

# 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（2013年）

三浦美穂 伊東愛梨 矢野浩司<sup>1)</sup> 大浦裕子<sup>2)</sup> 境田昌江<sup>3)</sup>

## Infectious Agents (viruses) Surveillance Report in Miyazaki Prefecture, 2013

Miho MIURA, Eri ITO, Kouji YANO, Yuko OURA, Masae SAKAIDA

### 要旨

2013年に県内の医療機関より感染症発生動向調査の検体が429件搬入され、180件のウイルスが分離・検出された。2013/2014シーズンに検出されたインフルエンザウイルスは、AH1pdm09が17件、AH3亜型が33件、B型が26件の計76件であった。

風疹ウイルスが、2001年以来12年ぶりに分離・検出された。風疹は2011年から首都圏を中心に報告数が増加し、2013年は全国へと流行が拡大した。本県では、10名の患者が発生し、26件のウイルスが分離・検出された。

その他のウイルスでは、発疹性疾患等の患者からエコーウイルス18型が28例35件分離・検出された。このうち1例はノロウイルスとの重複感染であった。本県では、2006年以来7年ぶりの流行であった。また、手足口病疑い患者からはコクサッキーウイルスA6型が多く分離・検出され、エンテロウイルス71型が3年ぶりに分離・検出された。

キーワード：インフルエンザウイルス，風疹ウイルス，エコーウイルス18型

### はじめに

本県では1981年7月から感染症発生動向調査事業を開始し、感染症の発生状況の正確な把握と解析を行い、その結果を速やかに県民や医療関係者に提供・公表するなど、感染症の発生及びまん延の防止に努めている。当研究所は、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ており、2013年の病原体検出状況を取りまとめたので報告する。

### 材料と方法

2013年1月～12月にウイルスの検索を目的として搬入された429検体を検査材料とした。

#### 1 分離材料

1) 髄液及び血清は検体をそのままウイルスの分離に用いた。

2) 咽頭ぬぐい液，鼻汁，眼瞼結膜ぬぐい液，水疱液及び気管内吸引液は，細胞培養用維持培地〔1%牛胎児血清加Eagle's MEM（日水製薬）にペニシリン及び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 10分間遠心した上清を分離材料とした。

3) 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。

4) 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0.45 $\mu$ m）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 及び 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 細胞をそれぞれ併用した。

## 3 分離

細胞培養によるウイルス分離は 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 及び RD-A 細胞に検体を 1 穴あたり 30  $\mu$ L ずつ接種して 35°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) が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)、直接蛍光抗体法及び遺伝子検査で行った。

インフルエンザウイルスについては、国立感染症研究所のインフルエンザ診断マニュアル (平成 24 年 3 月) に従ってリアルタイム RT-PCR 法で型別を行った。

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<sup>1)</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、N 及び 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、篠原等の報告<sup>2)</sup>に従い、RT-PCR 法で行った。分離されたエンテロウイルスについては、国立感染症研究所の手足口病病原体検査マニュアルに従って RT-PCR 法を行い同定した。

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 及び 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<sup>3)</sup>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 又は 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 429 検体について検査した結果、180 件のウイルスが分離・検出され、このうちインフルエンザウイルスが最も多く、次いでエコーウイルス 18 型が多かった。また、全国で風疹患者が発生したことにより風疹の検査依頼が増え、49 件の検体が搬入され、26 件のウイルスが分離・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 2013/2014 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を図 1 に示す。患者報告数は、2013 年第 50 週 (12 月中旬) から増え始め、2014 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) には注意報基準値未満となった。

2013 年 9 月から 2014 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 AH1pdm09 が 17 件、AH3 亜型が 33 件、B 型が 26 件の計 76 件であった。B 型は山形系統が 16 件、ビクトリア系統が 10 件であった。

### 2 風疹ウイルス

風疹は、幼児に定期接種が始まった 1995 年度以降、全国流行は認められていなかったが、2011 年から報告数が増加し始めた。2013 年は第 12 週時点で 2012 年の報告数 (2,392 例) を上回った。都道府県別では大都市を含む都府県からの報告が

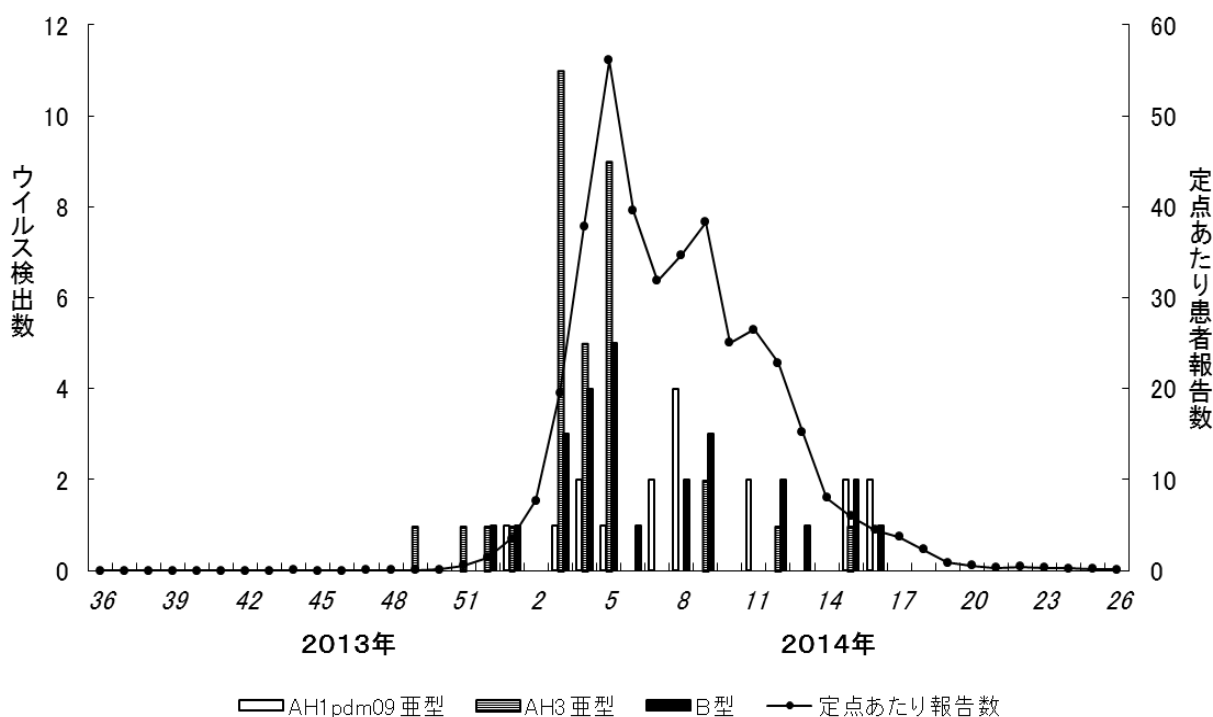


図1 インフルエンザのウイルス分離・検出数と定点あたり患者報告数の推移

多いが、週別にみえていくと、2013年は首都圏から全国へと流行が拡大している<sup>4)</sup>。

本県では2001年以来12年ぶりに風疹ウイルスが検出された(表2)。2013年は、1月と3月～5月にかけて10名の患者が発生し、26件のウイルスが分離・検出された(表1)。患者の年齢は、10歳代1名、20歳代1名、30歳代4名、40歳代4名で、すべて成人であった。男性が多く、男性9名、女性1名であった。

### 3 エコーウイルス18型

2013年1月～7月にエコーウイルス18型が28例35件分離・検出された。本県では2006年に46件分離・検出されており、2012年に6件分離・検出されているが、7年ぶりの流行であった。28例のうち13例14件は発疹性疾患で、脳症1例はノロウイルスとの重複感染であった。ほかは髄膜炎5例、不明熱4例、風疹疑い2例、脳炎1例、上気道炎1例、その他1例であった。年齢は0歳18例、1歳6例、3歳3例、30歳代1例(風疹疑い)であった。

エコーウイルス18型は、全国的にも例年に比べ多く検出されており、エコーウイルスでは6型に次いで多く検出された。また、手足口病疑い患者からはコクサッキーウイルスA6型が多く検出されたが、手足口病の主要な原因ウイルスの1つであるエンテロウイルス71型が3年ぶりに分離・検出された。

### 謝辞

2013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並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) 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) 国立感染症研究所: <特集>風疹・先天性風疹症候群 2013年3月現在, 病原微生物検出情報, Vol.34 No.4(No.398), (2013)

表 1 宮崎県における月別ウイルス検出数 (2013 年)

