

あるYC-11株より短時間で100%致死性を示すこと、VGIIa型北米分離株であるR265株よりも有意に致死性が強いことから、クリプトコックス属のなかでも極めて高い病原性を持つ株であることが伺われた。また、従来から*C. gattii*の病原性は*C. neoformans*より低いとされており、その意味では今回検討に用いた5815株は典型的な株と考えられるが、この株との比較においても如何にJP01株が高病原性であるかが示されるものであろうと考えられる。北米太平洋岸での事例をわが国に直接あてはめることはできないが、仮にJP01株がわが国でその生息域を拡大しているとするならば、大いなる脅威の新興感染症となるものと考えられ、十分な対策が必要であろう。

JP01株の疫学的検討や病態解明、病原因子、感染リスク等の検討は今後他の研究課題に譲るが、本感染症の存在は医療従事者のみならず広く国民へも情報を発信していかねばならぬものとする。

E. 結論

わが国で分離された北米型*C. gattii*株(JP01株)は、マウスの検討においては*Cryptococcus*属の中でも極めて高い病原性を示す株であることが示された。

F 健康危険情報

高病原性とされる北米型*C. gattii*株による感染症が、流行地域(北米太平洋岸)への渡航歴のない日本人に発生した。

2)クリプトコックス属の細胞表層蛋白を標的

とした感染検出法開発に関する検討

A. 研究目的

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クリプトコックス症において、クリプトコックス属の潜伏感染検出を念頭に、クリプトコックス属の細胞壁、分泌蛋白抗体を標的とした検出系の開発について検討した。

B. 研究方法

1) *Cryptococcus* 属の細胞表層蛋白・分泌蛋白の同定

すでに報告したように、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) *C. neoformans* SST クローンに対するモノクローナル抗体の作成((株)ACTGen)

得られたSSTクローンのうち、発現数が最も多かったSSTクローン(*CnHIP1*)に対しモノクローナル抗体を作成した。

・免疫方法

動物:マウス(Balb/c, male, 9w あるいは Balb/c, female, 10w) , 免疫原: *Cryptococcus neoformans* 由来 *CnHIP1* と MPL 遺伝子との融合

遺伝子を導入，発現させた Ba/F3 細胞，細胞免疫原は $1 \times 10^6 \sim 2.5 \times 10^6$ cells/回にて，隔日で 3 回，あるいは 4 回免疫した。

・細胞融合

採取したリンパ球をミエローマ細胞と PEG 法にて融合した。得られたハイブリドーマを HAT 培地にて選択し，コロニーを形成させた。

・ハイブリドーマスクリーニング

免疫原に対する反応性をフローサイトメトリにより検証した。免疫原に反応し，かつ陰性コントロール細胞に対して反応しない候補を選抜し，2 次スクリーニングで得られた候補をクローニングした。

(倫理面からの配慮について)

マウス免疫に際しては，作製発注先(株式会社 ACTGen)の倫理規定に従って実施した。

C. 研究結果

上記免疫原に対して特異反応性を有する 7 クローンを得た(図 3)。そのうち 2 クローンについては陰性コントロール細胞に対して弱く反応することが確認された。そのため，以後 ELISA 系検討には残る 5 クローンの抗体を用いた。一方，これら 5 クローンの抗体を用いて組換え CnHip1p を検出するためのサンドイッチ ELISA 系の構築を試みたが，非特異的な結合が非常に強い結果であった(図 4)。

D. 考察

本検討ではクリプトコックス株(ATCC90112 株)を対象に SST-REX 法を行った結果，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。本年度は CnHip1p に対する抗体を作成し，サンドイッチ ELISA 系の構築を行ったが，現時点では抗体は 5 クローン作製可能であったが，これらを用いた ELISA では非特異的な結合が強い結果であった。この原因は現時点では特定できていないが，ウエスタンブロットによる検出系の検討を行い，応用を目指している。一方，CnHip1p が病原性に関与しているとするならば，本抗体による病原性制御の可能性も考えられ，今後の検討課題として推進することが期待された。

図 3 抗Ba/F3細胞抗体の反応性

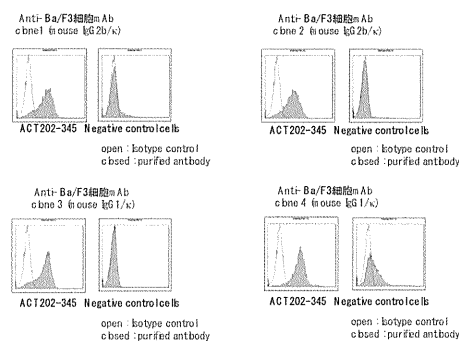
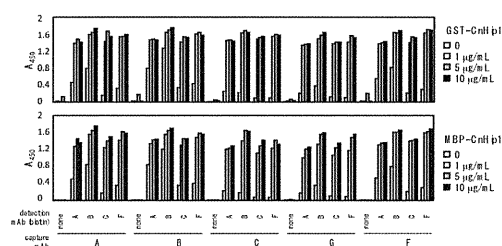


図 4 サンドイッチ系の抗体組合せ検討



E. 結論

CnHip1p に対する抗体として 5 クローンの抗体が得られ，現在サンドイッチ ELISA 系の構築を継続している。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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* 36: 312-314, 2011
- 2) Kobayashi T, Kakeya H, Miyazaki T, Izumikawa K, Yanagihara K, Ohno H, Yamamoto Y, Tashiro T, Kohno S. Synergistic antifungal effect of lactoferrin with azole antifungals against *Candida albicans* and a proposal for a new treatment method for invasive candidiasis. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 64: 292-296, 2011
- 3) Kimura M, Araoka H, Uchida N, Ohno H, Miyazaki Y, Fujii T, Nishida K, Izutsu K, Wake A, Taniguchi S, Yoneyama A. *Cunninghamella bertholletiae* pneumonia showing a reversed halo sign on chest computed tomography scan following cord blood transplantation. *Medical Mycology* (in press, posted online on 22 Nov 2011. DOI: 10.3109/13693786.2011.631153.)
- 4) Gyotoku H, Izumikawa K, Ikeda H, Takazono T, Morinaga Y, Nakamura S, Imamura Y, Nishino T, Miyazaki T, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Yasuoka A, Yaguchi T, Ohno H, Miyazaki Y, Kamei K, Kanda T, Kohno S. A case

of bronchial aspergillosis caused by *Aspergillus udagawae* and its mycological features. *Medical Mycology* (in press, posted online on 13 Dec 2011. DOI: 10.3109/13693786.2011.639036.)

