

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)

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

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: 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象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を認めず、また拒絶反応の誘発も認めなかった。有効抗体価獲得率、抗体陽転率ともに対照群と差を認めず、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。

A. 研究目的

2009 年型新型 H1N1 インフルエンザは、同季に世界的な流行をみせ、本邦でもその流行は 2009 年 8 月から 2010 年 3 月に及び、医学的危険因子をもつ患者等で重篤化が認められた。海外では、臓器移植患者群における重篤化も報告されている。本邦では、流行期に単種不活化ワクチンが製造され、ハイリスク群を中心に優先接種が行われたが、その安全性と効果、さらに平行して接種された三種季節性インフルエンザワクチンとの比較を事前に検証することはできなかった。本研究は、これらの検証を行い、さらに免疫抑

制療法下でない小児群との比較を行うことを目的とした。

B. 研究方法

生体肝移植後の小児 13 例と免疫抑制療法下でない障害児 31 例(対照群)を対象とした。移植例は移植後 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)安定している症例とした(原疾患は胆道閉鎖症 11 例、OTC 欠損症 1 例、門脈形成不全 1 例)。

44 例全例に単種新型インフルエンザワクチンが、移植後患児 13 例のうち 12 例では平行して三種季節性インフルエンザワクチンが併

施された(1-5 歳 0.2ml, 6-12 歳 0.3ml [4 週間隔 2 回], 13 歳以上 0.5ml [1 回]). 単種ワクチンは A/California/7 /2009(H1N1)由来, 三種ワクチンは A/Brisbane/ 59/2007(H1N1), A/Uruguay/716/2007(H3N2) , B/Brisbane/60/2008 由来のものを用い, いずれもアジュバントなしの不活化 split-virus ワクチンであった(>15 μ g HA/0.5ml).

接種の安全性に関する情報は接種後 6 ヶ月間収集し, 38 $^{\circ}$ C以上の発熱と発熱時のインフルエンザ感染(鼻咽頭スワブ抗原試験 QuickNavi-Flu)をモニターした. 移植後例については定期的に血液検査を行なって急性拒絶をモニターした. HI 力価判定のための採血は接種前と接種後 4 週後(2 回接種例では初回接種後 6 週)に行なった.

ワクチンの免疫原性評価には, ①有効抗体保有率(seroprotection rate): HI 力価 \geq 1:40, ②抗体陽転率(seroconversion rate): HI 力価上昇 \geq 4 倍, ③HI 力価の幾何平均(GMT)を用いた. 統計方法には Fisher 正確確率検定と Wilcoxon 符号順位検定を用い, p 値 $<$ 0.05 を有意とした.

(倫理面からの配慮について)

研究計画は名古屋大学臨床研究審査委員会の承認を受け, 対象小児とその保護者に対して接種に起因する潜在的な利点と危険を説明し, 事前に同意を得た.

C. 研究結果

肝移植後群の年齢は 6.7 \pm 3.9 歳(mean \pm SD), 対照群は 9.7 \pm 3.9 歳で後者が有意に

高かった($p=0.041$). 男女比は前者 8:5, 後者 13:18 であったが有意差はなかった. 前者の移植後経過年数は 4.1 \pm 1.8 年, ワクチン接種時の全血タクロリムス・トラフ濃度は 2.1 \pm 0.8ng/ml であった.

肝移植群においても対照群においても, ワクチン接種に関連した重度の全身合併症はみられず, 肝移植群では観察期間内に急性拒絶を認めなかった.

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. 有効抗体保有率も接種前後で 2009H1N1 7.7%/53.8%, 季節性 A/H1N1 66.7%/75%, 季節性 A/H3N2 41.7%/50%, 季節性 B 33.3%/25.5%と 2009H1N1 ワクチンで明確な上昇を示した. 抗体力価の幾何平均(GMT)も, 接種前後で 2009H1N1 6.2/32.3(5.2 倍), 季節性 A/H1N1 33.6/44.9(1.3 倍), 季節性 A/H3N2 17.8/26.7(1.5 倍), 季節性 B 13.4/13.4(1 倍)と 2009H1N1 のみで有意な上昇を示した. 肝移植群における季節性インフルエンザワクチン接種後の有効抗体保有率は, 昨年度報告し

