

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（2010年）

三浦美穂・櫻井涼子・北野智一・山本正悟*¹・山下美恵子*²

Infectious Agents (viruses) Surveillance Report in Miyazaki Prefecture, 2010

Miho MIURA, Ryoko SAKURAI, Tomokazu KITANO, Mieko YAMASHITA, Seigo YAMAMOTO

Abstract

In the surveillance of infectious agent (viruses), 418 samples were collected from sentinel clinics and hospitals, and 177 viruses were detected by polymerase chain reaction(PCR) or isolated in Miyazaki Prefecture in 2010, 65.0% of those detected viruses were identified as influenza virus.

During the 2010/2011 Influenza season, 173 influenza viruses were detected or isolated. The types of the influenza virus were A(H1N1)pdm, AH3 and B, and the number of virus included in each type was 75, 89 and 9 respectively.

Fourteen strains of Echovirus type 25 were isolated and the major symptom was aseptic meningitis.

Fourteen strains of Enterovirus type 71 were isolated from hand, foot and mouth disease. And they were not identified by a neutralization test but by PCR.

Norovirus genogroup II was detected from patient of the infection gastroenteritis.

We detected Dengue virus from patient using PCR and culture.

Key words : Influenza A(H1N1)pdm, Echovirus 25, Enterovirus 71, Norovirus, Dengue virus

はじめに

国内での新型インフルエンザ（A/H1N1）の流行状況は、2009年5月9日に初めての患者が検知されたのち、8月中旬に流行入りをし、11月末に流行のピークを迎えた。12月に入り減少に転じ、2010年3月末には厚生労働大臣が「今般の新型インフルエンザの最初の流行は沈静化している」との旨の発表を行った。

2010年8月27日に設置された政府の新型インフルエンザ対策本部において、今回の新型インフルエンザについては、政府全体として緊急かつ総合的に対処すべき事態は終息しつつあるものと判断され、今後は通常の感染症対策として厚生労働省において対策に万全を期すこと等を盛り込んだ「新型インフルエンザに対する

今後の取組」を決定した。厚生労働省では、国内における新型インフルエンザの再流行の可能性が続いていることを踏まえ、地域における感染拡大の探知のためのサーベイランスを継続して実施することを決定した¹⁾。

これを受け本県では、本県独自のサーベイランスとして、従来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、集団発生サーベイランスと入院サーベイランスを実施した。本県独自のサーベイランスは、2010年12月19日（PCR検査は12月21日）まで実施された。

当所では、2010年1月～12月に、新型インフルエンザのサーベイランスを含めて、ウイルスの検索を目的とした418件の検体を検査し、177株のウイルスを分離・検出した。インフル

エンザウイルスが検出数の 65.0% を占め、他ではエコーウイルス 25 型、エンテロウイルス 71 型、ノロウイルスが多く検出された。これらのウイルスについての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 2010/2011 シーズンについて解析を行った。

材料と方法

1 分離材料

髄液、血清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 γ /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。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。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 μ m) を通し、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 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 μ L ずつ接種して 36°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)、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、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) に従ってリアルタイム PCR 法で検査を行った。

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²⁾ と篠原等の報告³⁾ に従い、RT-PCR 法で行った。

A 型肝炎ウイルスの遺伝子検査は、A 型肝炎ウイルス検出法 (平成 21 年 12 月 1 日付食安監発 1201 第 2 号) に従い、RT-PCR 法で行った。

デングウイルスについては、国立感染症研究所で実施している高崎らの方法を用い、RT-PCR 法で検査を行った。

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 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