- 5) 大野秀明. 中枢神経系真菌感染症における最近の動向. *最新医学* 66: 997-1004, 2011
- 6) 大野秀明. 髄膜炎, 脳炎. 新版 感染症診療実践ガイド 有効な抗菌薬の使い方のすべて (Medical Practice 臨時増刊号). 文光堂, 352-358, 東京, 2011

2. 学会発表

- 1) 大野秀明. 高病原性クリプトコックス症の現状とその病態. ワークショップ 3, 深在性真菌症の新たな展開—重症例, 難治症例の病態と治療—第 60 回日本感染症学会東日本地方会学術集会, 第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会, 山形, 2011 (10 月)
- 2) 大野秀明, 大川原明子, 田辺公一, 金子幸弘, 梅山隆, 山越智, 泉川公一, 藤井毅, 竹村弘, 岸一馬, 河野茂, 宮崎義継. 日本国内で分離された *Cryptococcus* 属臨床分離株の血清型解析と抗真菌薬に対する感受性動向. 第 60 回日本感染症学会東日本地方会学術集会, 第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会, 山形, 2011 (10 月)
- 3) 田辺公一, 大野秀明, 金子幸弘, 梅山隆, 山越智, 金城雄樹, 杉田隆, 畠山修司, 亀井克彦, 渋谷和俊, 宮崎義継. *Cryptococcus gattii* 国内分離株の病原因子解析. 第 60 回日本感染症学会東日本地方会学術集会, 第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会合

- 同学会, 山形, 2011 (10 月)
- 4) 大野秀明, 宮崎義継. 真菌症診断の現状と課題. 第 128 回 ICD 講習会, 東京, 2011 (10 月)
- 5) 梅山隆, 大野秀明, 田辺公一, 山越智, 宮崎義継. 標準化 MLST 解析法を用いたわが国のクリプトコックス属臨床分離株の分子疫学解析. 第 55 回日本医真菌学会学術集会, 東京, 2011 (10 月)
- 6) 大野秀明, 田辺公一, 金子幸弘, 梅山隆, 山越智, 杉田隆, 畠山修司, 亀井克彦, 渋谷和俊, 宮崎義継. 本邦初の北米流行型 *Cryptococcus gattii* 臨床分離株の実験的病原性解析. 第 55 回日本医真菌学会学術集会, 東京, 2011 (10 月)
- 7) 三原智, 泉川公一, 井手昇太郎, 平野勝治, 峰松明日香, 細萱直希, 永吉洋介, 田代将人, 中村茂樹, 今村圭文, 宮崎泰可, 掛屋弘, 山本善裕, 柳原克紀, 梅山隆, 大野秀明, 宮崎義継, 田代隆良, 河野茂. 長崎大学における *Cryptococcus* の Multilocus Sequence Typing (MLST) を用いた分子疫学解析. 第 55 回日本医真菌学学術集会, 東京, 2011 (10 月)
- 8) 大野秀明, 田辺公一, 梅山隆, 金子幸弘, 山越智, 宮崎義継. クリプトコックス・ガッティ (*Cryptococcus gattii*). 衛生微生物技術協議会 第 32 回研究会, 東京, 2011 (6 月)
- 9) 大野秀明, 田辺公一, 杉田隆, 畠山修司, 金子幸弘, 梅山隆, 山越智, 亀井克彦, 宮崎義継. 国内で初めて分離された VGIIa 型 *Cryptococcus gattii* 株の薬剤感受性と病原性についての検討. 第 59 回日本化学療法学会総会, 札幌, 2011 (6 月)
- 10) 徳山承明, 眞木二葉, 竹村弘, 高木妙子, 田辺公一, 大野秀明, 宮崎義継, 亀井克彦, 長谷川泰弘. 日本人 AIDS 患者に発症したマルネツフェイ型ペニシリウム症の一例. 第 32 回関東医真菌懇話会, 東京, 2011 (5 月)
- 11) 田辺公一, 大野秀明, 金子幸弘, 梅山隆, 山越智, 杉田隆, 畠山修司, 亀井克彦, 宮崎義継. 国立感染症研究所における地域流行型真菌症への対応と現状. 第 32 回関東医真菌懇話会, 東京, 2011 (5 月)
- 12) 梅山隆, 大野秀明, 田辺公一, 山越智, 渡邊浩, 宮崎義継. 福岡県筑後地区周辺におけるクリプトコックス症多発発生例からの分離株の MLST 法による疫学的検討. 第 85 回日本感染症学会総会, 東京, 2011 (4 月)
- 13) 筋野恵介, 樽本憲人, 山口敏行, 前崎繁文, 梅山隆, 大野秀明, 宮崎義継. *Rothia* 属菌により出血性脳梗塞を合併した感染性心内膜炎の 1 例. 第 85 回日本感染症学会総会, 東京, 2011 (4 月)
- 14) 大野秀明, 田辺公一, 金子幸弘, 梅山隆, 山越智, 宮崎義継. 遺伝子診断法を用いた土壌中に生息するヒストプラスマ属検出の試み. 第 85 回日本感染症学会総会, 東京, 2011 (4 月)
- 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

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)

1. 新規 CMV 感染細胞検出法の移植医療への応用に関する研究
2. JC ウイルス感染症の病理学的解析

研究分担者 片野晴隆 国立感染症研究所感染病理部 第一室室長

研究要旨: 移植患者および免疫不全患者に合併するウイルス感染症の診断に関する研究を行い、下記の 2 つの成果を得た。1. サイトメガロウイルス (CMV) 感染細胞の新規検出法である promyelocytic leukemia protein body assay 法 (PML 法) を利用し、造血幹細胞移植後患者 26 症例の血液中 CMV の感染動態を解析した。PML 法の結果とアンチゲネミア, in vitro 培養で異なる結果が得られた例があったが、その原因が CMV の細胞指向性による差である可能性が示唆された。2. 免疫不全患者に発症した進行性多巣性白質脳症 (progressive multifocal leukoencephalopathy, PML) の病理組織において JC ウイルスのコードするタンパクの発現を明らかにした。

研究協力者

- (1) (株) ニッピバイオマトリックス研究所
後藤希代子
- (2) 自治医科大学附属さいたま医療センター
血液科
蘆澤正弘, 神田善伸
- (3) 虎の門病院 血液科
山本久史, 谷口修一
- (4) 国立感染症研究所感染病理部
鈴木忠樹, 佐藤由子, 長谷川秀樹

A. 研究目的

臓器移植患者および免疫不全患者にはさまざまなウイルス感染症が合併する。サイトメガロウ

イルス (cytomegalovirus, CMV) 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ウイルスの一つである。予防的措置として抗ウイルス薬の長期投与が行われるが、抗ウイルス薬の長期投与後には一定の確率で耐性ウイルスが出現する。昨年度までに我々は、CMV が感染する際に細胞内の promyelocytic leukemia protein body (PML) の分布が点状からびまん性に変化することに着目し、この現象を応用した新規 CMV 感染細胞検出法 (PML 法) を開発した。さらに、PML 法が造血幹細胞移植患者の血液中 CMV の感染動態を評価可能であることを確認した (J Med Virol

2012, 84:479-486). しかし, PML 法の結果と CMV アンチゲネミア試験結果が著しく乖離した検体も存在した. 今年度は, この原因を調べる目的で CMV が感染する細胞腫の違いについて検討を行った.

移植患者などの免疫不全者にはまれに JC ウィルス(JCV)が原因とされる進行性多巣性白質脳症 (progressive multifocal leukoencephalopathy, PML) が発症する. JCV は健常者ではほとんど疾患を起こさない常在ウイルスであるが, 免疫不全患者では PML の原因となり, 脳などの中枢神経を広範に破壊し, 痴呆などの重篤な症状を起こす. PML の確実な診断は移植患者のみならず, 免疫不全患者においてはその予後, QOL にきわめて重要である. しかし, JCV は健常者の尿中, 血中にも検出され, PML 診断において最も確実な検査は, 髄液や脳組織内に JC ウィルスが存在することを証明することである. 特に脳組織で JC ウィルス抗原を免疫染色で検出することは直接的に脳内で JC ウィルスが増殖していることを示しており, 最も確度の高い検査法である. 今年度は免疫不全患者に発症した PML の病理組織を用い, JCV のコードするタンパクの発現を詳細に検討することで, 生検組織で確実に JCV を同定できる病理学的検索法の開発を試みた.

