

- Marrow Transplantation 2010 Oct 18.  
[Epub ahead of print]
- 19) 渡辺修大, 足立壮一, 堀部敬三, 永利義久, 加藤剛二, 田淵 健, 吉見礼美, 加藤俊一, 矢部普正, 日本小児白血病リンパ腫研究グループ(JPLSG)SCT委員会. 小児急性骨髄性白血病第一寛解期でのHLA一致同胞間骨髄移植におけるGVHD予防(MTX単独vs. CyA群)の比較. 日本小児血液学会雑誌 2010;24(1): 32-36.
- 20) Nagai, S., Fujimoto, Y., Kamei, H., Nakamura, T., Kiuchi, T.: Mild hepatic macrovesicular steatosis may be a risk factor for hyperbilirubinaemia in living liver donors following right hepatectomy. *British Journal of Surgery* 96:437-444, 2009
- 21) Hata, T., Fujimoto, Y., Suzuki, K., Kim, B., Ishigami, M., Ogawa, H., Arikawa, T., Nagai, S., Kamei, H., Nakamura, T., Edamoto, Y., Kiuchi, T.: Two cases of central venous catheter-related thrombosis in living liver donors: how can the risk be minimized? *Clinical Transplantation* 23:289-293, 2009
- 22) Sugimoto, H., Kato, K., Hirota, M., Takeda, S., Kamei, H., Nakamura, T., Kiuchi, T., Nakao, A.: Serial measurement of Doppler hepatic hemodynamic parameters for the diagnosis of acute rejection after live donor liver transplantation. *Liver Transplantation* 15:1119-1125, 2009
- 23) Nagai, S., Fujimoto, Y., Kamei, H., Nakamura, T., Kiuchi, T.: Noninvasive positive pressure ventilation to prevent respiratory collapse after extubation: clinical case reports. *Transplantation Proceedings* 41:3919-3922, 2009
- 24) Nagai, S., Ito, M., Kamei, H., Nakamura, T., Ando, H., Kiuchi, T.: Indirect immunohistochemical evaluation of graft fibrosis and interface hepatitis after pediatric liver transplantation. *Pediatric Transplantation* 14:342-350, 2010
- 25) Gotoh, K., Ito, Y., Ohta, R., Iwata, S., Nishiyama, Y., Nakamura, T., Kaneko, K., Kiuchi, T., Ando, H., Kimura, H.: Immunologic and virologic analyses in pediatric liver transplant recipients with chronic high Epstein-Barr virus loads. *Journal of Infectious Diseases* 202:461-469, 2010
- 26) Kiuchi, T., Onishi, Y., Nakamura, T.: Small-for-size graft: not defined solely by being small for size. *Liver Transplantation* 16:815-817, 2010
- 27) Ishigami, M., Katano, Y., Hayashi, K., Ito, A., Hirooka, Y., Ohnishi, Y., Nakamura, T., Kiuchi, T., Goto, H.: Risk factors of recipient receiving living donor liver transplantation in the comprehensive era of indication and perioperative managements. *Nagoya Journal of Medical Science* 72:119-127, 2010
- 28) Ogawa, H., Fujimoto, Y., Yamamoto, K., Hata, T., Nagai, S., Kamei, H., Arikawa, T., Nakamura, T., Kiuchi, T.: Donor screening algorithm for exclusion of thrombophilia during evaluation of living donor liver

- transplantation. *Clinical Transplantation* Apr 11 [Epub ahead of print], 2010
- 29) Sugimoto, H., Kamei, H., Nakamura, T., Fujii, T., Nomoto, S., Takeda, S., Kiuchi, T., Nakao, A.: Gray-scale ultrasonography shows serial changes of the congestive area after living donor liver transplantation using right lobe graft. *Hepatogastroenterology*. 57:903-907, 2010
- 30) Ishigami, M., Kamei, H., Nakamura, T., Katano, Y., Ando, H., Kiuchi, T., Goto, H.: Different effect of HBV vaccine after liver transplantation between chronic HBV carriers and non-HBV patients who received HBcAb-positive grafts. *Journal of Gastroenterology* Sep 11 [Epub ahead of print], 2010
- 31) Koike, H., Kiuchi, T., Iijima, M., Ueda, M., Ando, Y., Morozumi, S., Tomita, M., Kawagashira, Y., Watanabe, H., Katsuno, M., Shimoyama, Y., Okazaki, Y., Kamei, H., Sobue, G.: Systemic but asymptomatic transthyretin amyloidosis 8 years after domino liver transplantation. *Journal of Neurology, Neurosurgery, & Psychiatry*. Oct 9 [Epub ahead of print], 2010
- 32) Gotoh, K., Ito, Y., Suzuki, E., Kaneko, K., Kiuchi, T., Ando, H., Kimura, H.: Effectiveness and safety of inactivated influenza vaccination in pediatric liver transplant recipients over three influenza seasons. *Pediatric Transplantation* 15:112-116, 2011
- 33) 伊藤和幸, 長井俊志, 亀井秀弥, 中村太郎, 木内哲也: 生体移植医療の実際 - 生体肝移植. *医学と薬学* 61:304-313, 2009
- 34) 長井俊志, 八木哲也, 中村太郎, 大西康晴, 木内哲也: 第7章 各領域別のMRSA保菌者対策とMRSA感染症の診断・治療. 12. 移植外科領域. 河野 茂, 編. *MRSA -基礎・臨床・対策-(改訂版)*. 医薬ジャーナル社, pp.288-294 (2010. 8)
- 35) Funahashi, Y., Iwata, S., Ito, Y., Kojima, S., 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. *Journal of Clinical Microbiology* 48: 825-830, 2010
- 36) 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. *Journal of General Virology* 90: 42-50, 2010
- 37) Kawabe, S., Ito, Y., Ohta, R., Sofue, A., Gotoh, K., Morishima, T., Kimura, H.: Comparison of the cerebrospinal fluid levels and serum concentrations of human herpesvirus 6 (HHV-6) DNA and cytokines in children with HHV-6 encephalopathy. *Journal of Medical Virology* 82:1410-1415, 2010
- 38) Ushijima, Y., Luo, C., Kamakura, M., Goshima, F., Kimura, H., Nishiyama, Y.: Herpes simplex virus UL56 interacts with