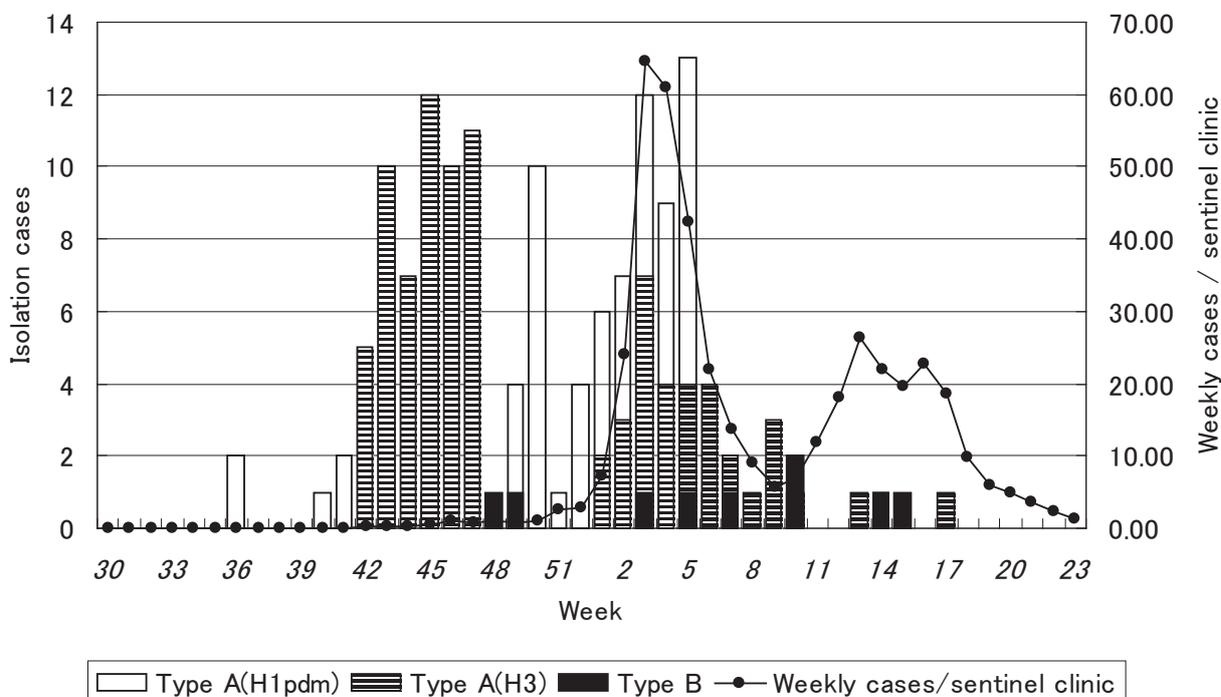
定点あたり患者報告数の推移とウイルス分離状況は Fig.1 に示すとおりであった。患者報告数は、第 45 週 (11 月上旬) から増え始め、2011 年第 2 週 (1 月中旬) に流行発生注意報基準値 (10.0) を超え、第 3 週にピークとなった。その後、第 8 週 (2 月下旬) には注意報基準値

以下となったが、第11週（3月中旬）には再び注意報基準値を超えた。その後、第17週（4月下旬）まで注意報基準値を超えた。

2011年4月までに分離されたインフルエンザウイルスはAH1pdm型が75株、AH3型が89株、B型が9株の計173株であった。これらの分離株について赤血球凝集抑制（HI）試験による型・亜型の同定を試みたが、A型インフルエンザウイルスは赤血球凝集（HA）活性の低い株が多く⁴⁾、これらの株はリアルタイムRT-PCRにより型・亜型の同定を行った。2010/2011シーズン分離株のHA価を測定した

結果、AH1pdm型の80%、AH3型の55%は8HA未満でHI試験が実施できなかった。8HA以上を示したAH1pdm型14株、AH3型36株についてHI試験を実施し抗原解析を行った結果、ワクチン株と類似していた。B型の分離株9株は2010年に分離された2株が山形系統、2011年に分離された7株がビクトリア系統であった。2010/2011シーズンのワクチン株はビクトリア系統であったが、HI試験で抗原解析を行った結果、分離された7株はワクチン株との抗原性のずれはみられなかった。

Fig.1 Weekly incidence of influenza per sentinel clinic and weekly cases of influenza virus isolation from the 30th week of 2010 through the 23rd week of 2011 in Miyazaki



2 エコーウイルス 25 型

2010年5月～10月にエコーウイルス25型が14株分離された（Table 1）。本県では2000年に30株、2004年に8株、2007年に2株されており、3年ぶりの検出であった（Table 2）。全国的には2007年までは毎年20～50株ほど分離されていたが、2008・2009年はほとんど分離されず、2010年に124株分離された。

