

6. インフルエンザの診断と治療 —臨床症例のウイルス排泄からの考察—

三田村 敬子¹⁾, 菅谷 憲夫²⁾

¹⁾ 永寿総合病院 小児科, ²⁾ 神奈川県警友会けいゆう病院 小児科

小児のインフルエンザの自然経過では, 発病前から発病後1~2週間までウイルスが分離される。迅速診断キットの判定には 10^3 pfu以上のウイルス量が必要であり, 検体のウイルス量を考慮した判断が必要である。抗インフルエンザ薬投与後, ウイルス量は徐々に減少するが, 小児では解熱時もおお半數以上の症例がウイルス分離陽性であり, 一定の率で耐性が生じている。感染対策のうえで, このようなウイルス排泄と薬剤耐性の評価が重要である。

はじめに

インフルエンザは毎年多くの患者が外来を受診し合併症による入院も少なくない。厚生労働省の調査では, A型とB型の混合流行であった2004/2005シーズンの抗原検出迅速診断キット(以下キット)の使用量は約1500万人分(出荷量約1700万人分, 残約120万人分), オセルタミビル使用は約1000万人分(出荷量1500万人分, 残420万人分)と推定される。流行のピークには一般病院での迅速診断キットの陽性率は例年ほぼ50%に達しており, 短期間に多くの患者に抗インフルエンザ薬が投与されることになる。このような状況におけるインフルエンザ患者のウイルス動態を知ることは, 診療や感染管理のうえで非常に重要である。

I. 自然経過での Viral Shedding

Frankらは, 出生時に登録した小児とその家族を対象に, 1975~1980年にわたって毎週ウイルス学的検索を行ったHouston Family Studyにおけるインフルエンザウイルスの分離状況を報告している^{1,2)}。4歳未満のA型インフル

エンザの症例では, 発病6日前から発病14日後までウイルス分離陽性例があり, 特に発病から1週間の分離陽性率は73%と高い。B型インフルエンザでは0.5~10歳までの症例で, やはり発病後2週間まで分離陽性例があり, 1週間までの分離陽性率は73%とA型と同じであったが, 2週目の分離率が37%でA型より高い値であった。

筆者らのA型インフルエンザ迅速検査キット(ディレクティジェンFluA, 日本ベクトン・ディッキンソン)の国内で最初の検討結果でも同様に, 1週間はキットでの陽性率が高く, 年少児の鼻咽頭吸引液では第10病日まで陽性例がみられた^{3,4)}。その後の検討では, 経時的な観察中のキットとウイルス分離の結果の一致率は高く, 小児では活性のあるウイルスが1週間前後は残っていることが少なくないと推測される。

II. 迅速診断キットと Viral Shedding

迅速診断キットは1999年にわが国に導入されて以来急速に普及し, 臨床では冬季の病原診断に欠かせない検査となった。2005/2006シーズンには, 13種類のキットが市場に出ているが, すべてA型とB型の鑑別可能であり, 検査所要時間は20分以内である⁵⁾。原理は, ウイルス核蛋白に対するモノクローナル抗体を使用した免疫法で, 最近では簡便なイムノクロマト法が主流になっている。感度と特異度は徐々に改善されてきており, 特異度はほぼ95%以上で, A型とB型の同時検出も報告されている^{6,7)}。

しかしながら, キットは, 一定量以上のウイルスを目視判定で検出する簡易検査であり, ある程度の率で偽陰性と偽陽性が発生するのは避けられない。その率は様々な条件

連絡先

〒110-8645 東京都台東区東上野2丁目23番16号
財団法人 ライフ・エクステンション研究所付属
永寿総合病院 小児科
TEL : 03-3833-8381
FAX : 03-3831-9488
E-mail : mitamura@eijuhp.com

