

感染症サーベイランスにおけるウイルス分離 (2013 年度)

高木 由美香、松本 文昭、浦山 みどり、吉川 亮、吾郷 昌信

Virus Isolation on Surveillance of Infectious Diseases in the year 2013

Yumika TAKAKI, Fumiaki MATSUMOTO, Midori URAYAMA, Akira YOSHIKAWA and Masanobu AGOH

Key word : Surveillance , CODEHOP VP 1 RT-snPCR , Hand, foot and mouth disease , SFTS, Rubella

キーワード：サーベイランス、エンテロウイルス網羅的 PCR、手足口病、重症熱性血小板減少症候群、風しん

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「感染症の予防及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及びまん延の未然防止、有効かつ確か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、ウイルス分離及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）及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及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、結膜ぬぐい

液）について、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 162 名より採取された咽頭ぬぐい液 67 件、鼻腔ぬぐい液 70 件、糞便 2 件、髄液 5 件、血清 44 件、尿 1 件、結膜ぬぐい液 3 件、総数 192 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、以下「感染研」）⁴⁾ に準じて実施した。

麻しんについては、麻しん検出マニュアル第2版⁵⁾、風しんについては、風しん検出マニュアル第2版⁶⁾ に準じてウイルス遺伝子の検出を行い、日本脳炎については、日本脳炎ウイルス検出マニュアルに準じて遺伝子検出を行い、感染研より供与された IgM capture ELISA for JE（Focus変法NIID）を用いて抗体検査を実施した。重症熱性血小板減少症候群（Severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS）については、平成25年3月13日付SFTS ウイルス検査マニュアル(感染研)⁷⁾ に準じて遺伝子検出を行い、SFTSウイルス陽性と判定された場合には、確定診断のため感染研へ検体を送付した。リケッチア感染症については、感染研へ検査を依頼した。

エンテロウイルス感染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（Enteroviruses：EVs）を網羅的に検出する PCR（Consensus Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primer：CODEHOP VP 1 RT-snPCR）（図 2）を実施

表 1 . 疾病別の被検者数及び検体件数内訳 (2013 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	結膜 ぬぐい液
インフルエンザ様疾患	77	77	9	68					
麻疹疑い	1	3	1				1	1	
風疹疑い (先天性風疹症候群含む)	5	7	4	1			2		
日本脳炎	1	1					1		
SFTS疑い (敗血性ショック含む)	12	18					18		
リケッチア感染症	9	18					18		
無菌性髄膜炎	7	12	7			5			
手足口病	31	31	30	1					
ヘルパンギーナ	3	3	3						
上気道炎 (咽頭炎含む)	4	4	4						
下気道炎 (気管支肺炎含む)	4	10	4		2		4		
急性出血性結膜炎	3	3							3
その他の疾患	5	5	5						
計	162	192	67	70	2	5	44	1	3

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、Basic Local Alignment Search Tool (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及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 162 名のうちで、最多疾病はインフルエンザ様疾患の 77 名 (77 検体) 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 17 件 (22.1%)、B 型が 23 件 (29.9%)、A/H1pdm09 型が 30 件 (38.9%) であり、残る 7 件 (9.1%) 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。2011 年、2012 年は A/香港型 (H3N2) が流行の主流であったが、2013 年は、2009 年以來の A/H1pdm09 型の流行が認められた。年度当初 (2012/2013 シーズン後半) は、A/香港型 (H3N2) 及び B 型が中心

に検出され、2013/2014 シーズンにおいては、大半が A/H1pdm09 型であった。

長崎県におけるインフルエンザ流行は、全国と同様に 2014 年第 1 週から立ち上がりを見せ始め、第 5 週にピーク (定点当たり報告数 41.01 (前年 50.91)) に達した。その後、第 9 週まで定点あたり報告数「30」を超えた状態にあった。2012 年度は、A/香港型の大規模な流行が認められ、全国よりも高い水準で推移したが、2013 年度は全国とほぼ同様の傾向で推移した (図 1)。

また、平成 26 年 1 月に札幌市で抗インフルエンザ薬耐性の A/H1pdm09 ウイルス株が検出されたことを契機に、当センターにおいても抗インフルエンザ薬耐性サーベイランスを実施した¹⁰⁾。2013 年度 1 月から 3 月に採取された臨床検体のうち、A/H1pdm09 ウイルス遺伝子が検出された 28 検体について、抗インフルエンザ薬 (オセルタミビル / ペラミビル) 耐性マーカー「H275Y」の検出を試みたところ、2 検体から「H275Y」変異が検出された。この 2 検体は、感染研の解析により、札幌市を中心に地域流行していた耐性株とは遺伝的に異なり、

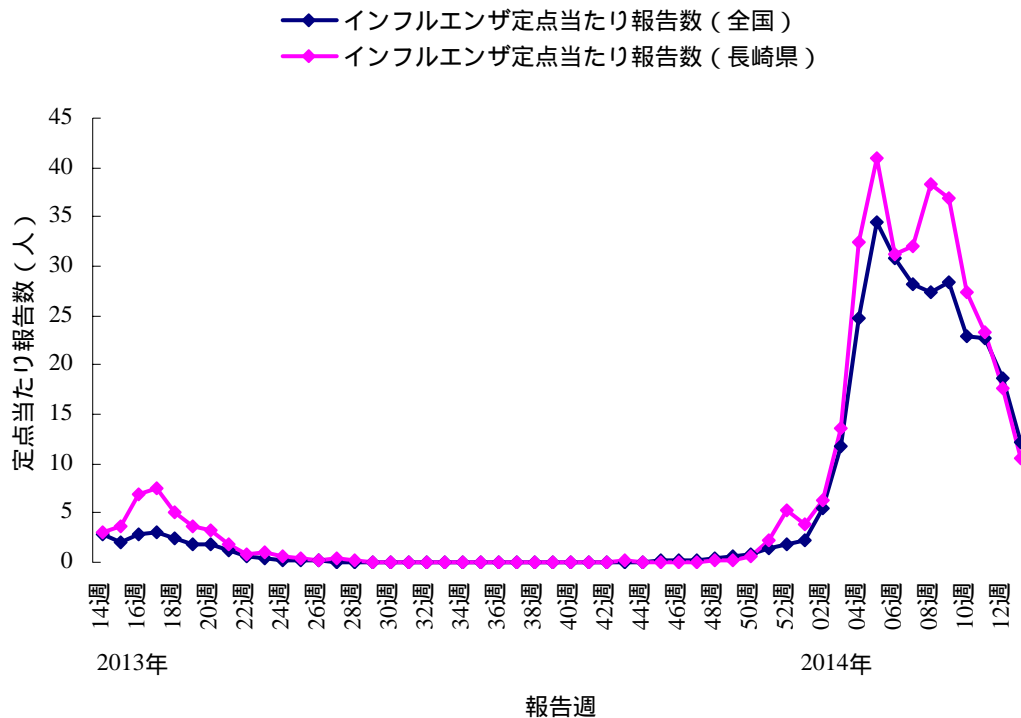


図1. インフルエンザの定点当たり報告数の推移 (2013年度)

日本国内の他地域で散発的に検出されている耐性株と遺伝的に近いということが分かった。来シーズン以降も薬剤耐性株の状況を把握していく必要があると考えられる。

2. 麻しん

麻しんを疑う検体が1名分、3検体(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、麻しんウイルス遺伝子は検出されなかった。

平成27年度までの麻しん排除を目標に掲げ、平成25年4月に一部改正された「麻しんに関する特定感染症予防指針」の中で、原則として麻しん疑い全例に遺伝子検査を求められていることから、今後の検査数の増加も予想される。

3. 風しん、先天性風しん症候群

風しんを疑う検体が4名分5検体(咽頭ぬぐい液、血清)及び先天性風しん症候群を疑う検体が1名分2検体(咽頭ぬぐい液、血清)搬入され、風しんウイルス遺伝子の検出を試みた。風しん疑いの4名分の検体のうち、周囲に風しん患者が確認されていた30歳代男性1名の検体から、風しんウイルスの遺伝子が検出された。

平成24年度から首都圏を中心に風しん患者報告

数が過去5年間において最も増加した。平成25年度に入っても全国的な風しん患者の増加は続き、予防接種制度により抗体保有率が低いとされている20-40歳代の男性を中心に全国的な大流行となった。長崎県において平成25年度は、当センターで検査した遺伝子検査陽性例を含む検査診断例13例と臨床診断例6例、計19件の報告があった。

平成26年4月1日付で「風しんに関する特定感染症予防指針」が策定され、風しん疑い患者の検体について地方衛生研究所における遺伝子検査の重要性が示されたことから、麻しんと同様に今後の検査数の増加が予想される。

4. 日本脳炎

2013年度は、日本脳炎を疑う患者1名の1検体(第6病日採取の血清)が搬入された。日本脳炎ウイルス(Japanese Encephalitis virus: JEV)の遺伝子検出及びELISA法によるIgM抗体の検出を試みたところ、JEV-IgM抗体価の上昇が認められ、日本脳炎の罹患が確認された。JEV遺伝子は検出されなかった。

県内における本疾患の発生は2年ぶりであった。患者は80歳代の女性で、発熱、意識障害、不随意運動(痙攣)の症状を呈し近医を受診後、他の医療機関へ紹介入院となったが、その後死亡した。

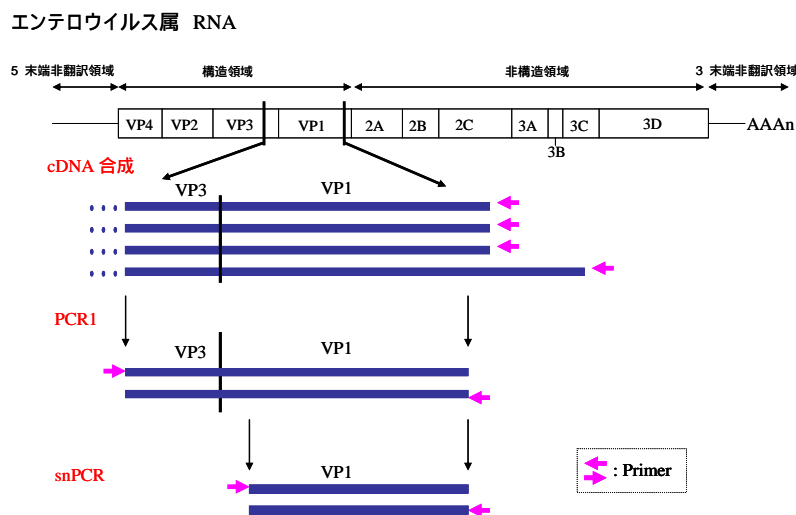


図 2 . CODEHOP VP1RT-snPCR の概略

来期の患者発生をみないためにも、感染症流行予測調査に基づく注意報発令、蚊の吸血行動が活発になる前のワクチン接種による予防等、より一層の注意喚起をしなければならないと考える。

5 . 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS)

本疾患は、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ブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類される新しいウイルスによるダニ媒介性感染症である。

2013年度は、SFTSを疑われた患者12名分、18検体 (血清) が搬入された。SFTSウイルス検出マニュアルに準じて検査を実施した結果、患者2名の検体からSFTSウイルス遺伝子が検出された。

患者のうち1名は、50歳代の女性で、発熱、食欲不振、全身倦怠感があり、医療機関を受診した。白血球及び血小板減少、ダニに咬まれたとの情報から、SFTS疑いで行政検査依頼があった。第5病日に採取された血清1検体が搬入され、SFTSウイルス遺伝子が検出された。感染研における遺伝子検査でもSFTSウイルスが検出された。

もう1名は、70歳代の女性で、発熱、消化器症状、血小板・白血球減少の所見から本疾患を疑い、消化器症状発現後2週間程度経過した採取日の異なる血清2検体が搬入された。いずれの血清においても、SFTSウイルス遺伝子が検出され、感染研からも同様の結果が報告された。

現段階では本疾患に対する確立された治療法はなく、対症療法のみであることから、野外の藪や

草むらに生息するマダニ類に咬まれないよう予防啓発をしていくことが重要であると考ええる。

6 . リケッチア感染症

つつが虫病及び日本紅斑熱を疑う検体が9名分、18検体 (それぞれ急性期及び回復期のペア血清) 搬入された。感染研での間接蛍光抗体法による抗体価 (IgM 及び IgG) の測定の結果、8名が日本紅斑熱と診断された。1名は、つつが虫病、日本紅斑熱ともに陰性であった。

7 . 無菌性髄膜炎

無菌性髄膜炎と診断された患者の検体は、7月から9月にかけて、県南保健所管内の医療機関から7名分、12検体 (咽頭ぬぐい液7検体、髄液5検体) が搬入された。いずれの患者も無菌性髄膜炎の典型的な症状である発熱、頭痛、髄膜炎を呈し、主治医より保育所等で流行が認められるとの情報提供があった。全ての検体についてCODEHOP VP1RT-snPCRによるEVsの遺伝子検索を実施した。

CODEHOP VP1RT-snPCR (図2) は、EVsを網羅的に検出できるよう設計されたプライマーを用いて逆転写反応と2回のPCRを行うことにより、EVsの粒子表面のタンパク質「VP1」をコードする遺伝子領域のDNA断片を合成する方法である。合成したDNAの配列をデータベースと照合することにより、ウイルスの型別同定が可能である。

同定を試みた結果、7名すべての検体から

Echovirus 30 (Echo30) が同定された。Echo30 が検 CV-A6 であったことが推察される。検出された

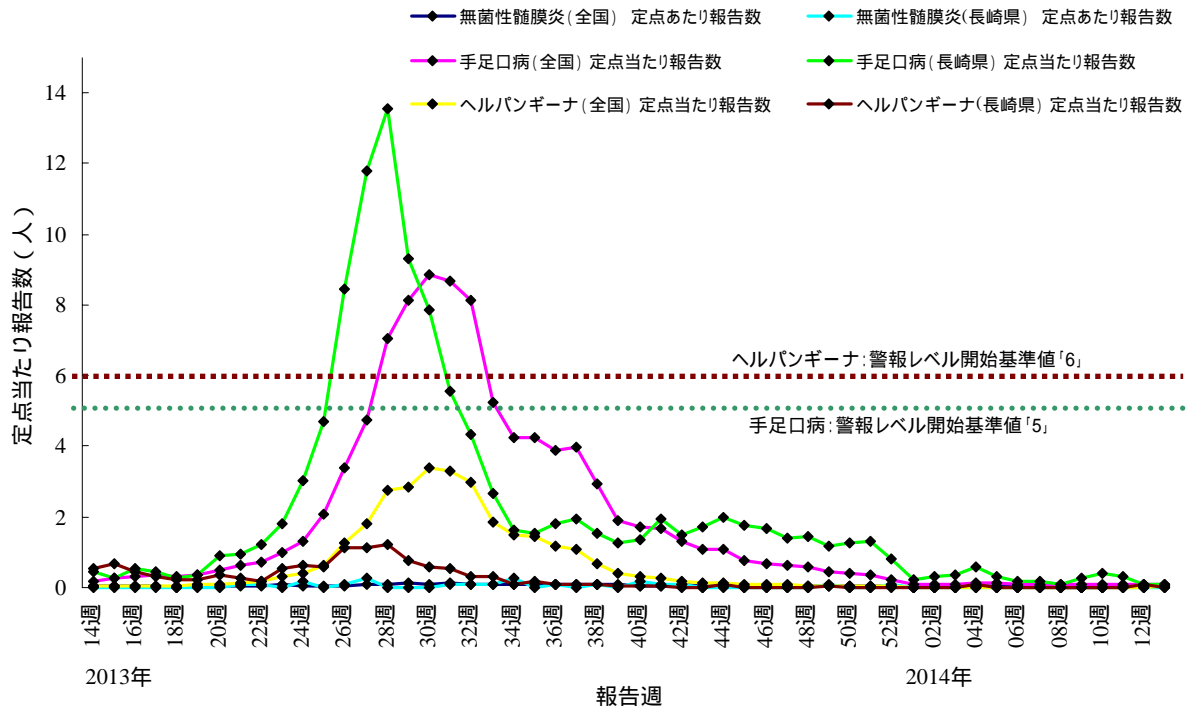


図3. 無菌性髄膜炎、手足口病、ヘルパンギーナの定点当たり報告数の推移 (2013年度)

出された7名の検体のうち、7月に採取された2名分は同一の塩基配列で2004年にマレーシアから報告された株と類似していた(相同性93%)。8月から9月に採取された5名の検体は、2008年、2009年に富山県の下水中に検出された株と類似していた(相同性95%)。以上の結果より、県南保健所管内において流行した無菌性髄膜炎の原因として、複数の系統のEcho30の関与が示唆された。

8. 手足口病

2013年度は、全国、長崎県いずれにおいても、手足口病が流行し、全国では、第30週の8.85人、長崎県では、第28週の13.57人をピークとし、警報基準値「5」を超える週が6週間続いた(図3)。

手足口病と診断された患者31名分、31検体(咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液)が搬入され、いずれの検体についてもCODEHOP VP1 RT-snPCRを用いたEVsの遺伝子検索を実施した。

31検体中、最多の23検体からCoxsackievirus A6 (CV-A6)が同定された。CV-A6遺伝子が検出された検体は、長崎市、佐世保市、県央、県北、県南、五島、対馬とほぼ県内全域から採取されており、長崎県内の手足口病の流行の主な原因ウイルスが

CV-A6 遺伝子の塩基配列のうち、ほとんどは同一の配列で、2009年に佐賀県の手足口病患者から検出された配列に類似していた(相同性95~96%)。

CV-A6の他に、Enterovirus71 (EV71)が4検体、CV-A9及びCV-A16が各1検体から検出された。

手足口病の症状の直接の原因とは考えにくいですが、ライノウイルスも1検体から検出された。

手足口病は、通常はCV-A16、CV-A10、EV71などのウイルスにより惹き起こされることが知られているが、2011年に全国的に手足口病が大流行した際の原因ウイルスは、ヘルパンギーナの原因ウイルスとして知られるCV-A6が主流であった。今年度も同様の傾向が認められた。

9. ヘルパンギーナ

2013年度は、全国、長崎県いずれにおいても、大きな流行は見られず、警報基準値を超える週はなかった(図3)。

ヘルパンギーナと診断された患者3名分、3検体(咽頭ぬぐい液)が搬入され、いずれの検体についてもCODEHOP VP1 RT-snPCRを用いたEVsの遺伝子検索を実施した。

3検体のうち2検体から、CV-A6が検出された。

手足口病と診断された患者由来の検体から最も多く検出されたもの同一の塩基配列であった。手足口病との鑑別が難しい症例もあるという医療機関からの情報提供もあった。

残り1検体からは、発疹等の症状の直接の原因とは考えにくい、ライノウイルスが検出された。

10. EVs 感染を疑う疾患

2013年度に佐賀県内で CV-B2 の垂直感染が疑われる新生児 EVs 感染症の重症例の報告が数件あった。この症例に関連して、当センターに EVs 感染疑いの新生児及びその母親の検体（それぞれ咽頭ぬぐい液、糞便、血清 2 件の計 4 検体）が搬入された。EVs の検索を実施したところ、新生児の咽頭ぬぐい液と血清1検体から CV-B2 が検出された。佐賀県の1症例と塩基配列が同一であった。

また、CV-B2 の県内での浸淫状況を確認するために、県内保健所に EVs 感染が疑われる上気道炎等の患者の検体収集を依頼し、搬入された「咽頭炎」3件、「上気道炎」1件、「感冒」2件、「気管支肺炎」2件、「ウイルス感染症疑い」2件について、EVs の検索を行った。

その結果、県北保健所管内の医療機関で採取された「咽頭炎」の検体から、佐賀県の1症例と同一の塩基配列をもつ CV-B2 の遺伝子が検出された。県全域に浸淫しているとは考え難いが、CV-B2 は夏風邪等の原因として県内に存在していることが推測された。今年度の症例を通して、周産期に本ウイルスに感染すると、胎児に移行し重篤な症状を引き起こすリスクがあることが分かった。今後感染予防の呼びかけを強化していく必要があると考えられる。

その他、「咽頭炎」、「感冒」の各1件から CV-A6、「気管支肺炎」、「ウイルス感染症疑い」の各1検体からヒトライノウイルスの遺伝子が検出された。残る10件から EVs の遺伝子は検出されなかった。

11. 急性出血性結膜炎

眼科を標榜する一医療機関で本疾患の患者数の増加が認められ、原因追求のために当センターに検査が依頼された。急性出血性結膜炎は主として、EV70 と CV-A24 変異株によって引き起こされるため、EVs の検索を試みたが、遺伝子は検出されなかった。

謝 辞

JEV IgM capture ELISA 用抗原を供与いただいた感染研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及び協力医療機関の

諸先生、検体の収集及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) 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)
- 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（2011年度）長崎県環境保健研究センター所報 57、104-110 (2011)
- 3) 北川 由美香 他：感染症サーベイランスにおけるウイルス分離（2012年度）長崎県環境保健研究センター所報 58、119-125 (2012)
- 4) 病原体検出マニュアル（国立感染症研究所）
- 5) 麻しん診断マニュアル第2版 平成20年7月（国立感染症研究所）
- 6) 風しん診断マニュアル第2版 平成24年（国立感染症研究所）
- 7) SFTSウイルス検出マニュアル 平成25年3月13日（厚生労働科学研究 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業「現在、国内で分離・同定できないウイルス性出血熱等の診断等の対応方法に関する研究」班）
- 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)
- 10) インフルエンザ診断マニュアル第2版 平成24年3月（感染研）