た 2006-2008 年季の値 (A/H1N1 38-57%, A/H3N2 38-71%, B 23- 43%)と同等であった。

ワクチン接種後の追跡期間において、対照群の 1 例が 2009 新型インフルエンザ感染と診断されたが、合併症なく軽快した。

D. 考察

インフルエンザ感染は免疫低下状態において重篤な合併症に繋がる可能性があり、臓器移植後の小児はそのリスクが高いと報告されている。加えて若年小児では、インフルエンザへの先行暴露による免疫獲得の機会に乏しい。肝移植患者における不活化インフルエンザワクチンの安全性についてはこれまでも報告されているが、その免疫原性については議論が残されている。

成人肝移植患者では、インフルエンザワクチンによる HI 抗体反応が健常者や肝硬変患者と比べて低いことが報告されているが、健常者と変わらないとする報告もある。一方で、小児肝移植患者におけるインフルエンザワクチンの免疫原性に関する報告は少ない。ある報告では、肝移植後小児では、健常な同胞と比べて T 細胞反応は低いものの、ワクチンに対する HI 抗体反応は同等であるとしている。昨年度報告した季節性インフルエンザワクチンの免疫原性は、肝移植後小児と健常児とで同等であった。

本年度研究の結果は、限られた症例数と障害児という対照群ながら、不活化 2009H1N1 ワクチンが肝移植後慢性期の患児に安全に接種でき、免疫反応が免疫低下

状態にない小児と同等であることを示唆している。

海外では種々の 2009H1N1 ワクチンが製造され、その高い安全性と効果が報告されている。ある報告では 1 回接種後の有効抗体保有率が 6-35 ヶ月児で 45-50%, 3-9 歳児で 69-75%, 18-60 歳で 95-100%, それより高齢で 93-95%, 別の報告では 3-12 歳で 76.7% (2 回接種後 97.7%), 12-18 歳で 96.8%, 18-60 歳で 89.5%, それより高齢で 80.3%となっている。

HI 抗体測定方法の厳密な国際的標準化という問題はあるものの、本研究における 2009H1N1 ワクチン接種後の有効抗体保有率は、これらの報告よりも低い。しかし、同季に接種された季節性インフルエンザと比べると、抗体陽転率は高く、有効抗体保有率は接種後明確に上昇している。同時に、同季以前に 2009H1N1 に対する有効抗体保有者がほとんどいなかったことが改めて確認された。

E. 結論

肝移植後慢性期の小児において、2009-2010 年季に 2009H1N1 新型及び季節性インフルエンザワクチンの安全性と効果を検討した。観察期間においてワクチン関連の重篤な全身副作用や急性拒絶は見られず、抗体の反応から、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。

F. 健康危険情報

特になし.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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. *Br J Surg* 96:437-444, 2009
- 2) 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? *Clin Transplant* 23:289-293, 2009
- 3) 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
- 4) Nagai, S, Fujimoto, Y., Kamei, H., Nakamura, T., Kiuchi, T.: Noninvasive positive pressure ventilation to prevent respiratory collapse after extubation: clinical case reports. *Transplant Proc* 41:3919-3922, 2009
- 5) 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. *Pediatr Transplant* 14:342-50, 2010
- 6) 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. *J Infect Dis* 202:461-9, 2010.
- 7) Kiuchi, T., Onishi, Y., Nakamura, T.: Small-for-size graft: not defined solely by being small for size. *Liver Transpl* 16:815-7, 2010
- 8) 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 J Med Sci* 2010; 72: 119-127
- 9) 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. *Clin Transplant* Apr 11 [Epub ahead of print], 2010
- 10) 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*. 57:903-7, 2010
- 11) 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. *J Gastroenterol*. Sep 11 [Epub ahead of print], 2010
- 12) 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. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. Oct 9 [Epub ahead of print], 2010
- 13) 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. *Pediatr Transplant* 15:112-6, 2011
- 14) 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
- 15) 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)
- ## 2.学会発表
- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 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)

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

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: BK ウイルス(BKV), JC ウイルス(JCV)およびアデノウイルス(AdV)は腎臓移植後のウイルス性腎症や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、移植患者の臨床検体に応用した。腎臓移植後患者の尿 124 検体中、BKV は 29 検体 (23.6%), JCV は 50 検体 (40.3%), AdV は 2 検体 (1.6%) で陽性(7 検体で複数のウイルスが陽性)だった。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 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 は 6 検体 (33.3%), JCV は 2 検体 (11.1%), AdV は 3 検体 (16.7%) から検出された。今回確立した BKV・JCV・AdV 同時定量システムは、標的遺伝子を特異的かつ高感度に検出が可能で、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 定量は腎臓移植後の BKV 腎症の診断的意義があることが示唆された。

