

200931042A

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

臓器移植患者の予後およびQOLの
向上のための真菌やウイルス感染症の
予防・診断・治療に関する研究

(H21-新興-一般-009)

平成21年度 総括・分担研究報告書

平成22年3月

研究代表者 西 條 政 幸

(国立感染症研究所)

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

臓器移植患者の予後およびQOLの
向上のための真菌やウイルス感染症の
予防・診断・治療に関する研究

(H21－新興－一般－009)

平成21年度 総括・分担研究報告書

平成22年 3 月

研究代表者 西 條 政 幸

(国立感染症研究所)

平成 21 年度厚生労働科学研究補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

臓器移植患者の予後および QOL の向上のための真菌やウイルス感染症の
予防・診断・治療に関する研究

平成 21 年度 研究組織

研究代表者(班長)

西條政幸 国立感染症研究所ウイルス第一部第三室長

研究分担者

氏名	所属
井上直樹	国立感染症研究所・ウイルス第一部第四室長
大野秀明	国立感染症研究所・生物活性部室長
片野晴隆	国立感染症研究所・感染病理部室長
加藤俊一	東海大学医学部・造血幹細胞移植・教授
木内哲也	名古屋大学医学部・移植外科学・教授
木村 宏	名古屋大学大学院医学系研究科・分子総合医学専攻(微生物・免疫学講座ウイルス学分野・ウイルス学)・准教授
錫谷達夫	福島県立医科大学微生物学教室・微生物学(福島県立医科大学)・教授
谷口修一	虎の門病院・血液内科(虎の門病院) 部長
森 康子	神戸大学大学院医学研究科・臨床ウイルス学・医学・ウイルス学・医薬基盤研究所)・教授
吉川哲史	藤田保健衛生大学医学部・小児科学・臨床ウイルス学・准教授

研究協力者(順不同)

氏名	所属
西村秀一	国立病院機構仙台医療センター・ウイルスセンター長
中道一生	国立感染症研究所ウイルス第一部
木下一美	国立感染症研究所ウイルス第一部
梅山 隆	国立感染症研究所生物活性物質部
山越 智	国立感染症研究所生物活性物質部
大川原明子	国立感染症研究所生物活性物質部
金城雄樹	国立感染症研究所生物活性物質部
宮崎義継	国立感染症研究所 物活性物質部
岡部智也	(株)ACTGen
後藤希代子	(株)ニッピバイオマトリックス研究所
上野智規	(株)ニッピバイオマトリックス研究所
西山 恭子	福島県立医科大学微生物学講座
岡崎 友亮	福島県立医科大学微生物学講座
定岡知彦	神戸大学大学院医学研究科
井平 勝	藤田保健衛生大学医療科学部

目次

I. 総括研究報告書

臓器移植患者の予後および QOL の向上のための真菌やウイルス感染症の予防・診断・治療に関する研究.....1

研究代表者 西條政幸

II. 研究分担報告書

1. LCM ウイルス感染の診断システムの開発.....23

西條 政幸

2. 感染初期過程を阻害する新規抗ヘルペスウイルス化合物の作用点解析と個体レベルでの評価.....33

井上直樹

3. 真菌の潜伏感染メカニズムの解明とその検出法に関する研究.....41

大野秀明

4. 新規 CMV 感染細胞検出法(PML 法)の移植医療への応用に関する研究.....47

片野晴隆

5. 臓器移植患者におけるウイルス感染症の精緻なモニタリングと移植患者の管理への応用.....55

加藤俊一

6. 移植医療の発展に伴って多様化する感染症の解析と制御.....59

木内哲也

7. FISH法を用いた EBV 関連リンパ増殖性疾患に対する非侵襲診断法の確立.....67

木村宏

8. 培養によらない細菌・真菌検査法の定量化.....73

錫谷達夫

9. 同種造血幹細胞移植後の呼吸器ウイルス感染症についての検討.....85

谷口修一

10. ヒトヘルペスウイルス6に対する細胞性免疫能の測定法に関する研究.....87

森康子

11. 移植後 HHV-6 感染症の診断・治療・予防法の開発.....89

吉川哲史

III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....93

IV. その他.....101

I. 総括研究報告書

臓器移植患者の予後および QOL の向上のための真菌やウイルス感染症の 予防・診断・治療に関する研究

所属 国立感染症研究所ウイルス第一部第三室
研究者 西條政幸

研究要旨:

最近の臓器移植(以下、移植)医療では、患者の予後は徐々に改善されつつあるものの、現在でも移植患者では感染症の治療に難渋したり、亡くなられたりする患者が多い。臓器移植医療の発達と幹細胞移植を含む臓器移植関連感染症は、移植医療における克服または改善を要する大きな問題点のひとつである。本年度は、移植術中における感染症対策をたてるために必要な幹細胞移植患者における呼吸器ウイルス感染症の流行と臨床像に関する調査、臓器提供者の感染症スクリーニング法の整備、臓器移植患者の移植後の細胞性免疫の評価法の開発等、移植を受けた患者の回復期・完解期における感染症対策のための基礎研究を実施した。また、臓器移植患者で問題となることの多い、ヘルペスウイルス感染症対策の一環として、EB ウイルス感染症の診断法の開発、新規抗ウイルス薬の開発と作用機序の解明、薬剤耐性サイトメガロウイルス感染症の診断法の開発に関する研究がなされた。真菌感染症対策のための研究として、真菌の潜伏感染メカニズムの解明とその検出法、培養によらない細菌・真菌検査法の定量化による真菌・細菌感染症診断法の開発とその評価に関する研究がなされた。以下の結果を得た。