- and regulates the Nedd4-family ubiquitin ligase Itch. *Virology Journal* 7:179, 2010
- 39) Ito, Y., Takakura, S., Ichiyama, S., Ueda, M., Ando, Y., Matsuda, K., Hidaka, E., Nakatani, A., Ishioka, J., Nobori, T., Sasaki, M., Kimura, H.: Multicenter evaluation of prototype real-time PCR assays for Epstein-Barr virus and cytomegalovirus DNA in whole blood samples from transplant recipients" in its current form for publication in *Microbiology and Immunology*. *Microbiology and Immunology* 54:516-522, 2010
- 40) Calatini, S., Sereti, I., Scheinberg, P., Kimura, H., Childs, R., Cohen, J.I.: Detection of EBV genomes in plasmablasts/plasma cells and non-B cells in the blood of most patients with EBV lymphoproliferative disorders using Immuno-FISH. *Blood* 116:4546-4559, 2010
- 41) 木村宏. 血液幹細胞移植時のウイルス感染症. *化学療法の領域* 26: 5-11, 2010
- 42) 岡本尚, 木村宏, 片野晴隆, 塚田訓久, 今井健一, 高折晃史. エイズ発症の危険因子としての微生物間相互作用. *日本エイズ学会誌* 12: 59-66, 2010
- 43) Yamamoto, H., Kato, D., Uchida, N., Ishiwata, K., Araoka, H., Takagi, S., Nakano, N., Tsuji, M., Asano-Mori, Y., Matsuno, N., Masuoka, K., Izutsu, K., Wake, A., Yoneyama, A., Makino, S., Taniguchi, S.: Successful sustained engraftment after reduced-intensity umbilical cord blood transplantation for adult patients with severe aplastic anemia. *Blood* (in press)
- 44) Takagi, S., Ota, Y., Uchida, N., Takahashi, K., Ishiwata, K., Tsuji, M., Yamamoto, H., Asano-Mori, Y., Matsuno, N., Masuoka, K., Wake, A., Miyakoshi, S., Ohashi, K., Taniguchi, S.: Successful engraftment after reduced-intensity umbilical cord blood transplantation for myelofibrosis. *Blood* 116:649-652, 2010
- 45) Nishida, A., Yamamoto, H., Ota, Y., Karasawa, M., Kato, D., Uchida, N., Wake, A., Taniguchi, S.: T-cell post-transplant lymphoproliferative disorder in a patient with chronic idiopathic myelofibrosis following allogeneic PBSC transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 45:1372-1374, 2010

## 2.学会発表

- 1) 中道一生, 伊藤睦代, 倉根一郎, 西條政幸. 進行性多巣性白質脳症が疑われた血液疾患患者におけるJCポリオーマウイルスゲノムDNAの検出: 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島(2010.11)
- 2) 中道一生, 井上直樹, 伊藤睦代, 倉根一郎, 西條政幸: 進行性多巣性白質脳症が疑われた患者の脳脊髄液におけるヘルペスウイルスの出現頻度の解析: 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島(2010.11)
- 3) 王麗欣, 木下一美, 中道一生, 伊藤睦代, 錫谷達夫, 倉根一郎, 西條政幸. DNAポリメラーゼ変異によるアシクロビルやフォスカルネット耐性単純ヘルペスウイルス1型の他の抗ウイルス薬に対する薬剤感

- 受性: 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島(2010.11)
- 4) 岸田修二, 水澤英洋, 中道一生, 西條政幸. 予後調査からみたPML: 第15回日本神経感染症学会, 福島(2010.10)
- 5) 中道一生, 伊藤陸代, 奴久妻聡一, 森本金次郎, 倉根一郎, 西條政幸. 脳脊髄液中のJCポリオーマウイルスを検出するためのリアルタイムPCR検査系の確立と進行性多巣性白質脳症(PML)の診断支援. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
- 6) 中道一生, 伊藤陸代, 倉根一郎, 西條政幸. 脳脊髄液中のJCポリオーマウイルスの検査支援を介した日本国内における進行性多巣性白質脳症(PML)の発生活況の解析: 第15回日本神経感染症学会, 福島(2010.10)
- 7) 中道一生, 伊藤陸代, 倉根一郎, 西條政幸. 定量的リアルタイムPCRによる脳脊髄液中JCウイルスゲノムの検出に基づく進行性多巣性白質脳症の診断支援. 第84回日本感染症学会総会学術集会, 京都(2010.4)
- 8) Shiota, T., Saijo, M.: Antiviral resistant herpes virus infections: BIT's 1st World Congress of Virus and Infections-2010, Busan, Korea (2010. 6-7)
- 9) Takakura S., Matsushima M., Shirano M., Nagao M., Saito T., Ito Y., Iinuma Y., Ogura Y., Uemoto S., Ichiyama S.: Successful Reduction of the Bloodstream Infections in Early Post-transplantation Period by Surveillance-Based Intervention in Living-Donor Liver Transplant Recipients: 48th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy/ 46th Annual Meeting of Infectious Diseases Society of America: Chicago (2008. 10)
- 10) Yamada, S., Kosugi, I., Katano, H., Fukui, Y., Kawasaki, H., Arai, Y., Kurane, I., N. Inoue.: In vivo imaging assay for the convenient evaluation of antiviral compounds against cytomegalovirus in mice: 2010 Congenital Cytomegalovirus Conference, France (2010. 9)
- 11) 山田壮一, 小杉伊三夫, 片野晴隆, 福井良子, 河崎秀陽, 新井義文, 福地早紀, 橋本楓, 倉根一郎, 井上直樹: GFP発現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25回ヘルペスウイルス研究会, 静岡(2010.5)
- 12) 梅山隆, 大野秀明, 棚町千代子, 橋本好司, 佐川公矯, 田辺公一, 山越智, 宮崎義継. 福岡県筑後地区周辺におけるクリプトコッカス症多発発生例の疫学的検討. 第22回日本臨床微生物学会総会, 岡山(2011年1月)
- 13) 筋野恵介, 樽本憲人, 山口敏行, 前崎繁文, 大野秀明, 宮崎義継. ミカファンギン低感受性 *Candida famata* および *fermentati* 血症の3例. 第59回日本感染症学会東日本地方会学術集会, 東京(2010年10月)
- 14) 田辺公一, 大野秀明, 山越智, 宮崎義継. タイにおける自然環境からの *Histoplasma capsulatum* の検出に関する検討. 第59回日本感染症学会東日本地方会学術集会, 東京(2010年10月)

