

## 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 (2023 年)

宮原加奈<sup>1)</sup> 新田真依子 水流奈己 成田翼 三浦美穂<sup>2)</sup> 吉野修司<sup>2)</sup> 古澤優<sup>1)</sup>

### Infectious Agents (viruses) Surveillance Report in Miyazaki Prefecture, 2023

Miyahara Kana, Narita Tsubasa, Tsuru Nami, Shinden Maiko,  
Miura Miho, Yoshino Shuji, Furusawa Yu

#### 要旨

2023 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 215 件搬入され、141 件のウイルスが分離・検出された。新型コロナウイルスのゲノム解析の検体が 2,530 件搬入され、1,510 件が系統分類された。インフルエンザウイルスは、年間を通して分離・検出された。

キーワード：新型コロナウイルス，インフルエンザウイルス

#### 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、2023 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

2023 年 1 月から 12 月にウイルスの検索を目的として搬入された 215 検体、新型コロナウイルスのゲノム解析を目的として搬入された 2,530 検体を検査材料とした。

##### 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  $\gamma$ /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、必要に応じてフィルター (ポアサイズ 0.45  $\mu$ 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 分間遠心したものを分離材料とした。

なお、検体は接種時まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

##### 2 細胞

Caco-2, Vero, HEP-2, RD-18S 及び RD-A 細胞の 5 種類を常時用い、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、パレコウイルスが疑われる場合には LLC-MK2 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 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、遺伝子検査、中和試験及び直接蛍光抗体法で行った。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 (第 4 版, 平成 30 年 12 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<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 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。

検査材料からのエンテロウイルスの遺伝子検査は、篠原らの報告<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<sup>3)</sup>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<sup>4)</sup>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<sup>5)</sup>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、NCBI の BLAST を用いて相同性検索を行い、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、国立感染症研究所の新型コロナウイルス検出・分離マニュアル (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。ゲノム解析は、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(2022/01/27、NEB 社 ARTIC SARS-CoV-2 Companion Kit(ONT) 編 version 1.6(2022/01/27)で実施した。

## 結果および考察

搬入された 215 検体について検査した結果、141 件のウイルスが分離・検出された (表 1)。

このうち、インフルエンザウイルスが 102 件と最も多く、次いでライノウイルスが多かった。なお、インフルエンザウイルスは年間を通して検出された。

### 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 2023/2024 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、前シーズンから引き続き減少せず定点あたり患者報告数が 1 を下回らないまま、第 38 週 (9 月中旬) に流行発生注意報基準値 (10.0) を超えた。その後、第 50 週 (12 月中旬) と第 5 週 (1 月下旬) に 2 峰生のピークとなった。第 13 週 (3 月下旬) には注意報基準値未満となった。

2023 年 7 月から 2024 年 6 月までに分離・検出されたインフルエンザウイルスは AH3 が 36 件、AH1pdm が 25 件、B 型が 20 件の計 81 件であった。B 型はすべてビクトリア系統であった。

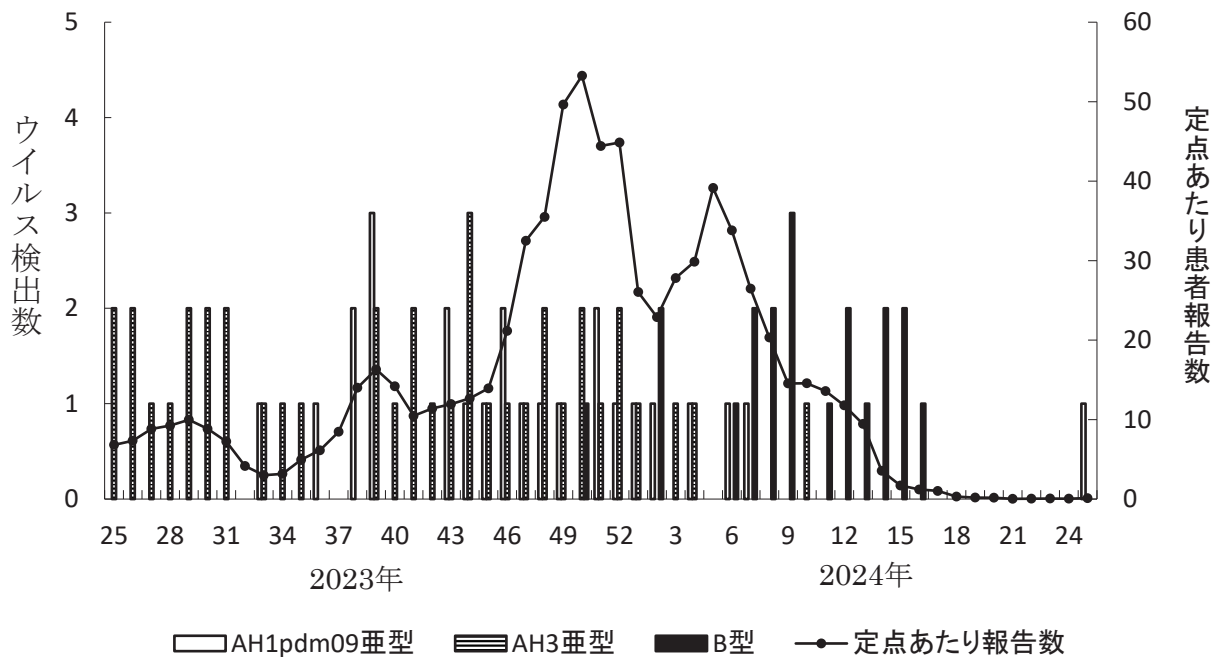


図1 インフルエンザのウイルス分離・検出数と定点あたり患者報告数の推移

## 2 ヒトライノウイルス

4月から5月にかけて6例、9月に1例、11月に1例検出された。検出された8例のうち、6例に上下気道炎の呼吸器症状があった。残りの2例は、髄膜炎1例、発疹性疾患1例であった。また、1例はヒトヘルペス6型との重複感染であった。

## 3 コクサッキーウイルス

3月から9月にかけてコクサッキーウイルスが7例分離・検出された。B5型が3例6件、A6型が2例、A9型が2例、A10型が1例であった。

B5型は全て髄膜炎で、年齢が0歳であった。A6型は、全て発疹性疾患で0歳1例、6歳1例であった。A9型は、発疹性疾患が1例でサイトメガロウイルスとの重複感染であった。残りの1例は不明熱が1例で、全て0歳であった。A10型は発疹性疾患で1歳であった。

## 4 新型コロナウイルス (全ゲノム解析)

1月から3月までは、オミクロン株のBA.2.75系統、BA.5.2系統及びBA.5.3系統が多く検出された。4月以降はオミクロン株のBJ.1(BA.2.10.1系統)とBM.1.1.1(BA.2.75.3系統)の組換え株であるXBB系統が主流となり感染が拡大した。(表2)

## 謝辞

2023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.

et al. Detection and Analysis of Diverse Herpesviral Species by Consensus Primer PCR . Journal of Clinical Microbiology 1996;34:1666-1671.

5) VanDevanter D.R, Warren P, Bennett L,

表 1 宮崎県における月別ウイルス検出数 (2023 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 3											1		1
Coxsackievirus A6									2				2
Coxsackievirus A9			1			1							2
Coxsackievirus A10					1								1
Coxsackievirus B5						1		3	2				6
Echovirus 3							2		1				3
Rhinovirus				4	2				1		1		8
Cytomegalovirus						1							1
Human herpes virus 6			1	1					1				3
Influenza virus A H1pdm09								1	6	3	5	4	19
Influenza virus A H3	7	8	10	4	12	8	7	4	2	7	5	6	80
Influenza virus B		2										1	3
Parainfluenza virus 3			1		1								2
Parainfluenza virus 4						1							1
RS virus					1	1							2
Human metapneumovirus								1					1
SARS-CoV-2						1	3	1					5
Total	7	10	13	9	17	14	12	11	15	10	12	11	141

表 2 宮崎県における新型コロナウイルス系統別ゲノム解析数 (2023 年)