主な臨床症状は、髄膜炎10例、不明熱2例、

熱性けいれん1例、発疹1例であった。年齢は0歳5例、5歳3例、6歳3例、1歳1例、3歳1例、15歳1例であった。3歳以上の年齢は、すべて髄膜炎であった。全国の髄膜炎患者から検出されたウイルスの報告数では、エンテロウイルス71型、エコーウイルス6型が多く、次いでエコーウイルス25型が多かった。

分離株は、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を行

ったが、難中和性の株もあり、その株についてはダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定し、遺伝子解析で同定を行った。

3 エンテロウイルス 71 型

エンテロウイルス 71 型は、コクサッキーウイルス A16 型とともに手足口病の主要な原因ウイルスのひとつで、毎年分離されている。手足口病は、手のひら、足の裏および口腔内に水疱性の発疹ができる発熱性疾患で、一般に予後はよいと言われている。

2010年に分離されたエンテロウイルス 71 型は 14 株であった (Table 1)。13 例が手足口病と診断されており、残りの 1 例はウイルス性発疹と診断されていた。年齢は 8 歳が 1 例で、残りの 13 例は 2 歳以下であった。全国の手足口病患者からのウイルス分離・検出報告数をみると、エンテロウイルス 71 型が 67% を占めていた。エンテロウイルス 71 型は、中和試験で同定できず、PCR およびシーケンスを行い同定した。

コクサッキーウイルス A16 型は 2 株分離されており、いずれも手足口病と診断されており、年齢も 2 歳以下であった。コクサッキーウイルス A16 型も難中和性のため、PCR およびシーケンスを行い同定した。

4 ノロウイルス

2010年12月、医療機関より入院患者数名が感染性胃腸炎を起こしたと報告があった。患者 5 名の便が提出されノロウイルスの検査を行った結果、3 名からノロウイルス GII が検出された。このうち 11 ヶ月の女児が翌日に死亡した。さらに数日後、同じ医療機関から 2 名の便が提出され、2 名からノロウイルス GII が検出された。基礎疾患のあった 10 歳の男児が多臓器不全で死亡した。12 月は、他の医療機関から提出された胃腸炎 6 例からもノロウイルス GII が検出され、計 11 例となった。

2010年に検出されたノロウイルス GII は 14 例であった (Table 1)。年齢は 1 歳 6 例、3 歳 3 例、0 歳 2 例、5 歳 1 例、10 歳 1 例、11 歳 1 例であった。

5 その他

1) デングウイルス

2010年8月に、フィリピンに渡航歴のある 20 歳の女性の血清からデングウイルス 2 型が分離された (Table 1)。このウイルスの同定は、Vero, HEp-2, RD-18S 細胞で CPE を示した分離株について RT-PCR を実施して行った。

フィリピンでのデング熱の流行シーズンは 7 ~10 月である。2006年4月~2010年5月までに日本で報告された症例について分析した結果、フィリピンから帰国した日本人がデング熱と診断された時期のほとんどは、8~10 月であった⁵⁾。本県の例も流行シーズンと一致していた。

2) 麻疹ウイルス

麻疹疑いで 23 検体が提出され遺伝子検査を実施したが、いずれも陰性であった。麻疹ウイルス以外のウイルスも含め分離を試みたが、ウイルスは検出されなかった。麻疹と似た症状を示すウイルスで、分離が困難なウイルスもあるので、今後は麻疹以外の遺伝子検査を実施していく必要があると考えられた。

謝辞

2010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先生方に深謝いたします。

参考文献

- 1) 厚生労働省結核感染症課：＜特集関連情報＞新型インフルエンザ (A/H1N1) 対策について、病原微生物検出情報, Vol.31 No.9 (No.367), 251-253, (2010)
- 2) 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)
- 3) 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)

