

Q

透析患者のインフルエンザ予防接種

毎日200人前後にインフルエンザの予防接種をしているが、その中に腎不全で透析を受けている人が数名いる。担当医が判断して予防接種を行っているが、次回の透析は明日とか3日後など、様々である。免疫をできるだけ効果的につけるには、接種から次回の透析までの間隔をどのようにすればよいか。無関係とも思えず、翌日の透析も少し早すぎるようにも思えるが、いかがか。

(東京都 S)

A

インフルエンザワクチンを接種すると、接種部位で抗原の認識が起こり、認識された情報が免疫実行細胞に伝えられ抗体上昇が起こるので、インフルエンザワクチンによる抗体反応に透析の影響は受けないと考えられる

現在、我が国で使用されている季節性インフルエンザワクチンは、インフルエンザウイルス全粒子を構成するエンベロープをエーテル処理にて取り除いた後、インフルエンザウイルスの構造蛋白であるヘマグルチニン(HA)を抽出して作成されており、HAワクチンと呼ばれている。また、インフルエンザウイルス粒子構造が保たれていないことから、スプリットワクチン(ウイルス粒子が壊れたワクチン)とも呼ばれている。我が国の季節性インフルエンザワクチンは、不活化ワクチンである。

免疫に関与する細胞群には、抗原提示細胞、免疫未熟細胞、免疫記憶細胞、免疫実行細胞がある。接種されたワクチン抗原を認識し、その情報を免疫未熟細胞に伝え、免疫未熟細胞を成熟させるのが抗原提示細胞であり、免疫未熟細胞が成熟したのが免疫記憶細胞である。免疫記憶細胞は免疫実行細胞を誘導し、特異抗体やキラーT細胞を産生させる。免疫記憶細胞や免疫実行細胞を誘導する過程を「プライミング」と呼び、免疫実行細胞の数を増加させ抗体の量やキラーT細胞の数を増加させることを「ブースティング」と呼ん

でいる。なお、キラーT細胞は生きたウイルスでしか誘導できない。

多くの不活化ワクチンでは、免疫記憶細胞が誘導されていない人には3~8週間隔で2回以上接種して免疫をプライミングし、6カ月後以降に1回接種して免疫をブースティングする。一度、免疫記憶細胞が誘導されていると、プライミング後6カ月以降ならばいつでもブースティングは可能である。また、1回のブースティングにより増幅された免疫は、3~8週後に2回目を接種してもさらなる免疫の増幅は認められない。1回のブースティングで免疫を高めるためには、ブースティングする抗原量を増加させる必要がある。

以上の不活化ワクチンの免疫理論をインフルエンザワクチンに当てはめると、インフルエンザワクチンによる免疫反応は接種局所で起こり、認識された免疫情報はリンパ濾胞内の免疫記憶細胞および免疫実行細胞に伝えられ、抗体価が上昇する。なお、インフルエンザワクチンにより誘導された抗体価は半年で1/2に低下すること、多くの年ではインフルエンザウイルスの変異のために、インフルエンザワクチンに使用される3種類のワクチン

株のいずれかが変更されるため、毎年のインフルエンザワクチン接種が勧められている。

さて、ご質問の件については、慢性腎不全で人工透析を受けている人は、糖尿病の人や慢性閉塞性肺疾患の人と同様に慢性の基礎疾患を持ち、インフルエンザに罹患するとインフルエンザだけでなく、基礎疾患も一時的に悪化するリスクが高い人であり、毎年のインフルエンザワクチンが勧められている。ご質問の主旨は、ワクチンで接種した抗原や認識した免疫情報が人工透析により透析されてしまい、免疫応答が十分に起こらないのでは、という危惧と解釈される。

前述したように、インフルエンザワクチンによる免疫認識は接種局所で起こり、ただちに免疫記憶細胞と免疫実行細胞に伝えられることから、インフルエンザワクチンは接種から透析までの期間に関係なく接種が可能と考

えられる。また、産生された抗体は人工透析により濾過されないため、抗体価の半減期は基礎疾患がない人と同等である。

なお、慢性腎不全により人工透析を受けている人は基礎疾患により、高齢の腎不全の人では年齢的な要素も加味して免疫応答が低下しているため、インフルエンザワクチン後の抗体反応は免疫健常者よりも低下している。免疫反応が低下している人に対しては、1シーズンに2回接種するよりも、1回に接種する抗原量を増加させるほうが効果的な免疫応答が期待できる。実際、米国では成人で用いる4倍量の抗原を含む高齢者向けの高用量インフルエンザワクチンが市販されている。