- 15) 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. 抗真菌薬投与下におけるCandidaバイオフィルムのキチン合成・分解酵素遺伝子発現調節. 第54回日本医真菌学会総会, 東京, (2010年10月)
- 16) 若山 恵, 大久保陽一郎, 篠崎 稔, 中山晴雄, 蜜田亜希, 大野秀明, 宮崎義継, 中谷行雄, 亀井克彦, 渋谷和俊. In situ hybridizationを用いたヒトヒストプラスマ症の組織診断の検討. 第54回日本医真菌学会総会, 東京(2010年10月)
- 17) 山越 智, 橋本ゆき, 梅山 隆, 田辺公一, 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. *Aspergillus fumigatus* 分泌蛋白質Y-1を標的としたELISA検出系の構築と病原性の検討. 第54回日本医真菌学会総会, 東京(2010年10月)
- 18) 高園貴弘, 泉川公一, 行徳宏, 池田直樹, 神田哲郎, 宮崎泰可, 関雅文, 掛屋弘, 山本善裕, 柳原克紀, 大野秀明, 矢口貴志, 宮崎義継, 亀井克彦, 河野 茂. 軽症の糖尿病患者に発症した *Aspergillus udagawael* による気管支アスペルギルス症の1例. 第54回日本医真菌学会総会, 東京(2010年10月)
- 19) 宮崎義継, 山越 智, 金子幸弘, 福田恵子, 田辺公一, 梅山 隆, 大野秀明, 金城雄樹. 真菌感染局所におけるヒト線維芽細胞の線維化と炎症への影響. 第54回日本医真菌学会総会, 東京(2010年10月)
- 20) 大野秀明. ガイドラインをふまえた中枢神経系真菌感染症の治療法. 第17回新潟神経疾患研究会, 新潟(2010年9月)
- 21) 大野秀明. 自然環境と深在性真菌症-地域流行型真菌症も含めて-. 第8回三菱化学メディエンスFORUM' 10, 東京(2010年7月)
- 22) 大野秀明. レクチャー3呼吸器感染症のABC 3.肺抗酸菌症. 第58回日本化学療法学会総会, 長崎(2010年6月)
- 23) 大野秀明. レクチャー3呼吸器感染症のABC 3.肺抗酸菌症. 第58回日本化学療法学会総会, 長崎(2010年6月)
- 24) 田辺公一, 名木稔, 山越智, 大野秀明, 宮崎義継. 病原真菌ABCタンパク質と機能阻害物質との相互作用部位の検討. 第58回日本化学療法学会総会, 長崎(2010年6月)
- 25) 金子幸弘, 今村圭文, 大野秀明, 河野茂, 宮崎義継. *Candida albicans* のbiofilmに対する抗真菌薬の拮抗作用に関連したHsp90関連ストレス応答に関する検討. 第58回日本化学療法学会総会, 長崎(2010年6月)
- 26) 名木稔, 田辺公一, 山越智, 大野秀明, 宮崎義継. 病原真菌 *Candida glabrata* におけるステロールトランスポーターの機能解析. 第58回日本化学療法学会総会, 長崎(2010年6月)
- 27) 樽本憲人, 金城雄樹, 山越智, 大野秀明, 宮崎義継. *Candida albicans* の細胞壁分泌蛋白抗体によるin vitro増殖抑制効果の検討. 第58回日本化学療法学会総会, 長崎(2010年6月)
- 28) 宮崎義継, 梅山隆, 田辺公一, 大野秀明. ヒストプラスマ等のアウトブレイク型真菌症への対策. 第31回衛生微生物技術協議会, 鹿児島(2010年5月)
- 29) 金子幸弘, 大野秀明, 河野 茂, 宮崎義継. *Candida albicans* の抗真菌薬治療抵抗性とHsp90関連ストレス応答. 第84回

- 日本感染症学会総会, 京都(2010年4月)
- 30) 乾佐知子, 中村竜也, 清水千裕, 奥田和之, 佐野 一, 中田千代, 藤本弘子, 大倉ひろ枝, 植村芳子, 田辺公一, 大野秀明, 宮崎義継, 高橋伯夫. *Candida glabrata*の薬剤感受性とmicafungin低感受性株の検出について. 第84回日本感染症学会総会, 京都(2010年4月)
- 31) 田辺公一, 大野秀明, 宮崎義継. *Candida glabrata*のステロール取り込みと病原性の関係. 第84回日本感染症学会総会, 京都(2010年4月)
- 32) Ohno H, Tanabe K, Kaneko K, Umeyama T, Yamagoe S, Miyazaki Y. Evaluation of two-stage PCR for diagnosis of Histoplasmosis. 12<sup>th</sup> Western Pacific Congress on Chemotherapy and Infectious Diseases, Singapore(2010年12月)
- 33) Norkaew T, Sriburee P, Takarn P, Tharavicitkul P, Tanabe K, Ohno H, Miyazaki Y. Detection of *Histoplasma capsulatum* in soil contaminated with bat guano by nested PCR. 12<sup>th</sup> Western Pacific Congress on Chemotherapy and Infectious Diseases, Singapore(2010年12月).
- 34) 上野智規, 片野晴隆, 山本久史, 大島久美, 谷口修一, 神田善伸, 桐山智美, 佐多徹太郎, 後藤希代子PML法を用いたヒトサイトメガロウイルスのphenotypic薬剤感受性試験法と臨床血液検体への応用 第58回日本ウイルス学会, 徳島(2010.11)
- 35) 佐々木純, 上野智規, 片野晴隆, 佐多徹太郎, 後藤希代子PML法を用いたHCMVの上皮細胞間感染の評価系の確立 第58回日本ウイルス学会, 徳島(2010.11)
- 36) Kamiya S, Yonezawa H, Woo T, Kurata S, Zaman C, Hanawa T, Kato S, Osaki T. Biofilm formation by *Helicobacter pylori* and its pathogenesis. 33<sup>rd</sup> International Congress on Microbial Ecology and Disease. Sep. 6-10, 2010, Athen, Greece.
- 37) Kato S. Cord blood banking and cord blood transplantation in children in Japan. 22<sup>nd</sup> International Congress of Pediatrics. Oct.14-18, 2010, Tehran, Iran.
- 38) Koike T, Yanagimachi N, Yabe H, Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, Ishiguro H, Takakura H, Kato S. High incidence of radiation induced cavernous hemangioma in long term survivors who underwent BMT with radiation therapy during childhood or adolescence. 2011 BMT Tandem Meeting. Feb. 17-21, 2011, Honolulu, USA.
- 39) Koike T, Yabe H, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Takakura H, Kato S and Yabe M. Recovery of gonadal function after allogeneic stem cell transplantation for Fanconi anemia. 22<sup>nd</sup> Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium. Oct. 2010, USA.
- 40) Yabe H, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Takakura H, Kato S and Yabe M. Long-term follow-up after unrelated bone marrow transplantation in a patient with dyskeratosis congenita. 22<sup>nd</sup> Annual