A. 研究目的

BK ウイルス(BKV), JC ウイルス(JCV)およびアデノウイルス(AdV)は腎臓移植後のウイルス性腎症や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。腎臓移植・造血幹細胞移植後の、ウイルス性腎症・出血性の膀胱炎を確実に診断することは、移植成績の向上とともに、患者の予後に大きく係わってくる。JCV は BKV と同じポリオーマ

ウイルスに属し、ヒトに普遍的に潜伏感染しており、移植後再活性化時に、患者尿中に検出されることがある。BKV による腎症・出血性膀胱炎では、尿細胞診による decoy cell (ウイルス感染上皮細胞)の検出がスクリーニング法として用いられているが、診断的価値は高くなく、JCV の活性化によっても Decoy cell は検出される。BKV・AdV の診断・スクリーニングに定量 PCR 法が導入されて

いるが、広く臨床応用されてはいない。今回我々は、BKV・JCV・AdV による移植後合併症の効率的な診断のため同時定量システムを開発する必要があると考え、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、腎移植・造血幹細胞移植後患者検体に応用した。

B. 研究方法

BKV は large T, JCV は large T, AdV は hexon に primer, probe を設定し、それぞれの probe を FAM, Cy5, JOE で標識した (BKV は 2 種類の primer セットを混合して使用)。陽性コントロールとして標的配列を組み込んだプラスミドを作製した。Multiplex Real-time PCR は、QuantiTect multiplex PCR kit (QIAGEN) を用いて Mx3000P Real-time PCR system (Stratagene) によって測定した。

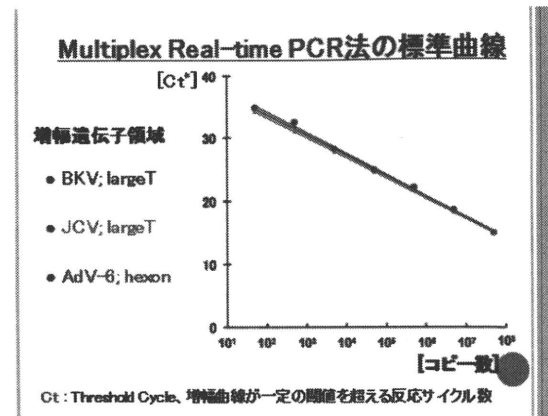
臨床検体として、腎移植後患者 124 例 (平均 47 歳, 男/女: 79/45, 移植後平均 78 カ月) より得られた尿 140 μ l から, QIAamp viral RNA kits (Qiagen) を用い DNA 抽出を行い定量 PCR に用いた。また造血幹細胞移植後に出血性膀胱炎を罹患した患者 18 例 (平均 15 歳, 男/女: 12/6, 移植後平均 2.4 カ月) から得られた血清 200 μ l から, QIAamp DNA Blood kits (Qiagen) を用い DNA 抽出を行った。

(倫理面からの配慮について)

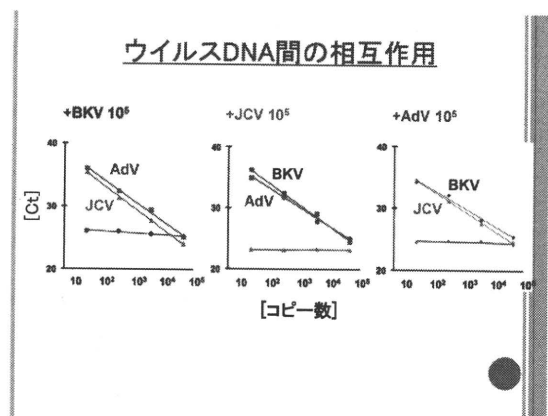
ヘルシンキ宣言に則り研究を遂行し、検体の採取にあたっては患者より同意を得た。

C. 研究結果

1) 陽性コントロールを用いて作成した標準曲線は、各ウイルス 5~5 \times 10⁷ コピーの範囲で良好な直線となり、検出限界は 6-18 copies/reaction であった。