▶ 回 答

国立病院機構三重病院院長
庵原俊昭

学 術

マルチプレックスPCRを用いた 呼吸器感染症ウイルスの検討

すずかこどもクリニック 渡 辺 正 博
京都市伏見保健センター 伊 藤 正 寛
国立病院機構三重病院 庵 原 俊 昭

はじめに

呼吸器感染症を引き起こすウイルスは110種類以上の血清型を有するライノウイルス (RV) が多く、その他にコロナウイルス (CoV)、パラインフルエンザウイルス (PIV)、インフルエンザウイルス、Respiratory Syncytial Virus (RSV) などがある。さらに近年では、ヒトメタニューモウイルス (MPV)、CoV-NL63、CoV-HKU1、ヒトボカウイルス (BoV) など新たに発見されたウイルスもあり、多くのウイルスが呼吸器感染症に関与していることが明らかになってきた¹⁾。呼吸器感染ウイルスの診断は従来から組織培養を用いたウイルス分離と抗原検出が行われてきたが、ウイルス分離は時間がかかること、抗原検出は感度が低いことが問題であった。また、BoVのようにウイルス分離法が確立されていないものもある。しかし、最近ではreverse transcription-polymerase chain reaction (RT-

PCR) 法やreal-time RT-PCR法などの遺伝子学的検査手法が発達し病因解明に寄与している²⁾。さらにこれらの検査はマルチプレックス化して多様な呼吸器系ウイルスへの対応が試みられている^{3,4)}。

今回、15種類の呼吸器系ウイルスを検出できるマルチプレックスPCRを用い、夏季の小児呼吸器感染症でのウイルス検出を試みたので報告する。

対象と方法

1. 対象

2010年7月から8月までの間に、すずかこどもクリニックを受診した7歳未満の発熱を伴う上気道感染患者である。咽頭結膜熱、ヘルパンギーナ、手足口病など臨床診断が容易なものは除いた。これらの患者から鼻腔吸引液を採取し生理食塩水2 mlで希釈した。

表1 Seeplex®RV15 ACE Detection

プライマーセットA	増幅サイズ (bp)
Internal control	850
Human adenovirus	534
Human coronavirus 229E/NL63	375
Human parainfluenza virus 2	268
Human parainfluenza virus 3	188
Human parainfluenza virus 1	139
プライマーセットB	増幅サイズ (bp)
Internal control	850
Human coronavirus OC43	578
Human rhinovirus A/B/C	394
Human respiratory syncytial virus A	273
Influenza A virus	206
Human respiratory syncytial virus B	143
プライマーセットC	増幅サイズ (bp)
Internal control	850
Human bocavirus 1/2/3/4	579
Influenza B virus	455
Human metapneumovirus	351
Human parainfluenza virus 4	249
Human enterovirus	194

表2 ウイルス検出有無での比較

ウイルス検出	あり	なし
人数	37人	10人
性比 男/女	1.1	1.5
年齢 mean ± SD	3.5 ± 1.4歳	4.4 ± 1.2歳
体温 median	39.0°C	38.9°C
咳	35.1%	0.0%*
鼻水	43.2%	20.0%
下痢	2.7%	10.0%
嘔吐	10.6%	10.0%
発熱のみ	37.8%	70.0%

*p<0.05

2. 核酸 (RNA/DNA) の抽出

検体200 μ lから核酸を抽出したQIAamp Min Elute Virus Spin Kit (QIAGEN) を用い、最終的に60 μ lのelution buffer中に核酸を抽出した。

3. マルチプレックスPCR

RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis kits (Fermentas) を用いてcDNAを合成し、マルチプレックスPCRはSeeplex® RV15 ACE Detection (Seegene) を使用した。これは3種類のプライマーセットで15種類のウイルスを増幅できる (表1)。

4. 検出

増幅されたPCR産物は従来のアガロースゲル電気泳動法ではなく、マイクロチップ電気泳動装置 MCE®-202 MultiNa (Shimadzu) を用いて検出した。

