

- 3) 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。
- 4) 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。

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., 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 Res* 88:45-52, 2010
- 2) 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
- 3) 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

2. 学会発表

- 1) 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: 2010 Congenital Cytomegalovirus Conference, France (2010.9)
- 2) 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)
- 3) 中道一生, 井上直樹, 伊藤(高山)陸代, 王麗欣, 木下一美, 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量の解析: 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 徳島(2010.11)

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

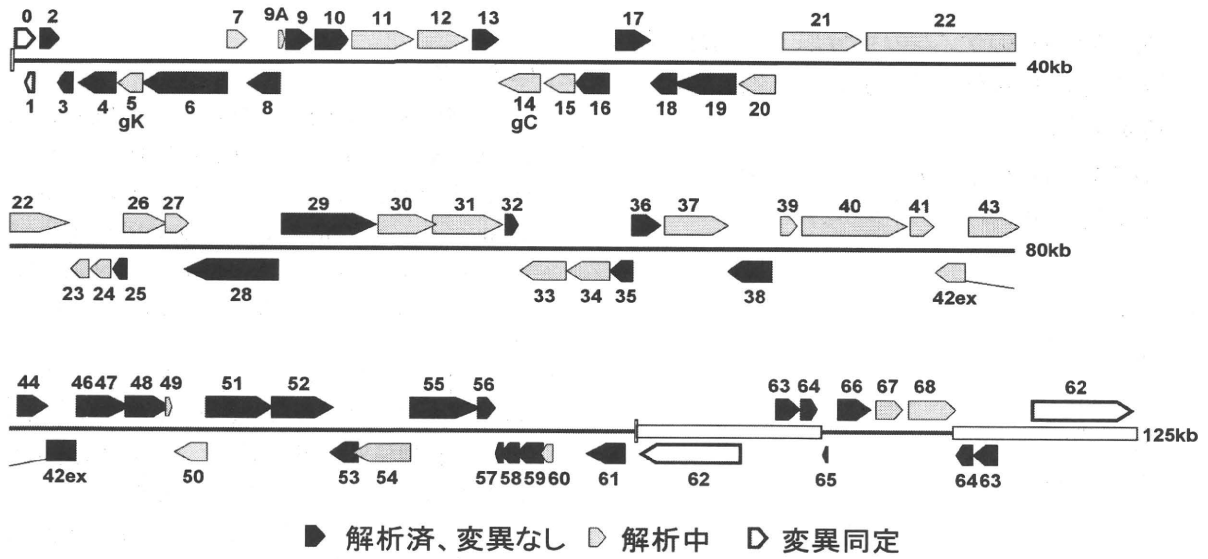


図1 35B2 耐性株 R1 の塩基配列解析

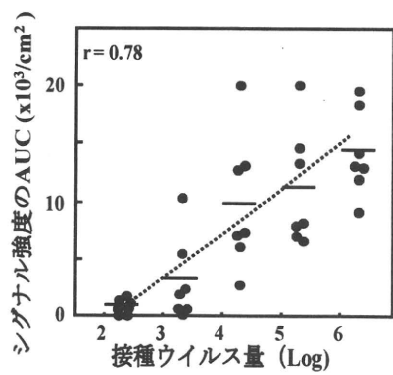


図2 イメージングの定量性

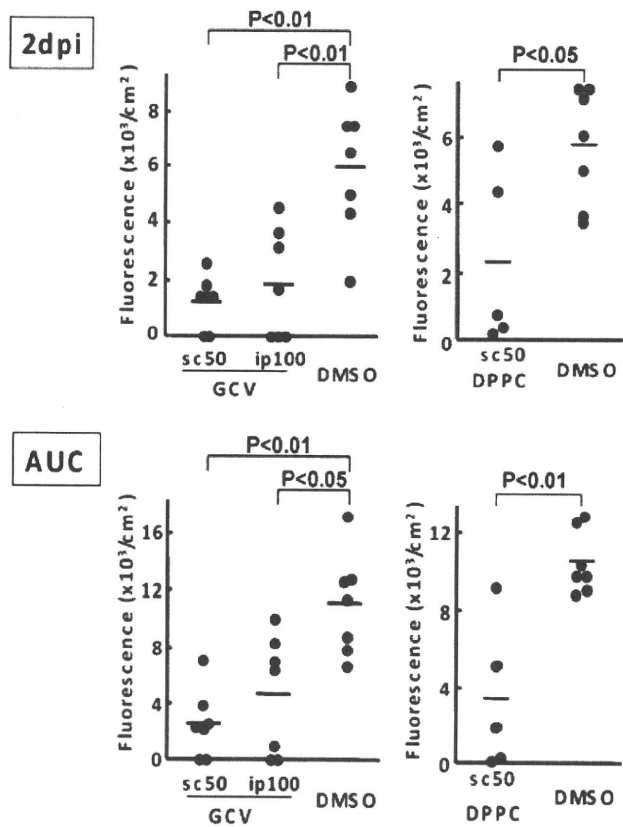


図3 DPPC の個体における効果

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)

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	樽本憲人	国立感染症研究所 生物活性物質部
研究協力者	梅山 隆	国立感染症研究所 生物活性物質部
研究協力者	山越 智	国立感染症研究所 生物活性物質部
研究協力者	金城雄樹	国立感染症研究所 生物活性物質部
研究協力者	宮崎義継	国立感染症研究所 生物活性物質部
研究協力者	梶川益紀	(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,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。

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。固形臓器移植に合併した深在性真菌症のうち,

