

接種前後とも有意差はなかった。

2008B型抗体保有率は、成人群で接種後に有意に上昇したものの($p=0.031$)、小児群では前値が高いこともあって上昇を認めず、むしろ低下傾向であった($p=0.727$) (図5)。接種前・後ともに、成人群・小児群間に有意差は認めなかった。

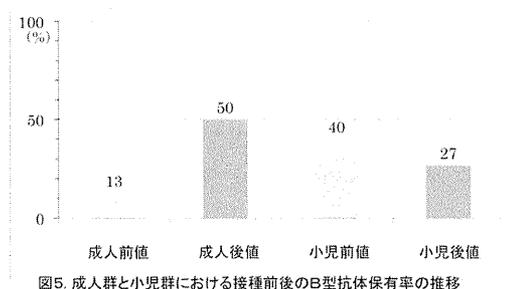


図5. 成人群と小児群における接種前後のB型抗体保有率の推移

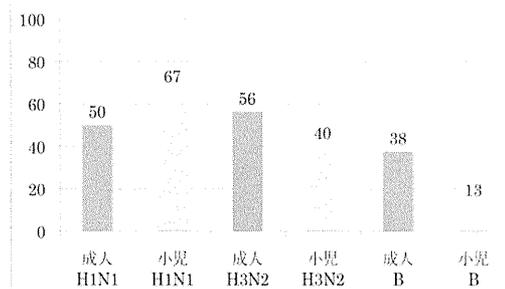


図6. 抗原別にみた成人群と小児群における接種後の抗体陽転率

各抗原における成人群と小児群の接種後抗体陽転率を図6に示す。2009A/H1N1型では成人群の、2007A/H3N2型と2008B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2008B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。

接種前後の幾何平均抗体価とその変化率を図7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、2009A/H1N1型を除いて変化率も成人の方が高かったが、いずれ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、

2009A/H1N1型、2007A/H3N2型、B型の順で低くなる傾向を示した。

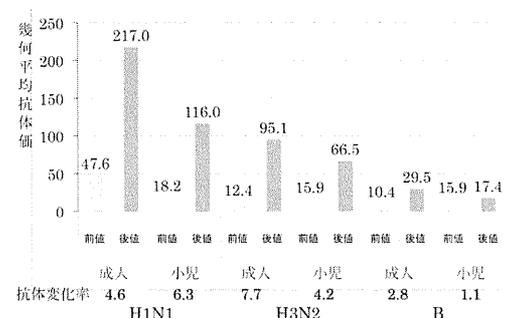


図7. 抗原別にみた成人群と小児群における接種前後の幾何平均抗体価と変化率

接種後の同年季におけるインフルエンザ罹患は、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、重篤化はなかった。接種有害事象としては、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。拒絶反応は両群ともに認めなかった。

D. 考察

本研究におけるHBVワクチンは、naïve例におけるHBV初感染予防を目的としたものではなく、いずれの群においてもHBV-DNAが血中には存在しないが肝臓内に潜在している病態であり、その再活性化予防を目的としたものである。いずれの群においても、再活性化の予防には、核酸アナログとHBIgの併用またはいずれかが用いられてきたが、耐性株出現の危険と高額な医療費から、経済的・安全・効果的な代替療法が模索されている。

HBVワクチンを使用した1例に可逆性の急性拒絶が発生したが、本症例では拒絶を繰り返す自己免疫性素因が確認されており、HBVワクチンの拒絶誘発は、一般には有意ではないと考えられた。ワクチン反応性に寄与する因子の中で、

若年や女性はすでに他の能動免疫療法において報告されているものと合致し、免疫抑制下におかれた際に反応が遅延することも想定内である。ドナーHBc 抗体高力価がワクチン反応性に寄与するとの結果は、肝臓とそこに存在する移入リンパ球の免疫記憶能が、何らかの機序でレシピエントの反応性に寄与している可能性を示唆している。

同様に肝組織内のみに HBV-DNA が潜在しながら、HBc 抗体陽性グラフト群では容易に能動免疫誘導が成立し、HBV キャリア群では治療抵抗性であるという事実は、HBV-DNA 量、その存在様式、宿主の特異的免疫状態に差異が存在することを示唆しており、こうした要素を分析し、ワクチン療法への反応因子を明らかにすることが重要である。

季節性インフルエンザは身近な市中感染症のひとつでありながら、毎年死亡例も発生しているため、予防接種による能動免疫の必要性については異論が少ない。一方で、流行予測に対応してワクチン抗原が適宜変更されており、また、供給される製剤の均一性についても十分な検証はなされていない。さらに、前年季の接種既往や感染既往が、次年季以降にどの程度影響するかについても知見が少ないため、厳密な解析を行うことが難しい。