結果

対象は47人 (男25人、女22人) で平均年齢3.7 ± 1.4歳、87.7%が保育園などの集団生活をしてきた。臨床症状では発熱のみが44.7%で、受診前の最高体温は中央値で39.0°Cであった。受診時の咳、鼻水、嘔吐、下痢の頻度はそれぞれ、27.7%、38.3%、10.6%、4.3%であった。37.5°C以上の発熱を認めてから検体採取までの時間は中央値で12.5時間 (範囲0.1-94.1時間) であった。

47人中37人 (78.7%) に1種類以上のウイルスが検出され、ウイルスの検出の有無で年齢及び性比に有意差はなく、臨床症状ではウイルスを検出しなかった群では発熱のみの症状である傾向があり、咳の頻度は有意に低かった (表2)。37人から検出されたウイルスはサブタイプの別も含めて9種類、51件であった。またウイルスを検出した37人中12人 (32.4%) で2種類あるいは3種類のウイルスが同時に検出され、ウイルス別の重複感染率ではエンテロウイルス (EV)

表3 検出されたウイルスと重複感染率

検出ウイルス	検出数 (%) ^{a)}	重複感染数 (%)	重複感染ウイルス
EV	15 (31.9)	9 (60.0)	RV (6)、BoV (4)
RV	12 (25.5)	8 (66.7)	EV (6)、AdV (2)
PIV-1	6 (12.8)	0	
PIV-2	1 (2.1)	0	
PIV-3	2 (4.3)	1 (10.0) ^{b)}	RV (1)
PIV-4	1 (2.1)	0	
AdV	8 (17.0)	2 (25.5)	RV (2)、EV (1)
BoV	5 (10.6)	5 (100)	EV (4)、RV (1)、CoV-OC43 (1)
CoV-OC43	1 (2.1)	1 (100)	BoV (1)
Negative	10 (21.3)		

a) 全検体47に対する割合

b) サブタイプをまとめた割合

を検出した15人中9人(60.0%)で他のウイルスを検出し、同様にライノウイルス(RV)では66.7%、パラインフルエンザウイルス全体(PIVs)では10.0%、アデノウイルス(AdV)では25.5%、ボカウイルス(BoV)では100%だった(表3)。重複感染を認めた12人においてEVとRVの重複検出が最も多く、次いでEVとBoVの重複であった(表4)。また2検体において3種類のウイルスが検出された。

症例の転帰では、37人が経過観察のみで軽快し、3人に抗菌薬投与、3人に輸液を行い、4人は経過不明だった。抗菌薬を投与した症例は伝染性膿痂疹合併が2例でいずれもPIV-1が検出され、急性中耳炎の合併が1例でRVが検出された。輸液を行った症例は嘔吐下痢、喘息発作を伴った症例でPIV-1が、多型紅斑を伴い6日間発熱が続き全身状態不良であった症例でAdVが検出された。咳が増悪し8日間発熱が続いた症例ではウイルスは検出されなかった。

考 察

夏季に見られる小児の熱性疾患には、咽頭結膜熱、ヘルパンギーナ、手足口病などがあり、これらの疾患は臨床所見から診断が容易である。

表4 重複感染症例

No.	性	年齢	検出ウイルス		
1	女	2.0	EV	RV	BoV
2	女	4.2	EV	RV	AdV
3	女	1.7	EV	RV	
4	男	3.4	EV	RV	
5	男	3.7	EV	RV	
6	男	5.4	EV	RV	
7	男	1.7	EV	BoV	
8	男	2.0	EV	BoV	
9	女	4.7	EV	BoV	
10	男	2.0	RV	AdV	
11	女	3.2	RV	PIV-3	
12	男	3.1	BoV	CoV-OC43	

これら以外の発熱を主とする疾患については、いわゆる“夏風邪”と診断されていることが多い。今回、この“夏風邪”について15種類の呼吸器系ウイルスを検索できるマルチプレックスPCRを用いて検討した。その結果47人中37人(78.7%)に1種類以上のウイルスを検出できた。検出されたウイルスは、夏季に流行するEVが最も多く⁵⁾、次いでRV、PIV、AdVが検出された。一方、夏季には流行が小さいCoVは1検体のみで、同様にRSVとMPVは検出されなかった⁶⁻⁸⁾。

