

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 proteoaoculans</i>
** 431	<i>Propionibacterium acnes</i>
380	<i>Pseudomonas sp. / Sphingomonas ap.</i>
375	<i>Serratia proteoaoculans / Rahnella sp.</i>
337	<i>Pseudomonas sp. / Propionibacterium acnes / Stenotrophomonas maltophilis</i>
282	ND
267	<i>Serratia proteoaoculans / Stenotrophomonas sp.</i>
209	ND
180	ND
151	ND
120	ND
118	<i>Pseudomonas sp.</i>
109	<i>Pseudomonas sp.</i>
104	ND

\*ND; can not determined

\*\*この症例からは培養で *Candida parapsilosis* グラム陰性菌をシャドウで示した.

表 4. 16 検体からPCRで同定できた真菌

菌 名	患者数
<i>Trichosporon Sp.</i>	7
<i>Candida parapsilosis</i>	5
<i>rugosa</i>	4
<i>albicans</i>	1
<i>glabrata</i>	1
<i>Cladosporium sp.</i>	3
<i>Aspergillus sp.</i>	2
<i>Fusarium sp.</i>	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, 1 $\mu$ l 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 100 copy/ $\mu$ l 以上という感度は菌数に換算するとおおよそ 0.1 ~ 1/ $\mu$ l (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胞子が混入するコンタミの危険は大きい, 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/ $\mu$ l 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.

この研究では検出感度を高めるためのサブトラクション法も開発した. この方法でかなり感度を高めることは可能となった. 検出できた菌種がコンタミによるものであるか否かを判断する必要はあるものの, 今後ヒトに常在する菌種の一覧を作製するような研究に発展させたい.

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較べて低いよ

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。

また、この研究で開発したサブトラクション法は今後ヒトの常在菌の一覧を作製する際、有用な方法になると期待できる。

#### 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) 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
- 3) 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

##### 2. 学会発表

- 1) 岡崎友亮, 西山恭子, 石岡 賢, 金子久俊, 錫谷達夫. 正常細菌叢中に存在する真菌の新しい定量法. 第63回日本細菌学会東北支部総会. 盛岡, 2009.
- 2) 西山恭子, 岡崎友亮, 石岡 賢, 金子久俊, 錫谷達夫. 培養によらない分子生物学的手法を用いた腔常在細菌叢の検討. 第63回日本細菌学会東北支部総会. 盛岡, 2009.

#### 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)

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 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。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、HSV1 26 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 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。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

早期診断・予防などに役立つことを目的に、本研究を行った。

B. 研究方法

虎の門病院で 2010 年 6 月から 2011 年 12 月までに造血幹細胞移植を行った 220 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70例(31.8%)であり、その内訳はPIV3が43例、PIV2が1例、Influenza virusが1例、RSVが1例、Mumps virusが1例、HSV1が26例であった(PIV3とHSV1の重複検出症例あり)。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、25例で肺炎を発症していた。肺炎症例のうち12例が肺炎を契機に致死的経過を辿ったが、そのうち10例は他の病原微生物の合併を来し、残りの2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、3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、18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。

Mumps virus検出例では、唾液腺腫脹を認めており、RSV、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4割であった。
- 2) PIV3検出例が多く、季節性の流行ならびに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、口内炎などの咽頭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、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

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.
- 4) Takagi S, Ota Y, Uchida N, Taniguchi S, et al. Successful engraftment after reduced-intensity umbilical cord blood transplantation for myelofibrosis. *Blood*. Jul 29. 116(4):649–652, 2010.
- 5) 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*. Nov. 147(4):543–553, 2009.
- 6) 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*. Aug 20. 114(8):1689–1695, 2009.
- 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

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, 健康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

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かは不明である.

B. 研究方法

健康人ボランティアより提供頂き分離した 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測定法の検討を行い, 確立した.

