

感染症サーベイランスにおけるウイルス分離 (2010 年度)

山口 顕徳、平野 学、吉川 亮、吾郷 昌信

Virus Isolation on Surveillance of Infectious Diseases in the year 2010

Akinori YAMAGUCHI, Manabu HIRANO, Akira YOSHIKAWA and Masanobu AGOH

Key word: Surveillance, CODEHOP VP 1 RT-snPCR, Enterovirus 71, Hand Foot and Mouth Disease (HFMD)

キーワード: サーベイランス、エンテロウイルス網羅的 PCR、エンテロウイルス 71、手足口病

はじめに

感染症サーベイランス(発生动向調査)は、平成 11 年 4 月 1 日施行された「感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律」、いわゆる「感染症法」に基づき、県内の患者発生状況、病原体の検索等感染症に関する情報を IT の活用により早期かつ的確に把握し、その情報を速やかに地域に還元(情報提供・公開)することにより、医療機関における適切な初期診断を推進することを旨とする。さらに、予防接種、集団生活の管理、衛生教育など、適切な予防措置を講じ、多様な感染症の発生およびまん延の未然防止、有効かつ的確な感染症対策の確立に役立てることを目的としている。¹⁾²⁾

当センターにおいても、「長崎県感染症発生动向調査実施要綱」等に基づき、県下の医療機関からウイルス性の感染症が疑われた患者の検体が適宜採取、搬入されている。

そこで、今年度搬入された検体について、ウイルス分離およびウイルス遺伝子の検索等を試みたので、その概要について報告する。

調査方法

1. 検査材料

政令市(長崎市、佐世保市)および県立保健所管轄の 10 地域において、長崎県感染症発生动向調査事業に基づいて指定された基幹定点医療機関および病原体定点医療機関または協力医療機関等から採取された検体(咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液、糞便、髄液、血清および吐物等)について、指定医療機関の最寄りの管轄保健所を通じて搬入された検体を検査材料とした。

検査のために搬入された検査材料の内訳は、患者 256 名より採取された咽頭ぬぐい液 46 件、鼻腔ぬぐい液

175 件、糞便 21 件、髄液 16 件、血清 17 件、その他 1 件、総数 276 件であった。

2. 検査方法

検体の前処理、細胞培養、ウイルス分離・同定・検出等については、基本的に病原体検出マニュアル(国立感染症研究所)³⁾に準じて実施した。

感染性胃腸炎(乳児嘔吐下痢症を含む)の検体で、ノロウイルス遺伝子が検出されたものの一部については、増幅産物の塩基配列の解析を行なった⁴⁾。麻疹は、麻疹診断マニュアル第 2 版⁵⁾に準じてウイルス遺伝子の検出を行い、リケッチア感染症では、間接蛍光抗体法(IF法)⁶⁾により検査を実施した。

エンテロウイルスを疑う疾患については培養細胞によるウイルス分離を併用し、Nix ら⁷⁾の方法によるエンテロウイルス網羅的 PCR(CODEHOP VP 1 RT-snPCR:以下 CODEHOP PCR と略す)を実施した後、増幅が認められたものについて、増幅産物の塩基配列を決定し、Blast 検索により型別同定を行なった。

調査結果及び考察

表 1 に疾病別の被検者数および検体件数の内訳を示す。

1. インフルエンザ様疾患

検査した患者 257 名のうちで、最多疾患はインフルエンザ様疾患の 198 件であった。PCR で陽性判定した結果の内訳は、A/香港型(H3N2)が 106 件(53.5%)、A/H1N1pdm が 58 件(29.3%)、A/ソ連型(H1N1)が 8 件(4%)、B 型が 5 件(2.5%)であり、残る 21 件(10.6%)からはインフルエンザの遺伝子は検出されなかった。

2009 年は A/H1N1pdm の侵入により大流行し、大半は本ウイルスに因るものであったが、今年度は通年来ほとんど検出されなかった A/香港型(H3N2)が流行の

疾病名	検査材料（内訳）							
	被検者数 （人）	検体数 （件）	咽頭ぬ ぐい液	鼻腔ぬ ぐい液	糞便	髄液	血清	その他
インフルエンザ様疾患	198	198	24	174				
咽頭結膜熱	2	2	2					
無菌性髄膜炎	11	20	1		6	13		
手足口病	3	4	3			1		
ヘルパンギーナ	1	3	2		1			
感染性胃腸炎	15	15			14			1
上気道炎	2	2	1	1				
下気道炎	4	4	4					
麻疹疑い	4	4	4					
伝染性紅斑	2	2	2					
日本脳炎疑い	1	2					2	
リケッチア感染症	8	14					14	
その他の疾患（不明熱など）	5	6	3			2	1	
計	256	276	46	175	21	16	17	1

