

# 畑岸悦子 論文内容の要旨

## 主 論 文

Establishment and Clinical Applications of a Portable System  
for Capturing Influenza Viruses Released through Coughing

咳とともに排出されるウイルスの機動性の高い回収システムの確立と  
インフルエンザ患者での実践

畑岸悦子, 岡本道子, 大宮卓, 矢野寿一, 堀亨, 齋藤若奈, 三木祐,  
鈴木康司, 齋藤玲子, 山本太郎, 庄司眞, 森崎義久, 阪田総一郎, 西村秀一

PLOS ONE • 9巻8号 e103560 2014年

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻  
主任指導教員：山本太郎教授

## 緒 言

インフルエンザの感染で咳は重要な役割を担っている。しかし患者の咳に含まれるウイルスの量については、十分な情報が得られていない。それは咳によって排出される生体粒子（咳粒子）を採取する良い方法がなかったためである。これまでいくつかの方法が報告されているが、それらは大がかりであったり、患者に大きな負担をかけるものであり、多くの患者から検体を採取するのに不適切であった。我々は、携行が容易で患者から簡単に咳粒子を採取できるシステムを開発し、さらに咳中のウイルスを定量する系を確立し、それにより 56 名の患者について咳とともに排出されるウイルスの定量に成功した。さらにそれらの結果から、ワクチン接種やノイラミニダーゼ (NA) 阻害薬による治療の有無などの患者背景と、咳中のウイルス量の関係を調べた。

## 方 法

咳回収装置は、吸引ポンプとゼラチン膜フィルターからなるエアサンプラーユニットに、咳をフィルターへと誘導するためのメガホンを接続して作製した。吸引された咳中のウイルスをゼラチン膜に捕捉させ、膜を速やかに培養液に溶解させ、溶液からウイルス RNA を抽出した後、ユニバーサルプライマーを用いた逆転写酵素反応によって得られた cDNA について、ウイルスの M1 遺伝子を標的とした定量的 PCR で遺伝子コピー数を測定した。さらに、プラーク法による感染性ウイルスの定量を試みた。

咳粒子は、吸引ポンプを稼働させた状態で患者に約 20 回咳をしてもらい回収した。

また、咳検体の採取に引き続き咽頭拭い液と唾液も採取し、それらのウイルス量を調べた。

## 結 果

模擬的にウイルス液をネブライザーで噴霧して求めた本回収系の回収率は約 50%であり、また既知量のウイルスをゼラチン膜溶液に加え、cDNA 合成までの全処理を行った後に回収された量から求めた定量系の回収率は約 20%であり、本システム全体の回収率は 10%程度であった。

この系を用い、2008 年 1 月から 2011 年 2 月にわたり、咽頭検体でウイルスが分離されたインフルエンザ A 型の 56 例の患者から、咳を回収した。その結果、41% (23/56) からウイルス遺伝子が検出され、それらの量は咳 1 回あたりにして定量系の検出限界である 10 から最大で 2240 遺伝子コピーまで、広範にわたっていた。また 3 例からはプラーク法で感染性を有するウイルスも検出された。

それらの結果を患者の背景別に比較し、傾向を調べた。ウイルス亜型および罹患シーズンの異なる患者間で、ウイルス検出率は類似していた。咳採取前に NA 阻害薬による治療が開始されていた患者と未治療の患者間でも、ウイルス検出の率と量に差はないようだった。一方、事前に季節性インフルエンザのワクチン接種を受けていた患者群と非接種の患者群では、ウイルス検出の率、量ともに、接種群で低い傾向を認めた。

また、症状としての咳を有する患者は、咳のない患者に比べてウイルス量が多い傾向を認めた。咳検体と同時に採取した咽頭拭い液と唾液中のウイルス量の相関を調べたところ、咳-咽頭、咳-唾液、いずれも弱い相関が認められた。一方で、咳のウイルス量は多いが咽頭や唾液のウイルス量は非常に少ない症例や、咽頭や唾液のウイルス量が非常に多いにもかかわらず咳検体でウイルスが検出されない例も多くみられた。

## 考 察

我々のシステムは、持ち運びや操作が容易で、ベッドサイドや外来診察室などで短時間に咳検体を採取するのに適している。今回、実際の患者で咳粒子を回収し、咳によって排出されるウイルスの定量に成功した。本システムの回収率が 10%程度であることから、実際に患者が排出するウイルスの量は今回の結果の 10 倍以上かもしれない。定量過程の中で、主に二つの濃縮過程でむしろ回収率が低下しており、今後の課題となった。ただ、それでも患者間のウイルス量の相対的な比較には、充分有用であろう。

解析結果によれば、ワクチン接種群は非接種群に比べてウイルスの検出率、量ともに明らかに低い傾向が認められ、ワクチンによって排出されるウイルス量が低下する可能性が示されたものの、今回は比較した例数が少なかったためか統計学的な有意差を示すには至らなかった。一方、NA 阻害薬による治療群と非治療群の間ではウイルスの検出率、量ともに差は認められなかったが、治療群は全例が 2008/2009 シーズンの A(H1N1) 亜型のウイルスの分離例であった。これらはオセルタミビル耐性株であったことが知られており、そのために両群間の差が出なかった可能性がある。これらについての確認のためには、更に大きな規模での研究が必要であろう。また、感染制御の観点からは、感染性ウイルスの量の情報がより重要であるが、ゼラチン膜での捕捉においてはウイルス活性の経時的低下があり、それが本法の限界と思われた。

以 上