

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)

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:

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

研究分担者 木内哲也 名古屋大学大学院医学系研究科病態外科学講座 教授

研究要旨: (I) 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。(II) 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。

A. 研究目的

臓器移植後慢性期においては、免疫抑制療法下におかれるために日和見感染の危険が高く、さらにひとたび罹患するとその重篤化や拒絶反応を招来する危険がある。そのため、欧米を中心に不活化ワクチンによる能動免疫によって予防を行うことが推奨されているが、移植臓器の別、免疫抑制の強度、さらに個体差によってその有効性や副反応の危険に差があることが推測される。一方で本邦においては、臓器移植医療の歴史が短いことも原因し、こうした移植後慢性的免疫抑制下の能動免疫療法についての臨床的知見がきわめて少なく、抗原刺激による拒絶反応の誘発などを恐れて導入に消極的な施設が

少なくない。

本年度研究では、季節性インフルエンザと B 型肝炎(HBV)それぞれのワクチンを用い、肝移植後慢成期における能動免疫療法の安全性と効果を検討した。

B. 研究方法

(I) 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

生体肝移植後に分担研究者の施設で追跡加療中の小児 38 例を対象とした。接種条件は、1)移植後 1 年以上経過して免疫抑制剤が 1 剤となっていること、2)原疾患の再発または活動性の拒絶反応のないこと、3)細胞性・液生免疫(白血球・好中球数、リンパ球

刺激試験, T/B 細胞比, 免疫グロブリン分画)が正常であることとし, 保護者が説明に基づいて接種を希望した 19 例に 06-07 年(7 例)・07-08 年(15 例)・08-09 年(11 例)の 3 季にのべ 33 接種を行った(10 例は 1 季のみ, 4 例は 2 季のみ, 5 例は 3 季). 対照は, 同季に接種を行わなかった肝移植後症例, 及び接種を受けた健常児(07 年季のみ; 69 例)とした.

接種量と回数は健常児に合わせ, 2-5 歳は 0.2 ml x2 回, 6-12 歳は 0.3 ml x2 回, 13 歳以上は 0.5 ml x2 回の皮下接種とした. 評価項目は, 1)インフルエンザ罹患率, 2)流行期の発熱事象(>38°C), 3)拒絶反応または重篤な副作用とした. 接種群については, 接種前と最終接種後 4 週の HI 抗体価(A 型 H1/A 型 H3/B 型)を測定し, 有効抗体価(40 倍以上)の保有率, 抗体価の有意な上昇(2 管以上)を求めた.

(II) 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

対象症例を移植時慢性 HBV キャリア群(HBV 関連疾患)と HBc 抗体陽性グラフト群(感染既往ドナーから移植を受けた非 HBV 疾患)に分けた.

慢性 HBV キャリア群は 9 例で 40-62 歳, 男女比は 7 対 2, 全例が HBs 抗原・HBc 抗体陽性で, 核酸アナログを併用しており, 1 例に HBs 抗体の併存を認めた. HBe 抗原は 3 例で陽性, 残り 6 例は HBe 抗体陽性で seroconversion していた. 移植時に血中に HBV-DNA を認めたものは HBe 抗原陽性の 3 例のみであった. キャリア群のドナーは 22-60 歳, 男女比は 4 対 5, 全例 HBs 抗原は

陰性であったが, HBs 抗体を 7 例に認め, うち 4 例は HBc 抗体も陽性であった.

HBc 抗体陽性グラフト群は 6 例で 0-49 歳(小児 3 例), 男女比は 3 対 3, 原疾患は胆道閉鎖症が 3 例, 原発性胆汁性肝硬変・原発性硬化性胆管炎・ウイルソン病が各 1 例であった. ドナーは 42-58 歳, 男女比は 2 対 4, 全例 HBs 抗原は陰性であったが, HBs 抗体・HBc 抗体ともに陽性であった.

慢性 HBV キャリア群では, ワクチン導入までの再発予防を核酸アナログと高力価 HBs 抗体免疫グロブリン(HBIg)にて行い, 移植後 1 年以上を経過して肝胆道型酵素が安定し, 免疫抑制剤が原則として 1 剤となった時点をワクチン導入の条件とした. HBV ワクチンは, 初期には PreS 抗原含有, 途中より非含有の製剤を 20 µg 毎月筋注で投与した. HBs 抗体価維持目標は 30 IU/L とし, 適宜 HBIg を追加した. HBIg の補充なく HBs 抗体価 >100 IU/L が達成できた時点でワクチンを休止し, この抗体価 3ヶ月以上持続した時点で核酸アナログを中止, 再度 HBs 抗体価 <100 IU/L となった時点でブースター接種を行うこととした.

HBc 抗体陽性グラフト群ではワクチン導入までの再発予防を移植術中のみの HBIg 投与とその後の核酸アナログにて行い(初期 2 例は核酸アナログなしで術後も HBIg 維持投与), ワクチン導入条件はキャリア群と同じとした. HBV ワクチン投与方法もキャリア群と同様としたが, 初期の 2 例を除いて HBs 抗体価維持目標は設定しなかった. ワクチンと核酸アナログの休止条件, ブースター接種の条

件は他群と同様とした。

(倫理面からの配慮について)

小児例では保護者に対し、成人例では本人に対して、接種に起因する潜在的な利点と危険を説明し同意を得た。研究プロトコールについては、施設の臨床研究審査委員会(IRB)において審査の上、承認を得た。

C. 研究結果

(I) 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

3 季とも、肝移植後の接種群と非接種群で男女比、移植からの経過期間(平均 3.4-5.5 年)、接種時年齢(平均 7.9-10.5 歳)、接種時のタクロリムス血中濃度(平均 1.9-3.4 ng/ml)に有意差を認めなかった。

各季ともに、接種群と非接種群で拒絶反応の頻度(0-5%)に有意差を認めず、接種後の重篤な副反応は認めなかった。流行期の発熱は、接種群と非接種群で 06 年季 14.3% (1/7) vs. 37.5% (9/24), 07 年季 26.7% (4/15) vs. 30.0% (6/20), 08 年季 18.2% (2/11) vs. 25.9% (7/27)といずれも非接種群にやや高い傾向があったが、有意差には至らなかった。インフルエンザ罹患率も 06 年季 0% vs. 4.2%, 07 年季 6.7% vs. 10%, 08 年季 9.1% vs. 3.7%と非接種群に高い傾向のある年もあったが、有意差には至らなかった。3 季を総合すると、拒絶反応の頻度は 0% (0/33) vs. 2.8% (2/71), 流行期の発熱は 21.2% (7/33) vs. 31.0% (22/71), インフルエンザ罹患率は 6.1% (2/33) vs. 5.6% (4/71)といずれも有意差がなかった。