B. 研究方法

[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]

対象と試料

造血幹細胞移植後に CMV アンチゲネミア試験陽性と判定された 26 症例の血液検体(EDTA 加血)を用いた. 26 症例(年齢中央値 52 歳, 最年

少 16 歳, 最年長 72 歳, 男女比 15:11)の内訳は急性骨髄性白血病 9 例, 再生不良性貧血 6 例, 急性リンパ性白血病 4 例, 成人 T 細胞性白血病 2 例, びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 3 例, 慢性骨髄性白血病 2 例であり, 移植の種類は骨髄移植 13 例, 末梢血幹細胞移植 8 例, 臍帯血移植 5 例(HLA 適合及び不適合血縁ドナーからの移植が各 3 例及び 4 例)であった.

活動性 CMV の検出と薬剤感受性試験

患者血液から PBMC を分離し, SE/15 細胞と共培養した. SE/15 細胞はその核内に GFP 融合 PML を点状のシグナルとして発現する細胞であり, CMV 感染によりこの GFP のシグナルがびまん性に変化する. この局在変化を指標として PML 陽性細胞数 (PML の局在がびまん性に変化した細胞の数) を計測した.

ウイルス分離とプラークサイズによる増殖能評価

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の有無を評価した. In vitro での増殖能を解析するため, 3-6 代継代目までの分離株を用いて, 14 日後に感染線維芽細胞が形成するプラークサイズを画像解析により計測した.

4. 定量的 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.

CMV ゲノム遺伝子配列解析

血液 DNA または分離ウイルスより得た DNA から PCR で UL128-131 および RL13 遺伝子を増幅し, 各遺伝子断片の DNA 配列を解析した. RL13 遺伝子の配列は株間で大きく異なるため, 約 2kbp 上流よりプライマーウォーキング法で

決定した。

[JC ウイルス感染症(PML)の病理学的解析]

検体

国立感染症研究所感染病理部に保存され、PML と確定診断がされている症例のホルマリン固定パラフィン包埋脳組織検体を用いた。

免疫組織化学

脱パラフィン後、クエン酸バッファーで 121°C 10 分の抗原賦活化処理を行い、リン酸バッファーで洗浄後、一次抗体として抗 VP1 抗体、抗 VP2 抗体、抗 agnoprotein (Agno)抗体(いずれも北海道大学 澤 洋文博士より供与されたウサギポリクローナル抗体)を反応させた。洗浄後、ビオチン標識抗ウサギイムノグロブリン抗体を二次抗体として、三次抗体にはペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを順次反応させ、ジアミノベンチジンで発色後、アルコール脱水、キシレン透徹、封入後、検鏡した。また、免疫染色とは別に各標本はヘマトキシリン・エオジン(HE)染色で全体の形態変化を観察した。

定量的 PCR 法

パラフィン切片からキアゲン社 DNeasy kit で DNA を抽出し、JCV を特異的に検出するプローブ、プライマー (Pal et al. J Virol Meth 135:32-42 (2006)) と QuantiTect Probe PCR Kit (QIAGEN) にて JCV の遺伝子断片の増幅を行った。同時に内在性のコントロールとして beta-actin の検出を行った。

(倫理面からの配慮について)

臨床血液試料を用いた CMV 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匿名化された試料を用いて実施した。

JCV の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の承認を得て行った (承認番号 322)。

C. 研究結果

[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]

PBMC 中の活動性 CMV レベル

造血幹細胞移植後 CMV アンチゲネミア陽性者 26 症例につき PML 法でガンシクロビル(GCV)に対する感受性を検討した結果、6 検体に GCV 感受性低下が認められた。そのうち 5 検体では薬剤耐性と関連する遺伝子変異が検出されず、かつ、分離ウイルスの GCV に対する IC₅₀ は正常範囲内であることから、偽性 GCV 感受性低下と判定した。

これらの検体の PBMC 中の活動性 CMV レベルを検討するため、PML 法での PML 陽性細胞数をゲノムコピー数あたりに換算し、比較した。偽性感受性低下を示した 5 検体では 43±37(陽性細胞数/1×10⁴ゲノムコピー数, Mean±SD)となり、全検体の 13±17(同)に比して高い値を示した。これは、偽性感受性低下を示した検体では単球系細胞でのウイルス増殖能が高い傾向があることを示唆する。一方、CMV 関連感染症を発症した別の 4 症例(5 検体)は 7.3±13(同)であり、単球系細胞でのウイルス増殖が低い傾向にあった。

分離ウイルス株を用いた増殖能の評価

次に、ウイルスが分離された 11 株について線維芽細胞を用い、in vitro での増殖能を評価

した。偽感受性低下と判定した3株の線維芽細胞でのプラークサイズは画像解析ソフト上で $5,035 \pm 1,299$ pixels (Mean \pm SD) となり、試験した11検体の平均値 $12,134 \pm 5,813$ pixels (同) に比して小さかった。この結果から、偽感受性低下株は線維芽細胞での増殖能が低いことが判明した。

プラークサイズに影響を及ぼす UL128-131 遺伝子および RL13 遺伝子のゲノムの配列解析を行ったが、蛋白質の欠失などをもたらす大きな変異は認められなかった。

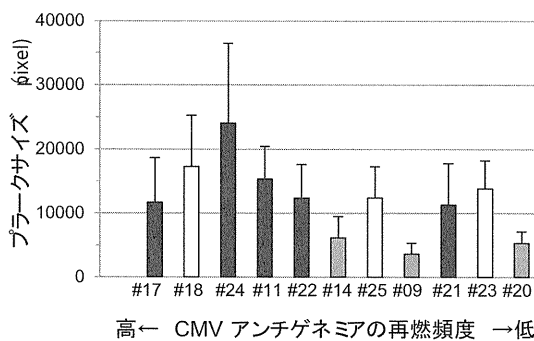


図1 分離ウイルス株の線維芽細胞における増殖能とCMV アンチゲネミア試験の再燃頻度

分離ウイルス株の線維芽細胞でのプラークサイズは株間で大きく異なり、GCV 感受性偽性低下株(灰色カラム)では増殖能が低い傾向が示された。CMV 関連感染症の発症例は黒色カラムで示した。

アンチゲネミア再燃頻度との比較

CMV アンチゲネミア再燃頻度と分離株の線維芽細胞での増殖性を比較したところ、アンチゲネミア再燃頻度の高い症例から得た分離株は大きなプラークサイズを示す傾向が見られた(図1)。CMV 関連感染症を発症した4症例(5検体)由来の分離ウイルスでは大きいプラーク

を形成する傾向 ($11,776 \pm 5,331$ pixels, Mean \pm SD) があり、線維芽細胞での増殖能が高いことが示された。一方、偽性 GCV 感受性低下である3検体はアンチゲネミア再燃のない症例由来であった。

