

季節性インフルエンザのウイルス排出量をもとにした院内での 隔離期間についての検討

安道 誠^{1,2,6)}・境目 容子^{3,6)}・丸山久美子^{4,6)}
森口 美琴^{5,6)}・浜島 智央^{5,6)}

Validation of In-hospital Isolation Based on Viral Shedding of Seasonal Influenza

Makoto ANDO^{1,2,6)}, Yoko SAKAIME^{3,6)}, Kumiko MARUYAMA^{4,6)},
Mikoto MORIGUCHI^{5,6)} and Tomohiro HAMASHIMA^{5,6)}

¹⁾Infection Control Department, Japan Organization of Occupational Health and Safety, Kumamoto Rosai Hospital, ²⁾Department of Respiratory Medicine, Japan Organization of Occupational Health and Safety, Kumamoto Rosai Hospital, ³⁾Nursing Department, Japan Organization of Occupational Health and Safety, Kumamoto Rosai Hospital, ⁴⁾Pharmacy Department, Japan Organization of Occupational Health and Safety, Kumamoto Rosai Hospital, ⁵⁾Central Laboratory Department, Japan Organization of Occupational Health and Safety, Kumamoto Rosai Hospital, ⁶⁾Infection Control Team, Japan Organization of Occupational Health and Safety, Kumamoto Rosai Hospital

(2020年6月22日受付・2020年10月19日受理)

要 旨

季節性インフルエンザでの入院患者の隔離期間に関しては、施設ごとで定められているのが現状である。当院に季節性インフルエンザ感染で入院となった患者の隔離期間について、2018年12月から2020年3月までに当院に季節性インフルエンザの診断で入院となった患者を対象に、リアルタイム RT-PCR 法によるウイルスコピー数およびウイルス培養結果をもとに検討した。入院日、3日後、7日後に鼻咽頭ぬぐい液を採取し、ウイルスコピー数測定およびウイルス培養を行った。4例で検討を行った(73~90歳;男:女=3:1)。ウイルスコピー数は4例中3例で経時的に減少していった(残る1例は7日後で再増加)。ウイルス培養結果については、4例中3例が入院日および3日後で陽性であったが7日後で陰性化し、残る1例は入院日は陽性であったが、3、7日後で陰性であった。以上の結果から、時間の経過とともに患者が排出するウイルス量は減少し、感染力も低下していくものと考えられた。最も長い発熱持続期間は6日間であり、いずれも肺炎を併発していた。季節性インフルエンザでの入院患者の隔離期間を、症状出現後7日間あるいは解熱後24時間のいずれか長いほうとすることは妥当と考えられた。

Key words : 季節性インフルエンザ, ウイルス排出, 隔離期間, リアルタイム RT-PCR 法, ウイルス培養

序 文

米国疾病予防管理センター (CDC) が2009年¹⁾および2010年²⁾に発表したインフルエンザ患者の隔離に関する推奨・手引きによると、医療機関においては症状出

現後7日間、あるいは解熱後24時間のいずれか長いほうを隔離期間とすることが推奨されている。当院にインフルエンザで入院となったあるいは当院入院中にインフルエンザに罹患した患者に対しては、CDCが推奨する隔離期間を用いている。一方、インフルエンザウイルスの排出が発症後10日以上経過してもみられる場合があることも、このCDCの推奨に記載されている¹⁾。Leeらは重症のインフルエンザで入院となった患者はウイルス増殖がさかんでかつウイルス排出期間が長く、また宿主免疫が低下しているとウイルス消失が遅延されること、

¹⁾独立行政法人労働者健康安全機構熊本労災病院感染制御部, ²⁾独立行政法人労働者健康安全機構熊本労災病院呼吸器内科, ³⁾独立行政法人労働者健康安全機構熊本労災病院看護部, ⁴⁾独立行政法人労働者健康安全機構熊本労災病院薬剤部, ⁵⁾独立行政法人労働者健康安全機構熊本労災病院中央検査部, ⁶⁾独立行政法人労働者健康安全機構熊本労災病院 ICT

