

数も長く、蛍光強度そのものも GFP より弱かった。これは、EGFP が単量体でも蛍光を発すのに対して、DsRed2 が 4 量体を形成して初めて蛍光を発するため、細胞内の蛋白濃度があるレベルになるまでに時間的な遅れが生じるためと考えられる。

#### 5) GCV を用いた in vivo imaging の有効性の証明

$2 \times 10^6$  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(ip)もしくは皮下(sc)に投与し、in vivo imaging で感染阻害を検討した。図 3A に示すように、腹腔内 50mg/kg 投与では部分的に、腹腔内 100mg/kg や皮下 50mg/kg では、完全に MCMV-GFP の増殖を阻害した。

#### 6) DPPC の評価

DPPC は小動物の CMV 増殖も阻害する抗 CMV 化合物で、細胞毒性も見られなかったことから、有望な抗 CMV 化合物である。そこで、in vivo imaging により個体レベルでの有効性を検討した。図 3B に示すように、腹腔内投与では効果が見られないものの、皮下 50mg/kg DPPC 投与で、一定の抗ウイルス効果があった。図 3C に示すように、DPPC の抗ウイルス効果は、HR1 マウスでも確認された。

#### 3. GCV 耐性が疑われた臨床材料の検討

移植後 GCV 治療が 3 ヶ月(1 例)及び 2 週間(2 例)奏功しない症例の血液検体について、検体から直接、耐性に関与する UL97 及びポリメラーゼ遺伝子断片を増幅し塩基配列を決定したが、いずれの場合にも、薬剤耐性に関与する、もしくは関与が解析されていない塩基置換はみいだされなかった。また、2 例については、細胞培養レベルでも GCV 耐性を示さなかった。残りの 1 例は、検体が冷凍保存されていたため、ウイルス分離ができる状態ではなかった。

#### D. 考察

非核酸アナログで次世代の抗 CMV 薬として最も期待されていた Maribavir が第 3 相臨床試験中に有効性が不十分として開発が中止されたため、第 2 相臨床試験で効果を検討できるような CMV に

対する薬剤の開発ができていない。一方で、移植症例の増大する中で、現行治療薬のバックアップとなる薬剤が求められている。こうした状況の中で、新たな抗ウイルス薬の標的やリードとなり得る化合物を探索し、その実用化の可能性を提示することの意義は大きいと考える。今年度は、同定した新規抗 VZV 化合物 2 種類が現行薬剤より細胞培養レベルで優れたものであることや新規抗 CMV 化合物を迅速に個体レベルで評価できる系を確立することができた。今回確立した In vivo imaging による評価は、毒性や薬物動態などの解析を行うことはできないが、培養細胞レベルで選定された多数の候補化合物を迅速に絞り込むことにより、効率的な抗 CMV 薬の開発が可能になると思われる。本年度は、マウスモデルでの評価法を検討したが、同様な解析をよりヒトに近いモルモットで行えるようにすることで、CMV のみならずモルモットでの増殖が知られるワクチン株を用いることで VZV についても検討が可能となると思われる。

今回の検討の中で、我々のグループが抗 CMV 活性を同定した化合物 DPPC は、in vivo imaging で AUC として 50% 程度の阻害効果を示した。この結果は、図 2B に示した接種ウイルス量との対応関係を前提にすると、10 から 100 分の 1 の接種ウイルス量程度まで感染を抑制していることとなる。今後、周辺化合物を用いた構造活性相関、個体での毒性・薬物代謝などの検討が求められる。

#### E. 結論

- 1) 同定した新規抗 VZV 化合物 2 種類が現行薬剤より細胞培養レベルで優れることを示した。
- 2) 新規抗 CMV 化合物を迅速に個体レベルで評価できる in vivo imaging 系を確立した。
- 3) 新規抗 CMV 化合物 DPPC が、今後さらに研究に値することを示した。

#### F. 健康危険情報

該当項目なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

2) 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

## 2. 学会発表

1) Yamada, S., Kosugi, I., Shindo, K., Fukui, Y., Katano, H., Yashiro, K., Higashi, C., Tsuda, M., Kurane, I., Inoue, N. Screening and characterization of chemical compounds that inhibit early phase of CMV and VZV infections. 第14回国際ヘルペスウイルス感染症学会, 大阪(2009.10)

2) Yamada, S., Kato, M., Katano, H., Fukui, Y., Tsuda, M., Tsutsui, Y., Nozawa, N., Kurane, I., Inoue, N. Characterization of guinea pig CMV GP129 and GP131, orthologs of HCMV UL128 and UL130, which are essential for efficient viral growth in vivo but not in vitro. 第14回国際ヘルペスウイルス感染症学会, 大阪(2009.10)

3) 井上直樹, 神道慶子, 福井良子, 永野瑛子, 倉根一郎, 山口十四文: 水痘帯状疱疹ウイルス及びサイトメガロウイルスの前初期蛋白による転写活性化機能を阻害する抗ウイルス化合物の解析 第19回抗ウイルス療法研究会, 東京(2009.6)

4) 山田壮一, 小杉伊三夫, 片野晴隆, 倉根一郎, 井上直樹: GFP組換えマウスサイトメガロウイルスを用いた in vivo imaging による抗ヘルペスウイルス薬 in vivo 評価系の確立 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

表1 抗 VZV 化合物の抗 HSV1 効果

化合物	DNA量(%)	
	VZV	HSV
DMSO	(100)	(100)
133G4	0.0	23.0
141B3	12.4	106.4
28A3	13.7	56.6
35B2	15.6	50.4
31G3	16.3	25.0
26F11	16.9	77.9
170G4	17.0	28.5
45B5	22.1	77.4
192C8	22.8	63.7