接種前後の有効抗体価(HI>40)の保有率の

変化をみると、A 型 H1 抗原では 06 年季 43% (3/7)→57% (4/7), 07 年季 23% (3/13)→54% (7/13), 08 年季 63% (5/8)→38% (3/8), 合計 39% (11/28)→50% (14/28)と相対的には上昇を認め、07 年季の成績は、同年の健常児における上昇 37% (23/63)→68% (43/63)と差を認めなかった。接種前陰性者における陽転率は、移植後患児で 06 年季 25% (1/4), 07 年季 40% (4/10), 08 年季 0% (0/3)と年次差を認めるものの、07 年季については健常児の 52% (24/46)と差を認めなかった。

A 型 H3 抗原に対する移植後患児の有効抗体価保有率の推移は、06 年季 43% (3/7)→71% (5/7), 07 年季 23% (3/13)→46% (6/13), 08 年季 25% (2/8)→38% (3/8), 合計 29% (8/28)→50% (14/28)と上昇を認め、07 年季の成績は、同年の健常児における上昇 49% (31/63)→68% (43/63)と差を認めなかった。接種前陰性者における陽転率は、移植後患児で 06 年季 50% (2/4), 07 年季 30% (3/10), 08 年季 33% (2/6)であり、07 年季の健常児の 39% (15/38)と差を認めなかった。

B 型抗原については全体的に有効抗体価保有率が低いものの、移植後患児の接種前後の変化は、06 年季 14% (1/7)→43% (3/7), 07 年季 8% (1/13)→23% (3/13), 08 年季 25% (2/8)→38% (3/8), 合計 11% (3/28)→32% (9/28)と上昇を認め、07 年季の成績は、同年の健常児における上昇 6% (4/63)→14% (9/63)と比べて差を認めなかった。接種前陰性者における陽転率は、移植後患児で 06 年季 33% (2/6), 07 年季 17% (2/12), 08 年季 33% (2/6)と高くないが、07 年季の健常児の 8%

(5/65)と差を認めなかった。

2 管以上の有意な抗体価の上昇は、A 型 H1 抗原では 06 年季 14% (1/7), 07 年季 46% (6/13), 08 年季 25% (2/8)とばらつきがあったが、07 年では健常児 38% (24/63)と差がなかった。A 型 H3 抗原では 06 年季 14% (1/7), 07 年季 31% (4/13), 08 年季 25% (2/8)とやはりばらつきがあったが、07 年では健常児 11% (7/63)と比べてむしろ良好であった。同様に B 型抗原では 06 年季 14% (1/7), 07 年季 23% (3/13), 08 年季 25% (2/8)であり、07 年では健常児 8% (5/63)と比べてむしろ良好であった。

前年季以前のインフルエンザワクチン接種既往の有無別に当該年季接種後の有効抗体保有率をみると、A 型 H1 抗原では接種既往のある患児で 06 年季 50% (3/6), 07 年季 57% (4/7), 08 年季 50% (3/6)と比較的一定していたが、必ずしも高くはなく、接種既往のない患児の 06 年季 100% (1/1), 07 年季 50% (3/6), 08 年季該当なしと差を認めなかった。A 型 H3 抗原では接種既往のある患児で 06 年季 83% (5/6), 07 年季 57% (4/7), 08 年季 50% (3/6)と、接種既往のない患児の 06 年季 0% (0/1), 07 年季 33% (2/6), 08 年季該当なしと比べてやや良好な傾向があった。B 型抗原では接種既往のある患児でも 06 年季 33% (2/6), 07 年季 29% (2/7), 08 年季 50% (3/6)と必ずしも高くなく、接種既往のない患児の 06 年季 100% (1/1), 07 年季 17% (1/6), 08 年季該当なしと差を認めなかった。

(II) 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

慢性 HBV キャリア群は、ワクチン導入が移

植後 12~14 か月で、その時点の免疫抑制剤は 1 例がシクロスポリン、他はタクロリムスであった。HBs 抗原と血中 HBV-DNA は術後早期から全例で陰性、HBs 抗体は補充により全例で陽性、HBc 抗体はワクチン開始時に 2 例で陰性であった。ワクチン接種回数は 3~43 回、開始後追跡期間は 3~47 ヶ月であった。ワクチン開始後の HBIg 補充量は 0.19~1.0 KIU/月で、一部の症例で減量効果を認めた。上記の観察期間において、ワクチン休止基準を満たしたものはなかった。

HBc 抗体陽性グラフト群は、ワクチン導入が移植後 12~78 か月で、その時点の免疫抑制剤は 1 例がシクロスポリン、他はタクロリムスであった。ワクチン開始時に全例で HBs 抗原と HBc 抗体は陰性、HBs 抗体は補充療法を行った 2 例と移行リンパ球による産生と考えられた 1 例で陽性であった。ワクチン接種回数は 3~22 回で、開始後追跡期間は 10~47 ヶ月であった。6 例中 4 例で 3~9 回の接種後 HBs 抗体 >100 IU/ml となり接種を休止、そのうち 3 例でブースター接種が行われた。残り 1 例は拒絶反応を合併したためにワクチン接種が断続的に行われ、最終的に複数の免疫抑制剤投与下(プロトコール外)で反応が認められた。残る 1 例は自己免疫性疾患を合併しており、ワクチン反応が認められていない。

両群を対象に、肝移植後慢性期における HBV ワクチンへの反応に関与する因子を単変量解析したところ、患者の若年齢(中央値反応群 18.5 歳 vs. 非反応群 51 歳; $p=0.0430$)、患者が女性であること(女性比率: 反応群

75% vs. 非反応群 18%; $p=0.0390$), ドナーの HBc 抗体力価(反応群 $86.7 \pm 19.5\%$ vs. 非反応群 $43.7 \pm 37.1\%$; $p=0.0491$), 移植時の HBV 非キャリア状態(キャリア比率: 反応群 0% vs. 非反応群 82%; $p=0.0042$)に有意差がみられた。

