

201028027A

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22年度 総括・分担研究報告書

平成23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22年度 総括・分担研究報告書

平成23年 3 月

研究代表者 西 條 政 幸

(国立感染症研究所)

平成 22 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 22 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長

研究分担者

氏名	所属
一山 智	京都大学大学院医学研究科臨床病態検査学・教授
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)
錫谷達夫	福島県立医科大学微生物学教室・微生物学・教授
谷口修一	虎の門病院・血液内科・部長
森 康子	神戸大学大学院医学研究科・臨床ウイルス学・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・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
辻正徳	虎ノ門病院血液内科
木下一美	国立感染症研究所ウイルス第一部
王麗欣	国立感染症研究所ウイルス第一部
高倉俊二	京都大学大学院医学研究科臨床病態検査学
梅山 隆	国立感染症研究所生物活性物質部
樽本憲人	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
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
梶川益紀	(株)ACTGen
後藤希代子	(株)ニッピバイオマトリックス研究所
大島久美	自治医科大学附属さいたま医療センター血液科
神田善伸	自治医科大学附属さいたま医療センター血液科
山本久史	虎ノ門病院血液内科
矢部普正	東海大学医学部基盤診療学系再生医療学
土田文子	東海大学医学部付属病院臨床検査科
西山恭子	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
榎本喜彦	藤田保健衛生大学病院臨床検査部

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. 分担研究報告書

1. 造血幹細胞移植患者における単純ヘルペスウイルス 1 型の排出状況と薬剤耐性ウイルスの出現…………… 23
西條政幸
2. 生体肝移植後の感染症の発症率, 起因微生物, 危険因子の包括的観察, および侵襲性アスペルギルス症の発症危険因子に関する疫学研究…………… 29
一山智
3. 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…………… 31
井上直樹
4. 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…………… 37
大野秀明
5. 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…………… 45
片野晴隆
6. 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…………… 51
加藤俊一
7. 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: (2)肝移植後慢性期の小児における 2009 新型 H1N1 インフルエンザワクチンの有効性と安全性についての検討…………… 55
木内哲也
8. Multiplex real-time PCR 法による BK ウイルス・JC ウイルス・アデノウイルス同時定量システムの確立と移植後のウイルス感染症診断への応用…………… 61
木村宏
9. 新規技術を用いた細菌, 真菌感染症の迅速で正確な感染症診断技術の開発とその評価…………… 67
錫谷達夫
10. 造血幹細胞移植患者病棟における呼吸器ウイルス感染症の流行に関する前方視的研究…………… 73
谷口修一
11. ヒトヘルペスウイルス 6 に対する細胞性免疫能に関する研究…………… 77
森康子
12. 移植後 HHV-6 感染症の診断・治療・予防法の開発…………… 79
吉川哲史

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 83

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
研究代表者 西條政幸

研究要旨:

最近の造血幹細胞移植を含む臓器移植(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。臓器移植患者における感染症は、移植医療における克服・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立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前方視的調査、臓器移植患者における薬剤耐性ヘルペスウイルスの迅速診断法の開発、臓器移植患者における薬剤耐性単純ヘルペスウイルス出現のモニタリング、新規抗ヘルペス薬の作用機序の解析、臓器移植患者慢性期の小児におけるワクチン接種の有効性と安全性に関する評価、臓器移植患者において問題となる JC ウイルスや BK ウイルスを迅速に検出するためのシステム開発、真菌感染症の新規迅速診断システム開発に関する基礎研究と臨床における有用性の評価、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能の評価法の開発等、移植急性期、回復期における感染症対策のための研究を実施した。以下の結果を得た。

- 1) 造血幹細胞移植患者における単純ヘルペスウイルス1型の排出状況と薬剤耐性ウイルスの出現:造血幹細胞移植患者における単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)感染症の実態を前方視的にウイルス分離法を用いて解析し、分離されたHSV-1のアシクロビル(ACV)に対する感受性を調べた。造血幹細胞移植を受けた79人の患者において、HSV-1を口腔内に排出していたのは9人(11%)で、比較的長期に排出し続けた患者は6人であった。その6人から分離されたHSV-1のACVに対する感受性を調べたところ、2名で薬剤感受性の低下が認められた。造血幹細胞移植患者においては、带状疱疹や単純疱疹の発症予防のために、ACVの予防投与が行われている。このような患者では、ACV耐性HSV-1は比較的高い頻度で出現していることが明らかにされた。
- 2) 生体肝移植後の感染症の発症率、起因微生物、危険因子の包括的観察、および侵襲性アスペルギルス症の発症危険因子に関する疫学研究:京都大学病院における生体肝移植後の感染症サーベイランスを行うことで、発症率、起因微生物、危険因子包括的観察研究、および、我が国における生体肝移植後の侵襲性アスペルギルス症の多施設疫学調査を計画した。京都大学において倫理審査を受け、感染症サーベイランス調査用紙、侵襲性アスペルギルス症の発症状況と発症例の臨床情報を得るための質問票・症例票を完成させ

