

## 感染症サーベイランスにおけるウイルス分離 (2012年度)

北川 由美香、山口 顕徳、吉川 亮、松本 文昭、吾郷 昌信

### Virus Isolation on Surveillance of Infectious Diseases in the year 2012

Yumika KITAGAWA, Akinori YAMAGUCHI, Akira YOSHIKAWA, Fumiaki MATSUMOTO and Masanobu AGOH

Key word : Surveillance, CODEHOP VP 1 RT-snPCR, Coxsackievirus A, Herpangina

キーワード：サーベイランス、エンテロウイルス網羅的 PCR、コクサッキーウイルス A、ヘルパンギーナ

#### はじめに

感染症サーベイランス（発生動向調査）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) 3)

当センターにおいても、「長崎県感染症発生動向調査実施要綱」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、長崎県感染症発生動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（直腸ぬぐい液）、髄液、血清、尿）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 144 名より採取された咽頭ぬぐい液 46 件、鼻腔ぬぐい液 88 件、糞便 1 件、髄液 3 件、血清 41 件、尿 4 件、その他 1 件、総数 184 件であった。

##### 2. 検査方法

基本的に、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、病原体検出マニュアル（国立感染症研究所 4）に準じて実施した。感染性胃腸炎の検体で、ノロウイルス遺伝子が検出されたものについては、増幅産物の塩基配列の解析を行なった。5) 麻疹については、麻疹検出マニュアル第 2 版 6)、風疹については、風疹検出マニュアル第 2 版に準じてウイルス遺伝子の検出を行い、デング熱疑いについては、デングウイルス検出マニュアルに準じて遺伝子検出を行い、国立感染症研究所より供与された Dengue Virus IgM capture ELISA（Focus 社）を用いて抗体検査を実施した。リケッチア感染症および重症熱性血小板減少症候群については、国立感染症研究所へ検査を依頼した。

エンテロウイルスを疑う疾患については、Nix ら 8)、9) の方法によるエンテロウイルス属を網羅的に検出する PCR（CODEHOP VP 1 RT-snPCR；CODEHOP PCR）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、

表 1. 疾病別の被検者数および検体件数内訳 (2012 年度)

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	尿	その他
インフルエンザ様疾患	79	79	13	66					
感染性胃腸炎 (嘔吐・下痢症を含む)	1	1			1				
麻疹疑い	11	24	11				11	2	
風疹疑い (先天性風疹症候群含む)	2	6	2				2	2	
ヘルパンギーナ	12	12	12						
急性上気道炎 (不明な発疹)	17	17	1	16					
デング熱	1	1					1		
リケッチア感染症	7	18					17		1
SFTS疑い	4	9				1	8		
急性脳炎	2	6	2			2	2		
風邪 (感冒)	3	6	3	3					
不明熱	4	4	1	3					
気管支肺炎 (下気道炎)	1	1	1						
計	144	184	46	88	1	3	41	4	1

BLAST 検索により型別同定等を行なった。

#### 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 144 名のうちで、最多疾病はインフルエンザ様疾患の 79 件であった。PCR にて陽性判定した結果の内訳は、A/香港型 (H3N2) が 56 件 (70.9%)、B 型が 16 件 (20.2%)、A/H1pdm09 型が 1 件 (1.3%)、A/香港型と B 型の混合感染が 2 件 (2.5%) であり、残る 4 件 (5.1%) からはインフルエンザの遺伝子は検出されなかった。また、A/ソ連型 (H1N1) は検出されなかった。2012 年は、2011 年に引き続き A/香港型 (H3N2)

が流行の主流であり、B 型はシーズン後半から検出され、例年どおり概ね二峰性の流行パターンとなった。

インフルエンザ流行の立ち上がりは全国平均と同様に、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 50.91 (前年 29.79)) に達した。その後、第 11 週に一旦注意報レベルの「10」を下回ったものの 15 週に再度増加に転じ、17 週の「7.50」以降減少傾向で推移した。昨年度は、長崎県内において A/香港型の大規模な流行は認められず、警報レベルの「30」を示すことはなかったが、2012 年度は「30」を超えた週が 3 週あり、全国よりも高い水準で推移した。(図 1)