クリプトコックス症は約 10%程度に認め、合併頻度としては多くはないものの、半数以上の例では播種型もしくは中枢神経系病変を合併している。また、移植患者に合併したクリプトコックス症の死亡率は全体で 15%程度と報告されているが、中枢神経系病変を伴うと死亡率は 40~50%に上昇するなど、予後は極めて不良であり、カンジダ症、アスペルギルス症とならび感染症対策が重要な疾患である。

カンジダ属やアスペルギルス属と比較し、クリプトコックス属においては近年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、本研究では昨年度から引き続き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や、カンジダ感染症の新たな制御法の開発を念頭にカンジダ属に対する細胞壁、分泌蛋白抗体の抗カンジダ活性の検討を通じて移植医療における深在性真菌症対策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、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。

### 2. 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。

### 3. カンジダ属 RNA 抽出。

*Candida albicans* SC5314 株を用い、通常の好気条件下で培養し、培養菌から ISOGEN を用いて total RNA を抽出した。

### 4. SST-REX 法。

トランスフェクション：抽出した *C. neoformans*, *C. albicans* の 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*, *C. albican* 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。

#### 5. *C. neoformans* CnHip1p の細胞内局在性の検討。

嫌気条件下で誘導された SST クローンのうち、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。

##### ① 遺伝子のクローニング

得られた mRNA より oligo-dT をテンプレートとし逆転写酵素により 1st strand cDNA を合成した。コーディング領域を PCR 法により増幅し、pBluescript II へクローニングした。

##### ② *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) 発現による分泌蛋白質の検出とその局在

クローニングした遺伝子を、HA tag を蛋白質の C 末端に付加する pADH-HA 発現ベクターに挿入し、*S. cerevisiae* に導入した。細胞での局在は、細胞質、細胞膜、細胞壁の画分に分けウエンスタンプロットに供し、抗 HA-抗体で検出した。培養上清は、抗 HA 抗体で免疫沈降し、ウエンスタンプロットに供し、抗 HA-抗体で検出した。

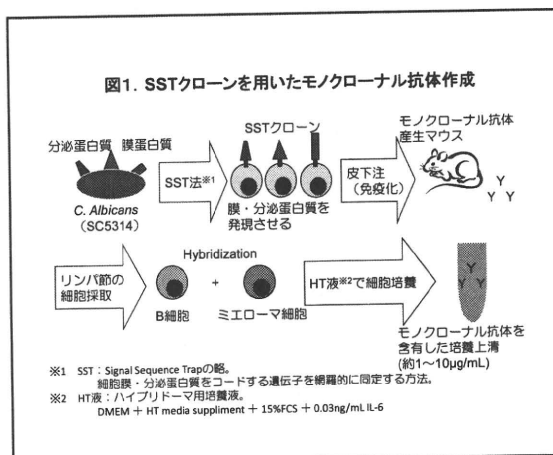
#### 6. *C. neoformans* CnHIP1, カンジダ属 SST クローンに対するモノクローナル抗体の作成(図1)。