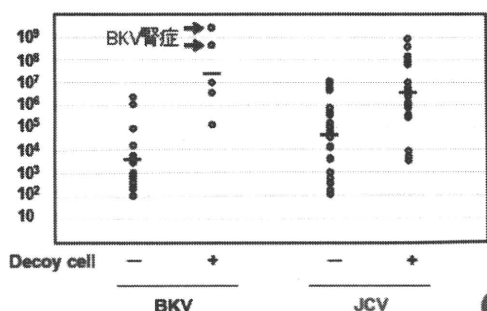
2) 抽出物中の阻害物質が測定系に及ぼす影響を調べるために、ウイルス DNA 陰性の検体 (尿・血清) から抽出した DNA をコントロールに一定量を加え検討したが、阻害は認められなかった。



3) 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。BKV は 29 検体

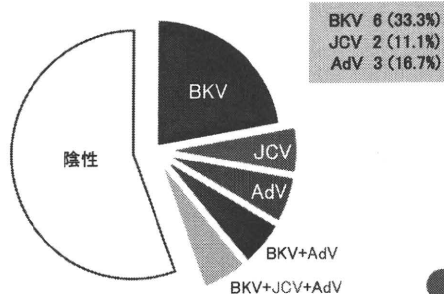
(23.6%), JCV は 50 検体 (40.3%), AdV は 2 検体 (1.6%) で陽性 (7 検体で複数のウイルスが陽性) だった. BKV および JCV のウイルス量と Decoy cell との関係を見たところ, Decoy cell が検出された尿中で有意に多量の BKV, JCV が検出された. さらに, 尿中に Decoy 細胞が認められた 31 例中, BKV が 10^8 copies/mL 以上の 2 例は組織検査により BKV 腎症と診断された.

Decoy cell の出現とウイルス量の関係



4) 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 は 6 検体 (33.3%), JCV は 2 検体 (11.1%), AdV は 3 検体 (16.7%) から検出された.

造血幹細胞移植後・出血性膀胱炎 18 例・血清



D. 考察

今回我々は, 移植後腎症・出血性膀胱炎の主因である BKV, JCV および AdV を同時定量する Multiplex assay を確立した. 本法により迅速かつ正確に, 3 つのウイルスを定量することができる. ことに BKV, JCV は遺伝子的にも近縁であり, 72-81% の核酸相同性を持つにもかかわらず, それぞれに影響されることなく, 同時に個別に定量できた. 本法により, 3 種類の異なったウイルスを同時に測定できるのみならず, 測定時間の短縮, 労働の減少も期待できる. 直接経費だけでなく人件費も大幅に削減できるため, 今後臨床分野で幅広く応用が期待される.

JCV, BKV は腎尿管上皮細胞に潜伏感染しているため, 免疫不全状態で再活性化する. よって, 尿中のウイルス検出は必ずしも, 疾病の存在を意味しない. 本研究においても腎移植後患者の尿中に BKV は 23.6%, JCV に至っては 40.3% という高い比率で検出された. 疾病との関連を証明するには, 単にウイルスを検出するのみならず, ウイルス量を定量する必要がある. 事実, 今回の検討で, BKV が 10^8 copies/mL 以上の 2 例は組織検査により BKV 腎症と診断されている. 今回確立した BKV・JCV・AdV 同時定量システムは, 定量性にも優れるため, 移植後腎症の診断に極めて有用と考えられる. また, 本研究において造血幹細胞移植後の出血性膀胱炎患者血清を調べたところ, これまで代表的な原因にウイルスとされてきた AdV 以外にも, BKV, JCV が高頻度に検出された. 血清からのウイルス DNA 検出は出血性膀胱炎

の診断的意義が高いと言われており、本研究により、従来考えられている以上に、BKV、JCV による出血性膀胱炎が存在する可能性が示唆された。

E. 結論

今回確立した BKV・JCV・AdV 同時定量システムは、標的遺伝子を特異的かつ高感度に検出が可能で、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 BKV 腎症の診断的意義が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

- 1) 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: 825–30, 2010
- 2) 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
- 3) 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 Viral Loads. *Journal of Infectious Diseases* 202:461–469, 2010

- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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* 54:516–22, 2010
- 7) 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 116:4546-59, 2010

- 8) 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
- 9) 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

2.学会発表

- 1) 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 14th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr virus & Associated Diseases, Birmingham, UK (2010.9).