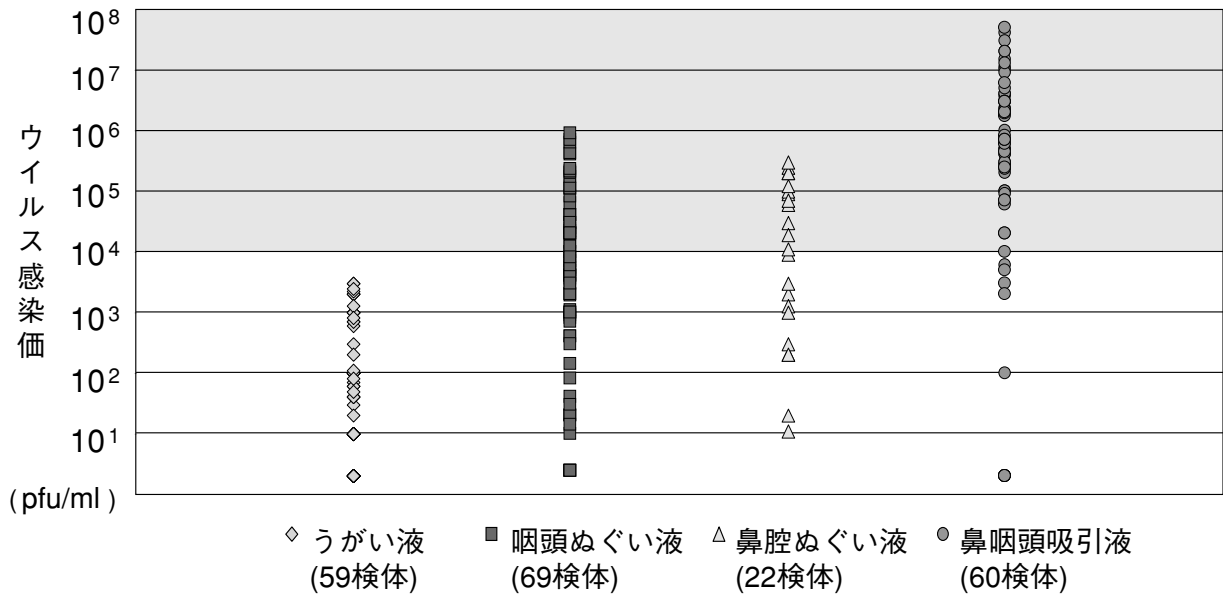


図1 検体別ウイルス感染価⁸⁾

インフルエンザ患者の初診時に採取した検体を、ウイルス輸送培地 3ml に希釈し、-80 度に保存した材料のウイルス感染価を測定した。臨床検体のウイルス感染価は広い範囲に分布し、感染価の低い検体では迅速診断キットは偽陰性となる。10⁴pfu/ml (10³pfu/100 μl) 以上のウイルス量の割合は、うがい液 0 %、咽頭ぬぐい液 42.0 %、鼻腔ぬぐい液 54.5 %、鼻咽頭吸引液 91.7 %と、鼻腔検体で高い。実際の検査時は希釈されていない直接検体を使用するので、陽性率はより高くなる。

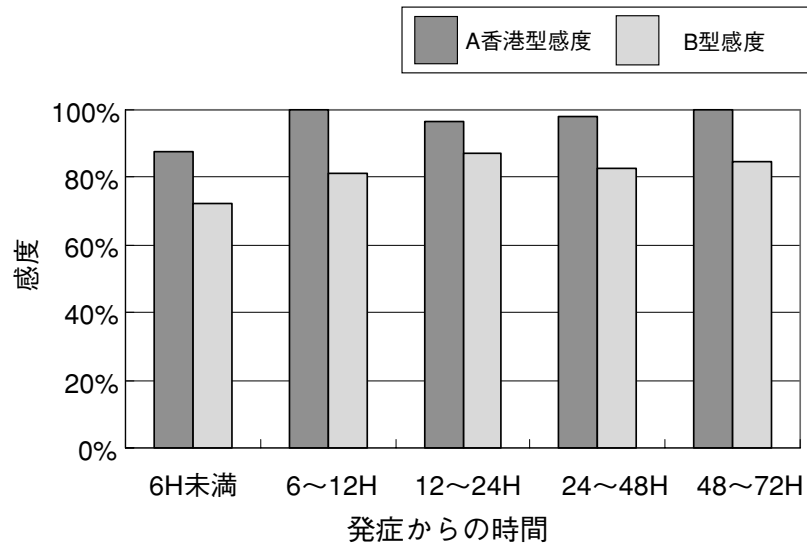


図2 A 香港型・B 型インフルエンザの発症からの時間による感度のちがい⁹⁾

小児と成人から採取した鼻腔ぬぐい液と鼻咽頭吸引液の迅速診断キット (エスプライン インフルエンザ A&B-N, 富士レビオ) の結果を、ウイルス分離と比較した。B 型および発症後 6 時間以内で感度が低い傾向を認める。

