

佐賀県感染症発生动向調査事業におけるウイルス検出状況 (平成 20 年度、平成 21 年度)

微生物課 増本久人 平野敬之 吉武俊一 南 亮仁
江口正宏 船津丸貞幸 武田裕二 吉川信治

キーワード：感染症発生动向 ウイルス検索 PCR 法 遺伝子解析 ウイルス型別

1 はじめに

感染症発生动向調査事業における対象疾患は、それぞれ数種のウイルスに起因することが多く検出されるウイルス血清型の種類も多い。また、主要なウイルス型の検出も毎年変化している状況である。

本調査では病原体の検出情報をタイムリーに関係機関へ還元すると共に県内への感染の拡大防止を目的として行っている。今回、平成 20 年度および平成 21 年度の佐賀県感染症発生动向調査事業におけるウイルス検索を実施したので報告する。

2 材料と方法

1) 材 料

平成 20 年度は(表 1) 県内 9 病原体定点および定点外の医療機関から送付された患者 135 名から得られた鼻・咽頭ぬぐい液 92 検体、糞便 26 検体、髄液 10 検体、尿 2 検体、喀痰 1 検体、血清 4 検体などから病原体ウイルスの検索を行った。

平成 21 年度は(表 2) 県内 9 病原体定点と新型インフルエンザ発生に伴い 19 定点外医療機関から送付された患者 252 名から得られた鼻・咽頭ぬぐい液 228 検体、糞便 12 検体、髄液 11 検体、尿 1 検体などから病原体ウイルスの検索を行った。

2) 方 法

鼻・咽頭ぬぐい液、髄液、尿、喀痰、糞便などからのウイルス分離については、Vero、RD-18S、BGM、HeLa、MDCK の各培養細胞を用いて分離・同定を行った。更に、各臨床検体、分離検体からウイルス性呼吸器疾患やウイルス性下痢症を引き起こす病原体ウイルスなどの検出を目的として病原体検出マニュアル等に準じ各病原体ウイルスの検索を行った。QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)にて RNA 抽出を行い Dnase 処理後、RT 反応にて cDNA を合成し、検出目的のウイルス遺伝子に応じた標的プライマーを用いて各 PCR 法などを行った。

各 PCR 法にて得られた陽性産物は Mini Elute Gel Extraction Kit(QIAGEN)で精製し BigDye Terminator v1.1 Kit を用いてダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し遺伝子型別等の分子疫学的解析を行った。また、イムノクロマト法、LAMP 法等やインフルエンザウイルスについては赤血球凝集抑制試験(HI)も併用して検索した。インフルエンザ HI 試験結果の詳細については本所報を参照「佐賀県におけるインフルエンザの流行」。

3 結果と考察

1) 疾患別検体搬入状況

平成 20 年度に搬入(表 3)された 135 検体の主な疾患名は 9 区分に別けられた。インフルエンザ

が最も多く44件、次いで感染性胃腸炎の19件、その他18件などであった。月別の病原体搬入状況では12月～3月の冬季を中心として多く検出されるインフルエンザや感染性胃腸炎の原因ウイルスと5月の春季から夏期にかけて多く検出をみるヘルパンギーナ、手足口病、咽頭結膜熱などの原因ウイルス感染と流行により2峰性の検体搬入パターンが見られた。年間の月あたり平均搬入数は11.2検体であった。

平成21年度に搬入(表4)された252検体の主な疾患名は8区分に別けられた。平成21年度は世界中で新型インフルエンザウイルスAH1pdm型の流行拡大により、佐賀県でも6月に初発例を確認し、翌年の3月までインフルエンザ疑いの検体が最も多く209件であった。月別の検体搬入状況でも平成20年度と疾患別の搬入状況はまったく異なり、インフルエンザ疑いの検体が6月から3月まで連続して多く搬入された。年間の月あたり平均搬入数は21.0検体の搬入状況であった。

2) 月別ウイルス検出状況

平成20年度は(表5)検体135件から検出したウイルスは重複例を含め17種類で71件であった。その内訳は、インフルエンザウイルスが33件(46.5%)と最も多く、検出時期は主に冬季に多く検出した。

遺伝子型別ではインフルエンザウイルスの33件(46.5%)で季節性のAH1亜型13件、AH3亜型は9件とB型の7件は、通常のインフルエンザ流行シーズンある12月から3月の冬期間に検出した。