- Fanconi Anemia Research Fund  
Scientific Symposium. Oct. 2010,USA.
- 41) Yabe H, Yabe M, Kato S, Koike T, Takakura H, Hyodo H, Tomita Y, Ishiguro H, Shimizu T, Morimoto T and Akiba T. Recovery of gonadal function after allogeneic stem cell transplantation for aplastic anemia. 第72回日本血液学会総会 2010年9月, 横浜.
- 42) Ishigami, M., Katano, Y., Kamei, H., Kiuchi, T., Goto, H.: Indication of liver transplantation for hepatocellular carcinoma: risk factor of recurrence from our experience: 15th Annual International Congress of the International Liver Transplantation Society, New York, NY (2009. 7)
- 43) Ishigami, M., Nakamura, T., Onishi, Y., Katano, Y., Kiuchi, T., Goto, H.: Renal Function after liver transplantation in adults; significance of EGFR and serum cystatin C: American Transplant Congress 2010, San Diego, CA (2010. 5)
- 44) Onishi, Y., Nakamura, T., Nagai, S., Tsuboi, T., Yamaguchi, N., Ishigami, M., Ando, H., Kiuchi, T.: Outcome of acute liver failure patients in living-donation-dominant country: a single center experience: 16th Annual International Congress of the International Liver Transplantation Society, HongKong, China (2010.7)
- 45) Ishigami, M., Nakamura, T., Onishi, Y., Katano, Y., Kiuchi, T., Goto, H.: Indication of liver transplantation for patients with hepatocellular carcinoma; utility of new scoring system for predicting postoperative recurrence: 16th Annual International Congress of the International Liver Transplantation Society, HongKong, China (2010. 7)
- 46) Ishigami, M., Nakamura, T., Onishi, Y., Katano, Y., Kiuchi, T., Goto, H.: HBIg saving protocol after liver transplantation in chronic HBV carriers: relationship between necessary amount of HBIg and early preoperative ascites: 16th Annual International Congress of the International Liver Transplantation Society, HongKong, China (2010. 7)
- 47) 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: 第27回日本肝移植研究会, 三島(2009. 7)
- 48) 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: 第13回日本肝臓学会大会, 京都(2009. 10)
- 49) 石上雅敏, 木内哲也, 後藤秀実: 当院における肝移植後HCV陽性患者の病理学的特徴-protocol biopsyの追跡結果より: 第46回日本肝臓学会総会, 山形 (2010. 5)
- 50) 石上雅敏, 木内哲也, 後藤秀実: 当院における肝移植後(内科的)晩期合併症: 第14回日本肝臓学会大会/第18回日本消化器関連学会週間(JDDW2010), 横浜 (2010. 10)
- 51) 鳥居ゆか, 伊藤嘉規, 越知信彦, 後藤研誠, 河邊慎司, 木村宏: 肝移植後小児例における新型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42回日本小児感染症学会総会学術集会, 仙台 (2010. 11)
- 52) 鳥居ゆか, 伊藤嘉規, 木村宏: 生体肝移植後小児への新型インフルエンザワクチンの接種経験: 第14回日本ワクチン学会学術集会, 東京 (2010. 12)
- 53) Kimura H, Ito Y, Kawabe S, Gotoh K, Iwata S, Nishiyama Y. Noninvasive identification of EBV-infected lymphocyte subtypes in EBV-associated T/NK lymphoproliferative diseases. The 14<sup>th</sup> Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr virus & Associated Diseases, Birmingham, UK (2010. 9).
- 54) Gotoh K, Ito Y, Ohta R, Iwata S, Nishiyama Y, Kimura H. Immunologic and Virologic analyses in Pediatric Liver Transplant Recipients. Restricted EBV genome expression in pediatric liver transplant recipients with chronic high Epstein-Barr viral loads. The 14<sup>th</sup> Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr virus & Associated Diseases, Birmingham, UK (2010. 9)
- 55)
- 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

## II. 分担研究報告書

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)

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

研究代表者	西條政幸	国立感染症研究所ウイルス第一部・部長
研究協力者	辻正徳	虎ノ門病院血液内科・医師
研究協力者	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・センター長
研究協力者	王麗欣	国立感染症研究所ウイルス第一部・流動研究員
研究協力者	谷口修一	虎ノ門病院血液内科・部長

研究要旨: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により解析し、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。そのうち3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、帯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。

#### A. 研究目的

造血幹細胞移植患者においては、極度に免疫能が低下することにより、潜伏感染している単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)や2型(HSV-2)が再活性化し、それらのウイルスによる皮膚粘膜感染症が重症化し、また、難治化することが多い。さらに、症状は起こさなくても無症候性に排出することが多い。本研