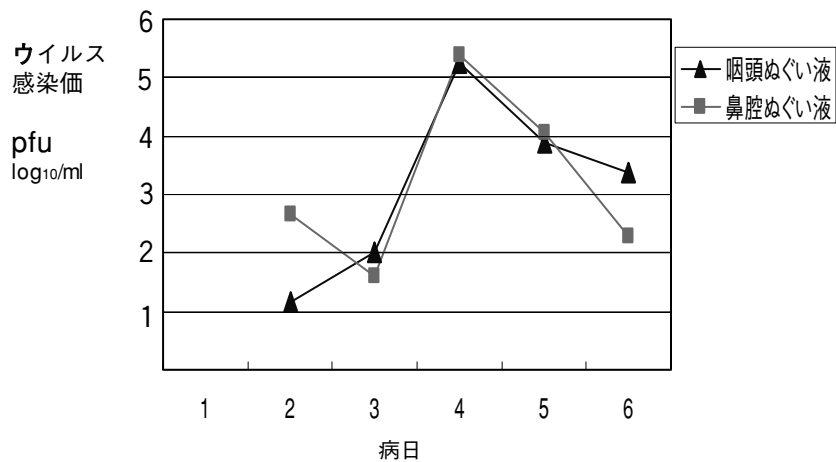


図3 発病初期にウイルス感染価が低値であったA香港型の乳児例²⁾

熱性痙攣で入院した10か月女児のウイルス感染価の推移を示した。抗インフルエンザ薬は投与されていない。A香港型が分離され、第2～3病日の咽頭ぬぐい液と鼻腔ぬぐい液のウイルス感染価は低値であった。

によって左右されることが観察されている。

ウイルス液希釈列100 μ lを検体として検査の検出限界を測定すると、ウイルス分離とnested RT-PCRはウイルス量が 10^1 pfu以下でも検出可能であるが、キットで検出に必要なウイルス量は $10^3 \sim 10^6$ pfuに分布している⁸⁾。2005年の11製品の検討では製品によって約200倍、同じ製品でもウイルス株によって約10倍までの差がみられている。

臨床検体での感度に影響する要素は、検体の採取部位、発症からの経過時間、ウイルスの型、年齢、発熱の程度、採取手法などである。一般に、成人は小児より検出率が低く、検出期間も短い。採取部位では、特に小児では鼻腔検体での検出率のほうが咽頭検体より高い。ウイルス分離陽性のインフルエンザ患者の採取部位別のウイルス感染価を測定すると、感染価は 10^8 pfuまでの広い範囲に分布しているが、鼻腔検体では感染価の高い検体の比率が高いことが検出率に影響していると考えられる(図1)⁸⁾。

また、発病初期6～12時間以内とB型は検出率が低い傾向を認める(図2)⁹⁾。インフルエンザ患者では、インフルエンザウイルスは1～3日で急速に増殖しピークに達する。病日の経過によってウイルス量の上昇が観察される症例があり、病初期の検出率が低い原因と考えられる(図3)^{2, 8, 10)}。

B型の検出率が低い理由として、B型の検出限界がA型より高いこと、B型インフルエンザ患者では採取されている検体のウイルス量が少ないこと、の双方の可能性が挙げられる。キットによってはB型のウイルス株の検出限界がわずかに高い傾向を認めるが⁶⁾、一方で、臨床検体のウイルス感染価でも、A型とB型の検出限界に差がない試薬があるからである(図4)¹¹⁾。

肺炎の症例では、上気道より下気道からの検体のウイルス量が多いことがある。小児の肺炎で、病初期のウイルス

量が、上気道検体では少なかった症例を提示した(図5)。喀痰での検出率が高い事は指摘されており¹²⁾、とくに上気道が乾燥しているといわれる高齢者の肺炎では、上気道よりも下気道からのほうが検出しやすい可能性があるが検討されていない。症例によって採取部位や時期を考えて検査したい。

Ⅲ. 抗インフルエンザ薬とViral Shedding

1) アマンタジン投与時のViral Shedding

アマンタジンを投与した1～2歳を中心とした小児入院例で、A香港型13例とAソ連型10例について経時的にウイルス分離を行った(図6)²⁾。アマンタジン5mg/kg/dayを3～5日間投与した。2歳以下の症例が多いため発熱の遷延する傾向を認めたが重症例は無かった。解熱後も検体が採取できた16例中、11例は解熱後もウイルス分離陽性であった。発熱が続いている期間に分離が陰性化したのは1例のみであった。3日間投与の8例中2例ではウイルス分離がいったん陰性となった後再び分離陽性になったことが観察された。最も長い期間陽性が確認されたのは第9病日まで陽性だった2例で、いずれも1歳の小児であった。6歳以上の4例のなかでも、3例は第6病日まで、1例は第5病日まで陽性であったが臨床経過が良好だったためその後の分離経過を追っていない。