た。

- 3) 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: サイトメガロウイルス(CMV)及び水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)に対する新規抗ウイルス薬開発を目的として、これまでにランダム化合物のスクリーニングにより、いくつかの化合物を同定し、抗VZV化合物35B2に対する耐性株を作製し耐性に関与する遺伝子産物を検索することにより、その作用機序を明らかにすることを試みた。35B2はACV耐性株に効果があり、また逆に、ACVは35B2耐性株に対して効果があったことから、35B2の作用機序は既存薬と異なることが明らかとなった。35B2耐性株R1の塩基配列を70遺伝子中37遺伝子約60kbまで決定し、ORF62及びORF1にアミノ酸変異を同定した。別の耐性株R2及びR3には、同様な変異が見られないことから、さらに対象遺伝子を広げ解析を進め留必要がある。また、昨年度本研究班で確立したin vivo imaging法を用いて、in vivoにおいても新規抗CMV化合物DPPCがGPCMV感染に対して有効であることが明らかにされた。
- 4) 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: 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、昨年度に引き続き深在性真菌症の原因真菌であるクリプトコックス属について、細胞壁表層・分泌蛋白を標的とした潜伏感染診断系の基盤的研究を行った。さらに、カンジダ属について細胞壁表層・分泌蛋白の網羅的同定を試み、発現が多いと考えられた蛋白に対する抗体の抗カンジダ活性について基礎的検討を行った。本検討から細胞表層抗原に対する抗体がカンジダ増殖抑制効果を有する可能性が示唆され、更なる検討を継続している。
- 5) 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: サイトメガロウイルス(CMV)の新規検出系であるPML法を利用し、移植医療において有用なphenotypicな薬剤感受性試験法の有用性を、臓器移植後の患者から採取された臨床検体を用いて検討した。アンチゲネミア試験陽性と判定された造血幹細胞移植後患者20名の末梢単核細胞(PBMC)における検討では、本法により活動性CMVを高感度に検出することが可能であり、その検出率とウイルスゲノム量は相関するという結果が得られた。薬剤感受性試験を施行した19症例中、6症例で感受性が低下していると判定されたが、その内5例には薬剤耐性を誘導する遺伝子変異は検出されなかった。一方、薬剤耐性遺伝子変異の見つかった2例のうち1例はPML法で感受性低下と判定された。さらなる改良が必要であるものの、PML法は臓器移植患者におけるCMV感染症の診断と治療において有用な検査となることが示唆された。
- 6) 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: 造血細胞移植後に定期的な定量的リアルタイムPCRを実施することにより、3例の患者でEBウイルスによる移植後リンパ増殖症(EBV-LPD)が診断された。EBV感染細胞の同定として、リンパ球サブセット別のリアルタイムPCRを行ったところ、主にBリンパ球(CD19陽性細胞)へのEBV感染が認められたが、抗CD20抗体による治療後にCD19陽

性、CD20 陰性分画に EBV 感染が持続した例が認められた。1 例では B リンパ球のみでなく、T リンパ球 (CD3 陽性細胞) にも EBV コピー数の高値が認められた。3 例とも抗 CD20 抗体および抗ウイルス剤の併用で改善した。

- 7) 肝移植後慢性期の小児における 2009 新型 H1N1 インフルエンザワクチンの有効性と安全性についての検討: 新型 H1N1 インフルエンザの世界的大流行が話題となった 2009 年季において、肝移植後慢性期の免疫抑制療法下にある小児を対象に、免疫抑制療法下でない小児を対照として不活化同ワクチンの効果と安全性を検討した。患者群においても対照群と同様に重篤な副作用は認められず、また拒絶反応の誘発も認められなかった。有効抗体価獲得率、抗体陽転率ともに対照群と差は認められず、同季に接種された季節性インフルエンザと比べて陽転率は高い傾向を示した。慢性期の小児肝移植患者は、健常児と同様に不活化新型 H1N1 ワクチンに安全かつ有効に反応することが示唆された。
- 8) マルチプレックスリアルタイム PCR 法による BK ウイルス・JC ウイルス・アデノウイルス同時定量システムの確立と移植後のウイルス感染症診断への応用: BK ウイルス (BKV)、JC ウイルス (JCV)、および、アデノウイルス (AdV) は、それぞれ、腎臓移植後のウイルス性腎症、進行性多巣性白質脳症、造血幹細胞移植後の出血性膀胱炎の代表的な原因ウイルスである。これら 3 種のウイルスに対し、異なる蛍光色素で標識したプローブを用い、同一チューブ内で同時定量するシステムを確立し、臓器移植患者の臨床検体を用いて診断におけるその有用性を検討した。腎移植後患者の尿 124 検体中、BKV、JCV、および AdV は、それぞれ 29 (23.6%)、50 (40.3%) および 2 検体 (1.6%) で陽性 (7 検体で複数のウイルスが陽性) を呈した。尿中に Decoy 細胞が認められた 31 例中、BKV が 10^8 コピー/mL 以上の 2 例は組織検査により BKV 腎症と診断された。造血幹細胞移植後に出血性膀胱炎に罹患した患者血清 18 検体では、BKV、JCV、および AdV は、それぞれ 6 検体 (33.3%)、2 検体 (11.1%)、および 3 検体 (16.7%) から検出された。今回開発された BKV・JCV・AdV 同時定量システムを導入することにより、これらのウイルス遺伝子を特異的かつ高感度に検出することが可能となり、腎臓移植後の尿中ウイルスのモニタリングがより迅速かつ簡便となる。また、尿中の BKV 定量は腎移植後の BKV 腎症の診断的意義があることが示唆された。
- 9) 新規技術を用いた細菌、真菌感染症の迅速で正確な感染症診断技術の開発とその評価: 菌血症や敗血症が疑われる患者から血液培養を実施しても、起炎菌が検出される割合は予想に反して低い。この原因が“培養”という検査法の欠陥によるものか、発熱の原因が感染であることが実際に少ないためであるのかは不明である。本研究では、独自に開発された PCR を基盤とする検査を行うことにより、この問題の解決に取り組んだ。造血幹細胞移植後に発熱を来した患者由来の 21 サンプルを解析した結果、6 例が培養陽性を呈したが、PCR では培養された菌は検出されず、PCR 検査の感度は比較的低いことが明らかとなった。一方、培養法では検出されないグラム陰性桿菌が多数検出されたこと、*Candida albicans* は検出されず、それ以外の真菌が検出されたことから、①培養法と PCR 法の比

較検討によって免疫不全患者の発熱原因を探るための基盤と、②予防的な抗菌薬投与による常在菌叢の変化をモニタリングするための基盤が確立された。

- 10) 造血幹細胞移植患者病棟における呼吸器ウイルス感染症の流行に関する前方視的研究: 虎の門病院で2010年6月から12月の期間に造血幹細胞移植を行った90例に対して、移植直前から移植後100日前後までの入院中の期間、週1回の頻度で咽頭拭い液を採取し、呼吸器ウイルスおよび単純ヘルペスウイルスとサイトメガロウイルスのモニタリングを行った。全90例のうち、完遂した症例が22例、退院、死亡にて中止した症例がそれぞれ30例と22例で、現在継続中の症例が16例である。全症例中でウイルスが検出されたのは35例であり、分離されたウイルスの内訳はパラインフルエンザ3型(PIV3, 7例)、RSウイルス(1例)、ムンプスウイルス(1例)、単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1, 9例)であった。HSV-1検出例で口内炎を発症していたのは1例のみで、その他の症例では、重症例に多く検出されていた。PIV3検出例に関しては、全例で呼吸器症状を認め、肺炎を発症しているのが全症例の約半数であり、移植後早期に発症している症例、発症時のリンパ球数が少ない症例で予後が不良であった。また、PIV3の検出率が高かったことから、PIV3の病棟内流行の可能性が考えられた。
- 11) ヒトヘルペスウイルス6型に対する細胞性免疫能に関する研究: 臓器移植や造血幹細胞移植後にヒトヘルペスウイルス6型(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、HHV-6に対する細胞性免疫能の測定系を確立した。本年度は、さらに7名の健常人ボランティアより提供された末梢血より単核球を分離し、IFN- γ ELISPOT法による検討を行った。HHV-6精製ウイルス粒子を用いたIFN- γ ELISPOT法により、健常人PBMCを用いたHHV-6に対する細胞生免疫能の高感度測定法を検討、確立した。
- 12) 移植後HHV-6感染症の診断・治療・予防法の開発: 造血幹細胞移植後のHHV-6感染症診断のためにリアルタイム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た。本年度は、その造血幹細胞移植患者におけるHHV-6の再活性化の評価のための臨床的有用性を検討した。このシステムを用いて、HHV-6の関与が示唆されている疾患の中から悪性リンパ腫を選択し、本ウイルスとの関連性を解析した。具体的には、HHV-6 DNAの検出された悪性リンパ腫組織中のHHV-6遺伝子発現を解析し、これらの患者リンパ組織でHHV-6が潜伏感染しているのか再活性化しているのかを明らかにした。その結果、過去の成績同様HHV-6の潜伏感染は確認されたが、再活性化の頻度は極めて低いことが明らかとなった。

研究分担者:

一山智

京都大学大学院医学研究科臨床病態検

査学

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、以前に比べて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年々増加している。臓器の移植に関する法律(臓器移植法、平成9年7月16日法律第104号)が施行され、同法律はさらに平成21年に法改正されて亡くなった患者の家族の同意があれば亡くなった患者の臓器を提供することが可能となった。同法改正以来、脳死患者をドナーとする臓器移植実施数が増加している。つまり、脳死患者からの臓器移植、例えば心臓、肝臓、肺臓などの移植もこれまで以上に増加

している。さらに、造血幹細胞移植領域においても移植数が急激に増加している。

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も造血幹細胞移植が多く患者で実施されている。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なっている。このように最近では臓器移植は、治療法として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技術の向上、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、臓器移植患者においては、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。また、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)に罹患している、移植を受けた患者(レシピエント)の多くが死亡するといった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。

今年度は、昨年度に引き続き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と治療、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分離法による前方視的研究に基づくウイルス性気道感染症に関する臨床研究, 肝臓移植患者におけるインフルエンザワクチン(パンデミックフル2009 に対するワクチン)接種に関する臨床研究がなされた。また, 真菌感染症対策として, 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や新規技術を用いた細菌, 真菌感染症の迅速で正確な感染症診断技術の開発とその評価に関する研究がなされ, 生体肝移植後の感染症の発症率, 起因微生物, 危険因子の包括的観察, および侵襲性アスペルギルス症の発症危険因子に関する疫学研究が準備された。

B. 研究方法

1. 造血幹細胞移植患者における単純ヘルペスウイルス 1 型感染症に関する研究。
患者は虎ノ門病院血液内科にて造血幹細胞移植治療を受けた患者の 79 人を対象として, 単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) の排出状況と病変の出現についてウイルス分離法を用いて検討した。患者のほとんどは, HSV-1, HSV-2 および水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV) の再活性化予防のために, アシクロビル (ACV) が予防投与されている。分離された継代歴 2 代以内の HSV-1 は, 国立感染症研究所ウイルス第一部に搬送され, ACV に対する感受性とウイルス性チミジンリン酸化酵素 (viral thymidine kinase, vTK) 遺伝子および DNA ポリメラーゼ遺伝子の塩基配列が決定された。
2. 生体肝移植後の感染症の発症率, 起因微生物, 危険因子の包括的観察, およ

び侵襲性アスペルギルス症の発症危険因子に関する疫学研究。「生体肝移植後感染症の臨床疫学調査」として, 京都大学病院において約 1.5 年間の生体肝移植例(およそ 100 例)について背景, 術後経過, 予後に関する臨床情報を収集する。同時に術後 30 日間, 細菌, 真菌, ウイルス感染症の発生の有無を観察し, 発症率, 原因微生物と臨床情報との関連を解析する。また, 「生体肝移植後の侵襲性アスペルギルス症の全国の実態調査」として, 全国の肝移植実施施設を対象に, 肝移植実施全例の背景因子の情報, および術後 1 年間の侵襲性アスペルギルス症症例について発症時の状態, 治療, 予後に関する情報を調査票形式で収集する。

3. 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に関する研究。MeWo 細胞, ヒト 2 倍体細胞 HLF, モルモット胎児肺細胞 GPL, VZV レポーター細胞 MV9G が用いられた。ウイルスは, VZV P-Oka 株, ワクチン株 V-Oka, ACV 耐性の Kanno 株, V-OkaYSR 株, マウス CMV (MCMV) 及び EGFP 発現 MCMV が用いられた。VZV や CMV の薬剤感受性はブランク減少法により測定された。感染細胞から精製した DNA を材料として, 各遺伝子 DNA 断片を増幅し, 塩基配列を決定した。また, EGFP 発現組換え MCMV をマウスに感染させ, その増殖の程度を, 蛍光シグナルを in vivo imaging 装置 Maestro を用いて解析することにより測定した。
4. 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、カンジダ属に対して、細胞の膜表面蛋白、分泌蛋白を網羅的に解析する方法 SST-REX 法を用いて分泌蛋白等を同定した。 *Cryptococcus neoformans* ATCC90112 株および *Candida albicans* SC5314 株を増殖させ、それぞれの集められた菌から全 RNA を抽出した。 ついで *C. neoformans*, *C. albicans* の全 RNA から cDNA を作成し、MPL^V を含む発現ベクターを用いて cDNA ライブラリーを作製した。 それをマウス由来 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*, *C. albicans* 由来遺伝子と推定される遺伝子断片の塩基配列を決定した。 比較的発現量の多かった *CnHIP1* についてその局在を確認し、分泌の可能性について検討した。 得られた SST クローンの一部については、SST クローンに対するモノクローナル抗体作製し、その抗カンジダ活性の有無を検討した。
5. 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。 造血幹細胞移植後にサイトメガロウイルス (CMV) アンチゲネミア試験陽性と判定された 20 症例、25 検体の血液検体 (EDTA 加血) を用いて、新規 CMV 感染細胞検出法 (PML 法) の CMV 感染症の診断および薬剤感受性試験法への応用における有用性を検討した。
 6. 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。 3 名の造血幹細胞移植患者 (症例 1, 2 は Fanconi 貧血, 症例 3 は副腎白質ジストロフィーの患児) において、造血幹細胞移植 (3 例とも前処置に ATG が使用された) の移植後に毎週 1 回、末梢血液中の EB ウイルス、CMV、ヒトヘルペスウイルス 6 型 (HHV-6) のウイルスゲノム量を定量的リアルタイム PCR 法により定量した。
 7. 肝移植後慢性期の小児における 2009 新型 H1N1 インフルエンザワクチンの有効性と安全性についての検討。 生体肝移植後の小児 13 例と免疫抑制療法下のない児 31 例 (対照群) を対象として、移植後 1 年以上を経過し、免疫抑制剤を減量でき (全例タクロリムス 1 剤) 安定している症例におけるインフルエンザワクチン接種の有効性と安全性について検討した。
 8. マルチプレックスリアルタイム PCR 法による BK ウイルス、JC ウイルス、アデノウイルス同時定量システムの確立と移植後のウイルス感染症診断への応用に関する研究。 BK ウイルス、JC ウイルス、アデノウイルス同時定量システムを開発し、腎移植後患者 124 例 (平均 47 歳, 男/女: 79/45, 移植後平均 78 カ月) より得られた尿と造血幹細胞移植後に出血性膀胱炎を罹患した患者 18 例 (平均 15 歳, 男/女: 12/6, 移植後平均 2.4 カ月) から得られた血清の臨床検体を用いて、その診断における有用性を検討した。
 9. 新規技術を用いた細菌、真菌感染症の迅速で正確な感染症診断技術の開発とその評価に関する研究。 独自に開発された PCR を基盤とする真菌および細菌を検出するシステムの、造血幹細胞移植患者における感染症診断法における有用性を、造血幹細胞移植後に発熱を来

した患者から採取された 21 検体を用いて解析した。

10. 造血幹細胞移植患者病棟における呼吸器ウイルス感染症の流行に関する前方視的研究. 虎の門病院血液内科で 2010 年 6 月から 12 月までに造血幹細胞移植が施行された 90 例を対象とした. 移植前週から移植後 14 週までの期間, 毎週 1 回咽頭拭い液を採取した後, 検体培地を仙台医療センターのウイルスセンターに搬送した. 同センターでは, 4 種類の細胞を用いて呼吸器ウイルスを分離するための HHVM プレート法を用いてウイルス分離・同定を行った. 各症例について, 検出ウイルスと臨床症状を照合し検討を行った.
11. ヒトヘルペスウイルス 6 型(HHV-6)に対する細胞性免疫能の測定法に関する研究. 昨年度に健常人 2 名より提供頂いた末梢血単核球(PBMC)を用いて確立した方法の HHV-6 に対する細胞性免疫能の測定法の有用性について, さらにボランティア数を増やして解析するとともに, PBMC 数および刺激抗原の調整法を検討して, より感度の高い系の確立を試みた.
12. 移植後 HHV-6 感染症の診断・治療・予防法の開発に関する研究. 本研究班の昨年度の成果として開発された HHV-6 の前初期(U90), 初期(U12), 後期(U100)の各遺伝子の発現を定量的に測定するリアルタイム RT-PCR 法を用いて, 藤田保健衛生大学血液内科を受診した 125 名の患者から採取された生検リンパ組織中の HHV-6 の遺伝子発現を測定した.

C. 研究結果

1. 造血幹細胞移植患者における単純ヘルペスウイルス 1 型感染症に関する研究. 対象の 79 人のうち, 咽頭スワブから HSV-1 が分離されたのは 9 人(11%)であった. また, 移植術中複数回 HSV-1 が咽頭スワブから分離された患者は 6 人であった. 同一患者において複数回にわたり HSV-1 が分離された患者 6 人の中で, 薬剤耐性 HSV-1 が出現したのは 2 名であった. 造血幹細胞移植患者においては薬剤耐性 HSV-1 感染症が比較的容易に出現することが明らかにされた.
2. 生体肝移植後の感染症の発症率, 起因微生物, 危険因子の包括的観察, および侵襲性アスペルギルス症の発症危険因子に関する疫学研究. 「生体肝移植後感染症の臨床疫学調査」は倫理審査が終了し, 診療担当医と具体的な実施についての最終準備段階であり, 平成 22 年度内に開始予定である. また, 「生体肝移植後の侵襲性アスペルギルス症の全国の実態調査」については, 倫理審査結果を待ちつつ, 収集すべき情報と侵襲性アスペルギルス症の診断基準を吟味し, 最終的な症例票の完成を急いでいる.
3. 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に関する研究. 現行の薬剤より細胞培養レベルで優れる抗 VZV 化合物 35B2 は, ACV 耐性株にも効果があった. 35B2 耐性株を作出した. 耐性株 R1 のゲノムの半分以上に当たる領域の塩基配列をすでに決定し, 原因変異の特定を進めている. 新規抗 CMV 化合物 DPPC は, 個体レベルでも統計的に有意な効果があった.

4. 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 SST-REX 法を応用し, 細胞表面層蛋白・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. このうちの CnHip1 の細胞内で発現している局在を解析したところ, 細胞壁で発現していることが認められた. 抗 CnHip1 抗体作製を試み, これを標的とした ELISA 系の構築を行っている. SST-REX 法で確認された *C. albicans* の SST クローンに対するモノクローナル抗体には, *C. albicans* に対する増殖抑制効果がある可能性が認められた.
5. 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. アンチゲネミア試験陽性と判定された造血幹細胞移植後患者 20 名の末梢血単核球細胞 (PBMC) を用いた検討では, 本法は活動性 CMV を高感度に検出可能であり, その検出率とウイルスゲノム量は相関する傾向が得られた. 薬剤感受性試験が施行された 19 症例中, 6 症例が感受性低下と判定されたが, 内 5 例には薬剤耐性を誘導する遺伝子変異は検出されなかった. 逆に, 薬剤耐性遺伝子変異が認められた 2 例のうち 1 例のみで PML 法で感受性低下と判定された.
6. 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. 造血幹細胞移植小児において, 移植後に EBV コピー数が急増した 3 症例 (症例 1, 症例 2, 症例 3) の臨床経過は, 以下の通りである. 1) EBV コピー数が急増したのは, それぞれ移植後 39 日, 61 日, 39 日であった, 2) その後数日に全ての患者で高熱を認めた, 3) 症例 1, 症例 2, 症例 3 の EBV コピー数は, 全血でそれぞれ 12×10^4 コピー/ μgDNA , 4×10^4 コピー/ μgDNA , 12×10^4 コピー/ μgDNA であった. 3 例とも, 免疫抑制剤の中止と同時に, rituximab $375\text{mg}/\text{m}^2$ /回の投与を行った. 症例 1 では 1 回目投与後も EBV コピー数はさらに上昇したが, 3 回の投与により, 著明な改善が得られた. 症例 2 は 1 回の投与のみで軽快し, 症例 3 では B+T 細胞に EBV ウイルス感染している可能性があるため, rituximab 投与と同時にヘルペスウイルスの DNA ポリメラーゼ阻害薬であるホスカビル (フォスカルネット) の投与を行い, B, T 細胞双方の EBV コピー数の著明な減少が得られた.
7. 肝移植後慢性期の小児における 2009 新型 H1N1 インフルエンザワクチンの有効性と安全性についての検討. 抗体陽転率は肝移植群 46.2%, 対照群 51.6% (NS), 有効抗体保有率は接種前後で肝移植群 7.7%/53.8%, 対照群 19.4%/58.1% (接種前・接種後ともに NS) であった. 抗体力価の幾何平均 (GMT) は, 接種前後で肝移植群 6.2/32.3 (5.2 倍), 対照群 12.5/48.9 (3.9 倍) で接種後に有意差はなかった. 肝移植群における 2009H1N1 インフルエンザワクチンと季節性インフルエンザワクチンの比較では, 抗体陽転率が 2009H1N1 46.2%, 季節性 A/H1N1 25%, 季節性 A/H3N2 8.3%, 季節性 B 8.3% と 2009H1N1 ワクチンが良好であった. 免疫抑制療法下の小児でも, 免疫低下にない小児と同様に不活化 2009H1N1 インフルエンザワクチンに反

応することが示唆された。

8. マルチプレックスリアルタイム PCR 法によるBKウイルス, JCウイルス, アデノウイルス同時定量システムの確立と移植後のウイルス感染症診断への応用に関する研究. 腎移植後患者の尿 124 検体中の3種ウイルスを同時定量した. BKウイルス, JCウイルス, および, アデノウイルスは, それぞれ 29 検体 (23.6%), 50 検体 (40.3%), 2 検体 (1.6%)で陽性(7検体で複数のウイルスが陽性)を呈した. BK および JC ウイルス量と decoy cell との関係のみたところ, decoy cell が検出された尿中で有意に多量のウイルスが検出された. さらに, 尿中に decoy 細胞が認められた 31 例中, BKV が 10^8 copies/mL 以上の 2 例は組織検査により BK ウイルス腎症と診断された. 造血幹細胞移植後に出血性膀胱炎に罹患した患者血清 18 検体では, BKウイルス, JCウイルス, アデノウイルスは, それぞれ 6 検体 (33.3%), 2 検体 (11.1%), 3 検体 (16.7%)から検出された. 今回開発されたこれらウイルスの同時定量システムを導入することにより, 標的遺伝子を特異的かつ高感度に検出が可能となり, 腎臓移植後の尿中ウイルスのモニタリングがより迅速かつ簡便となる. また, 尿中の BK ウイルス定量は同ウイルスによる腎症の診断に有用であることが示唆された.
9. 新規技術を用いた細菌, 真菌感染症の迅速で正確な感染症診断技術の開発とその評価に関する研究. 造血幹細胞移植後に発熱を来した患者由来の 21 検体を用いて, 今回開発された PCR を基盤と

する検査法の病原体診断における有用性を評価した. 21 検体中 6 検体が培養陽性を呈したが, その検体からは本 PCR では分離された菌と同じ菌の遺伝子は増幅されなかった. つまり, 本 PCR 検査の感度は比較的低いことが明らかとなった. 一方, 培養法では検出されなかったグラム陰性桿菌の遺伝子が多数検出されたこと, *Candida albicans* は検出されなかったものの, それ以外の真菌の遺伝子が検出された. 今後, 更に詳細な培養法と本 PCR 法の感染症診断における有用性を比較検討が必要であると考えられる.

10. 造血幹細胞移植患者病棟における呼吸器ウイルス感染症の流行に関する前方視的研究. 全症例のうち, 何らかのウイルスを検出したのは 35 例 (39%)であり, その内訳は, パラインフルエンザ 3 型 (PIV-3) が 27 例, RS ウイルスが 1 例, ムンプスウイルスが 1 例, HSV-1 が 9 例であった (PIV-3 と HSV-1 の重複検出症例あり). PIV-3 検出症例が多く, 病棟内で流行した可能性が示唆された. PIV-3 検出例や HSV-1 検出例では, 予後不良であるケースが多かった. ムンプスウイルス検出例では, 唾液腺腫脹が認められ, RS ウイルス検出例では上気道症状が認められた. 造血幹細胞移植病棟内では, 呼吸器ウイルス感染症の流行が拡がりやすく, 常に呼吸器ウイルス感染症の流行を阻止するための対策が重要であることが示唆された.
11. HHV-6 に対する細胞性免疫能の測定法に関する研究. 検体数を多くする事により, HHV-6 に対する細胞性免疫能の検

出に必要な PBMC には幅があり、 1×10^6 個での測定結果が最も感度が良く、かつ、効率的に多くのボランティアの細胞性免疫能の検出が可能であった。また刺激抗原量は、 $1 \mu\text{L}$ での刺激で充分であった。HHV-6 精製ウイルス粒子を用いた IFN- γ ELISPOT 法により、健康人 PBMC を用いた HHV-6 に対する細胞生免疫能の高感度測定法が確立された。

12. 移植後 HHV-6 感染症の診断・治療・予防法の開発に関する研究. 125 検体中 44 検体 (35.2%) で HHV-6 DNA が検出された ($4.6 \sim 11600$ コピー/ μg 、平均: 217 ± 116 コピー/ μg)。HHV-6 DNA 陽性検体の中で凍結保存細胞が残存していた検体について、リアルタイム RT-PCR 法により遺伝子発現の有無を解析した結果、1 検体だけ U90、U12、U100 の三種類の遺伝子発現が確認されたが、その他の検体ではいずれの遺伝子転写産物も検出されなかった。