初年度研究では、肝移植後慢性期の免疫抑制療法下の小児において、季節性インフルエンザ・ワクチン接種による副反応誘発の危険が低いことが明らかとなった。一方で、対象数も少なく、当該季のインフルエンザ感染や発熱事象の予防としての効果は明らかでなかった。接種群で発熱事象が少ない傾向にあった背景には、感

染予防意識などの潜在的な差がある可能性もある。

肝移植後小児において季節性インフルエンザ・ワクチン接種後に有効抗体陽転率が低いことが明らかになったが、健常児でも同様に低く、年季や抗原による差も示唆された。単季接種の効果については評価が難しいが、肝移植後慢性期の小児例では、少なくとも健常児と同程度の安全性と有効性は期待できると考えられる。

次年度研究の結果は、限られた症例数と障害児という対照群ながら、新規の 2009A/H1N1 ワクチンが肝移植後慢性期の患児に安全に接種でき、免疫反応は免疫低下状態にない小児と同等であることを示唆している。

同年季に海外で使用された種々の 2009A/H1N1 ワクチンのうち、ある報告では有効抗体保有率が 3-12 歳で 76.7% (2 回接種後 97.7%)、12-18 歳で 96.8%、18-60 歳で 89.5%、それより高齢で 80.3%となっている。HI 抗体測定方法の標準化という問題はあるものの、本研究における 2009A/H1N1 ワクチンの新規接種後の有効抗体保有率はこれよりも低い。一方で、同季以前に 2009H1N1 に対する有効抗体保有者がほとんどいなかったため、季節性インフルエンザと比べると抗体陽転率は高く、有効抗体保有率は明確に上昇した。

2010-2011 年季は 2009A/H1N1 型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。2007A/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、2008B 型については、成人と比べて小児群の反応が不良で、例年と同様に 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年少児で、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、成人例と小児例が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。

本研究を通して、接種後に一致して肝酵素上昇を 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

①肝移植後慢性期において、肝内に潜在する HBV の再活性化予防を目的とした HBV ワクチン (倍量連投法)は、多くの症例で安全に行えたが、急性拒絶のリスクの高い一部の症例で拒絶が観察された。若年者や女性、ドナー HBc 抗体価の高い症例で良好な反応を得たが、HBV キャリアであった症例では反応は不良であった。

②肝移植後慢性期におけるインフルエンザ・ワクチンは、有意な副反応なく安全に施行可能であった。しかしながら、健常者を含めて接種後の有効抗体価獲得率は必ずしも高くなく、年次や抗

原によるばらつきが見られた。

2009A/H1N1 ワクチンの初回接種では、免疫抑制下の小児でも免疫低下にない小児と同様に良好な抗体反応が得られたが、国際基準はやや下回っていた。一方、次年季の接種では、成人群・小児群ともに接種後の有効抗体保有率は良好であった。一方、B 型では特に小児で接種後有効抗体保有率が低く、接種後の罹患例が目立った。

接種群における有意な罹患予防効果や重症化予防効果を確認するには至らなかったが、小児の 1 例に接種後一過性の肝機能異常を認めたものの、接種の推奨を否定するほどではなかった。

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., Ohta, R., Iwata, S., Nishiyama, Y., Nakamura, T., Kaneko, K., Kiuchi, T., Ando, H., Kimura, H. Immunologic and virologic analyses in pediatric liver transplant recipients with chronic high Epstein-Barr virus loads. *J Infect Dis* 202;461-9, 2010
- 2) Kiuchi, T., Onishi, Y., Nakamura, T.: Small-for-size graft: not defined solely by being small for size. *Liver Transpl* 16:815-7, 2010
- 3) 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
- 4) Ishigami, M., Kamei, H., Nakamura, T., Katano, Y., Ando, H., Kiuchi, T., Goto, H.: Different effect of HBV vaccine after liver transplantation between chronic HBV carriers and non-HBV patients who received HBcAb-positive grafts. *J Gastroenterol.* 46:367-377, 2011
- 5) Gotoh, K., Ito, Y., Suzuki, E., Kaneko, K., Kiuchi, T., Ando, H., Kimura, H.: Effectiveness and safety of inactivated influenza vaccination in pediatric liver transplant recipients over three influenza seasons. *Pediatr Transplant* 15:112-6, 2011
- 6) 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
- 7) 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
- 8) Duvoux, C., Kiuchi, T., Pestalozzi, B., Busuttill, R., Miksad, R.: What is the role of adjuvant therapy after liver transplantation for hepatocellular carcinoma? *Liver Transpl* 17: S147-158, 2011
- 9) 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
- 10) 長井俊志, 八木哲也, 中村太郎, 大西康晴, 木内哲也: 第7章 各領域別のMRSA保菌者対策とMRSA感染症の診断・治療. 12. 移植外科領域. 河野 茂, 編. *MRSA -基礎・臨床・対策-(改訂版)*. 医薬ジャーナル社, pp.288-294 (2010. 8)
- ## 2.学会発表
- 1) Ishigami, M., Nakamura, T., Onishi, Y., Katano, Y., Kiuchi, T., Goto, H.: HBIg saving protocol after liver transplantation in chronic HBV carriers: relationship between necessary amount of HBIg and early preoperative ascites: 16th Annual International Congress of the International Liver Transplantation Society, HongKong, China (2010. 7)
- 2) 石上雅敏, 木内哲也, 後藤秀実: 当院における HCV 陽性患者に対する肝移植の現状: 第 27 回日本肝移植研究会, 三島 (2009.7)
- 3) 石上雅敏, 木内哲也, 後藤秀実: 肝移植後における HBV ワクチンによる HBs 抗体獲得効果 -HBV キャリア症例と HBc 抗体陽性ドナー非 HBV 症例との違い: 第 13 回日本肝臓学会大会, 京都 (2009.10)