D. 考察

インフルエンザは、2009 年の世界的な社会現象を引くまでもなく、最も身近な市中感染であり、毎年一定頻度の死亡例が発生しているため、予防接種による能動免疫の必要性については異論が少ない。一方で、ウイルス型の変異に対応するために、ワクチン抗原が適宜変更されており、また、毎年供給される製剤の均一性についても十分な検証がなされていない。さらに、前年季以前の接種既往や感染既往による抗体産生の効果が、次年季以降にどの程度残存するかについても知見が少ないため、naïve 例のみを選別して厳密な解析を行うことが難しいなど、様々な問題を内包している。

本研究では、肝移植後慢性期の免疫抑制療法下の小児においては、季節性インフルエンザワクチン接種による拒絶反応や副反応誘発の危険が低いことは明らかとなった。一方で、対象数の少ないこともあり、当該季のインフルエンザ感染の頻度や発熱事象の頻度には接種群と非接種群とで差を認めなかった。接種群において非接種群と比べて発熱事象が少ない傾向にあった背景には、接種を希望する保護者と希望しない保護者との間に存在する、感染対策意識などの潜

在的な差が影響していた可能性もある。

本研究では、肝移植後小児において季節性インフルエンザワクチン接種後に有効抗体価保有に至る陽転率が低いことが明らかになったが、対照として用いた健常児でも同様に低く、年次による差や抗原(A型とB型)による差がある可能性も示唆された。有意な抗体価の上昇には、接種既往が影響している可能性があり、単季接種の効果については評価が難しいが、本研究により、これまで有効率が高いと信じられていた健常児においても、血清学的な有効率は必ずしも高くないことが明らかになり、肝移植後慢性期の小児症例では、少なくとも健常児と同程度の安全性と有効性は期待できることも明らかになった。

一方、本研究における HBV ワクチンは、naïve 症例における HBV との初めての接触による初感染の予防を目的としたものではなく、いずれの群においても HBV-DNA は血中には存在しないが肝臓内に潜在している状態であり、その再活性化の予防を目的としたものである。いずれの群においても、再活性化の予防は、これまで、核酸アナログと HBIg の併用またはそのいずれかが用いられてきたが、耐性株出現の危険と高額な医療費から、経済的かつ安全・効果的な代替療法が模索されている。

本研究で HBV ワクチンを使用した 1 例に可逆性の急性拒絶が発生したが、本症例では拒絶を繰り返す自己免疫性素因が確認されており、HBV ワクチンの拒絶誘発作用は、一般には有意なものではないと考えられた。本研究で明らかになったワクチン反応性に寄与

する因子の中で、若年や女性はすでに他の能動免疫療法において報告されているものと合致し、強い免疫抑制下におかれた場合に反応が遅延することも合理的である。また、ドナーHBc 抗体高力価がワクチン反応性に寄与するとの結果は、肝臓とそこに存在した移入リンパ球の免疫記憶能が、何らかの機序でレシピエントの反応性に寄与している可能性を示唆するもので興味深い。

同様に肝組織内のみならず HBV-DNA が潜在しながら、HBc 抗体陽性グラフト群では比較的容易に能動免疫が成立し、HBV キャリア群では非常に治療抵抗性であるという事実は、HBV-DNA 量、その存在様式、宿主の特異的免疫状態に何らかの差異が存在することを示唆しており、こうした要素を詳細に分析し、ワクチン療法への反応予測因子を明らかにしていくことが重要である。

E. 結論

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は、少なくとも安定期で免疫抑制剤の最少化が可能となった時点では、有意な副反応なく安全に施行可能であった。しかしながら、接種後の有効抗体価獲得率は健常児と同様に低く、年次や抗原によるばらつきが見られた。非接種群と比べ、接種群において流行期の発熱が少ない傾向にあったが、有意な罹患予防効果や重症化予防効果を確認するには至らなかった。健常児において季節性インフルエンザワクチンが推奨されていることを前提にすれば、肝移植後慢性期の小児における推奨を覆すデータは得

られなかった。

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(倍量連投法)は、多くの症例で安全に行えたが、急性拒絶のリスクの高い一部の症例で接種後の拒絶が観察された。若年者や女性、ドナーHBc 抗体価の高い症例で良好な反応が得られる傾向があったが、移植前に HBV キャリアであった症例では反応が極めて不良であり、潜在 DNA 量や存在様式、宿主の特異的免疫に大きな差のあることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 石上雅敏, 木内哲也, 後藤秀実: 当院における HCV 陽性患者に対する肝移植の現状(シンポジウム): 第 27 回日本肝移植研究会, 三島 (2009.7).
- 2) 石上雅敏, 木内哲也, 後藤秀実: 肝移植後における HBV ワクチンによる HBs 抗体獲得効果-HBV キャリア症例と HBc 抗体陽性ドナー非 HBV 症例との違い(ワークショップ: 肝移植前後の肝炎ウイルス対策): 第 13 回日本肝臓学会大会, 京都 (2009.10).
- 3) 後藤研誠, 伊藤嘉規, 河辺慎司, 鈴木英

太郎, 木村宏: 肝移植後小児例における
インフルエンザワクチンの有効性・安全
性に関する検討: 第 41 会日本小児感染
症学会学術集会, 福井 (2009.11).

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

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)

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

研究分担者 木村 宏 名古屋大学大学院医学系研究科ウイルス学 准教授

研究要旨: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須である.我々は *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)法を開発し,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した. 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.

A. 研究目的

近年,造血幹細胞・臓器移植の増加とその技術の進歩に伴い,免疫抑制下におけるウイルス感染合併症がますます問題となってきた.ヒトに潜伏/持続感染している EBV, CMV, HHV-6, VZV, アデノウイルスなどは,移植後の細胞性免疫の抑制・再構築の遅れに伴い再活性化し,時に致命的な合併症を生じる.その中でも,EBV による移植後リンパ増殖症は,EBV 感染した B 細胞もしくは T 細胞による腫瘍性増殖疾患であり,重篤で致命率も高い.

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須である.我々は,世界に先駆けリアルタイム PCR 法による

EBV DNA 定量法を確立し,移植後リンパ増殖症の診断・治療モニタリング法に臨床応用した(Kimura H, *J Clin Microbiol* 37:132-6, 1999).現在,リアルタイム PCR 法による EBV DNA 定量は,移植後リンパ増殖症の診断・治療モニタリングの主流となっている.しかし,この方法により定量しているのはウイルス DNA であって,感染細胞数ではない.また,遺伝子増幅という過程を経ているため正確性に欠け,検査室間での比較が困難であるという欠点がある(Kimura H, *Rev Med Virol* 18: 305-319, 2008).さらには,EBV がどの細胞に感染しているかの同定も不可能である.