- 1) リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(lymphocytic choriomeningitis virus, LCM ウイルス)は、アレナウイルス科アレナウイルス属に分類され、ネズミなどのげっ歯類が媒介する人獣感染症のひとつである。近年 LCM ウイルスに感染して死亡した患者が臓器提供者(ドナー)となり、そのドナーより実質臓器の提供を受けた移植患者が LCM ウイルスに感染し死亡するという感染事例が報告されている。本研究では LCM ウイルス組換え核蛋白(NP)に対する単クローン抗体およびポリクローナル抗体を作製し、病理組織中の LCM ウイルス抗原検出法、血液中 LCM ウイルス抗原検出 ELISA 法を開発し、LCM ウイルス感染症の診断法を整備した。また、旧世界アレナウイルスの L 遺伝子を検出するプライマーセットを用いて行った RT-PCR 法により、LCM ウイルス遺伝子を高感度に検出できることを確認した。
- 2) ランダム化合物ライブラリーのスクリーニング法により同定されたサイトメガロウイルス(CMV)及び水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)の感染初期過程を阻害する新規抗ウイルス薬の作用機序を解析した。また、GFP 発現組換えマウスサイトメガロウイルス(MCMV-GFP)を用いた in vivo imaging 法を確立し、ガンシクロビルをモデルとして個体における化合物の簡便な評価法として有用であることを示した。
- 3) 予後不良の臓器移植に合併する深在性真菌症に対する、新たな予防、診断、治療法の開

発のための、クリプトコックス属について、その潜伏感染診断系の開発に関する基礎研究を実施した。クリプトコックス属の細胞表層蛋白・分泌蛋白を標的とした検出系開発を目的に SST-REX 法を行い、これら蛋白の網羅的検出を行った。また、これら蛋白に対する抗体を作製し、高感度検出系への応用や抗真菌活性について検討した。さらに、クリプトコックス属の菌体成分刺激による慢性クリプトコックス感染宿主 T 細胞の interferon γ 産生能の検討を行い、潜伏感染検出系としての可能性を検討した。これに関連し、クリプトコックス慢性感染マウスモデルを確立した。今回の検討により、glucuronoxylomannan は記憶抗原ではない可能性が示唆された。

- 4) 新規 CMV 感染細胞検出法である PML 法を利用した迅速な薬剤感受性試験を確立するための基礎試験を実施した。in vitro 感染血液細胞を用いて、CMV 臨床分離株を in vitro で感染させた末梢血単核球と PML 法の検出用細胞株である SE/15 細胞を共培養する際のプロトコールを決定した。この条件下では約一週間の共培養によりウイルスの複製サイクル依存的に陽性細胞が検出可能であった。更に感度を最適化する各種条件を検索した結果、デキサメタゾン添加が血液細胞におけるウイルス複製過程で効果的に感度を上昇させることを見出し、その至適濃度を決定した。また、デキサメタゾン添加は陽性細胞検出までの期間も短縮させ得ることを見出した。以上の試験では 10^6 個程度の末梢血単核球で陽性細胞が検出可能であり、in vivo 感染末梢血単核球へも応用可能と考えられた。
- 5) 幹細胞移植患者におけるヘルペスウイルス科のウイルスの再活性化についてリアルタイム PCR により精緻な感染の定量的なモニタリング法を実施して検討した。対象としたウイルスはサイトメガロウイルス (CMV)、Epstein-Barr ウイルス (EBV)、ヒトヘルペスウイルス 6 型 (HHV-6) の 3 種類である。その結果、移植後早期には CMV、EBV、HHV-6 の再活性化が高頻度に認められた。また、幹細胞移植患者における水痘・帯状疱疹ウイルスに対する細胞性免疫能を解析した。レシピエントに移植前の水痘既往がない場合には、ドナーにおける既往の有無に関わらず移植後の VZV 特異的リンパ球幼若化反応 (VZV-LPR) は陰性のままで経過し、水痘に罹患するか水痘ワクチン接種により初めて VZV-LPR が陽性化した。移植前に水痘の感染の既往があるレシピエントにおいては、移植前に陽性であった VZV-LPR が移植後 3 ヶ月頃までに徐々に減衰し陰性となり、帯状疱疹を発症することにより VZV-LPR が陽転化して、有効な細胞性免疫が成立した。その際、ドナーに水痘の既往がない場合は既往がある場合よりも VZV-LPR の陰性化が早く、帯状疱疹の発症時期も早い傾向が認められた。これらのウイルスに対する細胞性免疫回復状況を把握することで、適切な治療法の選択が可能となった。
- 6) 臓器移植患者におけるワクチン投与のあり方に関する研究が実施された。肝移植後慢性期の小児における季節性インフルエンザワクチンの安全性と効果について検討した。有意な副反応なく安全に施行可能であったが、有効抗体価獲得率は低く、対照の健常児でも同様であった。接種群における有意な臨床的效果を確認するには至らなかった。また、肝移植後慢性期において、肝内に潜在する HBV の再活性化予防を目的とした HBV ワクチンの

安全性と効果を検討した。多くの症例で安全に施行可能であり、若年・女性・ドナーHBc 抗体価の高い症例で良好な反応が得られたが、移植前に HBV キャリアであった症例では反応が不良であった。

