HCV の超可変領域の遺伝子を PCR で検出し, その配列を決定して各患者間の相同性解析を行った。

新規感染者と慢性 C 型肝炎患者 1 名は極めて高い相同性を示し (98.3%), ほぼ同一配列と考えられた。新規感染者ともう 1 名の慢性 C 型肝炎患者の相同性は 64.2% であった。今回の事例では, 疫

学調査の結果から感染経路の確定には至らなかった。

### 3) ポリオウイルス

下痢, 胃腸炎の乳児の便 2 例からポリオウイルス 1 型と 2 型が検出された (Table 1)。塩基配列を決定し, ワクチン株の塩基配列と比較した結果, いずれも 1.0% 以下の塩基置換であったため, 一般的なワクチン株であると判定された。

## 謝辞

2009 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ならびに検体採取にご協力いただいた医療機関の諸先生方に深謝いたします。

## 参考文献

- 1) 国立感染症研究所: <特集> 新型インフルエンザパンデミック (H1N1) 2009 2009 年 5~9 月, 病原微生物検出情報, Vol.30 No.10 (No.356), 255-256, (2009)
- 2) Detection of Human Sapovirus by Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, Journal of Medical Virology 78: 1347-1353, (2006)
- 3) Oberste MS, Maher K, Kilpartrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA: Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1, J Clin Microbiol, 37 (5): 1288-1293, (1999)
- 4) 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)
- 5) 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 世界行動計画 第 2 版, ウイルス, 55 (1), 161-178, (2005)
- 6) 国立感染症研究所: <特集関連情報> 2008/09 シーズンの季節性インフルエンザおよび新型インフルエンザ分離株の解析, 病原微生物検出情報, Vol.30 No.11 (No.357), 287-297, (2009)

Table 1 Monthly changes of detection number of viruses in Miyazaki Prefecture, 2009

Virus	Month												Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Adenovirus 1				1					1				2
Adenovirus 2										1	3		4
Coxsackievirus A6								1					1
Coxsackievirus A9						1	6	1					8
Coxsackievirus B1					1							1	2
Coxsackievirus B2			1	1							5		7
Coxsackievirus B3								2					2
Echovirus 7								1		2			3
Echovirus 9		2	1	2		3			1				9
Echovirus 11							2				1		3
Poliovirus 1						1							1
Poliovirus 2					1								1
Enterovirus 71											1		1
Rhinovirus										1	1		2
Herpes simplex virus 1				2		2						1	5
Hepatitis C virus	6												6
Influenza virus A H1pdm						23	40	81	30	109	138	73	494
Influenza virus A H1	30	5											35
Influenza virus A H3	15	3	1		6	18	1	1					45
Influenza virus B	2	5		2									9
Norovirus G1		1											1
Norovirus G2	7											1	8
Sapovirus genogroup unknown				1									1
Total	60	16	3	9	8	48	49	87	32	113	149	76	650

Table 2 Detection number of viruses in Miyazaki Prefecture, 2000–2009

	Year										Total
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	
Adenovirus 1	1	3	4	1	4	2	2		1	2	20
Adenovirus 2	6	8	3	3	6	4	1		1	4	36
Adenovirus 3	2	39	11	2	24	1	2		1		82
Adenovirus 4		1	1								2
Adenovirus 5	2	2	2			1					7
Adenovirus 6	3				1						4
Adenovirus 11	1					1					2
Adenovirus NT		2	1	2							5
Coxsackievirus A 2		1		2							3
Coxsackievirus A 4	5	3	1	1							10
Coxsackievirus A 5			1								1
Coxsackievirus A 6		4	1	2	2			2		1	12
Coxsackievirus A 8	4		1								5
Coxsackievirus A 9		13	1	38			14			8	74
Coxsackievirus A 10	5			1							6
Coxsackievirus A 16	2	20	6	17	19	2			12		78
Coxsackievirus A 24v				3							3
Coxsackievirus B 1										2	2
Coxsackievirus B 2			4			1	1			7	13
Coxsackievirus B 3	1	9				9				2	21
Coxsackievirus B 4			2					7			9
Coxsackievirus B 5	2			4				4	17		27
Echovirus 3		9				1					10
Echovirus 4	2										2
Echovirus 5									19		19
Echovirus 6					4				8		12
Echovirus 7										3	3
Echovirus 9	114			33		3	2			9	161
Echovirus 11		8		1						3	12
Echovirus 13			66								66
Echovirus 16				12	13						25
Echovirus 18	8	49				5	46				108
Echovirus 25	30				8			2			40
Echovirus 30				1	2		3	3	3		12
Poliovirus 1		3	1	1			2			1	8
Poliovirus 2	1	2	3	2						1	9
Poliovirus 3	2		1	1				2	2		8
Enterovirus 71	4			1	3		7	6		1	22
Group Enterovirus									1		1
Rhinovirus										2	2
Herpes simplex virus 1	7	12	11	5	9	3	3	1	3	5	59
Varicella-zoster virus									3		3
Hepatitis C Virus										6	6
Influenza virus A H1pdm										494	494
Influenza virus A H1	60	19	27			1		23	34	35	199
Influenza virus A H3	29	47	59	37	23	18	37	18	9	45	322
Influenza virus B		78	12	23	4	18	32	7	1	9	184
RS virus	1			2		2					5
Measles virus	1	5	2	24				8	1		41
Mumps virus		3	16			3	1				23
Rubella virus		1									1
Rotavirus	4			1		3		1	1		10
Norovirus		1		8	3	15	24	21	5	9	86
Orthoreovirus								1		1	2
Total	297	342	237	228	125	93	177	106	122	650	2377