[JC ウイルス感染症(PML)の病理学的解析]

PML の臨床病理疫学

1991 年以降に国立感染症研究所感染病理部に照会のあった PML 確定例 24 例を検討した。発症年齢は 22 歳から 83 歳で平均年齢は 55 歳であった。基礎疾患としては HIV 感染が 29%、非ホジキンリンパ腫が 17%、先天性免疫不全症が 8% などであり、エイズに合併する PML が多いことが示された。(図2)

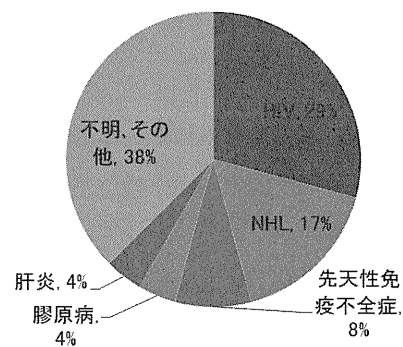


図2 PML 確定例 24 例の基礎疾患

エイズ合併 PML が 29%を占め、最も多い。NHL は non-Hodgkin lymphoma.

PML における JCV のコードするタンパク発現

検体のサイズが比較的大きく脱髄部と非脱髄部のいずれの部位も同一切片上に存在する検体 10 例を用いて、脱髄巢の領域を中心領域、中間領域、辺縁領域に分けて、それぞれの領域内での VP1, VP2, Agno の免疫組織化学の評価を行っ

た。その結果、抗VP1抗体は主な局在は感染細胞の核内であったが(図3)、核外、細胞外に存在する抗原も検出してしまい、病変の中心部付近では感染細胞が明瞭に染色されない傾向があった。一方、ウイルス粒子の裏打ちタンパクであるVP2に対する抗体は、感染細胞の核内のみにシグナルが見られ、細胞外のシグナルはほとんど検出されず、病変中心部でも明瞭な陽性所見を示した。また、細胞質に局在をするagnoに対する抗体は、病変の辺縁部では感染細胞の細胞質に陽性となったが、VP1と同様に病変中心部では感染細胞にほとんど陽性とならず、細胞周囲の間質のみが染色された。

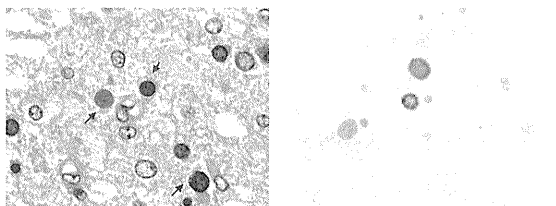


図3. PML脳病変におけるJCV VP1の発現
左: PML病変部のHE染色。膨化した細胞の核内にスリガラス様の封入体が観察される。(矢印)。右: JCV VP1に対する抗体を用いた免疫染色。核内封入体を持つ細胞の核に一致して陽性シグナルが認められる。

定量的PCR

免疫組織化学に供した切片と同じ切片からDNAを抽出しJCVゲノムの定量を行った。定量したゲノム量と免疫組織化学で算出したスコアとの相関を検討したところ、抗VP2抗体による免疫組織化学スコアが $R^2=0.5$ で最もよくJCVゲノムコピー数に相関することが分かった。

D. 考察

これまで CMV 臨床株ウイルスの細胞指向性、

や *in vitro* 増殖性に影響する因子は、UL128-131 遺伝子 および RL13 遺伝子の変異/欠失以外は知られていない。本研究では PML 法が示す患者体内の単球系細胞での CMV 感染性と、分離ウイルスの *in vitro* における CMV 増殖性が必ずしも一致しない例があることが判明した。すなわち、CMV 関連感染症を発症し、アンチゲネミアを繰り返した症例由来の分離株は、線維芽細胞で増殖性が高く、また、PML 法で評価した単球系での CMV の活動性が低い傾向が認められた。*in vitro* 培養での増殖性を評価したウイルス株では UL128-131 遺伝子などに大きな変異は認められず、さらにウイルス分離 1 代目において線維芽細胞での増殖能に差異が観察されたことより、これらの特徴は株本来の性状を反映したものと考えられた。これらの観察結果は、細胞種により異なる指向性を示す臨床分離株が存在する可能性を示す。この点は今後詳細な解析による確認が必要であると思われる。

PML症例の脳組織検体10例を用いた免疫組織化学の結果、VP1、VP2、Agnoのそれぞれの抗体が異なる染色パターンを採ることが明らかになった。VP1に対する抗体は感染細胞の核内に存在するウイルス粒子だけでなく、感染細胞の傷害に伴い核外、細胞外へと放出されるウイルス粒子も検出する。また、細胞質に局在するAgnoに対する抗体も、同様に感染細胞の傷害により細胞外のタンパクも検出する。こうした細胞障害に伴い、局在が変化する染色像は、ときに不明瞭な染色パターンを示し、感染細胞を明確に同定することが困難となる。一方、ウイルス粒子の裏打ちタンパクであるVP2に対する抗体は、ウイルス粒子を検出することができず、感染細胞の核内に存在する

粒子形成過程の抗原のみを検出し、その結果、病変中心部でも明瞭に感染細胞を検出できると考えられた。また、VP2の陽性シグナル量は、JCVゲノムコピー数と相関が見られた。このようなことから抗VP2抗体は従来の抗VP1抗体による免疫組織化学よりも診断精度が高いと考えられるが、病変領域によって、各抗体の染色像に差異があることから、複数の抗体を用いて免疫組織化学解析を行うことが望ましいと考えられた。

E. 結論

造血幹細胞移植後症例の血液を用いて、PML法によるCMVの感染動態の解析を行った。分離ウイルスの性状解析と比較すると、細胞種により異なる指向性を示すウイルス株が存在し、単球系細胞中でのCMV感染性が他の細胞(線維芽細胞、上皮細胞等)とは異なる可能性が示唆された。

PML脳病変においてJCVのウイルスタンパクの発現を明らかにした。脳生検検体をもちいたJCV感染の確定診断にはウイルス抗原陽性細胞の検出が必要不可欠であるが、VP1、VP2、Agnoの3つのウイルスタンパク質に対する抗体を用いることにより、小さな検体でより確度の高い診断ができることが考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ogawa-Goto K, Ueno T, Oshima K, Yamamoto H, Sasaki J, Fujita K, Sata T, Taniguchi S, Kanda Y,

Katano H: Detection of active human cytomegalovirus by the promyelocytic leukemia body assay in cultures of PBMCs from patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation, J Med Virol 84:479-486, 2011

- 2) Fukumoto H, Kanno T, Hasegawa H, Katano H: Pathology of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection, Front Microbiol 2:175, 2011

2. 学会発表

- 1) 佐々木純, 上野智規, 片野晴隆, 佐多徹太郎, 後藤希代子:PML法を用いた上皮細胞間におけるHCMV臨床分離株の感染経路の検討:第26回ヘルペスウイルス研究会,大阪(2011.06)
- 2) Sasaki, J. Ueno, T., Katano, H., Sata, T., Ogawa-Goto, K.: Analysis for cell-to-cell spread of HCMV in epithelial cells by using the PML assay: The IUMS2011 Congress, XV, International Congress of Virology, Sapporo, Japan (2011.09)