表1. 疾病別の被検者数および検体件数内訳（2010年度）

主流に置換ったことは注目される。

インフルエンザの立ち上がりは全国と同様に、2011年の第1週から立ち上がりを見せ始め、第4週にピーク（定点当たり報告数56.61）に達した。その後、第7週で15.97、第9週は注意報レベル以下の6.46となり、以降減少傾向で推移した。（図1）

2. 感染性胃腸炎（嘔吐・下痢症を含む）

感染性胃腸炎は15件で、そのうち10件は老人福祉施設における入所者および職員のノロウイルス感染症が疑われた事例であった。そのうち、島原市内の老人福祉施設で発生した例では、有症者10名の糞便が検査に供され、すべての検体からノロウイルス遺伝子(GII)が検出されたものの、感染経路の特定には至らなかった。

また、嘔吐・下痢症の症例についてはノロウイルス遺伝子の検出および培養細胞によるCPEは認めなかった。感染性胃腸炎の年次推移（図2）を見ると、本県は、全国より若干早い立ち上がりを示したが、それ以降は全国と同様の推移で経過し、晩秋から冬季にかけて流行がみられた。

3. 麻疹疑い

麻疹を疑う検体が4件搬入され、ウイルス遺伝子の検出を実施したが、いずれからも検出されなかった。うち2件は、その後の抗体検査により伝染性紅斑であることが判明した。また、伝染性紅斑と臨床診断された患者の検体2件についても麻疹否定のために遺伝子検査を実施したが、陰性であった。

4. リケッチア感染症

つつが虫病および日本紅斑熱を疑う検体が14件搬入され、検査の結果、1名がつつが虫病、2名が日本紅斑熱と診断された。

つつが虫病と診断されたのは、島原市在住の14歳の女性で、平成22年10月30日に発症、刺し口と発疹等の症状からつつが虫病若しくは日本紅斑熱疑いと診断され、血清が採取された。初回に採取した血清（第14病日）では、Gilliam、Karp、Kato、Kuroki、Kawasakiに対するIgM、IgG抗体価はいずれも10倍未満であったが、2回目（第18病日）に採取した血清において、Kawasakiに対してIgM40倍、IgG40倍、3回目（第30病日）の血清では、IgM抗体価2560倍以上、IgG抗体価640倍と顕著な上昇を認め、確定診断に至った。

日本紅斑熱と診断されたうちの1人は五島市在住の63歳の女性で、平成22年5月13日に発症、近医にて

—×— インフルエンザ 定点当たり報告数(全国) —×— インフルエンザ 定点当たり報告数(長崎県)

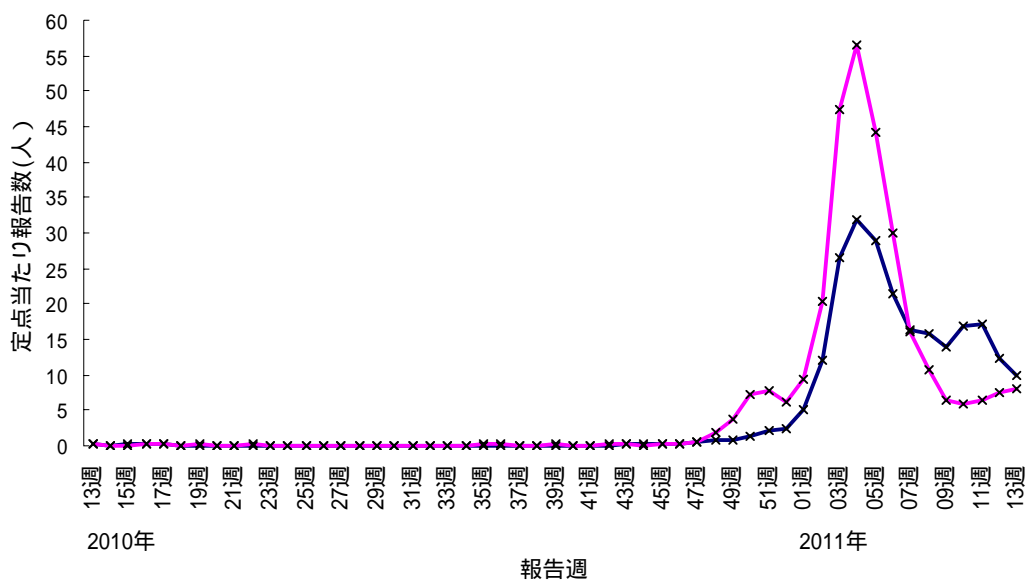


図1. インフルエンザの年次推移 (2010年度)

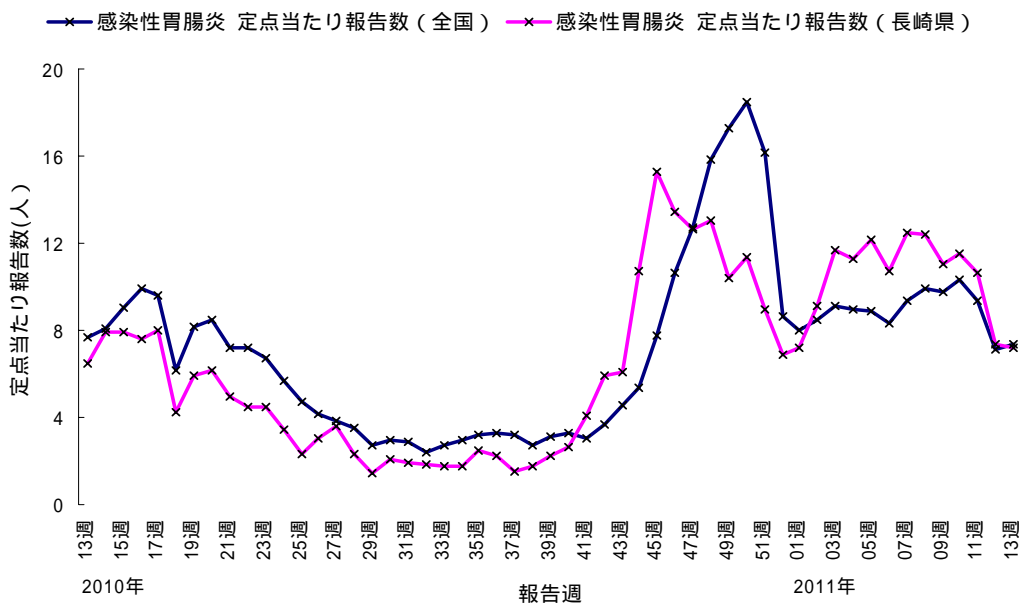


図2. 感染性胃腸炎の年次推移 (2010年度)

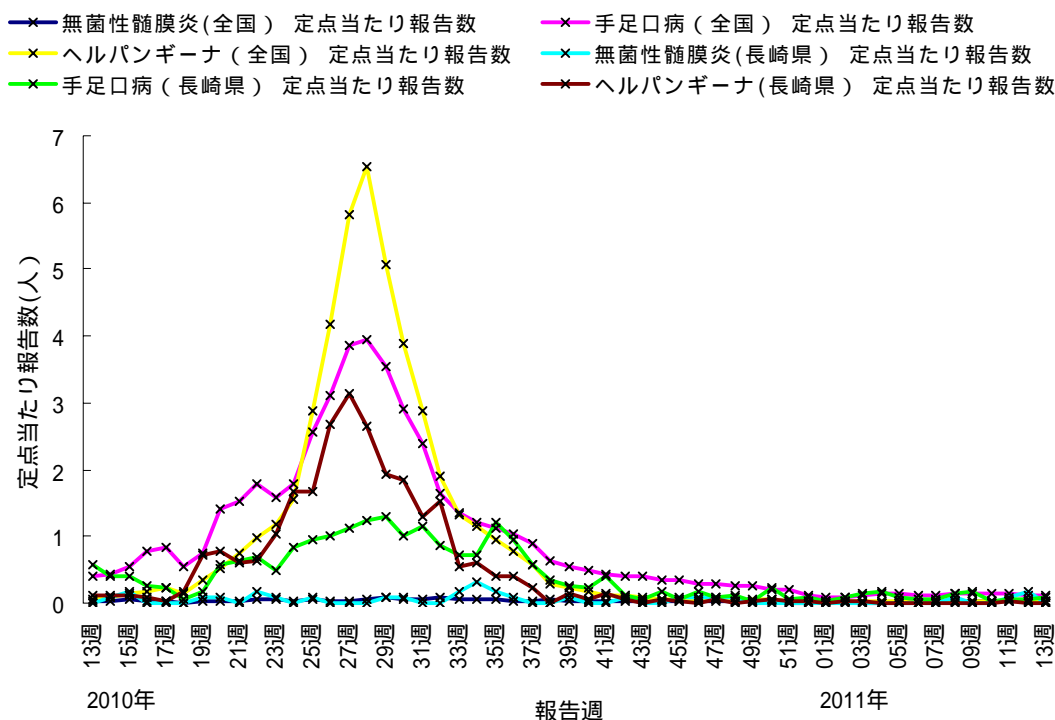


図3. 無菌性髄膜炎、手足口病、ヘルパンギーナの年次推移(2010年度)