プラーク法によるウイルス感染力価を測定した1例を提示した(図6, 症例24)²⁾。アマンタジン投与を5日間で終了した後、力価が再上昇しており、前述の再出現した2例とともに、抗インフルエンザ薬投与終了後のウイルス排泄増加の可能性を示唆している。

Shiraishiらはこのうち15例についてアマンタジンの作用部位であるM2の遺伝子分析を行い、耐性出現率は約

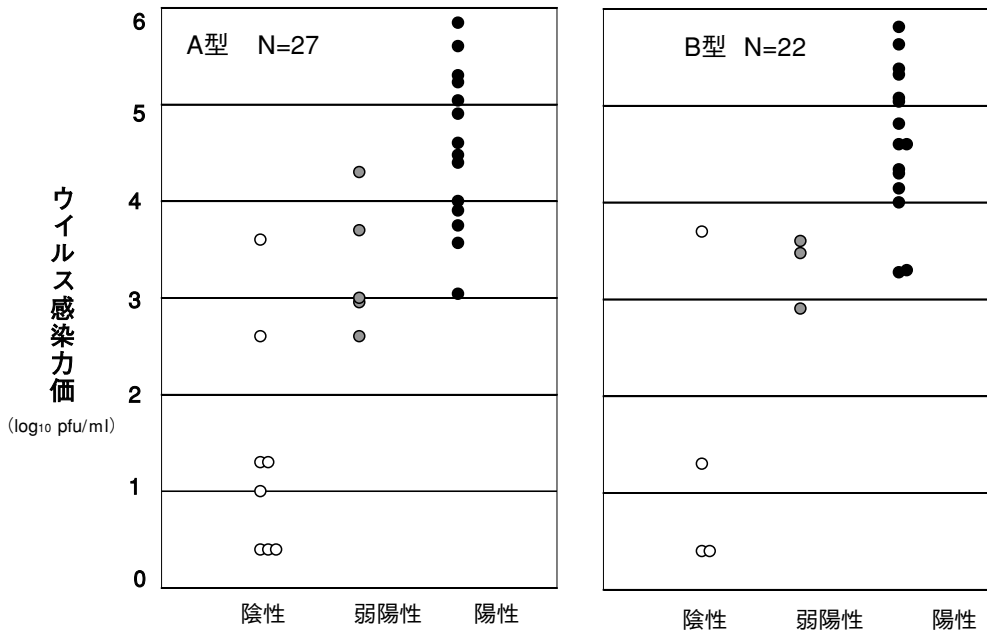


図4 咽頭ぬぐい液のウイルス感染力価とラピッドビュー インフルエンザ A/B 判定結果

文献 11 より作成した. ウイルス分離陽性検体 (ウイルス輸送培地に希釈) のウイルス感染価は 2.5pfu/ml 以上に分布していたが, ラピッドビュー インフルエンザ A/B (住友バイオメディカル) が陽性となったのは 1.1×10^3 pfu 以上の検体であった.

30%とされている従来の報告¹³⁾より高い頻度の80%(12/15)にアマンタジン耐性変異株の出現を認めた¹⁴⁾. 耐性株の出現時期が早い症例では投与2日後に出現していたが, 重症化した症例は無かった. 1検体から多種の耐性株が検出される, 耐性株と親株が同検体に混在する, アマンタジン投与終了後耐性株から再び親株に戻る, などの事柄が観察されており, 従来, 市中感染での耐性株検出率が多くないこととの関連が推測された. しかしアマンタジン耐性株は感染性と病原性が保たれたまま, 高率にしかも投与早期に出現するので, 十分な監視が必要である.

最近アマンタジン耐性株の検出率が世界的に増加し¹⁵⁾, 中国でのOTC薬との関連が推測されていたが, 2005/2006シーズン初期の米国でのアマンタジン耐性率が92%と非常に高いことが報告され¹⁶⁾, 2006年1月にCDCからアマンタジンの処方を抑えるように勧告が出されている¹⁷⁾.