- 4) 後藤研誠, 伊藤嘉規, 河辺慎司, 鈴木英太郎, 木村宏: 肝移植後小児例におけるインフルエンザワクチンの有効性・安全性に関する検討: 第 41 回日本小児感染症学会学術集会, 福井(2009.11)
- 5) 石上雅敏, 木内哲也, 後藤秀実: 当院における肝移植後 HCV 陽性患者の病理学的特徴- protocol biopsy の追跡結果より: 第 46 回日本肝臓学会総会, 山形(2010. 5)
- 6) 石上雅敏, 木内哲也, 後藤秀実: 当院における肝移植後(内科的)晩期合併症: 第 14 回日本肝臓学会大会/第 18 回日本消化器関連学会週間(JDDW2010), 横浜(2010. 10)
- 7) 鳥居ゆか, 伊藤嘉規, 越知信彦, 後藤研誠, 河辺慎司, 木村宏: 肝移植後小児例における新型インフルエンザワクチンの有効性・安全性に関する検討: 第 42 回日本小児感染症学会総会学術集会, 仙台(2010. 11)
- 8) 鳥居ゆか, 伊藤嘉規, 木村宏: 生体肝移植後小児への新型インフルエンザワクチンの接種経験: 第 14 回日本ワクチン学会学術集会, 東京(2010. 12)
- 9) 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)
- 10) 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 回日本肝臓学会西部会, 岡山(2011. 12)
- 11) 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)
- 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)

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 ウイルス (EBV) 関連移植後リンパ増殖症が発症する. 移植後リンパ増殖症の診断には, 末梢血中の感染細胞数の定量に加え, EBV が感染している細胞の同定が必須である. 我々は *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) 法を開発した. 本法を様々な 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を示した. 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た. FISH 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/定量が可能であり, 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.

A. 研究目的

近年, 造血幹細胞・臓器移植の増加とその技術の進歩に伴い, 免疫抑制下におけるウイルス感染合併症がますます問題となってきた。ヒトに潜伏/持続感染しているヘルペスウイルスは, 移植後の細胞性免疫の抑制・再構築の遅れに伴い再活性化し, 時に致命的な合併症を生じる。その中でも, Epstein-Barr ウイルス (EBV) による移植後リンパ増殖症は, EBV 感染した B 細胞もしくは T 細胞による腫瘍性増殖疾患であり, 重篤で致命率も高い。

移植後リンパ増殖症の診断には, 末梢血中の

感染細胞数の定量に加え, EBV が感染している細胞の同定が必須である。我々は, 世界に先駆け, リアルタイム PCR 法による EBV DNA 定量法を確立し, 移植後リンパ増殖症の診断・治療モニタリング法に臨床応用した。現在, リアルタイム PCR 法による EBV DNA 定量は, 移植後リンパ増殖症の診断・治療モニタリングの主流となっている。しかし, この方法により定量しているのはウイルス DNA であって, 感染細胞数ではない。また, 遺伝子増幅という過程を経ているため正確性に欠け, 検査室間での比較が困難であるという欠点がある。さらには, EBV がどの細胞に感

染しているかの同定も不可能である。

我々は *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、特許申請した (特願 2008-073384, 国際特許出願 PCT/JP2009/001173WO)。この方法を用いれば、末梢血中の EBV 感染細胞を正確に定量できるのみならず、感染細胞の同定が可能となる。本研究では、我々が独自に開発した FISH 法を、まず EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患患者に、続いて移植後リンパ増殖症患者に臨床応用し、同法が移植後リンパ増殖症の早期診断、治療法の決定に有用であるか否かを検証した。