ウイルス名	月												計	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
Adenovirus 1	3		1											4
Adenovirus 2													1	1
Adenovirus 3						1			1					2
Adenovirus 4		2												2
Adenovirus 11							1							1
Adenovirus 41							1							1
Coxsackievirus A6	1		2			2	7	2	1					15
Coxsackievirus A8								2						2
Coxsackievirus A14								1						1
Coxsackievirus A16									1	1		1		3
Coxsackievirus B2								1	2	1				4
Coxsackievirus B3						1	6							7
Coxsackievirus B5						1								1
Echovirus 18	3	2	1		1	17	11							35
Echovirus 19							4							4
Echovirus 25												1		1
Echovirus 30							3	2	4					9
Enterovirus 71											2	1		3
Rhinovirus			1	1	1				2	2	2	1		10
Herpes simplex virus 1												2		2
Parvovirus	1													1
Influenza virus A H3	20	5	1	1	1		1					3		32
Influenza virus B	1	1	1									1		4
RS virus		1	2											3
Human metapneumovirus							1							1
Rubella virus	6		9	6	5									26
Norovirus G2						1								1
Dengue virus 1								2						2
Dengue virus 3								2						2
Total	35	11	18	8	8	23	36	13	10	3	4	11		180

表2 宮崎県におけるウイルス検出数の推移（2004年～2013年）

	年										計
	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	
Adenovirus 1	4	2	2		1	2			2	4	17
Adenovirus 2	6	4	1		1	4		2	4	1	23
Adenovirus 3	24	1	2		1		2	2		2	34
Adenovirus 4										2	2
Adenovirus 5		1					1		2		4
Adenovirus 6	1								1		2
Adenovirus 11		1								1	2
Adenovirus 31									1		1
Adenovirus 41										1	1
Adenovirus NT									1		1
Coxsackievirus A 2							1	1			2
Coxsackievirus A 4							1	1	3		5
Coxsackievirus A 5									1		1
Coxsackievirus A 6	2			2		1		38	12	15	70
Coxsackievirus A 8										2	2
Coxsackievirus A 9			14			8			23		45
Coxsackievirus A 14										1	1
Coxsackievirus A 16	19	2			12		2	14		3	52
Coxsackievirus B 1						2		19			21
Coxsackievirus B 2		1	1			7	2			4	15
Coxsackievirus B 3		9				2				7	18
Coxsackievirus B 4				7					3		10
Coxsackievirus B 5				4	17				5	1	27
Echovirus 3		1					7				8
Echovirus 5					19						19
Echovirus 6	4				8			4	2		18
Echovirus 7						3					3
Echovirus 9		3	2			9		10	2		26
Echovirus 11						3					3
Echovirus 16	13										13
Echovirus 18		5	46						6	35	92
Echovirus 19										4	4
Echovirus 25	8			2			14			1	25
Echovirus 30	2		3	3	3					9	20
Poliovirus 1			2			1		1			4
Poliovirus 2						1					1
Poliovirus 3				2	2						4
Enterovirus 71	3		7	6		1	14			3	34
Group Enterovirus					1						1
Rhinovirus							2	12	14	10	38
Herpes simplex virus 1	9	3	3	1	3	5	1	4	2	2	33
Varicella-zoster virus					3						3
Hepatitis A Virus								1			1
Hepatitis C Virus						6					6
Parvovirus										1	1
Influenza virus A H1pdm09						494	52	55			601
Influenza virus A H1		1		23	34	35					93
Influenza virus A H3	23	18	37	18	9	45	60	41	90	32	373
Influenza virus B	4	18	32	7	1	9	3	8	7	4	93
Parainfluenza virus 1									1		1
Parainfluenza virus 2									1		1
RS virus		2						2	10	3	17
Human metapneumovirus								6	3	1	10
Human coronavirus									1		1
Measles virus				8	1				19		28
Mumps virus		3	1				1	1	1		7
Rubella virus										26	26
Rotavirus		3		1	1			2			7
Norovirus	3	15	24	21	5	9	14	11	4	1	107
Sapovirus						1			2		3
Dengue virus 1										2	2
Dengue virus 2							2				2
Dengue virus 3										2	2
Chikungunya virus								1			1
Orthoreovirus				1							1
Total	125	93	177	106	122	650	177	236	223	180	2089