図1 組換え MCMV とイメージングの再現性

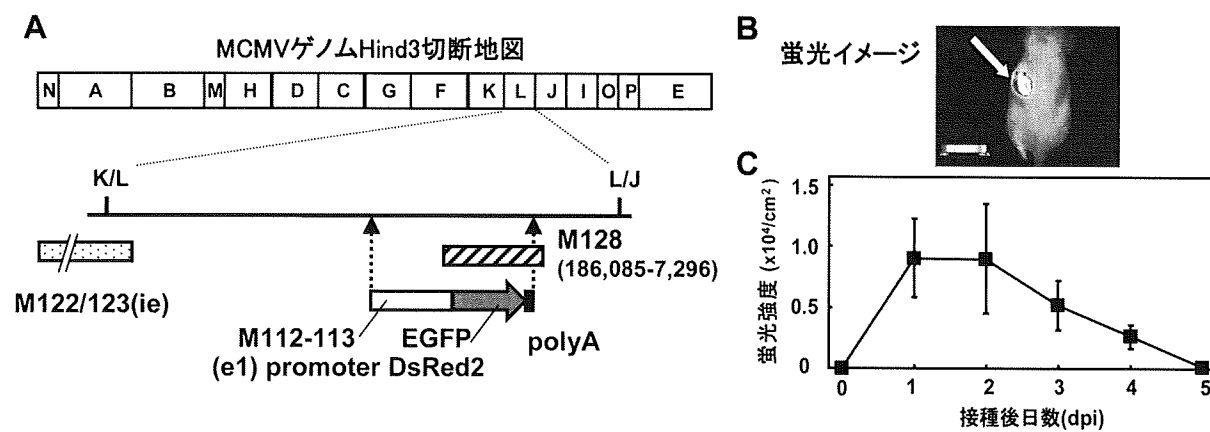


図 2 イメージングの定量性

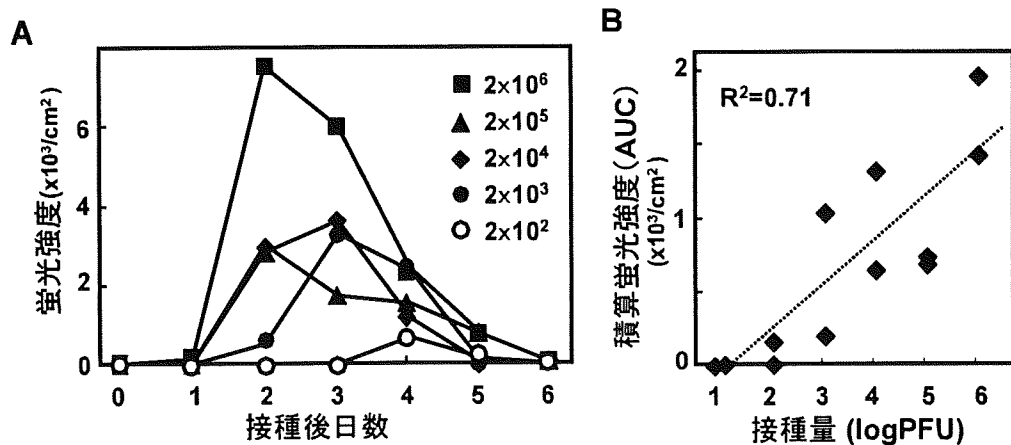
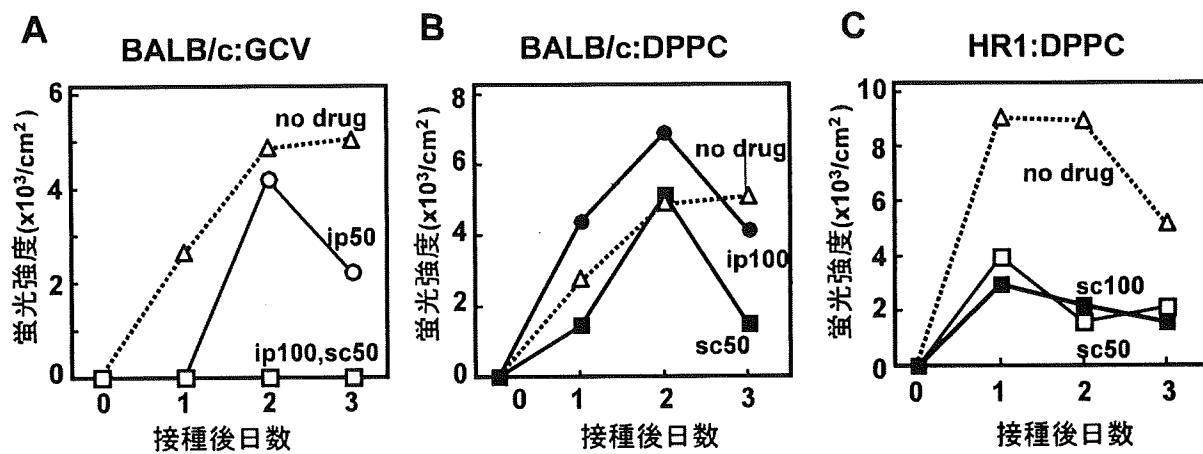


図 3 薬剤効果のイメージングによる評価



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)

研究分担者研究報告書

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(H21-新興-一般-009)

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

研究分担者	大野秀明	国立感染症研究所	生物活性物質部	室長
研究協力者	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	室長
	宮崎義継	国立感染症研究所	生物活性物質部	部長
	岡部智也	(株)ACTGen		