- 7) 移植後リンパ増殖症の診断には、末梢血中の感染細胞数の定量に加え、EBV が感染している細胞の同定が必要である。 *in situ* hybridization 法と、flow cytometry を組み合わせ、末梢血中の EBV 感染細胞を検出できる flow cytometric *in situ* hybridization (FISH) 法が開発され、さらに移植後リンパ増殖症を含む様々な EBV 関連リンパ増殖性疾患に応用された。FISH 法により患者末梢血中の EBV 感染細胞の定量・同定が可能であり、同法は移植後リンパ増殖症の非侵襲診断および治療効果モニタリングに有用であると考えられた。
- 8) 臓器移植患者に起こる感染症を培養によらない細菌・真菌検査法で定量的に検査するため、一検体中に共存する複数菌種それぞれの菌数を、ひとつの PCR で一度に定量する方法を確立した。また、常在菌叢中に存在する数の少ない菌種を特異的に増幅するサブトラクション法を確立した。本研究で確立した方法の臓器移植患者における細菌・真菌感染症の診断や病態生理の解析における有用性を、臨床検体を用いて評価することが必要と考えられた。
- 9) 虎の門病院において 2006 年 1 月から 2009 年 12 月まで)同種造血幹細胞移植を行った症例 415 例のうち、何らかの呼吸器症状があった症例で気道分泌物から呼吸器ウイルスを検出しえた 31 症例について解析した。20 例が肺炎を発症し、11 例で上気道炎が認められた。上気道炎症例は全例軽快したが、肺炎症例では 12 例が死亡した。呼吸器ウイルス感染症による死亡に関しては、危険因子として、発症時のリンパ球数が低値であること、好中球生着前の発症であること、他の微生物による二次感染を生じていることが挙げられた。また、呼吸器ウイルス感染症は病棟内で流行する傾向があり、一次・二次予防の必要があると考えられた。
- 10) 臓器移植や造血幹細胞移植後に HHV-6 が再活性化することにより、移植片対宿主病、間質性肺炎や脳炎、脳症等の重篤な疾患を惹起させる。HHV-6 に対する免疫能を測定することにより、再活性化の機構解明に繋げるために、ヒトヘルペスウイルス 6 に対する細胞性免疫能の測定系を確立した。
- 11) 造血幹細胞移植後の HHV-6 感染症診断において、real-time PCR 法によるウイルス DNA モニタリングが一般的に使用される。しかしながらその成績は、ウイルス分離成績と必ずしも一致せずウイルス血症が消退した後も比較的高いウイルス DNA 量が検出されることがある。そこで real-time RT-PCR 法による 3 種類の HHV-6 遺伝子発現定量的測定法を開発し、造血幹細胞移植患者のける HHV-6 の再活性化の評価における臨床的有用性を検討した。U90 遺伝子発現が最もウイルス分離成績との関連性が強く、活動性感染モニタリング法として有用なことが明らかにされた。

研究分担者:

井上直樹

国立感染症研究所・ウイルス第一部

大野秀明

国立感染症研究所・生物活性部

片野晴隆

国立感染症研究所・感染病理部

加藤俊一

東海大学医学部・造血幹細胞移植

木内哲也

名古屋大学医学部・移植外科学

木村宏

名古屋大学大学院医学系研究科・分子総合医学専攻(微生物・免疫学講座ウイルス学分野・ウイルス学)

錫谷達夫

福島県立医科大学微生物学教室・微生物学

谷口修一

虎の門病院・血液内科

森康子

神戸大学大学院医学研究科・臨床ウイルス学

吉川哲史

藤田保健衛生大学医学部・小児科学

A. 研究目的

現在では、移植医療がより高度化し、造血幹細胞移植を含む臓器移植を受ける患者が多くなる。角膜移植、腎臓移植、そして、白血病などの血液悪性腫瘍の治療法として骨髄移植が多くの患者で実施されている。また、心臓、肝臓、肺臓などの移植もこれまで以上に増加すると予想される。さらに、先天性免疫不全症や先天性代謝性疾患の治療法として臓器移植が用いられるようにもな

っている。このように移植医療は、多様な疾患が対象になっている。一方、有効な免疫抑制剤の開発や移植時の患者管理の向上、移植術の改良により、移植を受けた患者の予後が改善されつつある。しかし、移植患者および医療従事者にとっては、感染症は、未だに克服されるべき大きな課題である。とりわけウイルスや真菌感染症対策は重要な位置を占める。近年、移植患者における薬剤耐性ウイルス感染症や真菌症の対策の重要性も指摘されている。臓器提供者がいわゆる人獣共通感染症(例えばリンパ球性脈絡膜髄膜炎ウイルスや西ナイルウイルス感染症)に罹患していて、移植患者の多くが死亡する感染事故の報告も増えている。このように、現在の移植における感染症の特徴は、過去のそれとは異なりつつあり、かつ、多様化している。本研究では、移植患者の予後とQOLを改善するために、移植患者における感染症の現状を解析し、臓器移植患者におけるウイルスや真菌感染症の診断や治療法の開発を手がけ、将来を見据えた対応策を提示することが目的とされている。

本研究では、臓器移植関連感染症対策としてのドナーの感染症スクリーニング法、移植患者におけるヘルペスウイルス感染症に関する診断、ヘルペスウイルスへの細胞性免疫能の評価と治療への応用、造血幹細胞移植患者病棟でのウイルス性気道感染症に関する臨床研究、肝移植患者におけるインフルエンザワクチン接種とB型肝炎ワクチン接種に関する臨床研究がなされた。

本研究班では、平成21年11月13日(金)午後3時から、「臓器移植におけるウイルス感染症対策」と題するシンポジウムを国立感染症研究所(新宿区戸山1-23-1)にて開

催し、臓器移植関連感染症対策に関する情報交換が行われた。

B. 研究方法

1. LCM ウイルス感染の診断システムの開発: LCM ウイルスの組換え核タンパク (LCMV-rNP) を BALB/c マウスに免疫し、抗体が十分上昇した時点で脾臓を採取した。脾臓細胞とミエローマ細胞を融合させて LCMV-rNP に対する単クローン抗体を分泌するハイブリドーマを樹立した。この単クローン抗体と LCMV-rNP に対するポリクローナル抗体をそれぞれ捕捉抗体、検出抗体として、抗原検出 ELISA を確立した。樹立された単クローン抗体のエピトープを各サイズの LCMV-rNP に対する反応性をウェスタンブロット法により調べる方法で解析した。Viethら (Trans R Soc Trop Med Hyg 101:1253-1264, 2007) により開発された旧世界アレナウイルスの L 遺伝子を検出するプライマーセットを用いた RT-PCR 法を整備し、その有用性を評価した。
2. 感染初期過程を阻害する新規抗ヘルペスウイルス化合物の作用点解析と個体レベルでの評価: MeWo 細胞および、10% 牛胎児血清 (FBS) 添加 Dulbecco's MEM (DMEM) 培地にて培養したヒト 2 倍体細胞 (HLF, human lung fibroblast) で増殖させた。VZV レポーター細胞 MV9G は、100 μ g/ml の G418 及び 10% FBS 添加 DMEM にて培養した。VZV およびマウス CMV (MCMV) の薬剤感受性は、プラーク減少法で決定した。薬剤の細胞毒性は、生存細胞が産生する ATP 量に基づいて生存細胞数を測定するアッセイ

(CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay, Promega) を用いて決定した。VZV の初期蛋白 IE62 は、特異的単クローン抗体を用いて蛍光抗体法により検出した。HSV1 及び VZV のゲノムコピー数の測定は、定量的リアルタイム PCR 法によった。マウス感染実験と in vivo imaging に関する解析は、以下のように実施された。相同組換え法により m128 遺伝子領域に MCMVe1 プロモーターに制御される EGFP 発現カセットを導入することにより構築された EGFP 発現組換え MCMV 感染マウスを 2% イソフルランで吸入麻酔し、うつ伏せにして撮影した。蛍光シグナルは Cambridge Research & Instrumentation 社製の in vivo imaging 装置 Maestro を用いて検出した。シグナル強度は、Meta Imaging Software version 6.1 (Molecular Device) を用いて単位面積当りの蛍光量として測定した。

3. 新規 CMV 感染細胞検出法 (PML 法) の移植医療への応用に関する研究: 末梢血単核球 (PBMC) への in vitro 感染に使用する臨床分離株は感染線維芽細胞 (HEL 細胞) から超音波処理を行い、接種用ウイルス液を調製した。CMV 臨床分離株 41 株を使用して PBMC への感染性を予め評価し感染性を保持している株を選択して解析に用いた。ガンシクロビル (GCV) を使用した。臨床分離株は GCV 感受性株と耐性株の 2 群を使用した。PBMC への臨床分離株の感染性は PML 法を用いた子孫ウイルスの検出により評価した。in vitro 感染 PBMC と SE/15 細胞を共培養し、HCMV 感染の指標となる GFP-PML 蛋白の局在変化を示した陽性

細胞数を、時間経過を追ってカウントした。PML 法における感度向上、最適化のための条件検討は、CaCl₂, DMSO, トリコスタチン A (TSA), デキサメタゾン(Dex)などの各種薬剤存在下で培養を行い、PBMC より産生される子孫ウイルスの感染価を PML 法で評価した。さらに、そのピークに達する感染後の日数を減少させる濃度を検討した。

4. ヒトヘルペスウイルス6に対する細胞性免疫能の測定法に関する研究: 健康人ボランティア(2名)より採取した末梢血単核球(PBMC)を用い、以下に示す方法で、IFN- γ ELISPOT 法によりHHV-6に対する細胞性免疫能を測定した。抗ヒト IFN- γ 抗体 (clone 2G1, Endogen) をコートした 96 穴メンブレンプレートに PBMC を 2×10^5 個加え、その上に HHV-6B (HST 株) 感染 Molt-3 細胞あるいは MT-4 細胞より調整したウイルス粒子含有液を UV 不活化後、添加した。また感染細胞と同数の非感染細胞より同様に調整したウイルス粒子非含有液をコントロールとして添加した。37°C, 5%CO₂ 条件下で 38 時間培養した後、プレートを洗浄しビオチン標識抗ヒト IFN- γ 抗体 (clone B133.5, Endogen), ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (1:1,000 BD), TMB-H 発色液 (Moss) を反応させ、スポットを可視化した。スポット数の測定は、KS-ELISPOT 測定装置 (Carl Zeiss) により行った。本研究は臨床研究に関する倫理指針を遵守し、各研究機関における倫理委員会において承認を得ている。各検体はコード化され、個人を特定できない状態で実験担当者にわたって実験を

行った。

5. 臓器移植患者におけるウイルス感染症の精緻なモニタリングと移植患者の管理への応用に関する研究: リアルタイム PCR により精緻な感染の定量的なモニタリングを行った。対象としたウイルスはサイトメガロウイルス(CMV), Epstein-Barr ウイルス(EBV), ヒトヘルペスウイルス6型(HHV-6)の3種類で、移植前処置開始直前から移植後毎週1回定期的に患者全血を用いてリアルタイム PCR 検査を実施した。また、CMV については抗原血症 (antigenemia) 試験も実施した。抗原特異的リンパ球幼若化反応により抗原毎の細胞性免疫の経時的なモニタリングを行った。対象とした mitogen と抗原は IL-2, アロ抗原, CMV 抗原, 水痘 VZV 抗原, アデノウイルス抗原で、移植前処置開始直前から移植後毎月1回定期的に患者リンパ球を用いて幼若化試験を実施した。
6. 移植後 HHV-6 感染症の診断・治療・予防法の開発: 前初期 (U90), 初期 (U12), 後期 (U100) の各遺伝子を標的とした。Primer, probe の設計には、Primer Express (ABI) を用いた。Real-time PCR 法の標準曲線作製のために、各標的遺伝子領域をサブクローニングした。造血幹細胞移植後 day0 から約 60 日間定期的に採血し、ウイルス分離と全血中のウイルス DNA 量をモニタリングし得た 11 名を対象とした。比重遠心法で分離した単核球から total RNA (RNeasy Mini Kit ; QIAGEN) を抽出、血液 200 μ l から DNA (DNA blood Mini Kit; QIAGEN) を抽出した。RNA は random hexamer primer

を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。作成した cDNA 5 μ l を用いて real-time PCR を行い各遺伝子 mRNA の発現量を定量した。また内部標準として、 β アクチン mRNA を用いた。HHV-6 DNA の定量は、既存の HHV-6 U31 を標的とした real-time PCR 法により行った。

7. FISH法を用いたEBV 関連リンパ増殖性疾患に対する非侵襲診断法の確立：症例は EBV 関連移植後リンパ増殖症 1 例、NK 細胞性白血病 1 例、慢性活動性 EB ウイルス感染症 6 例である。末梢血より単核球を分離し、以下の手順で、FISH 法による EBV 感染細胞の定量・同定を行った。
8. 肝移植後免疫抑制療法下の慢性期における能動免疫療法の有効性についての検討：小児肝移植後症例における季節性インフルエンザワクチンの有効性に関する研究と肝移植後潜在感染症例における B 型肝炎ワクチンの有効性に関する研究が実施された。参加症例に対しては、平成 15 年 7 月 30 日付厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針」に則り、十分な説明を施した上で、患者および親権者よりインフォームドコンセントを得て実施された。
9. 同種造血幹細胞移植後の呼吸器ウイルス感染症についての検討：2006 年 1 月から 2009 年 12 月までに虎の門病院で同種造血幹細胞移植(血縁末梢血 50 例、非血縁骨髄 88 例、臍帯血 277 例)を行い、移植後に何らかの呼吸器症状を生じた症例で呼吸器検体(咽頭拭い液・喀痰・BAL 液)を採取し、呼吸器ウイルス(RSV, PIV, ADV)を認めたものを呼吸器ウイル

