201123009B（マニュアル有り）

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

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）

平成21年度～平成23年度　総合研究報告書

平成24年３月

研究代表者　西　條　政　幸

（国立感染症研究所）

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

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)

平成21年度～平成23年度　総合研究報告書

平成24年3月

研究代表者　西　條　政　幸

(国立感染症研究所)

平成 23 年度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

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

平成 21～23 年度　研究組織

研究代表者（班長）

西條政幸　　国立感染症研究所・ウイルス第一部長

研究分担者

氏名	所属
一山　智	京都大学大学院医学研究科臨床病態検査学・教授
井上直樹	国立感染症研究所ウイルス第一部・第四室長
大野秀明	国立感染症研究所生物活性部・室長
片野晴隆	国立感染症研究所感染病理部・室長
加藤俊一	東海大学医学部造血幹細胞移植・教授
木内哲也	名古屋大学医学部移植外科学・教授
木村　宏	名古屋大学大学院医学系研究科分子総合医学専攻(微生物・免疫学講座ウイルス学分野ウイルス学)・准教授
錫谷達夫	福島県立医科大学微生物学・教授
谷口修一	虎の門病院血液内科・部長
森　康子	神戸大学大学院医学研究科臨床ウイルス学・教授
吉川哲史	藤田保健衛生大学医学部小児科学・教授

研究協力者（順不同）

氏名	所属
西村秀一	国立病院機構仙台医療センター
中道一生	国立感染症研究所ウイルス第一部
木下一美	国立感染症研究所ウイルス第一部
王麗欣	国立感染症研究所ウイルス第一部
伊藤（高山）睦代	国立感染症研究所ウイルス第一部
林昌宏	国立感染症研究所ウイルス第一部
高倉俊二	京都大学大学院医学研究科臨床病態検査学
梅山　隆	国立感染症研究所生物活性物質部
樽本憲人	国立感染症研究所生物活性物質部
山越　智	国立感染症研究所生物活性物質部
金城雄樹	国立感染症研究所生物活性物質部
宮崎義継	国立感染症研究所　物活性物質部
梶川益紀	（株）ACTGen
後藤希代子	（株）ニッピバイオマトリックス研究所
蘆澤正弘	自治医科大学附属さいたま医療センター血液科
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
鈴木忠樹	国立感染症研究所感染病理部
佐藤由子	国立感染症研究所感染病理部
長谷川秀樹	国立感染症研究所感染病理部
山本久史	虎ノ門病院血液内科
辻正徳	虎ノ門病院血液内科
矢部普正	東海大学医学部基盤診療学系再生医療学
土田文子	東海大学医学部付属病院臨床検査科
西山恭子	福島県立医科大学微生物学講座
定岡知彦	神戸大学大学院医学研究科
井平勝	藤田保健衛生大学医療科学部
榎本喜彦	藤田保健衛生大学病院臨床検査部

目次

I. 総合研究報告書

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 …… 1
西條政幸

II. 分担総合研究報告書

1. 臓器移植患者における薬剤耐性単純ヘルペスウイルス感染症の実態と治療戦略に関する研究 …… 27
西條政幸
2. 生体肝移植後感染症の臨床疫学調査 …… 39
一山智
3. 感染初期過程を阻害する新規抗ヘルペスウイルス化合物の作用点解析 …… 41
井上直樹
4. 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/わが国で初めて分離された北米型 *Cryptococcus gattii* の病原性に関する研究 …… 49
大野秀明
5. 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/JC ウイルス感染症の病理学的解析 …… 59
片野晴隆
6. 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 …… 65
加藤俊一
7. 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 …… 71
木内哲也
8. 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 …… 81
木村宏
9. 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 …… 89
錫谷達夫
10. 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 …… 99
谷口修一
11. 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 …… 103
森康子
12. 移植後 HHV-6 感染症の診断・治療・予防法の開発 …… 107
吉川哲史