究では、造血幹細胞移植術をうけた患者における口腔内へのHSV-1の排出状況をウイルス分離検査により調べた。また、分離されたHSV-1のアシクロビル(acyclovir, ACV)に対する感受性を調べ、耐性を獲得したHSV-1の出現状況を調査した。

#### B. 研究方法

##### 1) 患者

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中で、本研究(倫理委員会への申請課題「造血幹細胞移植患者における単純ヘルペスウイルスとサイトメガロウイルスのウイルス分離検査による再活性化の経時的モニタリングと分離ウイルスの感受性に関する研究」)にエントリーを承諾して下さった患者である。H22年6月からH22年11月までの患者79人を対象とした。これらのほとんどの患者では、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、ACVが予防投与されている。

## 2) ウイルス分離.

臓器移植開始1週間前から1週間毎に、患者から咽頭スワブを採取し(虎ノ門病院において)、採取された検体はできるだけ早期に冷蔵しながら仙台医療ウイルスセンターに搬送した。同センターにおいて、それらのサンプルからHEL(ヒト胎児肺繊維芽細胞)、HEp-2細胞、Vero細胞およびMDCK細胞を用いてウイルス分離検査が実施された。ウイルスが分離された場合には、所定の方法により分離ウイルスを同定した。HSV-1の同定には、HSV-1に特異的な単クローナル抗体を用いて、直接蛍光抗体法により同定した。分離された継代歴2代以内のウイルスは、国立感染症研究所ウイルス第一部に搬送された。

## 3) 薬剤感受性試験

分離ウイルスのアシクロビル(ACV)に対する感受性は、24穴の細胞培養プレー

トに増殖させたVero細胞を用いて、プラーク減少法により測定した。対照(薬剤が加えられていないウエルのプラーク数)に対して、50%のプラーク数を形成する時のACV濃度(50% inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)を求めた。IC<sub>50</sub>が1μg/ml以上を耐性と判定した。

## 4) HSV-1 チミジンリン酸化酵素遺伝子の解析

ACVは、ウイルス性チミジンリン酸化酵素(viral thymidine kinase, vTK)により1リン酸体にリン酸化され、さらに細胞性酵素により3リン酸体になることにより抗ウイルス活性を発揮する。ACV耐性HSV-1の多くは、このvTKに変異が認められることから、分離されたHSV-1のvTK遺伝子の塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定した。

(倫理面からの配慮について)

本研究は、国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会、虎ノ門病院および国立病院機構仙台医療センターの医学研究倫理審査委員会の承認のもとに実施された。

## C. 研究結果

### 1) 患者

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。

## 2) 分離ウイルスの薬剤感受性と $\nu$ TK 遺伝子における変異.

一人の患者から HSV-1 が複数回分離された患者数は 6 名で、その患者から分離された HSV-1 の薬剤感受性を調べた。6 名中 2 名(患者 1 および患者 3)で治療途中から ACV 耐性株の出現が確認された(表 1)。患者 3 から分離された ACV 耐性 HSV-1 の TK 遺伝子の塩基配列において、ACV 感受性株には認められないイニシエーションコドンから数えて 430-436 番目に存在する 7 連続する G における 1 塩基欠損が認められた。一方、患者 1 から分離された ACV 耐性 HSV-1 の  $\nu$ TK 遺伝子には塩基配列において変異は認められなかった HSV-1 では、DNA ポリメラーゼにおいて変異(1 塩基置換)が認められた。

## D. 考察

造血幹細胞移植術を受ける血液疾患患者において、前方視的に HSV-1 の排出状況について検討した。これらの患者の HSV-1 に対する抗体の有無は検討していないので、個々の患者の HSV-1 感染症の既往については定かではない。そのような中で、HSV-1 を口腔内に排出する割合は、約 10%であることが明らかにされた。

移植術後に期間をあけて数回 HSV-1 が分離された患者が存在した。特に患者 2 では、口腔内に潰瘍性病変が認められ、その病変から得られた擦過物から HSV-1 が分離されている。ACV により治療されているにもかかわらず、治療に抵抗性を示した。このような患者においては、潰瘍性病変を引き起こす

薬剤(免疫抑制剤等)が投与されていることもあり、この病変が HSV-1 だけにより引き起こされていない可能性もある。つまり、ACV に抵抗性を示したのは、その病変が HSV-1 感染だけに基づいて引き起こされていないために、ACV に抵抗性を示した可能性がある。この病変から 6 週間にわたって分離された HSV-1 は経過中一貫して ACV に感受性を示した。ACV による治療がなされていたにもかかわらず、HSV-1 が長期にわたって分離されたことは、極度に免疫能が低下した患者では、ACV による治療だけでは HSV-1 感染症をコントロールするのが困難な場合があることを示している。

複数回 HSV-1 が分離された患者 6 人のうち、2 人で治療経過中に ACV 耐性 HSV-1 が出現した。これらの患者においては HSV-1 感染症にもとづく明らかな症状を呈していなかった。つまり、無症候性に HSV-1 が排出されていた可能性がある。しかし、2 名とも死亡退院した。分離された HSV-1 がこれらの患者の予後において何らかの役割を果たしていたかどうかについては明らかではない。

本研究の価値は、移植前から移植後退院まで症状の有無にかかわらずウイルス分離検査を前方視的に実施し、造血幹細胞移植患者における HSV-1 感染症の病態、薬剤耐性 HSV-1 感染症について調査することにある。研究予定期間は 2 年間であり、これからも本研究を継続することが重要である。

## E. 結論

造血幹細胞移植患者における HSV-1 感染

症に関する前方視的研究成績を報告した。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。臓器移植患者におけるヘルペスウイルス感染症対策のためには、薬剤感受性試験を迅速に測定するための方法を開発したり、日本国内で薬剤感受性試験を行える施設を整えたりするなど、環境整備が必要である。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## 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. *Jpn J Infect Dis* (in press)

### 2.学会発表

- 1) 中道一生, 伊藤睦代, 倉根一郎, 西條政

幸. 進行性多巣性白質脳症が疑われた血液疾患患者における JC ポリオーマウイルスゲノム DNA の検出: 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 徳島(2010.11)

- 2) 中道一生, 井上直樹, 伊藤睦代, 倉根一郎, 西條政幸. 進行性多巣性白質脳症が疑われた患者の脳脊髄液におけるヘルペスウイルスの出現頻度の解析: 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 徳島(2010.11)
- 3) 王麗欣, 木下一美, 中道一生, 伊藤睦代, 錫谷達夫, 倉根一郎, 西條政幸. DNA ポリメラーゼ変異によるアシクロビルやフォスカルネット耐性単純ヘルペスウイルス 1 型の他の抗ウイルス薬に対する薬剤感受性: 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 徳島(2010.11)
- 4) 岸田修二, 水澤英洋, 中道一生, 西條政幸. 予後調査からみた PML: 第 15 回日本神経感染症学会, 福島(2010.10)
- 5) 中道一生, 伊藤睦代, 倉根一郎, 西條政幸. 脳脊髄液中の JC ポリオーマウイルスの検査支援を介した日本国内における進行性多巣性白質脳症(PML)の発生状況の解析: 第 15 回日本神経感染症学会, 福島(2010.10)
- 6) 中道一生, 伊藤睦代, 倉根一郎, 西條政幸. 定量的リアルタイム PCR による脳脊髄液中 JC ウイルスゲノムの検出に基づく進行性多巣性白質脳症の診断支援. 第 84 回日本感染症学会総会学術集会, 京都(2010.4)
- 7) Shiota, T., Saijo, M.: Antiviral resistant herpes virus infections: BIT's 1st World

Congress of Virus and Infections-2010,  
Busan, Korea (2010.6-7)

なし

2. 実用新案登録

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

3. その他

なし

1. 特許取得

表 1. 複数回 HSV-1 が咽頭スワブ検体から分離された 3 名の患者におけるウイルス排出状況と ACV の分離ウイルスに対する IC<sub>50</sub>.

患者	ウイルス分離成績(上段)と ACV に対する感受性(IC <sub>50</sub> , µg/ml)(下段)											
	移植後の週数(週)											
	-1W	0W	1W	2W	3W	4W	5W	6W	7W	8W	9W	10W
患者 1	なし	陰性	陰性	陽性	陽性	陽性	陰性	陽性	陰性	陰性	死亡	退院
				0.27	1.7	1		1.3				
患者 2	陰性	陰性	陰性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	判定不能	陰性	退院
				0.1	0.1	0.24	0.54	0.56	0.54			
患者 3	陰性	陰性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陰性	陰性	陰性	死亡	退院
			0.21	0.19	0.17	10	8.2					

判定不能: ウイルス分離検査において真菌や細菌によるコンタミネーションによる.

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)

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

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・教授

研究要旨: 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.

A. 研究目的

- (1) 生体肝移植後の感染症の発症率, 起因微生物, 危険因子を包括的に把握することにより, 予防ないし早期介入の可能性を探索する.
- (2) 生体肝移植後の侵襲性アスペルギルス症の発症危険因子を解析し, 効果的な抗真菌予防法や早期先制攻撃的治療の対象患者を明らかにする.

B. 研究方法

- (1) 「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, 発生率, 原因微生物と臨床情報との関連を解析する.
- (2) 「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.

(倫理面からの配慮について)

本研究では治療介入や侵襲性を伴う検査, 検体収集は行わない. また収集する情報に個人を特定する情報は含まれない. 「生体肝移植後感染症の臨床疫学調査」は京都大学医の倫理委員会の承認を得ている. 「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」

は現在審査中である.

C. 研究結果

「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.

「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.

D. 考察

現時点では, 2 つのサーベイランス研究の開始準備がほぼ整い, これから開始する段階である.

E. 結論

周術期感染予防対策を改善させることは肝移植例の予後向上に不可欠であり, 結果に基づいて対策内容を変更することを目標とした内容のサーベイランスの計画が出来たことは意義が大きいと考えられる.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

## 2.学会発表

### 1) 高倉俊二(研究分担者の協力研究員):

Deep fungal infections in Solid Organ  
Transplant Recipients: 真菌症フォーラム第  
10回学術集会, 名古屋(2009. 2)

### 2) Takakura S., Matsushima M., Shirano M., Nagao M., Saito T., Ito Y., Iinuma Y., Ogura Y., Uemoto S., Ichiyama S.: Successful Reduction of the Bloodstream Infections in Early Post- transplantation Period by Surveillance-Based Intervention in Living-Donor Liver Transplant Recipients:

48th Interscience Conference on  
Antimicrobial Agents and Chemotherapy/  
46th Annual Meeting of Infectious Diseases  
Society of America: Chicago (2008. 10)

## 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)

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

研究分担者 井上 直樹 国立感染症研究所ウイルス第1部・室長

研究要旨 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た。今年度、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で、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ている。また、昨年度確立した*in vivo* imaging法を用いて、個体レベルで新規抗CMV化合物DPPCが有効であることを示した。今後さらに構造活性相関や作用点の解析を積み上げることで、実用性のある化合物の開発につながることを期待された。

A. 研究目的

現在用いられている、ないしはFDAにより認可されている抗ヘルペスウイルス薬は、サイトメガロウイルス(CMV)の前初期蛋白IE2に対するアンチセンスRNAであるフォミビルセンを除き、DNA複製を阻害する核酸基質アナログである。これらの核酸基質アナログの抗ウイルス薬は有効であるが、耐性株の出現、副作用、投与方法などのため使用上の制約があり、作用機序の異なる新規薬剤の開発が求められている。特に、臓器移植においてはCMV感染症を防ぐために核酸基質アナログであるガンシクロビル(GCV)が用いられているが、骨髄機能抑制の副作用により好中球減少が生じ、結果として細菌・真菌などの日和見感染症を増悪化させるため、生存率など移植全体としてみた場合には、決して満足できる結果をもたらさない。さらに、欧米では移植時のCMV感染症の予防の観点から、移植当初からGCV投与を行なう方策がとられており、このことは耐性株の出現頻度を高める結果に繋がる可能性をもっている。