我々は *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)法を開発し、特許申請した(特願 2008-073384)。この方法を用いれば、末梢血中のEBV感染細胞を正確に定量できるのみならず、感染細胞の同定が可能となる。本研究では、FISH法を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適用し、末梢血中のEBV感染細胞の定量・同定が可能であるか否かを検証した。

B. 研究方法

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。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。

- 1) 蛍光色素PEもしくはPC5標識モノクローナル抗体を用いて細胞表面抗原を標識。
- 2) 細胞を4%パラホルムアルデヒド/1%酢酸にて、4°C40分間固定。
- 3) 細胞膜・核膜に穴をあけるためにTween20/PBSで10分間処理。
- 4) EBER特異的FITC標識PNA probe (Dako)とhybridizationさせ1時間反応。
- 5) anti-FITC Alexa Fluor 488標識抗体を用い蛍光を増幅後、Flow cytometryにより解析。
- 7) 比較対象として、単核球を磁気ビーズ法によりCD3⁺、CD19⁺、CD3-CD56⁺、TCRαβ⁺、TCRγδ⁺分画に分けた後に、リアルタイムPCR法によりEBV-DNAを定量し、感染分画を決定した。

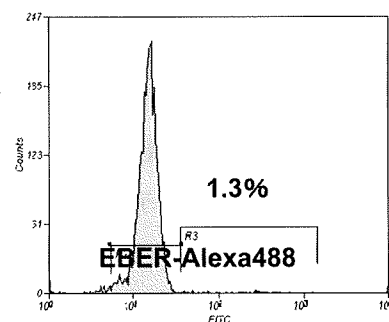
(倫理面からの配慮について)

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た。さらに検体の採取法、患者情報の取り扱いについても倫理規定を遵守し、個人情報の擁護に努めた。なお本研究は名古屋大学医学部倫理委員会にて承認されている。

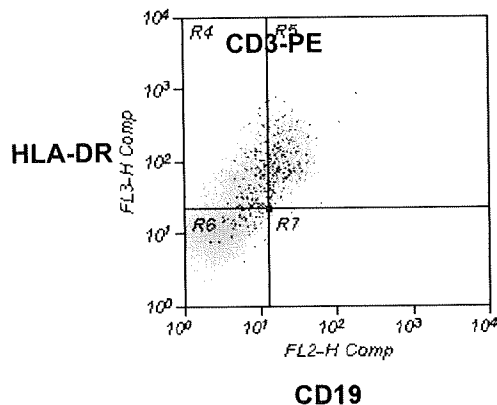
C. 研究結果

各疾患の末梢血中末梢血単核球中1.3-49.2%でEBER陽性を認め、感染リンパ球の表面抗原解析も可能であった。移植後リンパ増殖症患者末梢血中に1.3%のEBER陽性細胞を認め、表面抗原との多重染色によりCD19陽性のB細胞が感染細胞であることが示された。

移植後リンパ増殖症患者血液中のEBER陽性細胞



EBER陽性細胞(濃い黒)の表面抗原
(灰色はEBER陰性細胞)



慢性活動性EBV感染症患者では、種痘様水疱症を伴う3例すべてに末梢血 $\gamma\delta$ T細胞への、蚊刺過敏症を伴う1例で末梢血NK細胞へのEBV感染を認めた。これらの結果は磁気ビーズ法/リアルタイムPCR法の結果と合致していた。

D. 考察

今回我々は *in situ* hybridization 法と、flow cytometry を組み合わせた FISH 法を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し、同法が移植後リンパ増殖症を含む EBV 関連リンパ増殖性疾患の非侵襲診断に有用であることを示した。

FISH 法を用いれば、移植後リンパ増殖症患者末梢血中の EBV 感染細胞を、簡便かつ非侵襲的に検出・定量できるばかりでなく、表面抗原との二重染色により、感染細胞の同定が可能となる。近年、リンパ球表面抗原を標的とした、ヒト型モノクローナル抗体リツキシマブ(抗 CD21 抗体)やアレムツズマブ(抗 CD52 抗体)が開発され、幅広く臨床応用されている。さらに抗 CD56 抗体や抗 CCR4 抗体が臨床試験中である。EBV 感染細胞の表面抗原プロフィールが明らかになれば、移植後リンパ増殖症の診断のみならず、分子

標的治療法の選択が容易となる。さらに、本法は EBV 感染細胞数を正確に直接定量できるため、治療効果のモニタリング法としても最適である。

また、今回の解析により種痘様水疱症を伴う慢性活動性 EBV 感染症患者で $\gamma\delta$ T 細胞への EBV 感染が明らかとなり、EBV 関連リンパ増殖性疾患の発症病理解析にも有用であることが示された。

E. 結論

FISH 法により、簡便に患者末梢血中の EBV 感染細胞を定量・同定できることを明らかにした。同法を移植後リンパ増殖症の非侵襲診断および治療効果のモニタリングに応用可能である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mizuno T, Sugiura S, Kimura H, Ando Y, Sone M, Nishiyama Y, Nakashima T. Detection of cytomegalovirus DNA in preserved umbilical cords from patients with sensorineural hearing loss. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 266: 351-5, 2009
- 2) Wada K, Mizoguchi S, Ito Y, Kawada J, Yamauchi Y, Morishima T, Nishiyama Y, Kimura H. Multiplex real-time PCR for the simultaneous detection of herpes simplex virus, human herpesvirus 6, and human