エンテロウイルス属とライノウイルスについては夏から秋にかけて発生し“かぜ”様の症状などを示すことで知られている。今回、検出したエンテロウイルス属など17件(23.9%)を検出し、その13件はコクサッキーAウイルスで4型6件、10型3件、16型3件、2型1件を検出した。その他の4件はエコーウイルス30型2件、9型1件と”鼻かぜ様症状を示し多数の血清型を持つ“ライノウイルス88型1件を検出した。

アデノウイルスは咽頭結膜熱(プール熱)の原因ウイルスとして知られ、例年、多く検出されている。本年度は主に発熱、咽頭炎、気道炎、結膜炎など様々な症状を示す3型8件、6型2件の合計10件(14.1%)を5月から8月の期間に検出した。

ノロウイルスは感染性胃腸炎症状の代表的な原因ウイルスで冬季の病原体ウイルスとして知られている。本年度は例年に比べ検出例が極めて少なく5件(7.0%)で12月にGII/4型4件、4月にGII/13型1件であった。その後の2月から3月にA群ロタウイルス4件(5.6%)を検出し、そのG血清型は国内で検出例の多いG血清3型4件を検出した。

重複型として4月にノロウイルスGI/4型とアデノウイルス6型の1件、5月にコクサッキーA群ウイルス4型とアデノウイルス6型の1件を検出した。

平成21年度は(表6)検体252件から検出したウイルスは19種類で171件と前年度に比べ、多い検出状況であった。その内訳は、新型インフルエンザウイルスAH1pdm型の国内感染例が5月に確認され、佐賀県内では6月に初検出して以降、7月から流行が拡大し、翌年の3月の間に新型および季節性インフルエンザウイルスの検出は141件と非常に多い状況であった。遺伝子型別ではAH1pdm型126件、季節性のAH3型2件、B型13件を検出し、AH1pdm型が検出ウイルスの約9割を占め、今シーズンの流行型であった。

次に、呼吸器系疾患の検出ウイルスではエンテロウイルス属14件を検出した。前年に比べ、ウイルス型がやや異なり、コクサッキーA群ウイルス5型2件、6型3件、9型1件とコクサッキーB群

ウイルス4型4件、エンテロウイルス71型3件、エンテロウイルス属で型不明1件など数種類が混在していた。その他、最近、小児科領域で報告されているライノウイルスを前年より検出し、平成21年度は6件を検出した。型別ではライノウイルス21型3件と29型、66型、85型の各1件であった。また、乳幼児の冬かぜの原因ウイルスで下気道炎症状を示すRSウイルスA型1件、流行時期が3月から7月で上気道炎の症状を示すヒトメタニューモウイルス（hMPV）2型2件を検出した。

アデノウイルスの検出数は例年になく減少傾向を示し、20年度に比べても少なく6月にアデノウイルス2型2件を検出するのみであった。

ノロウイルスは検出数が例年に比べ激減したシーズンであった。検出型はノロウイルスの主流型であるGII/4型3件、GI/8型1件を検出した。その後、2月にA群ロタウイルスG血清型3型1件を検出した。

3) 疾患別ウイルス検出状況

平成20年度は（表7）咽頭結膜熱疾患の検体は9件中8件からアデノウイルスを検出したが、例年に比べて少ない検出状況であった。今年度は眼疾患で流行性角結膜炎症状を示す原因ウイルスであるアデノウイルス3型8件のみであった。

無菌性髄膜炎は検体12件中、2件からウイルスを検出した。エコーウイルス30型であった。

手足口病の検体3件中、3件からウイルスを検出した。ウイルス型はコクサッキーA群ウイルス16型2件、他に上気道感染症状をみるアデノウイルス6型1件を検出した。

ヘルパンギーナ疾患の検体12件中、10件からウイルスが検出された。今回はコクサッキーA群ウイルス4型5件、10型3件、2型1件の他、コクサッキーA群ウイルス4型とアデノウイルス6型の重複型1件を検出した。

急性脳炎は10件の検体が搬入されたが、病原体ウイルスは検出できなかった。

麻疹は8件の検体が搬入されたが、病原体ウイルスの検出は確認できなかった。

インフルエンザ疾患は検体44件中、34件からウイルスを検出した。季節性のAH1亜型が13件とやや多く、AH3亜型が10件、B型10件とほぼ同等数の検出状況であった。

感染性胃腸炎の検体19件中、11件からウイルスを検出した。そのウイルス型はノロウイルスGII/4型で4件と最も多く、このシーズン中の流行型であった。他にGII/13型1件を検出した。ノロウイルス流行の終息後、A群ロタウイルスG血清3型4件を検出した。また、コクサッキーA群ウイルス4型1件、ノロウイルスGI/4型とアデノウイルス6型の重複型1件も検出した。

その他の検体18件中、3件からアデノウイルス6型1件、エンテロウイルス属のエコーウイルス9型1件、コクサッキーA群ウイルス16型1件を検出した。

平成21年度は（表8）咽頭結膜熱疾患の検体数は2件と前年度と比較すると少ない検出状況であった。その病原体ウイルスはアデノウイルス2型2件のみを検出した。

無菌性髄膜炎疾患の検体11件中、5件からウイルスを検出した。ウイルス型はコクサッキーB群ウイルス4型4件を検出した。また、ノロウイルスGI/8型1件の検出もあった。

手足口病の検体5件中、5件からウイルスを検出した。主に手足口病患者から多く検出されるエンテロウイルス71型3件、コクサッキーA群ウイルス6型2件を検出した。

ヘルパンギーナ疾患の検体2件中、1件からコクサッキーA群ウイルス6型を検出した。

流行性耳下腺炎は検体1件の検体搬入があったが、病原体ウイルスは確認できなかった。

インフルエンザは平成21年6月から新型インフルエンザウイルスAH1pdm型の感染者が多発したシーズンであった。インフルエンザ検体の209件中、150件からウイルスを検出した。最も多かった検出したウイルス型は新型インフルエンザウイルスAH1pdm型の126件と多く、その他は季節性インフルエンザウイルスB型13件、AH3亜型2件であった。また、一般に“鼻かぜ”ウイルスと呼ばれ上気道感染を示すライノウイルス6件で21型3件、29型1件、66型1件、85型1件を検出した。下気道疾患を示すRSウイルスA型1件、急性呼吸器感染として報告されているヒトメタニューモウイルス2型1件の他、エンテロウイルス属で亜型不明1件などをインフルエンザとして診断された検体から検出した。

感染性胃腸炎は検体5件中、4件からウイルスを検出した。検出ウイルスはノロウイルスGII/4型3件とA群ロタウイルスG血清3型1件を検出した。

その他として提出された検体17件中、4件からウイルス遺伝子が検出された。エンテロウイルス属のкокサッキーA群ウイルス5型2件、кокサッキーA群ウイルス9型1件で無菌性髄膜炎患者から分離・検出されるウイルスを認めた。また、ヒトメタニューモウイルス2型1件の検出も見られた。

4 まとめ

1) 感染症発生動向調査における検体搬入は平成20年度および21年度ともに鼻・咽頭ぬぐい液と糞便の検体が9割以上を占めていた。平成20年度は135検体中、71件からウイルスを検出し検出率52.6%であった。平成21年度は252検体中、171件を検出し検出率は67.9%と平成20年度より15%ほど高い検出率であった。これは平成21年(2009年)5月に新型インフルエンザウイルスAH1pdm型が国内で初検出され6月から全国各地で流行拡大を示した。県内でも多くの新型インフルエンザAH1pdm型の患者発生が見られ、インフルエンザ定点および定点外の医療機関の協力により数多くの疫学的な調査用検体が提供され増加したものであった。

2) 疾患別の検体搬入状況では、例年、冬季を中心としてインフルエンザウイルスやノロウイルスと春季から夏季を流行している無菌性髄膜炎や手足口病疾患の患者から採取された検体が病原体定点などから搬入されるパターンを示していた。しかし、平成21年度は夏季シーズンの6月下旬から翌年の3月頃まで新型インフルエンザウイルスAH1pdm感染疑いの検体が連日、搬入され異例なインフルエンザ流行シーズンであった。

3) 下痢症ウイルスの検出状況では、平成18年度～19年度はGII/4型が流行株でノロウイルスの検出の多い年度であった。平成20年度から21年度はノロウイルスの型別検出では非常に少ない状況を示したが、依然として、ノロウイルスの主な流行型であるGII/4型などには遺伝子に変異の報告があり、周期的な感染の流行も予想されることから、ノロウイルスの発生動向を監視し迅速な検出体制が必要である。また、毎年、A群ロタウイルスによる乳幼児への感染や集団施設における発生の予防対策も重要である。