研究要旨:臓器移植に合併する深在性真菌症の予後は比較的不良であり、致死率も高い。このような背景から臓器移植時に合併しやすい真菌症に対し、新たな予防、診断、治療法の開発を念頭に、本年度は深在性真菌症の原因真菌の一つであるクリプトコックス属について、その潜伏感染診断系の研究を行った。第一として、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を継続している。第二として、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  $\gamma$  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。今回のわれわれの検討では glucuronoxylomannan は記憶抗原ではない可能性が示唆された。

A. 研究目的

高度先進医療の発達に伴い、それに合併する日和見感染症としての深在性真菌症対策は医療現場において重要な位置を占めるものと考えられる。とくに臓器移植患者に合併する侵襲性真菌感染症では死亡率も高い

と報告されており、今後のわが国での移植医療においても真菌症対策は避けては通れない問題である。

米国の移植医療に合併する真菌感染症の大規模疫学調査では、固形臓器移植に合併した真菌症の原因真菌ではカンジダ属、ア

スペルギルス属、クリプトコックス属の順に多く、造血幹細胞移植ではアスペルギルス属、カンジダ属、接合菌が多く認められている。中でもアスペルギルス属、カンジダ属で全体の70%以上を占めることから、これらの真菌感染症に対する予防を含めた総合的な対策の必要性は極めて高い。さらに近年、クリプトコックス属においてはヒトにおいて潜伏感染が認められることが明らかとなり、臓器移植後に発病するクリプトコックス症の大部分が、移植前に感染した菌の再活性化によると報告されている。ことから、臓器移植に合併するクリプトコックス症では、移植前の感染診断がその後の移植医療の成否の鍵を握るものとも考えられる。

以上の背景のもと、本年度の研究では移植医療に合併する深在性真菌症や原因真菌の諸問題のうち、クリプトコックス属の潜伏感染検出系の開発を通じて移植医療における患者の予後の改善に寄与することを目的とした。

## B. 研究方法

1. 真菌の細胞表面蛋白・分泌蛋白の同定  
本研究の遂行にあたり、基盤的研究として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。

### 1)クリプトコックス属 RNA 抽出

*Cryptococcus neoformans* ATCC90112 株を 100 ml の brain heart infusion (BHI) 液体

培地 (pH7.4) で 24 時間培養し、遠心にて集菌後 1 回洗浄を行った。その後等量の BHI 培地に再懸濁し、500 ml のカルチャーボトルへ注入し、嫌気ジャーにカルチャーボトルを蓋を開放したままの状態に収納した後、アネロパック®(三菱ガス化学)を添えジャーを密封した。カルチャーボトルを収納した嫌気ジャーを 37°C で 14 時間ゆっくりと攪拌しながら培養したのち、集菌を行い ISOGEN(ニッポンジーン)を用いて total RNA を抽出した。

### 2) SST-REX 法

トランスフェクション：抽出した *C. neoformans* total RNA から cDNA を作成し、MPL<sup>V</sup>を含む発現ベクターを用いて cDNA ライブラリーを作成した。リポフェクチンを用いてマウス由来 BAF 細胞にトランスフェクションし、自律増殖可能な細胞をスクリーニングした。増殖可能な細胞からトランスフェクションにより導入したベクター配列を確認し、*C. neoformans* 由来遺伝子と推定される遺伝子断片のシーケンスを行った。

さらに得られた SST クローンの一部については、マウスに免疫した後、マウスのリンパ節細胞を用いてハイブリドーマを作製し、SST クローンに対する抗体作製を試みた。

2. 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  $\gamma$  産生能の検討。

1)クリプトコックス属の mannoprotein (MP), glucuronoxylomannan (GXM), galactoxylomannan (GalXM) の分離抽出

供試菌株として同様に *C. neoformans*

ATCC90112 株を使用した。これら多糖や糖蛋白の分離抽出法は Wozniak らの方法 (Wozniak KL, Levitz SM. Isolation and purification of antigenic components of *Cryptococcus*. Host-pathogen interactions. P71-83, Humana Press, Totowa NJ, 2008) に準じて行った。

## 2) クリプトコックス慢性感染マウスモデルの作製

*C. neoformans* ATCC90112 株  $4.3 \times 10^3$  CFU/mouse の菌量を, C57BL/6J マウス (約 14 週令) の尾静脈より感染させた。感染後 14 日, 28 日, 120 日について臓器菌数 (肺, 肝, 脾, 脳), 病理組織像, 血中サイトカイン等について検討を行った。血中サイトカインについては IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 を中心に ELISA 法 (BD Bioscience) で測定した。

## 3) 菌体成分刺激による慢性クリプトコックス感染マウス T 細胞からの IFN- $\gamma$ 産生能の検討

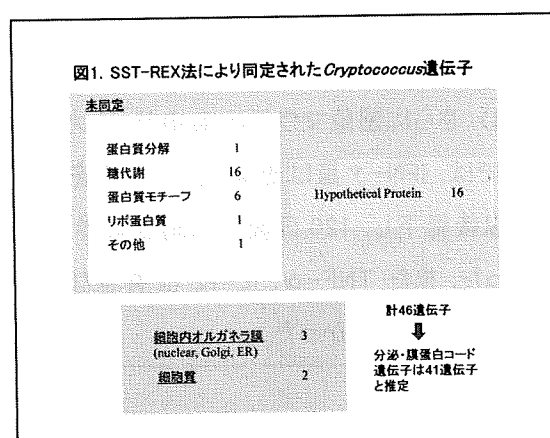
*C. neoformans* ATCC90112 株 感染後 120 日目の C57BL/6J マウスから採取したヘパリン加採血血液と GXM (3  $\mu$ g), ConA (20  $\mu$ g) と混合し, 18 時間 37°C で培養したあと血漿中の IFN- $\gamma$  量を ELISA 法で測定した。コントロールとして無刺激の血液を設定した。