15種類のウイルスを検索できるマルチプレックスPCRを用いても10人ではウイルスを検出できず、これらは検査感度の問題か、未知のウイルスもしくはプライマーセットに入っていないC型インフルエンザの可能性もある。C型インフルエンザは通年性に呼吸器感染症において検出されているが疫学や症状についてはまだ不明なことが多い⁹⁾。また、ウイルス以外にも百日咳、マイコプラズマ、クラミジアなどの細菌感染の可能性も考えられるが、10例中経過不明の1例を除き抗菌薬の投与なく改善している。しかし、咳の増悪と8日間発熱が持続し、抗菌薬投与せず治癒したが細菌感染を否定できないと思われた症例もあった。

ウイルスが検出された37人中12人(32%)で複数のウイルスが同時に検出され、最も多い組合せはRVとEVで、12人中6人で認めた。ウイルス別に重複感染率を見るとBoVを検出した場合100%、RVを検出した場合66.7%と高率に他のウイルスを検出した。他の報告でもBoVの重複感染率は40~83%で¹⁰⁻¹²⁾、またBoVは健康小児でも5%に検出され、呼吸器感染症では14日以上検出される場合もあり持続感染も示唆されている¹³⁾。同様にRVも重複感染率は40~57%で¹⁴⁻¹⁵⁾、健康小児でも22%に検出され、呼吸器感染症においては前後約100日間検出されることがあると報告されている¹⁶⁾。これらの報告はすべてウイルス遺伝子のみを検出であり活性化のあるウイルスの証明はされておらず感染と云って良いか疑問がある。

今回、重複感染で重症化する傾向はなかった。重複感染の場合ウイルス量の多い方が臨床症状に関与していると考えられるが、ウイルス遺伝子量について検討した報告ではインフルエンザ様症状のある場合と無症状の場合でRVの遺伝子量に差はなかったとされている¹⁷⁾。また、インフルエンザの発症初期にはウイルス遺伝子量が少ないと報告もあり¹⁸⁾、ウイルス遺伝子量の

多寡で臨床症状を説明できないかもしれない。このように上気道には無症状でも呼吸器系ウイルスが存在することがあり、複数同時に検出されることがわかってきて、従来から言われたウイルスは常在しない、干渉作用のため複数のウイルスは同時感染しないという常識は変わってきたと考えられる。

経過観察し得た43人中、抗菌薬を投与したのは伝染性膿痂疹を合併した2例と急性中耳炎の悪化を認めた1例のみで残りは抗菌薬の投与なく治癒した。咽頭結膜熱やヘルパンギーナのように明らかな所見があり、ウイルス性疾患と診断できるものには抗菌薬を投与しない判断をし易いが、それ以外の“夏風邪”には診断の不確実性、社会文化的、経済的圧力、医療過誤訴訟の懸念と抗生物質への保護者の期待から抗菌薬を処方する医師が多い¹⁹⁾。しかし、上気道炎の90%以上はウイルス性で、今回の検討でも約8割でウイルスを証明でき原則抗菌薬投与なしで経過観察可能であった。また上気道炎に対する抗菌薬投与は予後も合併症の有無も改善しないとされている²⁰⁾ことから、耐性菌の増加予防のためにも抗菌薬は投与すべきではない。

ウイルスの遺伝子学的検査手法の発達で、従来の方法に比べ熟練した技術を必要とせずに簡便にウイルスを同定できるようになり、外来で見られる軽症疾患においてもウイルス学的知見が増えてきた。その一方でウイルス遺伝子の存在や複数検出の臨床的意義について不明な点も多く出てきており、今後も詳細な臨床所見とウイルス学的検査を両立させ更に検討する必要がある。

文 献

- 1) Carman WF, Mahony JB: The pathogens. *J Clin Virol.* 2007 Nov; 40 Suppl 1: S5-S10.
- 2) Fox JD: Nucleic acid amplification tests for detection of respiratory virus. *J Clin*

