

リアルタイム RT-PCR 法によるインフルエンザ隔離期間の検討

日本赤十字社 長崎原爆諫早病院¹⁾ 長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学分野²⁾
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染免疫³⁾

福島 喜代康¹⁾ 久保 亨¹⁾²⁾ 江原 尚美¹⁾ 中野 令伊司¹⁾
松竹 豊司¹⁾ 相良 俊則¹⁾ 森田 公一²⁾ 河野 茂³⁾

Evaluation of isolation periods of the patients infected with influenza virus using a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay

Kiyoyasu FUKUSHIMA¹⁾, Toru KUBO¹⁾²⁾, Naomi EHARA¹⁾, Reiji NAKANO¹⁾, Toyoshi MATSUTAKE¹⁾,
Toshinori SAGARA¹⁾, Kouichi MORITA²⁾ and Shigeru KOHNO³⁾

¹⁾ Japanese Red Cross Nagasaki Genbaku Isahaya Hospital,

²⁾ Department of Virology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University,

³⁾ Department of Molecular Microbiology and Immunology,
Nagasaki University Graduate School of Biochemical Sciences

Key words : リアルタイム RT-PCR 法、インフルエンザウイルス、隔離期間

はじめに

インフルエンザ AH1N1 (豚由来 AH1pdm2009) が 2009 年 4 月下旬にメキシコで発生し、世界的な流行が始まった。本邦では 2009 年 5 月初旬に新型インフルエンザ感染が確認され、夏季から大流行し、インフルエンザ感染による死亡例もみられたが、2011 年 4 月に終息した。一般臨床現場では、インフルエンザの診断に迅速簡易キット (キット) を用いるが、キット陰性であってもインフルエンザの臨床診断で治療をしている症例もある。

インフルエンザウイルス感染の確定診断には、遺伝子増幅検査 polymerase chain reaction (PCR) 法が行われている¹⁾。近年、高い特異性と高い増幅効率を持ち、温度変化を必要としない簡易な増幅法である新しい遺伝子増幅法 loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法²⁾ も行われている。Kubo らは、AH1pdm2009 の流行時に RT-LAMP 法による

遺伝子診断を行い、その有用性を報告した³⁾。

今回、一般臨床において遺伝子検査リアルタイム RT-PCR 検査を導入し、インフルエンザウイルス感染の確定診断を行い、抗インフルエンザ薬治療後のインフルエンザウイルス PCR 検査陰性による隔離期間について解析し検討した。

対象および方法

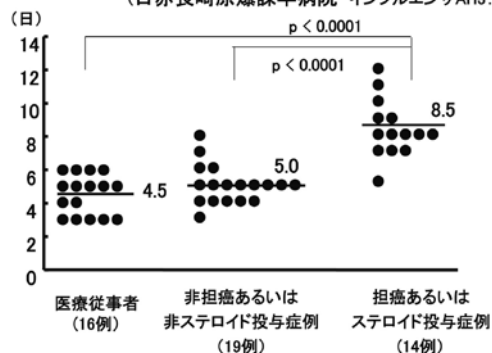
2012 年～2013 年に日本赤十字社長崎原爆諫早病院で外来および入院中に診断された A 型インフルエンザ患者でウイルスの遺伝子検査の同意が得られた 49 例 (患者 33 例、医療従事者 16 例) の鼻腔あるいは咽頭のぬぐい液を採取した。鼻腔あるいは咽頭ぬぐい液は綿棒で採取し、Hanks 液に保存した後、長崎大学熱帯医学研究所および日本赤十字社長崎原爆諫早病院において遺伝子検査を行った。咽頭ぬぐい液より RNA 抽出キット (QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAGEN) を用いて

RNA を抽出し、マルチプレックス TaqMan リアルタイム RT-PCR 法を用いて、A 型、B 型および C 型インフルエンザウイルスのスクリーニングを行った⁴⁾。A 型インフルエンザ陽性検体に関してはサブタイプの同定を我々の作成したインフルエンザサブタイプ特異的 RT-LAMP 法で行ない、さらに、リアルタイム RT-PCR 法を用いて Hanks 液中のインフルエンザウイルスの定量(コピー数 / μ L)も行った³⁾。担癌あるいはステロイド内服患者由来の A 型インフルエンザウイルスに関しては、ノイラミニダーゼ遺伝子をダイレクトシーケンシング法で解析し、薬剤耐性変異の有無を調べた。

結 果

1. 遺伝子検査で同定されたインフルエンザウイルスは全例 AH3 であり、インフルエンザ AH1pdm2009 は全く検出されなかった。
2. 医療従事者 16 名は抗インフルエンザ薬治療 6 日目に全例陰性であった(平均 4.5 日)。一方、患者 33 例中 15 例で抗インフルエンザ薬治療 7 日を越えており、担癌あるいはステロイド内服患者などの 14 例では、インフルエンザ治療後の PCR 陰性は平均 8.5 日(7~13 日)であった。それ以外の非担癌あるいは非ステロイド内服患者の 19 例は平均 5.0 日(3-8 日)であった(図 1)。

