

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（2012年）

三浦美穂 伊東愛梨 矢野浩司 大浦裕子 境田昌江¹⁾

Infectious Agents (viruses) Surveillance Report in Miyazaki Prefecture, 2012

Miho MIURA, Eri ITO, Koji YANO, Yuko OHURA, Masae SAKAIDA

要旨

2012年に宮崎県内の医療機関より感染症発生動向調査の検体が527件搬入され、223件のウイルスが分離・検出された。2012/2013シーズンに検出されたインフルエンザウイルスは、AH3亜型が42件、B型が3件の計45件であった。また、2008年以来4年ぶりに麻疹ウイルスが検出された。これは、タイに渡航歴のある患者からまず検出され、その後感染が広がっていったもので、最終的には計8例19件の麻疹ウイルスが分離・検出された。

その他には、発疹性疾患等の患者からコクサッキーウイルスA9型が9例23株分離され、このうち1例はノロウイルスとの重複感染であった。

また、呼吸器症状のある患者からヒトライノウイルス(hRV)14件、RSウイルス(RSV)10件、ヒトメタニューモウイルス3件が検出され、このうちhRVとRSVの重複感染が1例みられた。

キーワード： インフルエンザウイルスAH3亜型、麻疹ウイルス、コクサッキーウイルスA9型

はじめに

宮崎県における感染症発生動向調査事業は、1981年7月から開始されており、感染症の発生状況の正確な把握と分析を行い、その結果を県民や医療関係者へ提供・公開している。当所では、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た。

2012年の本県における病原体検出状況について報告する。

材料と方法

2012年1月～12月にウイルスの検索を目的として搬入された527検体を検査材料とした。

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、100y/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0.2μm)を通し、分離材料とした。なお、検体は接種時まで-80℃で保存した。

2 細胞

Caco-2, Vero, HEp-2, RD-18S, 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, 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) 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)、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ウサギ免疫血清 A/California/07/2009 [(H1N1)pdm09・ワクチン株], A/Victoria/361/2011 (H3N2・ワクチン株), B/Wisconsin/01/2010 (山形系統・ワクチン株), B/Brisbane/60/2008 (ビクトリア系統) 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 RT-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。

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 2 版, 平成 20 年 7 月) に従い、N および 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。

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 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⁴⁾を参考に、multiplex 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

搬入された 527 検体について検査した結果、223 件のウイルスが分離・検出された。また、麻疹患者の発生により麻疹の検査依頼が増え、38 名 93 件の検体が搬入された。分離・検出されたウイルスは、インフルエンザウイルス等の呼吸器 RNA ウイルスが多かった。また、コクサッキーウイルス A9 型も多く検出された。

1 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 2012/2013 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は図 1 に示すとおりであった。患者報告数は、2012 年第 50 週 (12 月中旬) から増え始め、2013 年第 3 週 (1 月中旬) 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 14 週 (4 月上旬) には注意報基準値以下となった。

2013 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 42 件、B 型が 3 件の計 45 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 2011/2012 シーズン同様、赤血球凝集 (HA) 活性の低い株が多く⁵⁾、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。今シーズンより、インフルエンザウイルス同定用キットの抗血清が

フェレット感染血清からウサギ免疫血清に変更になった。国立感染症研究所が抗血清を比較するため HI 試験を実施した結果、ウサギ免疫血清はフェレット感染血清に比べて変異株とも反応し、小規模な抗原性の変化を識別するのが困難だと判明した。このため、今シーズンは HI 試験によるワクチン株との抗原性の比較ができなかった。また、B 型の分離株 3 株はビクトリア系統であった。

国立感染症研究所で解析した流行株は、ワクチ

ン株である A/California/07/2009 (H1N1)pdm09, A/Victoria/361/2011 (H3N2), B/Wisconsin/01/2010 (山形系統) に抗原性が類似した株が、それぞれ 95%, 98%, 100% を占め、ワクチン類似株が流行の主流であった。B 型ビクトリア系統については、解析した流行株の 100% が 2011/2012 シーズンに使われたワクチン株 B/Brisbane/60/2008 に抗原性が類似していた⁶⁾。

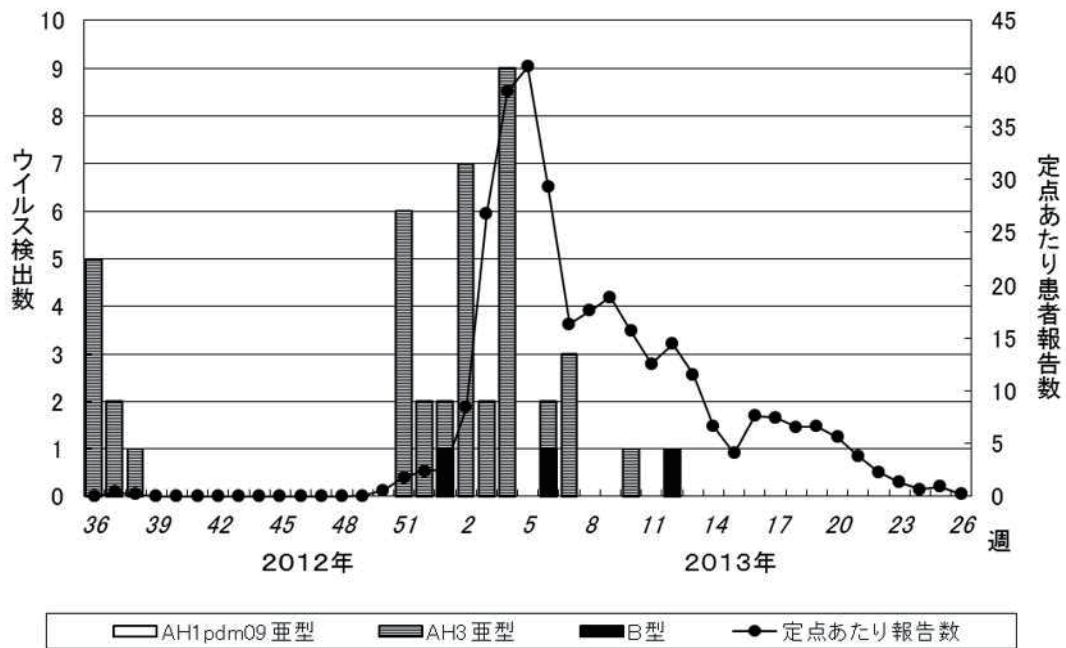


図1 インフルエンザの定点あたり患者報告数とウイルス分離・検出数

2 麻疹ウイルス

2012 年 8 月末にタイに渡航歴のある患者から遺伝子検査により麻疹ウイルスが検出された。宮崎県では 2008 年以来 4 年ぶりの検出であった(表 2)。その後、この患者から家庭、職場、受診した医療機関を介して感染が拡大し、計 8 名の患者が発生した。分離・検出された麻疹ウイルスは 19 件であった。

2012 年は日本を含む WHO 西太平洋地域の麻疹排除目標年であり、同年に新たに排除達成の認定基準として「適切なサーベイランス制度の下、麻疹ウイルス土着株による感染が 3 年間確認されず、また遺伝子型解析によりそのことが示唆され

ること」が提案された。日本では、麻疹排除に向けた積極的な取組により 2009 年から感染者数は急激に減少し、これに伴いウイルスの遺伝子にも変化がみられ、2006～2008 年頃までに主流を占めていた D5 型は 2010 年 5 月を最後に検出されず、海外で流行している遺伝子型のウイルスが検出されている⁷⁾。

今回の事例において、8 名の患者から検出された N 遺伝子の増幅産物についてダイレクトシーケンセスを行い、塩基配列を決定した。得られた塩基配列の一部について系統樹解析を実施した結果、D8 型麻疹ウイルスに分類された。D8 型はタイ、カンボジアなどで検出されており、本県の集

団発生事例はタイより輸入されたウイルスによるものと推定された。

3 コクサッキーウイルス A9 型

2012年3月と6月～9月にコクサッキーウイルス A9 型 (CA9) が 19 例 23 株分離された (表 1)。本県では 2003 年に 38 株, 2006 年に 14 株, 2009 年に 8 株と 3 年おきに分離されている (表 2)。19 例のうち 12 例 13 株は発疹性疾患で, 胃腸炎 1 例はノロウイルスとの重複感染であった。ほかは手足口病 1 例, 不明熱 1 例, その他 4 例であった。年齢は 1 歳が 9 例, 0 歳が 6 例, 5 歳と 7 歳がそれぞれ 2 例ずつであった。コクサッキーウイルス A 型は難中和性のものが多いため, RT-PCR およびシーケンスを行い同定した。

CA9 は, 全国的にも例年に比べ多く検出されており, エンテロウイルスでは CA4 に次いで多く検出された。

また, 手足口病疑い患者からは 2011 年に引き続き, コクサッキーウイルス A6 型が多く検出された。

4 呼吸器 RNA ウイルス

呼吸器 RNA ウイルスは培養が困難なものが多いため, 呼吸器症状のある検体を対象として, 9 種類のウイルスについての multiplex RT-PCR を行った。2012 年は, ほぼ一年を通してヒトライノウイルス (hRV) が検出された (表 1)。検出された 14 例のうち呼吸器症状のあるものは 7 例で, 下気道炎が 6 例, 上気道炎が 1 例であった。上気道炎の 1 例は RS ウイルスとの重複感染であった。また, エンテロウイルスの RT-PCR でも hRV が検出できるため, 発疹性疾患が 2 例, 心筋炎が 1 例あった。

8 月～12 月には RS ウイルス (RSV) が 10 件検出された。年齢は 1 歳が 5 例, 0 歳が 4 例, 3 歳が 1 例と乳幼児が占めた。

ヒトメタニューモウイルスは 3 月～5 月に 3 件検出された。年齢は RSV 同様 2 歳以下の乳幼児であった。

謝辞

2012 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) Oka T, Katayama K, Hansman GS, Kageyama T, Ogawa S, *et al.* : Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction, *Journal of Medical Virology*, 78(10), 1347-1353, (2006)
- 2) 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)
- 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) 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)
- 5) 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 No3(No385), 67-68, (2012)
- 6) 国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター第 1 室・WHO インフルエンザ協力センター ; <速報>国内インフルエンザ流行株の抗原性解析および薬剤耐性株の検出状況 (途中経過), 病原微生物検出情報, Vol.34 No6(No400), 141-142, (2013)
- 7) 国立感染症研究所 : <特集>麻疹 2012 年, 病原微生物検出情報, Vol.34 No2(No396), (2013)

表 1 宮崎県における月別ウイルス検出数 (2012 年)

ウイルス名	月												計	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
Adenovirus 1								1	1					2
Adenovirus 2				1					1	2				4
Adenovirus 5	1						1							2
Adenovirus 6		1												1
Adenovirus 31	1													1
Adenovirus NT	1													1
Coxsackievirus A4				1		1			1					3
Coxsackievirus A5								1						1
Coxsackievirus A6								2	7	2	1			12
Coxsackievirus A9			1			9	10	2	1					23
Coxsackievirus B4								2			1			3
Coxsackievirus B5							3		2					5
Echovirus 6	2													2
Echovirus 9			2											2
Echovirus 18									1		2	3		6
Rhinovirus		2	1	2			1		3	2	1	2		14
Herpes simplex virus 1	1						1							2
Influenza virus A H3	29	42	2				1		8				8	90
Influenza virus B	1	3		3										7
Parainfluenza virus 1			1											1
Parainfluenza virus 2										1				1
RS virus								4	2	2	1	1		10
Human metapneumovirus			1	1	1									3
Human coronavirus		1												1
Measles virus								3	16					19
Mumps virus						1								1
Norovirus G2	1					1					1	1		4
Sapovirus						1							1	2
Total	37	49	8	8	1	13	17	15	43	9	7	16		223

表2 宮崎県におけるウイルス検出数（2003年～2012年）

ウイルス名	年										計
	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	
Adenovirus 1	1	4	2	2		1	2			2	14
Adenovirus 2	3	6	4	1		1	4		2	4	25
Adenovirus 3	2	24	1	2		1		2	2		34
Adenovirus 5			1					1		2	4
Adenovirus 6		1								1	2
Adenovirus 11			1								1
Adenovirus 31										1	1
Adenovirus NT	2									1	3
Coxsackievirus A 2	2							1	1		4
Coxsackievirus A 4	1							1	1	3	6
Coxsackievirus A 5										1	1
Coxsackievirus A 6	2	2			2		1		38	12	57
Coxsackievirus A 9	38			14			8			23	83
Coxsackievirus A 10	1										1
Coxsackievirus A 16	17	19	2			12		2	14		66
Coxsackievirus A 24v	3										3
Coxsackievirus B 1							2		19		21
Coxsackievirus B 2			1	1			7	2			11
Coxsackievirus B 3			9				2				11
Coxsackievirus B 4					7					3	10
Coxsackievirus B 5	4				4	17				5	30
Echovirus 3			1					7			8
Echovirus 5						19					19
Echovirus 6		4				8			4	2	18
Echovirus 7							3				3
Echovirus 9	33		3	2			9		10	2	59
Echovirus 11	1						3				4
Echovirus 16	12	13									25
Echovirus 18			5	46						6	57
Echovirus 25		8			2			14			24
Echovirus 30	1	2		3	3	3					12
Poliovirus 1	1			2			1		1		5
Poliovirus 2	2						1				3
Poliovirus 3	1				2	2					5
Enterovirus 71	1	3		7	6		1	14			32
Group Enterovirus						1					1
Rhinovirus							2		12	14	28
Herpes simplex virus 1	5	9	3	3	1	3	5	1	4	2	36
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			1		23	34	35				93
Influenza virus A H3	37	23	18	37	18	9	45	60	41	90	378
Influenza virus B	23	4	18	32	7	1	9	3	8	7	112
Parainfluenza virus 1										1	1
Parainfluenza virus 2										1	1
RS virus	2		2						2	10	16
Human metapneumovirus									6	3	9
Human coronavirus										1	1
Measles virus	24				8	1				19	52
Mumps virus			3	1				1	1	1	7
Rotavirus	1		3		1	1			2		8
Norovirus	8	3	15	24	21	5	9	14	11	4	114
Sapovirus							1			2	3
Dengue virus 2								2			2
Chikungunya virus									1		1
Orthoreovirus					1						1
計	228	125	93	177	106	122	650	177	236	223	2137