- 2) 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 14th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr virus & Associated Diseases, Birmingham, UK (2010.9)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
1. 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

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

協力研究者 西山 恭子 福島県立医科大学微生物学講座・主任医療技師

研究要旨:医師が菌血症や敗血症を疑い、血液培養を行った症例での菌検出率は予想に反して低い。この原因が“培養”という検査法の欠点によるものか、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、我々が独自に開発した 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 例が培養陽性となったが、PCR で同じ菌は検出できず、PCR 検査の感度が低いことが明らかとなった。一方、培養法では検出できないグラム陰性桿菌が多数検出できたこと、*Candida albicans* は検出されず、それ以外の真菌が検出できたことから、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を確立できた。

A. 研究目的

免疫抑制剤の投与を受けている臓器移植患者にはしばしば致死的な日和見感染症が起こる。この感染症を早期に診断し、適正な治療を行うことは移植を成功させるために必須である。しかし、菌血症や敗血症を疑って菌の分離培養を行っても菌が分離できない症例は非常に多い。特に真菌は培養に1週間以上の時間を要することが多い。分離率が低く、たとえ分離できても菌種の同定に専門的な知識が必要で菌種同定に至らな

い場合が多い。このような症例には予想による治療が行われるのが一般的で、過剰な抗菌剤の投与が原因の新たな菌交代症が惹起され、診断が出来ないまま不帰の転機を取るケースも散見される。

そこで本研究では、虎の門病院で行われた造血幹細胞移植患者を対象に、発熱を来し、菌血症や敗血症を疑って採取した血液検体を対象に、現行の血液培養と我々が開発してきた培養によらない細菌・真菌の同定法による検査をし、その比較検討から、1)培養

によらない検査の改良と至適化、および、2) 感染症の確定診断と症例の検討を行う。その結果から、更に進んだ検査法を開発し、日和見感染症対策を進める。

B. 研究方法

1. DNA の調整

血液からの DNA 調整は以下のように実施した。

虎の門病院で造血幹細胞移植後、発熱した患者から採血した血液の一部は血液培養に、残りは -20°C で凍結保存し、匿名化後、福島県立医科大学微生物学講座に送付した。

溶解したサンプル $200\mu\text{l}$ に $1200\mu\text{l}$ の赤血球溶解液 (10mM NaCl , 10mM Tris-HCl pH7.4, 5mM MgCl_2) を加え攪拌後、 $13,000\text{rpm}$ で 10 分間遠心した。Pellet を再度赤血球溶解液 $1,000\mu\text{l}$ に浮遊後、 $13,000\text{rpm}$, 10 分間遠心して得られた pellet にイージー・エクストラクト for DNA/RNA キット (エーエムアール株式会社) の lysis buffer $150\mu\text{l}$ を加えて 70°C , 10 分インキュベートした。サンプルを同キットのビーズ充填チューブに移し、MagNA Lyser (Roche, Germany) にて $2,500\text{rpm}$ 2 分間攪拌して微生物を物理的に破碎し、ここに $200\mu\text{l}$ の 10% SDS 水溶液を加えてもう一度 70°C , 10 分間インキュベートした。 $400\mu\text{l}$ の水飽和フェノールを加えて充分攪拌後、 $13,000\text{rpm}$ で 5 分間遠心し、水層 $200\mu\text{l}$ を回収した。この $200\mu\text{l}$ は血液検体のおよそ $100\mu\text{l}$ に相当する。サンプルから

核酸をエタノール沈殿にて回収し、乾燥後、 $50\mu\text{l}$ の DEPC 水に溶解した。以上により、計算上、検体が 2 倍に濃縮された核酸のサンプルを調整した。

2. 細菌検査

上記の核酸サンプルを用いて細菌を検出するための reverse transcribed real-time PCR 並びに real-time PCR を行った。

逆転写 (RT) はタカラの PrimeScript RT reagent Kit を用いて行った。サンプル溶液 $6.5\mu\text{l}$ を使い、最終反応液量 $10\mu\text{l}$ で RNA から DNA を合成し、その $1\mu\text{l}$ を用いて real-time PCR を以下のように行った。

Real-time PCR は上記の RT 反応物並びに RT 反応を行っていない核酸溶液そのものを template に行った。PCR 反応の結果 RT-PCR による DNA コピー数の値が RT を行っていないサンプルの DNA コピー数の値より 10 倍程度高い場合を有意な結果とし、差が認められないものはキットの試薬に最初から、あるいは検査の過程でコンタミした DNA と判断した。Real-time PCR にはタカラの SYBR Premix Ex Taq II キットを用い、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System で反応と定量を行った。プライマーとして 8UA [5'-AGAGTTTGATC(A/C) TGGCTCAG-3'] と 519B [5'-ATTACCGCG GC(G/T)GCTG -3'] を用いて、16S rRNA 遺伝子の約 500 bp を増幅した。測定毎にプラスミドにクローニン