## C. 研究結果

### 1. クリプトコックス属の細胞表層蛋白・分泌蛋白の同定

嫌気条件下で培養した *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, これらから計 47 遺伝子が同定された (図 1)。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。

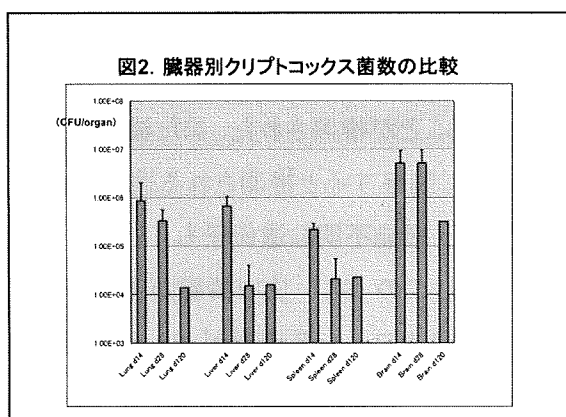


### 2. クリプトコックス属の菌体成分刺激による慢性クリプトコックス感染宿主 T 細胞の interferon $\gamma$ 産生能の検討

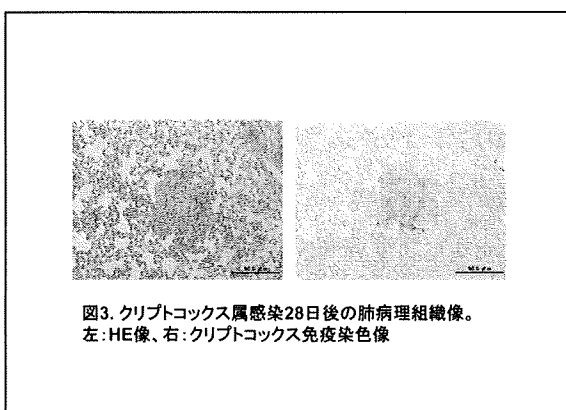
Wozniak らの方法に準じ *C. neoformans* ATCC90112 株より MP, GXM, GalXM をそれぞれ分離抽出した。

一方, *C. neoformans* をマウスに尾静脈を通じ感染させたマウスでは, 生存率に関しては途中死亡するマウスも認められたが, 半数以上は感染後 120 日まで生存することが確認された。各臓器からの分離菌数では感染 14 日後では  $10^5 \sim 10^6$  CFU/oragan の菌が分離されるが, その後分離菌数は低下傾向を示し, 120 日後では  $10^4$  CFU/oragan 程度を示

した(図 2)。



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(図 3)。さらに感染マウスの血中サイトカイン測定では, IFN- $\gamma$ 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- $\alpha$ , IL-12 は有意な値としては測定できなかった。



以上の結果を踏まえ, 感染 120 日目のマウスの全血をまず GXM と混合培養し, 18 時間後の血漿中の IFN- $\gamma$ を測定したが, 今回は ConA 刺激と比較し, IFN- $\gamma$ 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

臓器移植に伴う免疫不全状態は深在性真菌症のリスクファクターの一つであり, 一旦発病すると致死率も高いなど移植医療現場にとって常に考慮しなければならない合併症である。米国のデータでもあり, 臓器移植に合併する深在性真菌症の原因真菌の上位2つはアスペルギルス属, カンジダ属であり, おそらくわが国でも同様の傾向であると思われる。これらの真菌は環境中に普遍的に存在する(アスペルギルス属), 体内に常在する(カンジダ属), などからその感染対策は容易ではない。一方, クリプトコックス感染症の臓器移植での合併は全体の 10%弱程度と報告されているが, 播種型など重症型が多く死亡率も 40%にのぼる。さらにクリプトコックス属は潜伏感染することが次第に明らかとなっており, 移植後に発病し, はじめて本菌に感染していたことが判明する症例もある。

これら原因真菌に対する感染対策を考慮した場合, 環境からの感染防止など院内感染対策の強化, 宿主免疫能の回復はもとより, 菌側の病原因子, 発病に至るプロセスの阻害なども有効と考える。本年度の研究対象としては数ある真菌の中でも移植後合併感染症, 潜伏感染を念頭にクリプトコックス属に焦点を当て, 本菌の潜伏感染状態の検出法について検討した。

一般的に, クリプトコックス症は発病していれば GXM 抗原検出法により大部分の症例は診断が可能である。しかし, 体内で潜伏感染状態を検出, 診断できる方法は皆無に等しい。抗体検出法も単なる過去の感染か否かの鑑別は出来ない。そこで今回我々は



SST-REX 法を用いて、クリプトコックス属が分泌する蛋白を高感度で検出することで潜伏感染を検出することが可能かの検討に着手した。菌の RNA 抽出における培養条件としては、潜伏感染状態は比較的低酸素下条件にあると考え、低酸素での RNA 発現をもとに SST-REX 法を行った。本研究では計 286 個のクローンから約 40 個の遺伝子が同定されたが、約 1/3 が何らかのモチーフを持つと考えられ、実際に分泌が予想され、その機能がまだ未解明な蛋白質と考えられるものも認められた。今回はこの中から新規抗原となりうるものの選択を行ったが、選択にあたっては得られたクローン数を参考にした。また、現在まで 2 つの抗体が得られており、現在これらの抗体について、ELISA 系への応用や抗真菌活性の検討などを行っている。