- herpesvirus 7. *Microbiol Immunol* 53:22–29, 2009
- 3) Nomura Y, Kimura H, Karube K, Yoshida S, Sugita Y, Niino D, Shimizu K, Kimura Y, Aoki R, Kiyasu J, Takeuchi M, Hashikawa K, Hirose S, Ohshima K. Hepatocellular apoptosis associated with cytotoxic T/naturalkiller-cell infiltration in chronic active EBV infection. *Pathol Int* 59: 438–442, 2009
- 4) Ito Y, Shibata-Watanabe Y, Kawada J, Maruyama K, Yagasaki H, Kojima S, Kimura H. Cytomegalovirus and Epstein Barr virus coinfection in three toddlers with prolonged illness. *J Med Virol* 81:1399–1402, 2009
- 5) Tanaka-Kitajima N, Iwata N, Ando Y, Sakurai H, Iwami M, Tsuzuki K, Kondo M, Ito Y, Kimura H. Acute retinal necrosis caused by herpes simplex virus type 2 in a 3-year-old Japanese boy. *Eur J Pediatr* 168:1125–, 2009
- 6) Kimura H, Miyake K, Yamauchi Y, Nishiyama K, Iwata S, Iwatsuki K, Gotoh K, Kojima S, Ito Y, Nishiyama Y. Identification of Epstein-Barr virus (EBV)-infected lymphocyte subtypes by flow cytometric in situ hybridization in EBV-associated lymphoproliferative diseases. *J Infect Dis* 200: 1078–87, 2009
- 7) Ushijima Y, Goshima F, Kimura H, Nishiyama Y. Herpes simplex virus type 2 tegument protein UL56 relocalizes ubiquitin ligase Nedd4 and has a role in transport and/or release of virions. *Virology J* 6: 168, 2009
- 8) Cohen JI, Kimura H, Nakamura S, Ko Y-H, Jaffe ES. Epstein-Barr virus Associated Lymphoproliferative Disease in Non-Immunocompromised Hosts. *Ann Oncol* 20: 1472–82, 2009
- 9) Iwata S, Wada K, Tobita S, Gotoh K, Ito Y, Demachi-Okamura A, Shimizu N, Nishiyama Y, Kimura H. Quantitative Analysis of Epstein-Barr Virus (EBV)-Related Gene Expression in Patients with Chronic Active EBV Infection. *J Gen Virol* in press
- 10) Funahashi Y, Iwata S, Ito Y, Kojima, Yoshikawa T, Hattori R, Gotoh M, Nishiyama Y, Kimura H. Multiplex Real-time PCR Assay for Quantifying BK Polyomavirus, JC Polyomavirus, and Adenovirus DNA Simultaneously. *J Clin Microbiol* in press

2.学会発表

- 1) 木村 宏, 河邊慎司, 後藤研誠, 伊藤嘉規, 岩田誠子, 西山幸廣: FISH法を用いたEBV関連リンパ増殖性疾患の非侵襲診断および病態解析: 第57回日本ウイルス学会学術集会, ワークショップ, 東京 (2009.10)
- 2) Kimura H., Miyake K, Yamauchi Y, Iwata S, Kawabe S, Gotoh K, Ito Y, Nishiyama Y: The 34th International Herpesvirus Workshop, July 26, 2009, Ithaca, USA (2009.7)

H. 知的財産権の出願・登録状況

発明者; 木村 宏, 西山幸廣

出願日; 2009 年 3 月 17 日

1. 特許取得

2. 実用新案登録

国際特許出願 PCT/JP2009/001173(WO)

なし

ウイルス感染細胞の検出・同定法及びキ
ット

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)

培養によらない細菌・真菌検査法の定量化

研究分担者 錫谷 達夫 福島県立医科大学微生物学講座 教授
研究協力者 西山 恭子 福島県立医科大学微生物学講座 主任医療技師
岡崎 友亮 福島県立医科大学微生物学講座 大学院生

研究要旨: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。

A. 研究目的

地球上には 100 万種にも及ぶ細菌・真菌が存在するものと予想されているが、そのほとんどは培養法が確立しておらず、現在行われている培養を基盤とする検査法では同定することも、定量することもできない。この問題点を克服することを目的に、培養による菌種の同定法から、PCR で増幅した DNA 断片のシーケンス解析など、遺伝子解析による菌種の同定法が開発され、実用化されてきた。

真菌の場合、1 つのプライマーセットで全ての菌種の検出を行うことを目的に、菌種間で高度に保存された遺伝子として 18S ribosomal RNA (18S rRNA) 遺伝子や 28S rRNA 遺伝子、rRNA 遺伝子に挟まれたスペーサー領域である internal transcribed spacer (ITS)1 領域、ITS2 領域が菌種同定のターゲットとして利用されている。特に ITS 領域は遺伝子ではないため、菌種間での塩基配列や長さが大きく異なり、菌種同定に有

用で、マルチプレックス PCR、制限酵素分析、PCR法によるフィンガープリント解析など、多くの技術に利用されている。

最近、私たちの研究室でも、ITS2 領域をターゲットに、動物の DNA を増幅することなく、全ての真菌の ITS2 領域を増幅できるユニバーサルプライマーを 5.8S rRNA 遺伝子内と 28S rRNA 遺伝子内に設計した。その一方のプライマーの 5' 末端を蛍光ラベルすることで、PCR 産物のキャピラリー電気泳動 (Gene Scan) での解析から菌種の予測ができ (t-RFLP 分析)、さらにシーケンス解析によって菌種が同定できる検査法を開発した。これにより、培養法による菌種同定よりもかなり迅速に群集解析、菌種の同定を行うことができ、real-time PCR を行えば総真菌数を定量することも可能となった。

しかし、この検査法では、検体中に複数の真菌が混在した場合、t-RFLP 解析による菌種数の判定や、real-time PCR による総真菌数の定量はできるものの、それぞれの菌種

について個々に定量することは出来ない。また、シーケンスを解析するために PCR 産物をサブクローニングしなくてはならず、検体中の菌数が極わずかな菌種の同定には多数のクローンを解析する必要がある。

そこで本研究では、この問題を解決するために、検体中に複数の菌種が混在した場合に、それぞれの菌種について一度に定量出来る方法の開発とサブトラクション法により、多量の DNA 中に存在する少量の DNA を PCR で増幅させ、検出または同定できる検査法を開発を行った。

B. 研究方法

1. 真菌株

本実験で使用した真菌株を表にまとめた(表 1)。菌株は German Collection of Microorganisms and Cell Cultures Biological resource Centre (Braunschweig, Germany) の菌株を使用した。酵母様菌の培養はサブロー寒天培地 (Nissui Pharmaceutical Co.Ltd., Tokyo, Japan) に接種し、25°C、2-7 日培養した。糸状菌はポテトデキストロース寒天培地 (Nissui Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo, Japan) で 35°C、2 日培養した。

2. DNA 抽出

菌株からの DNA 抽出は Soeta らの方法で行った。

200 μ l の Lyticase solution [10 U/ml of recombinant lyticase (Sigma-Aldrich Inc., St.Louis, MO), 10 mg/ml of lysozyme chloride (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan), 50mM Tris-HCl (pH 7.5), 10mM EDTA and 0.2% 2-mercaptoethanol] に培養した菌株のコロニーを懸濁し、超音波破碎装置 (ELESTEIN035 cross ultrasonic homogenizer, Elekon Led, Tokyo, Japan) で 3 分間、超音波処理を行った。37°C で 30 分間保温して細胞壁を lyticase で溶解後、再び

超音波処理を 5 分間行った。18,000 rpm (30,000 \times g) で 10 分間遠心後、上清を捨て、ペレットを滅菌水 200 μ l に懸濁した。この懸濁液から 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。

3. Real-time PCR

ユニバーサルプライマー ITS86M-F, ITS4M-R (表 2) を使用し、ITS2 領域を PCR で増幅した。real-time PCR の反応溶液は、1 μ l の真菌 DNA 溶液、最終濃度各 0.6 μ M のプライマー (ITS86M-F, ITS4M-R), 10 μ l の TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 7.8 μ l の滅菌水を混ぜ計 20 μ l とした。real-time PCR は ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) で行い、反応条件は表に示した(表 2)。検量線は *Candida glabrata* をクローニングしたプラスミド DNA (pGEM-CG-ITS2) を滅菌水で 10^6 - 10^1 copies/ μ l に段階希釈したものをを用いて実験毎に作成した。

4. PCR とキャピラリー電気泳動

FAM でラベルしたリバースプライマー 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 を行った。テンプレートには 5 菌種から調製し、real-time PCR でコピー数を定量した DNA を混和した検体(表 1)、あるいは検量線作成のためのプラスミドを使用した。PCR の反応溶液は最終濃度各 0.5 μ M プライマー、10 \times dNTPs (10 mM) 1 μ l, Dimethyl sulfoxide (DMSO) 1 μ l, 10 \times Expand High Fidelity Buffer with 15 mM MgCl₂ 1 μ l, Enzyme 1 unit, Sample DNA 1 μ l と滅菌水 4.8 μ l を混合し、計 10 μ l の反応溶液とした。PCR (表 2) のサイクルを 20-35 回繰り返した一連のサンプルを用意し、

繰り返し回数が異なるそれぞれの検体をキャピラリー電気泳動で解析した。

キャピラリー電気泳動は ABI Prism 3100 genetic analyzer GENESCAN analysis software version 3.7 (Applied Biosystems) を使用した。1 μ l の PCR 産物に 10 μ l のキャピラリー電気泳動のミクスチャー [9.5 μ l Hi-Di formamide, 0.5 μ l GENESCAN 400HD (ROX) Size Standard (Applied Biosystems)] を混ぜて泳動に用いた。

5. サブトラクション法

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。その手順を図 1 にまとめた。

サブトラクション法に用いたプライマーとして、ITS2 領域を増幅し、制限酵素で切断されるサイトを持ったプライマー、ITS86M Pac I と ITS4M Asc I を設計した (表 2)。このプライマーによる PCR 産物を Pac I と Asc I で切断後、切断された断端に連結するリンカーを作成するため 4 種類の DNA (Pac I 22, Pac I 20, Asc I 22, Asc I 18) を合成した (表 2)。Pac I 22 と Pac I 20, および Asc I 22 と Asc I 18 を 5 mM ずつ混合し、95°C で 2 分間処理後、42°C で 1 分間インキュベートして Annealing をさせ 2 本鎖のリンカー DNA、Pac I 22-20 と Asc I 22-18 を調製した。

サブトラクションの検体としてモデル検体を作成した。検体中に多量の真菌と少量の真菌が混在した状態を再現するため、*Candida tropicalis* と *Aspergillus niger* 由来の DNA をそれぞれが 1.0×10^5 copies/ μ l, 1.0×10 copies/ μ l になるよう混合した (表 1)。この検体を ITS86M-F と ITS4M-R-FAM を用い PCR で解析した後、PCR 産物を DNA 精製カラムである DNA/RNA Extraction Kit (VioGene) で精製し、サブトラクションのモデル検体とした。

ドライバー DNA の作成にはサブトラクション

用のモデル検体中に多量に存在する *C. tropicalis* を、ITS86M-F と ITS4M-R を用いた PCR で増幅後 (表 2)、PCR 産物を精製しドライバー DNA とした。

次にサブトラクション法をまとめる (図 1)。まず、PCR 産物のモデル検体を ITS86M Pac I と ITS4M Asc I を用い 25 サイクル PCR を行い増幅した。この産物を滅菌水で 1,000 倍に希釈後、制限酵素 Pac I と Asc I で切断し、DNA 精製用カラムで両端の短い断片と混在するプライマーを除去した。この検体の DNA 末端に二本鎖のリンカー DNA、Pac I 22-20 と Asc I 22-18 をライゲーションさせた。この検体にドライバー DNA を大過剰に加え、ハイブリダイゼーションを次のように行った。プライマーを除く PCR の反応溶液に検体を 1 μ l、ドライバー DNA を 2 μ l 加え、95°C で 2 分間処理後 (Denaturation)、52°C で 1 分間、72°C で 2 分間インキュベーションを行い、ドライバー DNA と検体中に大量に存在する *C. tropicalis* 由来の PCR 産物間のハイブリッド DNA を形成させた。ここにサブトラクション用の PCR プライマー Pac I 22 と Asc I 18 を 1 μ l ずつ加え、20 サイクル PCR を行った (表 2)。PCR 産物の一部はキャピラリー電気泳動解析用の PCR に、残りの PCR 産物は 1,000 倍希釈後、次のサブトラクションのサイクルに用い、計 3 回のサブトラクションを繰り返した。

C. 結果

1. 真菌 DNA の PCR による定量

蛍光ラベルしたプライマーによる PCR でテンプレート DNA 量の定量が出来ることを確認するため、real-time PCR の原理を参考にプラスミド DNA (1.0×10^4 copies/ μ l) をテンプレートとする PCR をサイクル毎に止め、それぞれの PCR 産物をキャピラリー電気泳動で測定した。PCR 産物の量はピークの蛍光強度で測定した。23 サイクルではピーク高

が73, 27サイクルでは693, 31サイクルでは2962となった(図 2A-C). サイクル数と蛍光強度には正の相関があり, グラフより Peak Height = $0.0036 \exp(0.444 \times \text{サイクル数})$ の式が導かれた(図 2D). この式からサイクル数を求める式に変換すると, Cycle 数 = $2.158 \ln(\text{Peak Height}) + 13.361$ となり, ここから蛍光強度のピーク高が 100 に達するサイクル数(Ct 値)を求めた. Cycle 数 = $2.158 \ln(100) + 13.361$ となり, プラスミド DNA 1.0×10^4 copies/ μl の Ct 値は 23.3 サイクルとなった. 同様にして, プラスミド DNA $10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 40$ (copies/ μl)のそれぞれの濃度で PCR を行い, Ct 値を求めた. この Ct 値を縦軸に, DNA 濃度(copy/ μl)を横軸に取ることで相関係数の高い検量線を作成することができた(図 2E).

この定量法は高い定量性を示すものの, PCR をサイクル毎に止め, 多数の検体をキャピラリー電気泳動で測定する必要がある. そこで Sample 2 を用い, PCR を途中で止めることなく, DNA 合成がプラトーに達する 35 サイクル反応を行った後の産物の蛍光強度比と検体の比率の関係を調べた(図 3A). その結果, サイクル毎に解析する方法と較べても誤差はむしろ少なく, 相関係数 0.9949 の直線が得られた. この検量線は検体の DNA 量の比率が 100 倍の範囲まで定量を行うことのできる検量線となり得た. この方法で定量した Sample 1, Sample 3 の結果を図 3B, C にそれぞれまとめたが, どの Sample も測定値は実際のコピー数とほぼ一致し, この方法でも, それぞれの菌数を定量することがわかった.

2. 臨床検体の解析

上記の検査が実際に臨床検体でも有効であることを確認するため, 腔のスミアー3 検体の解析を行った. 35 サイクルの PCR を行った後, キャピラリー電気泳動により分画し,

蛍光強度を測定した結果を図に示した(図 4 A-C). Sample A は 3 種の真菌のピークが確認できた. ピーク 2 は Soeta らの報告を参考に, PCR 産物の DNA サイズから, *C. albicans* と予想できたが, 残りの 2 菌種はリストに記載されていない菌種であるため, 予測出来なかった. real-time PCR で求めた総真菌数 1.53×10^6 copies/ μl と, ピークの蛍光強度比による菌数の比率からそれぞれの真菌数を求めるとピーク 1 は 1.83×10^5 copies/ μl , ピーク 2 は 7.00×10^5 copies/ μl , ピーク 3 は 6.45×10^5 copies/ μl であった. Sample B, C も同様に解析し, 結果を図 4D にまとめた.

3. サブトラクション法

この研究で開発した定量的な PCR では検出限界が 40 copies/ μl 程度であり, 少量の菌種の同定は困難である. この問題を解決するために, サブトラクション法により多量の DNA に埋もれた少量の DNA のみを増幅させ, 検出できるサブトラクション法の開発を行った(図 1). *C. tropicalis* 1.0×10^5 copies/ μl と *A. niger* 1.0×10^1 copies/ μl を混合した検体をモデルに, サブトラクション法を行った(図 5). サブトラクションを行う前と行った後の DNA を上述の定量法で解析すると, サブトラクション前と, 1 回のサブトラクション後では検出できない *A. niger* のピークは, 2 回サブトラクションを繰り返すことで検出でき, 10^4 倍存在した DNA とほぼ同じ量にまで選択的に増幅できた. 3 回サブトラクションを繰り返しても, さらなる効果は認められなかった.

D. 考察

今回の研究では real-time PCR の定量法を応用した, サイクル毎に PCR 産物の量を求め, Ct 値を導くことで定量する方法(以下

前者)と、PCRを35サイクル行った後の蛍光強度比から定量する方法(以下 後者)の2種類の定量法の開発を行った。5種の真菌由来のDNAを混合した検体 Sample 1-3の結果より、前者では、相関係数が高い検量線を作成することができ、それぞれの真菌について高い定量性を示したが、この方法はサイクル毎にPCRを止め、蛍光強度を測定するので手間がかかる。後者の方法でも、前者と同じ程度の高い定量性を示した。この結果より、後者の定量法は迅速で簡単に定量することが出来る優れた方法であることが示された。また、どちらの定量法でも、検体中のDNA量の比率のまま同時に増幅されることがわかったが、前者の定量法では、サンプル内で1番多量のDNAがより効率的に増幅され、後者の定量法では、少量のDNA量が若干多く増幅される傾向が見られた。しかし、PCR産物のサイズやシーケンスが異なる菌種間でのばらつきは見られず、高い定量性があった。

臨床検体の解析より、どの臨床検体についても、それぞれのピークについて定量することが出来たが、菌種の予想は、Sample A, C(図4A-C)のPeak 1, 3, 7ではできなかった。菌種の予測にはSoetaらのDate Baseを用いたが、このDate Baseには数十種類の代表的な病原性真菌しか登録されておらず、今後は病原性真菌だけでなく、環境中に存在する真菌やヒトに常在する真菌なども加え、充実させる必要がある。また、同じ長さのITS 2を持つ真菌も確認されており、菌種の予測は可能であるが、同定にはシーケンス解析が必須である。

今回の実験より、後者の定量法は、前者の定量法と同程度か、それ以上の高い定量性が見られた。理論的には、前者の定量法の方が高い定量性を示すことが期待されたが、1つの検体につきサンプル数の異なるチューブを何本も用いるため、チューブ間で誤

差ができることや、サンプルを採取する度にPCRを止めるなど、テクニカルエラーを生じる要因が多いことから、ばらつきが大きくなったと考えられる。その点、後者の方法は手間が省けるだけでなく、1本のチューブですべてが済ませられることから実験誤差を最小に止めることができたものと考えられる。

以上のことより、検体中に複数の真菌が混在した場合には、菌種ごとに様々なプローブやプライマーセットを用意する菌種特異的な方法より、1つのプライマーセットで高い定量性を示し、より迅速で、安定した結果が得られる本法は大変有効と考えられる。また、菌種同定にはシーケンス解析が必要であるが、検体中の真菌数を調べ、シーケンスにサブクローニングが必要か否かをあらかじめ予測することにも、この方法は価値があると考えられる。