ス感染症と診断し、画像所見にて肺炎を認めるものを下気道感染症、認めないものを上気道感染症とした。これらの患者の臨床症状、予後等を解析した。ウイルス PCR 検査に関しては、患者のプライバシーを十分に保護した上で検査ならびに公表を行っている。また、患者さんからは同意を得ている。

10. 培養によらない細菌・真菌検査法の定量化：本実験では、菌株は German Collection of Microorganisms and Cell Cultures Biological resource Centre (Braunschweig, Germany) の菌株を使用した。菌株からの DNA 抽出は Soeta らの方法で行った。菌株の懸濁液から QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen Science, Hilden, Germany) を用い、使用説明書に従って DNA を抽出した。真菌の定量的検出は、ユニバーサルプライマー ITS86M-F、ITS4M-R を使用した定量的リアルタイム PCR 法によった。FAM でラベルしたリバープライマー ITS4M-R (以下 ITS4M-R-FAM とする)と ITS86M-F を用いて i-Cycler Thermal Cycler (BIO-RAD) で PCR を行い、PCR 産物を ABI Prism 3100 genetic analyzer GENESCAN analysis software version 3.7 (Applied Biosystems) を用いて泳動した。Nikolai らの方法を真菌の ITS2 領域用に改変したサブトラクション法を開発した。
11. 真菌の潜伏感染メカニズムの解明とその検出法に関する研究：クリプトコックス属に対して、細胞の膜表面蛋白、分泌蛋白を網羅的に解析する方法である SST-REX (signal sequence trap by retrovirus-mediated expression

screening)法を用いて分泌蛋白等の同定を行った。また、クリプトコックス慢性感染マウスモデルの作製に関する研究を行った。

C. 研究結果

1. LCM ウイルス感染の診断システムの開発:6 クローンの抗 LCMV-rNP 抗体分泌ハイブリドーマ (25-2-E2-25, 25-2-E5-27, 24-2-E3-30, 24-2-E3-31, 24-1-E10-42, 24-1-E10-71)が樹立された。これらの単クローン抗体は ELISA 法や蛍光抗体法によっても、LCM ウイルスの NP と結合することが確認された。LCM ウイルス抗原検出 ELISA 法が開発された。本 ELISA が陽性を呈するには、LCM ウイルスが 1×10^5 PFU/ml のウイルス量を要することが明らかにされた。2 クローン (25-2-E2-25, 25-2-E5-27) はアミノ酸領域 423-433 と、4 クローン (24-2-E3-30, 24-2-E3-31, 24-1-E10-42, 24-1-E10-71) はアミノ酸領域 335-433 に反応した。ウイルス遺伝子検出。Vieth らが報告した旧世界アレナウイルス用プライマーを用いた RT-PCR 法により、LCM ウイルス遺伝子が高感度にウイルス遺伝子が検出されることが確認された。
2. 感染初期過程を阻害する新規抗ヘルペスウイルス化合物の作用点解析と個体レベルでの評価:141B3 と 35B2 の2つの化合物の抗 VZV に対する 50%阻害濃度 (EC50) をプラーク減少法により決定した。141B3 と 35B2 の EC50 は、それぞれ $0.32 \mu\text{M}$ 及び $0.80 \mu\text{M}$ であった。また、50%細胞毒性濃度 (CC50) は、ともに $80 \mu\text{M}$

以上であり、選択係数 SI は 100 以上であった。141B3 と 35B2 の2つの化合物は、DNA 複製もしくはそれ以前の過程を阻害し、ともに初期遺伝子の転写発現を阻害する一方、35B2 のみが前初期遺伝子 ORF62 の転写発現を阻害した。従って、141B3 は前初期遺伝子発現以前を、35B2 は IE62 蛋白の翻訳後修飾や DNA 複製などを阻害している可能性が示された。皮下接種経路による EGFP 発現組換え MCMV 感染 HR1 マウス (体毛が発達しない) では、2-3 日をピークとして、ウイルス感染を GFP 蛍光シグナルとして検出可能であった。MCMV 感受性の BALB/c マウスに EGFP 発現組換え MCMV を感染させた場合には、 1×10^4 PFU からしか蛍光を検出できず、 1×10^6 PFU との間の接種量でも定量性は見られなかった。 2×10^6 PFU の MCMV-GFP を BALB/c マウスに皮下接種 6 時間後から毎日 50mg/kg もしくは 100mg/kg GCV を腹腔内もしくは皮下に投与し、in vivo imaging で感染阻害を検討した。ガンシクロビルの腹腔内 100mg/kg や皮下 50mg/kg は、in vivo imaging による評価では、MCMV-GFP の増殖を完全に阻害した。

3. 新規 CMV 感染細胞検出法 (PML 法) の移植医療への応用に関する研究: in vitro 感染血液細胞を用いて、CMV 臨床分離株を in vitro で感染させた末梢血単核球と PML 法の検出用細胞株である SE/15 細胞を共培養する際のプロトコルを決定した。デキサメタゾン添加が血液細胞における CMV 複製過程で効果的に感度を上昇させることを見出した。デキサメタゾン添加は陽性細胞検出までの