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・ 113

IV. その他
開催されたシンポジウム「臓器移植におけるウイルス感染症対策」の記録・・・・・・・・・・・・・・・・・125

Ⅰ．総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
代表者総合研究報告書

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

所属　　国立感染症研究所ウイルス第一部・部長
研究代表者　　西條政幸

研究要旨：
造血幹細胞移植を含む臓器移植（以下，移植）医療では，患者の予後は徐々に改善されつつあるものの，現在でも移植患者では感染症の治療に難渋し，亡くなられる場合が多い．臓器移植患者における感染症は，移植医療においては克服または改善を要する問題点のひとつである．本研究班では，臓器移植患者の予後や QOL の向上を目指して，1）臓器移植関連感染症スクリーニング対象疾患としてリンパ球脈絡髄膜炎ウイルス感染症の診断法の開発と整備，2）造血幹細胞移植患者におけるウイルス感染症，真菌感染症の流行の解析，病態，対策に関する研究，3）新規技術を用いた臓器移植患者における真菌・細菌感染症診断法の開発とその有用性の評価，4）アデノウイルス，JC ウイルス，BK ウイルス同時検出システム開発，5）造血幹細胞移植患者におけるウイルス病原体に対する細胞性免疫応答の評価法の開発とそれを応用した細胞性免疫再構築の評価，6）臓器移植患者の晩期合併症としての感染症として問題となる移植後 EB ウイルス関連リンパ増殖症の診断法の開発と臨床的有用性の評価，7）進行性多巣性白質脳症の病理学的診断法の評価，8）薬剤耐性単純ヘルペスウイルス感染症のサイトメガロウイルス感染症に対する診断法，治療法に関する研究，8）肝臓移植後慢性期の患者に対するインフルエンザワクチン，B 型肝炎ワクチン接種の有効性と安全性に関する研究，9)新規抗ヘルペスウイルス薬の作用機序の解明と in vivo イメージング法による有効性の評価システム開発，等の研究がなされた．本研究班では，ウイルス性病原体（呼吸器ウイルス，単純ヘルペスウイルス，水痘帯状疱疹ウイルス，サイトメガロウイルス，EB ウイルス，ヒトヘルペスウイルス 6 型，リンパ球脈絡髄膜炎ウイルス），真菌（クリプトコックス），細菌と，多岐にわたる病原体を研究対象とした．造血幹細胞移植患者を含む臓器移植患者におけるヘルペスウイルス感染症対策マニュアルを作成した．臓器移植患者における感染症スクリーニング，移植術中，移植後慢性期に出現する合併症としての感染症対策に資する成績を得た．

研究分担者：
(1) 京都大学大学院医学研究科臨床病態検査学
一山智
(2) 国立感染症研究所ウイルス第一部
井上直樹
(3) 国立感染症研究所生物活性部
大野秀明
(4) 国立感染症研究所感染病理部
片野晴隆

(5) 東海大学医学部造血幹細胞移植
加藤俊一
(6) 名古屋大学医学部移植外科学
木内哲也
(7) 名古屋大学大学院医学系研究科分子総合医学専攻(微生物・免疫学講座ウイルス学分野・ウイルス学)
木村宏
(8) 福島県立医科大学微生物学
錫谷達夫
(9) 虎の門病院血液内科
谷口修一
(10) 神戸大学大学院医学研究科臨床ウイルス学
森康子
(11) 藤田保健衛生大学医学部小児科学
吉川哲史

A. 研究目的

以前に比べて現在の移植医療はより高度化し，造血幹細胞移植を含む臓器移植を受ける患者が年々増加している．臓器の移植に関する法律(臓器移植法，平成 9 年 7 月 16 日法律第 104 号)が施行され，同法律はさらに平成 21 年に法改正されて，亡くなられた患者の家族の同意があれば亡くなられた患者の臓器が提供されることが可能となった．同法改正以来，臓器移植実施数が増加している．さらに，造血幹細胞移植領域においても移植数が急激に増加している．特に脳死患者からの臓器移植，例えば心臓，肝臓，肺臓などの移植もこれまで以上に増加している．

角膜移植，腎臓移植，そして，白血病などの血液悪性腫瘍の治療法として造血幹細胞移植が多くの患者で実施されている．さらに，先天性免疫不全症や先天性代謝性疾患の治療法としても臓器移植がなされるようになっている．このように臓器移植は，治療法としてより多様な疾患の対象になっている．

一方，有効な免疫抑制剤の開発や移植時の患者管理の向上，移植術の改良により，移植を受けた患者の予後が改善されている．しかし，臓器移植患者においては，感染症は未だに克服されるべき大きな課題である．とりわけウイルスや真菌感染症対策は重要な位置を占める．近年，移植患者における薬剤耐性ウイルス感染症や真菌症の対策の重要性も指摘されている．臓器提供者がいわゆる人獣共通感染症(例えばリンパ球性脈絡膜髄膜炎ウイルスや西ナイルウイルス感染症)に罹患していて，移植患者の多くが死亡する感染事故の報告も増えている．このように，現在の臓器移植における感染症の特徴は，過去のそれとは異なりつつあり，かつ，多様化している．本研究では，移植患者の予後と QOL を改善するために，移植患者における感染症の現状を解析し，臓器移植患者におけるウイルスや真菌感染症の診断や治療法の開発を手がけ，将来を見据えた対応策を提示することを目的とした．

B. 研究方法

1. リンパ球脈絡髄膜炎ウイルス(LCM ウイルス)感染の診断システムの開発に関する研究．
組換えバキュロウイルスにより発現・精製された LCM ウイルス組換え核蛋白(NP)に対する単クローン抗体およびポリクローナル抗体を作製し，これらの抗体を用いた LCM ウイルス蛋白を検出する抗原検出 ELISA 法を開発した．
2. 臓器移植患者における薬剤耐性単純ヘルペスウイルス感染症の実態と治療戦略に関する研究．