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。

#### 7. カンジダ SST クローンに対するモノクローナル抗体の抗カンジダ活性の検討。

前述した方法で得られたモノクローナル抗体を含有する細胞培養上清を用いて、抗カンジダ活性の有無を検討した。方法としては、YPD broth で *C. albicans* SC5314 を 18 時間程度培養し、HT 液で洗浄後、菌量を OD530=0.1 に調整し、96 穴マイクロプレート上で菌液 100  $\mu$ l と抗体含有培養液(含有抗体量にして約 100 ng~1 $\mu$ g)を混合培養し、48 時間後の菌数等を比較検討した。



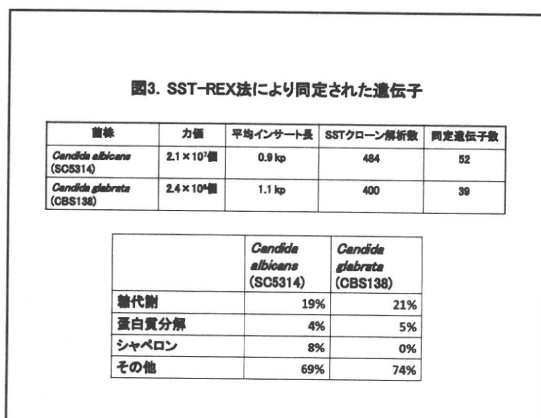
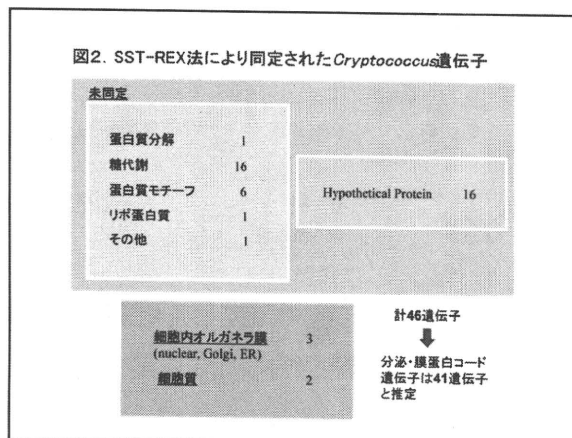
## C. 研究結果

### 1. クリプトコックス属, カンジダ属の細胞表面蛋白質・分泌蛋白質の同定

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2)。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最も多かった *CnHIP1* 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でき、現在この *CnHIP1* 検出用の ELISA 法を作成中である。

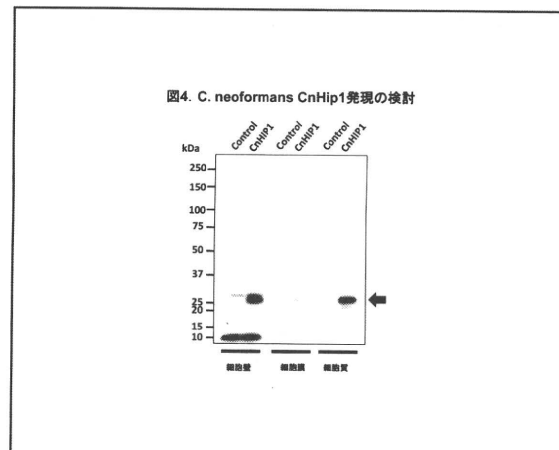
一方、*C. albicans* についても同様に解析を行い、52 の遺伝子が同定された。この同定された遺伝子の推測されている機能を見ると糖代謝 19%、蛋白分解 6%などと判明した(図 3)。



## 2. *C. neoformans* CnHip1p の細胞内局在性

### の検討

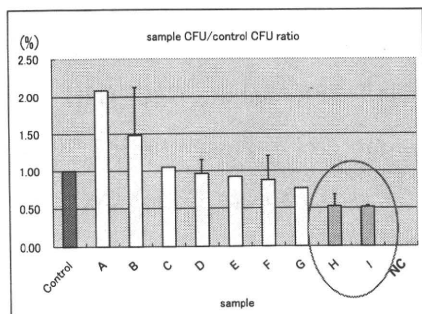
*CnHIP1* 遺伝子発現酵母では細胞質と細胞壁に CnHip1p 蛋白質を検出した。また、細胞膜にはほとんど検出できなかった。一方、今回の検討系では培養細胞上清には蛋白質は検出できなかった(図4)。