期間も短縮させ得ることを見出した。10⁶個程度の末梢血単核球で陽性細胞が検出可能であり、*in vivo* 感染末梢血単核球へも応用可能と考えられた。

4. ヒトヘルペスウイルス 6 に対する細胞性免疫能の測定法に関する研究: ヒト末梢血単核球(PBMC)を用いて HHV-6 に対する細胞生免疫能の測定法(IFN-gamma ELISPOT 法)が確立された。
5. 臓器移植患者におけるウイルス感染症の精緻なモニタリングと移植患者の管理への応用に関する研究: 幹細胞移植前に水痘の感染の既往があるレシピエントにおいては、移植前に陽性であった VZV-LPR が移植後3ヵ月頃までに徐々に減衰し陰性となり、帯状疱疹を発症することにより VZV-LPR が陽転化して、有効な細胞性免疫が成立した。その際、ドナーに水痘の既往がない場合は、その既往がある場合よりも VZV-LPR の陰性化が早く、帯状疱疹の発症時期も早い傾向が認められた。幹細胞移植患者におけるサイトメガロウイルス(CMV)、Epstein-Barr ウイルス(EBV)、ヒトヘルペスウイルス6型(HHV-6)の再活性化を定量的 PCR 法により解析したところ、移植後早期には CMV、EBV、HHV-6 の再活性化が高頻度に認められることが確認された。これらのウイルスに対する細胞性免疫回復状況を把握することや、再活性化の状態を把握することで、適切な治療法の選択が可能となった。
6. 移植後 HHV-6 感染症の診断・治療・予防法の開発: 造血幹細胞移植患者移植後の血液中の HHV-6 の前初期(U90)、初期(U12)、後期(U100)の各遺伝子発現状況を解析したところ、U90 遺伝子発現が最もウイルス分離成績との関連性が強く、HHV-6 の活動性感染モニタリング法として有用なことが明らかにされた。
7. FISH法を用いた EBV 関連リンパ増殖性疾患に対する非侵襲診断法の確立: *in situ* hybridization 法と、flow cytometry を組み合わせ、末梢血中の EBV 感染細胞を検出できる flow cytometric *in situ* hybridization (FISH) 法が開発された。移植後リンパ増殖症を含む様々な EBV 関連リンパ増殖性疾患に応用された。FISH 法により患者末梢血中の EBV 感染細胞の定量・同定が可能であり、同法は移植後リンパ増殖症の非侵襲診断および治療効果モニタリングに有用であった。
8. 肝移植後免疫抑制療法下の慢性期における能動免疫療法の有効性についての検討: 肝移植後慢性期の小児における季節性インフルエンザワクチンの安全性と効果に関する研究では、有意な副反応なく安全に施行可能であったが、有効抗体価獲得率は低く、対照の健常児でも同様であった。しかし、接種群における有意な臨床的効果を確認するには至らなかった。また、肝移植後慢性期において、肝内に潜在する HBV の再活性化予防を目的とした HBV ワクチンの安全性と効果を検討した。多くの症例で安全に施行可能であり、若年・女性・ドナー-HBc 抗体価の高い症例で良好な反応が得られたが、移植前に HBV キャリアであった症例では反応が不良であった。
9. 同種造血幹細胞移植後の呼吸器ウイル

ス感染症についての検討: 虎の門病院血液内科において同種造血幹細胞移植が施行された患者 415 人のうち, 何らかの呼吸器症状があった症例で気道分泌物から呼吸器ウイルスが検出された 31 症例について解析した. 20 例が肺炎を発症し, 11 例で上気道炎が認められた. 上気道炎症例は全例軽快したが, 肺炎症例では 12 例が死亡した. 呼吸器ウイルス感染症による死亡に関しては, 危険因子として, 発症時のリンパ球数が低値であること, 好中球生着前の発症であること, 他の微生物による二次感染を生じていることが挙げられた. また, 呼吸器ウイルス感染症は病棟内で流行する傾向があった.

10. 培養によらない細菌・真菌検査法の定量化: 臓器移植患者に起こる感染症を培養によらない細菌・真菌検査法で定量的に検査するため, 一検体中に共存する複数菌種それぞれの菌数を, ひとつの PCR で一度に定量する方法を確立した. また, 常在菌叢中に存在する数の少ない菌種を特異的に増幅するサブトラクション法を確立した. 本研究で確立した方法の臓器移植患者における細菌・真菌感染症の診断や病態生理の解析における有用性を, 臨床検体を用いて評価することが必要と考えられた.
11. 真菌の潜伏感染メカニズムの解明とその検出法に関する研究: 嫌気条件下で培養された *C. neoformans* ATCC90112 株の total RNA を用いた SST-REX 法により, SST クローン総数 286 個, 取得因子 72 個の結果が得られた. これらから計 47 遺伝子が同定された. このうち 42 遺

伝子については細胞表層もしくは分泌蛋白であることが推測された. また機能的には糖代謝に関与すると推測される遺伝子が比較的多く, 機能不明な遺伝子も 16 遺伝子検出された. この SST 法で情報が得られた遺伝子のうちクローン発現数が 22 個と最も多かったものについて抗体作製を試み, 2 種類の抗体候補を得ることが出来た. クリプトコックス属の菌体成分刺激による慢性クリプトコックス感染宿主 T 細胞の interferon γ 産生能に関する研究では, 病理組織像では感染 28 日目では肺, 肝などで菌体を取り囲む様に肉芽腫形成が認められ, 慢性感染を示唆する結果が得られた. クリプトコックス慢性感染マウスモデルが確立された. さらに感染マウスの血中サイトカイン測定では, IFN- γ 量は感染後 14 日目をピークに以後低下し, 120 日後では測定限界以下であった. また TNF- α , IL-12 は有意な値としては測定されなかった. ConA 刺激と比較し, IFN- γ 産生はほとんど認められず, 無刺激コントロールとほぼ同じ値を示した.

D. 考察

我が国では, これまでのところ LCM ウイルスによるヒトの感染症例は報告されていない. しかし, 海外においてはこのウイルス感染症は稀ではなく, 臓器移植関連 LCM ウイルス感染事例が報告されている. 本研究では, 我が国に整備されていない LCM ウイルス感染症の診断法が整備された. これらの成績は, 今後の臓器移植関連感染対策に資するものと考えられる.

造血幹細胞移植を含む臓器移植患者に

においては、ヘルペスウイルスの再活性化による感染症が移植医療の成績を左右する重要な問題である。その代表例が CMV 肺炎や CMV 網膜炎などの臓器感染症である。本研究では、臓器移植患者における CMV 感染症対策のための基礎研究が実施され、抗 CMV 活性や抗 VZV 活性のある新規薬剤の開発と作用機序の解析および *in vivo* imaging システムによる抗ウイルス活性の評価法が開発された。また、薬剤耐性 CMV 感染症の診断のための PML 法の開発と評価がなされた。臨床的研究として、造血幹細胞移植患者における移植後のヘルペスウイルスの再活性化状況が解析された。造血幹細胞移植患者では、移植後早期に CMV の再活性化が高感度リアルタイム PCR 法による検出され、その成績に合わせて治療法が選択されることが可能であることが明らかにされた。HHV-6 に対する細胞性免疫能の IFN- γ ELISPOT 法による測定法が開発された。造血幹細胞移植患者における移植後の VZV に対するリンパ球幼若化試験による細胞性免疫能の低下と回復過程が明らかとなった。これらの検査法から得られる成績は、臓器移植患者の移植後の治療法の選択に有用であることが明らかにされた。臓器移植患者で見られることの多い、EB ウイルス感染症に対する新規診断法 (FISH 法) の EB ウイルス感染症の診断における有用性が評価された。臓器移植患者における EB ウイルスの再活性化による慢性活動性 EB ウイルス感染症や悪性腫瘍性疾患の早期診断に役立つ技術であると考えられる。この様に、臓器移植患者におけるヘルペスウイルス感染症に対する治療と診断に関する幅広い研究がなされた。

感染症は、培養可能な病原体によるとは限らない。むしろ、現状では培養ができない病原体による感染症の方が多くも予想される。本研究では、真菌や細菌に保存されている遺伝子領域を標的とした PCR 法により、培養が不可能な病原体を含む迅速診断法が開発された。また、臓器移植患者における真菌の潜伏感染の診断法開発のための基礎研究 (真菌の潜伏感染メカニズムの解明とその検出法に関する研究) がなされた。クリプトコックス慢性感染マウスモデルも作製された。今後の真菌の潜伏感染に関する研究が推進されることが期待される。

移植患者にとっては、健康人にとっては軽い感染症であるウイルス性気道感染症が致死的事であることが確認された。造血幹細胞移植病棟におけるウイルス性気道感染症の流行に対する予防の重要性が改めて確認された。本研究では、RS ウイルス、パラインフルエンザウイルス、アデノウイルスによる気道感染症について評価されたが、今後はより多くの病原体をウイルス学的に診断するシステムを用いて、前方視的に調査することの重要性が示唆された。

E. 結論

臓器移植患者におけるウイルス性感染症と真菌感染症対策に関する研究がなされた。LCM ウイルス感染症の診断法が整備された。臓器移植患者におけるヘルペスウイルス感染症の早期迅速診断法が開発された。また、ヘルペスウイルス感染症の治療法の開発のための、抗ウイルス薬の探索とその抗ウイルス活性機序の解明、評価法の開発がなされた。薬剤耐性サイトメガロウイルス感染症の迅速診断システム (PML 法)

に関する研究もなされた。臓器移植患者における真菌感染症対策として、培養法によらない網羅的な病原体検出法の開発、真菌の潜伏感染に関する基礎研究がなされた。肝移植患者のけるワクチン投与に対する知見も得られた。本研究では、臓器移植患者における感染症対策のための臨床的研究と基礎研究が有機的に組み合わせられて実施されたことが特徴のひとつである。今後、臓器移植患者における感染症対策と患者の QOL を高めるための研究が求められる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iizuka, I., Saijo, M., Shiota, T., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Hasegawa, H., Sakai, K., Fukushi, S., Mizutani, T., Ogawa, M., Nakauchi, M., Kurane, I., Mizuguchi, M., Morikawa, S.: Loop-mediated isothermal amplification-based diagnostic assay for monkeypox virus infections. *Journal of Medical Virology* 80:1102-1108, 2009
- 2) Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Iizuka, I., Shiota, T., Sakai, K., Ogata, M., Fukushi, S., Mizutani, T., Sata, T., Kurata, T., Kurane, I., Morikawa, S.: Virulence and pathophysiology of the Congo Basin and West African strains of monkeypox virus in nonhuman primates. *Journal of General Virology* 90:2266-2271, 2009
- 3) Nakauchi, M., Fukushi, S., Saijo, M., Mizutani, T., Ure, A.E., Romonowski, V., Kurane, I., Morikawa S.: Characterization of monoclonal antibodies to Junin virus nucleocapsid protein and application to the diagnosis of hemorrhagic fever caused by South American arenaviruses. *Clinical and Vaccine Immunology* 16:1132-1138, 2009
- 4) Saijo, M.: Emerging and re-emerging infection threats to society. *Journal of Disaster Research* 4:291-297, 2009
- 5) Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I.: Diagnostic systems for viral hemorrhagic fevers and emerging viral infections prepared in the National Institute of Infectious Diseases. *Journal of Disaster Research* 4:315-321, 2009
- 6) Morimoto, K., Saijo, M.: Imported rabies cases and preparedness for rabies in Japan. *Journal of Disaster Research* 4:346-357, 2009
- 7) Yagi, T., Hattori, H., Ohira, M., Nakamichi, K., Takayama-Ito, M., Saijo, M., Shimizu, T., Ito, D., Takahashi, K., Suzuki, N.: Progressive multifocal leukoencephalopathy developed in incomplete Heerfordt syndrome, a rare manifestation of sarcoidosis, without steroid therapy responding to cidofovir. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 12:153-156, 2010
- 8) Yamada, S., Nozawa, N., Katano, H., Fukui, Y., Tsuda, M., Tsutsui, Y., Kurane, I., Inoue, N.: Characterization of the guinea pig cytomegalovirus genome locus that encodes homologs of human cytomegalovirus major immediate-early