一方、上記方法とは別にクリプトコックス症の病態が結核症と同様に慢性感染病態や Th-1 系優位の肉芽腫形成性疾患であることを考慮し、菌体成分を抗原として用いて宿主メモリー T 細胞を刺激することにより、IFN- $\gamma$  の産生の有無で感染状態が鑑別できないかについて検討した。本方法は結核症ではすでに実用化されているが、クリプトコックス症においては、菌体成分のうち何が良い抗原となりうるのか、特異的な抗原は何か、などの問題を解決することが必要である。またこれとともに、本検討のためにはマウス慢性感染モデルを作製することも必要であり、これら基礎検討を本年度の課題とした。今回の検討では、我々が用いた方法でクリプトコックス慢性感染モデルの作成が可能であることが

わかり、慢性感染病態としての評価が可能であると考えられ、今後各方面の検討に応用する予定である。また、今回はマウスの全血を用いて GXM 刺激での IFN- $\gamma$  産生能について検討したが、有意な産生が認められなかったことはマウスの細胞においては荚膜多糖は記憶抗原としての可能性が低いと考えられ、ヒトでも同様ではないかと考えられた。今後は順次 MP 等その他の菌体成分での検討や全血を用いない方法等についての検討を予定している。

#### E. 結論

1) クリプトコックス属に対し SST-REX 法を応用し、細胞表層蛋白・分泌蛋白の同定を行ったところ、約 40 個の蛋白遺伝子が検出された。またこのうちの一つにつき抗体作製を試み、新規診断系や抗真菌活性についての検討を行っている。

2) 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  $\gamma$  産生能の検討において、GXM は記憶抗原ではない可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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.

## 2.学会発表

- 1) 田辺公一, 山越 智, 大野秀明, 宮崎義継: 血清による *Candida albicans* の azole 系抗真菌薬感受性の変化の検討. 第 56 回日本化学療法学会東日本支部総会, 東京(2009. 10)
- 2) 大野秀明: 真菌性髄膜炎に対する抗真菌薬療法: 第 14 回日本神経感染症学会総会, 宇都宮(2009. 10)
- 3) 大川原明子, 山越 智, 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継: *C. albicans* 細胞壁表層のマンナン構造の違いによる初期免疫応答の解析. 第 83 回日本感染症学会総会, 東京(2009. 4)
- 4) Ishida-Okawara A, Ohno H, Yamagoe S, Kaneko Y, Niimi M, Miyazaki Y. Evaluation of mycological character and early immune response against different structures of cell surface mannan of *Candida albicans*. 109<sup>th</sup> General Meeting, American Society for Microbiology,

Philadelphia (2009. 5)

- 5) Ishida-Okawara A, Ohno H, Yamagoe S, Kaneko Y, Niimi M, Miyazaki Y. Characterization of mycological features of putative  $\alpha$ -type mannosyltransferase deleted *Candida albicans*. The 17<sup>th</sup> Congress of The International Society for Human and Animal Mycology, Tokyo (2009. 5)
  - 6) Kaneko Y, Ohno H, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. Effects of antifungal combinations against *Candida* biofilms and stress response. 49<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco (2009. 9)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

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)  
分担者研究報告書

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(H21-新興-一般-009)

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

研究分担者	片野晴隆	国立感染症研究所感染病理部 室長
研究協力者	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

研究要旨

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予備試験として, *in vitro* 感染血液細胞を用いて以下の検討を行った。まず, 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予想された。

A. 研究目的

ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)は免疫抑制下の造血幹細胞/臓器移植患者にしばしば重篤な症状を引き起こし, 移植医療において継続的なモニタリングが必須な感染症のひとつである。その予防的対策の重要性から CMV に対する抗ウイルス薬の長期投与が行われる頻度が高い。現在使用されている抗ウイルス薬による治療効果は免疫状態に左右され, 頻度は高くないものの, 耐性ウイ

ルスが一定の確率で出現する。このため, 抗ウイルス治療の効果が低い場合には薬剤耐性ウイルスの鑑別が重要である。また, CMV の潜伏, 再活性化などの機構はほとんど解明されておらず, *in vivo* における CMV 感染動態を解析するツールの開発も重要な課題である。

従来の phenotypic な薬剤感受性試験はウイルス分離に長時間を必要とすることから移植医療現場では実用性に乏しかった。我々

が開発した新規検出系である PML 法(参考文献1)は、ウイルス分離を必要とせず、phenotypic な薬剤感受性検査を従来法に比して大幅に短縮して提供できる可能性がある。本研究では移植医療現場において実用性があり、かつ信頼度の高い迅速な phenotypic な抗 CMV 薬に対する薬剤感受性試験法の開発を目的とする。これまでに我々は、PML 法を用いて PBMC 由来の子孫 CMV を SE/15 細胞の系で検出できること、ウイルス初期抗原である UL44 が CD14 陽性細胞で検出されたことから、CMV が単球/マクロファージ系細胞に感染していることを明らかにしてきた。臨床血液検体を試料として用いる場合は試料量などの問題から感度の改善が必須であると予想される。これらの目的を達成するために今年度は、本法を利用した感受性試験のプロトコルを確立し、血液細胞を用いて感度と迅速性を向上させる条件を検索した。

## B. 研究方法

CMVゲノム陰性の健常人より分離した末梢血単核球(PBMC)に *in vitro* で CMV 臨床分離株を感染させ、以下の検討を行った。

1. ウイルスおよび抗ウイルス剤: 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 分離株の一部の株では線維芽細胞での継代を繰り返すことによりウイルスゲノムの一部が変異/脱落して血球細胞への感染価が弱まる可能性が知られているため、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。用いる薬剤として抗 HCMV 剤であるガンシクロビル(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。

