

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏 名	長田 秀和
学 位	博士 (医学)
学 位 記 番 号	新大院博 (医) 第 1081 号
学位授与の日付	令和4年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博 士 論 文 名	Development of cycling probe based real-time PCR methodology for influenza A viruses possessing the PA/I38T amino acid substitution associated with reduced baloxavir susceptibility. (PA/I38T アミノ酸置換を有するバロキサビル感受性低下 A 型インフルエンザウイルスに対するサイクリングプローブリアルタイムPCR法の確立)
論文審査委員	主査 教授 齋藤 昭彦 副査 教授 松本 壮吉 副査 准教授 今井 千速

博士論文の要旨

【背景と目的】

インフルエンザは、公衆衛生上重要な感染症の一つである。日本では2018年2月にバロキサビルマルボキシル (BA) が治療薬として承認された。BA はウイルス由来の RNA ポリメラーゼを構成する polymerase acidic タンパク質 (PA) に作用するキャップ依存性エヌスクレアーゼ阻害剤である。他の抗インフルエンザ薬と同様に、感受性低下株の出現とその伝播が懸念されている。BA 感受性低下株の代表的な変異として、PA の 38 番目のアミノ酸置換 (I38T) が報告されているが、これは野生型と一塩基異なる。本研究では、一塩基の違いを検出可能な cycling probe real-time PCR を用いて、治療前の臨床検体から BA 感受性低下株 (PA/I38T) と BA 感受性野生株 (WT) のスクリーニングを行い、市中感染の可能性を評価した。

【方法】

cycling probe real-time PCR はインフルエンザ A (H1N1) pdm09 と A (H3N2) それぞれに対し、PA/I38T と WT の配列へ対応する蛍光キメラプローブとそれらを挟むプライマーセットを使用した。最初に、これらのプローブとプライマーセットを評価するために、対象の塩基配列を含むプラスミドを用いて、real-time PCR を行った。次に2018/19シーズンにおいて、8道府県の11医療施設にてインフルエンザ迅速診断キット陽性のインフルエンザ様疾患患者から治療前の咽頭・鼻腔拭い液または鼻汁を採取した。それらの臨床検体から RNA を抽出し、cDNA を合成した。そして、前述の cycling probe real-time PCR によりスクリーニングを行った。PA/I38T 陽性検体は確認のため、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。患者背景を解析するため、サンプル採取の際に臨床医が記録した臨床データと患者またはその家族が記録した1日3回の体温の測定記録を用いた。

【結果】

コントロールのプラスミドを用いた評価では、A (H1N1) pdm09 と A (H3N2) それぞれに対し、cycling probe

real-time PCR は高い直線性と感度を示した。また、検出限界を算出したところ、A (H1N1) pdm09 および A (H3N2) の PA/I38T と WT とともに、2.1 コピー以上が検出可能であった。

インフルエンザ迅速診断キット陽性の 377 サンプルを cycling probe real-time PCR を行った結果、A (H1N1) pdm09 は 129 検体 (34.2%)、A (H3N2) は 229 検体 (60.7%)、19 検体 (5.0%) は陰性と判別された。A (H1N1) pdm09 陽性 129 検体中、PA/I38T 陽性検体は認められなかったが、その一方で、A (H3N2) 陽性 229 検体中、4 検体 (1.7%) は PA/I38T 陽性であった。これら PA/I38T 陽性 4 検体は、real-time PCR において、WT の反応は認められず、PA/I38T のみの反応が認められた。また、ダイレクトシーケンスの結果でも PA/I38T に相当する塩基配列が決定された。この 4 症例は全て 10 歳以下の患者であった。そのうち 2 症例で BA が処方され、体温が 37.5℃未満になるまでの発熱持続時間は、少なくとも 2.0 日と 1.1 日要した。その一方で、残りの 2 症例では、ノイラミニダーゼ阻害剤が処方され、発熱持続時間は 0.3 日と 0.9 日であった。推定された感染源は 1 症例が家族で 3 症例は学校であった。

感染源が家族と推定された症例は患者とほぼ同時期に両親、患者の姉もインフルエンザに罹患していた。患者の姉の治療後検体を解析した結果、PA/I38T が確認された。姉妹間で同一のウイルスに感染したかを調べるために、ウイルスの構造遺伝子のダイレクトシーケンスを行った。その結果、同じ塩基配列を有しており、姉妹は同一の PA/I38T アミノ酸置換を有するインフルエンザウイルスに感染していることが示唆された。

【考察】

本研究で用いた cycling probe real-time PCR は感度と特異度はともに高く、PA/I38T と WT を判別する迅速診断方法として有用であると考えられる。A (H1N1) pdm09 では PA/I38T が認められなかったが、A (H3N2) では 4 検体で認められ、A (H3N2) では変異が起こる可能性が高いことが考えられる。PA/I38T が認められた 4 症例の臨床背景から、学校や家族内での感染が推定され、PA/I38T を有するインフルエンザ A (H3N2) ウイルスは市中感染が起きていることが示唆された。本研究の結果では、感受性低下株の頻度は低かったが、今後も PA/I38T を有するウイルスを注視する必要があると思われる。

審査結果の要旨

日本では 2018 年にバロキサビルマルボキシル (BA) が季節性インフルエンザの治療薬として承認された。BA 感受性低下の代表的な変異として、ウイルス RNA ポリメラーゼを構成する polymerase acidic 蛋白質 (PA) の 38 番目のアミノ酸置換 (I38T) が報告されている。本研究では、Cycling probe real-time PCR を用いて、治療前の臨床検体から BA 感受性低下株 (PA/I38T) と感受性野生株 (WT) を調査し、市中感染の可能性を評価した。

2018/19 年のインフルエンザ迅速診断キット陽性の 377 サンプルを Cycling probe real-time PCR を行った結果、A (H1N1) pdm09 は 129 検体 (34.2%)、A (H3N2) は 229 検体 (60.7%)、19 検体 (5.0%) は陰性と判別された。PA/I38T 陽性は A (H3N2) で 4 検体 (1.7%、4/229) であった。PA/I38T が認められた 4 症例は学校や家族内での感染が推定され、市中感染が起きていることが示唆された。今回の結果では、感受性低下株の頻度は低かったが、今後も PA/I38T を注視する必要があると思われる。

以上より、学位論文としての価値があると判断する。