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

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

研究要旨:21 例の小児造血細胞移植患者において、週 1 回の CMV, EBV, HHV-6 のリアルタイム PCR を行い、移植造血細胞種類による再活性化の頻度、重症度を検討し、同時に CMV, HHV-6 に対する特異的細胞性免疫の検討を行った。CMV, EBV は非血縁骨髄、血縁骨髄の順で再活性化を認めたが、臍帯血では殆ど認めなかった。一方、HHV-6 は臍帯血、非血縁骨髄で再活性化が多く、血縁骨髄では少なかった。特異的細胞性免疫では臍帯血のみ CMV, HHV-6 とも低値であり、重症化の要因と考えられた。

研究協力者

- (1) 東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学
矢部普正
- (2) 東海大学医学部付属病院臨床検査科
土田文子

A. 研究目的

造血細胞移植(SCT)においては、移植前処置後の汎血球減少、GVHD 予防の免疫抑制剤などの影響で免疫再構築までに長期の免疫不全状態が生じる。この間、既感染であった主にヘルペス属のウイルスが再活性化し、間質性肺炎などの重症感染症を起こすことがある。これらのウイルス対策として、リアルタイム PCR を用いた迅速診断と治療介入を行い、同時にウイルス特異的細胞性免疫の再構築を検討した。

B. 研究方法

対象は年齢が 0.5~26 歳(中央値 7 歳)、男性 11 例、女性 10 例であった。原疾患は急性リンパ白血病(ALL)が 5 例、急性骨髄性白血病(AML)が 4 例、若年性骨髄単球性白血病、神経外細胞腫がそれぞれ 1 例、再生不良性貧血が 7 例(先天性 4 例、後天

性 3 例)、ムコ多糖症 2 例、先天性免疫不全 1 例であった。移植ドナーは血縁骨髄が 6 例、非血縁骨髄が 10 例、非血縁臍帯血が 5 例であった。

移植前処置は原疾患によって選択し、GVHD 予防は HLA 一致同胞間移植では 10 歳未満でシクロスポリン(CyA)単独、10 歳以上あるいは非血縁臍帯血移植では短期メソトレキセート(MTX)と CyA の併用とし、非血縁者間骨髄移植では短期 MTX とタクロリムスの併用とした。

CMV, EBV, HHV-6 のリアルタイム PCR は末梢血を用いて週 1 回行い、リンパ球の回復後に CMV, HHV-6 の各抗原および IL-2 を刺激としてリンパ球幼若化試験を行った。HLA-A0201, HLA-A2402 を持つ患者においては、テトラマー解析による CMV 特異的細胞傷害性 Tリンパ球の回復を検討した。

(倫理面への配慮)

移植についてのインフォームドコンセントはヘルシンキ宣言に基づいて行い、文書での同意を得た。リアルタイム PCR については施設 IRB に申請し、文書による同意を得た。

C. 研究結果

CMV 再活性化は血縁骨髄移植の 6 例中 3 例、非

血縁骨髓移植の 10 例中 6 例, 非血縁臍帯血移植の 5 例中 1 例に認めた. 再活性化例でのリアルタイム PCR のピーク値の中央値は血縁骨髓移植で 3588 copy/ml, 非血縁骨髓移植で 1160 copy/ml, 非血縁臍帯血移植で 448 copy/ml であった.

EBV 再活性化は血縁骨髓移植の 6 例中 3 例, 非血縁骨髓移植の 10 例中 9 例に認めたが, 非血縁臍帯血移植では認めなかった. 再活性化例でのリアルタイム PCR のピーク値の中央値(標準偏差)は血縁骨髓移植で 7450 copy/ml, 非血縁骨髓移植で 8200 copy/ml であった.

HHV-6 の再活性化は血縁骨髓移植の 6 例中 4 例, 非血縁骨髓移植の 10 例中 8 例, 非血縁臍帯血移植の 5 例中 4 例に認めた. 再活性化例でのリアルタイム PCR のピーク値の中央値は血縁骨髓移植で 36 copy/ml, 非血縁骨髓移植で 1665 copy/ml, 非血縁臍帯血移植で 13036 copy/ml であった.

CMV に対する幼若化反応(stimulation index; SI) は骨髓移植後 4 ヶ月以降に上昇し, 検査した 7 例中 6 例で SI が 5 以上となったが, 臍帯血移植では移植後 3 ヶ月以降を通じて SI が 5 以上に達した例はなかった. 一方, HHV-6 に対する SI は, 特に骨髓移植例で移植後 2 ヶ月から上昇し, 検査した 13 例中 10 例で 5 を超えたが, 臍帯血移植では移植後 3 ヶ月までで 5 を超えたのが 5 例中 1 例のみであった. テトラマー解析による CMV 特異的 CTL は, CMV に対する幼若化反応の SI が 5 以上の例で検出可能であった.

D. 考察

今回の検討で臍帯血移植例においては CMV, EBV の再活性化が少ないものの, HHV-6 は高率に再活性化を認め, しかもリアルタイム PCR のピーク値は骨髓移植の場合よりも高値に達しやすいことが明らかとなった. またウイルス抗原に対する特異的幼若化反応では, 骨髓移植では CMV に対する細胞性免疫は移植後 4 ヶ月以降に獲得され, HHV-6 に対しては移植後 2 ヶ月で陽性になる例が多いのに対し, 臍帯血移植では一部の例を除いて特異的細

胞性免疫の獲得が遅延することが明らかになった. 今後, 臍帯血移植における重症ウイルス感染の対策として, 早期の抗ウイルス剤の投与に加え, in vitro での特異的 CTL の培養などを考慮すべきかもしれない.

E. 結論

移植後のヘルペス群ウイルスの再活性化のモニタリングとして, リアルタイム PCR は極めて有用であり, ウイルス抗原添加リンパ球幼若化試験は CMV, HHV-6 の双方でウイルス特異的細胞性免疫の再構築の指標となる可能性が示された.

F. 健康危険情報

特記事項なし.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, 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* 46(7):1023-5, 2011
- 2) 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* 46(8):1148-50, 2011
- 3) Morio T, Atsuta Y, Tomizawa D, Nagamura-Inoue T, Kato K, Ariga T, Kawa K, Koike K, Tauchi H, Kajiwara M, Hara T, Kato S. Outcome of unrelated umbilical cord blood transplantation in 88 patients with primary immunodeficiency in Japan. *Brit J Haematol* 154(3):363-72, 2011
- 4) Kato K, Yoshimi A, Ito E, Oki K, Hara J,

- Nagatoshi Y, Kikuchi A, Kobayashi R, Nagamura-Inoue T, Kai S, Azuma H, Takanashi M, Isoyama K, Kato S; for the Japan Cord Blood Bank Network. Cord Blood Transplantation from Unrelated Donors for Children with Acute Lymphoblastic Leukemia in Japan: The Impact of Methotrexate on Clinical Outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant*. Dec 17(12):1814–21, 2011
- 5) Yahata T, Takanashi T, Muguruma Y, Ibrahim AA, Matsuzawa H, Uno T, Sheng Y, Onizuka M, Ito M, Kato S, Ando K. Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. *Blood* 118(11):2941–50, 2011
 - 6) Yagasaki H, Kojima S, Yabe H, Kato K, Kigasawa H, Sakamaki H, Tsuchida M, Kato S, Kawase T, Morishima Y, Kodera Y; Japan Marrow Donor Program. Acceptable HLA-mismatching in unrelated donor bone marrow transplantation for patients with acquired severe aplastic anemia. *Blood* 118(11):3186–90, 2011
 - 7) Kawaguchi AT, Aokawa J, Yamada Y, Yoshida F, Kato S, Kametani Y. Effect of Liposome-Encapsulated Hemoglobin on Antigen-Presenting Cells in Mice. *Artif Organs* (in press)
 - 8) Okada M, Yoshihara S, Taniguchi K, Kaida K, Ikegame K, Kato R, Tamaki H, Inoue T, Soma T, Kai S, Kato S, Ogawa H. Intrabone Marrow Transplantation of Unwashed Cord Blood Using Reduced-Intensity Conditioning Treatment: A Phase I Study. *Biol Blood Marrow Transplant* (in press)
 - 9) Atsuta Y, Morishima Y, Suzuki R, Nagamura-Inoue T, Taniguchi S, Takahashi S, Kai S, Sakamaki H, Kouzai Y, Kobayashi N, Fukuda T, Azuma H, Takanashi M, Mori T, Tsuchida M, Kawase T, Kawa K, Kodera Y, Kato S; for the Japan Marrow Donor Program and the Japan Cord Blood Bank Network. Comparison of Unrelated Cord Blood Transplantation and HLA-Mismatched Unrelated Bone Marrow Transplantation for Adults with Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* (in press)
 - 10) Asano T, Kogawa K, Morimoto A, Ishida Y, Suzuki N, Ohga S, Kudo K, Ohta S, Wakiguchi H, Tabuchi K, Kato S, Ishii E. Hemophagocytic lymphohistiocytosis after hematopoietic stem cell transplantation in children: A nationwide survey in Japan. *Pediatr Blood Cancer* (in press)
 - 11) Koike T, Yanagimachi N, Ishiguro H, Yabe H, Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, Takakura H, Kato S. High Incidence of Radiation-Induced Cavernous Hemangioma in Long-Term Survivors Who Underwent Hematopoietic Stem Cell Transplantation with Radiation Therapy during Childhood or Adolescence. *Biol Blood Marrow Transplant* (in press)
 - 12) Kanda J, Hishizawa M, 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. Impact of graft-versus-host disease on outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T-cell leukemia: a retrospective cohort study. *Blood* (in press)
 - 13) Hyodo H, Ishiguro H, Tomita Y, Takakura H, Koike T, Shimizu T, Morimoto T, Yabe H, Yabe M, Kojima S, Shiraiishi K, Minemura T, Kato S. Decreased serum testosterone levels in long-term adult survivors with fatty liver after childhood stem cell transplant. *Biol Blood*

Marrow Transplant (in press)

2. 著書

- 1) 加藤俊一. 造血細胞移植. 衛藤義勝編:ライソゾーム病. 診断と治療社, 東京, pp93-99, 2011
- 2) 加藤俊一. ムコ多糖症に対する造血幹細胞移植の現状と課題(骨髄, 臍帯血, 末梢血). 折居忠夫編:ムコ多糖症 UPDATE.イーエヌメディックス, 東京, pp212-218,2011

3. 学会発表

- 1) 加藤俊一. 造血幹細胞移植の現状と展望. 第28回日本医学会総会. 東京. 2011.4.
- 2) Kato S, et al. High incidence of radiation-induced cavernous hemangioma (RICH) in long-term survivors who underwent blood and marrow transplantation (BMT) in childhood.

ESLCCC2011, Amsterdam, Sept, 2011.

- 3) Kato S, et al. Early and quantitative assay to detect HHV-6 viremia and evaluation of cellular response specific against HHV-6 after hematopoietic stem cell transplantation. The Joint Meeting of The XVIIth International Symposium on Gnotobiology and The XXXIVth Congress of the Society for Microbial Ecology and Disease, Yokohama, Nov, 2011.

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)

『移植医療の発展に伴って多様化する感染症の解析と制御』

肝移植後慢性期の成人および小児例における混合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流行が話題となった 2009 年季に続いて, 肝移植後慢性期の成人および小児を対象に, 混合インフルエンザ・ワクチン接種の安全性と効果を検討した. A 型(2009H1N1 型, H3N2 型)では成人群・小児群ともに接種後の有効抗体保有率・幾何平均抗体価は良好で, 接種後の罹患もほとんどなかった. 一方, B 型では特に小児で接種後の有効抗体保有率・抗体陽転率・幾何平均抗体価ともに低く, 接種後の罹患例も目立った. 小児の 1 例に, 接種後一過性の肝機能異常を認めたが, 拒絶反応の惹起はなかった.

A. 研究目的

生涯にわたって免疫抑制療法下にある臓器移植患者では, 市中感染症罹患の危険が高く, 感染後に重篤化する危険も高い. このため, 欧米を中心に安全性とのバランスを考慮した予防接種が推奨されている. しかしながら本邦では, 免疫抑制下の能動免疫誘導の安全性と効果についての情報が充分ではない. 肝移植後慢性期の成人・小児症例を対象に, 混合インフルエンザ・ワクチンを用いて, こうした病態のモデルとしての解析を行った.

B. 研究方法

2010-2011 年季において, 肝移植後慢性期の成人(16 歳以上)および小児を対象に, 混合インフルエンザ・ワクチン接種を行った. 接種基準は, 1) 肝移植後 1 年以上を経過, 2) 原疾患の再発および活動性拒絶反応がない, 3) IgG, IgA, IgM, リンパ球サブセット, リンパ球幼弱化試験が正常, 4) 本人あるいは保護者が接種を希望していることとした. 最終的に, 成人 16 例(接種時年齢 16.3-70.0 歳, 中央値 53.7 歳), 小児 15 例(接種時年齢 2.6-13.8 歳, 中央値 6.4 歳)が接種を受けた.

男女比は成人群 5:11, 小児群 8:7(有意差なし), 移植時の年齢は成人群 3.9-60.0(中央値 47.5)歳,

小児群 0.3-5.6(中央値 1.3)歳, 移植後の経過期間は成人群 3.8-13.3(中央値 6.2)年, 小児群 1.1-12.4(中央値 3.7)年($p=0.022$)と小児群が短かった。接種時の免疫抑制剤は成人群でタクロリムスまたはシクロスポリン単剤が 7 例(6 対 1), タクロリムスと MMF またはプレドニン併用が 4 例(3 対 1), タクロリムスとプレドニンに MMF またはアザチオプリンの併用が 5 例(3 対 2), 小児群ではタクロリムスまたはシクロスポリン単剤が 13 例(12 対 1), タクロリムスと MMF またはプレドニン併用が 2 例(1 対 1)と成人群で多剤併用例が多かった。接種時のタクロリムストラフ値は成人群で 0.6-7.3(中央値 3.9)ng/ml, 小児群で 0.9-6.8(中央値 2.4)ng/ml と有意差を認めなかった。

ワクチン接種量は、健常例と同様に、1-5 歳児で 0.2ml×2 回(3 週間隔), 6-12 歳児で 0.3ml×2 回, 13 歳以上で 0.5ml×1 回の皮下注射とした。HI 抗体価の測定はワクチン接種前後の定期受診時とし、接種前後のタイミングは中央値で成人群 0.3/5.4 週, 小児群で 1.1/5.3 週となった。

抗体保有率(HI 抗体価 ≥ 40 倍の症例の比率), 抗体陽転率(接種前後の HI 抗体価 <10 倍/ ≥ 40 倍, または HI 抗体価上昇率 ≥ 4 倍の症例の比率), 抗体変化率(幾何平均抗体価(GMT) の変化率)を測定し、同時に接種の副反応, 拒絶反応, インフルエンザ罹患の有無を追跡した。

(倫理面からの配慮について)

臓器移植患者の慢性期におけるインフルエンザ・ワクチン接種は、WHO の推奨にも挙げられているが、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、対象患者と小児の場合には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

ワクチン接種前後における H1N1 型抗体保有率の変化を図 1 に示す。成人群・小児群ともに、有効抗体保有率はワクチン接種により上昇したが、小児群では有意差を認めた($p=0.008$)ものの、成人群では接種前の有効抗体保有率が高いため前後に有意差を認めず($p=0.25$)、成人群の前値は小児群との間に有意差を認めた($p=0.012$)。

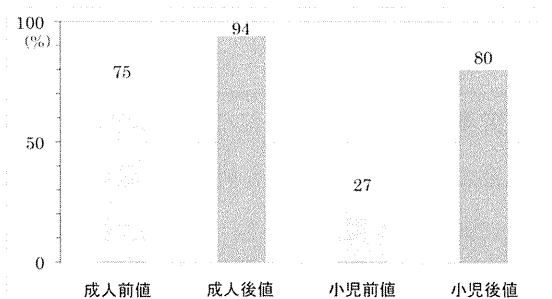


図 1. 成人群と小児群における接種前後の H1N1 型抗体保有率の推移

H3N2 型抗体保有率も、成人群・小児群ともに接種後に上昇した(図 2)ものの、成人群では有意差を認めた($p=0.008$)のに対し、小児群では有意差に至らなかった($p=0.063$)。これは、小児群の前値がやや高い傾向にあることと関連していると考えられた。成人群と小児群との間には、接種前後とも有意差はなかった。

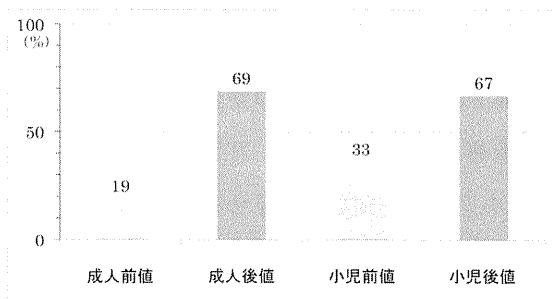


図 2. 成人群と小児群における接種前後の H3N2 型抗体保有率の推移

B 型抗体保有率は、成人群では接種後に上昇したものの($p=0.031$)、小児群では前値が高いこともあって上昇を認めず($p=0.727$)、むしろ低下傾

向であった(図3)。接種前値・後値ともに、成人群と小児群との間に有意差は認めなかった。

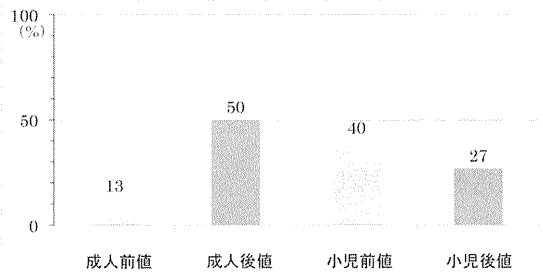


図3. 成人群と小児群における接種前後のB型抗体保有率の推移

ワクチンのそれぞれの型における成人群と小児群の接種後抗体陽転率を図4に示す。H1N1型では成人群の、H3N2型とB型では小児群の前値がやや高いことを反映して抗体陽転率が下がったが、特に小児ではH1N1型やH3N2型と比べて、B型で陽転率が低い傾向にあった。いずれの型においても成人群と小児群との間に有意差はなかった。

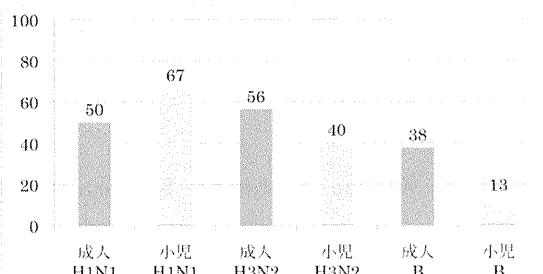


図4. 型別にみた成人群と小児群における接種後の抗体陽転率

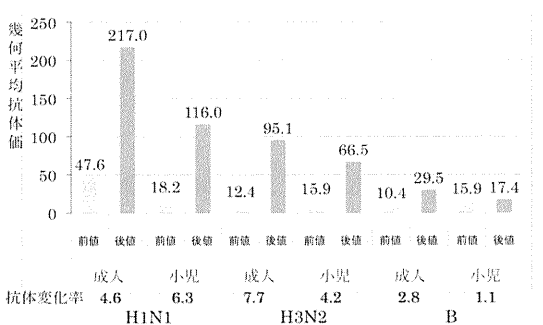


図5. 型別にみた成人群と小児群における接種前後の幾何平均抗体価と変化率

ワクチン接種前後の幾何平均抗体価とその変化率を図5に示す。全体として接種後の幾何平均抗体価は小児よりも成人で高い傾向を示し、H1N1型を除いてその変化率も成人の方が高か

ったが、いずれの型においても有意差はなかった。接種後の幾何平均抗体価は、H1N1型、H3N2型、B型の順で低くなる傾向を示した。

ワクチン接種後の同年季におけるインフルエンザへの罹患は、成人群には見られなかったものの、小児群に4例(A型1例、B型3例)認めた($p=0.043$)が、いずれも重症化は見られなかった。接種後の有害事象としては、小児群に1例一過性の肝酵素上昇を認め、入院観察を必要とした。接種後の拒絶反応は両群ともに認めなかった。

D. 考察

肝移植後患者における季節性インフルエンザ・ワクチン接種へのHI抗体価反応は、健常人や非免疫抑制下の肝硬変患者と比べて低いとする報告のある一方、健常人と差がないとする報告もある。本研究班の初年度に報告した肝移植後小児における結果では、連投の影響が除外できず、新規抗体陽性率は必ずしも高くないものの、非免疫抑制下の対照群と比べて差を認めなかった。

一方で、次年度に報告した肝移植後小児における2009新型H1N1インフルエンザ・ワクチン初回接種への反応は、接種後の有効抗体保有率が欧米の報告と比べていずれも低いものの、非免疫抑制下の対照群と比べて差を認めなかった。2010-2011年季は2009H1N1インフルエンザ・ワクチンの二年季目であったが、成人群で前年季接種(または罹患)の影響が強く残っていることが示唆されたものの、接種後の有効抗体保有率は成人群・小児群ともに前年季よりむしろ良好であった。

季節性H3N2型についても、前年季接種(または罹患)の影響が否定できないものの、成人群・

小児群ともにやはり前年季より良好であった。一方で、季節性B型については、成人と比べて小児群の反応が不良で、例年のように Vaccine Efficacy Cut-off (被接種者の70%以上がHI抗体価40倍以上)を大きく下回るものであった。こうした背景が、その後のB型インフルエンザへの罹患に結びついた可能性がある。

一般に、インフルエンザ・ワクチン接種に対する反応は、GMT でみると成人よりも小児で、また成人では高齢者で低いと報告されている。本研究では、成人例で免疫抑制剤多剤併用例が多いものの、移植からの経過期間は長いなど、必ずしも同条件ではなかったが、GMT ではやはり成人群で高い傾向にあった。高齢の影響や、免疫抑制の種類や強度、移植からの経過期間の影響については、対象数が少ないため解析できなかった。

本研究では、接種後に一致して肝酵素の上昇を1例に認め、入院観察を必要とした。拒絶反応の診断には至らなかったものの、今後予防接種全般の安全性についての重要な情報となるものと考えられた。

E. 結論

2010-2011年季において、肝移植後慢性期の成人および小児を対象に、混合インフルエンザ・ワクチン接種の安全性と効果を検討した。成人群で移植後の経過期間が長く、免疫抑制剤の多剤併用例が多いなどの条件の違いがあったが、A型(2009H1N1型、H3N2型)では成人群・小児群ともに接種後の有効抗体保有率・幾何平均抗体価は良好で、接種後の罹患もほとんどなかった。一方、B型では特に小児で接種後の有効抗体保有率・抗体陽転率・幾何平均抗体価ともに低く、

接種後のB型インフルエンザ罹患例が目立った。小児の1例に、接種後一過性の肝機能異常を認めたが、拒絶反応の惹起は認めなかった。

F. 健康危険情報

確定的なものなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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: 112-116, 2011
- 2) Torii, Y., Kimura, H., Ochi, N., Kaneko, K., Ando, H., Kiuchi, T., Ito, Y.: Immunogenicity of inactivated 2009 H1N1 influenza vaccine in pediatric liver transplant recipients. *Vaccine* 29: 4187-4189, 2011
- 3) Ito, Y., Kawabe, S., Kojima, S., Nakamura, F., Nishiyama, Y., Kaneko, K., Kiuchi, T., Ando, H., Kimura H.: Identification of Epstein-Barr virus-infected CD27+ memory-B cells in liver or stem cell transplant patients. *J Gen Virol* 92: 2590-2595, 2011
- 4) Duvoux, C., Kiuchi, T., Pestalozzi, B., Busuttil, R., Miksad, R.: What is the role of adjuvant therapy after liver transplantation for hepatocellular carcinoma? *Liver Transpl* 17: S147-158, 2011
- 5) Ishigami, M., Onishi, Y., Ito T., Katano, Y., Ito, A., Hirooka, Y., Kiuchi, T., Goto, H.: Anti-hepatitis B surface immunoglobulin reduction in early postoperative period after liver transplantation

in hepatitis B virus-positive patients. Hepatol Res 41: 1189-1198, 2011

- 6) 伊藤孝司, 大西康晴, 木内哲也: わが国における脳死肝移植の現状. 医学のあゆみ 237: 408-412, 2011

2. 学会発表

- 1) 石上雅敏, 大西康晴, 伊藤孝司, 山口尚子, 坪井千里, 片野義明, 木内哲也, 後藤秀実: 当院における HBV 関連肝移植症例における再発予防戦略: 第 29 回日本肝移植研究会, 仙台(2011. 7)
- 2) 石上雅敏, 木内哲也, 後藤秀実: 当院における肝移植後原疾患再発対策: 第 39 回日本臓学会西部会, 岡山(2011. 12)
- 3) 鈴木道雄, 鳥居ゆか, 河野好彦, 木村宏, 伊藤嘉規: 肝移植後成人および小児例におけるインフルエンザワクチン接種の有効性・安全性についての検討: 第 15 回日本ワクチン学会学術集会, 東京(2011. 12)
- 4) Ito, T., Onishi, Y., Ishigami, M., Kiuchi, T.: Osteoporosis before and after adult living donor liver transplantation: 2011 Joint International Congress of ILTS, ELITA, and LICAGE, Valencia, Spain (2011. 6)

- 5) Ishigami, M., Onishi, Y., Ito, T., Katano, Y., Kiuchi, T., Goto, H.: Risk factors of LDLT in patients with liver cirrhosis in recent era of comprehensive indication: significance of recipient age and preoperative fasting blood glucose: 2011 Joint International Congress of ILTS, ELITA, and LICAGE, Valencia, Spain (2011. 6)

- 6) 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 eight years after domino liver transplantation: VIIIth International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy, Kumamoto, Japan (2011. 11)

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)

移植後 EBV 関連リンパ増殖症におけるウイルス感染細胞同定

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:臓器・造血幹細胞移植後における免疫抑制状態では、しばしば Epstein-Barr Virus (EBV)関連リンパ増殖症が発症する。今回、移植後 EBV-DNA 高値を認め EBV 関連リンパ増殖症が疑われた患者に対して、我々が独自に開発した flowcytometric *in situ* hybridization (FISH)法を用い血液検体中の EBV 感染細胞の同定と定量を試みた。対象は臓器・造血幹細胞移植後にリアルタイム PCR 法により EBV-DNA の高値を認めた 8 例。内訳は生体間肝移植 4 例、骨髄移植 3 例、臍帯血移植 1 例。FISH 法により、末梢血単核球の表面抗原染色および核内の EBER 染色を連続して行った後、flow cytometry にて解析した。全例で感染細胞の定量が可能であり、0.05~0.78%の末梢血リンパ球が EBV 陽性であった。感染細胞の同定が可能であった症例では、CD20 陽性 B 細胞に EBV の感染を認めた。感染細胞の細胞表面抗原フェノタイプからメモリー B 細胞が感染の主体であると考えられた。骨髄移植後の 1 例ではリツキシマブを使用したところ EBV-DNA は減少した。本法は移植後リンパ増殖症の早期診断、治療法の決定につながる有用な方法と考えられた。

A. 研究目的

移植後リンパ増殖症は、臓器・造血幹細胞移植後に、細胞性免疫抑制の結果、Epstein-Barr Virus (EBV) 感染 B 細胞が多または単クローン増殖するものである。造血幹細胞移植に合併する頻度は同種骨髄移植全体では 1%未満と低い。T 細胞除去を行った場合 12-24%と極めて高い。本症は、発熱・リンパ節腫張・肝脾腫・下痢・下血など非特異的症状で発症することも多く、また深部リンパ節腫張は見逃されやすい

ため、臨床診断は困難である。従来より、移植後リンパ増殖の確定診断には、リンパ節生検材料を用いた病理組織診断が主に行われてきたが、同法は侵襲が強く、必ずしも生検できるリンパ組織が得られないという欠点があった。近年では、末梢血液中の EBV-DNA 定量により、移植後リンパ増殖症の早期診断をする試みがなされている。移植後の細胞免疫抑制状態の持続により、EBV が再活性化し、血液中の EBV-DNA が無症候性に増加していることもある。