

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（2011年）

三浦美穂 櫻井涼子¹⁾ 北野智一²⁾ 大浦裕子 境田昌江³⁾

Infectious Agents (viruses) Surveillance Report in Miyazaki Prefecture, 2011

Miho MIURA, Ryoko SAKURAI, Tomokazu KITANO, Yuko OURA, Masae SAKAIDA

Abstract

For the surveillance of infectious agents (viruses), 532 samples were collected from sentinel clinics and hospitals, and 236 viruses were detected by gene detection using polymerase chain reaction(PCR) or by virus isolation in Miyazaki Prefecture in 2011. 44.1% of the detected viruses were identified as influenza viruses.

During the 2011/2012 Influenza season, 82 influenza viruses were detected. The types of the influenza virus were AH3 and B, and the number of virus included in each type was 75 and 7 respectively.

From the patients with hand, foot and mouth disease, 31 viruses of Coxsackievirus A6 and 13 viruses of Coxsackievirus A16 were detected.

From the patients with aseptic meningitis, 19 viruses of Coxsackievirus B1 were isolated.

From the adult male with no record of overseas travel, a Hepatitis A virus was detected.

Key words : Influenza AH3, Coxsackievirus A6, Coxsackievirus A16, Coxsackievirus B1

はじめに

2009年5月に国内で初めての患者が発生した新型インフルエンザは、2011年3月31日をもって、感染症法の規定に基づき、「新型インフルエンザ等感染症」でなくなった旨、厚生労働大臣による公表が行われた。2011年4月以降は「インフルエンザ(H1N1)2009」という名称になり、通常の季節性インフルエンザ対策に移行することになった。

当所では、2011年1月～12月にウイルスの検索を目的とした532件の検体を検査し、236件のウイルスを分離、検出した。インフルエンザウイルスが44.1%を占めた。また、手足口病疑い患者からコクサッキーウイルスA6型、コクサッキーウイルスA16型が多く検出された。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2011/2012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

微生物部 ¹⁾ 現 県立宮崎病院 ²⁾ 現 都城食肉衛生検査所 ³⁾ 企画管理課

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）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。

分離されたインフルエンザウイルスの抗原性は国立感染症研究所から配布されたフェレット感染血清A/California/07/2009（A/H1N1pdm09・ワクチン株）、A/Victoria/210/2009（A/H3N2・ワクチン株）、B/Brisbane/60/2008（ビクトリア系統・ワクチン株）、B/Bangladesh/3333/2007（山形系統）を用いたHI試験で調べた。赤血球凝集（HA）価が低くHI試験で抗原性の解析ができないウイルスについては、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11月ver.2）に従ってリアルタイムPCR法で型別を行った。また、分離されなかった検体についてもリアルタイム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、HA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¹⁾と篠原等の報告²⁾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型から4型、ヒトコロナウイルスOC43および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³⁾を参考に、multiplex 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。

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シング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

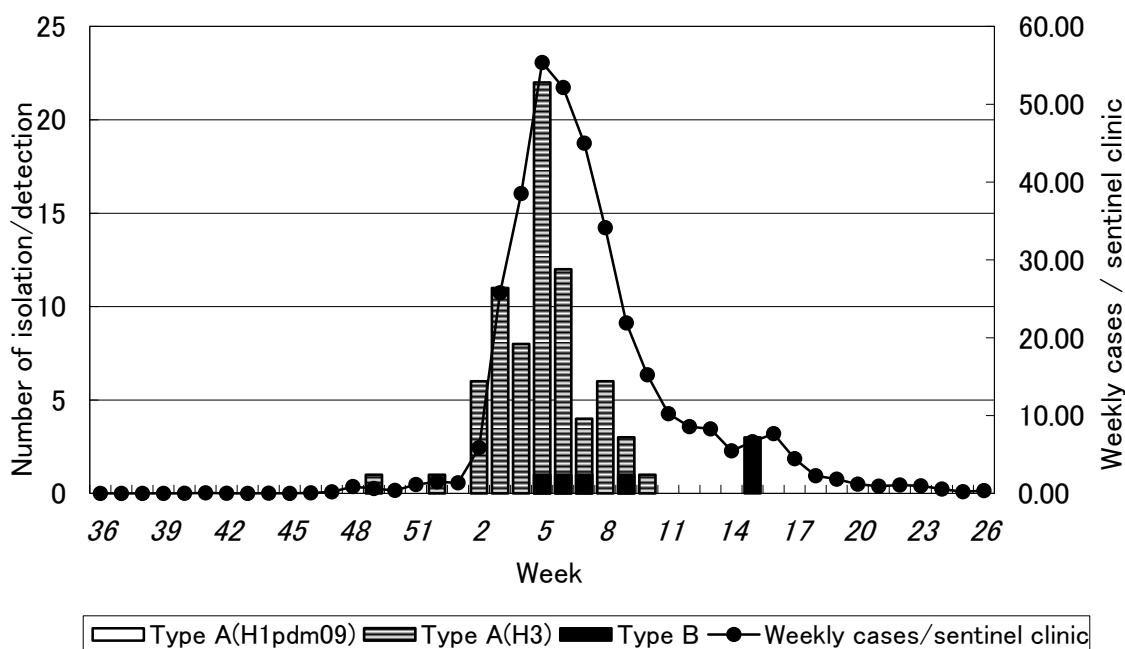
定点あたり患者報告数の推移とウイルス検出状況はFig.1に示すとおりであった。患者報告数は、2012年第2週（1月中旬）から増え始め、第3週に流行発生注意報基準値（10.0）を超え、第5週にピークとなった。その後、第12週（3月下旬）には注意報基準値以下となった。

2012年4月までに分離・検出されたインフルエンザウイルスはAH3亜型が75件、B型が7件の計82件であった。シーズン中にAH1pdm09は検出されなかった。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、AH3亜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。2011/2012シーズン

ン分離株の HA 価を測定した結果, AH3 亜型で 8HA 以上を示したのは 68 株中わずか 4 株であった. HI 試験を実施し抗原解析を行った結果, 2 株の HI 価がワクチン株から 8 倍以上低下していた. B 型の分離株 6 株は 1 株が山形系統,

5 株がビクトリア系統であった. 2011/2012 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 5 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 cases of influenza and isolation/detection of influenza viruses from week 36 of 2011 to week 26 of 2012



2 手足口病の原因ウイルス

手足口病は口腔粘膜やおよび四肢末端の水疱性の発疹を特徴とする発熱性疾患で, 幼児を中心に夏期に流行する. 一般に予後はよいと言われている. 手足口病の主要な原因ウイルスは, エンテロウイルス 71 型 (EV71), コクサッキーウイルス A16 型 (CA16), コクサッキーウイルス A10 型 (CA10) などである.

2011 年は従来の手足口病と臨床像が異なり, 水疱性病変が手掌や足底にはほとんど見られず, 大腿部, 臀部および肛囲に高頻度に見られた. また, 従来の手足口病では見られない口囲にも発疹が見られた. 水疱は扁平で大きく, 膿疱や周囲と融合している例もあった⁵⁾.

2011 年は, 手足口病疑い患者 45 検体からウイルスが分離, 検出され, CA6 が 31 件, CA16 が 13 件, ヒトライノウイルス (hRV) 3 件であ

った. 2 検体については, CA6 と hRV が検出された. CA6 は現在使用している細胞では分離できず, RT-PCR およびシーケンスを行い同定した.

2011 年は全国的に手足口病患者検体から CA6 が相次いで検出された. CA6 は主にヘルパンギーナの原因となることが多く, 手足口病の原因となった例は過去に報告があるものの, 本年のように全国的に大流行を起こしたことはない.

CA6 は, 手足口病以外にヘルパンギーナ, 発疹性疾患からも検出された. また, 約 1 ヶ月の間に続けて 2 回手足口病に罹患する患者が 3 名認められ, 1 回目が CA6, 2 回目は CA16 であった. 同じコクサッキーウイルスでも型が異なれば感染を繰り返すと考えられた.

3 コクサッキーウイルス B1 型

2011 年 4 月～8 月にコクサッキーウイルス B1 型 (CB1) が 12 例 19 株分離された (Table 1). 本県では 1997 年に 8 株, 2009 年に 2 株分離されているだけである. 12 例のうち 7 例 12 株が髄膜炎と診断され, 脳炎 1 例, 熱性けいれん 1 例, 下気道炎 1 例, 発疹性疾患 1 例, その他 1 例であった. 年齢は 0 歳が 6 例で, 残りの 1 例は 4 歳であった. 19 株のうち 3 株は難中和性のため, PCR およびシーケンスを行い同定した.

CB1 は, 全国的にも例年に比べ多く検出されており, 無菌性髄膜炎から検出されたウイルスでは, エコーウイルス 6 型に次いで多く 15.2% を占めた.

4 その他

1) A 型肝炎ウイルス

2011 年 3 月に, 発熱, 黄疸, 全身倦怠感の 60 歳代の男性から A 型肝炎ウイルスが検出された (Table 1). ウイルスの同定は RT-PCR を実施して行った.

海外渡航歴はなく, 生ガキを食べていることから, 生ガキが感染原因と推定された.

2) 麻疹ウイルス

麻疹疑いで 24 症例 65 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

2011 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) 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)
- 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 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)
- 3) S. Bellau-Pujol et al. : Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses, J Virol Methods, 126, 53-63, (2005)
- 4) 安井善宏 藤原範子 小林慎一 山下照夫 平松礼司 皆川洋子 : <速報>今シーズン用同定キットの赤血球凝集抑制活性が低いインフルエンザ AH3 ウイルス分離株—愛知県, 病原微生物検出情報, Vol.33 No.3(No.385), 67-68, (2012)
- 5) 中田恵子 山崎謙治 加瀬哲男 : <速報>コクサッキーウイルス A6 型による手足口病の成人例—大阪府, 病原微生物検出情報, Vol.32 No. 8(No.378), 231, (2011)

Table 1 Monthly changes of detection number of viruses in Miyazaki Prefecture, 2011

Virus	Month												Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Adenovirus 2			1		1								2
Adenovirus 3						1			1				2
Coxsackievirus A2										1			1
Coxsackievirus A4		1											1
Coxsackievirus A6						10	24	2	1	1			38
Coxsackievirus A16		2				1	1	10					14
Coxsackievirus B1				1	3	4	8	3					19
Echovirus 6									1	2		1	4
Echovirus 9										3	3	4	10
Poliovirus 1										1			1
Rhinovirus		1	1	2		5	2					1	12
Herpes simplex virus 1		1	1								2		4
Hepatitis A Virus			1										1
Influenza virus A H1pdm	40	15											55
Influenza virus A H3	18	11	6	2	2							2	41
Influenza virus B	1	2	2	2		1							8
RS virus		1					1						2
Human metapneumovirus			4	1							1		6
Mumps virus				1									1
Rotavirus			1	1									2
Norovirus G2	5	2			1	1			1			1	11
Chikungunya virus					1								1
Total	64	36	17	10	8	23	36	15	4	8	6	9	236

Table 2 Detection number of viruses in Miyazaki Prefecture, 2002–2011

	Year										Total
	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	
Adenovirus 1	4	1	4	2	2		1	2			16
Adenovirus 2	3	3	6	4	1		1	4		2	24
Adenovirus 3	11	2	24	1	2		1		2	2	45
Adenovirus 4	1										1
Adenovirus 5	2			1					1		4
Adenovirus 6			1								1
Adenovirus 11				1							1
Adenovirus NT	1	2									3
Coxsackievirus A 2		2							1	1	4
Coxsackievirus A 4	1	1							1	1	4
Coxsackievirus A 5	1										1
Coxsackievirus A 6	1	2	2			2		1		38	46
Coxsackievirus A 8	1										1
Coxsackievirus A 9	1	38			14			8			61
Coxsackievirus A 10		1									1
Coxsackievirus A 16	6	17	19	2			12		2	14	72
Coxsackievirus A 24v		3									3
Coxsackievirus B 1								2		19	21
Coxsackievirus B 2	4			1	1			7	2		15
Coxsackievirus B 3				9				2			11
Coxsackievirus B 4	2					7					9
Coxsackievirus B 5		4				4	17				25
Echovirus 3				1					7		8
Echovirus 5							19				19
Echovirus 6			4				8			4	16
Echovirus 7								3			3
Echovirus 9		33		3	2			9		10	57
Echovirus 11		1						3			4
Echovirus 13	66										66
Echovirus 16		12	13								25
Echovirus 18				5	46						51
Echovirus 25			8			2			14		24
Echovirus 30		1	2		3	3	3				12
Poliovirus 1	1	1			2			1		1	6
Poliovirus 2	3	2						1			6
Poliovirus 3	1	1				2	2				6
Enterovirus 71		1	3		7	6		1	14		32
Group Enterovirus							1				1
Rhinovirus								2		12	14
Herpes simplex virus 1	11	5	9	3	3	1	3	5	1	4	45
Varicella-zoster virus							3				3
Hepatitis A Virus										1	1
Hepatitis C Virus								6			6
Influenza virus A H1pdm								494	52	55	601
Influenza virus A H1	27			1		23	34	35			120
Influenza virus A H3	59	37	23	18	37	18	9	45	60	41	347
Influenza virus B	12	23	4	18	32	7	1	9	3	8	117
RS virus		2		2							6
Human metapneumovirus										6	6
Measles virus	2	24				8	1				35
Mumps virus	16			3	1				1	1	22
Rotavirus		1		3		1	1			2	8
Norovirus		8	3	15	24	21	5	9	14	11	110
Sapovirus								1			1
Dengue virus 2									2		2
Chikungunya virus										1	1
Orthoreovirus						1					1
Total	237	228	125	93	177	106	122	650	177	236	2151