グした既知濃度の大腸菌 16S rRNA 遺伝子を使って検量線を描いた。

3. 真菌検査

血液から調整した核酸溶液を用い real-time PCR で真菌 DNA コピー数を定量した。方法は添田らの方法に従った (Soeta et al, 2009)。

4. 菌種の同定

上記の PCR で産物が得られた場合は T-cloning 法で PCR 産物をクローニングし、各サンプルにつき 3 コロニーずつ PCR 反応液に直接加え、遺伝子断片を PCR で増幅した。その PCR 産物を簡易カラムで精製後、シーケンスを決定し、相同性検索によって菌種の同定を行った。

(倫理面からの配慮について)

臨床研究を行うにあたって、虎の門病院並びに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。

虎の門病院では全ての検体を匿名化し、福島県立医大には個人情報公表していない。また、インフォームドコンセントを得た患者のみを研究対象とし、本研究に参加しなくても医療上不利益がないよう最大限の配慮を行った。

C. 研究結果

1. DNA のコンタミネーションと感度の問題

今回、様々なキットを用いて効率良く、定量的に純度の高い DNA を得る方法について検

討を行ったが、市販の多くの試薬やキットには細菌の DNA がコンタミネーションしており、多い場合は 300 コピーを越える DNA が 1 μ l の溶液に存在していた。特に、PCR の酵素は細菌由来で、完全に DNA を除けていない。このようなことから、検査の感度を上げることが出来ないこと、また簡便な DNA 調整キットは使用できないことが明らかとなった。そこで、検出できた菌のコピー数と細菌検査については RT-PCR と PCR 両方の結果からサンプル中に存在していた菌を検出したのかコンタミネーションしている DNA を検出したのかを判断し、検体中の菌とコンタミネーションを区別することとした。ただし、今回の検討は高度の免疫不全を持つ患者検体であることから、感染に対する宿主の反応に乏しく、真に感染とコンタミネーションを判別することは困難であった。

2. 検体の解析結果

移植後、発熱時に採取した血液 21 検体の解析結果を図 2 にまとめた。血液培養で陽性となった 6 検体は *Helicobacter cinaedi* の 1 例を除き、全てブドウ球菌属あるいはレンサ球菌属のグラム陽性菌であった。これらの検体で培養された菌と同じ菌が PCR で検出されたケースはなかった。一方、PCR で検出された菌の多くがグラム陰性桿菌であった。検出された菌として *Pseudomonas* 属のものが多かったが、特定の菌種が繰り返し検出されることはなく、試薬やキットに特定の DNA がコンタミネーションし、それを検出したものではない。また、RT-PCR のコピー数が高かつ

たことから、DNA そのもののコンタミネーションではなく、たとえコンタミネーションであっても形態を保った菌であることが予想された。

真菌は5検体から検出されたが、特筆すべきことは常在菌として存在する *Candida albicans* が全く検出されなかったことである。今回検討した症例は既に多くの抗菌剤が投与された症例であることから、常在菌叢がかなり変化していることが窺えた。

D. 考察

今回の検体は採血後に菌数を変化させないこと、また、採血から検査までに輸送に時間がかかることから凍結して保存した血液を用いた。凍結によって菌数は安定に保たれる反面、凍結融解による菌の破壊も考えられ、今後は新鮮な血液を用いて同じ研究を行う必要性がある。

PCR は感度が高いという誤解が広く一般にもたれている。しかし、PCR は検査にかけられる検体量が数 μ l 以下であり、20ml 程度使って検査が出来る培養法よりも遙かに感度が低い。今回、培養できた菌種を PCR で検出できなかったのはそのためであろう。一方、培養法は今回の結果を見ても明らかのようにグラム陽性菌が培養されることは多いものの、グラム陰性桿菌の培養率が低い。同様の結果は過去の研究でも観察され、報告されている。PCR を基盤とする検査が主流となることは難しいが、培養による検査の補助検査として有用なものであろう。また以上の結果はグラム陰性桿菌が死菌として血中に存

在していることによるものなのか、あるいは生きていますが培養できない (Viable but not culturable) 状態に血中ではなるためなのかは分からない。興味深い問題で、今後さらに研究を進めたい。