## 3. カンジダ SST クローンに対するモノクローナル抗体の抗カンジダ活性の検討

SST クローンのうち、発現量が比較的多いクローンに注目し、モノクローナル抗体の作成を試みた。このうち、*C. albicans* SC5314 細胞壁表層抗原とされる SST クローンで免疫したマウスのハイブリドーマ細胞培養上清 9 種類について、*C. albicans* の発育に与える影響を見たところ、2種類の上清についてはコントロールに比し、発育阻害効果が認められた(図5)。現在、これらの抗体を精製し、その抗カンジダ活性について検討中である。

図5. *Candida albicans* (SC5314株) に対するSSTクローン抗体のin vitro増殖抑制効果



#### 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。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。本年度は、昨年度に引き続き、クリプトコックス属の潜伏感染の検出法について、細胞表面蛋白・分泌蛋白を標的とした検出系開発の基盤研究、ならびにカンジダ属表面抗原に対する抗体の発育抑制効果について検討した。

我々は昨年度 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、潜伏感染状態では低酸素条件にある可能性が高いことから、低酸素での RNA 発現をもとに SST-REX 法を行った。

その結果、計 286 個のクローンから約 40 個の遺伝子が同定され、得られたクローン数が最も多かった *CnHIP1* を第一候補に検討を進めた。今回は、この *CnHIP1* について発現酵母を用いてその局在について確認したところ、細胞壁、細胞質に発現が確認された。一方、培養上清での発現は明らかなものは認められなかったが、これは酵母の違いに由来するものと考えている。従って、*CnHip1p* の局在から、確かに細胞壁での発現が認められ、ある程度の量については細胞壁から遊離してきているのではないかと推測され、これを標的とした診断系の開発については十分可能なものと考えている。また、昨年度には 2 つの抗体が得られており、本年度はこれらの抗体について、ELISA 系の構築を行っているが、技術的な問題から現在のところまだ作成段階である。今後、この構築が完了した後、クリプトコックス細胞培養ろ液(好気、嫌気条件下)や、クリプトコックス感染マウス血清(慢性期)などを用いて検討する予定である。また平行して、この蛋白の病原性に与える影響を検討するため、今後この遺伝子欠損株を作成し、検討も進める予定である。

一方、本年度はクリプトコックス属に加えカンジダ属に対する検討を行った。背景として、カンジダ属は移植医療に合併する真菌症として最も重要な原因真菌の一つであるが、カンジダ血症を合併する症例の予後は極めて不良である。現在、カンジダ属に有用な抗真菌薬は数種類存在するが、カンジダ属ではバイオフィーム形成がみられるなどの原因で、十分にその抗真菌効果が得られないことも

散見される。これらを念頭に、SST クローンを標的としたモノクローナル抗体の抗カンジダ活性について検討し、補助的薬剤としての可能性を探った。本年度の検討では、細胞壁表層抗原を標的としたモノクローナル抗体に着目し、ハイブリドーマ培養上清を用いて検討したが、2種類の培養上清については増殖抑制効果の可能性が認められた。現時点での結果からはまだ結論はできないが、今後の精製抗体を用いた検討で何らかの増殖抑制効果等が確認できれば、新たな補助的治療薬の可能性が期待できるものとする。

#### 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 CnHip1p につき発現の局在を確認したところ細胞壁での発現が認められた。

2) 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。

3) 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の抗カンジダ活性について基礎的な検討を行い、その増殖抑制効果の可能性が認められた。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 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.

2) Tomita H, Muroi E, Takenaka M, Nishimoto K, Kakeya H, Ohno H, Miyazaki Y, Utani A.

*Rhizomucor variabilis* infection in human cutaneous mucomycosis. *Clinical and Experimental Dermatology* published online: 10 Nov 2010|DOI: 10. 1111/j. 1365-223-. 2010.03956.x

3) Kaneko Y, Ohno H, Kohno S, Miyazaki Y. Micafungin alters the expression of genes related to cell wall integrity in *Candida albicans* biofilms. *Jpn J Infect Dis* 63: 355-357, 2010.

4) 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.

5) 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



## 2.学会発表

- 1) 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. 1)
- 2) 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 (2010.10)
- 3) 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 (2010.10)
- 4) 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. 10)
- 5) 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 (2010.10)
- 6) 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 (2010.10)
- 7) 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 udagawae* 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 (2010.10)
- 8) 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 (2010.10)
- 9) 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. 9)
- 10) 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. 7)
- 11) 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. 6)
- 12) 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. 6)
- 13) 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. 6)
- 14) 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. 6)
- 15) 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. 6)
- 16) 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. 5)
- 17) 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. 4)
- 18) 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. 4)
- 19) 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. 4)
- 20) 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 (2010.12)
- 21) 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 (2010.12).
- 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)

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
研究協力者	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
研究協力者	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
研究協力者	山本久史	虎の門病院血液科
研究分担者	谷口修一	虎の門病院血液科

研究要旨

我々は、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開発を目的とした検討を進めてきた。本年度は移植後の臨床検体を用いて実施可能性を検討した。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 PBMC における検討では、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。薬剤感受性試験を施行した 19 症例中、6 症例が感受性低下と判定されたが、内 5 例には薬剤耐性獲得となる遺伝子変異は検出されなかった。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。他の 1 例では感受性低下を判定し得なかったが、この原因として、体内において異なる感受性、指向性をもつ複数のウイルス株の存在などが推察された。より安定した試験法の確立のためには、プロトコールの再検討に加えて、異なる反応性を示す要因を特定するためのウイルス学的検討が必要である。

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し、継続的なモニタリン

グが必須な感染症の一つである。予防的措置が重要な為、抗ウイルス薬の長期投与が行われる頻度が高いといえる。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、耐性ウイルス出現の頻度は高くないが一定の確率で引き起こされる。その為、抗ウイルス薬の効果が低い場合には薬剤耐性ウイルスとの鑑別が重要である。

従来 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ために実用性に乏しかった。本研究では移植医療において有用な phenotypic な抗 CMV 薬に対する薬剤感受性試験法の開発を目的とし、我々が開発した新規検出系である PML 法(参考文献1)を用いた。本法では GFP-PML の安定発現株 SE/15 細胞をレポーター細胞として用い、HCMV の IE1 遺伝子産物を経時的にモニターすることにより、培養細胞中の活動性 CMV を検出する。昨年度までに、本

法を利用した感受性試験の protocol を in vitro 感染血液細胞を用いて確立し、感度向上のための諸条件を決定した。本年度は臨床検体を用いて PML 法によるこれら試験の実施可能性を検討した。加えて、本法はその原理から病態との高い相関性が得られると期待されるので、CMV ゲノムコピー数、他の臨床データと PML 法での検出結果を比較検討した。

## B. 研究方法

1. 対象と試料 造血幹細胞移植後に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) を用いた。表 1 に疾患および移植の背景データのまとめを示した。

表 1 患者背景データのまとめ (n=20)

年齢	中央値 (range)	50 (17-65)	移植の種類	骨髄移植	10
性別	male/female	10 / 10		末梢血幹細胞移植	7
疾患名	急性骨髄性白血病	7	ドナータイプ	臍帯血移植	3
	再生不良性貧血	5		HLA matched related	3
	成人 T 細胞性白血病	2		HLA mismatched related	4
	び慢性大細胞型 B 細胞性リンパ腫	2		unrelated	13
	急性リンパ性白血病	3	急性 GVHD 発症数		7
	慢性骨髄性白血病	1			

2. 活動性 CMV の検出と薬剤感受性試験 患者血液から分離した PBMC を SE/15 細胞と共培養し、GFP-PML の局在変化を指標として時間経過にともなう陽性細胞数を計測した。このうち、PBMC 培養初日から SE/15

細胞と共培養した場合を plate 1 とした。薬剤感受性試験の場合は、培養開始時において様々な複製段階に進んだウイルスが存在しうするため、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細胞を培養3日後に添加し、これを plate 2 とした。

3. ウイルス分離とプラーク法による薬剤感受性試験 ヒト線維芽細胞に血液 200ul を接種して 3-4 週間培養しウイルス分離を評価した。分離ウイルスのプラーク法による薬剤感受性試験はヒト線維芽細胞を用いて常法に従った。