2) オセルタミビル投与時の Viral Shedding

リン酸オセルタミビルの臨床効果については, 治療投与によって罹病期間の短縮が認められる¹⁸⁾. また, オセルタミビル治療例でのウイルス分離・定量の報告では, 非投与のコントロール群に比して, ウイルス分離率やウイルス量の減少が報告されている^{19,20)}.

筆者らの2001/2002シーズンの小児外来インフルエンザ患者の調査でも, オセルタミビル投与後解熱までの平均は1.7日で, A型とB型, 年齢, ワクチン接種の有無による差はみられなかった²¹⁾. しかし同シーズンの小児A型イン

フルエンザ入院患者では, 抗ウイルス薬非投与群に比べて全有熱日数は短いものの(3.5vs5.5日), 投与開始から解熱までの日数は2.6日と外来症例に比して長い傾向を認めた²²⁾. A型とB型の混合流行であった2004/2005シーズンの調査では, B型患者はA型患者に比して解熱までの期間が長く, 咽頭ぬぐい液でのウイルス排泄にも差がみられ, オセルタミビルの発熱でみた効果は, 流行株によって差がある可能性が示された(投稿中).

オセルタミビルの効果はまた, 投与開始時期によっても影響され, 発病から投与開始までの時間が短いほうが効果が高い²³⁾. 前述の, 病初期のウイルス量が発病1~2日はまだ増加傾向にあることに関連していると考えられる. Boivinらは, オセルタミビル投与開始が発病24時間以内(A群)と24~48時間(B群)のウイルス定量をreal-time PCRで行い, A群はB群に比して, 治療開始時のウイルス量は少なく, 治療開始48時間後のPCR陽性率も低かったとしている²⁴⁾.

オセルタミビル投与後のウイルス排泄を調べるために, オセルタミビルを投与した小児のA香港型(H3N2)の症例を対象に, 主に鼻咽頭検体を急性期から回復期に複数回採取し, プラーク法でウイルス感染価を測定した(図7)²⁾. 投与前の高力価から徐々にウイルス量が減少していくことが観察されるが, 投与開始後3~5日のウイルス分離陽性率は68%(36/53)で, 解熱した時点でもウイルス陽性率はまだ高く, 7歳以上で66%, 6歳以下で73%であった.

KisoらはA香港型の小児50例について, オセルタミビ

月日	咽頭ぬぐい液	鼻腔ぬぐい液	気管内吸引液
1/9	10	40	3500
1/10	25	100	1200
1/12	3000	85000	ND
1/13	ND	1500	ND

