

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（2019年）

松浦裕¹⁾ 三浦美穂 西田倫子 三好めぐみ 杉本貴之 馬見塚理奈²⁾

Infectious Agents (viruses) Surveillance Report in Miyazaki Prefecture, 2019

Matsuura Yu, Miura Miho, Nishida Michiko, Miyoshi Megumi,
Sugimoto Takayuki, Mamizuka Rina

要旨

2019年に県内の医療機関より感染症発生動向調査の検体が447件搬入され、205件のウイルスが分離・検出された。2019/2020シーズンに検出されたインフルエンザウイルスは、AH1pdm09が66件、AH3亜型が1件、B型が7件の計74件であった。

2019年は、3月から8月にかけてコクサッキーウイルスA6型が検出され、6月から8月にかけてコクサッキーウイルスB5型が検出された。また、ほぼ1年を通してヒトライノウイルスが検出され、4月から7月にかけてパレコウイルス3型が検出された。

キーワード： インフルエンザウイルス、ヒトライノウイルス、パレコウイルス3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、2019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

2019年1月～12月にウイルスの検索を目的として搬入された447検体を検査材料とした。

1 分離材料

- 1) 髄液、血しょう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 γ /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 μ 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 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) 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 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、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) に従いリアルタイム RT-PCR 法で型別を行った。

ノロウイルスについては、ノロウイルス病原体検出マニュアル (第 1 版, 令和元年 6 月) に従いリアルタイム 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 3.4 版, 平成 29 年 4 月) に従い、N 遺伝子をターゲットとしたリアルタイム RT-PCR 法で行った。

エンテロウイルスの遺伝子検査は、篠原らの報告²⁾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 法を行った。

パレコウイルスについては、吉富らの報告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 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⁴⁾を参考に、multiplex RT-PCR 法で行った。

ヘルペスウイルスについては、VanDevanter らの方法⁵⁾を参考に、nested 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 447 検体について検査した結果、205 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、次いでコクサッキーウイルス A6 型、ヒトライノウイルス及びコクサッキーウイルス B5 型が多かった (表 1)。

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 2019/2020 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、2019 年第 47 週 (11 月下旬) から増え始め、2019 年第 50 週 (12 月中旬) に流行発生注意報基準値 (10.0) を超え、2020 年第 4 週 (1 月下旬) にピークとなった。その後、第 7 週 (2 月中旬) には注意報基準値未満となった。

2019 年 9 月から 2020 年 5 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 66 件、AH3 亜型が 1 件、B 型が 7 件の計 74 件であった。B 型はすべてビクトリア系統であった。

2 コクサッキーウイルス A6 型

3 月から 8 月にかけてコクサッキーウイルス A6 型が 20 例分離・検出された。20 例のうち手足口病・発疹性疾患の患者から 8 例ずつ検出された。残りの 4 例は脳症 2 例、ヘルパンギーナ 1 例、下気道炎 1 例であった。また、1 例はライノウイルスとの重複感染であった。

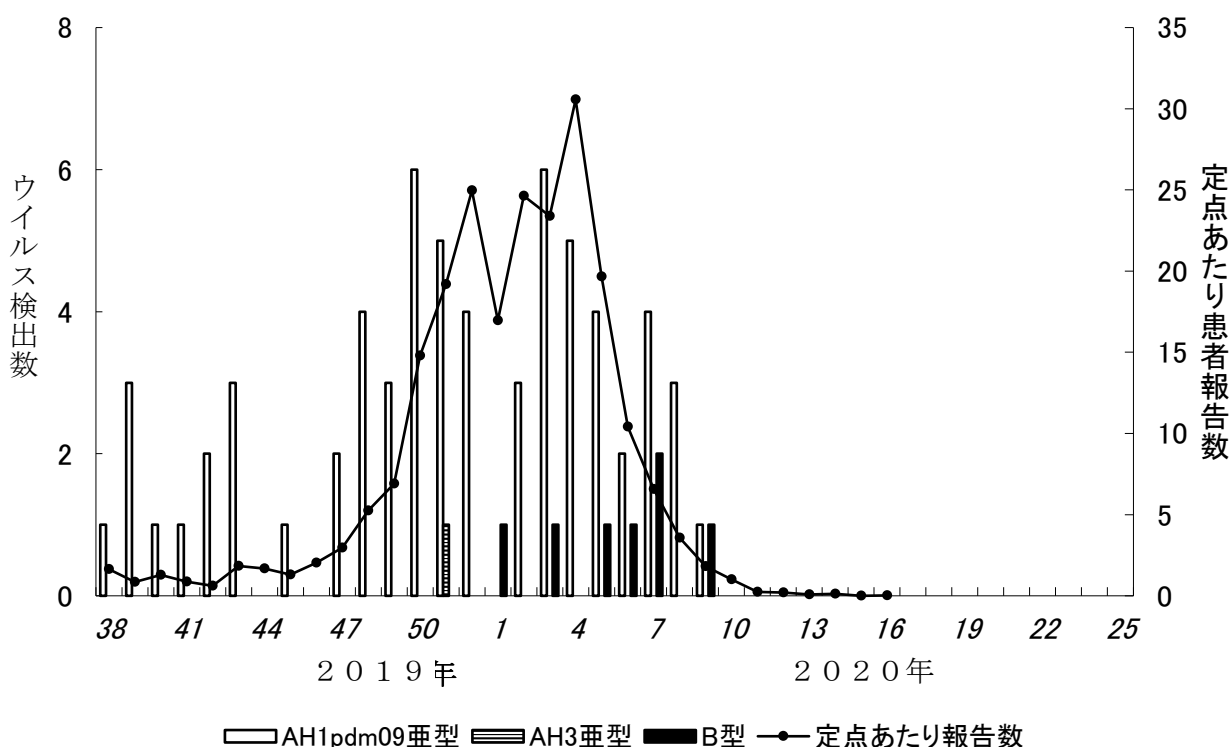


図1 インフルエンザのウイルス分離・検出数と定点あたり患者報告数の推移

3 ヒトライノウイルス

ほぼ1年を通してヒトライノウイルスが検出された。検出された13例のうち10例に上下気道炎の呼吸器症状があった。残りの3例は流行性筋痛症疑い1例、不明の発疹症1例、急性循環不全1例であった。年齢は、0歳が8例と最も多く1歳が1例、4歳1例、10歳代が3例であった。

4 コクサッキーウイルス B5

6月から8月にかけてコクサッキーウイルス B5 が検出された。検出された12例のうち11例が無菌性髄膜炎、残りの1例がけいれん重積を伴う脳炎であった。年齢は、0歳が11例と最も多く1歳が1例であった。

謝辞

2019年の感染症発生病動向調査事業において検査材料を提供してくださった、感染症発生病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) 吉富秀亮, 石橋哲也, 世良暢之: 福岡県におけるヒトパレコウイルス検出状況, *福岡県保健環境研究所年報第 39 号*, 99-100, (2012)
- 4) S. Bellau-Pujol *et al.* : Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses, *Journal of Virological Methods*, 126, 53-63, (2005)
- 5) VanDevanter *et al.* : Detection and Analysis of

表 1 宮崎県における月別ウイルス検出数 (2019 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
Adenovirus 3		1							1				2
Adenovirus 6												1	1
Adenovirus NT			1	2									3
Coxsackievirus A4				1			1						2
Coxsackievirus A5											1		1
Coxsackievirus A6			1	3	11	3	1	1					20
Coxsackievirus A10							1				2		3
Coxsackievirus B3										1			1
Coxsackievirus B4			1						3				4
Coxsackievirus B5						3	3	6					12
Echovirus 30											2	1	3
Parechovirus 3				1	5	4	1						11
Parechovirus NT					3								3
Rhinovirus	1	1		1	2		2			1	5		13
Herpes simplex virus 1					1							1	2
Cytomegalovirus			1										1
Human herpes virus 6		2				1		2			1	2	8
Influenza virus A H1pdm09	7	4	5					1	6	7	7	18	55
Influenza virus A H3	9	7	8	5	1							1	31
Influenza virus B				1	1								2
Parainfluenza virus 1			3								1		4
Parainfluenza virus 3		1				3							4
RS virus			1	1									2
Human metapneumovirus			1					1					2
Measles virus				2									2
Rubella virus						2							2
Norovirus							1						1
Dengue virus 1							1						1
Dengue virus 3								1					1
Dengue virus NT							1	1					2
Chikungunya virus		2											2
Total	17	18	22	18	24	17	13	13	11	9	19	24	205