B. 研究方法

1) 対象は慢性活動性 EBV 感染症 18 例、血球貪食性リンパ組織球症 4 例、全身性 EBV 陽性 T 細胞リンパ増殖症 2 例、末梢性 T 細胞リンパ腫 1 例、アグレッシブ NK 細胞性白血病 1 例の計 26 例。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 標識モノクローナル抗体を用いて細胞表面抗原を標識。
- ② 細胞を 4%パラホルムアルデヒド/1%酢酸にて、4°C40 分間固定。
- ③ 細胞膜・核膜に穴をあけるために Tween20/PBS で 10 分間処理。
- ④ EBER 特異的 FITC 標識 PNA probe (Dako) と hybridization させ 1 時間反応。
- ⑤ anti-FITC Alexa Fluor 488 標識抗体を用

い蛍光を増幅後、Flow cytometry により解析。

- ⑥ 比較対象として、単核球を磁気ビーズ法により CD3+, CD19+, CD3-CD56+, TCR $\alpha\beta$ +, TCR $\gamma\delta$ + 分画に分けた後に、リアルタイム PCR 法により EBV-DNA を定量し、感染分画を決定した。

2) 続いて、臓器・造血幹細胞移植後に、リアルタイム PCR 法により血液中の EBV-DNA 量増加が認められ、移植後リンパ増殖症が疑われた 8 症例を対象とした。症例の内訳は 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)。FISH 法は上記に示した方法にて行った。

(倫理面からの配慮について)

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た。なお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。

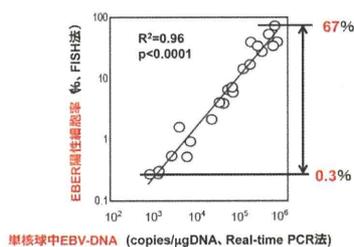
C. 研究結果

1) EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患に対する臨床応用。

FISH 法を用い、各 EBV 関連疾患の末梢血中末梢血単核球中の EBER 陽性細胞を測定したところ、全例の単核球中 0.3-67% に

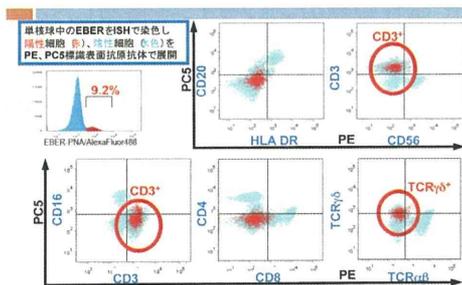
EBER 陽性細胞を認め、陽性細胞率は血液単核球中の EBV-DNA 量と相関していた(図 1).

図 1 単核球中EBV-DNA量と FISH法におけるEBER陽性細胞率との相関



種痘様水疱症を伴う慢性活動性 EBV 感染症患者 8 例中では、 $\gamma\delta$ T 細胞 5 例、NK 細胞 1 例、NKT 細胞 1 例に EBV の感染を認めた。末梢血 $\gamma\delta$ T 細胞への EBV 感染を認めた症例の FISH 法の結果を示す(図 2)。

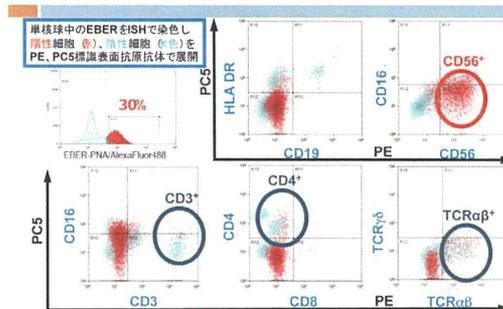
図 2 慢性活動性EBV感染症 6歳・女児



更に 2 症例においては複数の細胞群に EBV 感染を認めた。図 3 に示した症例では CD56 陽性の NK 細胞に主に感染しているものの、CD3、CD4、TCR $\alpha\beta$ 陽性の T 細胞にも一部感染していると考えられた。

FISH 法による EBV 感染細胞同定結果は、従来法である磁気ビーズ法とリアルタイム PCR 法を組み合わせた方法により得られた結果と、ほぼ一致した。

図 3 症例 3, 8歳・男児



2) 移植後リンパ増殖性疾患に対する臨床応用。

FISH 法を用い、移植後リンパ増殖症が疑われた患者末梢血単核球中の EBER 陽性細胞を測定したところ、全例の単核球中 0.3-67%に EBER 陽性細胞を認め、陽性細胞率は血液単核球中の EBV-DNA 量と相関していた(図 4)。

図 4 単核球中EBV-DNA量と FISH法におけるEBER陽性細胞率との相関

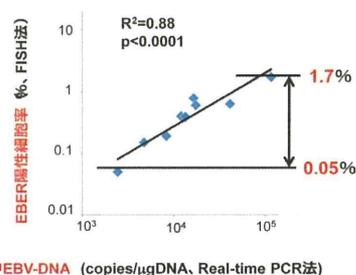
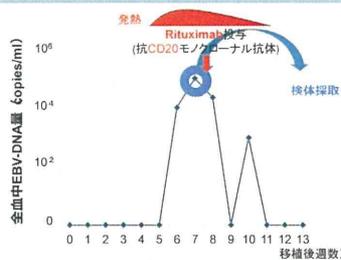


図 5 に神経芽腫にて血縁同種骨髄移植後の 7 歳女児例の経過を示す。移植後 5 週目より発熱および全血中 EBV-DNA 量の増加を認めた。抗 CD20 モノクローナル抗体であるリツキシマブ投与により症状および EBV-DNA 量が減少した。

図5. 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



この症例のリツキシマブ投与前の末梢血を用い、FISH法にて感染細胞の定量とEBV感染細胞のフェノタイプ同定をおこなったところ、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。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、IgD陽性細胞が83%、CD27陽性細胞が100%であった。

表1に対象とした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。

表1. FISH法による結果

年齢別	性別	先行治療	移植後	EBV-DNA出現後	単核球中感染細胞率	Naive B	Memory B	Switched Memory B
7	F	骨髄移植	1M	1M	0.63%	37%	53%	10%
1	F	骨髄移植	3M	1M	0.30%	0%	83%	17%
6	F	骨髄移植	10M	1M	0.05%	3%	37%	60%
48	F	臍帯血移植	37M	6M	0.28%	47%	38%	15%
1	M	生体肝移植	9M	8M	0.39%	10%	17%	73%
2	F	生体肝移植	15M	15M	0.15%	6%	69%	25%
2	F	生体肝移植	15M	15M	0.19%	18%	43%	39%
10	M	生体肝移植	96M	96M	0.78%	ND	ND	ND
10	F	生体腎移植	18M	3M	1.70%	ND	ND	ND

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

今回我々は *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を含む様々な EBV 関連リンパ増殖性疾患に応用し、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。

FISH 法を用いれば、移植後リンパ増殖症患者末梢血中の EBV 感染細胞を、簡便かつ非侵襲的に検出・定量できるばかりでなく、表面抗原との二重染色により、感染細胞の同定が可能となる。移植後リンパ増殖症患者末梢血中の EBER 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/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0型と呼ばれる、ウイルス抗原を全く出さず、EBER や BARTs などの RNA のみを発現し、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 血症を維持しているのかもしれない。

近年、リンパ球表面抗原を標的とした、ヒト型

モノクローナル抗体リツキシマブ(抗 CD21 抗体)やアレムツズマブ(抗 CD52 抗体)が開発され、幅広く臨床応用されている。本研究の図5で示した症例も、リツキシマブが臨床的に有用であった。さらに抗 CD56 抗体や抗 CCR4 抗体が臨床試験中である。EBV 感染細胞の表面抗原プロフィールが明らかになれば、移植後リンパ増殖症の診断のみならず、分子標的治療法の選択が容易となる。さらに、本法は EBV 感染細胞数を正確に直接定量できるため、治療効果のモニタリング法としても最適と考えられる。

E. 結論

FISH 法により、簡便に患者末梢血中の EBV 感染細胞を定量・同定できることを明らかにした。同法は移植後リンパ増殖症の非侵襲診断に有用であると共に、治療効果のモニタリングにも応用可能と考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 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

- 3) 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
- 4) 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
- 5) Iwata S, Wada K, Tobita S, Gotoh K, Ito Y, Demachi-Okamura A, Shimizu N, Nishiyama Y, Kimura H. Quantitative analysis of Epstein-Barr virus (EBV)-related gene expression in patients with chronic active EBV infection. *J Gen Virol* 90: 42-50, 2010
- 6) Funahashi Y, Iwata S, Ito Y, Kojima, Yoshikawa T, Hattori R, Gotoh M, Nishiyama Y, Kimura H. Multiplex real-time PCR assay for quantifying BK polyomavirus, JC polyomavirus, and adenovirus DNA simultaneously. *J Clin Microbiol* 48: 825-830, 2010
- 7) Gotoh K, Ito Y, Ohta R, Iwata S, Nishiyama Y, Nakamura T, Kaneko K, Kiuchi T, Ando H, Kimura H. Immunologic and virologic analyses in pediatric liver transplant recipients with chronic high Epstein-Barr viral loads. *J Infect Dis* 202:461-469, 2010
- 8) 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* 54:516-22, 2010
- 9) 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* 116:4546-59, 2010
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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⁺ memory B cells in patients after transplantation. *J Gen Virol* 92:2590-5, 2011
- 13) 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
- 2.学会発表
- 1) 木村宏, 河邊慎司, 後藤研誠, 伊藤嘉規, 岩田誠子, 西山幸廣: FISH法を用いたEBV関連リンパ増殖性疾患の非侵襲診断および病態解析: 第57回日本ウイルス学会学術集会, ワークショップ, 東京 (2009.10)
- 2) Kimura H, Miyake K, Yamauchi Y, Iwata S, Kawabe S, Gotoh K, Ito Y, Nishiyama Y: The 34th International Herpesvirus Workshop, July 26, 2009, Ithaca, USA (2009.7)
- 3) Kimura H, Ito Y, Kawabe S, Gotoh K, Iwata S, Nishiyama Y. Noninvasive identification of EBV-infected lymphocyte subtypes in EBV-associated T/NK lymphoproliferative diseases. The 14th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr virus & Associated Diseases, Birmingham, UK (2010.9).
- 4) Gotoh K, Ito Y, Ohta R, Iwata S, Nishiyama Y, Kimura H. Immunologic and Virologic analyses in Pediatric Liver Transplant Recipients. Restricted EBV genome expression in pediatric liver transplant recipients with chronic high Epstein-Barr viral loads. The 14th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr virus & Associated Diseases, Birmingham, UK

(2010.9)

- 5) 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).
- 6) 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

国際特許出願 PCT/JP2009/001173(WO)
ウイルス感染細胞の検出・同定法及びキット
発明者; 木村宏, 西山幸廣
出願日; 2009年3月17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)

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: 本研究では培養による感染症診断の欠点を明らかにし, 培養によらない核酸検査による診断法を確立することを目的に初年度は検査法の確立, 2, 3 年度目はその実用化を目指した臨床検体の解析を行った. 核酸検査の感度を高めることを目標にサブトラクション法を確立したが, 市販のキットを詳細に検討した結果, 多くの酵素や核酸精製キットには細菌や真菌のDNAが混入していることが明らかとなり, 感度を上げるためには試薬や酵素等, 材料を提供するメーカーに微生物診断に対応した製品の開発を促す必要があることが判明した. そこで, 2, 3 年度目は核酸の混入が問題とならない程度まで感度を低めに設定し, 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結果, 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可能性が示唆された. また, 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. この様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、細菌・真菌の核酸検査を至適化し、培養検査の補助診断とすることを目標に検査法の至適化を行った。さらに、その方法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°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 μl に 1200 μl の赤血球溶解液(10mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH7.4, 5mM MgCl_2) を加え攪拌後、13,000 rpm で 10 分間遠心した。Pellet を再度赤血球溶解液 1,000 μl 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 μl を加えて 70°C , 10 分インキュベートした。サンプルを同キットのビー

ズ充填チューブに移し、MagNA Lyser (Roche, Germany)にて 2,500rpm 2分間攪拌して微生物を物理的に破碎し、ここに 200 μl の 10% SDS 水溶液を加えてもう一度 70°C , 10 分間インキュベートした。400 μl 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 μl を回収した。この 200 μl は血液検体のおよそ 100 μl 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 μl 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 μl を使い、最終反応液量 10 μl で RNA から DNA を合成し、その 1 μl 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。

6) サブトラクション法

Nikolai らの方法を真菌の ITS2 領域用に改変したサブトラクション法を開発した。その手順を図 1 にまとめた。

サブトラクション法に用いたプライマーとして、ITS2 領域を増幅し、制限酵素で切断されるサイトを持ったプライマー、ITS86M Pac I と ITS4M Asc I を設計した (表 1)。このプライマーによる PCR 産物を Pac I と Asc I で切断後、切断された断端に連結するリンカーを作成するため4種類の DNA (Pac I 22, Pac I 20, Asc I 22, Asc I 18) を合成した (表 1)。Pac I 22 と Pac I 20、および Asc I 22 と Asc I 18 を 5 mM ずつ混合し、95°C で 2 分間処理後、42°C

で 1 分間インキュベートして Annealing させ 2 本鎖のリンカー-DNA、Pac I 22-20 と Asc I 22-18 を調製した。

サブトラクションの検体としてモデル検体を作成した。検体中に多量の真菌と少量の真菌が混在した状態を再現するため、*Candida tropicalis* と *Aspergillus niger* 由来の DNA をそれぞれが 1.0×10^5 copies/ μ l、 1.0×10 copies/ μ l になるよう混合した。この検体を ITS86M-F と ITS4M-R-FAM を用い PCR で解析した後、PCR 産物を DNA 精製カラムである DNA/RNA Extraction Kit (VioGene) で精製し、サブトラクションのモデル検体とした。

ドライバーDNA の作成にはサブトラクション用のモデル検体中に多量に存在する *C. tropicalis* を、ITS86M-F と ITS4M-R を用いた PCR で増幅後、PCR 産物を精製しドライバー DNA とした。

次にサブトラクション法をまとめる。まず、PCR 産物のモデル検体を ITS86M Pac I と ITS4M Asc I を用い 25 サイクル PCR を行い増幅した。この産物を滅菌水で 1,000 倍に希釈後、制限酵素 Pac I と Asc I で切断し、DNA 精製用カラムで両端の短い断片と混在するプライマーを除去した。この検体の DNA 末端に二本鎖のリンカー-DNA、Pac I 22-20 と Asc I 22-18 をライゲーションさせた。この検体にドライバーDNA を大過剰加え、ハイブリダイゼーションを次のように行った。プライマーを除く PCR の反応溶液に検体を 1 μ l、ドライバーDNA を 2 μ l 加え、95°C で 2 分間処理後 (Denaturation)、52°C で 1 分間、72°C 2 分間インキュベーションを行い、ドライバーDNA と検

体中に大量に存在する *C. tropicalis* 由来の PCR 産物間のハイブリッド DNA を形成させた。ここにサブトラクション用の PCR プライマー Pac I 22 と Asc I 18 を 1 μ l ずつ加え、20 サイクル PCR を行った。PCR 産物の一部はキャピラリー電気泳動解析用の PCR に、残りの PCR 産物は 1,000 倍希釈後、次のサブトラクションのサイクルに用い、計 3 回のサブトラクションを繰り返した。

(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 μ l の溶液に存在していた。特に、PCR の酵素は細菌由来で、完全に DNA を除けていない。このようなことから、検査の感度を上げることが出来ないこと、また簡便な DNA 調整キットは使用できないことが明らかとなった。そこで、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 100 copy/ μ l とし、10~100 copy/ μ l の結果は±として参考に止めた。

2) サブトラクション法

上記の通り、この研究では PCR の検出限界を 100 copy/ μ l としたが、さらに感度を高める場合を想定し、サブトラクション法の開発を行った (図 1)。*C. tropicalis* 1.0×10^5 copies/ μ l と *A. niger* 1.0×10^1 copies/ μ l を混合した検体をモデルに、サブトラクション法を行った (図 2)。サブトラクションを行う前と行った後の DNA を上述の定量法で解析すると、サブトラクション前と、1 回のサブトラクション後では検出できない *A. niger* のピークは、2 回サブトラクションを繰り返すことで検出でき、 10^4 倍存在した DNA とほぼ同じ量にまで選択的に増幅できた。3 回サブトラクションを繰り返しても、さらなる効果は認められなかった。

3) 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 3)。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(表2). 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 μ 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.

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/ μ lを越えた例は1例も存在しなかったが, 10~100 copy/ μ 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が検出された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5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.

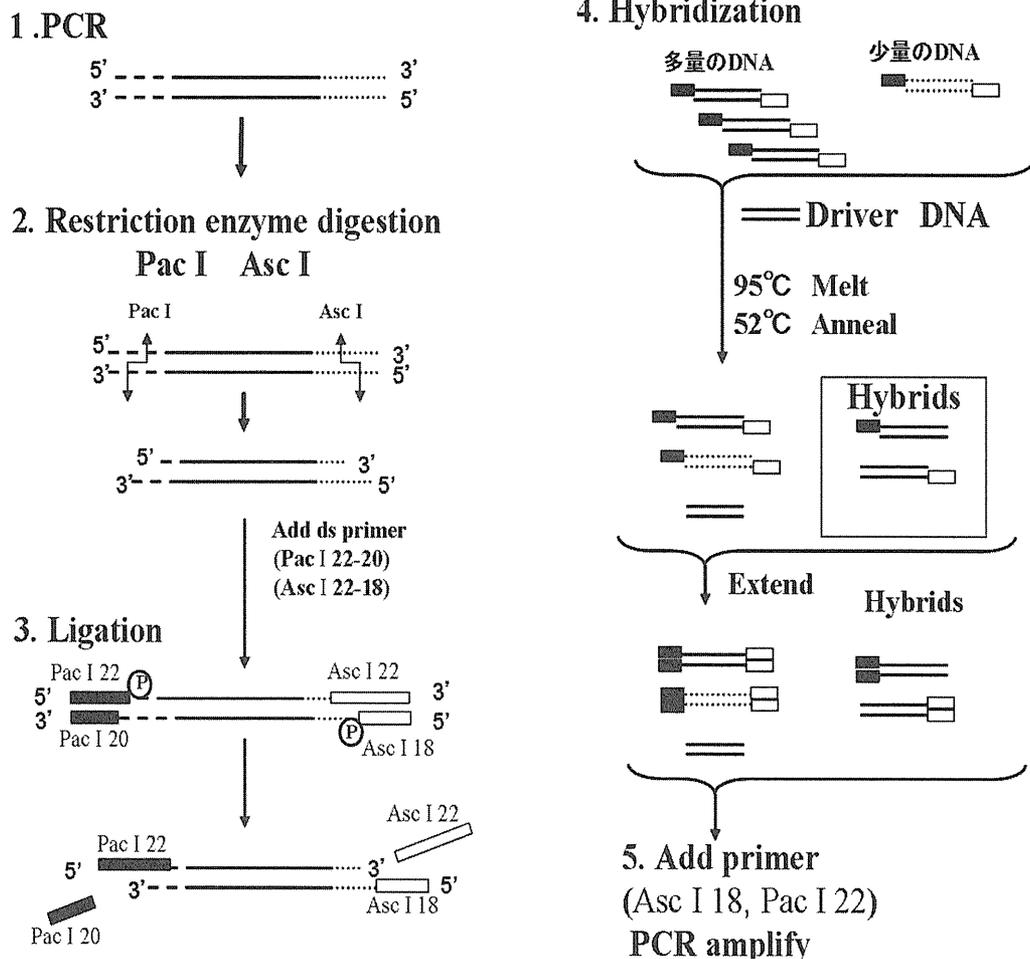


図1. サブトラクション法の手順

- ITS86M Pac I と ITS4M Asc I を用いた PCR で真菌の ITS2 領域を増幅する。
- 制限酵素 Pac I, Asc I で PCR 産物を切断し, DNA 精製簡易カラムで両端の切断端とプライマーを除去する。
- リンカー Pac I 22-20 と Asc I 22-18 を両端に連結する. 末端にリン酸基の存在する Pac I 22 と Asc I 18 のみが連結されることになる。
- Driver DNA を大過剰に加え, denature 後, annealing させると, 両端にリンカーがついた ds DNA, 一方のみについた ds DNA (Hybrid), 両端にリンカーのついていない ds DNA が形成される. これらの鎖の両端を DNA polymerase で伸長させ, 平滑末端とする。
- Pac I 22, Asc I 18 を用いた PCR を行うと両端にリンカー-DNA が結合した DNA のみが選択的に増幅される. 大過剰の Driver を加えた DNA の多くは確率的にリンカーを両端に持つものが少ないため, 増幅されず, Driver を加えない. 少量の DNA はすべてが両端にリンカーを結合しているため増幅される(サブトラクション)。
- ステップ 5. の PCR 産物の 1/1000 を用いて, ステップ 2. 以降のステップを繰り返す。

表 1. 用いたプライマー, リンカーと PCR の条件

Name	Sequence	real-time PCR	PCR
定量 PCR			
ITS86M-F	TGAATCATCGACTCTTTGAACGC	95°C/10min x1	95°C/2min x 1
ITS4M-R	TTTCTTTTCCTCCGCTTATTGATAT	95°C/30s x35 61°C/1min	95°C/30s 52°C/1min x 20-30 72°C/30s 72°C/10min x 1
サブトラクション			
ITS86M-F-PacI	CCttaattaaTGAATCATCGACTCTTTG AACGC		95°C/2min x1 95°C/30s
ITS4M-R-AscI	AggcgcgccTTTCTTTTCCTCCGCTTAT TGATAT		52°C/1min x 25 72°C/30s 72°C/10min x 1
ASC I 18	TACGTA <u>CTGTAAGCTAGG</u>		95°C/2min x1
Pac I 22	ACGATCAAGTACTAGCCTTAAT		95°C/30s 52°C/1min x 20 72°C/30s 72°C/10min x1
Linkers	<u>TACGTA<u>CTGTAAGCTAGG</u></u>		
Asc I 18	CGCGCCTAGCTTACAGTACGTA		
Asc I 22	<u>TAAGGCTAGTACTT</u> GATCGT		
Pac I 20	<u>ACGATCAAGTACTAGCCTTAAAT</u>		
Pac I 22			

小文字の部分が制限酵素切断部位, 注 2) 下線の部分は相補的な部分

表 2. 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/μl; 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 mulcilaginosa</i>	1
<i>Streptococcus mitis (oralis)</i>	3	(-)	2
		293; <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Serratia proteamaculans</i>	1
α -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> & α -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