4) 今回の調査期間にて新たに検出したウイルスでは、平成20年度から21年度にインフルエンザ疾患として診断された検体の中に、鼻かぜウイルスと呼ばれ、主に鼻炎など上気道感染を示すライノウイルス7件、感冒様症状から細気管支炎や肺炎などの下気道疾患を示すRSウイルス1件、2001年頃から検出されはじめたウイルスで軽い上気道炎から重篤な気管支炎や肺炎など急性呼吸器感染症を示し、小児などが罹患しやすいヒトメタニューモウイルス(hMPV)2件を検出した。これらの呼吸器系疾患のウイルスを検出する機会はなかったが、乳幼児や免疫機能の低下した高齢者への感染による報告がある。今後は、この呼吸器系病原ウイルスについても発生動向調査の対象ウイルス

として継続的な検査と監視が必要と思われる。

以上より、平成 20 年度および平成 21 年度の感染症発生動向調査について様々なウイルス病原体等の検索を行い分子疫学的な分析を行った。今後も健康危機管理における感染症予防対策の一環として病原体の発生動向調査を積極的に実施し、継続することが疫学的に重要と思われる。

謝 辞

本調査事業に御協力を頂きました定点医療機関の諸先生方及び関係各保健福祉事務所の皆様に深謝いたします。

参考文献

- 1) 金井興美, 山崎修道: 微生物検査必携、ウイルス・クラミジア・リケッチア検査、第 3 版、(財)日本公衆衛生協会、1987
- 2) 臨床とウイルス: ウイルス検査法 臨床と検査室のための手引き、23、1995
- 3) 地方衛生研究所全国協議会・国立感染症研究所: 病原体検査マニュアル、2003
- 4) 厚生労働省医薬食品局安全部監視安全課: ノロウイルスの検出法について、2003
- 5) 九州衛生環境技術協議会: ウイルス分科会共同マニュアル Ver.3、2003
- 6) 佐賀県衛生薬業センター所報 29、2006
- 7) 佐賀県衛生薬業センター所報 30、2008
- 8) 高尾信一 ほか: 本邦において初めて流行が確認された小児の human emtapneumovirus 感染症の臨床的、疫学的解析、感染症学雑誌、78(2)、129-137、2004

表1 検体別搬入状況（平成20年度）

	鼻・咽頭拭液	糞便	髄液	血清	喀痰	尿	計
検体数（件）	92	26	10	4	1	2	135
検出数（件）	59	12					71
検出率（%）	64.1	46.2					52.6

表2 検体別搬入状況（平成21年度）

	鼻・咽頭拭液	糞便	髄液	血清	喀痰	尿	計
検体数（件）	228	12	11			1	252
検出数（件）	162	8	1				171
検出率（%）	71.1	66.7	9.1				67.9

表3 疾患別検体搬入状況（平成20年度）

疾患名	検体数	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月
咽頭結膜熱	9		4	1		4							
手足口病	3		2	1									
ヘルパンギーナ	12		6	2			1	2		1			
急性脳炎	10		7		1								2
無菌性髄膜炎	12				7	1	3	1					
麻疹	8		2	3								2	1
インフルエンザ	44	1	4	1					2	6	12	9	9
感染性胃腸炎	19	3	2		1	1		1		5	1	1	4
その他	18		4	3	3	7	1						
合計	135	4	31	11	12	13	5	4	2	12	13	12	16

表4 疾患別検体搬入状況（平成21年度）

疾患名	検体数	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月
咽頭結膜熱	2			2									
手足口病	5			3	2								
ヘルパンギーナ	2			1		1							
流行性耳下腺炎	1			1									
無菌性髄膜炎	11		5	4									2
インフルエンザ	209	2	2	10	29	14	30	27	21	41	14	8	11
感染性胃腸炎	5											1	4
その他	17	3			3	1			3			6	1
合計	252	5	7	21	34	16	30	27	24	41	14	15	18

表5 月別ウイルス検出状況 (平成20年度)

検出ウイルス名		検出数	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月
アデノ	AD 3型	8		3	1		4							
	AD 6型	2		2										
エンテロ属	Echo 9型	1					1							
	Echo 30型	2				2								
	CA 2型	1						1						
	CA 4型	6		3	2	1								
	CA 10型	3							2		1			
ライノ	CA 16型	3		1	1		1							
	RN 88型	1								1				
インフル	IF AH1型	13									2	6	5	
	IF AH3型	10		1							3	5		1
	IF B型	10	1	1	1							7		
ノロ	NV GII/4型	4									4			
	NV GII/13型	1	1											
ロタ	ARV G3型	4											1	3
重複	NV GI/4型+AD 6型	1	1											
	CA 4型 + AD 6型	1		1										
合計(検出数)		71	3	12	5	3	6	1	2	1	10	18	6	4
検体数(月別)		135	4	31	11	12	13	5	4	2	12	13	12	16

AD:アデノウイルス Echo:エコーウイルス CA:コクサッキーAウイルス RN:ライノウイルス RS:RSウイルス IF:インフルエンザウイルス
 NV:ノロウイルス ARV:A群ロタウイルス 重複検出例:○V型/☆V型

表6 月別ウイルス検出状況 (平成21年度)

検出ウイルス名		検出数	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月
アデノ	AD 2型	2			2									
	EV 71型	3			3									
エンテロ属	CA 5型	2											2	
	CA 6型	3			1	2								
	CA 9型	1					1							
	CB 4型	4		4										
	亜型不明	1							1					
ライノ	RN 21型	3						1	1		1			
	RN 29型	1			1									
	RN 66型	1							1					
	RN 85型	1			1									
インフル	IF AH3型	2				1		1						
	IF B型	13	1	2	1									9
	IF AH1型pdm	126			2	16	12	15	16	16	29	12	7	1
RS	RS A型	1									1			
hMPV	A 2型	2	1				1							
ノロ	NV GI/8型	1												1
	NV GII/4型	3												3
ロタ	ARV G3型	1											1	
合計(検出数)		171	2	6	11	19	14	18	18	16	31	12	10	14
検体数(月別)		252	5	7	21	34	16	30	27	24	41	14	15	18

AD:アデノウイルス EV:エンテロウイルス CA:コクサッキーAウイルス RN:ライノウイルス RS:RSウイルス IF:インフルエンザウイルス
 NV:ノロウイルス ARV:A群ロタウイルス 重複検出例:○V型/☆V型

表7 疾患別ウイルス検出状況 (平成20年度)

ウイルス名	疾患名	咽頭結膜熱	無菌性髄膜炎	手足口病	ヘルパンギーナ	急性脳炎	麻しん	インフルエンザ	感染性胃腸炎	その他	合計
	検体数	9	12	3	12	10	8	44	19	18	135
	検出数	8	2	3	10			34	11	3	71
	検出率 (%)	88.9	16.7	100.0	83.3			77.3	57.9	16.7	52.6
アデノ	AD 3型	8									8
	AD 6型			1						1	2
エンテロ属	Echo 9型									1	1
	Echo 30型		2								2
	CA 2型				1						1
	CA 4型				5				1		6
	CA 10型				3						3
	CA 16型			2						1	3
ライノ	RN 88型							1			1
インフル	IF AH1型							13			13
	IF AH3型							10			10
	IF B型							10			10
ノロ	NV GII/4型								4		4
	NV GII/13型								1		1
ロタ	ARV G3型								4		4
重複	NV GI/4型+AD 6型								1		1
	CA 4型 + AD 6型				1						1

AD:アデノウイルス EV:エコーウイルス CA:コクサッキーAウイルス RN:ライノウイルス RS:RSウイルス
 IF:インフルエンザウイルス NV:ノロウイルス ARV:A群ロタウイルス 重複検出例:○○V型/☆☆V型

表8 疾患別ウイルス検出状況 (平成21年度)

ウイルス名	疾患名	咽頭結膜熱	無菌性髄膜炎	手足口病	ヘルパンギーナ	流行性耳下腺炎	急性脳炎	麻しん	インフルエンザ	感染性胃腸炎	その他	合計
	検体数	2	11	5	2	1			209	5	17	252
	検出数	2	5	5	1				150	4	4	171
	検出率 (%)	100.0	45.5	100.0	50.0				71.8	80.0	23.5	67.9
アデノ	AD 2型	2										2
エンテロ属	EV 71型			3								3
	CA 5型										2	2
	CA 6型			2	1							3
	CA 9型										1	1
	CB 4型		4									4
	亜型不明								1			1
ライノ	RN 21型								3			3
	RN 29型								1			1
	RN 66型								1			1
	RN 85型								1			1
インフル	IF AH3型								2			2
	IF B型								13			13
	IF AH1型pdm								126			126
RS	RS A型								1			1
hMPV	A 2型								1		1	2
ノロ	NV GI/8型		1									1
	NV GII/4型									3		3
ロタ	ARV G3型									1		1

AD:アデノウイルス EV:エコーウイルス CA:コクサッキーAウイルス RN:ライノウイルス RS:RSウイルス
 PV:ポリオウイルス IF:インフルエンザウイルス NV:ノロウイルス ARV:A群ロタウイルス
 重複検出例:○○V型/☆☆V型