造血幹細胞移植患者における単純ヘルペスウイルス 1 型(HSV-1)感染症の実態を前方視的にウイルス分離法により解析し，分離された HSV-1 のアシクロビル(ACV)に対する感受性を解析した．また，DNApol における変異が原因で ACV に耐性を示す HSV-1 (DNApol 関連 ACV 耐性 HSV-1)感染症の治療法や診断法を開発する目的で，DNApol 関連 ACV 耐性 HSV-1 の性状を解析した．

3. 生体肝移植後感染症の臨床疫学調査．

生体肝移植後感染症の疫学調査として，過去の真菌血症例のレビューを行うとともに，2011 年 1 月以降，京都大学医学部附属病院にて実施した生体肝移植術後の全症例について術後の感染症発症の有無を調査した．

4. 感染初期過程を阻害する新規抗ヘルペスウイルス化合物の作用点の解析．

抗水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)化合物のひとつ triazin-4-one 誘導体 35B2 に対する耐性株を作製し，その耐性株の性状を解析することで，その作用機序を明らかにした．また，GFP 発現組換えマウスサイトメガロウイルス(MCMV-GFP)を用いた in vivo imaging 法を確立した．

5. 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

臓器移植時に合併しやすい真菌症のなかでクリプトコックス症について，クリプトコックス属の細胞壁表層・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い，クリプトコックス蛋白 CnHip1p を標的としたモノクローナル抗体として 5 クローンの抗体を作成し，k の抗体を用いた抗原検出 ELISA 法の開発した．

6. わが国で初めて分離された北米型 *Cryptococcus gattii* の病原性に関する研究．

C. gattii 株(JP01 株)が渡航歴のない日本人患者から分離されたことを受けて，その病原性をマウスモデルを用いて，*C. neoformans* H99 株や北米分離株である *C. gattii* R265 株と比較して検討した．

7. 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．

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の血液中 CMV の感染動態を解析した．

8. JC ウイルス感染症(PML)の病理学的解析．

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．

9. 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に関する研究．

小児造血細胞移植患者において，週 1 回の CMV，EB ウイルス(EBV)，ヒトヘルペスウイルス 6 型(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 等の病原体に対する特異的細胞性免疫能を評価した．

10. 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関する研究．

臓器移植後慢性期の免疫抑制療法下における能動免疫誘導の有効性と安全性について，肝移植後患者を対象にB型肝炎ワクチン(既感染免疫制御)とインフルエンザ・ワクチン(新規感染免疫制御)を用いて，その安全

性と効果を検討した.

11. 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に関する研究.

in situ hybridization 法と, flow cytometry を組み合わせ, 末梢血中の EBV 感染細胞を検出できる flow cytometric *in situ* hybridization (FISH) 法を開発し, その診断法の移植後リンパ増殖症の診断における臨床的有用性を評価した.

12. 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に関する研究.

独自に開発された PCR を基盤とする真菌および細菌を検出するシステムの, 造血幹細胞移植患者における感染症診断法における有用性を, 虎の門病院血液内科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を用いて解析した.

13. 同種造血幹細胞移植後の呼吸器ウイルス感染症に関する前方視的研究.

虎の門病院で 2010 年 6 月から 2011 年 12 月の期間に造血幹細胞移植を行った 220 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. 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搬送した. 同センターでは, 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.

14. ヒトヘルペスウイルス 6 型 (HHV-6) に対する細胞性免疫能の測定法に関する研究.

末梢血単核球 (PBMC) を用いて確立した方法の HHV-6) に対する細胞性免疫能の測定法の有用性について, さらにボランティア数を増やして解析するとともに, PBMC 数および刺激抗原の調整法を検討して, より感度の高い系の確立を試みた.

15. 移植後 HHV-6 感染症の診断・治療・予防法の開発に関する研究.

Real-time RT-PCR 法による 3 種類の HHV-6 遺伝子発現定量的測定法を開発し, 臨床的有用性を検討した. また, 同法を用いて成人悪性リンパ腫組織中での HHV-6 再活性化について解析した. さらに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.

C. 研究結果

1. リンパ球脈絡髄膜炎ウイルス (LCM ウイルス) 感染の診断システムの開発に関する研究.

樹立された単クローン抗体を用いた LCM ウイルス核蛋白検出 ELISA の検出限界は, 旧世界アレナウイルスの L 遺伝子を検出するプライマーセットを用いて行った RT-PCR 法とほぼ同等であることが明らかにされた.

2. 臓器移植患者における薬剤耐性単純ヘルペスウイルス感染症の実態と治療戦略に関する研究.

造血幹細胞移植患者においては, ACV の予防投与が行われているにも関わらず, アシクロビル (ACV) 耐性 HSV-1 は比較的高い頻度で出現していることが明らかにされた. また, 分離された HSV-1 は, ACV に耐性を示すものが高頻度で認められた. その中で, ウイルス性 DNA ポリメラーゼ変異による ACV 耐性 HSV-1 出現が比較的頻度で出現してい

た. DNApol 関連 ACV 耐性 HSV-1 の多くは，フォスカルネットとビダラビンに交差耐性を示すものの，シドフォビル，ガンシクロビル(GCV)，ブリブジン，ソリブジンに感受性または高度感受性を示した．多くはマウスにおける病原性が低下していたが，親株とほぼ同等の病原性を呈する DNApol 関連 ACV 耐性 HSV-1 も存在した．DNApol 関連 ACV 耐性 HSV-1 感染症に対して，マウス動物モデルを用いて ACV と GCV による治療効果を解析したところ，ACV には抵抗性を示したものの，GCV の治療効果は認められた．

3. 生体肝移植後感染症の臨床疫学調査．

術後 1 ヵ月間経過観察された 55 例のうち，手術部位感染は 20 例(36.4%)に発生し，その 90% (18 例)は臓器・体腔感染であった．血流感染は 15 例(27.3%)に発生し，その 73%が手術部位感染を伴う例であった．原因菌では *Enterococcus faecium*, Coagulase-negative staphylococci, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. が多く，この 4 菌種で 70%以上を占めていた．また，*E. coli*, *Klebsiella* sp.の約半数が ESBL 産生菌であった．この 55 例に有意な真菌感染症は発症しなかった．過去の真菌血症症例のレビューから，カンジダ性眼内炎のリスク因子(*C. albicans*, β-D グルカン陽性)，非カンジダ真菌血症の臨床像(免疫抑制の強い重症例で発症，カンジダ血症に比べて予後不良)を明らかにした．

4. 感染初期過程を阻害する新規抗ヘルペスウイルス化合物の作用点の解析．

triazin-4-one 誘導体 35B2 は，主要カプシド蛋白を標的としてカプシド形成を阻害する新規の作用機序を持つ化合物であることが明らかにされた．この主要カプシド蛋白はヘルペスウイルス科ウイルス内で共通性の高い配列をもつことから，全てのヘルペスウイルスに効果を有する薬剤を検索するためのリード化合物になると考えられた．GFP 発現組換えマウスサイトメガロウイルス(MCMV-GFP)を用いた in vivo imaging 法を用いて，スクリーニングで同定した化合物 DPPC や GCV が一定の効果を示しすことが明らかにされ，本法が薬剤の in vivo におけるウイルス増殖抑制効果を評価する上で有用であることが明らかにされた．

5. 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

クリプトコックス蛋白 CnHip1p を標的としたモノクローナル抗体として 5 クローンの抗体が作成された．

6. わが国で初めて分離された北米型 *Cryptococcus gattii* の病原性に関する研究．

JP01 株のマウスにおける致死性は *C. neoformans* H99 株や北米分離株である *C. gattii* R265 株より強く，*Cryptococcus* 属の中でも極めて高病原性であることが疑われた．日本における重要な公衆衛生学的監視対象となりうるものと考えられた．

7. 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．

PML 法は CMV 血漿の解析，ガンシクロビル耐性 CMV 感染症のモニタリングに有用であることが示された．しかし，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．その原因は CMV の細胞指向性による差である可能性が示唆された．

8. JC ウイルス感染症(PML)の病理学的解析．

抗 VP1 抗体は主な局在は感染細胞の核内であったが，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 タンパクに対する抗体は，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．

9. 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に関する研究．

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．

10. 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関する研究．

以下の成績が得られた．

1) 肝内に潜在するB型肝炎ウィルス（HBV）の再活性化予防を目的としたHBV ワクチンは，多くの症例で安全に施行可能であり，若年・女性・ドナーHBc 抗体価の高い症例で良好な反応が得られたが，移植前に HBV キャリアであった症例では反応が不良であった．

2) 小児における季節性インフルエンザ・ワクチンは，重篤な副反応や拒絶反応の誘発なく安全に施行可能であった．しかし，新規有効抗体獲得率は低かったものの，対照の健常児でも同様であった．新規の2009H1N1 ワクチンでは，健常児対照群と同様に季節性インフルエンザ・ワクチンよりも高い有効抗体価獲得率を示した．成人群でも小児群と同様に接種後の有効抗体保有率は良好であった．一方，B型インフルエンザ・ワクチンでは特に小児で接種後の有効抗体保有率が低く，接種後の罹患例も目立った．

11. 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に関する研究．

in situ hybridization 法と，flow cytometry を組み合わせ，末梢血中の EBV 感染細胞を検出できる flow cytometric *in situ* hybridization (FISH) 法を様々な EBV 関連リンパ増殖性疾患に応用し，患者末梢血中の EBV 感染細胞の定量・同定が可能であることが示された．更に，FISH 法を移植後 EBV-DNA 高値を認め移植後リンパ増殖症が疑われた患者に対して臨床応用し，本法により非侵襲的に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．

12. 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に関する研究．

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．33 例（34.0%）から細菌が，1 例（1.0%）から真菌が分離培養された．一方，16S rRNA をRT-PCR 法で増幅する核酸検出で細菌が検出できた例は 24 例（24.7%）で，PCR で ITS2 領域を増する真菌検査で陽性となった検体はなかった．この結果を検討した以下の結論が示唆された．

1) 培養法ではグラム陽性菌は感度良く培養できるが，グラム陰性菌の検出感度が低

い.