- genes, UL128, and UL130. *Virology* 391:99–106, 2009
- 9) Yamada, S., Kosugi, I., Katano, H., Fukui, Y., Kawasaki, H., Arai, Y., Kurane, I., Inoue, N.: In vivo imaging assay for the convenient evaluation of antiviral compounds against cytomegalovirus in mice prior to comprehensive analyses. 投稿中
- 10) 大野秀明, 宮崎義継: 微生物の種類別にみた施設内感染制御 3) 真菌 アスペルギルス 医療福祉施設における感染制御と臨床検査. 臨床検査53: 1381–1386, 2009.
- 11) Ueno T, Kaneko K, Katano H, Sato Y, Mazitschek R, Tanaka K, Hattori S, Irie S, Sata T, Ogawa-Goto K.: Expansion of the trans-Golgi network following activated collagen secretion is supported by a coiled-coil microtubule-bundling protein, p180, on the ER. *Experimental Cell Research* (in press)
- 12) Takiyama, A., Wang, L., Tanino, M., Kimura, T., Kawagishi, N., Kunieda, Y., Katano, H., Nakajima, N., Hasegawa, H., Takagi, T., Nishihara, H., Sata, T., Tanaka, S.: Sudden Death of a Patient with Pandemic Influenza (A/H1N1pdm) Virus Infection by Acute Respiratory Distress Syndrome. *Japanese Journal of Infectious Disease* 63:72–74, 2010
- 13) Shintaku, M., Kaneda, D., Tada, K., Katano, H., Sata, T.: Human herpes virus 6 encephalomyelitis after bone marrow transplantation: Report of an autopsy case. *Neuropathology* 30:50–55, 2010
- 14) Nakamura, T., Sato, Y., Watanabe, D., Ito, H., Shimonohara, N., Tsuji, T., Nakajima, N., Suzuki, Y., Matsuo, K., Nakagawa, H., Sata, T., Katano, H.: Nuclear localization of Merkel cell polyomavirus large T antigen in Merkel cell carcinoma. *Virology* (in press)
- 15) Nakajima, N., Hata, S., Sato, Y., Tobiume, M., Katano, H., Kaneko, K., Nagata, N., Kataoka, M., Ainai, A., Hasegawa, H., Tashiro, M., Kuroda, M., Odai, T., Urasawa, N., Ogino, T., Hanaoka, H., Watanabe, M., Sata, T.: The First Autopsy Case of Pandemic Influenza (A/H1N1pdm) Virus Infection in Japan: Detection of a High Copy Number of the Virus in Type II Alveolar Epithelial Cells by Pathological and Virological Examination. *Japanese Journal of Infectious Disease* 63:67–71, 2010
- 16) Kanno, T., Sato, Y., Nakamura, T., Sakamoto, K., Sata, T., Katano, H.: Genotypic and clinicopathological characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection in Japan. *Journal of Medical Virology* 82:400–406, 2010
- 17) Hatano, B., Maki, T., Obara, T., Fukumoto, H., Hagsawa, K., Matsushita, Y., Okutani, A., Bazartseren, B., Inoue, S., Sata, T., Katano, H.: LAMP using a disposable pocket warmer for anthrax detection, a highly mobile and reliable method for anti-bioterrorism. *Japanese Journal of Infectious Disease* 63:36–40, 2010

- 18) Hatano, B., Kojima, A., Sata, T., Katano, H.: Virus detection using viro-adembeads, a rapid capture system for viruses, and plaque assay in intentionally virus-contaminated beverages. *Japanese Journal of Infectious Disease* 63:52-54, 2010
- 19) Tobiume, M., Sato, Y., Katano, H., Nakajima, N., Tanaka, K., Noguchi, A., Inoue, S., Hasegawa, H., Iwasa, Y., Tanaka, J., Hayashi, H., Yoshida, S., Kurane, I., Sata, T.: Rabies virus dissemination in neural tissues of autopsy cases due to rabies imported into Japan from the Philippines: immunohistochemistry. *Pathology International* 59:555-566, 2009
- 20) Takahashi-Makise, N., Suzu, S., Hiyoshi, M., Ohsugi, T., Katano, H., Umezawa, K., Okada, S.: Biscoclaurine alkaloid cepharanthine inhibits the growth of primary effusion lymphoma in vitro and in vivo and induces apoptosis via suppression of the NF-kappaB pathway. *International Journal of Cancer* 125:1464-1472, 2009
- 21) Katano, H., Ito, H., Suzuki, Y., Nakamura, T., Sato, Y., Tsuji, T., Matsuo, K., Nakagawa, H., Sata, T.: Detection of Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma and Kaposi's sarcoma. *Journal of Medical Virology* 81:1951-1958, 2009
- 22) Hoshino, Y., Katano, H., Zou, P., Hohman, P., Marques, A., Tying, S.K., Follmann, D., Cohen, J.I.: Long-Term Administration of Valacyclovir Reduces the Number of Epstein-Barr Virus (EBV)-Infected B Cells but Not the Number of EBV DNA Copies per B Cell in Healthy Volunteers. *Journal of Virology* 83:11857-11861, 2009
- 23) Dewan, M.Z., Tomita, M., Katano, H., Yamamoto, N., Ahmed, S., Yamamoto, M., Sata, T., Mori, N., Yamamoto, N.: An HIV protease inhibitor, ritonavir targets the nuclear factor-kappaB and inhibits the tumor growth and infiltration of EBV-positive lymphoblastoid B cells. *International Journal of Cancer* 124:622-629, 2009
- 24) Dabaghmanesh, N., Matsubara, A., Miyake, A., Nakano, K., Ishida, T., Katano, H., Horie, R., Umezawa, K., Watanabe, T.: Transient inhibition of NF-kappaB by DHMEQ induces cell death of primary effusion lymphoma without HHV-8 reactivation. *Cancer Science* 100:737-746, 2009
- 25) Cheng, B., Martinez, F.P., Katano, H., Tang, Q.: Evidence of inability of human cytomegalovirus to reactivate Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus from latency in body cavity-based lymphocytes. *Journal of Clinical Virology* 46:244-248, 2009
- 26) Oda, M., Isoyama, K., Ito, E., Inoue, M., Tsuchida, M., Kigasawa, H., Kato, K., Kato, S.: Survival after cord blood transplantation from unrelated donor as a second hematopoietic stem cell transplantation for recurrent pediatric acute myeloid leukemia. *International Journal of Hematology* 89:374-382, 2009