単位:pfu/ml



図5 インフルエンザ肺炎患児（11ヶ月）のウイルス排泄と胸部L線像

呼吸障害のため挿管されたA香港型の乳児例。発病初期の咽頭ぬぐい液と鼻腔ぬぐい液のウイルス感染価は低い、気管内吸引液の感染価は高かった。

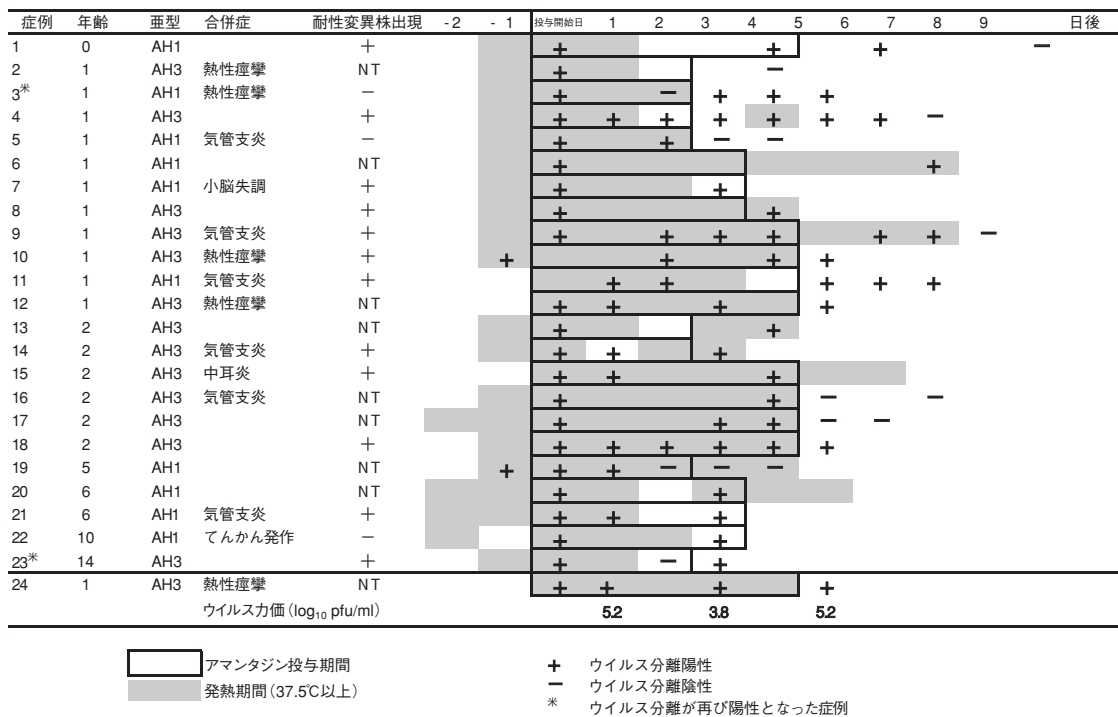


図6 アマンタジンを投与した小児A型インフルエンザ症例のウイルス分離の経過²⁾

ル投与開始前と回復期に採取した検体を分析し、回復期のウイルス分離陽性率は66% (33/50)で、18% (9/50)にNA耐性株の出現を認めた²⁵⁾。しかし、耐性株の出現はオセルタミビル開始4日後以降で、耐性株が検出された症例でも、発熱などの臨床経過の遷延や重症化はみられなかった。

IV. 感染対策と Viral Shedding

抗インフルエンザ薬は、予防効果も認められており、ノイラミニダーゼ阻害薬では、暴露後の予防投与および流行期の長期予防投与での予防効果は60～90%と報告されている^{18,26,27)}。新庄らは小児病棟におけるインフルエンザ発

生時に24時間以内のオセルタミビルの予防投与と患者の隔離によって流行の拡大を防止した事例を報告した²⁸⁾。このような感染対策を講じる場合、小児や免疫低下患者ではオセルタミビルの投与後もウイルス排泄が続いている症例があることを念頭におく必要がある²⁹⁾。しかし、鼻咽頭から10⁸pfu/mlまでの多量のウイルスが検出される発病時の速やかな対応が最も重要であることは言うまでもない。

おわりに

インフルエンザ患者では、抗インフルエンザ薬投与の有無にかかわらず、数日間ウイルスが検出される。その期間

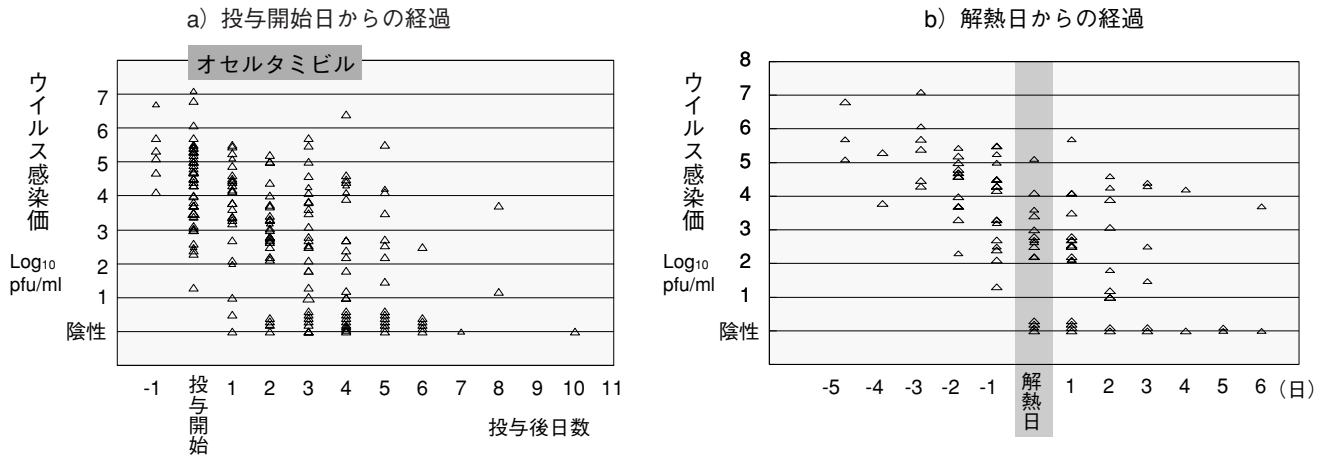


図7 オセルタミビルを投与した小児 A 香港型 62 例のウイルス感染価²⁾
 a) 投与開始日からの経過
 b) 解熱日からの経過

と量はおそらく、ウイルス株、免疫状態、年齢、病態、など様々な条件によって異なる。耐性を生じにくいとされたノイラミニダーゼ阻害薬でも、新型インフルエンザ発生時の大量使用を想定して、薬剤耐性の問題がクローズアップされている³⁰⁾。ウイルス排泄を質と量からとらえた評価がさらに必要である。