2) RT-PCR 法で検出される菌の多くはグラム陰性菌で，発熱の原因の一部はグラム陰性菌の死菌や菌体成分の血液への流入である.

13. 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.

全例のうち，完遂した症例が 54 例，退院・死亡にて中止した症例がそれぞれ 80 例・66 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 70 例であり，その内訳は PIV3 (43 例)，PIV2(1 例)，Influenza virus(1 例)，RSV(1 例)，Mumps virus(1 例)，HSV-1(26 例)であった. HSV-1 検出例で口内炎・陰部潰瘍を発症していたのは 4 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.

14. HHV-6 に対する細胞性免疫能の測定法に関する研究.

9 人の健常人末梢血単核球を用いた IFN-γ ELISPOT 法による検討を行い，抗 HHV-6 細胞性免疫能測定系の有用性が確認された.

15. 移植後 HHV-6 感染症の診断・治療・予防法の開発に関する研究.

U90 遺伝子発現が最も HHV-6 分離成績との関連性が強く，HHV-6 の活動性感染モニタリング法として有用なことが明らかとなった. 成人悪性リンパ腫組織中では HHV-6 の潜伏感染は高率に認められたが，再活性化の頻度は極めて低いことが明らかになった. 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/μg 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%). 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-1β 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.

D. 考察

本研究では造血幹細胞移植患者の予後と QOL 向上のための知見を得るために，移植患者における感染症の病態や院内感染の実態を明らかにするとともに，迅速診断システムの開発や新規抗ヘルペス薬の検索と見出された薬剤の作用機序の解明等，基礎から臨床まで幅広い範囲の研究がなされた.

LCM ウイルス(アレナウイルス科アレナウイルス属に分類され，ネズミなどのげっ歯類が媒介する人獣感染症を引き起こす)に感染して死亡した患者が臓器提供者(ドナー)となり，そのドナーより実質臓器の提供を受けた移植患者が LCM ウイルスに感染し死亡するという感染事例が報告された. 日本においては LCM ウイルス診断システムが整備されておらず，LCM ウイルス抗原検出による感染症診断が整備されたことは，今後の臓器移植関連感染症スクリーニングに資するものと考えられる.

臓器移植患者で問題となる出血性膀胱炎の原因ウイルスであるアデノウイルス，BK ウイルスおよび進行性多巣性白質脳症の原因ウイルス

である JC ウイルスを同時に迅速に検出するシステムが開発された．臓器移植関連感染症の診断に極めて有用である．

造血幹細胞移植患者におけるヘルペスウイルス感染症の病態を明らかにするとともに，薬剤耐性ヘルペスウイルス（単純ヘルペスウイルスとサイトメガロウイルス）感染症の診断と治療に関する研究が精力的になされた．分離されたヘルペスウイルスの薬剤感受性を調べることが患者の適切な治療に欠かせないにもかかわらず，我が国においては薬剤感受性試験検査が実施できる施設は極めて限られている．臓器移植患者や免疫不全患者のおけるヘルペスウイルス感染症の診断と治療をより適切に実施するには，今後，薬剤感受性試験を積極的に受け入れることのできる施設整備が必要でると考えられる．

調査対象となった病院の造血幹細胞移植病棟においては，2 年連続でパラインフルエンザウイルス 3 型の院内感染が発生し，比較的長期にわたり持続したことが明らかにされた．この調査においては，迅速性に欠けるもののウイルス感染症の診断の基本であるウイルス分離法を用いて調査がなされた．免疫が極度に低下している患者では予後が悪く，一方で感染性ウイルスを排出し続けている患者の存在も明らかにされた．今後の院内呼吸器ウイルス感染症流行の対策を講じる上で極めて重要な知見であると考えられる．

臓器移植患者の慢性期に合併症として発生し予後を左右する移植後 EBV 関連リンパ増殖症の新規診断技術（FISH 法）を開発するとともに，その病態を明らかにした．治療に資する知見を得た．また，JC ウイルスの後期タンパクに対する抗体を用いた脳組織中のこれらのタンパクを染色する方法を用いて，る進行性多巣性白質脳症（PML）の病理所見の解明と診断技術向上のための知見を得た．さらに，造血幹細胞移植患者における HHV-6 の再活性化の HHV-6 遺伝子 RNA を検出することによる新規評価システムし，その有用性が示された．臓器移植患者における HHV-6 の再活性化と予後との関連をより詳細に明らかにしていくことが求められる．

HHV-6 や CMV をはじめ，臓器移植患者において問題となるウイルス性病原体に対する細胞性免疫能を評価する方法が開発された．今後，開発された細胞性免疫能法を駆使して，移植患者における各種病原体に対する細胞性免疫能の回復状況等を明らかにし，感染症対策に役立てていかなければならない．

肝移植慢性期の患者にインフルエンザワクチンを安全に接種することが可能であることが明らかにされた．臓器移植患者の予後と QOL が向上してくると，このような患者における感染症対策が重要な課題のひとつとなり，ワクチン接種のあり方をより詳細に検討することが求められる．インフルエンザワクチン，B 型肝炎ワクチンについて検討がなされたが，今後，Hib ワクチン，DTP ワクチン，IPV ワクチン等，他のワクチンの接種および免疫誘導能について検討がなされるべきであると考えられる．

日本で初めて分離された北米型 *Cryptococcus gattii* の病原性について解析された．*C. gattii* 感染症については，臓器移植関連感染症の脅威となる可能性があるため，日本においても重要な公衆衛生学的監視対象のひつとになる．その動向を注意深く観察することが求められる．

基礎的な研究から臨床的な研究が幅広く実施された．造血幹細胞移植を含む臓器移植患者の予後に大きな影響を与える感染症対策のさらなる研究が必要である．臓器移植患者における侵襲性真菌感染症の実態調査と診断法の改良，呼吸器ウイルス感染症の病棟内院内感染対策，

薬剤耐性ヘルペスウイルス感染症対策を含む臓器移植患者におけるヘルペスウイルス感染症の診断と治療に関する提言等，具体的な成果が求められる．

臓器移植患者の適切な治療を実施するために有用なマニュアル「臓器移植患者におけるヘルペスウイルス感染症に対する診断・治療・予防マニュアル」が作成された．

今後，益々移植医療の質の向上が図られ，移植医療を受ける患者も増加するものと予想される．臓器移植を受けたより多くの患者が日常生活を送る社会が実現されなければならない．そのためには，移植術急性期の感染症対策だけでなく，移植術を受けた患者の慢性期（後期）における感染症対策を通じた QOL の向上に繋がる研究がこれまで以上に望まれる．

E. 結論

本研究はにおいては，臓器移植患者の診断と治療のために資する研究を行い，患者のQOLを向上するための科学的な活動がなされた．造血幹細胞移植を含む臓器移植関連感染症対策に資する知見を得た．今後も臓器移植治療を受ける患者の増加が予想されることから，さらなる研究が必要である．

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

1) Nakauchi M, Fukushi S, Saijo M, Mizutani T, Ure AE, Romonowski V, Kurane I, Morikawa S. Characterization of monoclonal antibodies to Junin virus nucleocapsid protein and application to the diagnosis of hemorrhagic fever caused by South American arenaviruses. Clin Vaccine Immunol16:1132-1138, 2009

2) Saijo M. Emerging and re-emerging infection threats to society. J Disaster Res 4:291-297, 2009

3) Saijo M, Morikawa S, Kurane I. Diagnostic systems for viral hemorrhagic fevers and emerging viral infections prepared in the National Insititute of Infectious Diseases. J Disaster Res 4:315-321, 2009

4) Morimoto K, Saijo M. Imported rabies cases and preparedness for rabies in Japan. J Disaster Res 4:346-357, 2009

5) Yamada S, Nozawa N, Katano H, Fukui Y, Tsuda M, Tsutsui Y, Kurane I, Inoue N. Characterization of the guinea pig cytomegalovirus genome locus that encodes homologs of human cytomegalovirus major immediate-early genes, UL128, and UL130. Virology 391:99-106, 2009.

6) Kurashina Y, Liu X, Kato C, Inoue N, Saneyoshi M, Yamaguchi, T. Influence of 3'-azido- 2',3'-dideoxyguanosine treatment on telomere length in human telomerase-immortalized human fibroblast cells. Nucleic Acids Symp 53:249-250, 2009

7) 大野秀明，宮崎義継．微生物の種類別にみた施設内感染制御 3）真菌 アスペルギルス 医療福祉施設における感染制御と臨床検査．臨床検査 53:1381-1386, 2009.

8) Oda M, Isoyama K, Ito E, Inoue M, Tsuchida M, Kigasawa H, Kato K, Kato S. Survival after cord blood transplantation from unrelated donor as a second hematopoietic stem cell transplantation for recurrent pediatric acute

myeloid leukemia. Int J Hematol 89:374-382, 2009

9) Yazaki M, Atsuta Y, Kato K, Kato S, Taniguchi S, Takahashi S, Ogawa H, Kouzai Y, Kobayashi T, Inoue M, Kobayashi R, Nagamura-Inoue T, Azuma H, Takanashi M, Kai S, Nakabayashi M, Saito H. Japan Cord Blood Bank Network. Incidence and risk factors of early bacterial infections after unrelated cord blood transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 15:439-446, 2009

10) Yagasaki H, Kojima S, Yabe H, Kato K, Kigasawa H, Sakamaki H, Tsuchida M, Kato S, Kawase T, Muramatsu H, Morishima Y, Kodera Y. Tacrolimus/Methotrexate versus cyclosporine/methotrexate as graft-versus-host disease prophylaxis in patients with severe aplastic anemia who received bone marrow transplantation from unrelated donors: results of matched pair analysis. Biol Blood Marrow Transplant 15:1603-1608, 2009

11) Wada K, Mizoguchi S, Ito Y, Kawada J, Yamauchi Y, Morishima T, Nishiyama Y, **Kimura H**. Multiplex real-time PCR for the simultaneous detection of herpes simplex virus, human herpesvirus 6, and human herpesvirus 7. Microbiol Immunol 53:22-29, 2009

12) Ito Y, Shibata-Watanabe Y, Kawada J, Maruyama K, Yagasaki H, Kojima S, **Kimura H**. Cytomegalovirus and Epstein Barr virus coinfection in three toddlers with prolonged illness. J Med Virol 81:1399-1402, 2009

13) Kimura H, Miyake K, Yamauchi Y, Nishiyama K, Iwata S, Iwatsuki K, Gotoh K, Kojima S, Ito Y, Nishiyama Y. Identification of Epstein-Barr virus (EBV)-infected lymphocyte subtypes by flow cytometric in situ hybridization in EBV-associated lymphoproliferative diseases. J Infect Dis 200:1078-1087, 2009

14) Cohen JI, Kimura H, Nakamura S, Ko Y-H, Jaffe ES. Epstein-Barr virus associated lymphoproliferative disease in non-immunocompromised hosts. Ann Oncol 20:1472-1482, 2009

15) Soeta N, Terashima M, Gotoh M, Mori S, Nishiyama K, Ishioka K, Kaneko H, Suzutani T. An improved rapid quantitative detection and identification method for a wide range of fungi. J Med Microbiol 58:1037-1044, 2009

16) Takagi S, Masuoka K, Uchida N, Taniguchi S, et al. High incidence of haemophagocytic syndrome following umbilical cord blood transplantation for adults. Br J Haematol 147:543-553, 2009.

17) Matsuno N, Wake A, Uchida N, Taniguchi S, et al. Impact of HLA disparity in the graft-versus-host direction on engraftment in adult patients receiving reduced-intensity cord blood transplantation. Blood 114:1689-1695, 2009

18) Muramatsu H, Watanabe N, Matsumoto K, Ito M, Yoshikawa T, Kato K, Kojima S. Primary infection of human herpesvirus-6 in an infant who received cord blood SCT. Bone Marrow Transplant 43:83-84, 2009

19) Ohta A, Fujita A, Murayama T, Iba Y, Kurosawa Y, Yoshikawa T, Asano Y. Recombinant human monoclonal antibodies to human cytomegalovirus glycoprotein B neutralize virus in a complement-dependent

manner. Microbe Infect 11:1029-1036, 2009

20) 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

21) Yagi T, Hattori H, Ohira M, Nakamichi K, Takayama-Ito M, Saijo M, Shimizu T, Ito D, Takahashi K, Suzuki N. Progressive multifocal leukoencephalopathy developed in incomplete Heerfordt syndrome, a rare manifestation of sarcoidosis, without steroid therapy responding to cidofovir. Clinical Neurology and Neurosurgery 112:153-156, 2010

22) 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

23) 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

24) 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

25) Isoyama K, Oda M, Kato K, Nagamura-Inoue T, Kai S, Kigasawa H, Kobayashi R, Mimaya J, Inoue M, Kikuchi A, Kato S. Long-term outcome of cord blood transplantation from unrelated donors as an initial transplantation procedure for children with AML in Japan. Bone Marrow Transplant 45:69-77, 2010

26) Kudo K, Ohga S, Morimoto A, Ishida Y, Suzuki N, Hasegawa D, Nagatoshi Y, Kato S, Ishii E. Improved outcome of refractory Langerhans cell histiocytosis in children with hematopoietic stem cell transplantation in Japan. Bone Marrow Transplant 45:901-906, 2010

27) Ohga S, Kudo K, Ishii E, Honjo S, Morimoto A, Osugi Y, Sawada A, Inoue M, Tabuchi K, Suzuki N, Ishida Y, Imashuku S, Kato S, Hara T. Hematopoietic stem cell transplantation for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. Pediatr Blood Cancer 54:299-306, 2010

28) Yabe H, Koike T, Shimizu T, Ishiguro H, Morimoto T, Hyodo H, Akiba T, Kato S, Yabe M. Natural pregnancy and delivery after unrelated bone marrow transplantation using fludarabine-based regimen in a Fanconi anemia patient. Int J Hematol 91:350-351, 2010

29) Oshima K, Hanada R, Kobayashi R, Kato K, Nagatoshi Y, Tabuchi K, Kato S; for the Hematopoietic Stem Cell Transplantation Committee of the Japanese Society of Pediatric Hematology. Hematopoietic stem cell transplantation in patients with severe congenital neutropenia: An analysis of 18 Japanese cases. Pediatr Transplant 14:657-663, 2010

30) 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 115:2723-2724, 2010

31) 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 116:1369-76, 2010

32) 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 116:2839-46, 2010

33) 渡辺修大, 足立壮一, 堀部敬三, 永利義久, 加藤剛二, 田渕 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 24:32-36, 2010

34) 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 202:461-469, 2010.