表2 宮崎県におけるウイルス検出数の推移（2010年～2019年）

	年										計
	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	
Adenovirus 1			2	4	1	1		5	2	2	17
Adenovirus 2		2	4	1	4	2	1	4	2	2	22
Adenovirus 3	2	2		2		2	1	1		2	12
Adenovirus 4				2							2
Adenovirus 5	1		2				1	2			6
Adenovirus 6			1		1			1		1	4
Adenovirus 11				1							1
Adenovirus 31			1				1				2
Adenovirus 35									1		1
Adenovirus 41				1							1
Adenovirus 54						2					2
Adenovirus NT			1				1			3	5
Coxsackievirus A 2	1	1				1		3			6
Coxsackievirus A 4	1	1	3		11				1	2	19
Coxsackievirus A 5			1				1			1	3
Coxsackievirus A 6		38	12	15		31	5	36	5	20	162
Coxsackievirus A 8				2							2
Coxsackievirus A 9			23			25			2		50
Coxsackievirus A 10					2	5		9		3	19
Coxsackievirus A 14				1	1						2
Coxsackievirus A 16	2	14		3	2	5	22		2		50
Coxsackievirus B 1		19						5			24
Coxsackievirus B 2	2			4				1			7
Coxsackievirus B 3				7	3				4	1	15
Coxsackievirus B 4			3			7				4	14
Coxsackievirus B 5			5	1	8		13			12	39
Echovirus 3	7					16					23
Echovirus 5								2			2
Echovirus 6		4	2				5	1			12
Echovirus 7								1			1
Echovirus 9		10	2				6	2	5		25
Echovirus 11					1				4		5
Echovirus 14					2						2
Echovirus 16						8	7				15
Echovirus 18			6	35		3	29	4	13		90
Echovirus 19				4							4
Echovirus 25	14			1	1	2	9	2			29
Echovirus 30				9						3	12
Parechovirus 1					7	3	4	2	1		17
Parechovirus 3					5		29	2	3	11	50
Parechovirus 6								1			1
Parechovirus NT										3	3
Poliovirus 1		1									1
Enterovirus D68						7			2		9
Enterovirus 71	14			3	15			3	12		47
Rhinovirus		12	14	10	32	32	29	35	13	13	190
Herpes simplex virus 1	1	4	2	2	4	5	2	9	6	2	37
Herpes simplex virus 2								1			1
Varicella-zoster virus						3	3	2			8
Cytomegalovirus						4	3	1	1	1	10
Epstein-Barr virus									1		1
Human herpes virus 6						13	8	9	12	8	50
Human herpes virus 7						1	1	3	1		6
Hepatitis A Virus		1			13			1	19		34
Parvovirus B19				1		1	7		6		15
Influenza virus A H1 pdm09	52	55			20	1	26	36	18	55	263
Influenza virus A H3	60	41	90	32	47	25	17	84	32	31	459
Influenza virus B	3	8	7	4	27	1	20	50	42	2	164
Parainfluenza virus 1			1		1	1	9	4		4	20
Parainfluenza virus 2			1								1
Parainfluenza virus 3					5	3	13	7	4	4	36
Parainfluenza virus 4								1			1
RS virus		2	10	3	21	30	18	6	6	2	98
Human metapneumovirus		6	3	1	3	29	4	8	2	2	58
Human coronavirus			1			2		2	4		9
Measles virus			19		10			5		2	36
Mumps virus	1	1	1				4	2			9
Rubella virus				26					6	2	34
Rotavirus		2						2			4
Norovirus	14	11	4	1	1	5	6	4		1	47
Sapovirus			2		1						3
Dengue virus 1				2		2				1	5
Dengue virus 2	2										2
Dengue virus 3				2			2			1	5
Dengue virus NT										2	2
Chikungunya virus		1					1				4
Total	650	177	236	223	180	249	278	308	232	205	2738