2. 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(参考文献1)。即ち、*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。
3. PML 法における感度向上、最適化のための条件検討は、CaCl<sub>2</sub>、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。

## C. 研究結果

1. ウイルス株の選択と培養プロトコルの決定。臨床分離株 41 株のうち PBMC への感染性を保持していた PBMC(+)株は 24 株、感染性が認められなかった PBMC(-)株は 17 株であった。以下の検討には PBMC(+)株のうち、感染価の比較的高いものを使用した。これらの PBMC 指向性を保持した CMV 臨床分離株を *in vitro* で PBMC へ感染させた感染 PBMC 細胞を用いて、PML法の検出用細胞株

である SE/15 細胞と共培養する際の細胞密度、量比、細胞添加時間などの各種条件を検討し、プロトコールを決定した。臨床感染試料は様々な複製段階に進んだウイルスの混合物であり、培養開始時において抗ウイルス剤(GCV)の作用点を通過後のウイルスも含まれると予想される。その影響を最小限に抑えるため、SE/15 細胞は感染3日後に添加した。図1には6種類のCMV臨床分離株(GCV感受性株)を GCV 存在下、非存在下で用いた場合の陽性細胞数の推移を示した。全ての株において GCV 存在下では陽性細胞は検出されずに、GCV 非存在下のみで感染7-8日後に陽性細胞数はピークを示した。このことから in vitro 感染 PBMC と SE/15 細胞を約一週間、共培養することで、ウイルス複製サイクル依存的に子孫ウイルスが検出可能であることが確認された。

2. PML 法による GCV 感受性株と耐性株の判別。これまでに線維芽細胞を用いた系では、PML 法を薬剤感受性試験の評価系として採用できることを報告しているが(参考文献1)、PBMCでも GCV 耐性株が判別できるかどうかを検討した。その結果、GCV 耐性株を用いた場合、感染後7日後から GCV 存在下においても陽性細胞が検出された(図2)。更に確認のため、GCV 感受性株12種、耐性株4種のウイルスを用いて 0-10  $\mu\text{M}$  の GCV 存在下で実験を行った。図3に示したように3  $\mu\text{M}$  または5  $\mu\text{M}$  GCV 存在下、耐性株4種全

てで陽性細胞が検出された。陽性細胞数は GCV と比して有意に多いことから、PBMC でも PML 法による薬剤阻害効果の判定が可能であることを確認した。

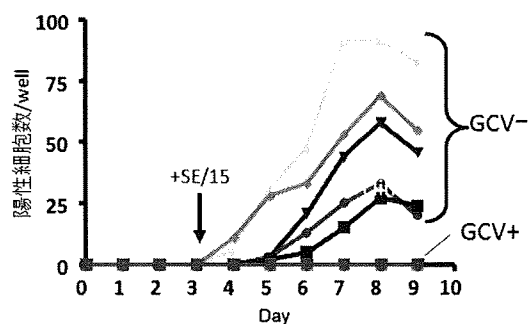


図1・In vitro 感染 PBMC におけるウイルス複製サイクル依存的な子孫ウイルス(陽性細胞)の検出

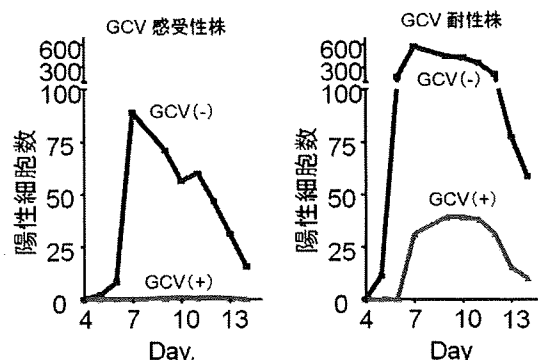


図2. PBMC における GCV 感受性の判別

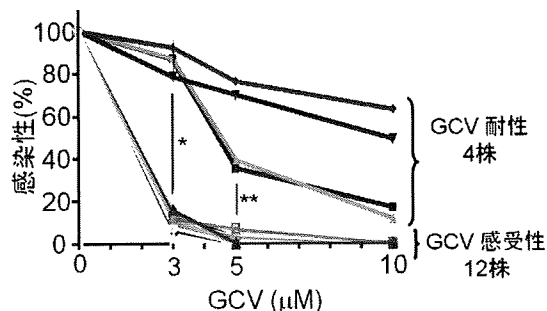


図3. PBMC における薬剤阻害効果の判定  
\*: $P<0.01$ , \*\*: $P<0.05$  感染性は0  $\mu\text{M}$  GCV の陽性細胞数を 100%として記載した。

### 3. 感度向上のための条件検討.

CaCl<sub>2</sub>, トリコスタチン A, デキサメタゾンなどの各種薬剤が線維芽細胞, 上皮細胞における CMV の複製を促進することが知られているが, PBMC における効果は不明であった. これらの薬剤のうち PBMC への効果が高いものを選択するため検討した. その結果, デキサメタゾンが血液細胞での CMV 複製過程において効果的に陽性細胞数を上昇させることを見出した. 試験に供した株間でその効果の程度に差が見られたものも, ほぼ全例において上昇効果が認められた. また, デキサメタゾンの濃度を検討して 5 μM で多くの株において感染価を最も効率よく上昇させたことから, 至適濃度を 5 μM と決定した. この濃度において細胞障害性も示さないことを確認した.

次にデキサメタゾン添加が PBMC 感染時に CMV 臨床分離株の GCV 感受性に影響を与えるかどうか検討した. 図5に示したように, GCV 感受性の20株は 10 μM GCV 存在下で陽性所見は示さないが, GCV 耐性4株の感染価はデキサメタゾンの添加の有無によりほとんど変化せず, GCV 感受性には影響を及ぼさないことを確認した.