4. real time PCR 血液中 CMV ゲノムコピー数は全血から DNA を抽出後、IE1gene の定量を real time PCR 法にて行った。

5. 薬剤耐性遺伝子変異解析 ; UL54 および UL97 遺伝子の配列解析は血液 DNA または分離ウイルスより得た DNA を試料として、PCR 増幅後に各遺伝子断片の DNA 配列を解析した。

(倫理面からの配慮について)

臨床血液試料を用いた試験は虎ノ門病院および自治医科大学での倫理委員会にて承認されたプロトコールに沿って実施した。

## C. 研究結果

1. 活動性 CMV の PML 法による検出  
造血幹細胞移植後の 25 検体の PBMC を用い

て、活動性 CMV を PML 法により検出可能かどうか試験した。患者由来 PBMC と SE/15 細胞の約 5 日の共培養により陽性細胞が検出され、試料中の活動性ウイルスを検出可能である事を確認した。並行して行ったウイルス分離成績 44%に対し、PML 法では 76% と高い検出率が得られ、ウイルス分離されない検体でも PML 法により検出可能である事が示された(表 2)。ウイルスゲノム量により、Low grade ( $1 \times 10^4 >$ ), High grade ( $1 \times 10^4 \leq$ ) の 2 群に分けると、High grade 群のウイルス分離成績は Low grade 群のそれよりも有意に高く(表 2)、この 2 群間での比較の有効性が示唆された。PML 法での陽性率(plate 1)は Low grade 群 36%、High grade 群 69%となり、ウイルスゲノム量と相関する傾向が得られた。PML 法での検出の指標として  $1 \times 10^6$  PBMC あたりの陽性細胞数を比較すると、High grade 群がより高い傾向にあったが(表 2)、一部の検体で PML 法の結果とゲノム量、アンチゲネミア試験値が乖離している事も判明した。アンチゲネミア試験値は PML 法のための採血よりも 2-5 日前である場合が多いため、PML 法との結果の相関度は低い傾向にあった(未掲載)。

表 2 PML 法の検出結果とウイルスゲノム量, ウイルス分離成績の比較

		PML 法の検出結果						ウイルス 分離成績
		plate 1			plate 2			
		陽性 % (陽性検体数 / 総検体数)	平均陽性 細胞出現 日 (day)	陽性細胞数 / $1 \times 10^6$ 中央値 (range)	陽性 % (陽性検体数 / 総検体数)	平均陽性 細胞出現 日 (day)	陽性細胞 数/ $1 \times 10^6$ 中央値 (range)	
	total	58 (14/24)	5.1	34.2 (4-96)	76 (19/25)	8.6	30.0 (4-212)	44 (11/25)
HCMV genome DNA	Low grade $1 \times 10^4 >$	36 (4/11)	5.4	28.6 (11-92)	73 (8/11)	8.7	20 (5-212)	18 (2/11)
	High grade $1 \times 10^4 \leq$	69 (9/13)	4.8	34.2 (4-96)	79 (11/14)	8.4	40.0 (4-92)	64 (9/14)

2. 薬剤感受性試験 Plate2 において陽性細胞が確認され, 薬剤感受性試験を施行した 19 検体中, 6 検体が感受性低下と判定された. この内 5 検体では, 薬剤耐性獲得となる遺伝子変異およびプラーク減少法による IC50 の上昇は認められなかった. 既報告の薬剤耐性獲得となる遺伝子変異は 2 検体で検出された. このうち 1 例は PML 法で感受性低下と判定された (図 1 #hsct-17). しかし, 他の 1 例では感受性低下を判定し得なかった (#hsct-22). その原因を探索するため, その分離ウイルスの PBMC と線維芽細胞での複製能を in vitro で評価すると, #hsct-22 株ウイルスは PBMC でのウイルス複製能が低い可能性が示された.

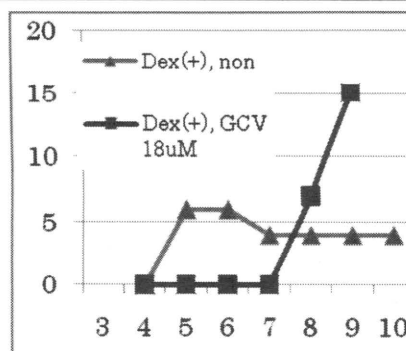


図 1. #hsct-17 の PML 法による薬剤感受性試験結果. 本検体はその後の遺伝子解析において薬剤耐性獲得となる UL54 (T301 I) 及び UL97 (C603W) の変異が検出された.