真菌の検査で、多くのヒトに常在している *Candida albicans* が検出されないことは特筆に値する。移植患者には予防的に様々な抗菌剤が投与されている。真菌感染症として最も頻度の高い *Candida albicans* をカバーする抗菌剤を予防投与するのは当然の選択で、今回の結果はそれによって常在細菌叢の変化が起こったことを反映するものと考えられる。検査結果が感染症を意味するものか、採血時の皮膚からのコンタミによるものなのかを判定することは困難である。しかし、少なくとも患者の常在菌叢が変化していることは明らかであり、この様な患者に起こる感染の起炎菌を予測するのに役立つであろう。

今後は、新鮮な検体を用いて培養法と PCR 法の比較をより詳細に行うこと、また、PCR の正確性を高めるため SYBR green 法ではなく TaqMan probe 法による検査を確立する必要があると考えられた。

E. 結論

PCR を基盤とする検査法は感度が低いものの、培養法では検出されない菌種が同定され、補助診断としての可能性が示された。今後、更に詳細な培養法と PCR 法の比較検討が必要である。

F. 健康危険情報

- | | |
|---------|------------------|
| なし | H. 知的財産権の出願・登録状況 |
| | 1. 特許取得 |
| G. 研究発表 | なし |
| 1.論文発表 | 2. 実用新案登録 |
| なし | なし |
| 2.学会発表 | 3. その他 |
| なし | なし |

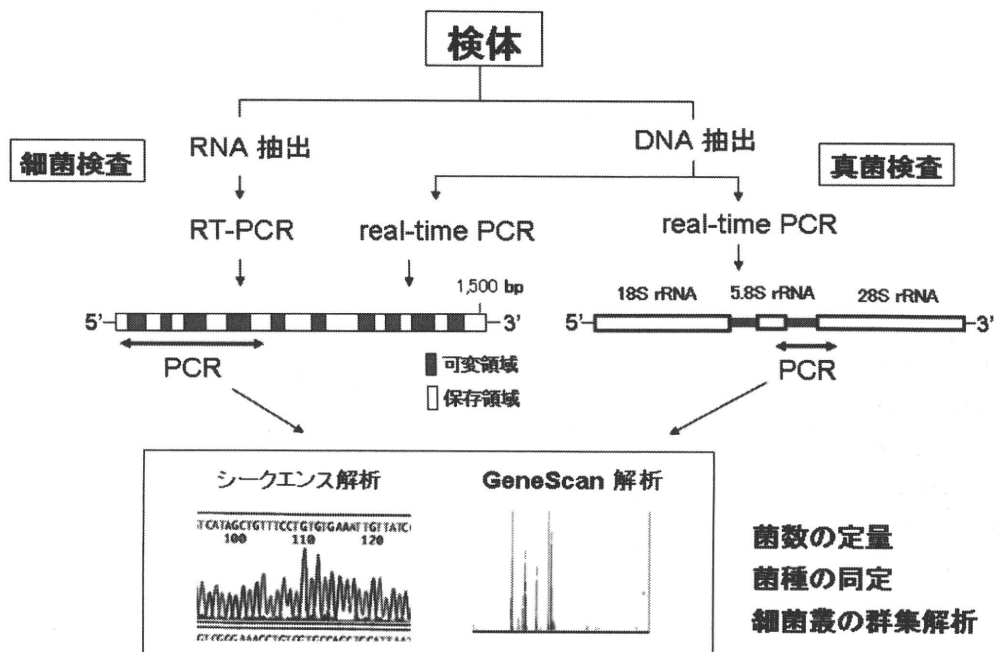


Fig. 1 PCR を基盤とした培養によらない細菌・真菌の同定法

図 1. PCR による細菌・真菌検査の流れ.

表 1. 発熱時の末梢血検査.

細菌	真菌	血液培養
		<i>S. haemolyticus</i>
	<i>Trichosporon sp.</i>	<i>S. epidermidis</i>
		<i>S. epidermidis</i>
		<i>S. mitis / oralis</i>
<i>Serratia proteamaculans</i> <i>Pseudomonas sp.</i>		<i>S. mitis / oralis</i>
<i>Pseudomonas f luprescens</i> <i>P. antarctica</i> <i>P. marginalis</i>	<i>Trichosporon sp.</i> <i>Malassezia sp.</i> <i>Candida rugosa</i>	<i>Helicobacter cinaedi</i>
	<i>Trichosporon sp.</i> <i>Malassezia yamatoensis</i> <i>Candida rugosa</i>	
<i>Serratia proteamaculans</i> <i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Candida rugosa</i> <i>Candida parapsilosis</i>	
	<i>Trichosporon sp.</i>	
<i>Lactococcus lactis</i> <i>Methylobacterium sp.</i>		
<i>Lactococcus lactis</i>		
<i>Pseudomonas sp.</i>		
<i>Afipia broomeae</i> <i>Acinetobacter sp.</i>		
<i>Propionibacterium acnes</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		
他 7 例 全 て 陰 性		