新規抗ヘルペスウイルス薬の検索や耐性株の検出には、依然として感染性ウイルス力価を計測する生物学的方法が有効であるが、増殖の遅いCMV及び水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)では、時間と労力がかかりすぎ、迅速な対応が求められる耐性株検出やマススクリーニングに伴う新規薬剤の検索には困難が生じている。既存薬に対する耐性株の検出については、耐性が予想される変異を遺伝子レベルで同定する方法が普及しつつあるが、すべての耐性変異に対応することは現実的ではない。

欧米などで開発が進められている新規薬剤は、カプシド蛋白の成熟過程やゲノムのパッケージング過程に対する阻害剤などである。その中で有望視され、第3相臨床試験まで進んだマリバビルも十分な効果が得られず頓挫し、現在、有力な新規抗CMV候補薬がない状況にある。VZVについても、核酸アナログ以外の化合物で抗ヘルペスウイルス活性が知られるものは、数えるほどしかない。

我々は、ウイルス前初期蛋白により活性化

される初期遺伝子プロモーターを利用し、酵素反応による化学発光を指標として容易に力価を測定できるレポーター細胞株を CMV 及び VZV についてそれぞれ樹立し、これらの細胞株を用いて両ウイルスの感染初期過程を阻害する化合物の検索をこれまで行ってきた。本研究では、これらのスクリーニングで同定された化合物について、その抗ウイルス活性の作用機序を解析するとともに、個体での有効性を検討する。

## B. 研究方法

### 1) ウイルス株及び細胞株

MeWo 細胞(ATCC より購入)及びヒト 2 倍体細胞 HLF(CDC 組織培養施設より分与)は、10% 牛胎児血清(FBS)添加 Dulbecco's MEM (DMEM)培地にて培養した。モルモット胎児肺細胞 GPL は、10%牛胎児血清(FBS)添加 F12 培地にて培養した。VZV P-Oka 株(基盤研山西博士より分与)、ワクチン株 V-Oka、アシクロビル(ACV)耐性の Kanno 株および V-OkaYSR 株(福島医大錫谷博士より分与)を MeWo 細胞ないしは HLF 細胞で培養した。我々が樹立した VZV レポーター細胞 MV9G は、100 $\mu$ g/ml G418 及び 10%FBS 添加 DMEM にて培養した。マウス CMV(MCMV)及び EGFP 発現 MCMV(浜松医大筒井博士より分与)は、10%FBS 添加 DMEM を用いて NIH3T3 細胞で増殖させた。

### 2) プラーク形成阻害アッセイ

12 穴プレートにまき込んだ線維芽細胞に 50-100PFU/穴でウイルスを接種し 1-2 時間培養後、接種液を除き、2 倍階段希釈した薬剤、1%メチルセルロース、4%FBS を含む MEM 培地で培養した(VZV 7-8 日、MCMV 4-5 日)。2% crystal violet を含む 10%ホルマリンで固定染色後プラーク数を実体顕微鏡下で測定し、薬剤によるプラーク形成阻害率を薬剤濃度に対する linear regression 法にて解析し EC50 を求めた。また、プラーク形成の代わりに、VZV ではメチルセルロースを用いることなく感染 3-4 日後に細胞を 3.5%ホルマリンで 5 分固定し、

TritonX-100 処理後、抗 VZV IE62 モノクローナル抗体(Chemicon)、ペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体と順次反応させ、最終的に DAB を用いて染色し、抗原陽性のフォーカスを計数する方法も用いた。

### 3) ウイルス DNA の定量

感染細胞からの核酸精製は、市販キットを用いた。リアルタイム PCR には、市販キット(TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosciences)を用いた。VZV のゲノムコピー数の測定は、IE62 遺伝子を標的とした。細胞当たりのコピー数を求めるために、ヒトアルブミン遺伝子(Gault et al. 2001)ないしはモルモット  $\beta$  アクチン遺伝子(Nozawa et al. 2008)のコピー数を求めた。

### 4) 塩基配列の決定

感染細胞から精製した DNA を材料として、各遺伝子特異的なプライマーを用いて PCR 増幅を行い、各遺伝子 DNA 断片を得た。増幅には PfuI ポリメラーゼを用いた。DNA 断片を精製後、塩基配列を BigDye terminator circle sequence 法により決定した。

### 5) マウス感染実験と in vivo imaging

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、BALB/c の場合には体毛による蛍光を避けるためバリカンで除毛後、撮影を行う。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。データ収集条件は、binning (resolution) factor 2, aperture 1.25 f/stop とした。取り込んだ蛍光データは人為的な色変換をおこない、グレースケールの個体のイメージに重ね合わせた。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。

### (倫理面への配慮)

動物実験は、実験動物委員会の承認を得て、

動物愛護の精神のもとに適切に行った。組換え DNA 実験は、大臣確認申請に対する承認を得ることを含め、法に基づき適切に行った。

## C. 研究結果

### 1. 新規抗 VZV 化合物の評価

#### 1) ACV 耐性株の増殖阻害

昨年度、抗 VZV 活性が強いと思われる 141B3 と 35B2 の2つの化合物について、細胞フリーの VZV を用いて 50% 阻害濃度 (EC50) をプラーク減少法により決定し、アシクロビルの EC50 が  $8.9\mu\text{M}$  ( $2\mu\text{g}/\text{ml}$ ) の条件下で、それぞれ EC50 が  $0.32\mu\text{M}$  及び  $0.80\mu\text{M}$  であることを報告した。本年度は、ACV 耐性株の増殖がこれら化合物で阻害されるかを検討した。細胞フリーの様々な VZV 株を用意するのは、大変な時間と労力がかかるので、この検討は、感染細胞を非感染細胞に重層して行った。この条件で、V-Oka 株 (ACV 感受性) 及び V-OkaYSR 株 (ACV 耐性) に対する 35B2 の EC50 は、 $1.8\pm 0.2\mu\text{M}$  及び  $1.1\pm 0.5\mu\text{M}$  であり、ACV 耐性株に対しても効果があった。ACV 耐性株 Kanno でも同様な結果を得た。従って、35B2 は、既存薬とは異なる過程を阻害すると結論できる。なお、35B2 耐性株を含め V-Oka 由来株は、MeWo 及び GPL 両細胞で同程度の効果を示した。

#### 2) 作用機序の解析

これまでの解析から、35B2 は DNA 複製もしくはそれ以前の過程、即ち、前初期もしくは初期に発現される遺伝子機能のいずれかを阻害すると予想された。そこで、V-Oka を GPL 細胞に感染後、35B2 を途中から添加したり、添加から非添加にするなどの処理を行い、感染 46 時間後にウイルス DNA 量と宿主遺伝子 DNA 量をリアルタイム PCR により定量した。その結果、感染 5-20 時間に薬剤が効果を発揮することが明らかとなった。これは、ACV と似た時間帯での効果であることから、初期遺伝子の発現ないしは機能が阻害されていると思われた。

#### 3) 141B3 及び 35B2 に対する耐性株の作出

2つの抗 VZV 化合物 141B3 及び 35B2 について、低濃度から徐々に濃度をあげて VZV を増殖させることで、耐性ウイルスの作出を試みた。141B3 は、抗 VZV 効果が見られる濃度と完全に阻害する濃度の範囲が狭いこともあり耐性株を得ることができなかったが、35B2 については 35B2R1 から 35B2R4 と名付けた 4 株を得ることができた。これらのウイルス株感染細胞を用いて GPL 細胞上での EC50 を求めると、R1:  $37.6\pm 4.1\mu\text{M}$ , R2:  $4.2\pm 0.2\mu\text{M}$ , R3:  $3.5\pm 0.5\mu\text{M}$ , R4:  $1.8\pm 0.2\mu\text{M}$  となった。R4 は、EC50 で見ると阻害効果がないように見えるが、 $8\mu\text{M}$  程度まで元の 1 割程度がプラーク形成することから、ウイルスとして完全に単一なものではない可能性があり、現在、ウイルスの純化を行っている。

次に、35B2 耐性変異を同定するために、EC50 が大きく最も耐性である R1 株について感染細胞 DNA を調製し、感染前初期及び初期に発現される遺伝子及びテグメント蛋白として前初期遺伝子の活性化などに関与する遺伝子などを中心に合計 60kb をカバーする 37 遺伝子領域 (図1) を PCR により増幅後、塩基配列を決定し、薬剤感受性の親株配列との比較を行った。その結果、ORF62 に His275Arg 変異が見られた。また、ORF1 に Leu52Pro 変異が見られた。そこで、異なる耐性株 R2 及び R3 について、その ORF62 及び ORF1 遺伝子について解析したところ、ORF1 には変異はなく、ORF62 については、R2 のみに Val733Ala と Gln1215Pro の 2 変異が同定された。さらに、ORF62 蛋白との結合が知られる ORF4、ORF63 遺伝子についても解析を行ったが、これらの遺伝子に変異は検出されなかった。

作用機序として後期に発現されるため解析を行わなかった糖蛋白などの遺伝子についても、現在、R1 株の塩基配列を決定中である。

### 2. 新規抗 CMV 化合物の評価

#### 1) In vivo imaging での評価

昨年度、in vivo imaging を用いた新規抗 CMV 化合物評価系の条件検討を行い、予備的実験

において、その有用性が示されたのを受けて、個体数を増やし有意差検定ができる実験を本年度組んだ。

まず、*in vivo* imaging の定量性を、 $2 \times 10^2$  から  $2 \times 10^6$  PFU までの 10 倍段階希釈した MCMV-GFP 計 5 群を BALB/c マウス各群 7 匹に皮下接種し、接種後毎日測定したシグナル強度の面積積算値 (AUC: area under curve) が接種ウイルス量と良く相関することにより証明した (図 2)

次に  $1 \times 10^5$  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 で GCV もしくは新規化合物 DPPC 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 3 に示すように、腹腔内 100mg/kg や皮下 50mg/kg の ACV 接種では、MCMV-GFP の増殖を有意に阻害した。一方、新規化合物 DPPC は、腹腔内 50mg/kg 投与では部分的効果しか見られないものの、皮下 50mg/kg DPPC 投与では、感染 2 日後の一点でも AUC の比較でも有意に抗ウイルス効果を示した。

## 2) 作用機序の解析

DPPC はウイルスの細胞内侵入から、前初期蛋白発現までの過程で作用する抗 CMV 化合物であることをすでに報告している。詳細な作用点を明らかにするため、*in vivo* imaging にも用いた MCMV-GFP を DPPC 存在下で植え継ぎ、耐性株候補を数株得た。現在、その EC50 などを検討している。

## 3. GCV 耐性が疑われた臨床材料の検討

1 歳児が原因不明の劇症肝炎にて入院後、保存的治療にて改善がないため生体肝移植が施行された症例において、CMV 抗原血漿となり GCV 治療で効果が見られないため、薬剤耐性を疑い、GCV 耐性に関する検査依頼があった。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、耐性に関与すると思われる塩基置換は見出されなかった。

## D. 考察

核酸アナログの抗ヘルペスウイルス薬の開発は、側鎖を修飾し生体への吸収効率をあげることや、ポリメラーゼ認識部位の特異性を上げることで、副反応を減少させることを重点に進んできており、シドホビル誘導体を中心に臨床治験が進められている。移植症例の増大する中で、耐性株の出現も問題となることから、現行治療薬のバックアップとなる次世代薬剤が求められている。しかしながら、非核酸アナログで次世代の抗ウイルス薬剤として期待されてきた Marivabir をはじめとしたいくつかの薬剤が第 2 相臨床治験などで十分な効果が証明できないとして開発が中断・中止されている。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。昨年度は、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を明らかにした。本年度は、その作用機序を明らかにするために耐性株を作出し、その変異の同定を試みた。現時点では耐性に関与する変異を確定できていないため、さらに遺伝子領域を広げ検討を行っている。いずれにしても、これまでに知られてきたような遺伝子産物が 35B2 の標的ではないことから、作用点として新規性が高い化合物である可能性が高い。

*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。

## E. 結論

- 1) 現行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。
- 2) 35B2 耐性株を作出した。