抗ヒト IFN- $\gamma$  抗体 (clone 2G1, Endogen) をコートした 96 穴メンブレンプレートに PBMC を加え, 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- $\gamma$  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(図 1)。

(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

本研究期間において合計 26 名の健常人ボランティアより、PBMC をご提供頂き、条件検討の結果、以下の条件において高感度な HHV-6 に対する細胞性免疫能測定法を確立した。

1 反応あたり、PBMC  $4 \times 10^5$  個、HHV-6 刺激抗原量  $1 \mu\text{L}$  (精製ウイルス粒子  $1.5 \times 10^7$  コピー/ $\mu\text{L}$ ,  $\text{TCID}_{50} = 10^5/\mu\text{L}$ , UV 照射にて不活化) を使用した。陽性コントロールとして、phytohemagglutinin (PHA)  $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、陰性コントロールとして、精製ウイルス粒子不含懸濁液を用いた。

本条件において、2011 年度募集によりご提供頂いた健常人ボランティア 17 名分の PBMC

を用いた測定を行った (図 2)。ボランティア 17 名の詳細は、平均年齢 34.53 歳、(21 歳 ~ 61 才) 男女比 7 : 10 である。

いずれの PBMC においても陽性コントロールである PHA 刺激における差異はなく、十分な非特異的 T 細胞性免疫応答があることを確認した。

HHV-6 抗原刺激  $1 \mu\text{L}$  により、12~128 個(平均 53.764 個)のスポットが検出され、陰性コントロールでは、0~58 個(平均 12.411 個)のスポットが検出された。いずれの検体においても、有為に HHV-6 刺激抗原  $1 \mu\text{L}$  によるスポット数が多かった。

本結果より、高感度な抗 HHV-6 細胞性免疫能測定法が確立された。

### D. 考察

IFN- $\gamma$  ELISPOT 法により、健常人ボランティア PBMC を用いた、高感度な HHV-6 に対する細胞性免疫能測定系の確立に成功した。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。

今後の課題としては、以下の事が考えられる。

①IFN- $\gamma$  ELISPOT 法においては形成されるスポット数によりその IFN- $\gamma$  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、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が必要である。

②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



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: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. その結果, U90 遺伝子発現が最もウイルス分離成績との関連性が強く, 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. 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結果, 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. 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 感染群で炎症性サイトカイン反応の低下が示唆された.

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臨床工学科

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.

本研究においては, 造血幹細胞移植後の HHV-6 再活性化の病態を明らかにするため, 初年度にはリアルタイム RT-PCR 法による, HHV-6 遺伝子発現の解析システムを構築することを目指した. その後, 同方法を用いて成人の悪性リンパ腫患者, リンパ組織でのウイルス再活性化状況を明らかにすること, ならびに造血幹細胞移植患者のより詳細なウイルス再活性化状況把握を目指した. 最終年度には, 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

### 1) HHV-6mRNA 発現解析のためのリアルタイム RT-PCR 法確立.

前初期(U90)、初期(U12)、後期(U100)の各遺伝子を標的とした。Primer, probe の設計には、Primer Express (ABI) を用いた。Real-time PCR 法の標準曲線作製のために、各標的遺伝子領域をサブクローニングした。造血幹細胞移植後 day0 から約 60 日間定期的に採血し、ウイルス分離と全血中のウイルス DNA 量をモニタリングし得た 11 名を対象とした。比重遠心法で分離した単核球から total RNA (RNeasy Mini Kit ;QIAGEN)を抽出、血液 200 $\mu$ l から DNA (DNA blood Mini Kit; QIAGEN)を抽出した。RNA は random hexamer primer を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した (High capacity RT kit; ABI)。作成した cDNA 5 $\mu$ l を用いて real-time PCR を行い各遺伝子 mRNA の発現量を定量した。また内部標準として、 $\beta$  アクチン mRNA を用いた。HHV-6 DNA の定量は、既存の HHV-6 U31 を標的とした real-time PCR 法により行った。

### 2) リアルタイム RT-PCR 法を用いた HHV-6 遺伝子発現解析による悪性リンパ腫組織でのウイルス再活性化に関する検討.

対象: 本学血液内科を受診した 125 名の患者から採取した生検リンパ組織を対象とした。

材料と方法: 生検リンパ節から QIAamp DNA Blood Mini kit で DNA を抽出。HHV-6 DNA の検出は、real-time PCR 法にて行った。さらに、EBV 関連リンパ腫の検索のために real-time PCR 法による EBV DNA 定量も行った。HHV-6 DNA 陽性検体については RNAeasy Mini Kit を用い total RNA を抽出、DNase 処理後 random hexamer primer を用い cDNA を合成 (High capacity RT kit: QIAGEN) し、HHV-6 U90 遺伝子 (前初期遺伝子)、U12 (初期遺伝子)、U100 (後期遺伝子) 発現を real-time PCR 法で測定した。内部標準として  $\beta$  アクチン遺伝子を用いた。また、HHV-6 DNA が検出されたリンパ組織については、TaqMan<sup>®</sup> Arrays システム (アプライドバイオシステムズ社) を用いて宿主サイトカイン、ケモカイン遺伝子とリンパ腫の転移に重要な役割を果たす可能性が示唆されている分子の遺伝子 (IL-4, 6, 10, 8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , RANTES, MIG, CXCL-12, VEGFA, VEGFC, HGF) 発現量を解析した。各疾患群間でのウイルス DNA 量の比較は、Kruskal-Wallis 解析を用いて解析した。

### 3) 造血幹細胞移植後 HHV-6 感染の宿主免疫に及ぼす影響解明.

対象: 名古屋第一日赤病院、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-β, IL-6, IL-10, TNF α, 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<sup>3</sup>コピー/μg 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。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。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

#### 1) HHV-6mRNA 発現解析のためのリアルタイム RT-PCR 法確立

観察期間中に得られた 77 検体中 11 検体でウイルスが分離、そのほとんどは移植後 28 日以内であった。移植後の HHV-6 DNA 量は、移植後 28 日でピーク(平均 693,482 コピー/μg)を示し、経過とともに漸減したが、1 例をのぞき観察期間中最後まで陰性化しなかった。HHV-6 U90mRNA のピークは、移植後 14 日で 255 コピー/Actin1000 であった。U90mRNA は、16 検体(20.8%)で検出され、その 75%が移植後 28 日以内のウイルス分離好発時期であった。また、ウイルス分離陽性検体は全て U90mRNA も検出された。U12 と U100 mRNA は、U90 mRNA と同様移植後 14 日がピークで、それぞれ 5.4, 1.4 コピー/Actin1000 であった。U12 mRNA は 14 検体(18.2%)で検出され、その 85.7%が移植後 28 日以内、U100 mRNA は 7 検体(9%)で陽性であったが 1 例をのぞいてすべて移植後 28 日以内に検出された。ウイルス分離陽性の 11 検体中、8 検体で U12mRNA が検出され、5 検体で U100 mRNA が検出された。各ウイルス遺伝子発現とウイルス分離との関連性を比較した結果(図 2)、U90 遺伝子発現が最も感度良くウイルス分離陽性検体を検出できることが明らかとなった。

#### 2) リアルタイム RT-PCR 法を用いた HHV-6 遺伝子発現解析による悪性リンパ腫組織でのウイルス再活性化に関する検討。

125 名のうち男性 66 名、女性 59 名。125 検体中 44 検体(35.2%)で HHV-6 DNA が検出された(4.6~11629.7 copies/μg, 平均:217.3

±1161.9 copies/ $\mu$ g). 一方, EBV DNA は 99 検体 (79.2% : 12.0~959549266.0copies/ $\mu$ g, 平均: 16468327.7±99950321.0 copies/ $\mu$ g) で陽性となった. 各疾患群におけるリンパ生検組織中ウイルス DNA 量の分布は図 1 に示す通りで, EBV DNA 量は疾患群間でウイルス DNA 量に有意差が認められたが, HHV-6 DNA 量については疾患群間に有意差はなかった. また, HHV-6 DNA 量と EBV DNA 量の間には相関はなかった. HHV-6 DNA 陽性検体の中で凍結保存細胞が残存していた検体について, real-time RT-PCR 法により遺伝子発現の有無を解析した結果, 1 検体だけ U90, U12, U100 の三種類の遺伝子発現が確認された. その他の検体ではいずれの遺伝子転写産物も検出されなかった. 次に, HHV-6 DNA が検出された 29 検体のリンパ節について, HHV-6 DNA 量と宿主サイトカイン, ケモカイン, HGF 遺伝子発現の関連性を調べた. その結果, HHV-6 DNA 量と宿主 CXCR12, IL-8 (data not shown), VEGFA, VEGFC, HGF 遺伝子発現量の間には有意な正の相関が確認された.

### 3) 造血幹細胞移植後 HHV-6 感染の宿主免疫に及ぼす影響解明.

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/ $\mu$ 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的変化では, 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.

### D. 考察

初年度に構築した real-time RT-PCR 法による各遺伝子発現量の推移は, ウイルス分離やウイルス DNA 量のピークともよく一致しており, 効率よく活動性感染を反映していると考えられる. 特に, DNA PCR と異なり, ウイルス分離時期ときわめてよく一致していた. 感度の点から, 前初期遺伝子である U90 mRNA の発現量モニタリングが最適と考えられる.

2 年目に実施した, リアルタイム RT-PCR 法による HHV-6 mRNA 発現解析法を用いた検討で, 悪性リンパ腫患者生検リンパ節から, 過去の報告通り HHV-6 DNA がかなりの頻度で検出された. しかしながら, EBV と異なり疾患群間でウイルス DNA 量に差はなかった. さらに, それら HHV-6 DNA 陽性のリンパ節中わずか 1 検体でのみ, HHV-6 の三種類の遺伝子発現が確認されたことから, HHV-6 の再活性化は起きているもののその頻度は極めて低く, ほとんどが潜伏感染状態にあると考えられた.

ウイルス DNA 量と宿主 CXCL-12, IL-8, HGF 遺伝子発現量の間には正の相関が認められたことから, 潜伏感染した HHV-6 が宿主ケモカインや HGF 遺伝子発現に何らかの影響を与え, 転移しやすさなど悪性リンパ腫の生物学的性状に関与している可能性が示唆された.

幹細胞移植後 14 から 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 産生の抑制を起し、免疫機能抑制に導くとの報告がある。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

- 1) U90 遺伝子発現をモニタリングする real-time RT-PCR 法は、HHV-6 活動感染の良い指標となる。
- 2) 我々が開発した HHV-6 遺伝子発現をモニタリングする real-time RT-PCR 法を用いることにより、これまで本ウイルスの関与が示唆されていた悪性リンパ腫患者リンパ組織におけるウイルスの存在様式を明らかにすることができた。
- 3) 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) 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.
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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 50:65-68, 2011
- 6) 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* 51:12-19, 2011.
- 7) 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
- 8) 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.
- 9) Higashimoto Y, Ohta A, Nishiyama Y, Ihira M, Sugata K, Asano Y, Ablashi DV, Yoshikawa T. Development of human herpesvirus 6 variant specific immunoblotting assay. *J Clin Microbiol* (in press)
- 10) Kawamura Y, Ohashi M, Asahito H, Takahashi Y, Kojima S, Yoshikawa T. Posterior reversible encephalopathy syndrome in a child with post-transplant HHV-6B encephalitis. *Bone Marrow Transplant* (in press)
- 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

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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 Immunol	16	1132-1138	2009
Saijo M.	Emerging and re-emerging infection threats to society.	J Disaster Res	4	291-297	2009
Saijo M, Morikawa S, Kurane I.	Diagnostic systems for viral hemorrhagic fevers and emerging viral infections prepared in the National Institute of Infectious Diseases.	J Disaster Res	4	315-321	2009
Morimoto K, Saijo M.	Imported rabies cases and preparedness for rabies in Japan.	J Disaster Res	4	346-357	2009
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
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
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
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

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
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
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
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
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
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
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
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
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

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
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
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
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
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.	Clin Neurol Neurosurg	112	153-156	2010
Kaneko Y, Ohno H, Kohno S, Miyazaki Y.	Micafungin alters the expression of genes related to cell wall integrity in <i>Candida albicans</i> biofilms.	Jpn J Infect Dis	63	355-357	2010
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.	Med Mycol	48	606-612	2010
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(大 阪)		163- 168	2010
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
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

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
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
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
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
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	1369-1376	2010
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	2839-2846	2010
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	32-36	2010
Gotoh K, Ito Y, Ohta R, Iwata S, Nishiyama Y, Nakamura T, Kaneko K, Kiuchi T, Ando H,	Immunologic and virologic analyses in pediatric liver transplant recipients with chronic high Epstein-Barr virus	J Infect Dis	202	461-469	2010

Kimura H.	loads.					
Kiuchi T, Onishi Y, Nakamura T.	Small-for-size graft: not defined solely by being small for size.	Liver Transpl	16	815-817	2010	
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	
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(大阪)		288-294	2010	
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	
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 sdenovirus DNA dimultaneously.	J Clin Microbiol	48	825-30	2010	
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	
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	
Galatini 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	
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	
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	