本稿の内容は以下の方々との共同研究である（敬称略）。

伊勢原協同病院小児科（木村和弘，込山 修，市川正孝），座間小児科診療所（山崎雅彦），けいゆう病院小児科（田村大輔），川崎市立川崎病院小児科（長 秀男），川崎市衛生研究所（渡邊寿美，今井光信），横浜市衛生研究所（川上千春），川崎市衛生研究所（清水英明），慶應大学小児科（新庄正宜），東京大学医科学研究所感染・免疫部門ウイルス感染分野（河岡義裕，白石京子，木曾真紀，畠山修司）

文 献

- 1) Frank AL, et al: Patterns of shedding of myxoviruses and paramyxoviruses in children J infect Dis 144: 433-41, 1981.
- 2) 三田村敬子，川上千春，清水英明，他：インフルエンザの Viral Shedding. インフルエンザ 7：125-130, 2006.
- 3) 三田村敬子 菅谷憲夫，蕪澤真理，高橋浩治，清水英明 平井芳江：小児科入院患者から見た A 香港型インフルエンザの流行と迅速診断. 感染症誌 72：883-889, 1998
- 4) 三田村敬子：酵素免疫法による A 型インフルエンザウイルスの迅速診断. 日本臨牀 58：2229-2233, 2000.
- 5) 三田村敬子：インフルエンザ迅速診断キット. 化学療法の領域 21：1751-1758, 2005.
- 6) 三田村敬子，山崎雅彦，市川正孝，木村和弘，川上

- 千春，清水英明，渡邊寿美，今井光信，新庄正宜，武内可尚，菅谷憲夫：イムノクロマトグラフィー法と酵素免疫法を組み合わせた原理によるインフルエンザ迅速検査キットの検討. 感染症誌 78：597-603, 2004.
- 7) 高尾 信一，原 三千丸，角田 修，島津 幸枝，桑山 勝，福田 伸治，宮崎佳都夫：迅速診断キットで A 型と B 型インフルエンザウイルスの重複感染が疑われ，RT-PCR 法とウイルス分離法で確定された 11 例について. 感染症誌 79：877-885, 2005.
- 8) 川上千春，市川正孝，三田村敬子：インフルエンザの迅速診断キットの現状. インフルエンザ 6：309-316, 2005.
- 9) 三田村敬子：インフルエンザ 今季の動向と診断，治療のポイント
「小児医療におけるインフルエンザの迅速診断と治療のポイント」
The medical test journal 代 951 号 P9 平成 17 年 12 月 11 日（日曜日），じほう
- 10) 川上千春，三田村敬子，木村和弘：迅速診断キットの基礎検討. インフルエンザ 4：317-324, 2003.
- 11) 川上千春，清水英明，渡邊寿美，七種美和子，宗村徹也，三田村敬子，菅谷憲夫，今井光信：イムノクロマトグラフィー法による A, B 型インフルエンザウイルス迅速診断キットの検討. 感染症誌 75：792-799, 2001.
- 12) Covalciuc KA, Webb KH, Carlson CA: Comparison of four clinical specimen types for detection of influenza A and B viruses by optical immunoassay (FLU OIA test) and cell culture methods. J Clin Microbiol 37:3971-4, 1997.
- 13) Crumacker C: Antiviral therapy. Fields virology. 4th ed. Knipe DM, Howley PM, eds. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 393-433, 2001.
- 14) Shiraishi K, Mitamura K, Sakai-Tagawa Y, Goto H, Sugaya N, Kawaoka Y: High frequency of resistant viruses harboring different mutations in amantadine-