D. 考察

1. 臓器移植患者におけるヘルペスウイルス感染症対策に関する研究

本年度は、臓器移植患者で致死的な感染症の原因となることの多いヘルペスウイルス感染症対策のための研究として、1) 造血幹細胞移植患者における単純ヘルペスウイルス 1 型感染症に関する研究、2) 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、3) 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、4) ヒトヘルペスウイルス 6 型 (HHV-6) に

対する細胞性免疫能の測定法に関する研究、5) 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に関する研究、6) 移植後 HHV-6 感染症の診断・治療・予防法の開発に関する研究、等がなされた。

新規抗ウイルス薬の開発やその作用機序の解明という基礎研究から造血幹細胞移植患者における薬剤耐性 HSV-1 感染症や CMV 感染症の実態を解明する臨床研究がなされた。さらに、小児における幹細胞移植患者において定期的にヘルペスウイルスの遺伝子量をモニタリングすることで、予後不良な EB ウイルスによる移植後リンパ増殖症の早期診断が可能となり、予後改善のためにそれが有効であることが示唆された。

臓器移植患者における感染症対策においては、細胞性免疫能を測定することが必要である。本研究班においては HHV-6 に対する細胞性免疫測定システムが開発され、その有用性が評価された。

2. 臓器移植患者におけるヘルペスウイルス感染症以外のウイルス感染症対策に関する研究

臓器移植患者において致死的な感染症を引き起こすウイルスの代表例としては、JC ウイルスや BK ウイルスが挙げられ、それぞれ進行性多巣性白質脳症や腎症の原因病原体である。また、移植時に呼吸器ウイルス感染症に罹患すると、それが致死的な感染症を引き起こすことが知られている。その詳細を把握するには院内感染流行の実態を調査することが重要である。また、移植患者にお

いては、移植早期における感染症対策は重要な課題ではあるが、移植治療終了後の慢性期(回復期)における感染症対策も重要な課題である。そこで、本年度は、以下の研究課題について検討がなされた。1) マルチプレックスリアルタイムPCR法によるBKウイルス、JCウイルス、アデノウイルス同時定量システムの確立と移植後のウイルス感染症診断への応用に関する研究、2) 造血幹細胞移植患者病棟における呼吸器ウイルス感染症の流行に関する前方視的研究、3) 肝移植後慢性期の小児における2009 新型 H1N1 インフルエンザワクチンの有効性と安全性についての検討、等に関する研究がなされた。

一度、呼吸器ウイルスが感染症病棟内に入り込み、臓器移植患者が呼吸器ウイルス感染症に罹患すると、比較的長期にわたり感染性のウイルスを排出し続けることが原因で、長期にわたり院内感染が続くことが明らかにされた。JCウイルス、BKウイルス、アデノウイルスの迅速かつ同時検出が定量性をもって可能となるシステムが開発された。

慢性期の移植患者においては、比較的安全に、インフルエンザワクチン接種が可能であることも示唆された。

3. 真菌感染症対策に関する研究

臓器移植患者における真菌感染症対策として、培養によらない真菌と細菌を網羅的に、かつ、定量性をもって検出するためのシステムの開発とその診断における有用性の評価(新規技術を用いた細菌、真菌感染症の迅速で正確な感染症診断技術の開発とその評価に関す

る研究)や真菌の潜伏感染機序の解明に関する研究(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。また、臓器移植患者における真菌感染症は、主に侵襲性深部感染症を呈し、診断と治療に難渋することが多い。全国調査等を通して、臓器移植患者における真菌感染症の実態を解明するための全国調査(生体肝移植後の感染症の発症率、起因微生物、危険因子の包括的観察、および侵襲性アスペルギルス症の発症危険因子に関する疫学研究)の準備がなされた。

今年度の活動においては、基礎的な研究から臨床的な研究が幅広く実施され、造血幹細胞移植を含む臓器移植患者の予後の改善には感染症対策技術のさらなる向上が求められる。臓器移植患者における侵襲性真菌感染症の実態調査と診断法の改良、呼吸器ウイルス感染症の病棟内院内感染対策、薬剤耐性ヘルペスウイルス感染症対策を含む臓器移植患者におけるヘルペスウイルス感染症の診断と治療に関する提言等、具体的な成果が求められる。

今後、益々移植医療の質の向上が図られ、移植医療を受ける患者も増加するものと予想される。臓器移植を受けたより多くの患者が日常生活を送る社会が実現されなければならない。そのためには、移植術急性期の感染症対策だけでなく、移植術を受けた患者の慢性期(後期)における感染症対策を通じたQOLの向上に繋がる研究がこれまで以上に望まれる。

E. 結論

本研究においては、臓器移植患者の診断と治療のために資する研究を行い、患者の QOL を向上するための科学的な活動がなされている。今年度の活動においては、基礎的な研究から臨床的な研究が幅広く実施された。本研究班の来年度の活動においては、臓器移植患者におけるウイルスや真菌感染症対策と QOL の向上に向けた、感染症対策のための診断と治療におけるガイドラインの策定、公衆衛生上に有用な提言等をまとめることが重要な課題である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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* 112:153-156, 2010
- 2) Shiota, T., Kurane, I., Morikawa, S., Saijo, M.: Long-term observation of HSV-1 infections in a child with Wiskott-Aldrich syndrome and possible reactivation mechanism of TK-negative HSV-1 in humans. *Japanese Journal of Infectious Diseases* (in press)
- 3) 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. *Antiviral Research* 88:45-52, 2010
- 4) 金井亨輔, 山田壮一, 井上直樹: 特集: ヘルペスウイルス HHV-3 (VZV): ウイルス 66:197-208, 2010
- 5) Inoue, N.: Chapter 84 Human herpesvirus 5 (cytomegalovirus). In: (Ed) Liu D, "Molecular detection of human viral pathogens" Taylor & Francis CRC Press, pp.949-962, 2011
- 6) Nagi, M., Nakayama, H., Tanabe, K., Bard, M., Aoyama, T., Okano, M., Higashi, S., Ueno, K., Chibana, H., Niimi, M., Yamagoe, S., Umeyama, T., Kajiwara, S., Ohno, H., Miyazaki, Y.: Transcription factors CgUPC2A and CgUPC2B regulate ergosterol biosynthetic genes in *Candida glabrata*. *Genes Cells* 16: 80-89, 2011.
- 7) Tomita, H., Muroi, E., Takenaka, M., Nishimoto, K., Kakeya, H., Ohno H., Miyazaki, Y., Utani, A.: *Rhizomucor variabilis* infection in human cutaneous mucromycosis. *Clinical and Experimental Dermatology* (in press)
- 8) Kaneko, Y., Ohno, H., Kohno, S., Miyazaki, Y.: Micafungin alters the expression of genes related to cell wall integrity in *Candida albicans* biofilms. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 63: 355-357, 2010.
- 9) Kaneko, Y., Ohno, H., Fukazawa, H., Murakami, Y., Imamura, Y., Kohno, S., Miyazaki, Y.: Anti-candida-biofilm activity of micafungin is attenuated by

- voriconazole but restored by pharmacological inhibition of Hsp90-related stress responses. *Medical Mycology* 48: 606–612, 2010.
- 10) 大野秀明. カンジダ属による心血管系感染の治療. IDSAガイドライン真菌症治療のUP-TO-DATE(河野 茂編), 医薬ジャーナル社, p163–168, 大阪, 2010
- 11) Yamamoto, K., Ishikawa, C., Katano, H., Yasumoto, T., Mori, N.: Fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol, induce apoptosis of primary effusion lymphomas. *Cancer Letters* 2011 300:225–234.
- 12) Katano, H., Kano, M., Nakamura, T., Kanno, T., Asanuma, H., Sata, T.: A novel real-time PCR system for simultaneous detection of human viruses in clinical samples from patients with uncertain diagnoses. *Journal of Medical Virology* 2011 83:322–330.
- 13) Yabe, H., Yabe, M., Koike, T., Shimizu, T., Morimoto, T., Kato, S.: Rapid improvement of life-threatening capillary leak syndrome after stem cell transplantation by bevacizumab. *Blood* 115: 2723–2724, 2010
- 14) Hishizawa, M., Kanda, J., Utsunomiya, A., Taniguchi, S., Eto, T., Moriuchi, Y., Tanosaki, R., Kawano, F., Miyazaki, Y., Masuda, M., Nagafuji, K., Hara, M., Takanashi, M., Kai, S., Atsuta, Y., Suzuki, R., Kawase, T., Matsuo, K., Nagamura-Inoue, T., Kato, S., Sakamaki, H., Morishima, Y., Okamura, J., Ichinohe, T., Uchiyama, T.: Transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells for adult T-cell leukemia: a nationwide retrospective study. *Blood* 116:1369–1376, 2010
- 15) Tomita, Y., Yasuda, Y., Hyodo, H., Koike, T., Shimizu, T., Morimoto, T., Hattori, K., Matsumoto, M., Inoue, H., Yabe, H., Yabe, M., Shinohara, O., Kojima, S., Minemura, T., Kato, S.: High incidence of fatty liver and insulin resistance in long-term adult survivors of childhood stem cell transplant. *Bone Marrow Transplantation* 2010 Jun 21 [Epub ahead of print]
- 16) Takanashi, M., Atsuta, Y., Fujiwara, K., Kodo, H., Kai, S., Sato, H., Kohsaki, M., Azuma, H., Tanaka, H., Ogawa, A., Nakajima, K., Kato, S.: The impact of anti-HLA antibodies on unrelated cord blood transplantations. *Blood* 116: 2839–2846, 2010
- 17) Yabe, M., Morimoto, T., Shimizu, T., Koike, T., Takakura, H., Arakawa, S., Kato, S., Yabe, H.: Therapy-related myelodysplastic syndrome of recipient origin in a juvenile myelomonocytic leukemia patient 17 years after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplantation* 2010 Sep 27. [Epub ahead of print]
- 18) Yabe, M., Shimizu, T., Morimoto, T., Koike, T., Takakura, H., Suganuma, E., Sugiyama, N., Kato, S., Yabe, H.: Alternative donor marrow transplantation in children with aplastic anemia using low-dose irradiation and fludarabine-based conditioning. *Bone*