系統名	月												計
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
BA.2													
BA.2.3													
BA.2.3.20系統					2		1						3
BA.2.75系統(BN系統を除く)				4	2	3		3	4	6	7	11	42
BN系統				14	18	8	7	6	2	2	4	1	62
BA.2.86													
BA.2.86.1												7	7
BA.5													0
BA.5.1系統				4	7								11
BA.5.2系統(BF.5.2.1、BF系統を除く)				27	15	9	2				3		56
BA.5.2.1				15	12	3							30
BF系統				72	72	81	19	12	2	2	1		261
BA.5.3				40	26	27	4	11	0	1	4		113
BA.5.11					1	2							3
XBB.1						2	3	1					6
XBB.1.5系統						8	14	12	40	15	15	27	149
XBB.1.9系統 (EG.5.1系統を除く)						4	36	53	51	42	32	23	250
EG.5.1系統								1	3	15	46	70	160
XBB.1.11								2		6			8
XBB.1.16系統								24	42	62	40	27	202
XBB.1.17									1				1
XBB.1.18								1				1	2
XBB.1.19													1
XBB.1.22系統										12	2	6	31
XBB.1.41系統											7	12	23
XBB.1.42												3	3
XBB.2						1							1
XBB.2.3系統								10	19	17	17	13	77
XBF						1	1		1				3
XBC系統												1	1
XBL系統								1		1		1	3
XBW									1				1
Total	176	154	148	89	137	178	171	179	199	46	16	17	1510

表 3 宮崎県におけるウイルス検出数の推移 (2014 年～2023 年)

ウイルス名	年										計
	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	
Adenovirus 1	1	1		5	2	2		1	1	1	14
Adenovirus 2	4	2	1	4	2	2		1			16
Adenovirus 3		2	1	1		2	2			1	9
Adenovirus 5			1	2							3
Adenovirus 6	1			1		1		5			8
Adenovirus 31			1								1
Adenovirus 35					1						1
Adenovirus 54		2									2
Adenovirus NT			1			3					4
Coxsackievirus A2		1		3							4
Coxsackievirus A4	11				1	2	1				15
Coxsackievirus A5			1			1					2
Coxsackievirus A6		31	5	36	5	20			2	2	101
Coxsackievirus A9		25			2					2	29
Coxsackievirus A10	2	5		9		3				1	20
Coxsackievirus A14	1										1
Coxsackievirus A16	2	5	22		2						31
Coxsackievirus B1				5							5
Coxsackievirus B2				1							1
Coxsackievirus B3	3				4	1					8
Coxsackievirus B4		7				4					11
Coxsackievirus B5	8		13			12				6	39
Echovirus 3		16								3	19
Echovirus 5				2							2
Echovirus 6			5	1				17			23
Echovirus 7				1							1
Echovirus 9			6	2	5		5				18
Echovirus 11	1				4						5
Echovirus 14	2										2
Echovirus 16		8	7								15
Echovirus 18		3	29	4	13						49
Echovirus 25	1	2	9	2							14
Echovirus 30						3	2				5
Parechovirus 1	7	3	4	2	1				1		18
Parechovirus 3	5		29	2	3	11			10		60
Parechovirus 6				1							1
Parechovirus NT						3					3
Enterovirus D68		7			2						9
Enterovirus 71	15			3	12						30
Rhinovirus	32	32	29	35	13	13	3	2	5	8	172
Herpes simplex virus 1	4	5	2	9	6	2	1	1			30
Herpes simplex virus 2				1							1
Varicella-zoster virus		3	3	2							8
Cytomegalovirus		4	3	1	1	1	1		2	1	14
Epstein-Barr virus					1						1
Human herpes virus 6		13	8	9	12	8	10	1	5	3	69
Human herpes virus 7		1	1	3	1		2		1		9
Hepatitis A virus	13			1	19		6				39
Parvovirus B19		1	7		6						14
Influenza virus A H1pdm09	20	1	26	36	18	55	32			19	207
Influenza virus A H3	47	25	17	84	32	31			2	80	318
Influenza virus B	27	1	20	50	42	2	7			3	152
Parainfluenza virus 1	1	1	9	4		4	1				20
Parainfluenza virus 3	5	3	13	7	4	4		1		2	39
Parainfluenza virus 4				1						1	2
RS virus	21	30	18	6	6	2	1	1	1	2	88
Human metapneumovirus	3	29	4	8	2	2	1			1	50
Human coronavirus		2		2	4						8
Measles virus	10			5		2					17
Mumps virus			4	2				1			7
Rubella virus					6	2					8
Rotavirus				2							2
Norovirus	1	5	6	4		1	1				18
Sapovirus	1										1
Dengue virus 1		2				1					3
Dengue virus 3			2			1					3
Dengue virus NT						2					2
Chikungunya virus			1			2					3
SARS-CoV-2							362	1,260	3,836	5	5,463
Total	249	278	308	359	232	205	438	1,291	3,866	141	7,367