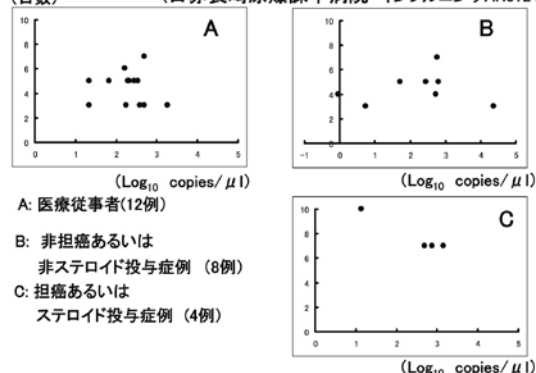
図 1. RT-PCR 法によるインフルエンザウイルス陰性化までの期間
(日赤長崎原爆諫早病院 インフルエンザ AH3: 49 例)



3. 医療従事者 12 例 (A 群)、非担癌あるいは非ステロイド内服患者の 8 例 (B 群)、担癌あるいはステロイド内服患者 4 例 (C 群) について、インフルエンザ診断時のウィル

ス量(コピー数 / μ L)を定量した(図 2)。

図 2. 発症時ウィルス量とインフルエンザウイルス陰性化までの期間
(日赤長崎原爆諫早病院 インフルエンザ AH3: 24 例)



各群の平均ウィルス量 (\log_{10} コピー数 / μ L) / PCR 陰性化の平均日数(日)は各々、A 群: 2.3/4.5、B 群: 2.2/4.5、C 群: 2.5/7.8 であった。

4. タミフル耐性に関する遺伝子解析も行ったが、タミフル耐性は認めなかった。

考 察

インフルエンザの診断は、通常、発熱、咳、咽頭痛、関節痛などの臨床症状と簡易迅速キットを用いて行われる。キット陰性でも重症例では、肺炎や脳炎、心筋炎を併発し死亡することもあるため、重症例ではインフルエンザウイルスの核酸増幅検査である PCR 法や LAMP 法が保険適応になっている。また、インフルエンザの治療は、ノイラミニダーゼ阻害薬で行われるが、効果判定に関しては、通常、臨床症状の改善でのみ判定されているにすぎず、インフルエンザウイルス自体の培養や遺伝子検査はなされていない。

インフルエンザ罹患後の対応として、2012 年 4 月に学校保健法にて、従来の基準であるインフルエンザに罹患し解熱後 2 日間から、インフルエンザ発症 5 日後かつ解熱 2 日間経過したら登校可能とされた。しかし、このインフルエンザ発症 5 日後の 5 日という期間の根拠については、明確にされていない。本研究において、リアルタイム RT-PCR による健康者 16 例のインフルエンザウイルス陰性化までの平均期間は 4.5 日であったことは、かなり妥当な日数と推察された。

さらに、インフルエンザの院内アウトブレイクにおいて抗インフルエンザ薬での治療後6日以上経過してもRT-PCRで陽性の症例は、担癌あるいはステロイド投与症例が多かった。この担癌あるいはステロイド投与症例ではPCR陰性化の平均日数は、8.5日と健常者の約2倍近くの日数を要したことは新しい知見で、これまでの報告はない。インフルエンザウイルス量の検討でも、医療従事者群と非担癌あるいは非ステロイド投与症例群の診断時のウイルス量と診断時のウイルス量に差は見られなかった。担癌あるいはステロイド投与症例群は診断時のウイルス量は若干多かったが、平均ウイルス陰性化は約2倍弱と延長していた。今回のインフルエンザウイルスのうち、PCR陰性化が6日以上要したウイルスについて、ノイラミニダーゼ耐性遺伝子変異の有無をシークエンサーで解析したが、ノイラミニダーゼ耐性遺伝子変異は認めなかった。このことは、ウイルス感染後の生体からの排除機構が患者自身の基礎疾患に依存している可能性が示唆された。

以上より、当院の院内感染対策委員会では、入院患者でのインフルエンザ感染の隔離解除では、PCR検査で陰性になった時と決めて院内感染対策をおこなっている。通常の施設では、PCR検査が速やかにかつ経過を見ることはできないため、入院患者でのインフルエンザ感染の隔離解除では、担癌あるいはステロイド投与症例など生体の免疫能が低下しているような症例では約8日にするなど、基礎疾患を十分考慮して慎重におこなうべきである。

インフルエンザ感染のPCRによる遺伝子診断の有用性が示唆された。また、インフルエンザ感染後の生体のウイルス排除機構については十分に解明されておらず、今後さらに詳細な検討が必要である。

文 献

- 1) 国立感染症研究所. インフルエンザ診断マニュアル (第2版). 平成24年3月
(http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/influenza_2003.pdf)
- 2) Notomi T, Okayama H, et al.: Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28 (12) :e63, 2000.
- 3) Kubo T, Agoh M, et al. : Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for detection of pandemic (H1N1) 2009 virus as a novel molecular method for diagnosis of pandemic influenza in resource-limited settings. *J Clin Microbiol.* 48 (3) : 728-35, 2010.
- 4) Enan KA, Nabeshima T, et al.: Survey of causative agents for acute respiratory infections among patients in Khartoum- State, Sudan, 2010-2011. *Virology J.* 10:312, 2013.