日本紅斑熱と診断され、第9病日に採取された血清において、Japonica に対する IgM、IgG 抗体価がいずれも 80 倍、回復期(第30病日)の血清では、IgM 抗体価 1280 倍、IgG 抗体価 320 倍を示し、いずれの抗体価も明らかな上昇が認められた。

五島市では以前にも同地区周辺から日本紅斑熱患者が発生しており、患者も山野に入っていることから、本疾患を媒介するダニからの感染が示唆された。

もう1人は、長崎市在住の79歳の女性で、平成22年10月12日、山間部にシバを取りに行き、帰宅後、右肩の刺し口に気づき、同日、全身倦怠感、紅斑の出現、39℃台の発熱の症状を呈し発症、つつが虫病疑いと診断された。10月14日に急性期の血清が採取され、Gilliam、Karp、Kato、Kuroki、Kawasaki に対する IgM、IgG 抗体価は、いずれも 10 倍未満、Japonica に対する抗体価も 10 倍未満であった。10月27日の回復期の血清において、つつが虫病関連の抗原に対する抗体価はすべて 10 倍未満で陰性であったが、Japonica に対する、IgM 抗体価は 160 倍、IgG 抗体価 640 倍の抗体価の上昇を認め、本件は日本紅斑熱と診断した。

日本紅斑熱と診断された患者の共通点は、いずれの場合も山野に入ってダニに刺されている。一方、つつが虫病と診断された患者は山野への立入りはないもの

の、住所地周辺は田園地帯であり、本地域における同リケッチアを媒介するダニの生息が示唆され、今後、注意喚起や情報の提供を強化していく必要があると考える。

5. 日本脳炎

諫早市在住の86歳の男性で、平成22年8月28日に発症、9月1日に脳炎疑いで市内病院に転院、9月10日に日本脳炎と診断された。当センターでは、IgM capture ELISA for JE(Focus 変法 NIID) (国立感染症研究所ウイルス第一部高崎智彦博士より供与)を用いて急性期(9月1日)および回復期(9月17日)に採取された患者血清で確認検査を行ない、JEV-IgM 抗体陽性でJEV への罹患が確認された。さらに、JEV 遺伝子検査を実施したものの JEV 遺伝子は検出できなかった。本県において2001年以来9年ぶりにJEV 患者の発生が認められたことから、注意報発令の復活、ワクチンの接種等、より一層の注意喚起を呼びかける必要があるものと思われる。

6. 無菌性髄膜炎

無菌性髄膜炎と診断された患者13名、20件の検体について、CODEHOP PCR を行なった後、陽性検体は

RD-A 細胞および Vero 細胞を用いてウイルス分離を行った。CODEHOP PCR の結果、20 件のうち 1 名の糞便および、髄液いずれからも Coxsackievirus B2 (以下 CV-B2 と略す) が同定された。糞便から RD-A 細胞および Vero 細胞いずれに接種した場合も同じ CV-B2 が分離同定された。患者は生後 1 ヶ月の男児であった。

また、7 歳 3 ヶ月の患者(女児)からの糞便と髄液の検体のうち、糞便からのみ、CODEHOP PCR で、Enterovirus 71 (以下 EV71 と略す) が検出、同定されたが、ウイルスは分離できなかった。

7. 手足口病 (HFMD)

手足口病と診断された患者 3 名、4 検体について、無菌性髄膜炎患者由来検体と同様の方法で検査を実施した。結果、2 歳 3 ヶ月の女児の咽頭ぬぐい液から CODEHOP PCR で EV71 が検出、同定された。さらに、RD-A 細胞からも同ウイルスが分離、同定された。

8. ヘルパンギーナ

ヘルパンギーナと診断された患者 1 名、3 検体について CODEHOP PCR による遺伝子検査及びウイルス分離を行ったが、いずれも陰性であった。

無菌性髄膜炎、手足口病、およびヘルパンギーナの年次推移を見ると(図 3) 全国とほぼ同様に経過した。2010 年の第 28 週(7 月 12~18 日) 前後に流行のピークが認められたが、本県ではヘルパンギーナの報告数が多かったものの、検体の搬入数は少なかった。

9. その他の疾患

不明熱、急性心筋炎、上気道炎、下気道炎、乳児発熱、熱性痙攣、咽頭結膜熱などの疾患から得られた 21 検体について、CODEHOP PCR およびウイルス分離を実施した。

結果、乳児発熱の診断で採取された生後 1 ヶ月の女児の直腸ぬぐい液を接種した RD-A 細胞および Vero 細胞のいずれにおいても CPE を認めため、その分離材料を用い、CODEHOP PCR を実施したところ、EV71 が同定された。この患児には 2 歳の姉がおり、通園する保育園で手足口病が流行しており、手足口病に続く脳炎の疑いで本女児の検体も搬入されたが、検体採取の時期が発症後 2 週間以上経過していたため、CODEHOP PCR、ウイルス分離、いずれも陰性であった。

また、下気道炎を発症した 4 歳男児の咽頭ぬぐい液から、CODEHOP PCR により C 群に属するヒトライノ

ウイルス(以下 HRV sp C と略す) が検出、同定された。

HRV sp C に属するウイルスは現時点で培養可能な細胞はなく、通常鼻かぜ程度の上気道炎のみに関与すると考えられていた HRV の中で sp C に属するウイルスは、下気道炎、肺炎などの重症化に関与していることが示唆されている。今回、下気道炎患者より HRV sp C に属するウイルスが同定されたが、本ウイルスがこれまでに報告された重症下気道炎患者から同定されたウイルスと極めて近縁であったことは極めて興味深い。

さらに、CODEHOP PCR による検出同定がエンテロウイルスのみならず、HRV、しかも培養不可能な HRV sp C の検出にも有効であることが示唆されたことから、呼吸器ウイルス感染症からの検体における HRV を含むエンテロウイルスの検出同定に多用していきたいと考える。

今回、エンテロウイルスによる感染が疑われる疾患を中心に 48 の検体について、CODEHOP PCR と培養細胞によるウイルス分離を試み、EV71 が 2 件、CV-B2 が 1 件、ライノウイルスが 1 件同定され、CODEHOP PCR と培養細胞の併用、特に CODEHOP PCR によりウイルスを検出、同定後にそのウイルスに適切な培養細胞を選択してウイルス分離することは、効率よく原因ウイルスの同定をできることから有用であると思われる。エンテロウイルスによる感染症、特に手足口病は全国的にみても 2008 年までは、Coxsackievirus A16 (CV-A16) によるものが多かったが、2009 年より EV71 が主流となり、今後の手足口病の原因ウイルスとして EV71 の拡大が懸念される。本県では、昨年まで CV-A16 によるものがほとんどであったが、今回 EV71 が分離・同定されたことから来年度以降 EV71 による手足口病の流行に注意を要する。

本ウイルスによる手足口病は、中国では一昨年より大流行しており、高い確率で髄膜炎、肺合併症を含む神経系の合併症を引き起こし、死者も多数報告されていることから、中国における流行株の日本への侵入、国内における本ウイルスによる手足口病の流行拡大等、今後の動向に注視すべきものであると考える。

謝 辞

JEV IgM capture ELISA を供与いただいた国立感染症研究所高崎智彦博士並びに感染症発生動向調査にご協力頂いた各定点医療機関および協力医療機関の先生方、検体の収集および搬入にご協力頂きました長崎市、佐世保市、県立保健所の関係諸氏に深謝します。

参考文献

- 1) 平野 学 他: 感染症サーベイランスにおけるウイルス分離(2008年度) 長崎県環境保健研究センター所報 54、129-133 (2008)
- 2) 平野 学 他: 感染症サーベイランスにおけるウイルス分離(2009年度) 長崎県環境保健研究センター所報 55、123-126 (2009)
- 3) 病原体検出マニュアル(国立感染症研究所)
- 4) 厚生労働省通知: 最終改正 平成 19 年 5 月 14 日食安監発第 0514004 号、ノロウイルスの検出法について
- 5) 麻疹診断マニュアル第 2 版 平成 20 年 7 月(国立感染症研究所)
- 6) リケッチア感染症診断マニュアル 平成 12 年(国立感染症研究所)
- 7) Nix W, Oberste MP, Pallansch MA. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol* **2006**; 44:2698-704.