21名の患者血液のPCRならびに血液培養の結果

- : > 50 copies / μ l
- ▒ : < 50 copies / μ l
- : undetectable

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

研究分担者	谷口修一	国家公務員共済組合連合会虎の門病院血液内科・部長
研究協力者	辻正徳	国家公務員共済組合連合会虎の門病院血液内科
研究協力者	西村秀一	国立病院機構仙台医療センター、ウイルスセンター長
研究協力者	西條政幸	国立感染症研究所ウイルス第一部・部長

研究要旨 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 HSV・CMV 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・22 例、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、その内訳はパラインフルエンザ 3 型(PIV-3, 27 例)、RS ウイルス(RSV, 1 例)、ムンプスウイルス(mumps virus, 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。PIV-3 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、PIV-3 の病棟内流行の可能性が考えられた。今後引き続き、計 2 年間の予定で本研究を進めていくこととしている。

A. 研究目的

造血幹細胞移植後は免疫抑制剤使用により強度の免疫抑制状態となる。この状態の際に呼吸器ウイルスやヘルペス属のウイルスに感染すると、致死的な状態に陥ることが知られている。現在までにこれらのウイルスの前向きモニタリングを行った研究は FHCRC からの報告(Blood 115: 2088-2094, 2010)程度である。今回我々は、これらのウ

イルスのモニタリングを経時的に行い、早期診断・予防などに役立てることを目的に、本研究を行った。

B. 研究方法

虎の門病院で 2010 年 6 月から 12 月までに造血幹細胞移植を行った 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

地を仙台医療ウイルスセンターに郵送し、同センターにて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。

(倫理面からの配慮について)

本研究は、「造血幹細胞移植患者における呼吸器ウイルス感染症のウイルス分離検査によるモニタリングと予防に関する研究」と「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活性化の経時的モニタリングと分離ウイルスの薬剤感受性に関する研究」の臨床研究として、国立感染症研究所・仙台医療センター・虎の門病院の3施設の倫理委員会にて承認されており、患者本人から同意を得た上で咽頭拭い液採取を行っている。

C. 研究結果

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 parainfluenza virus type 3 (PIV-3) が27例、RSVが1例、mumps virus 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、流行している可能性が疑われた。PIV3検出例では全例で呼吸器症状を認めており、13例で肺炎を発症していた。肺炎症例のうち6例が肺炎を契機に致命的経過を辿ったが、そのうち4例は他の病原微生物の合併を来し、残りの2例はびまん性の間質性肺炎様の変化を来していた。肺炎にて致命的経過を辿る症例では、発症が移植後早期であること、発症時のリンパ球数が低値である傾向を認

めた。

HSV-1検出症例では、1例のみ難治性口内炎を来していたが、その他の症例では明らかな口内炎などの局所所見を認めなかった。しかし、6例は重症例で検出しており、全身状態の悪化とHSV-1再活性化との関連が考えられた。

Mumps virus 検出例では、唾液腺腫脹を認めており、RSV検出例では上気道症状を認めた。

D. 考察

- 1) 全体でのウイルス検出の頻度は約4割であった。
- 2) PIV-3検出例が多く、病棟内での流行が大いに疑われた。
- 3) PIV-3感染症においては、肺炎症例での転帰に発症時期・発症時のリンパ球数などが予後に影響を与えるかもしれない。
- 4) HSV-1検出例は全身状態の悪化している症例が多く、口内炎などの咽頭の局所症状を来している症例は少なかった。現時点ではHSV1検出の意義は不明である。
- 5) 今回の咽頭拭い液採取ではサイトメガロウイルス(CMV)抗原陽性患者においてもCMVは一例も検出されなかった。

E. 結論

造血幹細胞移植患者において呼吸器ウイルス・HSV・CMVのモニタリングを行い、約4割でウイルスを検出した。各ウイルスと臨床症状との関連に関しては、PIV-3、RSV、mumps virus にかんしては関連性を認めたが、HSV-1に関しては現時点で不明であった。今回の結果を参考に、今後、計2年間本研究を進めていく予定である。

F. 研究発表

論文発表

1. 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)
2. 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

3. 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

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし