

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 (2021 年)

宮原加奈 水流奈己 成田翼 三好めぐみ¹⁾ 三浦美穂 杉本貴之²⁾ 古澤優³⁾

Infectious Agents (viruses) Surveillance Report in Miyazaki Prefecture, 2021

Miyahara Kana, Tsuru Nami, Narita Tsubasa, Miyoshi Megumi,
Miura Miho, Sugimoto Takayuki, Furusawa Yu

要旨

2021 年に県内の医療機関等より感染症発生動向調査の検体が 22,090 件搬入され、1,773 件のウイルスが分離・検出された。2021/2022 シーズンにインフルエンザウイルスは検出されなかった。

キーワード：新型コロナウイルス、エコーウイルス 6 型、コクサッキーウイルス A6 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、2021 年の病原体検出状況を取りまとめたので報告する。

ただし、2021 年は 2020 年同様、新型コロナウイルス感染症の感染拡大により、新型コロナウイルス感染症疑い以外の検体の受け入れを縮小せざるを得ない状況であった。

材料と方法

2021 年 1 月～12 月にウイルスの検索を目的として搬入された 22,090 検体を検査材料とした。そのうち、新型コロナウイルス感染症疑いの検体が 22,023 件、その他が 67 件だった。

1 分離材料

1) 髄液、血漿及び血清検体は、そのまま分離材料とした。

2) 咽頭ぬぐい液、鼻咽頭ぬぐい液、鼻汁、気管内吸引液、喀痰及び唾液は、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分離材料とした。

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。

5) 唾液 (サリベット: ザルスタット) は、1,000g 2 分間遠心した上清を分離材料とした。

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 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。ウイルス分離出来なかった検体は、検査材料より遺伝子検査を行った。

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 又は MEGA を利用して系統樹解析を実施した。

新型コロナウイルスは、国立感染症研究所「感染研・地衛研専用」SARS-CoV-2 遺伝子検出・ウイルス分離マニュアル Ver.1.1 (令和 3 年 2 月 8 日版) に従い、リアルタイム one-step RT-PCR 法で SARS-CoV-2 遺伝子検出を行った。

なお、2 月より新型コロナウイルスの変異株であるアルファ株、6 月よりデルタ株の検出を実施した。アルファ株は、国立感染症研究所のリアルタイム one-step RT-PCR 法による SARS-CoV-2 Spike N501Y 変異の検出 (暫定版 v2.1.1) マニュアル、デルタ株は国立感染症研究所のリアルタイム one-step RT-PCR 法による SARS-CoV-2 Spike L452R 変異の検出 (暫定版 v2.1) マニュアルに従い実施した。また、国立感染症研究所で実施していた新型コロナウイルスのゲノム解析を、当所でも 6 月より開始した。解析方法は、国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター作成の新型コロナウイルスゲノム解読プロトコル (Qiagen 社 QiaSEQ FX 編 version 1.4(2021/12/03、NEB 社 ARTIC SARS-CoV-2 Companion Kit(ONT) 編 version 1.5(2021/12/03)で実施した。

結果および考察

搬入された 22,090 検体について検査した結果、1,291 件のウイルスが分離・検出された (表 1)。

このうち、新型コロナウイルスが 1,260 件と最も多く、次いでエコーウイルス 6 型、コクサッキーウイルス A6 型が多かった。

1 新型コロナウイルス

11 月を除く全ての月から 1,260 件のウイルスが

検出された。1 月は 2020 年 12 月末からの感染拡大が 1 月末まで続き検出数が多かった。また、4 月から 5 月は新型コロナウイルスの変異株であるアルファ株の流行、8 月から 9 月にはデルタ株の流行により検出数が多かった。アルファ株やデルタ株は、ともにウイルス結合に関与する遺伝子領域であるスパイク蛋白部分の変異であり、従来の新型コロナウイルスと比較してウイルスが結合しやすく、感染拡大に多大な影響を与えた。新型コロナウイルス変異株検査件数を表 2、ゲノム解析件数を表 3 に示す。

2 エコーウイルス 6 型

4 月から 9 月にかけてエコーウイルス 6 型が 9 例 17 件分離・検出された。9 例のうち髄膜炎の患者が 8 例と多く、残りの 1 例は下気道炎であった。年齢は、0 歳が 5 例と最も多く 1 歳が 1 例、4~6 歳が 3 例であった。

3 コクサッキーウイルス A6 型

8 月から 10 月にかけてコクサッキーウイルス A6 型が 5 例検出された。検出された 5 例全て手足口病の患者であった。

4 インフルエンザウイルス

2021/2022 シーズン (2021 年 9 月から 2022 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なかった。

謝辞

2021 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。また、新型コロナウイルス感染症の流行による事業制限へもご理解と協力をいただき感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Oka T, Katayama K, Hansman GS, et al. Detection of Human Sapovirus by Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction . Journal of Medical Virology 2006;78:1347-1353.
- 2) 篠原美千代, 内田和江, 島田慎一, 他. 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 1999;73:749-757.
- 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 2012;39:99-100.
- 4) Bellau-Pujol S, Vabret A, Legrand L, et al. Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses . Journal of Virological Methods 2005;126:53-63.
- 5) VanDevanter D.R, Warrenner P, Bennett L, et al. Detection and Analysis of Diverse Herpesviral Species by Consensus Primer PCR . Journal of Clinical Microbiology 1996;34:1666-1671.

表 1 宮崎県における月別ウイルス検出数 (2021 年)

ウイルス名	月												計
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Adenovirus 1											1		1
Adenovirus 2					1								1
Coxsackievirus A6								1	1	3			5
Echovirus 6				2		1	8	3	3				17
Rhinovirus					1			1					2
Herpes simplex virus 1						1							1
Human herpes virus 6				1									1
Parainfluenza virus 3							1						1
RS virus			1										1
Mumps virus				1									1
SARS-CoV-2	293	62	11	147	158	19	37	380	141	10	0	2	1,260
Total	293	62	12	151	160	21	46	385	145	13	1	2	1,291

表 2 宮崎県における新型コロナウイルス月別変異株検出件数 (2021 年)

	月												計
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
アルファ株検出件数	-	0	0	113	337	40	0	0	0	0	0	0	490
デルタ株検出件数	-	-	-	-	-	5	14	269	0	0	0	2	290

表 3 宮崎県における新型コロナウイルス月別ゲノム解析件数 (2021 年)

系統名	月												計
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
B. 1. 1. 284	1												1
B. 1. 1. 214	88	17	1	16									122
R. 1	1		5	5	3								14
B. 1. 1. 7 (アルファ)				73	103	12	16	5					209
Q. 1 (アルファ)							2						2
AY. 24 (デルタ)						2	2						4
AY. 29 (デルタ)						1	21	114	67	1			204
AY. 4 (デルタ)								2					2
AY. 103 (デルタ)												2	2
Total	90	17	6	94	106	15	41	121	67	1	0	2	560

表 4 宮崎県におけるウイルス検出数の推移 (2012 年～2021 年)

ウイルス名	年										計
	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	
Adenovirus 1	2	4	1	1		5	2	2		1	18
Adenovirus 2	4	1	4	2	1	4	2	2		1	21
Adenovirus 3		2		2	1	1		2	2		10
Adenovirus 4		2									2
Adenovirus 5	2				1	2					5
Adenovirus 6	1		1			1		1		5	9
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 A2				1		3					4
Coxsackievirus A4	3		11				1	2	1		18
Coxsackievirus A5	1				1						3
Coxsackievirus A6	12	15		31	5	36	5	20			124
Coxsackievirus A8		2									2
Coxsackievirus A9	23			25			2				50
Coxsackievirus A10			2	5		9		3			19
Coxsackievirus A14		1	1								2
Coxsackievirus A16		3	2	5	22		2				34
Coxsackievirus B1						5					5
Coxsackievirus B2		4				1					5
Coxsackievirus B3		7	3				4	1			15
Coxsackievirus B4	3			7				4			14
Coxsackievirus B5	5	1	8		13			12			39
Echovirus 3				16							16
Echovirus 5						2					2
Echovirus 6	2				5	1				17	25
Echovirus 7						1					1
Echovirus 9	2				6	2	5		5		20
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		1	1	2	9	2					15
Echovirus 30		9						3	2		14
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											0
Enterovirus D68				7			2				9
Enterovirus 71		3	15			3	12				33
Rhinovirus	14	10	32	32	29	35	13	13	3	2	183
Herpes simplex virus 1	2	2	4	5	2	9	6	2	1	1	34
Herpes simplex virus 2						1					1
Varicella-zoster virus				3	3	2					8
Cytomegalovirus				4	3	1	1	1	1		11
Epstein-Barr virus							1				1
Human herpes virus 6				13	8	9	12	8	10	1	61
Human herpes virus 7				1	1	3	1		2		8
Hepatitis A virus			13			1	19		6		39
Parvovirus B19		1		1	7		6				15
Influenza virus A H1pdm09			20	1	26	36	18	55	32		188
Influenza virus A H3	90	32	47	25	17	84	32	31			358
Influenza virus B	7	4	27	1	20	50	42	2	7		160
Parainfluenza virus 1	1		1	1	9	4		4	1		21
Parainfluenza virus 2	1										1
Parainfluenza virus 3			5	3	13	7	4	4		1	37
Parainfluenza virus 4						1					1
RS virus	10	3	21	30	18	6	6	2	1	1	98
Human metapneumovirus	3	1	3	29	4	8	2	2	1		53
Human coronavirus	1			2		2	4				9
Measles virus	19		10			5		2			36
Mumps virus	1				4	2				1	8
Rubella virus		26					6	2			34
Rotavirus						2					2
Norovirus	4	1	1	5	6	4		1	1		23
Sapovirus	2		1								3
Dengue virus 1		2		2				1			5
Dengue virus 2											0
Dengue virus 3		2			2			1			5
Dengue virus NT								2			2
Chikungunya virus					1			2			3
SARS-CoV-2									362	1,260	1,622
Total	223	180	249	278	308	359	232	205	438	1,291	3,763