一方抗ウイルス薬が発症4日以内に開始されればウイルスRNA (ribonucleic acid) の排出期間が短縮されることを示した³⁾。Cheungらはインフルエンザと検査により診断された582名およびその同居家族に関する観察研究を行い、24時間以内のオセルタミビル投与が自己申告による症状短縮と関連していることを示した一方、オセルタミビル投与とリアルタイムRT-PCR (reverse-transcription polymerase chain reaction) 法 (以下、RT-PCR法) によるウイルス排出期間や同居家族への伝播のリスク減少との関連は見いだせなかった⁴⁾。また、IpらはA型インフルエンザ感染でのウイルス排出は発症後1~2日目でピークを呈し、発症後6~7日目にかけて臨床症状の改善と一致するように減少し検出可能なレベルとなったが、B型インフルエンザ感染でのウイルス排出は発症2日前までに上昇し2相性のパターンで発症後6~7日目まで持続していたことを示した⁵⁾。当院にインフルエンザで入院となった患者に対してはほぼ全例抗インフルエンザウイルス薬が投与されるが、当院において抗インフルエンザウイルス薬がはたして周囲への伝播リスク減少に有効かははっきりせず、またA型とB型で隔離期間などを変えるべきかどうかは定かではない。Fieldingらは季節性インフルエンザに関する研究論文22報についてのシステマティックレビューを行った⁶⁾。外来管理を継続した群 (15報)、入院となった群 (4報)、ICUに入室となった群 (3報) に層別化し比較検討を行ったところ、入院となった群が外来管理を継続した群に比べ平均ウイルス排出期間が長かった。また、このシステマティックレビューには日本からの報告がまったく含まれていなかった。以上のことから今回われわれは季節性インフルエンザで入院となった症例についての検討を行う必要があると考えた。季節性インフルエンザで入院あるいは入院中に発症した患者の隔離期間に関しては、施設ごとで定められているのが現状である。当院に季節性インフルエンザ感染で入院となった患者に対する隔離期間が妥当かどうかについて、RT-PCR法によるウイルスコピー数およびウイルス培養結果をもとに検討した。

対象と方法

2018年12月から2020年3月までに季節性インフルエンザと診断し当院に入院となった患者を対象とした。本研究は、熊本労災病院倫理審査委員会の承認を得て行った (承認番号: 17-11)。入院時に患者もしくはその家族に本試験について説明し、書面により同意を得た。患者の年齢、性別、基礎疾患、既往歴、併用薬・常用薬、同シーズンの季節性インフルエンザワクチン接種歴の有無、インフルエンザウイルス型、抗インフルエンザ薬の種類、合併症の有無、併用抗菌薬の有無・種類、入院日からの発熱 (37.5℃以上) 期間、転帰について調査した。

全例患者から得られた鼻咽頭ぬぐい液を用いてイムノエース[®] Fluで診断し、入院日と診断日は同一日であった。また、入院日、入院3日後 (以後、3日後)、入院7日後 (以後、7日後) にそれぞれスワブにて鼻咽頭ぬぐい液を採取し、スワブを輸送培地に入れた状態で株式会社タウンズに搬送後RT-PCR法によるウイルスコピー数測定およびウイルス培養を行った。

インフルエンザウイルスの分離培養は、国立感染症研究所の「インフルエンザ診断マニュアル (第4版)」⁷⁾ に準じて行った。MDCK-SIAT1細胞に採取試料を200 μL接種し、1回の植え継ぎを含む計2週間ウイルス培養を行った。細胞変性効果が出現した段階、もしくは細胞変性効果の出現の有無にかかわらず培養2週間の段階で、培養上清を回収した。インフルエンザウイルス培養結果の判定 (陽性あるいは陰性) は、培養上清を用いたイムノエース[®] Fluの測定結果で評価した。

採取試料からのRNA抽出とRT-PCR法による測定は、国立感染症研究所の「インフルエンザ診断マニュアル (第4版)」⁷⁾ に準じて行った。採取試料140 μLよりQIAamp[®] viral RNA mini kit (Qiagen社) を用いてRNAの抽出を行い、リアルタイムRT-PCRキットにPrimeScript[™] One Step RT-PCR kit Ver.2 (タカラバイオ株式会社)、リアルタイムPCR装置にCFX96リアルタイムPCR解析システム (バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社) を使用し、インフルエンザウイルスA型とB型の検出およびインフルエンザA型pdmH1とインフルエンザA型H3N2の亜型の同定を行った。RT-PCR法で陽性であった試料に対して、インフルエンザウイルスコピー数の測定を行った。検量線作成用の標準物質はターゲット遺伝子をクローニングしたプラスミドを使用し、濃度は 10^6 - 10^{10} copy/μLに調整した。前述と同様の条件でRT-PCR法による検査を2重測定で実施し、検量線から算出された数値の平均値を用いて検体中のインフルエンザウイルスコピー数を換算した。