本法により、臨床検体の定量を行うと、人工的に真菌DNAを混在させた純粋なサンプルと違い、測定の際にいくつかの低いピークが現れることが多い(図4A)。この低いピークはPCRのエラー産物なのか、機器によるノイズなのか、または検出限界以下の少量の真菌のDNAなのか判断し難い。この問題の解決策のひとつとして、サブトラクション法を開発した。この方法によって、検出限界が40 copies/ μ lであった検査の感度を10 copies/ μ l以下に上昇させることができた。

サブトラクション後、菌種の同定にはサブクローニングを行う必要があるが、キャピラリー電気泳動で検出されない、蛍光ラベルされていないDriver DNAも混在しており、Driver DNAがクローニングされる確率が高い。従ってクローニングの際に障害になるDriver DNAを除去する技術が必要となる。その1つとして、Driver DNAをPCRで合成する際、dTTPの代わりにdUTPでDNAを複製させ、Uracil-DNA Glycosylase (UDG)で処理することで、Driver DNAを除去することができれば、

目的とするDNA断片を効率よくクローニング出来るかと期待される。今後はこの方法もサブトラクション法に導入して、検証して行きたい。

来年度は、本研究で確立した方法を用い、臨床検体で、臓器移植後の感染症の診断や病態生理の解析を行ってゆく予定である。

E. 結語

蛍光ラベルした細菌用、真菌用のユニバーサルプライマーを用い、検体中に存在する様々な菌種を一度に定量できる方法を確立した。また、常在菌叢中に存在する少数の菌を検出するためのサブトラクション法を開発した。

(倫理面への配慮)

臨床研究を行うにあたって、福島県立医科大学の倫理委員会に研究申請を行い、承認を受けた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miura Y, Y Kawakami, M Otsuka, M Hachiya, T Yamanoi, K Ohashi, T Suzutani, and T Yamamoto. Cutaneous cryptococcosis in a patient with cirrhosis and hepatitis C virus infection. *Acta Derm Venereol.* **90**:106-7, 2010.
- 2) Hashimoto K, K Ishibashi, K Ishioka, D Zhao, M Sato, S Ohara, Y Abe, Y Kawasaki, Y Sato, S Yokota, N Fujii, RS Jr Peebles, M Hosoya, and T Suzutani. RSV replication is attenuated by counteracting expression of the suppressor of cytokine signaling

(SOCS) molecules. *Virology.*

391:162-70, 2009.

- 3) Ishibashi K, T Tokumoto, H Shirakawa, K Hashimoto, N Kushida, T Yanagida, K Shishido, K Aikawa, O Yamaguchi, H Toma, K Tanabe, T Suzutani. Association between antibody response against cytomegalovirus strain-specific glycoprotein H epitopes and HLA-DR. *Microbiol Immunol.* **53**:412-6, 2009.
- 4) Soeta N, M Terashima, M Gotoh, S Mori, K Nishiyama, K Ishioka, H Kaneko, and T Suzutani. An improved rapid quantitative detection and identification method for a wide range of fungi. *J Med Microbiol.* **58**:1037-44, 2009.
- 5) Kaneko H, H Ishiko, T Ohguchi, Y Tagawa, K Aoki, T Suzutani, and S Ohno. Nucleotide sequence variation in the hexon gene of human adenovirus type 8 and 37 strains from epidemic keratoconjunctivitis patients in Japan. *J Gen Virol.* **90**:2260-5, 2009.

2. 学会発表

- 1) 岡崎友亮, 西山恭子, 石岡 賢, 金子久俊, 錫谷達夫. 正常細菌叢中に存在する真菌の新しい定量法. 第63回日本細菌学会東北支部総会. 盛岡, 2009.
- 2) 西山恭子, 岡崎友亮, 石岡 賢, 金子久俊, 錫谷達夫. 培養によらない分子生物学的手法を用いた腔常在細菌叢の検討. 第63回日本細菌学会東北支部総会. 盛岡, 2009.

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

表1 用いた菌株と調整したモデル検体

No. Organism	Ref. strain (Accession no.)	Size of PCR Product (bp)	Sample No.		
			1	2	3
Amount of DNA (copies/ μ l)					
定量 PCR のモデル検体					
i <i>Candida parapsilosis</i>	DSM5784 (AB305096)	270	1,000	10,000	10,000
ii <i>Candida albicans</i>	DSM1386 (AB305093)	297	400	4,000	100
iii <i>Candida guilliermondii</i>	DSM11947 (AB305098)	338	100	1,000	100
iv <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	DSM18184 (AB305106)	362	40	400	100
v <i>Candida glabrata</i>	DSM6425 (AB305094)	377	10	100	100
Subtraction のモデル検体					
			Subtraction Sample		
① <i>Candida tropicalis</i>	DSM11953 (AB305099)	287	100,000		
② <i>Aspergillus niger</i>	DSM737 (AB305102)	308	10		

表2 用いたプライマー、リンカーとPCRの条件

Name	Sequence	Real-time PCR	PCR
定量PCR			
ITS86M-F	TGAATCATCGACTCTTTGAACGG	95°C/10min x1	95°C/2min, 20~30 サイクルの (95°C/30s, 52°C/1min, 72°C/30s), および 72°C/10min
ITS4M-R	TTTCTTTTCCTCCGCTTATTGATAT	35 サイクルの (95°C/30s, 61°C/1min)	
サブトラクション			
ITS86M-F-PacI	CCttaattaaTGAATCATCGACTCTTTGAACGG		95°C/2min, 20~30 サイクルの (95°C/30s, 52°C/1min, 72°C/30s), および 72°C/10min
ITS4M-R-AscI	AggeggccTTTCTTTTCCTCCGCTTATTGATAT		95°C/2min, 20 サイクルの (95°C/30s, 52°C/1min, 72°C/30s), および, 72°C/10min
ASC I 18	TACGTACTGTAAGCTAGG		
Pac I 22	ACGATCAAGTACTAGCCTTAAT		
Linkers			
Asc I 18	<u>TACGTACTGTAAGCTAGG</u>		
Asc I 22	<u>CGCGCCTAGCTTACAGTACGTA</u>		
Pac I 20	<u>TAAAGCTAGTACTTGTATCGI</u>		
Pac I 22	<u>ACGATCAAGTACTAGCCTTAAAT</u>		

注1) 小文字の部分が制限酵素切断部位, 注2) 下線の部分は相補的な部分