##### 2. 感染性胃腸炎

感染性胃腸炎は 12 月に搬入された 1 件で、糞便

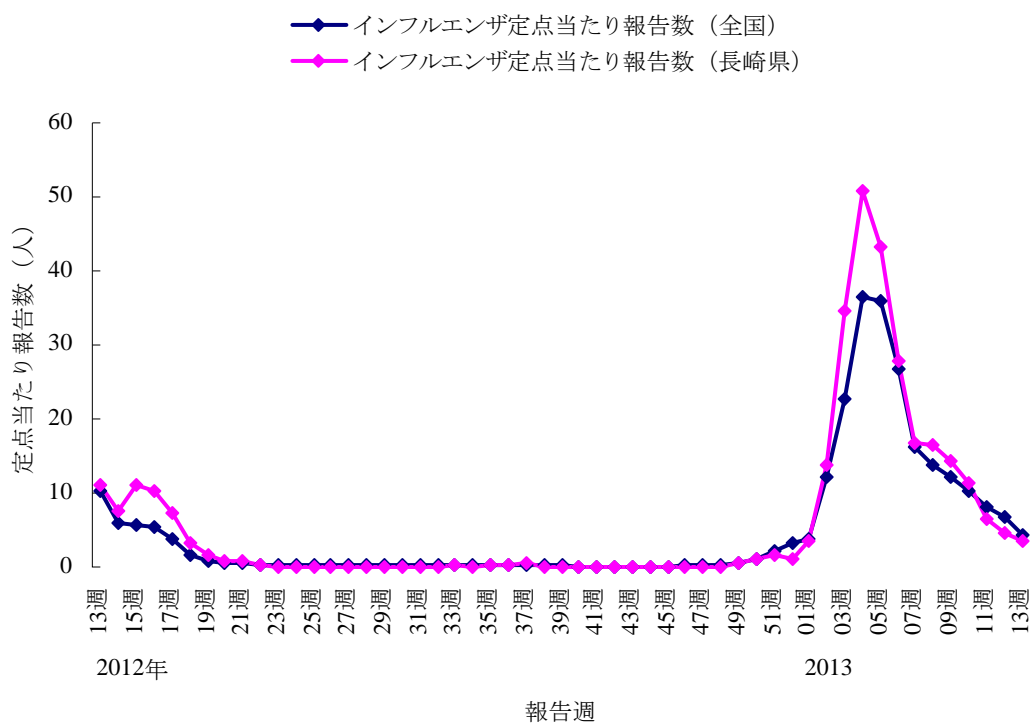


図 1. インフルエンザの年次推移 (2012 年度)

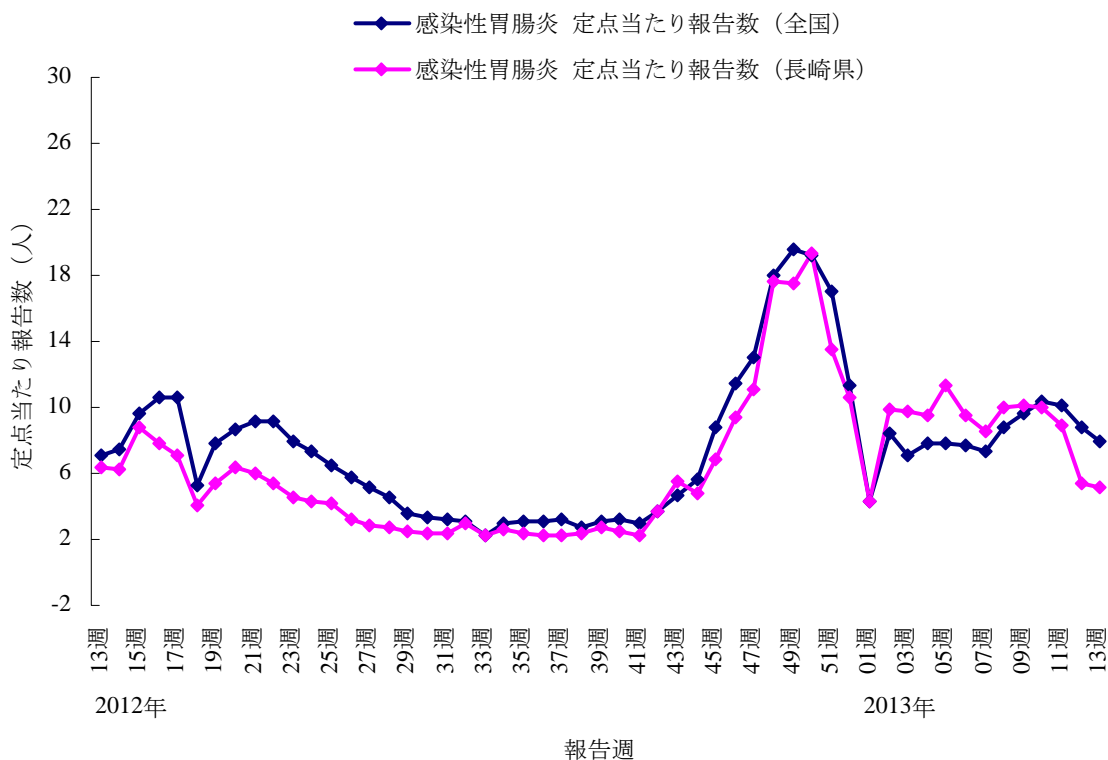


図 2. 感染性胃腸炎の年次推移 (2012 年度)

検体からノロウイルス遺伝子 (GII) が検出された。また、ダイレクトシーケンス法により塩基配列の確認を実施したところ、遺伝子増幅領域の塩基配列は、2012年に全国的に流行した GII/4 2012 変異株 (Sydney/NSW0514/2012/AU 株) と一致していた。長崎県で 2012 年度に発生した食中毒の検体から検出された遺伝子においても、同じ株が検出されていることから、全国同様、長崎県内でも同株が流行していたものと推測される。

感染性胃腸炎の年次推移 (図 2) を見ると、本県は、全国とほぼ同様の推移を示し、第 50 週 (定点当たりの報告数 10.13) にピークを認め、晩秋から冬季にかけて流行がみられた。全国的には、警報基準値である「20」を超える週はなかったが、過去 10 年の中でも高い水準で推移した。

### 3. 麻疹

麻疹を疑う検体が 11 名分、24 件 (咽頭ぬぐい液、血清、尿) 搬入され、ウイルス遺伝子の検出を試みたが、いずれも麻疹ウイルス遺伝子は検出されなかった。また、11 名のうち 1 名については、風疹の流行している都市部から一時帰省した成人であり、風疹の可能性も否定できないことから、麻疹と併せて風疹ウイルス遺伝子の検出を試みたところ、咽頭ぬぐい液および血清から風疹ウイルスの遺伝子が検出された。

平成 27 年度までの麻疹排除を目標に掲げ、平成 25 年 4 月に麻疹に関する特定感染症予防指針が一部改正され、原則として全例に検査を求められることとなり、今後の検査数の増加も予想される。

### 4. 風疹、先天性風疹症候群

風疹を疑う検体が 1 名分、3 件 (咽頭ぬぐい液、血清、尿)、CRS を疑う検体が 1 名分 3 件 (咽頭ぬぐい液、血清、尿) 搬入され、ウイルス遺伝子の検出を試みたが、いずれも風疹ウイルス遺伝子は検出されなかった。

麻疹を疑い、搬入された 1 名分、2 件の検体から風疹ウイルス遺伝子が検出されたが、指定プライマーでは反応せず、塩基配列の解析ができなかったことから、遺伝子型の同定には至らなかった。平成 24 年度に長崎県では、本症例と臨床診断例 2 例、検査診断例 (医療機関における IgM 抗体の検出) 1 例、計 4 件の報告があった。平成 24 年度は風疹による報告数が首都圏を中心に過去 5 年間において最も増加し、平成 25 年度に入っても、全国

的に流行が継続していることから、発生状況に注視する疾患である。

### 5. ヘルパンギーナ

ヘルパンギーナと診断された患者の検体は、7 月に県南保健所から、1 月に県北保健所から搬入された。いずれの検体についても CODEHOP PCR によるエンテロウイルス属の遺伝子検索を実施した (表 2)。

県南保健所より搬入された検体は、9 名分の咽頭ぬぐい液 9 件であった。いずれの患者もヘルパンギーナの典型的な症状である 38~40 度の高熱、口内炎、咽頭痛・咽頭炎の症状を呈していた。9 件中 8 件から Cocksackievirus A4 (CV-A4) が同定され、残る 1 件から Cocksackievirus A2 (CV-A2) が同定された。CV-A4 が検出された 8 件のうち、7 件は同一の塩基配列で 2011 年にインドから報告された株と類似していた (相同性 92~93%)。1 件は、2010 年にギリシャから報告された株と類似していた (相同性 96%)。供試した 9 検体のうち、1 件から検出された CV-A2 は、2012 年にロシアから報告された株と 96% の相同性を示した。以上の結果より、夏頃県南保健所管内において流行したヘルパンギーナの原因ウイルスは、CV-A4 が主流で、一部 CV-A2 が混在していたものと推察された。

県北保健所より搬入された検体は、ヘルパンギーナの集団発生がみられた同一保育所からの 3 名分 3 検体 (咽頭ぬぐい液) で、CODEHOP PCR による遺伝子検索を実施したところ、すべての検体から同一の塩基配列をもつ遺伝子が検出された。BLAST 検索により相同性の高い塩基配列を探したところ、CV-A8 (相同性 81%)、CV-A3 (74%)、CV-A6 (72%)、CV-A10 (74%) と 70~80% の相同性で複数の血清型が候補に挙がったため、アミノ酸配列に翻訳して BLAST 検索を行ったところ CV-A8 と 90% 以上の相同性が認められたので、CV-A8 と同定した。したがって、保育所で流行したヘルパンギーナの原因ウイルスは CV-A8 であると判定した。また、検出された CV-A8 と最も相同性が高かった株は、2000 年に中国の急性弛緩性麻痺の患者由来の分離株であったことから、神経病原性を伴うウイルスに変異する可能性も十分に考えられることから今後の流行状況に注視していく必要があるものとする。また、夏場に流行することの多いヘルパンギーナの集団発生が 1 月に認められたことも注目すべき点である。

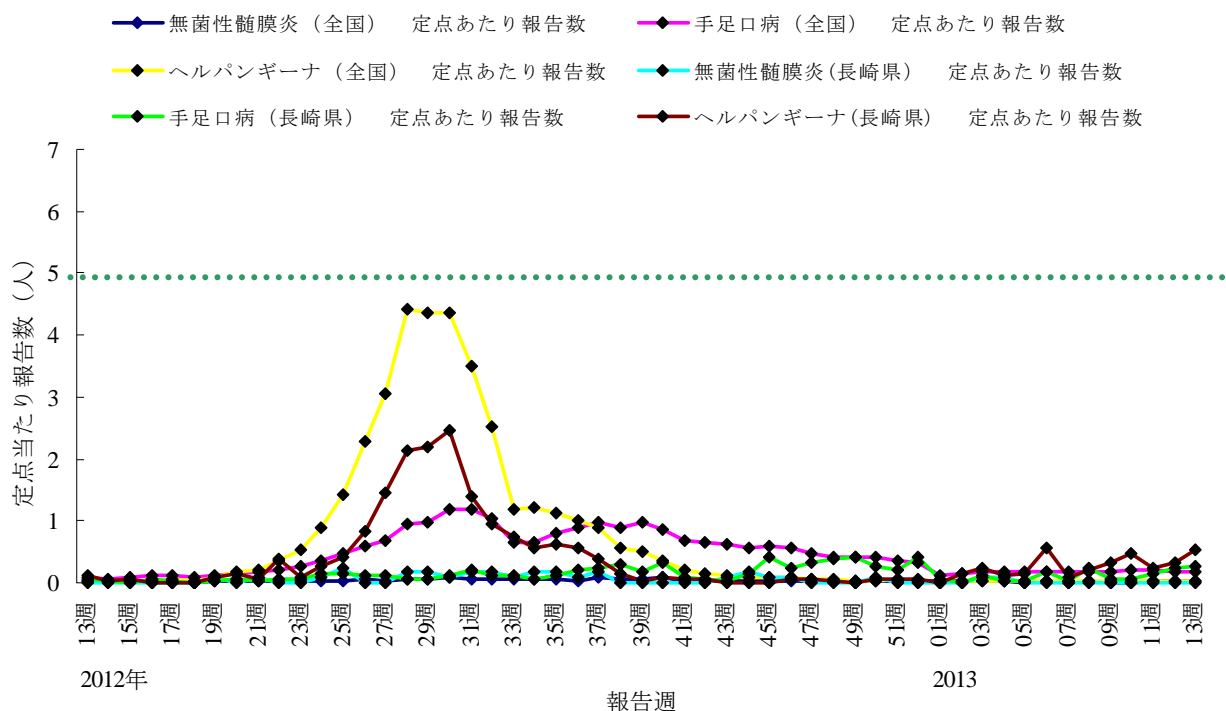


図3. 無菌性髄膜炎、手足口病、ヘルパンギーナの年次推移（2012年度）

2011年度は、手足口病およびヘルパンギーナと診断された検体から CV-A6 が最も多く検出され、流行の主流であったが、2012年度は1件も検出されなかった。手足口病と診断された検体の搬入がなかったため、断定は難しいが、昨年とは異なる傾向が認められた。全国的に手足口病の流行（ピークは、全国：第28週の定点あたり10.98人、長崎県：第26週の定点あたり19.32人）が認められた2011年度と比較して、2012年度は、全国、長崎県いずれにおいても、手足口病およびヘルパンギーナの大きな流行はなく、警報基準値を超える週はなかった（図3）。

#### 6. 発疹を伴う上気道炎

県南保健所管轄内で地域的に流行した発疹を伴う上気道炎患者の検体が17名分17件（咽頭ぬぐい液および鼻腔ぬぐい液）搬入され、検査を実施した。主症状は、上気道炎、発熱と全身性の発疹であった。症状からエンテロウイルス属による症状を疑い、CODEHOP PCR による遺伝子検索を試みた。その結果、17件中、7検体から Echovirus 9 が同定された。これらの塩基配列には多様性が認められたものの、アミノ酸配列で BLAST 検索

を行うと、大きく2系統に分かれた。以上の結果より、発疹を伴う上気道炎の流行の原因として、複数の系統の Echo9 の関与が示唆された。

また、3件からは、ヒトライノウイルス（以下 HRV と略す）9型、81型、55型がそれぞれ検出された。HRV は感冒症状の主原因と考えられるが、発疹症状を惹起することはほとんどないため、発疹の原因は混合感染した他のウイルスによるものと考えられた。残る7件から、エンテロウイルス属の遺伝子は検出されなかった。

#### 7. デング熱

7月に当センターにデング熱疑いで搬入された検体は、カンボジアに渡航歴のある40歳代男性の血液（3病日採取）1件であった。デングウイルス遺伝子の検出を試みたところ、デングウイルス1型の遺伝子が検出された。さらに、塩基配列をデングウイルス1型の陽性対照と比較したところ、増幅領域において、94%の相同性が認められた。しかしながら、デングウイルスに対するIgM抗体は検出されなかった。

本疾患は、主としてネッタイシマカやヒトスジシマカが媒介するデングウイルスにより発症する。現

在 Dengue ウイルスは日本国内には常在していないが、海外渡航者の増加とともに、帰国後発症する例が増加しており、輸入感染症として重要な疾患である。県内でも24年度に本症例以外に海外渡航歴のある患者2例が報告されている。

#### 8. 重症熱性血小板減少症候群 (Severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS)

本疾患は、平成25年1月に初めて国内発症例が確認されたダニ媒介性のウイルス感染症であり、平成25年3月4日から感染症法上の4類感染症に指定された。

2013年1月、発熱、消化器症状、血小板減少、白血球減少、血清酵素の上昇等の要件を満たす患者の情報提供の協力依頼(平成25年1月30日付厚生労働省健康局結核感染症課長通知)があつて以降、2月から3月にかけて、当センターに4名分9件の検体(髄液および血清)が搬入された。搬入時点では、地方衛生研究所における検査体制が確立されていなかったため、検体は国立感染症研究所に送付し、同研究所でウイルス遺伝子検査および間接蛍光抗体法による検査が実施された。4名中1名の検体からは、ウイルス遺伝子は検出されなかったが、SFTSの臨床定義に合致する症状を示した2名の検体からは、ともにウイルス遺伝子が検出され、うち1名は抗体検査でも陽性であった。残り1名については、検査材料が回復期の血清のみであったことから、抗体検査では陽性であったものの、SFTSとしての診断には至らなかった。

#### 9. 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7名分、18件搬入された。検査体制が整っていなかったため、国立感染症研究所に検査を依頼した結果、1名(昨年2名)がつつが虫病、2名(昨年9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、上五島保健所管内の90歳代の女性で、刺し口の確認と臨床症状からリケッチア感染症(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(第7病日)および2回目(第21病日)に採取した血清において、Gilliam、Kawasakiに対するIgM抗体価が640倍以上、IgG抗体価はGilliam に対して640倍、Kawasakiに対して80倍であった。

日本紅斑熱と診断された1名は、0歳の女兒で刺し口の確認と臨床症状からリケッチア感染症が疑われ、痂皮および血液から、リケッチア属の遺伝子が検出され、塩基配列が*Rickettsia japonica*と一致した。

日本紅斑熱と診断されたもう1名は、30代女性で、刺し口は認められなかったものの、臨床症状からリケッチア感染症を疑われた。第19病日に採取された血清において、*Rickettsia japonica*に対するIgG抗体価が640倍以上を示し、顕著な抗体価の上昇が認められたことから、日本紅斑熱であったことが確定した。

#### 10. 急性脳炎

急性脳炎と診断された検体が2名分、6件(咽頭ぬぐい液、血清および髄液)搬入された。いずれの場合にも、急性脳炎の原因となりうるエンテロウイルス属の遺伝子検索、日本脳炎ウイルス遺伝子検査および抗体検査(抗日本脳炎ウイルスIgM抗体の検出)を実施したが、遺伝子検査、抗体検査とも陰性であった。

#### 謝 辞

Dengue Virus IgM capture ELISA (Focus 社) および JEV IgM capture ELISA 用抗原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諸先生、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、県立各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(2009年度)長崎県環境保健研究センター所報 55、123-126(2009)
- 2) 山口 顕徳 他: 感染症サーベイランスにおけるウイルス分離(2010年度)長崎県環境保健研究センター所報 56、99-104(2010)
- 3) 山口 顕徳 他: 感染症サーベイランスにおけるウイルス分離(2010年度)長崎県環境保健研究センター所報 57、104-110(2011)
- 4) 病原体検出マニュアル(国立感染症研究所)
- 5) 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
- 6) 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)
- 7) 風疹診断マニュアル第2版 平成24年(国立感染症研究所)
- 8) Nix WA, 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.

9 ) CDC Enterovirus Laboratories Procedure #EV010-10, VP1RT-snPCR for Clinical Specimens 2005 (CDC, USA)