デキサメタゾン添加が, ウイルス複製効率を上昇させることより, 更に陽性細胞検出までの時間短縮を可能とするかどうか検討した. デキサメタゾン添加, 非添加の条件で図1と同様の時間経過を追跡した検討を行ったところ, GCV 感受性株, 耐

性株ともに, 陽性細胞数のピークが9日目から7日目へと約2日間早く検出できることが判明した. この傾向は, GCV 存在下で GCV 耐性株を試験した場合も同様であり, デキサメタゾン添加が PBMC からの子孫ウイルスの検出時間を短縮させることが確認された.

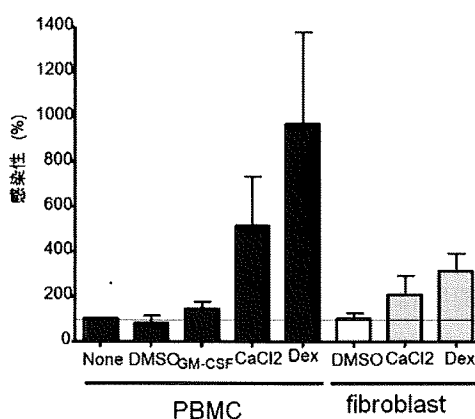


図4. PBMCにおけるCMV臨床分離株の複製に対するデキサメタゾンによる効果(薬剤は以下の濃度を使用した. DMSO:0.5%, GM-CSF:100ng/ml, CaCl<sub>2</sub>: 2mM, Dex:10μM, 感染性は薬剤未使用時の陽性細胞数を100%として記載した).

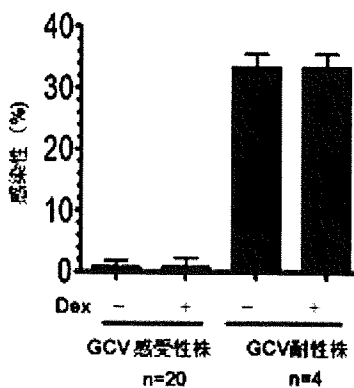


図5.GCV 感受性に対するデキサメタゾン添加の効果

#### D. 考察

以上のように in vitro 感染血液細胞を用いた試験から、ウイルス分離を要せずに phenotypic な薬剤感受性検査の実施可能性が示された。また、今回の研究から感染価の低い臨床分離株の血液細胞での感染動態を特異的かつ高感度に検出できることが判明した。これらの試験では  $10^6$  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予想された。今後は臨床血液試料を用いて in vivo 感染血液細胞での実施可能性を検討する予定である。また臨床検体使用時には、更なる感度上昇と試験期間短縮のため使用細胞種(単核球または多形核白血球など)の検討を含め様々な条件検討を引き続き行うことも重要と考えられる。

また、これらの研究結果より血液細胞での CMV 臨床分離株の感染動態を特異的かつ高感度に検出するという点において PML 法が大変有用であることが明らかとなった。このことは PML 法を用いて in vivo 感染 CMV の感染動態を高感度に追跡できる可能性を示唆しているものと考えられる。CMV の潜伏、再活性化などその機構が十分解明されていない課題について重要な情報を提供しうる解析ツールとしての応用可能性も検討すべきと考えられる。

#### E. 結論

PML 法により CMV 臨床分離株の迅速な薬剤感受性試験を確立するための予備試験として in vitro 感染末梢血単核球細胞を用いて

プロトコールを決定し 実施可能性を確認した。

#### 参考文献

1. Ueno, T., Eizuru, Y., Katano H., Kurata, T., Sata, T., Irie, S., and Ogawa-Goto, K. (2006) *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 2806-2813

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1.論文発表

- 1) 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. *Exp Cell Res* (in press)
- 2) 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. *Jpn J Infect Dis* 63:72-74, 2010
- 3) Shintaku M, Kaneda D, Tada K, Katano H, Sata T. Human herpesvirus 6 encephalomyelitis after bone marrow transplantation: Report of an autopsy

- case. *Neuropathology*. 30:50–55, 2010
- 4) 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)
  - 5) 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. *Jpn J Infect Dis*. 63:67–71, 2010
  - 6) 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. *J Med Virol*. 82:400–406, 2010
  - 7) Hatano B, Maki T, Obara T, Fukumoto H, Hagiwara 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. *Jpn J Infect Dis*. 63:36–40, 2010
  - 8) 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. *Jpn J Infect Dis* 63:52–54, 2010
  - 9) 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
  - 10) 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. *Pathol Int* 59:555–566, 2009
  - 11) 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- $\kappa$ B pathway. *Int J Cancer*. 125:1464–1472, 2009
  - 12) 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. J Med Virol 81:1951-1958, 2009
- 13) Hoshino Y, Katano H, Zou P, Hohman P, Marques A, Tyring SK, Follmann D, Cohen JI. 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. J Virol. 83:11857-11861, 2009
- 14) Dewan MZ, 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. Int J Cancer. 124:622-629, 2009
- 15) 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 Sci 100:737-746, 2009
- 16) Cheng B, Martinez FP, Katano H, Tang Q. Evidence of inability of human cytomegalovirus to reactivate Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus from latency in body cavity-based lymphocytes. J Clin Virol 46:244-248, 2009
- 2.学会発表
- 1) Ueno, T., Katano H, Yamamoto, H., Taniguchi, S., Eizuru, Y., Sata, T., Ogawa-Goto, K. :Establishment of rapid phenotypic susceptibility testing for anti-HCMV drugs using PML assay. 14<sup>th</sup> International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections, Kobe, Japan (2009. 10)
- 2) 上野智規, 栄鶴義人, 片野晴隆, 佐多徹太郎, 後藤希代子: PML法を用いた HCMV 臨床分離株の細胞指向性の解析 第 24 回ヘルペスウイルス研究会, 三島 (2009. 7)
- H. 知的財産権の出願・登録
1. 特許取得  
特許 第4299724号「ヘルペスウイルス前初期遺伝子産物の検出方法」発明者:上野智規, 後藤希代子, 入江伸吉, 片野晴隆, 佐多徹太郎
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

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)  
分担者研究報告書

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(H21-新興-一般-009)

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

研究分担者 加藤俊一 東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学 教授

研究要旨: 病原体側と宿主側の両方から移植後の感染症と感染免疫を正確かつ定量的にモニタリングすることにより, より特異的な治療や予防を行うことが可能となり移植後の感染症による死亡の低下に結びつけられるようになった。

A. 研究目的

臓器移植や造血細胞移植においては移植後の免疫不全状態に起因する易感染性により種々の感染症が多発すると同時に重症化しやすい。本研究の目的は移植後の感染症と感染免疫反応について詳細に把握し, 移植関連死亡の低下と QOL の向上を目指すことにある。

B. 研究方法

造血細胞移植におけるウイルス感染症と真菌感染症について以下のような検討を行った。

1. 病原体検索

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。

2. 宿主側の免疫反応

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。

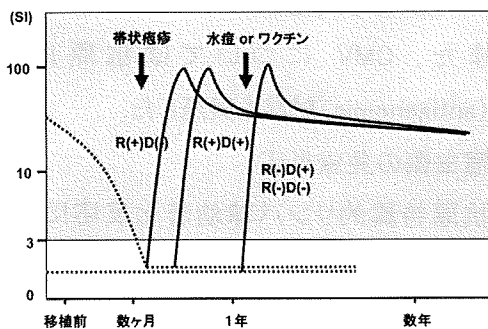
C. 研究結果

1. 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。
2. CMV においてはリアルタイム PCR の増

加が先行し、抗原血症において陽性となった時点において早期治療が開始され、CMV 感染症が重症化することはなかった。

3. EBV においては抗リンパ球グロブリン (ATG) 使用例で再活性化が多い傾向が認められ、リアルタイム PCR 著増例や移植後リンパ球増殖性疾患 (PTLD) 発症例においてはリツキサンの投与を行うことにより致命的な転帰を回避できた。
4. VZV においては VZV 特異的リンパ球幼若化反応により VZV に対する特異的な細胞性免疫の回復を正確に把握することが可能で、移植後のアシクロビル投与と中止の時期の判断に役立った。

造血幹細胞移植後の VZV-LPR



R: レシピエント (患者), D: ドナー

(+): 移植前に水痘の既往あり, (-): な

し

- 1) 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する。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。

- 2) 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-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。

#### D. 考察

病原体側の検索としてウイルスについてはほぼ網羅できたが、真菌類の精緻で迅速な検索方法を開発する必要がある。

宿主側の抗原特異的免疫反応として、HHV-6 に対する細胞性免疫の評価法の開発が望まれる。

#### E. 結論

病原体側と宿主側の両方から移植後の感染症と感染免疫を正確かつ定量的にモニタリングすることにより、より特異的な治療や予防を行うことが可能となり移植後の感染症による死亡の低下に結びつけられるようになった。

#### F. 健康危険情報

本研究による健康被害はなかった。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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. *Int J Hematol* 89:374-82, 2009.
- 2) Yazaki M, Atsuta Y, Kato K, Kato S, Taniguchi S, Takahashi S, Ogawa H, Kouzai Y, Kobayashi T, Inoue M, Kobayashi R, Nagamura-Inoue T, Azuma H, Takanashi M, Kai S, Nakabayashi M, Saito H; Japan Cord Blood Bank Network. Incidence and risk factors of early bacterial infections after unrelated cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 15:439-46, 2009
- 3) Isoyama K, Oda M, Kato K, Nagamura-Inoue T, Kai S, Kigasawa H, Kobayashi R, Mimaya J, Inoue M, Kikuchi A, Kato S. Long-term outcome of cord blood transplantation from unrelated donors as an initial transplantation procedure for children with AML in Japan. *Bone Marrow Transplant*. 2009 May 11.
- 4) Kudo K, Ohga S, Morimoto A, Ishida Y, Suzuki N, Hasegawa D, Nagatoshi Y, Kato S, Ishii E. Improved outcome of refractory Langerhans cell histiocytosis in children with hematopoietic stem cell transplantation in Japan. *Bone Marrow Transplant*. 2009 Sep 21.
- 5) Yagasaki H, Kojima S, Yabe H, Kato K, Kigasawa H, Sakamaki H, Tsuchida M, Kato S, Kawase T, Muramatsu H, Morishima Y, Kodera Y. Tacrolimus/Methotrexate versus cyclosporine/methotrexate as graft-versus-host disease prophylaxis in patients with severe aplastic anemia who received bone marrow transplantation from unrelated donors: results of matched pair analysis. *Biol Blood Marrow Transplant* 15:1603-8, 2009
- 6) Ohga S, Kudo K, Ishii E, Honjo S, Morimoto A, Osugi Y, Sawada A, Inoue M, Tabuchi K, Suzuki N, Ishida Y, Imashuku S, Kato S, Hara T. Hematopoietic stem cell transplantation for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. *Pediatr Blood Cancer* Feb;54(2):299-306, 2010
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし。
1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし