

- 堂, 352-358, 東京, 2011.
- 10) 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
 - 11) 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.
 - 12) 堀内一宏, 山田萌美, 白井慎一, 高橋育子, 加納崇裕, 金子幸弘, 秋沢宏次, 梅山 隆, 宮崎義継, 矢部一郎, 佐々木秀直: 脳室内抗真菌薬投与が奏功した *Cryptococcus gattii* による脳および肺クリプトコックス症の1例. 臨床神経学 (in press).
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回日本医真菌学会学術集会, 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) 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)
- 14) 梅山隆, 大野秀明, 棚町千代子, 橋本好司, 佐川公矯, 田辺公一, 山越智, 宮崎義継. 福岡県筑後地区周辺におけるクリプトコックス症多発発生例の疫学的検討. 第 22 回日本臨床微生物学会総会, 岡山, 2011(1 月)
- 15) 田辺公一, 大野秀明, 山越智, 宮崎義継. タイにおける自然環境からの *Histoplasma capsulatum* の検出に関する検討. 第 59 回日本感染症学会東日本地方会学術集会, 東京, 2010(10 月)
- 16) 若山 恵, 大久保陽一郎, 篠崎 稔, 中山晴雄, 蜜田亜希, 大野秀明, 宮崎義継, 中谷行雄, 亀井克彦, 渋谷和俊. In situ hybridization を用いたヒトヒストプラスマ症の組織診断の検討. 第 54 回日本医真菌学会総会, 東京, 2010(10 月)
- 17) 高園貴弘, 泉川公一, 行徳 宏, 池田直樹, 神田哲郎, 宮崎泰可, 関雅文, 掛屋弘, 山本善裕, 柳原克紀, 大野秀明, 矢口貴志, 宮崎義継, 亀井克彦, 河野茂. 軽症の糖尿病患者に発症した *Aspergillus udagawae* による気管支アスペルギルス症の 1 例. 第 54 回日本医真菌学会総会, 東京, 2010(10 月)
- 18) 宮崎義継, 山越智, 金子幸弘, 福田恵子, 田辺公一, 梅山隆, 大野秀明, 金城雄樹. 真菌感染局所におけるヒト線維芽細胞の線維化と炎症への影響. 第 54 回日本医真菌学会総会, 東京, 2010(10 月)
- 19) 大野秀明. ガイドラインをふまえた中枢神経系真菌感染症の治療法. 第 17 回新潟神経疾患研究会, 新潟, 2010(9 月)
- 20) 大野秀明. 自然環境と深在性真菌症-地域流行型真菌症も含めて-. 第 8 回三菱化学メディエンス FORUM' 10, 東京, 2010(7

- 月)
- 21) 大野秀明. レクチャー3 呼吸器感染症の ABC 3.肺抗酸菌症. 第 58 回日本化学療法学会総会, 長崎, 2010(6 月)
- 22) 田辺公一, 名木稔, 山越智, 大野秀明, 宮崎義継. 病原真菌 ABC タンパク質と機能阻害物質との相互作用部位の検討. 第 58 回日本化学療法学会総会, 長崎, 2010(6 月)
- 23) 金子幸弘, 今村圭文, 大野秀明, 河野茂, 宮崎義継. *Candida albicans* の biofilm に対する抗真菌薬の拮抗作用に関連した Hsp90 関連ストレス応答に関する検討. 第 58 回日本化学療法学会総会, 長崎, 2010(6 月)
- 24) 名木稔, 田辺公一, 山越智, 大野秀明, 宮崎義継. 病原真菌 *Candida glabrata* におけるステロールトランスポーターの機能解析. 第 58 回日本化学療法学会総会, 長崎, 2010(6 月)
- 25) 樽本憲人, 金城雄樹, 山越 智, 大野秀明, 宮崎義継. *Candida albicans* の細胞壁分泌蛋白抗体による in vitro 増殖抑制効果の検討. 第 58 回日本化学療法学会総会, 長崎, 2010(6 月)
- 26) 宮崎義継, 梅山隆, 田辺公一, 大野秀明. ヒストプラスマ等のアウトブレイク型真菌症への対策. 第 31 回衛生微生物技術協議会, 鹿児島, 2010(5 月)
- 27) 金子幸弘, 大野秀明, 河野茂, 宮崎義継. *Candida albicans* の抗真菌薬治療抵抗性と Hsp90 関連ストレス応答. 第 84 回日本感染症学会総会, 京都, 2010(4 月)
- 28) 乾佐知子, 中村竜也, 清水千裕, 奥田和之, 佐野一, 中田千代, 藤本弘子, 大倉ひろ枝, 植村芳子, 田辺公一, 大野秀明, 宮崎義継, 高橋伯夫. *Candida glabrata* の薬剤感受性と micafungin 低感受性株の検出について. 第 84 回日本感染症学会総会, 京都, 2010(4 月)
- 29) 田辺公一, 大野秀明, 宮崎義継. *Candida glabrata* のステロール取り込みと病原性の関係. 第 84 回日本感染症学会総会, 京都, 2010(4 月)
- 30) Ohno H, Tanabe K, Kaneko K, Umeyama T, Yamagoe S, Miyazaki Y. Evaluation of two-stage PCR for diagnosis of Histoplasmosis. 12th Western Pacific Congress on Chemotherapy and Infectious Diseases, Singapore, 2010 (12 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

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 (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:移植医療で問題となる 2 つのウイルス感染症の診断に関する研究を行った。一つはサイトメガロウイルス(CMV)であり, CMV 感染細胞の新規生物学的検出法である PML 法(promyelocytic leukemia protein body assay)を利用し, 造血幹細胞移植後患者の末梢血単核球における活動性 CMV を高感度に検出した。また, 本法で薬剤感受性試験を行うことも可能であることが確認された(J Med Virol 2012, 84:479-486)。PML 法でガンシクロビル感受性低下株とされたものの中には, 薬剤耐性獲得となる遺伝子変異が検出されないものもあった。この原因として, 細胞種により CMV の増殖性が異なることが推察された。分離ウイルスの性状解析から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が示唆された。JC ウイルス感染症の病理診断に関する研究も行い, 免疫不全患者に発症した進行性多巣性白質脳症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

ヒトサイトメガロウイルス(human cytomegalovirus, HCMV)は免疫抑制下の造血幹細胞/臓器移植患者にしばしば重篤な症状を引き起し, 継続的なモニタリングが必須なウイルスである。予防的措置が重要で, ガンシクロビル(GCV)をはじめとする抗ウイルス薬の長期投与が行われる頻度が高い。現在使用さ

れている抗ウイルス薬による治療効果は患者の免疫状態に左右され, 長期投与後には一定の確率で耐性ウイルスが出現する。そのため, 抗ウイルス薬の効果が低い場合には薬剤耐性ウイルスとの鑑別が重要である。これまでの薬剤感受性試験はウイルス分離に長時間を必要とするために実用性に乏しかった。本研究では移植医療において有用な phenotypic な抗 CMV 薬に対する薬剤感受性試験法の開発を目指して, CMV の細胞への感染能を評価する PML(promyelocytic leukemia protein body)法を利用することで, 移植医療現場において, ウイルス分離なしで, 迅速, かつ正確な薬剤感受性試験の実施可能性を検証した。

また, 進行性多巣性白質脳症(progressive multifocal leukoencephalopathy, PML)は脳のオリゴデンドロサイトに JC ウイルス(JCV)が溶解感染し, その結果, 脱髄が起きて発症する疾患である。PML は, JCV の初感染に伴い発症するわけではなく, 宿

主の免疫不全状態に伴い腎臓に持続感染している JCV が再活性化することにより起こる。免疫不全状態でない健常人の 8 割で持続感染が成立していることから、PML 発症に関わらず血清中の JCV 抗体は陽性となり、JCV の血清学的検査は診断価値が低い。PML の発症とウイルス血症の間には明らかな相関がなく、PML 診断において最も重要な検査は、髄液や脳組織内に JC ウイルスの存在を証明することである。特に脳組織で JC ウイルス抗原陽性細胞を検出することは直接的に脳内で JC ウイ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と考えられている。現在、JC ウイルスの免疫組織化学には JC ウイルス粒子外殻タンパク質の VP1 に対する特異抗体が用いられているが、脱髄が進んだ病変等では典型的な染色パターンを示さない症例が散見され、確定診断に苦慮することがある。そこで、本研究では、JCV の溶解感染時に発現するウイルスタンパク質である VP1 と VP2、agnoprotein に対する特異抗体を用いた免疫組織化学を行うことにより、PML 診断の精度向上を試みた。

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]

1) 対象と試料

造血幹細胞移植後にアンチゲネミア試験陽性と判定された 20 症例、25 検体の血液検体(EDTA 加血)を用いた。20 症例(年齢中央値、50, range17-65, 男女比 1:1)の内訳は急性骨髄性白血病 7 例、再生不良性貧血 5 例、急性リンパ性白血病 3 例、成人 T 細胞性白血病、及び、びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 各 2 例、慢性骨髄性白血病 1 例であり、移植の種類は骨髄移植 10 例、末梢血幹細胞移植 7 例、臍帯血移植 3 例(HLA 適合及び不適合ドナーからの移植が各 3 例及び 4 例)であった。

2) 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(図 1)。薬剤感受性試験では、様々な複製段階に進んだウイルスが存在し、抗ウイルス剤(GCV 他)の作用点を通過後のウイルスが培養開始時において含まれていると予想されることから、その影響を考慮し、SE/15 細胞を培養初日(ExpD0)と 3 日後(ExpD3)に添加した。抗ウイルス剤存在下及び非存在下で培養後、抗ウイルス剤存在下での PML 陽性細胞数を指標に薬剤感受性試験を施行した(図 1)。

3) ウイルス分離とプラーク法による薬剤感受性試験および増殖能評価

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。分離後の薬剤感受性試験はヒト線維芽細胞を用いて常法(プラーク減少法)に従った。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計測した。

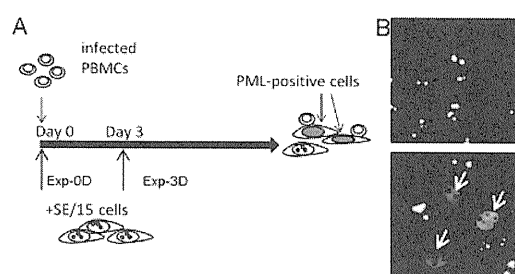


図 1. PML 法による薬剤感受性試験の概要。

A. PML 法による薬剤感受性試験の概要図, B. 非感染 SE/15 細胞(上)と PML 陽性細胞(下, 矢印)の蛍光顕微鏡写真例

[JC ウイルス感染症の病理学的解析]

1) 検体

国立感染症研究所感染病理部にコンサルテーションされ保存されている、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。

2) 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。

(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]

1) 活動性 CMV の PML 法による検出

造血幹細胞移植後の 25 検体の PBMC を用いて、活動性 CMV を PML 法により検出可能かどうか試験した。患者由来 PBMC と SE/15 細胞の約 5 日の共培養により CMV 陽性細胞(PML の局在がびまん性に変化した細胞)が検出され、試料中の活動性ウイルスを検出可能であることを確認した(J Med Virol 2012, 84:479-486)。並行して行ったウイルス分離成績 44%に対し、PML 法では 76%と高い検出率が得られ、ウイルス分

離されない検体でも PML 法により検出可能であった。一部では PML 法の結果とゲノム量、アンチゲネミア試験値が乖離している検体も見られた。

2) 薬剤感受性試験

造血幹細胞移植後患者より得た PBMC を *in vitro* にて培養し薬剤感受性試験を施行した。PML 陽性細胞が確認された 19 例のうち 1 例を PML 法で GCV に対する感受性低下と判定した(#hsct-17, 図 2)。薬剤耐性遺伝子変異解析からは UL54 および UL97 の変異が検出され、本法により GCV 耐性株を検出可能であることが確認された。臨床サイドではこの情報を受け抗 CMV 剤を変更したところ、本症例の CMV アンチゲネミア値は急速に陰性化した。

19 検体中、この他に 5 検体で感受性低下の可能性が示唆されたが、遺伝子解析結果から薬剤耐性獲得となる遺伝子変異は検出されず、分離ウイルスを用いたプラーク減少法でも IC50 の上昇は認められないことから、偽感受性低下であると推論された。

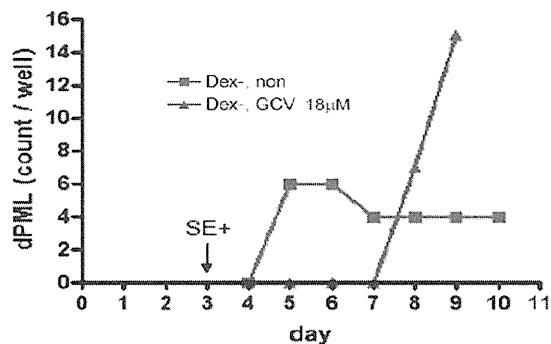


図 2. #hsct-17 の PML 法による薬剤感受性試験結果。本検体はその後の遺伝子解析において薬剤耐性獲得となる UL54 (T301I)及び UL97(C603W)の変異が検出された。

一方、他の 1 例(#hsct-22)では PML 法で GCV 感受性ありと判定されたが、直後に CMV アンチゲネミア値の異常上昇(7000<)がおき、ゲノム遺伝子解析結果から薬剤耐性獲得となる遺伝子変異が検出された。この検体が PML 法での薬剤耐性が不検出であったのは、PBMC

におけるウイルス増殖性の低下などによる PML 陽性細胞数の低値が原因として予想された。そこで、#hsct-22 の分離ウイルス株をウイルス学的に解析したところ、#hsct-22 株ウイルスは PBMC でのウイルス増殖能が線維芽細胞に比較してかなり低下していた (図 3)。

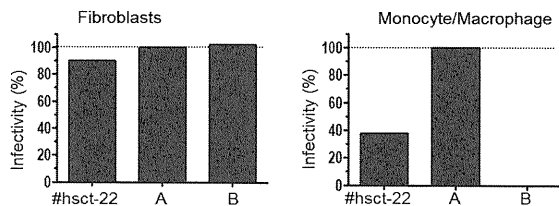


図 3. #hsct-22 分離ウイルスの In vitro 複製能の比較. A, B PBMC 向性株 (陽性コントロール) B, PBMC 非向性株 (陰性コントロール)

3) 分離ウイルス株を用いた増殖能の評価

さらに、ウイルスが分離された 11 株について in vitro 培養でのプラークサイズを測定し線維芽細胞での増殖性を検討した。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 5035 ± 1299 (Mean \pm SD) となり、試験した 11 検体の平均値 12134 ± 5813 (Mean \pm SD) に比して小さく、線維芽細胞での増殖能が低い傾向を示した。プラークサイズに影響を及ぼす UL128-131 遺伝子および RL13 遺伝子のゲノムには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。

[JC ウイルス感染症(PML)の病理学的解析]

1) PML の臨床病理疫学

PML 確定例 24 例の病理組織を検討した。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。

2) PML における JCV のコードするタンパク発現

10 例の PML 確定例の病理組織を用いて、VP1, VP2, Agno の免疫組織化学を行った。その結果、VP1 の主な局在は感染細胞の核内であったが

(図 4)、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 は、感染細胞の核内のみでシグナルが見られ、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 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。

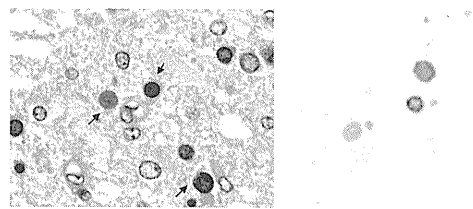


図 4. PML 脳病変における JCV VP1 の発現。

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。

D. 考察

CMV の細胞への感染能を評価する PML 法を利用した薬剤感受性試験により GCV 耐性株の検出がウイルス分離なしで可能であることが示された。しかしその一方で、#hsct-22 検体のように薬剤耐性ウイルスの検出が困難な検体が存在することも判明した。#hsct-22 ウイルス株は UL128-UL131 遺伝子群に大きな変異は認められなかったこと、および #hsct-22 の検体ではウイルス分離 1 代目において線維芽細胞での増殖能がすでに高かったことから、もともと PBMC でのウイルス複製能の低い株であったことが考えられた。このように、造血幹細胞移植後患者の血液中には異なる指向性、感受性をもつ複数のウイルス株による重感染の可能性があり、複雑な背景があり、薬剤感受性検査にもこれらを考慮する

必要がある。これまで我々が確立した PML 法の各種組織由来レポーター細胞（線維芽細胞，上皮細胞，単球系細胞）を用いて，in vivo での感染動態の評価など詳細なウイルス学的検討を行い，今後の更なる改良を行う予定である。

PML症例の脳組織検体10例を用いた免疫組織化学の結果では，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やAgnoに対する抗体は細胞障害に伴い，局在が変化し，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に対する抗体は病変中心部でも明瞭に感染細胞を検出する。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を行うことが望ましい。

E. 結論

PML 法を造血幹細胞移植後患者の血液検体に応用し，血液中の活動性 CMV を高感度に検出できることを確認した。本法によりウイルス分離なしで GCV 耐性株が検出可能であることが確認されたが，指向性，感受性の異なる複数のウイルス株による重感染の可能性などを考慮した改良が今後さらに必要である。

また，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。脳生検検体における JCV 感染の確定診断には 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, 2012
- 2) Fukumoto H, Kanno T, Hasegawa H, Katano H: Pathology of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection, *Front Microbiol* 2011, 2:175
- 3) Katano H, Kano M, Nakamura T, Kanno T, Asanuma H, Sata T. A novel real-time PCR system for simultaneous detection of human viruses in clinical samples from patients with uncertain diagnoses. *J Med Virol* 83: 322-330, 2011
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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
- 7) 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

2.学会発表

- 1) 上野智規, 栄鶴義人, 片野晴隆, 佐多徹太郎, 後藤希代子. PML 法を用いた HCMV 臨床分離株の細胞指向性の解析. 第 24 回ヘルペスウイルス研究会, 三島 (2009.7)
- 2) Ueno T, Katano H, Yamamoto H, Taniguchi S, Eizuru Y, Sata T, Ogawa-Goto, K. Establishment of rapid phenotypic susceptibility testing for anti-HCMV drugs using PML assay. 14th International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections: Kobe, Japan(2009.10)
- 3) 上野智規, 片野晴隆, 山本久史, 大島久美, 谷口修一, 神田善伸, 桐山智美, 佐多徹太郎, 後藤希代子. PML 法を用いたヒトサイトメガロウイルスの phenotypic 薬剤感受性試験法と臨床血液検体への応用, 第 58 回日本ウイルス学会, 徳島(2010.11)
- 4) 佐々木純, 上野智規, 片野晴隆, 佐多徹太郎, 後藤希代子. PML 法を用いた HCMV の上皮細胞間感染の評価系の確立. 第 58 回日本ウイルス学会, 徳島(2010.11)
- 5) 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(2011.6)
- 6) 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 (2011.9)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 片野晴隆 (研究分担者)

特許第4299724号「ヘルペスウイルス前初期遺伝子産物の検出方法」発明者:上野智規, 後藤希代子, 入江伸吉, 片野晴隆, 佐多徹太郎 2009.4.24 登録

2) 後藤希代子(研究協力者)

① 特許第4299724号「ヘルペスウイルス前初期遺伝子産物の検出方法」発明者:上野智規, 後藤希代子, 入江伸吉, 片野晴隆, 佐多徹太郎 2009-4.24 登録

② 特願 2010-105396:「サイトメガロウイルスの検出のための細胞株およびその細胞株を使用した検出方法」発明者:後藤希代子, 上野智規, 佐々木純

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: 3年の研究期間において造血細胞移植後におけるウイルス感染症に関する精緻なモニタリングの検査系を確立し, そのモニタリング結果に基づいて移植患者の治療管理への応用を行った. 造血細胞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, VZV, HHV-6 のいずれにおいても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.

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, 杉本達哉, 村上美知, 中塩屋千絵

A. 研究目的

臓器移植や造血細胞移植においては移植後の免疫不全状態に起因する易感染性により種々の感染症が多発すると同時に重症化しやすい. 本研究の目的は移植後の感染症と感染免疫反応について詳細に把握し, 移植関連死亡の低下と QOL の向上を目指すことを目的とした.

B. 研究方法

造血細胞移植におけるウイルス感染症と真菌感染症について以下のような検討を行った.

1. 病原体検索

リアルタイム PCR により精緻な感染の定量的なモニタリングを行った. 対象としたウイルスはサイトメガロウイルス(CMV), Epstein-Barr ウイルス(EBV), ヒトヘルペスウイルス6型(HHV-6)の3種類で, 移植前処置開始直前から移植後毎

週1回定期的に患者全血を用いてリアルタイム PCR 検査を実施した. また, CMV については抗原血症(antigenemia)試験も実施した.

2. 宿主側の免疫反応

抗原特異的リンパ球幼若化反応により抗原毎の細胞性免疫の経時的なモニタリングを行った. 対象とした mitogen と抗原は IL-2, アロ抗原, CMV 抗原, 水痘 VZV 抗原, アデノウイルス抗原で, 移植前処置開始直前から移植後毎月1回定期的に患者リンパ球を用いて幼若化試験を実施した.

C. 研究結果

<平成 21 年度>

1. 移植後早期には CMV, EBV, HHV-6 の再活性化が高頻度に認められた.
2. CMV においてはリアルタイム PCR の増加が先行し, 抗原血症において陽性となった時点において早期治療が開始され, CMV 感染症が重症化することはなかった.
3. EBV においては抗リンパ球グロブリン(ATG)使用例で再活性化が多い傾向が認められ, リアルタイム PCR 著増例や移植後リンパ球増殖性疾

患 (PTLD) 発症例においてはリツキサンの投与を行うことにより致命的な転帰を回避できた。

4. VZV においてはVZV特異的リンパ球幼若化反応により VZV に対する特異的な細胞性免疫の回復を正確に把握することが可能で、移植後のアシクロビル投与と中止の時期の判断に役立った。

<平成 22 年度>

1. 造血細胞移植後に血液中の EBV コピー数が著明に増加した3症例において、リアルタイム PCR の結果を基に移植後リンパ増殖症 (EBV-LPD) の早期診断が可能となり、CD20 モノクローナル抗体である Rituximab の治療が奏功した。
2. HHV-6 ウイルスに対する抗原特異的リンパ球幼若化反応 (HHV-6 LPR) のアッセイ系を確立し、HHV-6 に対する細胞性免疫反応を定量的に評価することが可能となった。
3. 造血細胞移植後の HHV-6 ウイルスコピー数と HHV-6 LPR を経時的に検査した結果、移植によりレシピエントの特異的免疫能が消失することにより HHV-6 ウイルス血症が起こり、引き続いてドナー由来のリンパ球による HHV-6 特異的細胞性免疫が成立することが明らかになった。

<平成 23 年度>

1. 小児造血細胞移植において各種ウイルス感染症の動態を移植細胞源別に比較した。
2. CMV 再活性化は血縁骨髄移植の 6 例中 3 例、非血縁骨髄移植の 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髄移植で 3588 copy/ml、非血縁骨髄移植で 1160 copy/ml、非血縁臍帯血移植で 448 copy/ml であった。
3. EBV 再活性化は血縁骨髄移植の 6 例中 3 例、非血縁骨髄移植の 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) は血縁骨髄移植で 7450 copy/ml、非血縁骨髄移植で 8200 copy/ml であった。

4. HHV-6 の再活性化は血縁骨髄移植の 6 例中 4 例、非血縁骨髄移植の 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髄移植で 36 copy/ml、非血縁骨髄移植で 1665 copy/ml、非血縁臍帯血移植で 13036 copy/ml であった。

5. CMV に対する幼若化反応 (stimulation index; SI) は骨髄移植後 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、特に骨髄移植例で移植後 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

3年の研究期間において造血細胞移植後におけるウイルス感染症に関する精緻なモニタリングの検査系を確立し、そのモニタリング結果に基づいて移植患者の治療管理への応用を行ったが、移植医療の現場においては極めて有用なものとなった。

ウイルス感染症の診断におけるリアルタイムPCRは定量的な評価が可能であり、病原体であるウイルスの増殖動態を正確かつ迅速に行えるようになり、治療開始と治療終了の時期の決定に役立った。

一方我々が開発したウイルスあるいは真菌抗原特異的リンパ球幼若化反応は、抗原毎のT細胞免疫能を評価することが可能であり、宿主側の病原体に対する免疫機能を正確に把握した上で実施すべき治療法の選択と、実施した治療法の効果判定に役立った。

HSV, VZV, CMV, EBV などのヘルペスウイルスに対する治療法には一定の進歩が見られる中、HHV-6 はとくに臍帯血移植において発症頻度が高く、また適切な治療法がないために重症化しやすい

ことが問題となっている。

今回の検討において臍帯血移植においては他の移植方法と比較して HHV-6 に対する特異的細胞性免疫の獲得が遅れる傾向が認められた。臨床的に臍帯血移植において HHV-6 感染症が重症化しやすいことを裏付けるものとして注目される結果と言える。今後症例数の蓄積と観察継続によりさらに詳細を明らかにする必要がある。

また、このような結果を踏まえて HHV-6 特異的細胞障害性Tリンパ球(CTL)の誘導などを試みて、有効的な抗ウイルス剤のないウイルス感染症の治療法の開発を計画するための理論的基盤を作ることができたものと考えている。

E. 結論

造血細胞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, ZVZ, HHV-6 のいずれにおいても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) 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(3):374-382, 2009
- 2) 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(4):439-446, 2009

- 3) 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(1):69-77, 2010
- 4) 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(5):901-906, 2010
- 5) 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(12):1603-1608, 2009
- 6) 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(2):299-306, 2010
- 7) 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(2):350-351, 2010

- 8) 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(5):657-663, 2010
- 9) 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(13):2723-2724, 2010
- 10) 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(8):1369-1376, 2010
- 11) Tomita Y, Yasuda Y, Hyodo H, Koike T, Shimizu T, Morimoto T, Hattori K, Matsumoto M, Inoue H, Yabe H, Yabe M, Shinohara O, Kojima S, Minemura T, Kato S. High incidence of fatty liver and insulin resistance in long-term adult survivors of childhood stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant* 46(3):416-425, 2011
- 12) 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(15): 2839-2846, 2010
- 13) Masuda H, Alev C, Akimaru H, Ito R, Shizuno T, Kobori M, Horii M, Ishihara T, Isobe K, Isozaki M, Itoh J, Itoh Y, Okada Y, McIntyre BA, Kato S, Asahra T. Methodological development of a clonogenic assay to determine progenitor cell potential. *Circ Res* 109(1):20-37, 2011
- 14) 渡辺修大, 足立壮一, 堀部敬三, 永利義久, 加藤剛二, 田淵 健, 吉見礼美, 加藤俊一, 矢部普正. 日本小児白血病リンパ腫研究グループ (JPLSG)SCT 委員会 小児急性骨髄性白血病第一寛解期での HLA 一致同胞間骨髄移植における GVHD 予防 (MTX 単独 vs. CyA 群) の比較 日本小児血液学会雑誌 24(1):32-36, 2010
- 15) 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):1023-1025, 2011
- 16) 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):1148-1150, 2011
- 17) 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
- 18) 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* 17(12):1814-1821, 2011
- 19) 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):2941–2950, 2011
- 20) 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* 18(11):3186–90, 2011
- 21) 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*. 2011 Jul 25. doi: 10.1111/j.1525-1594.
- 22) 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* 2011 Aug 23. [Epub ahead of print]
- 23) 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* 2011 Oct 18. [Epub ahead of print]
- 24) 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* 2011 Oct 28. doi: 10.1002/pbc.23384. [Epub ahead of print]
- 25) 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* 2011 Dec 23. [Epub ahead of print]
- 26) 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* 2012 Jan 10. [Epub ahead of print]
- 27) Hyodo H, Ishiguro H, Tomita Y, Takakura H, Koike T, Shimizu T, Morimoto T, Yabe H, Yabe M, Kojima S, Shiraishi 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* 2012 Jan 14 [Epub ahead of print]
2. 著書
- 1) よくわかる造血細胞移植コーディネート. 医薬ジャーナル社 2010 pp1-2 (編集)
- 2) よくわかる小児の造血細胞移植 医薬ジャーナル社 2010 (監修および共著)
- 3) 加藤俊一. 造血細胞移植. 衛藤義勝編:ライゾーム病. 診断と治療社, 東京, pp93-99, 2011.
- 4) 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) Kamiya S, Yonezawa H, Woo T, Kurata S, Zaman C, Hanawa T, Kato S, Osaki T. Biofilm formation by *Helicobacter pylori* and its pathogenesis. 33rd International Congress on Microbial Ecology and Disease. Sep. 6-10, 2010, Athen, Greece.
- 2) Kato S. Cord blood banking and cord blood transplantation in children in Japan. 22nd International Congress of Pediatrics. Oct.14-18, 2010, Tehran, Iran.
- 3) Koike T, Yanagimachi N, Yabe H, Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, Ishiguro H, Takakura H, Kato S. High incidence of radiation induced cavernous hemangioma in long term survivors who underwent BMT with radiation therapy during childhood or adolescence. 2011 BMT Tandem Meeting. Feb. 17-21, 2011, Honolulu, USA.
- 4) Koike T, Yabe H, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Takakura H, Kato S and Yabe M. Recovery of gonadal function after allogeneic stem cell transplantation for Fanconi anemia. 22nd Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium. Oct. 2010, USA.
- 5) Yabe H, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Takakura H, Kato S and Yabe M. Long-term follow-up after unrelated bone marrow transplantation in a patient with dyskeratosis congenita. 22nd Annual Fanconi Anemia Research

Fund Scientific Symposium. Oct. 2010, USA.

- 6) Yabe H, Yabe M, Kato S, Koike T, Takakura H, Hyodo H, Tomita Y, Ishiguro H, Shimizu T, Morimoto T and Akiba T. Recovery of gonadal function after allogeneic stem cell transplantation for aplastic anemia. 第72回日本血液学会総会, 2010年9月, 横浜.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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

1件

特許: 第 4437335 号

名称: 「ヒト未分化造血幹細胞およびその分離方法ならびに分離装置」

発明者: 加藤俊一, 中村嘉彦

取得日: 平成 22 年 1 月 15 日

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(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: 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)を用いた検討を行った。(I)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。(II)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が、新規有効抗体獲得率は低く、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が、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。全体として、接種群における罹患率の低下を含む臨床的効果を確認するには至らなかった。

A. 研究目的

臓器移植後においては、常時免疫抑制下におかれるために日和見感染の危険が高く、さらに、ひとたび罹患すると重篤化する危険がある。そのため、欧米を中心に、安全性とのバランスを考慮したワクチンによる能動免疫によって予防を行うことが推奨されているが、移植後の時期

や臓器の別、免疫抑制の種類や強度、さらに個体差によってその有効性や副反応の危険に差があることが推測される。一方で本邦においては、臓器移植医療の歴史が短いこともあって、こうした移植後慢性的免疫抑制下の能動免疫誘導についての臨床的知見が少なく、抗原刺激による拒絶反応誘発などを恐れて導入に消極的な

施設が少なくない。

本研究では、既往感染の再燃防止策としてのB型肝炎ワクチンと新規感染に対する免疫誘導としてのインフルエンザ・ワクチンを用い、肝移植後慢成期における能動免疫療法の安全性と効果を検討した。

B. 研究方法

(I) 肝移植後潜在感染の再燃防止を目的とした

B型肝炎ワクチン

対象症例を移植時慢性B型肝炎ウイルス(HBV)キャリア群(HBV 関連疾患)とHBc抗体陽性グラフト群(感染既往ドナーから移植を受けた非HBV疾患)に分けた。

移植時慢性HBVキャリア群は9例で40-62歳、全例がHBs抗原陽性で核酸アナログを使用しており、1例にHBs抗体が併存していた。HBc抗原陽性は3例で、移植時に血中HBV-DNAを認めた。キャリア群のドナーは22-60歳、全例HBs抗原は陰性であったが、HBs抗体を7例に認め、うち4例はHBc抗体も陽性であった。

HBc抗体陽性グラフト群は6例で0-49歳(小児3例)、原疾患は胆道閉鎖症(3例)・原発性胆汁性肝硬変・原発性硬化性胆管炎・ウイルソン病であった。ドナーは42-58歳、全例HBs抗原陰性、HBs抗体・HBc抗体ともに陽性であった。

慢性HBVキャリア群では、ワクチンまでの再発予防を核酸アナログと高力価HBs抗体免疫グロブリン(HBIg)にて行い、移植後1年以上を経過して肝胆道型酵素が安定し、免疫抑制剤が原則として1剤となった時点をワクチン導入条件とした。HBVワクチンは、初期にはPreS抗原含有、途中より非含有の製剤を20 μ g毎月筋注で投与した。

ワクチン施行中のHBs抗体価は30 IU/L以上に維持し、適宜HBIgを追加した。HBIgの補充なくHBs抗体価>100 IU/Lとなった時点でワクチンを休止し、3ヶ月以上持続した時点で核酸アナログを中止、再度HBs抗体価<100 IU/Lとなった時点でブースター接種を行なった。

HBc抗体陽性グラフト群ではワクチンまでの再発予防を移植術中のHBIg投与とその後の核酸アナログにて行い(初期2例は核酸アナログなしで術後もHBIg維持投与)、ワクチン導入条件はキャリア群と同じとした。HBVワクチン投与方法もキャリア群と同様とし、初期の2例を除いてHBs抗体価維持は行わなかった。ワクチンと核酸アナログの休止条件、ブースター接種の条件はキャリア群と同様とした。

(II) 肝移植後の新規感染防止を目的としたインフルエンザ・ワクチン

1) 初年度解析(06-08年季)

生体肝移植後の小児38例を対象とし、3年季にわたる三種季節性インフルエンザ・ワクチン(A型H1/A型H3/B型)の解析を行った。移植後接種群は19例に06-07年(7例)・07-08年(15例)・08-09年(11例)の3季のべ33接種を行った(10例は1季のみ、4例は2季のみ、5例は3季)。対照群は、同季に接種を行わなかった肝移植後症例、及び接種を受けた健常児(07年季のみ;69例)とした。3季とも、肝移植後接種群と非接種群で性比、移植後経過期間(平均3.4-5.5年)、接種時年齢(平均7.9-10.5歳)、接種時のタクロリムス濃度(平均1.9-3.4 ng/ml)に有意差を認めなかった。

2) 次年度解析 (09-10 年季)

生体肝移植後の小児 13 例 (6.7±3.9 歳) と 免疫抑制療法下でない障害児 31 例 (対照群; 9.7±3.9 歳; $p=0.041$) を対象とし、単種新型インフルエンザ・ワクチン (A 型 2009H1N1) と三種季節性インフルエンザ・ワクチン (A 型 2007H1N1/A 型 2007H3N2/B 型 2008) の解析を行った。移植群の移植後年数は 4.1±1.8 年、接種時のタクロリムス濃度は 2.1±0.8ng/ml であった。接種条件は初年度解析と同様で、全例に新型インフルエンザ・ワクチンが、移植後患児 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。

3) 最終年度解析 (10-11 年季)

肝移植後慢性期の成人 16 例 (年齢 16.3-70.0 歳, 中央値 53.7 歳) および 小児 15 例 (年齢 2.6-13.8 歳, 中央値 6.4 歳) を対象に、三種インフルエンザ・ワクチン (A 型 2009H1N1/A 型 2007H3N2/B 型 2008) 接種の解析を行った。移植後経過期間は成人群 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、成人群の 9 例と小児群の 2 例が多剤併用であった。接種時のタクロリムストラフ値 (成人群中央値 3.9 ng/ml, 小児群中央値 2.4 ng/ml) には差を認めなかった。

いずれの時期も接種条件は、1) 移植後 1 年以上経過して免疫抑制剤が 1 剤 (2010 年以外)、2) 原疾患再発や活動性拒絶がない、3) 細胞性・液性免疫 (白血球・好中球数, リンパ球刺激試験, T/B 細胞比, 免疫グロブリン分画) が正常、かつ 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。接種量は、1-5 歳 0.2 ml x2 回 (3-4 週間隔)、6-12 歳 0.3 ml x2 回、13 歳以上 0.5 ml x1 回の皮下接種とした。

接種前と最終接種後定期受診時の HI 抗体価を測定し、①有効抗体価保有率 (HI 抗体価 $\geq 1:40$)、②抗体陽転率 (HI 抗体価上昇 ≥ 4 倍または接種前後で $<10/\geq 40$)、③幾何平均抗体価 (GMT) とその変化率を求めた。併せて有害事象、発熱事象、インフルエンザ罹患をモニターした。

(倫理面からの配慮について)

小児例では保護者に対し、成人例では本人に対して、接種に起因する潜在的な利点と危険を説明し同意を得た。研究プロトコールについては、施設の臨床研究審査委員会 (IRB) において審査の上、承認を得た。

C. 研究結果

(I) 肝移植後潜在感染の再燃防止を目的とした B 型肝炎ワクチン

慢性 HBV キャリア群は、ワクチン導入が移植後 12~14 か月で、HBs 抗原と血中 HBV-DNA は術後早期から陰性、HBs 抗体は陽性、HBc 抗体は 2 例で陰性であった。ワクチン接種回数は 3~43 回、開始後追跡期間は 3~47 ヶ月。ワクチン開始後の HBIg 補充量は 0.19~1.0 KIU/月で、一部の症例で減量効果を認めた。上記期間においてワクチン休止基準を満たしたものはなかった。

HBc 抗体陽性グラフト群は、ワクチン導入が移植後 12~78 か月で、全例で HBs 抗原と HBc 抗

体は陰性、HBs 抗体は補充療法の 2 例の他 1 例(移行リンパ球による産生疑い)で陽性であった。ワクチン接種回数は 3~22 回で、開始後追跡期間は 10~47 ヶ月。6 例中 4 例で 3~9 回の接種後 HBs 抗体>100 IU/ml となり接種を休止、そのうち 3 例でブースター接種が行われた。残り 1 例は拒絶反応合併により、複数の免疫抑制剤投与下(プロトコール外)で反応が認められた。残る 1 例は自己免疫性疾患を合併しており、ワクチン反応が認められていない。

両群を対象とした HBV ワクチン反応に関与する因子の単変量解析では、若年齢(中央値 反応群 18.5 歳 vs. 非反応群 51 歳; $p=0.0430$), 女性(女性比率: 反応群 75% vs. 非反応群 18%; $p=0.0390$), ドナーの HBc 抗体力価(反応群 86.7 ± 19.5 vs. 非反応群 43.7 ± 37.1 ; $p=0.0491$), 移植時 HBV 非キャリア状態(キャリア比率: 反応群 0% vs. 非反応群 82%; $p=0.0042$)に有意差がみられた。

(II) 肝移植後の新規感染防止を目的としたインフルエンザ・ワクチン

1) 初年度解析(06-08 年季)

各季とも接種群と非接種群で拒絶反応の頻度(0-5%)に有意差を認めず、接種の重篤な副反応は認めなかった。流行期の発熱は、接種群と非接種群で 06 年季 14.3%対 37.5%, 07 年季 26.7%対 30.0%, 08 年季 18.2%対 25.9%と非接種群に高い傾向があったが有意差なし。インフルエンザ罹患率も 06 年季 0%対 4.2%, 07 年季 6.7%対 10%, 08 年季 9.1%対 3.7%と非接種群に高い傾向もあったが有意差なし。いずれの項目も、3 季を合算しても有意差はなかった。

A 型 H1 抗原の移植後患児における接種前後の有効抗体価保有率は、06 年季 43%→57%, 07 年季 23%→54%, 08 年季 63%→38%, 合計 39%→50%と相対的には上昇を認め、07 年季では健常児 37%→68%と差を認めなかった。接種前陰性者の陽転率は、移植後患児で 06 年季 25%, 07 年季 40%, 08 年季 0%と年次差を認めるものの、07 年季については健常児の 52%と差を認めなかった。

A 型 H3 抗原に対する移植後患児の有効抗体価保有率は、06 年季 43%→71%, 07 年季 23%→46%, 08 年季 25%→38%, 合計 29%→50%と相対的上昇を認め、07 年季の成績は健常児 49%→68%と差を認めなかった。陽転率は、移植後患児で 06 年季 50%, 07 年季 30%, 08 年季 33%であり、07 年季は健常児 39%と差を認めなかった。

B 型抗原については全体的に有効抗体価保有率が低いものの、移植後患児で 06 年季 14%→43%, 07 年季 8%→23%, 08 年季 25%→38%, 合計 11%→32%と上昇を認め、07 年季では、健常児 6% →14%と差がなかった。陽転率は、移植後患児で 06 年季 33%, 07 年季 17%, 08 年季 33%と高くないが、07 年季の健常児の 8%と差を認めなかった。

2 管以上の有意な抗体価の上昇も、各抗原ともに年季によるばらつきがあったが、07 年では健常児と差がなかった。

インフルエンザワクチン接種既往の有無別に接種後の有効抗体保有率をみると、A 型 H1 抗原では接種既往の患児で 06 年季 50% (3/6), 07 年季 57% (4/7), 08 年季 50% (3/6)と必ずしも高くなく、接種既往のない患

児と差を認めなかった。A 型 H3 抗原では接種既往のある患児で 06 年季 83% (5/6), 07 年季 57% (4/7), 08 年季 50% (3/6)と、接種既往のない患児と比べてやや良好な傾向があった。B 型抗原では接種既往のある患児でも 06 年季 33% (2/6), 07 年季 29% (2/7), 08 年季 50% (3/6)と必ずしも高くなく、接種既往のない患児と差を認めなかった。

2) 次年度解析(09-10 年季)

肝移植群・対照群ともに、ワクチン接種に関連した重度の全身合併症はみられず、移植群では6ヵ月以内に急性拒絶を認めなかった。

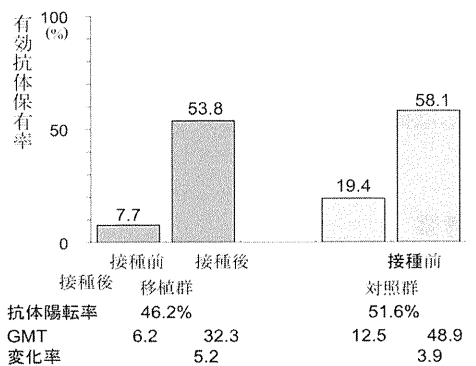


図1. 2009A/H1N1ワクチン初回接種前後のHI抗体価(小児例)

図1に示すように、抗体陽転率、接種前後の有効抗体保有率ともに、肝移植群と対照群に有意差を認めなかったが、いずれの群でも Vaccine Efficacy Cut-off (70%以上がHI抗体価40倍以上)よりやや低かった。接種後抗体価の幾何平均(GMT)にも両群間に有意差はなかった。

移植群における 2009H1N1 ワクチンと季節性インフルエンザワクチンの比較では、前者の抗体陽転率が後者と比べて良好であった(図2)。有効抗体保有率も抗体価の幾何平均(GMT)も、2009H1N1 ワクチンが接種前後

で明確な上昇を示した。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、前年度に報告した 2006-2008 年季の値と同等であった。

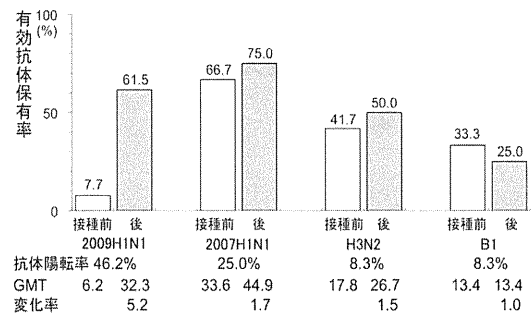


図2. 小児移植群におけるインフルエンザワクチン接種前後のHI抗体価(2009年季)

接種後の追跡期間において、対照群の1例が 2009H1N1 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。

3) 最終年度解析(10-11 年季)

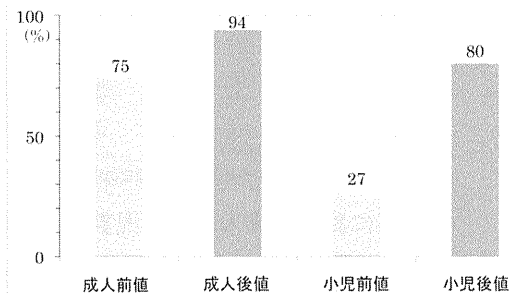


図3. 成人群と小児群における接種前後のA/H1N1型抗体保有率の推移

図3に示すように、2009A/H1N1 有効抗体保有率は成人群・小児群ともに接種により上昇したが、小児群で有意差を認めた($p=0.008$)ものの、成人群では接種前の有効抗体保有率が高い(对小児群 $p=0.012$)ため有意差を認めなかった($p=0.25$)。

2007A/H3N2 抗体保有率も、成人群・小児群ともに接種後に上昇した(図4)ものの、有意差は成人群のみで認めた($p=0.008$)。これは、小児群前値がやや高い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、