結 果

1. 患者背景

5例登録したがそのうち1例は7日後の検体採取が行えず、最終的に解析可能な症例は4例となった。患者背景を表に示す。症例1と2は2018-19シーズン、症例3と4は2019-20シーズンに罹患し入院となった。年齢は73~90歳と全例高齢者であった。また、基礎疾患を有する者も多く、4例中3例で複数種の経口薬による加療がなされていた。季節性インフルエンザワクチンを同シーズン中の発症前に接種していた者は4例中3例であった。抗インフルエンザ薬は全例に投与され、その内訳はペラミビル3例 (300 mg 2例, 150 mg 1例)、パロキサビル マルボキシル1例であった。発症時あるい

表 患者背景

症例	年齢	性別	基礎疾患	既往歴	同シーズンでの季節性インフルエンザワクチン接種	インフルエンザウイルス型	抗インフルエンザ薬	合併症	併用抗菌薬	入院日からの発熱期間(日)	転帰
1	90	男	パーキンソン症候群 高血圧症 認知症	脳梗塞	あり	A型 H3N2	ペラミビル 150mg/日; 初日1回のみ		CTRX 2g q24h	1	軽快
2	82	男	パーキンソン病 COPD 高血圧症	肺炎 心不全	あり	A型 H3N2	ペラミビル 300mg/日; 初日1回のみ		SBT/ABPC 3g q12h	4	軽快
3	73	男	高血圧症 膝痛	前立腺 肥大症	なし	A型 pdmH1	ペラミビル 300mg/日; 初日1回のみ	肺炎	Day 5~SBT/ABPC 3g q12h	6	軽快
4	84	女	気管支拡張症 気管支喘息 高血圧症 便秘症	肺炎 腎炎	あり	A型 pdmH1	バロキサビル マルボキシル 20mg/日; 初日のみ	肺炎	CTRX 1g q12h	6	軽快

は発症後の合併症として2例が肺炎をきたしており、インフルエンザ感染に伴う続発性肺炎と診断した。使用された抗菌薬としては、SBT/ABPC 2例、CTRX 2例であった。入院日からの発熱持続期間は1~6日間であり、6日間を要した2例はいずれも肺炎を併発していた。転帰は全例軽快退院であった。

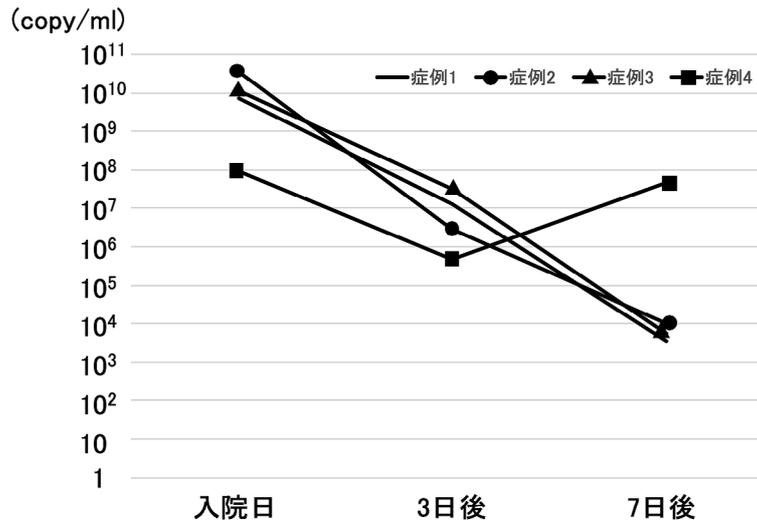
2. RT-PCR法による測定結果およびウイルス培養結果

検査結果を図に示す。各症例のウイルスコピー数について経時的な推移をみると、症例1~3についてはウイルスコピー数の減少を認めていた。一方、症例4に関しては、3日後で減少したものの7日後で再び増加していた。また、各症例のウイルス培養結果について経時的な推移をみると、症例1~3は入院日および3日後までは陽性であったが7日後で陰性化し、症例4は入院日は陽性であったが3、7日後で陰性となっていた。

考 察

RT-PCR法によるウイルス検出はウイルス培養法よりも感度が高いとされるが、RT-PCR法は感染力のない non-viable なウイルスのRNAも検出することを考慮しておく必要がある。一方、ウイルス培養法は感染力のあるウイルスの評価が可能である。したがって今回、RT-PCR法とウイルス培養の両者を測定した。症例4を除きウイルスコピー数は経時的に減少し、また培養結果に関しては7日後ではすべての症例において陰性化していた。このことから、時間の経過とともに患者が排出するウイルス量は減少し、感染力も低下していくものと考えられる。

症例4に関しては、3日後採取検体と7日後採取検体でコピー数が逆転していた。念のため、RNAを再抽出しRT-PCR法による検査を再度施行したが同様の結果となった。逆転していた理由として以下の2つが考えられた。第1に、輸送検体の管理面である。症例1~3の検体は輸送培地を凍結せずに培養していたものの、症例4の検体は輸送培地を凍結したのちに培養を行っており、凍結融解が何らかの影響を及ぼした可能性が考えられた。第2に、治療薬に対する耐性の可能性である。症例4に対してはバロキサビル マルボキシルを投与していた。国立感染症研究所の情報によると、2019-20シーズンにおけるA型 pdmH1に対するバロキサビル マルボキシルの耐性株率は0.14% (解析株数 738株)と低率であった⁸⁾。しかしながら、国際共同第III相試験(T0831試験)において、多くのPA/I38のアミノ酸変異が検出された時点である5、6日目において、I38のアミノ酸変異を有する患者では一過性にウイルス力価の上昇が認められた。また国内第II相試験(T0821試験)や国内第III相試験(T0822試験)においても同様の傾向が認められ



症例	培養結果		
1	+	+	-
2	+	+	-
3	+	+	-
4	+	-	-

図 リアルタイム RT-PCR 法によるウイルスコピー数およびウイルス培養結果

たと報告されている。したがって、症例4において、同薬に対する耐性のため7日後の時点でウイルスコピー数が再上昇した可能性があるものの不明といえる。同時点での培養結果は陰性であったため感染力については低いと考えてよいのかもしれない。

当院にインフルエンザで入院となった患者に対してはほぼ全例発症48時間以内に抗インフルエンザ薬が投与されるため、抗インフルエンザ薬による治療がなされていない場合との比較ができなかった。Fieldingらによるシステマティックレビューによると、発症48時間以内にオセルタミビルを投与された群は発症48時間を超えて投与された群および未投与群に比べ、ウイルス排出期間の中央値と平均値のいずれも低かった⁶⁾。したがって、当院での隔離期間も比較的短縮されている可能性は考えられる。

本研究はインフルエンザに罹患し入院となった患者が対象であり、また様々な疾患（易感染性や化学療法中など）で入院中の他の患者への感染リスクを考慮したものである。日本においては就学や職場復帰の基準として「症状出現後5日目」や「解熱後48時間」が用いられているが、それらの基準を院内という環境でも用いることが妥当かどうかは本研究の出発点でもあった。ただし、今回のわれわれの研究では症状出現後5日目での検討は加えておらず、今後の課題と考える。

本研究の限界として以下のようなものが挙げられる。

1点目として、単施設での研究であり、症例数が少なく、患者の背景の違いによるウイルス生存・排出の差などについての比較検討はできなかった。2010-11シーズンから2019-20シーズンにかけてのインフルエンザ過去10年間の定点あたり報告数を見ると、2019-20シーズンは2010-11シーズンに次いで少なかった⁹⁾。少なかった理由として、日本においては新型コロナウイルス感染症のパンデミックによるさまざまな影響や、暖冬および絶対湿度が高かったことによる可能性が推測された。実際に当院においても2019-20シーズンはインフルエンザでの入院患者数が少なかったが、今後も継続的な調査を検討したい。

2点目として、症例は成人特に高齢者のみであり年齢層に偏りがみられた点である。高齢者は合併症を有する頻度が比較的高く、またインフルエンザ感染による症状などによりADL低下および経口摂取量が減少しやすいため入院となる可能性が比較的高いことが理由として考えられた。

3点目として、今回ステロイド、免疫抑制薬、臓器移植などの治療中あるいは悪性疾患や血液疾患などの基礎疾患を有する症例が含まれておらず、それらの症例においてウイルス生存・排出期間が延長されるかどうかについては検討できなかった。Lehnersらは、血液疾患を有

する患者を対象に鼻咽頭ぬぐい液での RT-PCR 法でのウイルスに関する解析を行ったところ、インフルエンザ 40 例のうち 2 例はウイルス排出期間が 30 日を超えており (41 日と 48 日)、いずれも同種骨髄移植を受けた症例であった¹⁰⁾。今後は免疫抑制状態にある症例についての検討を加えたい。

4 点目として、B 型インフルエンザに関しては今回症例に含まれておらず検討できなかった。Sugaya らによる報告では、489 名のインフルエンザに罹患した小児患者 (A 型 127 名、B 型 362 名) を対象とした検討において、オセルタミビルによる治療開始後の平均発熱期間は A 型 H3N2 型群に比べ B 型群は有意に長く、またウイルスに対する 50% 阻害濃度も A 型 H3N2 型群に比べ B 型群は有意に高かった。また、その検討での B 型インフルエンザウイルスに対するオセルタミビルの耐性率はわずか 1.6% であった¹¹⁾。また、Kondo らは、ノイラミニダーゼ阻害薬のひとつであるラニナミビルによる治療を行ったインフルエンザ小児 28 例で検討を行い、ラニナミビル治療開始後 5~9 日後においても高い 50% 組織培養感染値量 (TCID₅₀) とウイルス RNA コピー数を示した症例が存在していたこと、また解熱後に B 型インフルエンザ症例 21 例中 3 例 (14.3%) で感染性のあるウイルス排出を認め、21 例中 9 例 (42.9%) でウイルス RNA を検出したと報告した¹²⁾。成人の入院症例においても B 型インフルエンザは A 型インフルエンザよりも長期に感染性のあるウイルスを排出する可能性もあり、今後 B 型インフルエンザ症例についても検討していきたい。

結 論

本研究結果からは、季節性インフルエンザで入院となったあるいは入院中に罹患した患者の隔離期間を、症状出現後 7 日間あるいは解熱後 24 時間のいずれか長いほうとすることは妥当と考えられた。

謝 辞：本研究は独立行政法人労働者健康福祉機構「病院機能向上のための研究活動支援」によるものである。また、今回の研究を支援していただきました株式会社タウンズの皆様に深謝申し上げます。

利益相反自己申告：申告すべきものなし。

文 献

- 1) CDC Recommendations for the Amount of Time Persons with Influenza-Like Illness Should be Away from Others: <https://www.cdc.gov/h1n1flu/guidance/exclusion.htm>. accessed May 17, 2020.
- 2) Interim Guidance on Infection Control Measures for 2009 H1N1 Influenza in Healthcare Settings, Including Protection of Healthcare Personnel: https://www.cdc.gov/h1n1flu/guidelines_infection_control.htm. accessed May 21, 2020.
- 3) Lee N, Chan PKS, Hui DSC, Rainer TH, Wong E, Choi KW, *et al.*: Viral Loads and Duration of Viral Shedding in Adult Patients Hospitalized with Influenza. *The Journal of Infectious Diseases* 2009; 200: 492-500.
- 4) Cheung DH, Tsang TK, Fang VJ, Xu J, Chan KH, IP DKM, *et al.*: Association of Oseltamivir Treatment With Virus Shedding, Illness, and Household Transmission of Influenza Viruses. *The Journal of Infectious Diseases* 2015; 212: 391-6.
- 5) Ip DKM, Lau LLH, Chan KH, Fang VJ, Leung GM, Peiris MJS, *et al.*: The Dynamic Relationship Between Clinical Symptomatology and Viral Shedding in Naturally Acquired Seasonal and Pandemic Influenza Virus Infections. *Clinical Infectious Diseases* 2016; 62: 431-7.
- 6) Fielding JE, Kelly HA, Mercer GN, Glass K: Systematic review of influenza A(H1N1)pdm09 virus shedding: duration is affected by severity, but not age. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 2014; 8: 142-50.
- 7) 「インフルエンザ診断マニュアル (第 4 版)」: <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/influenza20190116.pdf>: 2020 年 5 月 18 日現在。
- 8) 「抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス 2020 年 4 月 30 日」(国立感染症研究所): <https://www.niid.go.jp/niid/ja/influ-resist.html>: 2020 年 5 月 24 日現在。
- 9) 「インフルエンザ過去 10 年間との比較グラフ」(国立感染症研究所): <https://www.niid.go.jp/niid/ja/flu-m/813-idsc/map/130-flu-10year.html>: 2020 年 5 月 18 日現在。
- 10) Lehnert N, Tabatabai J, Prifert C, Wedde M, Puthenparambil J, Weissbrich B, *et al.*: Long Term Shedding of Influenza Virus, Parainfluenza Virus, Respiratory Syncytial Virus and Nosocomial Epidemiology in Patients with Hematological Disorders. *PLoS ONE* 2016; 11: e0148258.
- 11) Sugaya N, Mitamura K, Yamazaki M, Tamura D, Ichikawa M, Kimura K, *et al.*: Lower Clinical Effectiveness of Oseltamivir against Influenza B Contrasted with Influenza A Infection in Children. *Clinical Infectious Diseases* 2007; 44: 197-20.
- 12) Kondo H, Shobugawa Y, Hibino A, Yagami R, Daput C, Okazaki M, *et al.*: Influenza Virus Shedding in Laninamivir-Treated Children upon Returning to School. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 2016; 238: 113-21.

[連絡先]：〒866-8533 熊本県八代市竹原町 1670
独立行政法人労働者健康安全機構熊本労災病院感染制御部 安道 誠
E-mail: m_anduu@yahoo.co.jp]

Validation of In-hospital Isolation Based on Viral Shedding of Seasonal Influenza

Makoto ANDO^{1,2,6)}, Yoko SAKAIME^{3,6)}, Kumiko MARUYAMA^{4,6)},
Mikoto MORIGUCHI^{5,6)} and Tomohiro HAMASHIMA^{5,6)}

¹⁾Infection Control Department, Japan Organization of Occupational Health and Safety, Kumamoto Rosai Hospital, ²⁾Department of Respiratory Medicine, Japan Organization of Occupational Health and Safety, Kumamoto Rosai Hospital, ³⁾Nursing Department, Japan Organization of Occupational Health and Safety, Kumamoto Rosai Hospital, ⁴⁾Pharmacy Department, Japan Organization of Occupational Health and Safety, Kumamoto Rosai Hospital, ⁵⁾Central Laboratory Department, Japan Organization of Occupational Health and Safety, Kumamoto Rosai Hospital, ⁶⁾Infection Control Team, Japan Organization of Occupational Health and Safety, Kumamoto Rosai Hospital

Abstract

In-hospital isolation for patients with seasonal influenza is currently dependent on the facilities. In this study, we validated in-hospital isolation for patients who were diagnosed with seasonal influenza and admitted to our hospital from December 2018 to March 2020 using both viral copy numbers calculated by real-time RT-PCR method and viral culture. We collected each nasopharyngeal swab sample at the date of admission, and at three and seven days from admission, respectively, and determined viral copy numbers and cultivated viruses collected from each patient. Four patients were evaluated (73—90 years old; male: female, 3:1). The viral copy numbers decreased with time in three of the four patients (increased again at seven days from admission in the other patient). As for the viral culture, three of the four patients were positive both at the date of admission and three days from admission and negative at seven days from admission. The remaining patient was positive only at the date of admission. Thus, both viral shedding and infectiousness decrease with time in patients with seasonal influenza. The longest fever duration was six days in two patients, both of whom were complicated by pneumonia. On the basis of our findings, the longest indicated in-hospital isolation for inpatients with seasonal influenza is seven days after symptom onset or 24 hours after defervescence.

Key words: seasonal influenza, viral shedding, isolation, real-time RT-PCR method, viral culture