- treated children with influenza. *J Infect Dis* 188:57-61, 2003.
- 15) Bright RA, Medina MJ, Xu X, Perez-Orozco G, Wallis TR, Davis XM, Povinelli L, Cox NJ, Klimov AI.: Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet*. 2005 366(9492):1175-1181, 2005.
 - 16) Bright RA, Shay DK, Shu B, Cox NJ, Klimov AI.: Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States. *JAMA* 295: 891-894, 2006.
 - 17) Centers for Disease Control and Prevention (CDC): High levels of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses and interim guidelines for use of antiviral agents--United States, 2005-06 influenza season. *MMWR* 55:44-6, 2006.
 - 18) Moscona A: Neuraminidase inhibitors for influenza. *N Engl J Med* 353:1363-1373, 2005.
 - 19) 柏木征三郎, 工藤翔二, 渡辺 彰, 吉村 功: インフルエンザウイルス感染症に対するリン酸オセルタミビルの有効性および安全性の検討—プラセボを対照とした第Ⅱ相二重盲検並行群間比較試験成績—*感染症誌* 74 : 1044-61, 2000.
 - 20) Whitley RJ, Hayden FG, Reisinger KS, Young N, Dutkowski R, Ipe D, Mills RG, Ward P.: Oral oseltamivir treatment of influenza in children. *Pediatr Infect Dis J* 20:127-3,2001.
 - 21) 三田村敬子, 菅谷憲夫, 葦澤真理, 新庄正宜, 武内可尚: 小児のA型およびB型インフルエンザに対する oseltamivir の効果. *感染症誌* 76 : 946-952, 2002.
 - 22) 三田村敬子, 菅谷憲夫: 小児のインフルエンザに対するオセルタミビルの使用経験. *インフルエンザ* 5 : 117-122, 2004.
 - 23) Aoki FY, Macleod MD, Paggiaro P, Carewicz O, El Sawy A, Wat C, Griffiths M, Waalberg E, Ward P; IMPACT Study Group. : Early administration of oral oseltamivir increases the benefits of influenza treatment. *J Antimicrob Chemother*. 51:123-9, 2003.
 - 24) Boivin G, Coulombe Z, Wat C: Quantification of the influenza virus load by real-time polymerase chain reaction in nasopharyngeal swabs of patients treated with oseltamivir. *J Infect Dis* 188:578-80, 2003.
 - 25) Kiso M, Mitamura K, Sakai-Tagawa Y, Shiraishi K, Chiharu K, Kimura K, Hayden FG, Sugaya Y: Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir : descriptive study. *Lancet* 364:759-65, 2004.
 - 26) Kirkbride HA, Watson J: Review of the use of neuraminidase inhibitors for prophylaxis of influenza. *Commun Dis Public Health*. 6:123-7, 2003.
 - 27) Harper SA, Fukuda K, Uyeki TM, Cox NJ, Bridges CB; Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Prevention and control of influenza Recommendations of the advisory committee on immunization practices. *MMWR* July 29,2005/54(RR08); 1-40
 - 28) 新庄正宜, 左藤清二, 菅谷憲夫, 三田村敬子, 武内可尚, 小崎健次郎, 高橋孝雄: 小児病棟における, インフルエンザ接触者へのオセルタミビル予防内服効果. *感染症誌* 78 : 262-269, 2004.
 - 29) Sato M, Hosoya M, Kato K, Suzuki H: Viral shedding in children with influenza virus infections treated with neuraminidase inhibitors. *Pediatr Infect Dis J*. 24:931-932, 2005.
 - 30) Moscona A: Oseltamivir Resistance-Disabling our influenza defenses. *NEJM* 353:2636-2667,2005.

Diagnosis and Treatment of influenza - Clinical Investigation on Viral Shedding in Children with Influenza

Keiko MITAMURA¹⁾, Norio SUGAYA²⁾

¹⁾ Department of Pediatrics, Eiju General Hospital

²⁾ Department of Pediatrics, Keiyu Hospital

Children with influenza usually shed viruses from the several days before onset of clinical symptoms, and viruses are isolated for one or two weeks after onset. Point-of-care rapid diagnostic tests are useful to guide use of antiviral agents, appears over 90% sensitivity and specificity for influenza A with nasopharyngeal specimens compared with cell culture. The detection limits of these test kits are 10³ pfu or over, so it is necessary to consider viral load in clinical specimens for diagnosis with these kits. Viral load are decreased after the start of antiviral agents, but influenza viruses are isolated in more than half of pediatric patients when fever get down, and resistant viruses are detected in some of these patients. It is very important for influenza control to investigate on viral shedding and resistant viruses.