- 4) 小渕正次, 堀元栄詞, 小原真弓, 岩井雅恵, 滝澤剛則, 佐多徹太郎: <速報>2010/11シーズンに急増した赤血球凝集性が低いインフルエンザ A(H1N1)2009 ウイルス分離株—富山県, 病原微生物検出情報, Vol.32

No.7 (No.377), 197-198, (2011)

- 5) 中村奈緒美, 島田智恵, 多田有希: <特集関連情報>日本で診断されるデング熱症例数の季節的变化とその感染国の流行季節の影響について, 病原微生物検出情報, Vol.32 No.6 (No.376), 162-163, (2011)

Table 1 Monthly changes of detection number of viruses in Miyazaki Prefecture, 2010

Virus	Month												Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Adenovirus 3				1					1				2
Adenovirus 5								1					1
Coxsackievirus A2									1				1
Coxsackievirus A4					1								1
Coxsackievirus A16										1	1		2
Coxsackievirus B2							1		1				2
Echovirus 3						1	5	1					7
Echovirus 25					2		3	8		1			14
Enterovirus 71			2			2	4	1	5				14
Herpes simplex virus 1											1		1
Influenza virus A H1pdm	19	5	2						2	3	1	20	52
Influenza virus A H3			1							16	43		60
Influenza virus B											1	2	3
Mumps virus											1		1
Norovirus G2	1	1					1					11	14
Dengue virus 2								2					2
Total	20	6	5	1	3	3	14	13	10	21	48	33	177

Table 2 Detection number of viruses in Miyazaki Prefecture, 2001–2010

	Year										Total
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	
Adenovirus 1	3	4	1	4	2	2		1	2		19
Adenovirus 2	8	3	3	6	4	1		1	4		30
Adenovirus 3	39	11	2	24	1	2		1		2	82
Adenovirus 4	1	1									2
Adenovirus 5	2	2			1					1	6
Adenovirus 6				1							1
Adenovirus 11					1						1
Adenovirus NT	2	1	2								5
Coxsackievirus A 2	1		2							1	4
Coxsackievirus A 4	3	1	1							1	6
Coxsackievirus A 5		1									1
Coxsackievirus A 6	4	1	2	2			2		1		12
Coxsackievirus A 8		1									1
Coxsackievirus A 9	13	1	38			14			8		74
Coxsackievirus A 10			1								1
Coxsackievirus A 16	20	6	17	19	2			12		2	78
Coxsackievirus A 24v			3								3
Coxsackievirus B 1									2		2
Coxsackievirus B 2		4			1	1			7	2	15
Coxsackievirus B 3	9				9				2		20
Coxsackievirus B 4		2					7				9
Coxsackievirus B 5			4				4	17			25
Echovirus 3	9				1					7	17
Echovirus 5								19			19
Echovirus 6				4				8			12
Echovirus 7									3		3
Echovirus 9			33		3	2			9		47
Echovirus 11	8		1						3		12
Echovirus 13		66									66
Echovirus 16			12	13							25
Echovirus 18	49				5	46					100
Echovirus 25				8			2			14	24
Echovirus 30			1	2		3	3	3			12
Poliovirus 1	3	1	1			2			1		8
Poliovirus 2	2	3	2						1		8
Poliovirus 3		1	1				2	2			6
Enterovirus 71			1	3		7	6		1	14	32
Group Enterovirus								1			1
Rhinovirus									2		2
Herpes simplex virus 1	12	11	5	9	3	3	1	3	5	1	53
Varicella-zoster virus								3			3
Hepatitis C Virus									6		6
Influenza virus A H1pdm									494	52	546
Influenza virus A H1	19	27			1		23	34	35		139
Influenza virus A H3	47	59	37	23	18	37	18	9	45	60	353
Influenza virus B	78	12	23	4	18	32	7	1	9	3	187
RS virus			2		2						4
Measles virus	5	2	24				8	1			40
Mumps virus	3	16			3	1				1	24
Rubella virus	1										1
Rotavirus			1		3		1	1			6
Norovirus	1		8	3	15	24	21	5	9	14	100
Sapovirus									1		1
Dengue virus 2										2	2
Orthoreovirus							1				1
Total	342	237	228	125	93	177	106	122	650	177	2257