- Viol. 2007 Nov; 40 Suppl 1: S15-S23.
- 3) Kim SR, Ki CS, Lee NY.: Rapid detection and identification of 12 respiratory viruses using a dual priming oligonucleotide system-based multiplex PCR assay. *J Virol Methods*. 2009 Mar;156 (1-2): 111-6.
 - 4) Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE.: Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev*. 2000 Oct; 13 (4): 559-70.
 - 5) Jacques J, Moret H, Minette D, Lévêque N, Jovenin N, Deslée G, Lebargy F, Motte J, Andréoletti L.: Epidemiological, molecular, and clinical features of enterovirus respiratory infections in French children between 1999 and 2005. *J Clin Microbiol*. 2008 Jan; 46 (1): 206-13.
 - 6) Gaunt ER, Hardie A, Claas EC, Simmonds P, Templeton KE.: Epidemiology and clinical presentations of the four human coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 detected over 3 years using a novel multiplex real-time PCR method. *J Clin Microbiol*. 2010 Aug; 48 (8): 2940-7.
 - 7) van den Hoogen BG, van Doornum GJ, Fockens JC, Cornelissen JJ, Beyer WE, de Groot R, Osterhaus AD and Fouchier RA: Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients; *J. Infect. Dis*. 2003 188 1571-1577
 - 8) Brandenburg AH, Neijens HJ, Osterhaus AD.: Pathogenesis of RSV lower respiratory tract infection: implications for vaccine development. *Vaccine*. 2001 Apr 6; 19 (20-22): 2769-82.
 - 9) Moriuchi, H., N. Katsushima, H. Nishimura, K. Nakamura, and Y. Numazaki.: Community-acquired influenza C virus infection in children. *J Pediatr*. 1991 Feb; 118 (2): 235-8.
 - 10) Neske, F., K. Blessing, F. Tollmann, J. Schubert, A. Rethwilm, H. W. Kreth, and B. Weissbrich: Real-time PCR for diagnosis of human bocavirus infections and phylogenetic analysis. *J Clin Microbiol*. 2007 Jul; 45 (7): 2116-22.
 - 11) Fry, A. M., X. Lu, M. Chittaganpitch, T. Peret, J. Fischer, S. F. Dowell, L. J. Anderson, D. Erdman, and S. J. Olsen: Human bocavirus: a novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring hospitalization in Thailand. *J Infect Dis*. 2007 Apr 1; 195 (7): 1038-45.
 - 12) Sloots, T. P., P. McErlean, D. J. Speicher, K. E. Arden, M. D. Nissen, and I. M. Mackay: Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children. *J Clin Virol*. 2006 Jan; 35 (1): 99-102.
 - 13) Wang K, Wang W, Yan H, Ren P, Zhang J, Shen J, Deubel V.: Correlation between bocavirus infection and humoral response, and co-infection with other respiratory viruses in children with acute respiratory infection. *J Clin Virol*. 2010 Feb; 47 (2): 148-55.
 - 14) Meerhoff TJ, Houben ML, Coenjaerts FE, Kimpen JL, Hofland RW, Schellevis F, Bont LJ.: Detection of multiple respiratory pathogens during primary respiratory infection: nasal swab versus nasopharyngeal aspirate using real-time polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010 Apr; 29 (4): 365-71.
 - 15) Linsuwanon P, Payungporn S, Samransamruajkit R, Posuwan N, Makkoch J, Theanboonlers A, Poovorawan Y.: High prevalence of human rhinovirus C infection in

- Thai children with acute lower respiratory tract disease. *J Infect.* 2009 Aug; 59 (2): 115-21.
- 16) Wright PF, Deatly AM, Karron RA, Belshe RB, Shi JR, Gruber WC, Zhu Y, Randolph VB.: Comparison of Results of Detection of Rhinovirus by PCR and Viral Culture in Human Nasal Wash Specimens from Subjects with and without Clinical Symptoms of Respiratory Illness. *J Clin Microbiol.* 2007 July; 45 (7): 2126-2129.
- 17) Niang MN, Diop OM, Sarr FD, Goudiaby D, Malou-Sompy H, Ndiaye K, Vabret A, Baril L.: Viral etiology of respiratory infections in children under 5 years old living in tropical rural areas of Senegal: The EVIRA project. *J Med Virol.* 2010 May; 82 (5): 866-72.
- 18) Watanabe M, Nakagawa N, Ito M, Ihara T: Sensitivity of rapid immunoassay for influenza A and B in the early phase of the disease. *Pediatr Int.* 2009 Apr; 51 (2): 211-5.
- 19) Pichichero ME. Understanding antibiotic overuse for respiratory tract infections in children. *Pediatrics.* 1999; 104 (6): 1384-1388.
- 20) Fahey T, Stocks N. Antibiotics for children with upper respiratory tract infections. *Jama.* 1998; 280 (16): 1399-1400. author reply 401-2.

