

最近、我々が確立したフローサイトメトリーと *in situ* hybridization 法を組み合わせ EBER 陽性細胞と表面抗原の多重染色を同時に行う方法：flowcytometric *in situ* hybridization (FISH)法は、末梢血を用い非侵襲的に EBV 感染細胞の定量と感染細胞のフェノタイプを同定できる画期的なものである。これまで、移植後リンパ増殖症における EBV 感染細胞率や詳細な感染細胞分画は不明であった。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、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。

## B. 研究方法

症例は EBV 関連移植後リンパ増殖症 4 例(骨髄移植後 3 例、臍帯血移植後 1 例)、移植後高 EBV 血症 4 例(いずれも生体肝移植後)、末梢血より単核球を分離し、以下の手順で、FISH 法による EBV 感染細胞の定量・同定を行った。

- 1) 蛍光色素 PE もしくは PC5 標識した単クローン抗体を用いて細胞表面抗原を標識。表面抗原抗体として、CD3, CD4, CD8, CD19, CD16, CD20, CD27, CD56, IgD などを用いた。
- 2) 4%パラホルムアミド/1%酢酸処理(室温 40 分)にて細胞を固定。
- 3) Tween20/PBS で 10 分間処理し細胞および核膜に孔をあける。
- 4) EBER 特異的 FITC 標識 PNA probe(Dako) と 56°C1 時間 hybridization 反応。
- 5) 抗 FITC Alexa Fluor 488 標識抗体を用い蛍光強度を増幅。
- 6) BD FACS Calibur にて flow cytometry によ

り測定。

同時に末梢血単核球から DNA を抽出し、定量 PCR 法により EBV-DNA の定量を行った。

(倫理面からの配慮について)

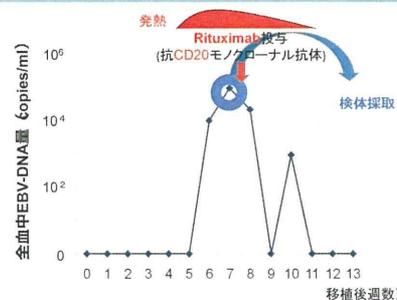
本研究は、患者に対して診断的検査を行うのみで、治療的介入は行わない。また、ヒトの遺伝子解析は行わないため、ヒト遺伝子研究には該当しない。

参加症例に対しては、平成 15 年 7 月 30 日付厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針」に則り、十分な説明を施した上で、患者および親権者よりインフォームドコンセントを得た。さらに検体の採取法、患者情報の取り扱いについても倫理規定を遵守し、個人情報の擁護に努めることとした。また本研究は、名古屋大学医学部倫理委員会にて承認されている。

## C. 研究結果

1. 神経芽腫にて血縁同種(8座ミスマッチ)骨髄移植後の 7 歳女児例の経過を示す。

### 症例 1. 7歳女児 神経芽腫にて血縁同種(8座ミスマッチ)骨髄移植後

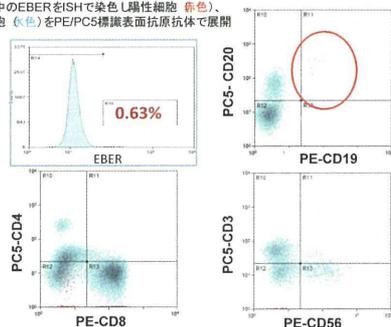


移植後 5 週目より発熱および全血中 EBV-DNA 量の増加を認めた。抗 CD20 モノクローナル抗体であるリツキシマブ投与により症状が消失し、EBV-DNA 量も減少した。

この症例での、FISH 法による感染細胞の定量と EBV 感染細胞のフェノタイプの結果を以下に示す。感染細胞率は 0.63% で、感染細胞は CD3 陰性、CD56 陰性で CD19 および CD20 陽性の B 細胞であった。

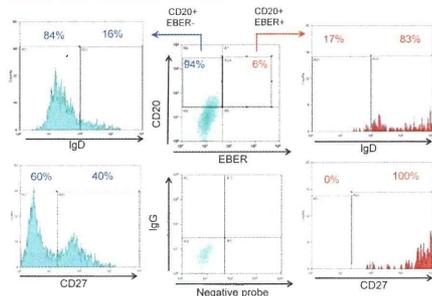
### 症例 1 7歳女児 FISH法によるEBV感染細胞の定量と同定

単核球中のEBERをISHで染色し陽性細胞(赤色)、陰性細胞(青色)をPE/PC5標識表面抗原抗体で展開



更に、CD20 陽性 B 細胞を EBER 陽性すなわち EBV 感染分画と陰性の非感染分画に分け、IgD および CD27 の発現プロフィールを調べた結果、以下のごとく IgD 陽性細胞が 83%、CD27 陽性細胞が 100%であった。

### 症例 2 1歳女児 若年性骨髄球性白血病にて骨髄移植後1カ月



2. 対象とした 8 例の臓器・造血幹細胞移植後患者の簡単なプロフィールと、FISH 法による末梢血中の EBV 感染細胞数、および EBER 陽性細胞の IgD/CD27 の表面抗原フェノタイプをまとめた。

### FISH法にEBV感染細胞の定量と細胞同定

症例	年齢	性別	先行治療	移植後	EBV-DNA 出現後	単核球中感染細胞率	EBER+細胞	
							IgD+	CD27+
1	7	F	骨髄移植	1M	1M	0.63%	56%	80%
2	1	F	骨髄移植	3M	1M	0.10%	83%	100%
3	6	F	骨髄移植	10M	1M	0.05%	58%	100%
4	48	F	臍帯血移植	37M	6M	0.28%	48%	49%
5	1	M	生体肝移植	9M	8M	0.39%	81%	99%
6	2	F	生体肝移植	15M	15M	0.15%	79%	99%
7	2	F	生体肝移植	15M	15M	0.19%	87%	98%
8	10	M	生体肝移植	96M	96M	0.78%	68%	83%

Ito Y, J Gen Virol in press

移植後リンパ増殖症患者末梢血中 0.05~0.78% の単核球が EBER 陽性であった。EBV-DNA 検出の期間が短い症例では IgD 陰性のナイーブ B 細胞が多い症例もあったが、EBV-DNA 検出の期間が長い症例ではナイーブ B 細胞は少なく、CD27 陽性 IgD 陽性のメモリー B 細胞や CD27 陽性 IgD 陰性のスイッチドメモリー B 細胞が多い結果が得られた。

### D. 考察

我々は *in situ* hybridization 法と、flow cytometry を組み合わせた FISH 法を移植後リンパ増殖症患者に応用し、同法が EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患および移植後リンパ増殖症の非侵襲診断として有用であることを示した。

B 細胞の分化は、骨髄よりナイーブ B 細胞が末梢血中に出現するから始まる。この時のナイーブ B 細胞は CD27 陰性で IgD 陽性のフェノタイプを示す。リンパ組織の胚中心で抗原を認識すると CD27 陽性 IgD 陽性のメモリー B 細胞へ分化する。その後クラススイッチが起こり CD27 陽性 IgD 陰性のスイッチドメモリー B 細胞に分化し様々なグロブリンを産生すると考えられている。これまで、移植後リンパ増殖症における EBV 感染細胞は主に B 細胞であるということはわかっ

ていたが、詳細な感染細胞分画は不明であった。

我々は FISH 法を用い移植後リンパ増殖症患者末梢血中の EBV 陽性細胞のフェノタイプを解析したところ、全例感染細胞は CD19 および CD20 陽性 B 細胞であった。また更に詳細に EBV 感染細胞のフェノタイプを調べたところ、臍帯血移植後以外の症例では、CD27 陽性 IgD 陽性のメモリーB 細胞主体であることが明らかとなった。これらの知見は、移植後リンパ増殖症の治療方針を考える点で極めて興味深い。一般に EBV がメモリーB 細胞に感染している時は、潜伏感染O型と呼ばれ、ウイルス抗原を全く出さず、宿主の免疫機構から回避していると考えられている。ことに、臓器移植後、一部の患者では、EBV は分裂増殖せず長期に生存しているメモリーB 細胞に潜伏し、宿主の細胞性免疫から逃れつつ、高 EBV-DNA 血症を持続しているのかもしれない。これらの高 EBV-DNA 血症を有する患者に対して、リツキシマブを用いた治療を行うべきかどうかについては議論のあるところである。

#### E. 結論

FISH 法により、非侵襲的な方法で移植後リンパ増殖症における EBV 感染細胞の同定/定量が可能であった。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であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### 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) Hoshino Y, Nishikawa K, Ito Y, Kuzushima K, Kimura H. Kinetics of Epstein-Barr virus load and virus-specific CD8+ T cells in acute infectious mononucleosis. *J Clin Virol* 50: 244-246, 2011
- 3) Torii Y, Kimura H, Gotoh K, Ochi N, Kaneko K, Ando H, Kiuchi T, Ito Y. Immunogenicity of inactivated 2009 H1N1 influenza vaccine in pediatric liver transplant recipients. *Vaccine* 29: 4187-9, 2011
- 4) Kunitomi A, Kimura H, Ito Y, Naitoh K, Noda N, Iida H, Sao H. Unrelated bone marrow transplantation induced long-term remission in a patient with life-threatening Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Clin Exp Hematop* 51:57-61, 2011
- 5) Iwata S, Yano S, Ito Y, Ushijima Y, Gotoh K, Kawada J, Fujiwara S, Sugimoto K, Isobe Y, Nishiyama Y, Kimura H. Bortezomib induces apoptosis in T lymphoma cells and natural killer lymphoma cells independent of Epstein-Barr virus infection. *Int J Cancer* 129: 2263-2273, 2011
- 6) Ukeba-Terashita Y, Saita Y, Ito Y, Kanegane H, Kimura H, Kobayashi I. Chronological changes in Epstein-Barr virus genome and subsets of

- peripheral mononuclear cells in a case of HLH.  
Open Journal of Pediatrics 1:30–33, 2011
- 7) Ito Y, Kawabe S, Kojima S, Nakamura F, Nishiyama Y, Kaneko K, Kiuchi K, Ando H, Kimura H. Identification of Epstein–Barr virus–infected CD27<sup>+</sup> memory B cells in patients after transplantation. J Gen Virol 92:2590–5, 2011
- 8) Gotoh K, Ito Y, Maruo S, Takada K, Mizuno T, Teranishi M, Nakata S, Nakashima T, Iwata S, Goshima F, Nakamura S, Kimura H. Replication of Epstein–Barr virus primary infection in human tonsil tissue explants. PLoS One 6: e25490, 2011
- 9) Kimura H, Ito Y, Kawabe S, Gotoh K, Takahashi Y, Kojima S, Naoe T, Esaki S, Kikuta A, Sawada A, Kawa K, Ohshima K, Nakamura S. Epstein–Barr virus (EBV)–associated T/NK lymphoproliferative diseases in non-immunocompromised hosts: prospective analysis of 108 cases. Blood 119:673–86, 2012
2. 学会発表
- 1) Kimura H, Gotoh K, Maruo S, Takada K, Iwata S, Goshima F, Nishiyama Y, Ito Y.: Ex vivo model for Epstein–Barr virus primary infection using human tonsil tissue explants. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan (2011. 9)
- 2) 木村 宏. EB ウイルスリンパ関連 T/NK リンパ増殖性疾患. 第 43 回,日本小児感染症学会, 教育講演. 岡山 (2011. 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)

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

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, 菌血症を疑う理由となった発熱の原因としての感染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, PCR を基盤とする核酸検査を行うことによりこの問題の解決に取り組んだ. 虎の門病院で造血幹細胞移植後に発熱を来した患者由来のサンプル 97 検体を解析した結果, 33 例 (35.1%) から細菌が, 1 例から真菌が分離された. 一方, RT-PCR で 16S rRNA を増幅する核酸検出法で細菌が検出できた例は 24 例 (24.7%) で, ITS2 領域の増幅で真菌が検出された例はなかった. 培養法と同定できた細菌と核酸検査で同定された菌が菌種まで一致した例はわずか 1 例であった. この 1 例からは血液 1  $\mu$ l 当たりおよそ 4800 分子の 16S rRNA が検出され, それ以外の RT-PCR 陽性例では多くが 500 分子以下であったことから, RT-PCR で有意な結果を出すためには 1000 分子以上の 16S rRNA 分子が血液 1  $\mu$ l に存在する必要があると考えられた. 培養法で同定された菌種は Helicobacter と大腸菌を始めとする腸内細菌が分離された 6 例を除き, 全てがグラム陽性菌であった. ところが RT-PCR で菌種同定まで出来た 14 検体のうちグラム陽性菌は 4 検体だけであった. この結果は培養法ではグラム陰性菌の検出率が低いか, あるいは発熱の原因としてグラム陰性菌の菌体成分や死菌の血液への流入が多いことを示すものと考えられた.

協力研究者

(1) 福島県立医科大学微生物学講座

西山恭子

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, 発熱から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

とが多いうえ、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も多い。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を惹起し、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、核酸検査による細菌・真菌の検査を使って虎の門病院で造血幹細胞移植を受けた患者を検討した。術後、発熱によって菌血症や敗血症を疑った症例から採血し、血液培養と核酸検査を施行してその結果を比較検討した。

## B. 研究方法

### 1) 検体の採取

虎の門病院で造血幹細胞移植を受けた移植患者が発熱をきたした時に採血を行い、一部は虎の門病院中央検査室での血液培養に、一部は福島県立医科大学微生物学講座での核酸検査に供した。検査には抗凝固剤としてEDTAを加えた血液を用いた。福島県立医科大学には匿名化後、凍結して輸送し、保存する場合には検査まで $-20^{\circ}\text{C}$ に保存した。

### 2) DNA の調整

血液からの核酸の調整は以下のように実施した。

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  $\text{MgCl}_2$ ) を加え攪拌後、13,000 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 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  $70^{\circ}\text{C}$ , 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 2,500rpm 2 分間攪拌して微生物を物理的に破砕し、ここに 200 $\mu\text{l}$  の 10% SDS 水溶液を加えてもう一度  $70^{\circ}\text{C}$ , 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、13,000rpm 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。

### 3) 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黄色ブドウ球菌 16S rRNA 遺伝子を使って検量線を描いた。

#### 4) 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。方法は本研究の初年度に確立した添田らの方法に従った (Soeta et al, 2009)。

#### 5) 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、PCR で細菌の場合は 16S rRNA 遺伝子を、真菌の場合は ITS2 領域を増幅した。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 がコンタミしており、多い場合は 300 コピーを越える DNA が 1 $\mu$ 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、細菌検査については real-time PCR で定量した 16S rRNA 由来の cDNA 分子数がゲノム DNA を定量した値より 10 倍以上高い場合を菌体の核酸を検出したと判定した。また、検査の感度は 100copy/ $\mu$ l とし、10~100copy/ $\mu$ l の結果は±として参考に止めた。

#### 2) 検体の解析結果

##### ① 細菌の検査結果

移植後、発熱時に採取した血液 97 検体中 33 検体が血液培養陽性で、24 検体が RT-PCR 陽性となった (表 1)。真菌としては *Candida parapsilosis* が培養された症例が 1 例あった。

培養された菌種としては表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、*Staphylococcus haemolyticus*、薬剤耐性腸内細菌 (ESBL) の順で多く、2 例は 2 菌種の混合感染であった。分離培養された 12 菌種中、グラム陰性菌は大腸菌 (*Escherichia coli*)、ヘリコバクター、薬剤耐性腸内細菌の 3 種のみで、他の 9 種は

グラム陽性菌であった。

一方、培養陽性となった 34 検体中、RT-PCR が陽性となったものが 10 件、陰性となったものが 24 件で(表 2)、菌種まで一致した例は *Staphylococcus haemolyticus* が同定できた1例のみであった。この例では、血液 1 $\mu$ l 当たり 4762 分子の 16S rRNA が検出できたことより、かなりの菌数が流血中に存在していたことがわ

かった。血液培養で陰性だった 64 検体中 RT-PCR 陽性だったものが 15 例、陰性だったものが 49 例だった。RT-PCRではPCR産物をクローニングして 3 つのコロニーから菌種同定を行ったが、最大 3 菌種検出された。同定できた菌種は 10 種あり、そのうちグラム陽性菌は 4 種で、残り 6 種はグラム陰性菌だった。

表 1. 血液培養で細菌が分離された 33 検体のまとめ

培養	症例数	RT-PCR (Copy/ $\mu$ l; 菌種)	症例数
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	11	(-)	9
		247; 同定不能	1
		148; <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Serratia proteamaculans</i>	1
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	5	(-)	4
		4762; <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1
ESBL	4	(-)	3
		304; <i>Serratia proteamacula</i>	1
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	3	(-)	1
		245; <i>Serratia proteamaculans</i>	1
		746; <i>Staphylococcus warneri</i> , <i>Rothia mulcilaginsa</i>	1
<i>Streptococcus mitis (oralis)</i>	3	(-)	2
		293; <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Serratia proteamaculans</i>	1
$\alpha$ - Streptococci	1	(-)	1
<i>Corynebacterium striatum</i>	1	(-)	1
<i>Helicobacter cinaedi</i>	1	105; <i>Pseudomonas fluorescens</i>	1
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	1	(-)	1
<i>Enterococcus faecium</i>	1	174; ND*	1
<i>Escherichia coli</i> & $\alpha$ - Streptococci	1	(-)	1
<i>Enterococcus faecium</i> & <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1	(-)	1

グラム陰性菌をシャドウで示した。

\* ND; can not determined

表 2. 培養と RT-PCR の結果のまとめ

RT-PCR \ 培養	陽性	陰性	計
	陽性	9	15
陰性	24	49	73
計	33	64	97

表 3. 血液培養が陰性の検体から RT-PCR で検出できた細菌の菌種のまとめ

コピー数 ( / $\mu$ l)	菌 種
541	ND*
492	<i>Serratia proteoaculans</i>
** 431	<i>Propionibacterium acnes</i>
380	<i>Pseudomonas</i> sp. / <i>Sphingomonas</i> ap.
375	<i>Serratia proteoaculans</i> / <i>Rahnella</i> sp.
337	<i>Pseudomonas</i> sp./ <i>Propionibacterium acnes</i> / <i>Stenotrophomonas maltophilis</i>
282	ND
267	<i>Serratia proteoaculans</i> / <i>Stenotrophomonas</i> sp.
209	ND
180	ND
151	ND
120	ND
118	<i>Pseudomonas</i> sp.
109	<i>Pseudomonas</i> sp.
104	ND

\*ND; can not determined

\*\*この症例からは培養で *Candida parapsilosis* が検出された。グラム陰性菌をシャドウで示した。

## ② 真菌の検査結果

血液培養から真菌が分離された例は1例で、*Candida parapsilosis* が分離された。Real-time PCR 検査では陽性としている 100 copy/ $\mu$ l を越えた例は1例も存在しなかったが、10~100 copy/ $\mu$ l の DNA を検出した例は8例あった。更にコピー数が少ない症例も含め、PCR 産物が得られたものは全てクローニングし、1 検体から 3 つのコロニーをシーケンスして同定した菌種は表 4 の通りである。常在菌として検出されることが多い *Candida albicans* が少ないのが特徴であり、抗真菌剤の予防投与によって常在菌叢が変化したためと考えられた。

表 4. 16 検体から PCR で同定できた真菌

菌 名	患者数
<i>Trichosporon</i> Sp.	7
<i>Candida parapsilosis</i>	5
<i>rugosa</i>	4
<i>albicans</i>	1
<i>glabrata</i>	1
<i>Cladosporium</i> sp.	3
<i>Aspergillus</i> sp.	2
<i>Fusarium</i> sp.	2
<i>Malassezia yamatoensis</i>	1

1 検体から複数の真菌が同定できた場合は重複してそれぞれの菌種をカウントした。

## D. 考察

今回の核酸検査ではコンタミしたDNAを検出する疑陽性を防ぐため i) 感度を下げて 100 copy/ $\mu$ l 以上を陽性とする、ii) 試薬にDNAがコ

ンタミしている可能性が高い細菌検査では検出したゲノムDNAのコピー数に対し、RT-PCRで検出した16S rRNAのコピー数が10倍以上であることを陽性の基準とした。一般的な細菌の多くはゲノムに10コピー弱の16S rRNA遺伝子をコードするが、16S rRNAのRT-PCRでの検出数はその10~100倍であると報告されている。つまり、1μl当たり1つの細菌が存在し、検出効率が100%であった場合、RT-PCRで定量した16S rRNA分子数は100~1000となる。従って、この研究で設定した100copy/μl以上という感度は菌数に換算するとおおよそ0.1~1/μl, 100~1,000/mlという感度で、実際に検出に成功した1例は血液1ml中に4,000個の菌が存在していたと概算できる。

真菌の検査は検査中に孢子が混入するコンタミの危険は大きいですが、検査試薬にDNAがコンタミしている可能性は細菌よりは少ない。今回は検出感度を100 copy/μlとしたが、もう少し感度を高く設定しても良いのかもしれない。

血液培養と核酸検査を比較し、次のようなことが明らかとなった。まず、検査の感度として、培養法は明らかに核酸検査よりも感度が高い。しかし、グラム陰性菌の検出感度が陽性菌に比べて低いようであり、培養が困難な菌はPCRでなければ検出できない可能性は残されている。一方、PCRでは死菌でも検出できることから、必ずしも血流感染を診断していることにはならない。ただ、血中から菌体成分が検出できることは体内のどこかに感染があり、菌体成分によって発熱反応が起こされている可能性を示唆するものである。

真菌検査の場合は培養に時間がかかることが問題である。また、抗菌薬の種類が少なく、細菌

感染に較べて薬剤感受性試験の重要性が低い。従って、真菌感染症に対しては核酸検査の意義は細菌に対してよりも高いものと思われる。

#### 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、特に真菌の診断法としてより簡便な方法を開発する。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kawakami Y, Oyama N, Sakai E, Nishiyama K, Suzutani T, Yamamoto T. Childhood tinea incognite caused by trichophyton mentagrophytes var. interdigitale mimicking pustular psoriasis. *Pediatr Dermatol* (In press)

##### 2. 学会発表

なし

#### 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)

同種造血幹細胞移植後の呼吸器ウイルス感染症についての検討

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

研究要旨:虎の門病院で2011年1月から2011年12月の期間に造血幹細胞移植を行った130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。全例のうち、完遂した症例が27例、退院・死亡にて中止した症例がそれぞれ44例・39例、現在継続中の症例が20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PIV3 16例、PIV2 1例、Influenza virus 1例、HSV1 17例であった。HSV検出例で口内炎・陰部潰瘍を発症していたのは3例のみで、その他の症例では、重症例に多く検出されていた。PIV3検出例に関しては、全例で呼吸器症状を認め、肺炎を発症しているのが全症例の約半数であり、移植後早期に発症している症例・発症時のリンパ球数が少ない症例で予後が不良であった。また、PIV3の検出率が高かったことから、PIV3の病棟内流行の可能性が考えられた。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。

研究協力者

- (1) 国家公務員共済組合連合会 虎の門病院  
血液内科  
辻 正徳
- (2) 仙台医療センターウイルスセンター  
西村秀一

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2011年1月から2011年12月までに造血幹細胞移植を行った130例を対象とした。移植前週から移植後14週までの期間、毎週1回咽頭拭い液を採取した後、検体培地を仙台医療センター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。

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族のウイルスに感染すると、致命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 2010; 115: 2088-2094)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、

(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(26.9%)であり、その内訳はPIV3 16例、PIV2 1例、Influenza virus 1例、HSV1 17例であった。PIV3 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、10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死的経過を辿ったが、そのうち5例は他の病原微生物の合併を来し、残りの1例はびまん性の間質性肺炎様の変化を来していた。肺炎にて致死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。

HSV1 検出症例では、2例に難治性口内炎、1例に陰部潰瘍を来していたが、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、12例は重症例で検出しており、全身状態の悪化とHSV1 再活性化との関連が考えられた。

Influenza virus, PIV2 検出例ではいずれも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3割程度であった。

- 2) PIV3 検出例が多く、病棟内での流行が大いに疑われた。
- 3) PIV3 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) HSV1 検出例は全身状態の悪化している症例が多く、口内炎や陰部潰瘍など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、PIV3, PIV2, Influenza virus, RSV, Mumps virus に関しては関連性を認めたが、HSV1 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、残り約半年の期間を含め、計2年間本研究を進めていく予定である。

### F. 健康危険情報

特記すべきことなし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Yamamoto H, Kato D, Uchida N, Taniguchi S, et al. Successful sustained engraftment after reduced-intensity umbilical cord blood transplantation for adult patients with severe aplastic anemia. *Blood*. Mar 17. 117(11):3240–3242, 2011.
- 2) Uchida N, Wake A, Nakano N, Taniguchi S, et al. Mycophenolate and tacrolimus for

graft-versus-host disease prophylaxis for elderly after cord blood transplantation: a matched pair comparison with tacrolimus alone. *Transplantation*. Aug 15. 92(3):366-371, 2011.

- 3) Masuoka K, Uchida N, Ishiwata K, Taniguchi S, et al. What is the upper age limit for performing allo-SCT? Cord blood transplantation for an 82-year-old patient with AML. *Bone Marrow Transplant*. Apr.

46(4):619-620, 2011.

#### H. 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

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)

ヒトヘルペスウイルス6に対する細胞性免疫能に関する研究

研究分担者 森 康子 神戸大学大学院医学研究科 教授

研究要旨:ヒトヘルペスウイルス6に対する細胞性免疫能の測定系を確立することを目的とし、健常人末梢血単核球を用いた IFN- $\gamma$  ELISPOT 法による検討を行い、抗 HHV-6 細胞性免疫能測定系を確立した。

研究協力者

(1) 神戸大学大学院医学研究科  
定岡知彦

かは不明である。

そこで、本研究では、ヒト末梢血単核球(PBMC)を用いて HHV-6 に対する免疫応答の測定法の確立を目的とする。

A. 研究目的

ヒトヘルペスウイルス6(HHV-6)は、生後約半年以降の乳幼児に感染し、一部の児に突発性発疹を引き起こした後、潜伏感染する。そして、臓器移植や造血幹細胞移植後に HHV-6 が再活性化することにより、移植片対宿主病、間質性肺炎や脳炎、脳炎等の重篤な疾患を惹起させる。主にヒトにのみ感染する HHV-6 における「潜伏ウイルスの再活性化および病気の発症」は、宿主側のウイルスに対する免疫応答の抑制が原因と考えられているが、どの程度の免疫能の低下によるものなのか、またその免疫能の低下がどのようにウイルスの再活性化に関与している

B. 研究方法

今年度は、昨年度までに健常人 9 名より提供頂いた PBMC を用いて確立した方法を改良し、高感度な測定系を確立するとともに、新たなボランティアより提供頂いた PBMC を用いて、高感度測定系において HHV-6 に対する細胞性免疫能の測定を行った。健常人ボランティア(17 名)より採取した PBMC を用い、以下に示す方法で、IFN- $\gamma$  ELISPOT 法により HHV-6 に対する細胞性免疫能を測定した。

抗ヒト IFN- $\gamma$  抗体(clone2G1, Endogen)をコートした 96 穴メンブレンプレートに PBMC を 4 x

10<sup>5</sup> 個加え、その上に HHV-6B (HST 株) 感染 MT-4 細胞上清より調整したウイルス粒子含有液 1 あるいは 3 μL (1.5 × 10<sup>7</sup> コピー/μL, TCID<sub>50</sub> = 10<sup>5</sup>/μL) を UV 照射にて不活化後、添加した。37°C, 5%CO<sub>2</sub> 条件下で 38 時間培養した後、プレートを洗浄しビオチン標識抗ヒト IFN-γ 抗体 (clone B133.5, Endogen), ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (1:1,000 BD), TMB-H 発色液 (Moss) を反応させ、スポットを可視化した。スポット数の測定は、KS-ELISPOT 測定装置 (Carl Zeiss) により行った。

#### (倫理面からの配慮について)

本研究は臨床研究に関する倫理指針を遵守し、各研究機関における倫理委員会において承認を得ている。各検体はコード化され、個人を特定できない状態で実験担当者に渡される。なお、検体については、解析上必要とする性別、年齢、病名、臨床情報の提供を受けるが、個人を特定できる情報は受けない。

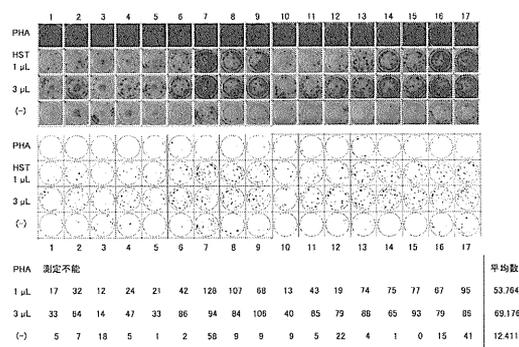
本研究の対象となる被験者に対して、文書を用いて本研究の主旨を十分に説明し同意を得る。また本研究の結果については、希望する被験者に対して公開した。

#### C. 研究結果

17 名の新たなボランティアより提供頂いた PBMC において、1 反応あたり、PBMC 4 × 10<sup>5</sup> 個、HHV-6 刺激抗原量 1 μL により、十分な細胞性免疫能の測定が可能であった。

陰性コントロール(刺激抗原懸濁液のみ)において平均 12.411 個のスポット数に対し、刺激抗原 1 μL では 53.764 個と、明らかに有為なスポッ

ト数の検出が可能であった。最もスポット数の少ない検体においても、陰性コントロールスポット数:刺激抗原スポット数=5:17 と明らかな有為差が認められた。また 21 歳から 61 歳という幅広い年齢層においても測定可能であった。



#### D. 考察

今回、ELISPOT 法を用いて、HHV-6 に対する細胞性免疫能の測定系を検討、確立した。感染力価の高い HHV-6 ウイルス精製粒子刺激により、より広範囲でのスクリーニングを目的とした測定に適した、少数の PBMC を用いた高感度な測定系を構築できた。

IFN-γ ELISPOT 法においては形成されるスポット数によりその IFN-γ 産生細胞数を知る事は可能であるが、同数のスポットを産生する場合においてもそのスポットの大きさには明らかな差が認められ、今後さらに健常人ボランティア数を増やし解析を行っていく中で、スポット数とともにスポットの大きさと細胞性免疫能の関係についても探索を行いたいと考えている。

またボランティアからの血清を用いた液性免疫能の測定も視野に入れ、包括的な HHV-6 に対する免疫能と再活性化の関連について検討を行っていきたい。

E. 結論

HHV-6 精製ウイルス粒子を用いた IFN- $\gamma$   
ELISPOT 法により, 健常人 PBMC を用いた  
HHV-6 に対する細胞生免疫能の高感度測定法  
を確立した.

F. 健康危険情報

特記すべきことなし.

G. 研究発表

1.論文発表

特記すべきことなし.

2.学会発表

特記すべきことなし.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし.

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)

移植後 HHV-6 感染症の診断・治療・予防法の開発

研究分担者 吉川哲史 藤田保健衛生大学医学部小児科 教授

研究要旨:小児造血幹細胞移植患者において、ウイルス分離ならびにリアルタイム PCR 法によるウイルス DNA モニタリング結果に基づき、感染の有無を評価した。その結果に沿って、HHV-6 感染あり群となし群に分け、経時的なサイトカインの推移を解析した。53 人中末梢血からのウイルス分離陽性、あるいは HHV-6 DNA 陽性(1000 コピー/ $\mu\text{g}$  DNA 以上)の基準を満たしウイルス感染ありとされたのは 16 名(30.2%)。移植当日と移植後 7 日を除き、全ての経過でウイルス感染あり群で有意にウイルス DNA 量が多かった。サイトカインの経時変化では、6 種類のサイトカインの中で IL-1 $\beta$  と IL-6 についてウイルス感染あり群となし群の間で有意差が認められた。

研究協力者

(1) 藤田保健衛生大学医学部小児科

大橋正博

(2) 藤田保健衛生大学医療科学部

井平 勝 A. 研究目的

現在ヒトに感染するヘルペスウイルスは 8 種類知られている。Human herpesvirus 6(HHV-6)は、リンパ球増殖性疾患患者から分離された 6 番目のヒトヘルペスウイルスである。移植などの免疫抑制状態化で再活性化し間質性肺炎、脳炎・脳症、などとの関連が示唆されている。しかしながら、再活性化機構については未だ不明な点が多い。

HHV-6 再活性化の病態を明らかにするため、造

血幹細胞移植患児から経時的に採取した血液サンプルを用いウイルス分離とともに、HHV-6 DNA, HHV-6 mRNA, 血清サイトカインを定量し、HHV-6 再活性化におけるサイトカインの影響、また HHV-6 再活性化がサイトカイン合成に与える影響を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

【対象】名古屋第一赤病院、名古屋大学付属病院にて造血幹細胞移植を受けた患児 53 名(男児 29 名 女児 24 名)、合計 279 検体を解析した。

【方法】移植時、移植後毎週 EDTA 加末梢血と全血を採取した。EDTA 加末梢血からはウイルス分離を行い、単核球から DNA, RNA を抽出、

real-time PCR 法にて HHV-6 DNA 量を測定し、real time RT PCR によって HHV-6 mRNA の定量をおこなった。血清からは 6 種類のサイトカイン (IL-8 , IL-1- $\beta$  , IL-6 , IL-10 , TNF  $\alpha$  , IL-12p-70) を Cytometric Bead Array:BD によって同時測定した。移植後ウイルスが分離された患児、移植後の末梢血単核球中ウイルス DNA 量が  $10^3$  コピー/ $\mu\text{g}$  を超えた患児を HHV-6 感染有と規定、移植後各期間においてそれぞれのサイトカイン量を感染群、非感染群の 2 群に分けて比較した。

(倫理面からの配慮について)

以下のような対策を講じ、本学倫理審査委員会の承認を得た。

a 説明文書を使用し患者に説明、同意書に署名を得た後実施。

b 個人への利益:本研究を実施するうえで、患者本人が受ける直接的な利益はない。一方、診断目的のため生検されたリンパ節を材料として用いるため被験者にとって不利益となることはない。危険性もない。

c 個人情報の保護、試料保存についても説明文書に記載。連結可能匿名化により個人情報を保護する。対照表は暗号化した上で、パスワードにて管理されたエクセルファイルにて管理する (分担研究者吉川哲史教授室内で施錠管理されたコンピューター。検体輸送に際しては、検体ラベルにはコード番号のみを記載し、後に別に保管した対照表を基に主任研究者のみ連結化が可能となるような形をとる。使用済みの検体は小児科学教室にて一括して管理、保存され、研究終了に伴い廃棄される。得られた検体は、本研究以外には使用しない。

### C. 研究結果

53 人中末梢血からのウイルス分離陽性、あるいは HHV-6 DNA 陽性 (1000 コピー/ $\mu\text{g}$  DNA 以上) の基準を満たしウイルス感染ありとされたのは 16 名 (30.2%)。移植後のウイルス DNA 量の推移を図 1 に示す。移植当日と移植後 7 日を除き、全ての経過でウイルス感染あり群で有意にウイルス DNA 量が多かった。サイトカインの経時的変化では、6 種類のサイトカインの中で IL-1 $\beta$  (図 2) と IL-6 (図 3) についてウイルス感染あり群となし群の間で有意差が認められた。

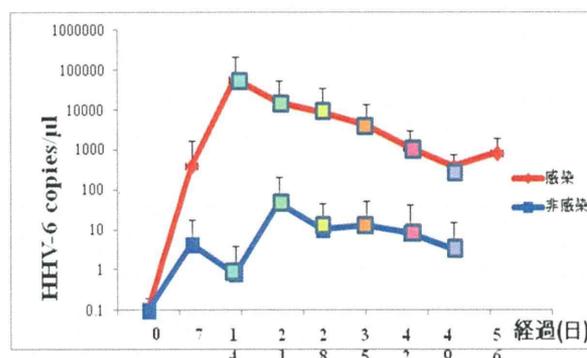


図 1. 移植後の HHV-6 DNA 量の推移 (HHV-6 感染あり群となし群の比較)

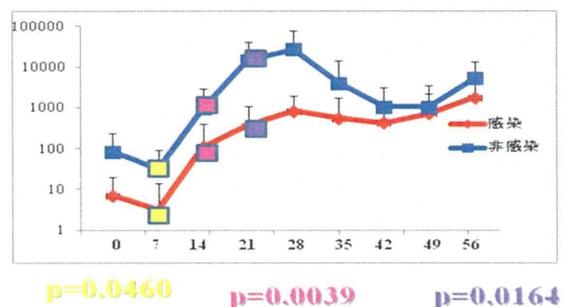


図 2. HHV-6 感染あり群となし群間での IL-1 $\beta$  の比較

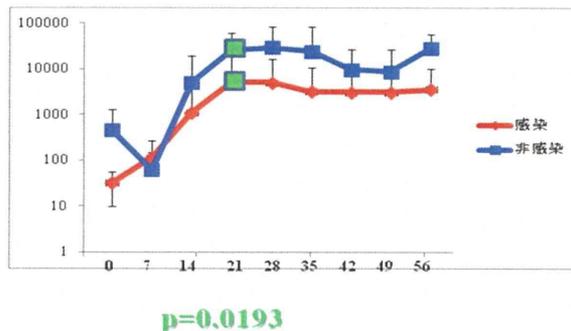


図 3. HHV-6 感染あり群となし群間での IL-6 の比較

#### D. 考察

造血幹細胞移植後 14-28 日にウイルス分離が集中し、その時期に合わせて感染群にてウイルス量の有意差を認めた。HHV-6 の活動性感染時期に合わせて IL-1 $\beta$  が移植後 7 から 21 日目、IL-6 が移植後 21 日目に感染あり群で有意に低値を示した。In-vitro の実験では、樹状細胞の HHV-6 感染が IL-12 産生の抑制を起こし、免疫機能抑制に導くと報告がある。また、最近の移植後 HHV-6 感染についての解析では、HHV-6 感染に伴い宿主免疫低下が誘導され、それに伴い日和見感染の頻度が増加し患者予後を悪化させるという報告が相次いでいる。今回の検討結果は、それを裏付ける成績と考えられる。今後臨床像も含め、さらに詳細な解析を進める予定である。

#### E. 結論

小児造血幹細胞移植患者において、ウイルス分離ならびにリアルタイム PCR 法によるウイルス DNA モニタリング結果に基づき、感染の有無を評価した。その結果に沿って、HHV-6 感染あり群となし群に分け、経時的なサイトカインの推移

を解析した。その結果、HHV-6 感染が宿主の炎症性サイトカイン反応を抑制している可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1.論文発表

- 1) Yoshikawa T, Sugata K, Asano Y, Ihira M, Kumagai T. Kinetics of the cytokines and chemokines in cases with primary HHV-6 infection. J Clin Virol 50(1):65-8, 2011.
- 2) Kawamura Y, Sugata K, Ihira M, Mihara T, Mutoh T, Asano Y, Yoshikawa T Different characteristics of human herpesvirus 6 encephalitis between primary infection and viral reactivation. J Clin Virol 51(1):12-9, 2011.
- 3) Ogata M, Satou T, Kawano R, Yoshikawa T, Ikewaki J, Kohno K, Ando T, Miyazaki Y, Ohtsuka E, Saburi Y, Kikuchi H, Saikawa T, Kadota J. High incidence of cytomegalovirus, human herpesvirus-6, and Epstein-Barr virus reactivation in patients receiving cytotoxic chemotherapy for Adult T cell leukemia. J Med Virol. 83:702-9, 2011.
- 4) Sugata K, Taniguchi K, Yui A, Asano Y, Hashimoto S, Ihira M, Yagasaki H, Takahashi Y, Kojima S, Matsumoto K, Kato K, Yoshikawa T. Analysis of rotavirus antigenemia in hematopoietic stem cell transplant recipients. Transplant Infect Dis doi: 10.1111/j.1399-3062.
- 5) Higashimoto Y, Ohta A, Nishiyama Y, Ihira M,

Sugata K, Asano Y, Ablashi DV, <u>Yoshikawa T</u> Development of human herpesvirus 6 variant specific immunoblotting assay. J Clin Microbiol (in press)	H. 知的財産権の出願・登録状況 1. 特許取得 なし
6) Kawamura Y, Ohashi M, Asahito H, Takahashi Y, Kojima S, <u>Yoshikawa T</u> . Posterior reversible encephalopathy syndrome in a child with post-transplant HHV-6B encephalitis. Bone Marrow Transplant (in press)	2. 実用新案登録 なし 3. その他 なし