35) Kiuchi T, Onishi Y, Nakamura T. Small-for-size graft: not defined solely by being small for size. Liver Transpl 16:815-817, 2010

36) 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 72:119-127, 2010

37) 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

38) 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 GeneExpression in Patients with Chronic Active EBV Infection. J Gen Virol 90:42-50, 2010

39) Funahashi Y, Iwata S, Ito Y, Kojima, Yoshikawa T, Hattor R, Gotoh M, Nishiyama Y, **Kimura H**. Multiplex real-time PCR assay for quantifying BK polyomavirus, JC polyomavirus, and adenovirus DNA simultaneously. J Clin Microbiol 48: 825-830, 2010

40) 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. Microbiol Immunol 54:516-522, 2010

41) Calatini S, Sereti I, Scheinberg P, **Kimura H**, Childs R, Cohen JI. Detection of EBV

genomes in plasmablasts/plasma cells and non-B cells in the blood of most patients with EBV lymphoproliferative disorders using Immuno-FISH. Blood 116:4546-4559, 2010

42) Miura T, Kawakami Y, Otsuka M, Hachiya M, Yamanoi T, Ohashi K, Suzutani T, Yamamoto T. Cutaneous cryptococcosis in a patient with cirrhosis and hepatitis C virus infection. Acta Derm Venereol 90:106-107, 2010

43) Takagi S, Ota Y, Uchida N, Taniguchi S, et al. Successful engraftment after reduced-intensity umbilical cord blood transplantation for myelofibrosis. Blood 116:649-652, 2010

44) Suzuki R, Ihira M, Enomoto Y, Yano H, Maruyama F, Emi N, Asano Y, Yoshikawa T. Heat denaturation increases the sensitivity of the cytomegalovirus loop-mediated isothermal amplification method. Microbiol Immunol 54:466-470, 2010

45) Ihira M, Sugiyama H, Enomoto Y, Higashimoto Y, Sugata K, Asano Y, Yoshikawa T. Direct detection of human herpesvirus 6 DNA in serum by variant specific loop-mediated isothermal amplification in hematopoietic stem cell transplant recipients. J Virol Methods 167:103-106, 2010

46) Nakamura T, Sato Y, Watanabe D, Ito H, Shimonohara N, Tsuji T, Nakajima N, Suzuki Y, Matsuo K, Nakagawa H, Sata T, Katano H. Nuclear localization of Merkel cell polyomavirus large T antigen in Merkel cell carcinoma. Virology 398: 273-279, 2010

47) Kanno T, Sato Y, Nakamura T, Sakamoto K, Sata T, Katano H. Genotypic and clinicopathological characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection in Japan. J Med Virol 82:400-406, 2010

48) Shiota T, Kurane I, Morikawa S, Saijo M. Long-term observation of HSV-1 infections in a child with Wiskott-Aldrich syndrome and possible mechanism of TK-negative HSV-1 in humans. Jpn J Infect Dis 64:121-126, 2011

49) Shiota T, Wang L, Ito M, Iizuka I, Ogata M, Tsuji M, Nishimura H, Taniguchi S, Morikawa S, Kurane I, Mizuguchi M, Saijo M. Expression of herpes simplex virus type 1 recombinant thymidine kinase and its application to a rapid antiviral sensitivity assay. Antiviral Res 91:142-149, 2011

50) Nakamichi K, Kurane I, Saijo M. Evaluation of a quantitative real-time PCR assay for detection of JC polyomavirus DNA in cerebrospinal fluid without the need for nucleic acid extraction. Jpn J Infect Dis 64:211-216, 2011

51) Ishibashi K, Tokumoto T, Tanabe K, Shirakawa H, Hashimoto K, Kushida N, Yanagida T, Shishido K, Aikawa K, Toma H, Inoue N, Yamaguchi O, Suzutani T. The lack of antibodies against the AD2 epitope of cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B (gB) is associated with CMV disease after renal transplantation in recipients having gH serotypes same as their donors. Transplant Infec Dis 13:318-323, 2011.

52) Inoue, N. Chapter 84 Human herpesvirus 5 (cytomegalovirus), pp949-962. In: (Ed) Liu D, "Molecular detection of human viral pathogens" Taylor & Francis CRC Press. 2011