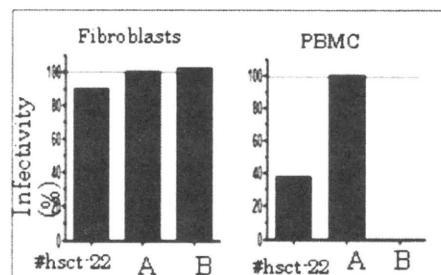


図 2. #hsct-22 分離ウイルスの In vitro 複製能の比較. A, BPBMC 向性株 (陽性コントロール) B, PBMC 非向性株 (陰性コントロール)

#### D. 考察

本年度の検討から、移植後患者血液中には異なる指向性、感受性をもつ複数のウイルス株による重感染の可能性など、複雑な背景が示唆され、薬剤感受性検査にもこれらを考慮する必要性が判明した。今後、より安定した試験法の確立のためには、プロトコルの再検討に加えて、異なる反応性を示す要因を特定するための詳細なウイルス学的検討が必要であると考えられた。一部の検体でみられた、PML法の結果とゲノム量、アンチゲネミア値の乖離についても同様な解析から *in vivo* での病態理解を深める必要があると推察される。

#### E. 結論

造血幹細胞移植後患者の血液由来細胞から PML 法により活動性 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していた。PML 法による薬剤感受性試験法の実施可能性も示唆されたが、より安定した試験法の確立にむけて更なる改良が必要である。

(参考文献)

Ueno, T., Eizuru, Y., Katano, H., Kurata, T., Sata T., Irie, S., and Ogawa-Goto, K.: Antimicrobial Agents and Chemotherapy 50, 2806-2813, 2006

#### F. 健康危険情報: 無

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yamamoto, K., Ishikawa, C., Katano, H., Yasumoto, T., Mori, N.: Fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol,

induce apoptosis of primary effusion lymphomas. Cancer Letters 300:225-234, 2011.

- 2) 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 83:322-330, 2011.
- 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

#### 2. 学会発表

- 1) 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)
- 2) 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)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 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  
研究協力者 矢部 普正 東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学・准教授  
研究協力者 土田 文子 東海大学医学部付属病院臨床検査科・技術員

研究要旨: 造血細胞移植後に定期的な real-time PCR を行い, 3 例において EB ウイルスによる移植後リンパ増殖症(EBV-LPD)の診断を行った. EBV 感染細胞の同定として, リンパ球サブセット別の real-time PCR を行ったところ, 主に B リンパ球(CD19 陽性細胞)への EBV 感染を認めたが, 抗 CD20 抗体による治療後に CD19 陽性, CD20 陰性分画に感染が持続した例を認めた. 他の 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 コピー数の高値を認めた. 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.

A. 研究目的

非血縁ドナーを始めとする代替ドナーからの同種造血細胞移植においては, 拒絶・GVHD 予防に用いる抗胸腺細胞グロブリン(ATG)の影響で T リンパ球の回復が遅延し, 予後不良な EB ウイルスによる移植後リンパ増殖症(EBV-LPD)が合併することがある. 感染細胞の殆どは B 細胞 LPD であり, 抗 CD20 モノクローナル抗体である Rituximab の早期介入治療が奏功する例が多い. われわれは 3 例の EBV-LPD を経験したが, リンパ球サブセット別の EBV コピー数を測定し, Rituximab 治療後の経過につき検討した.

B. 研究方法

症例 1, 2 は Fanconi 貧血, 3 は副腎白質ジストロフィーの患児で, 3 例とも前処置に ATG を使用した. 移植後に症例 1 は可逆性後頭葉白質脳症を合併, 症例 2, 3 は急性 GVHD のためステロイド投与を行った. 生着の確認は short-tandem repeat (STR) 法で行い, 3 例ともに末梢血はドナータイプ 100%に転換した. 移植後毎週 1 回の EBV, CMV, HHV-6 に対する real-time PCR を行った.

(倫理面からの配慮について)

同種造血細胞移植の方法, リスク, 合併症, ウイル数 of real-time PCR 測定の意義,

EBV-LPD に対する Rituximab 治療については、両親と小児患者に文書やイラストによる説明を行い、文書による同意を得た。

### C. 研究結果

EBV コピー数が急増したのは症例 1, 症例 2, 症例 3 でそれぞれ移植後 39 日, 61 日, 39 日で、その後数日で高熱を認めた。症例 1, 症例 2, 症例 3 の EBV コピー数は、全血でそれぞれ  $12 \times 10^4 \text{copy}/\mu\text{gDNA}$ ,  $4 \times 10^4 \text{copy}/\mu\text{gDNA}$ ,  $12 \times 10^4 \text{copy}/\mu\text{gDNA}$  であった。CD19 陽性細胞中の EBV コピー数は症例 1, 症例 2, 症例 3 でそれぞれ  $144 \times 10^4 \text{copy}/\mu\text{gDNA}$ ,  $112 \times 10^4 \text{copy}/\mu\text{gDNA}$ ,  $24 \times 10^4 \text{copy}/\mu\text{gDNA}$  と、他のサブセットに比べて高値であった。CD3 陽性細胞中の EBV コピー数は症例 1, 症例 2, 症例 3 でそれぞれ  $4 \times 10^4 \text{copy}/\mu\text{gDNA}$ ,  $0.5 \times 10^4 \text{copy}/\mu\text{gDNA}$ ,  $16 \times 10^4 \text{copy}/\mu\text{gDNA}$  で、症例 3 では T リンパ球への EBV 感染が疑われた。CD56 陽性細胞中の EBV コピー数は症例 1, 症例 2, 症例 3 のいずれも  $5 \times 10^4 \text{copy}/\mu\text{gDNA}$  未満にとどまった。症例 1 の末梢血 CD19 陽性細胞は 17.9%, CD20 陽性細胞は 5.7% と解離がみられ、CD20 陰性 EB-LPD が疑われた。

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 EB ウイルス感染している可能性があるため、Rituximab 投与と同時にホスカビルの投与を

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。

### D. 考察

EBV-LPD は予後不良な移植後合併症として知られているが、われわれの経験した 3 例では、いずれも Rituximab の投与で改善を得ることができた。通常の B 細胞リンパ腫においては Rituximab 投与により腫瘍崩壊症候群などの重篤な合併症を生じることがあるが、今回の 3 例においては EBV コピー数は極めて高いものの、腫瘍形成がなく、Rituximab 投与で崩壊する細胞量が少なかったことが安全に治療できた要因かもしれない。

EBV-LPD は高熱が持続した後に診断されるような例では、すでに臓器障害が進行している場合が多く、予後に影響するものと推測される。ATG の投与を要する非血縁移植においては、予め毎週の real-time PCR で EBV 再活性化の早期把握を行い、適切な Rituximab の投与時期を逸しないような注意が必要である。

### E. 結論

EBV-LPD のハイリスク症例においては、定期的な real-time PCR を測定して EBV 再活性化の早期把握を行い、感染細胞の同定を試みた上で適切な Rituximab 投与を行う必要がある。

### F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表

### 1.論文発表

- 1) 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*. 2010 Apr 1;115(13):2723-4.
- 2) 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*. 2010 Aug 26, 116(8):1369-76. May 17. [Epub ahead of print]
- 3) 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 Transplant*. 2010 Jun 21 [Epub ahead of print]
- 4) 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*. 2010 Oct 14;116(15): 2839-46. Jul 13. [Epub ahead of print]
- 5) 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 Transplant*. 2010 Sep 27. [Epub ahead of print]
- 6) 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 Marrow Transplant*. 2010 Oct 18. [Epub ahead of print]
- 7) 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.

### 2. 著書

- 1) よくわかる造血細胞移植コーディネート.  
医薬ジャーナル社 2010 pp1-2 (編集)
  - 2) よくわかる小児の造血細胞移植 医薬ジャーナル社 2010 (監修および共著)
3. 学会発表
- 1) 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.
  - 2) 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.
  - 3) 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.
  - 4) 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.
  - 5) 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.
  - 6) Yabe H, Yabe M, Kato S, Koike T, Takakura H, Hyodo H, Tomita Y, Ishiguro H, Shimizu T, Morimoto T, 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.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- なし
  1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし