

図2 抗ヘルペス薬の作用機序

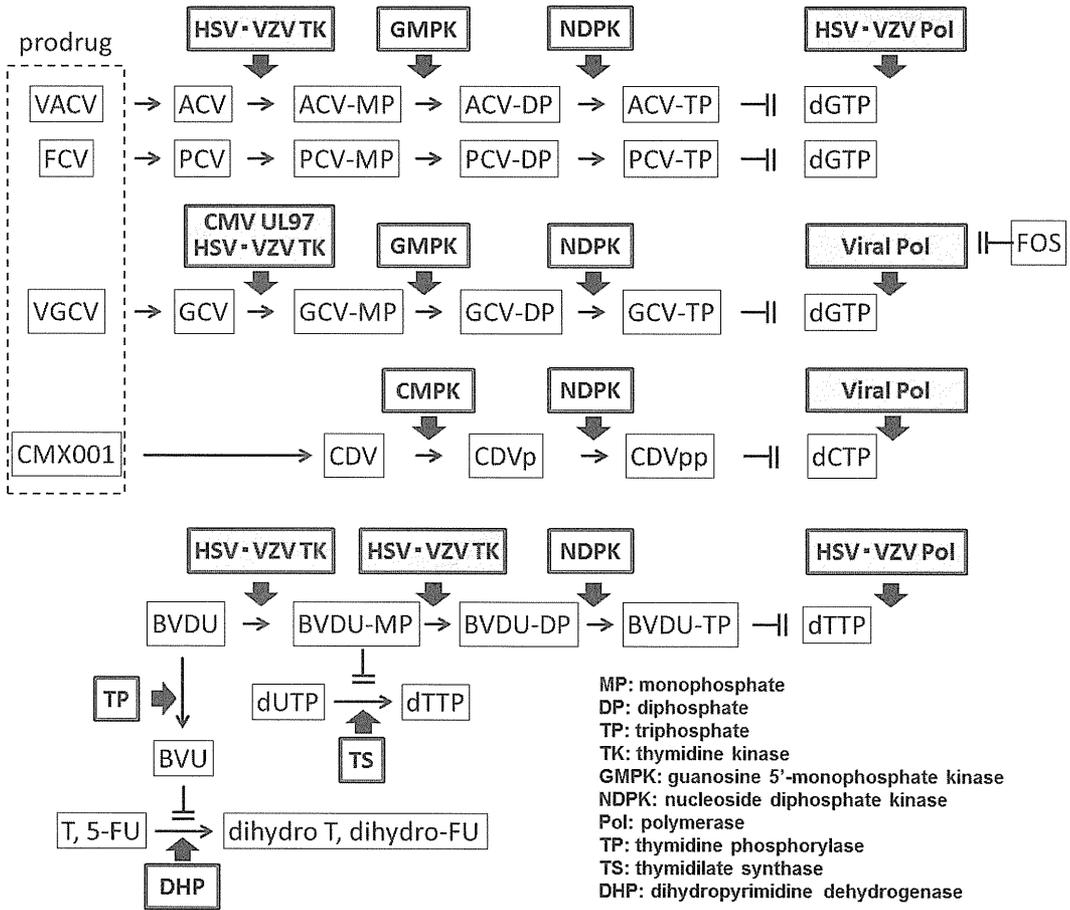
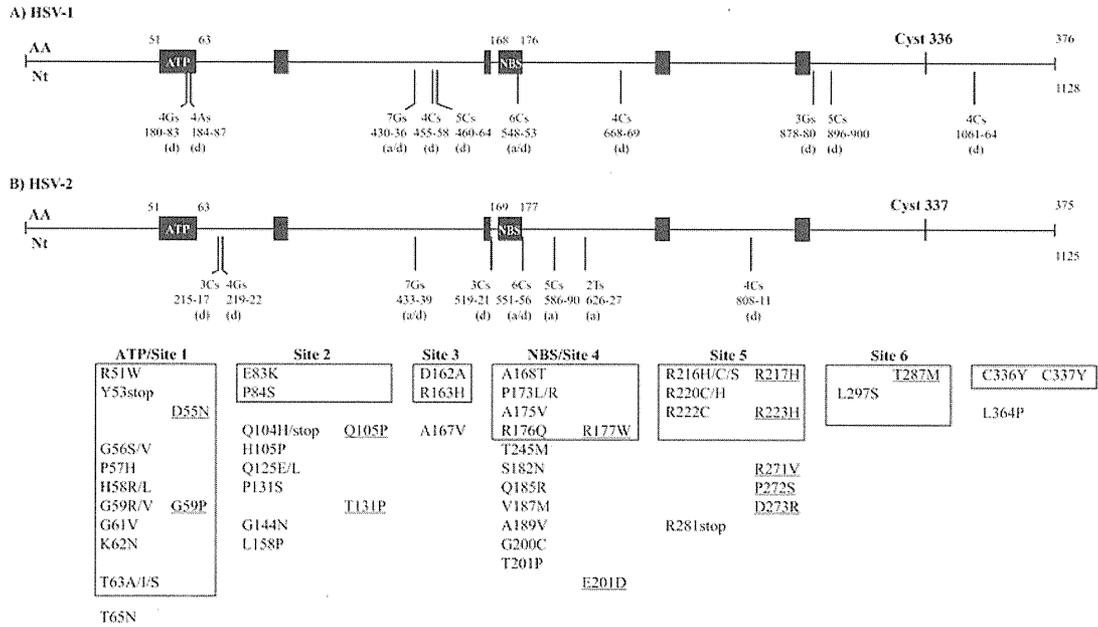


図3 HSVにおけるACV耐性変異(Piret & Boivin, 2011)

HSV TK



HSV ポリメラーゼ

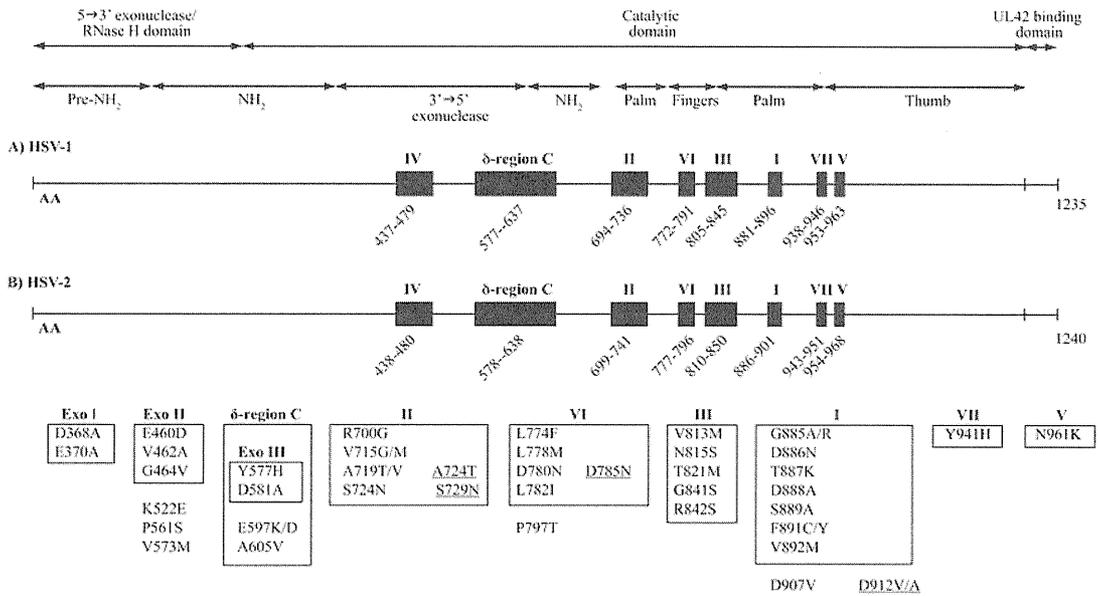
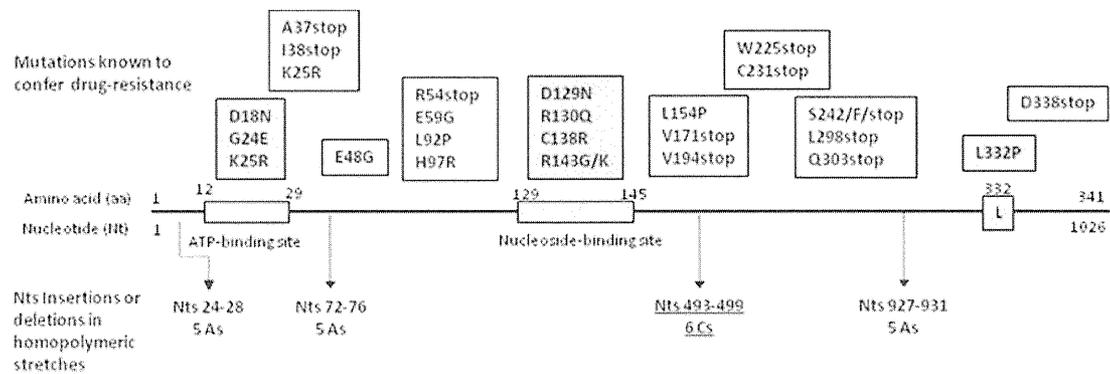
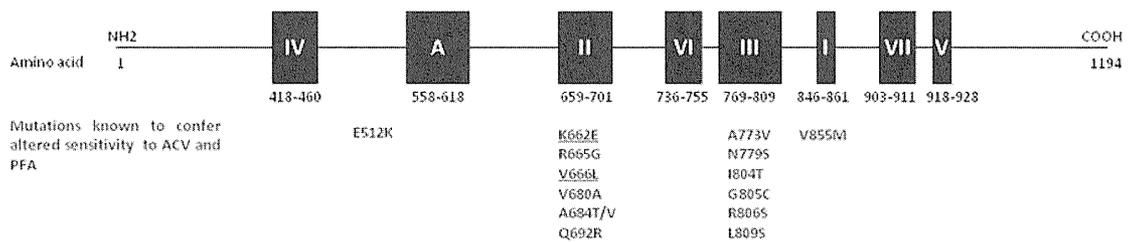


図4 VZVにおけるACV耐性変異(Andrei et al, 2012)

VZV TK



VZV ポリメラーゼ



臓器移植患者における感染予防

藤田保健衛生大学医学部小児科学

吉川 哲史

1. はじめに

固形臓器移植患者は、移植臓器に対する宿主の拒絶反応を制御するため、移植後恒久的に免疫抑制剤の服用が必要となる。一方、造血幹細胞移植 (hematopoietic stem cell transplantation; HSCT) においても、原疾患に対する治療と移植後の移植片対拒絶反応 (graft versus host disease; GVHD) を防ぐため、抗がん剤や免疫抑制剤、放射線照射といった前処置が必要となり、また移植後も GVHD 予防のため免疫抑制療法を継続する必要がある。このような状況下では日和見感染症が問題となるが、本項では主に水痘感染に焦点を当ていわゆる院内感染対策をどのように進めるかについて述べる。このような患者の水痘感染は極めて重症化し、稀に致死的な経過をたどる。また水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) は空気感染する代表的な病原体であり、適切な院内感染対策は極めて重要である。幸いその他問題となるウイルス感染症、例えばアデノウイルス感染症などと異なり、VZV には有効な抗ウイルス剤、ワクチンがあるため、このような有効手段を使って水痘院内感染からいかにして患者を守るかは重要な課題である。

2. 免疫不全宿主での重症水痘

臓器移植患者をはじめとして新生児、成人、妊婦、などで水痘は重症化するが、特に強い細胞性免疫抑制状態にある移植患者においては致死的な経過をたどることがある¹⁾。近年の医療の進歩に伴い臓器移植患者のみならず、自己免疫疾患患者をはじめとした医原性免疫不全患者が増加しており、そのような患者における fatal varicella の報告も相次いでいる。

このような患者を診療する上で大切なのは、皮疹出現前に激しい腹痛、背部痛、腰痛を認めることである¹⁾。水痘既往のない免疫不全宿主が原因不明の激しい腹痛や背部痛を訴えた際には、本症を念頭に迅速に診断治療を進める必要がある。一般に皮疹数は多く、出血性となる場合や、巨大な水疱を形成することもある。致死的水痘の典型例では、急速にトランスアミナーゼが上昇し、多臓器不全となり数日間で不幸な転帰をとる。早期に抗ウイルス剤治療が開始された、あるいはレシピエントの免疫低下がそれほど強くない場合などは治療が奏功するが、その際も皮疹の痂皮化までに長期間を要することが多い。

免疫が正常な宿主においては水痘の再罹患はないと考えられているが、臓器移植をはじめとした免疫不全宿主においては水痘再罹患を疑わせる症例が報告されている²⁻⁶⁾。水痘患児と接触したレシピエントに対し、感染後の軽症化を目的として後述する varicella zoster immune globulin (VZIG) を投与するが、その投与前に VZV IgG が検出されていた症例がその後軽症水痘を発症したという報告がほとんどである。再感染の正確な証明のためには、初回水痘と二回目の水痘罹患時に皮疹部から VZV を検出する必要がある。実際にはこのようなことは極めて困難で、確実な水痘再罹患連の証明は難しいと思われる。

る。

3. 院内での水痘患者発生時の対応策(表 1)

臓器移植患者における VZV 感染経路は, index case の皮疹部 VZV の直接接触と, 気道から排泄される VZV による空気感染の二つのルートがある。重症度を左右する要因としては暴露ウイルス量が重要と考えられ, 患者との接触時間, 接触の濃厚さが関わってくる。水痘の家族内感染では約 90%の感受性者が水痘を発症し, 帯状疱疹の家族内感染の場合は約 25%とされており⁷⁾⁸⁾, いずれにせよ感染力は極めて強いと考えて良い。しかし, 友人との一過性の接触や, 院内での一時的な患者接触による場合は, 発症率は約 20%まで低下する⁹⁾。一方で全く水痘患者との接触歴がない(気づいていない)にもかかわらず院内感染がおこることも忘れてはならない¹⁰⁻¹³⁾。院内感染対策をとる際に, どのような状況を水痘あるいは帯状疱疹患者との接触ありと定義するかは重要な問題であるが, 残念ながら現時点で明確な基準はない。現状では, 特に臓器移植患者に対する院内感染制御考慮する場合には, より安全性を考慮してわずかな接触歴しかないレシピエントに対しても対策を講じたほうが良いと思われる。

院内感染制御対策としてまず大事なことは, 基本的なことではあるが全ての入院患児について水痘の罹患歴, ワクチン接種歴を事前に把握しておくことである。これは, そのような事態が生じた際に速やかな対策を講じる上で必須となる。万が一入院患者が水痘あるいは帯状疱疹を発症した場合には, 退院が可能であれば直ちに退院させる。不可能であれば個室管理とし, 標準予防策に加え空気感染予防策, 接触感染予防策をとる。前述のように VZV は空気感染するため¹²⁻¹⁵⁾, 特に同一病棟内に水痘罹患に伴い重症化の恐れがある様な免疫不全患児がいる場合には, 水痘患児は陰圧個室へ隔離するべきである。その上で既往歴, ワクチン接種歴から感受性者を抽出することになるが, 判断が困難な際には水痘抗原皮内テストを実施し VZV に対する特異免疫の有無を確認する。ただし, 免疫抑制剤を服用している臓器移植患者においては本検査が偽陰性となる可能性があるため注意が必要である。

さらに, 明らかに index case との接触が確認された水痘患児についても, 発症 2 日ほど前から感染の可能性があるため隔離が必要である。このような患児も, 退院もしくは外泊が可能であればそのような対応が望ましいが, 入院が余儀なくされる場合はこれらの患児についても個室管理が必要である。免疫学的な健常児であれば潜伏期は 2 週間程度のため, 接触後 10 日から 20 日間の隔離が必要で, 後述の γ グロブリン製剤を投与された移植患児の場合は潜伏期が延長する可能性があるため 28 日まで隔離の必要がある¹⁶⁾。

感受性者中で, ワクチン接種が可能な患児には緊急ワクチン接種が予防策としてある。しかし, 重症化が懸念される免疫不全宿主には水痘ワクチンが使用できないため, 後に述べる γ グロブリン製剤の投与と acyclovir (ACV) の予防内服で対応するしかない。

4. VZIG による発症予防

96 時間以内に水痘帯状疱疹免疫グロブリン (VZIG, 帯状疱疹回復期患者血清から作成された免疫グロブリン製剤)を投与する。しかしながら, わが国では VZIG は入手できないため, 市販の γ グロブリン製剤を使用せざるを得ない。各製剤間で VZV 抗体価レベル

は様々であり、正確な投与量についての基準はないが、400mg/kg 程度の投与量で効果が期待できるものと思われる。しかしながら、VZIG の予防効果についても未だ明確な効果が認められておらず、VZV IgG 陽性患者に VZIG を投与しても抗体価依存性に感染予防効果が増すこともないとされているため、少なくとも VZV 感染のあった全ての抗体陽性レシピエントに対して一律的に γ グロブリン製剤を投与することに対して疑問視する意見もある。

5. 水痘ワクチンによる対応策

健常児においては、感染暴露後 72 時間以内に水痘ワクチンを接種すれば水痘の発症予防、軽症化が可能である。しかしながら臓器移植患者においては生ワクチン接種に伴い重症水痘を発症する懸念があること、ワクチン接種後の免疫誘導についても期待ができないことから、水痘ワクチンによる感染予防策をとることはできない。固形臓器移植の場合は、移植前にあらかじめ水痘ワクチン接種により免疫を誘導しておく方策は考えられるが、血液腫瘍や固形腫瘍等に対する HSCT レシピエントについては、原疾患の診断とともに直ちに化学療法等の宿主免疫を低下させる治療が始まるため、あらかじめ水痘ワクチン接種により免疫を誘導しておくことは現実的に不可能である。米国のように、universal immunization を進めることにより水痘患者数を減少させ、結果的に移植患児を含めたハイリスク患児を水痘感染から守ることが可能である¹⁷⁾¹⁸⁾。しかしながら、未だ水痘ワクチンが任意接種で、接種率が 40%程度にとどまっているわが国においては、まずはレシピエントと接触する機会の多い家族や、医療従事者などの中に水痘感受性者がいる場合に、水痘ワクチン接種を勧めることが重要である。

現行の水痘ワクチンを加熱して不活化し、自家骨髄移植の 30 日前、移植後 30, 60, 90 日に接種した臨床研究があるが、それによるとワクチン接種により帯状疱疹の発生頻度が低下したとされている¹⁹⁾。今後、不活化水痘ワクチンならびにアジュバントにより、移植患者を含めた免疫不全宿主においても安全かつ有効に VZV に対する免疫能が誘導できるようになることが望まれる。

6. 抗ウイルス剤による発症予防法

水痘患者と接触した際の感染予防策として、前述の VZIG あるいは水痘ワクチンによる予防法があるが、臓器移植患者に対しての生ワクチン接種は不可能なため、 γ グロブリン製剤による予防可能時期を逸してしまったような場合の対策が必要となる。免疫学的に健常な児においては、潜伏期後半[患者と接触後 8 日目から発症予定日(14 日後)]に ACV を予防内服することにより、発症予防もしくは症状の軽症化、且つ有効な免疫獲得が可能である²⁰⁾²¹⁾。投与方法の詳細は、患者との接触後 7 日目より ACV を 40mg/kg, 1 日 4 回, 7 日間経口投与する。尚、無症状で経過した症例については約 2 ヶ月後に VZV 抗体価を測定し未感染例には水痘ワクチン接種をしておくことが望ましいとされている。しかしながら、臓器移植患者をはじめとした免疫不全宿主においては、発症予防目的に VZIG あるいは γ グロブリン製剤が投与されることが多く、その場合潜伏期が最大 28 日程度まで延長することがある。さらに、水痘発症後も長期間にわたりウイルス増殖が抑制できず症状が持続することが多い。よって、移植後レシピエントをはじめとした免疫不全患児では、少なくとも 7 日間だけの予防内服では不十分と思われる。今後適切な投与量、投与期間を明らかにしてゆく必要があるが、現時点では可

能であれば末梢血単核球中の VZV DNA 量をリアルタイム PCR 法でモニタリングしながら、投与期間を慎重に見極めるのが望ましい。

最近、悪性腫瘍を対象とした研究ではあるが、水痘院内感染に対しどのような対応策を取られたか解析したデータが英国より報告された²²⁾。それによると、英国では毎年 250 名の悪性腫瘍患児が水痘の院内感染を受けて問題となり、そのうち約半数が VZIG の投与を受け、残りの半数が ACV の予防投与を受けていたとされている。筆者らは、未だ英国ではどちらの方策を取るべきかコンセンサスが得られておらず、早急にエビデンスを作るべきであると考察している。わが国でも同様の状況で、今後研究班等で全国レベルの臨床研究を計画して、移植患児における ACV の予防内服による感染予防法の確立が望まれる。

7. まとめ

院内で水痘患者が発生した際の対応、特に臓器移植患者をはじめとした免疫不全宿主が入院している病棟での対応策を中心に述べた。有効な抗ウイルス剤が使用できるにもかかわらず未だ、このような免疫不全宿主が水痘に罹患し重症化することが発生している。中には死亡する例もあり、適切な対応策は不可欠である。

引用文献

1. Gershon A. Varicella-zoster virus. In Feigin RD, Cherry JD, Kaplan SL, and Demmler-Harrison GJ., (eds), Textbook of Pediatric Infectious Diseases Sixth edition Saunders Elsevier, Philadelphia, 2007-2008, 2009
2. Gershon AA, Steinberg SP, Gelb L. Clinical reinfection with varicella-zoster virus. J Infect Dis 149:137-142, 1984
3. Talbot GH, Skros M, Fisher M, Friedman H. Immunologic evidence of reinfection with varicella-zoster virus. J Infect Dis 149:1035-1036, 1984
4. Pallett AP, Nicholls MW. Varicella-zoster: reactivation or reinfection? Lancet 1(8473):160, 1986
5. McNamara MP, LaCrosse S, Piering WF, Rytel MW. Exogenous reinfection with varicella-zoster virus. N Engl J Med 317:511, 1987
6. Taha Y, Scott FT, Parker SP, Syndercombe Court D, Quinlivan ML, Breuer J. Reactivation of 2 genetically distinct varicella-zoster viruses in the same individual. Clin Infect Dis 43:1301-1303, 2006
7. Ross AH. Modification of chicken pox in family contacts by administration of gamma globulin. N Engl J Med 267:369-376, 1962
8. Seiler HE. A study of herpes zoster particularly in its relationship to chickenpox. J Hygiene 47:253-262, 1949
9. Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of varicella: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR 45(RR-11):1-36, 1996

10. Leclair JM, Zaia JA, Levine MJ, Congdon RG, Goldmann DA. Airborne transmission of chickenpox in a hospital. *N Engl J Med* 302:450–453, 1980
11. Gustafson TL, Lavelly GB, Brawner ER, Hutcheson RH, Wright PF, Schaffner W. An outbreak of airborne nosocomial varicella. *Pediatrics* 70:550–556, 1982
12. Josephson A, Gombert ME. Airborne transmission of nosocomial varicella from localized zoster. *J Infect Dis* 158:238–241, 1988
13. Sawyer MH, Chamberlin CJ, Wu YN, Aintablian N, Wallace MR. Detection of varicella–zoster virus DNA in air samples from hospital rooms. *J Infect Dis* 169:91–94, 1994
14. Suzuki K, Yoshikawa T, Tomitaka A, Matsunaga K, Asano Y. Detection of aerosolized varicella–zoster virus DNA in patients with localized herpes zoster. *J Infect Dis* 189:1009–1012, 2004
15. Suzuki K, Yoshikawa T, Tomitaka A, Suzuki K, Matsunaga K, Asano Y. Detection of varicella–zoster virus DNA in throat swabs of patients with herpes zoster and on air purifier filters. *J Med Virol* 66:567–570, 2002
16. American Academy of Pediatrics, Varicella–Zoster Infections. In: Pickering LK, Baker CJ, Long SS, McMillan JA, eds. *Red Book 2006: Report of Committee on Infectious Diseases*, 27th Ed. American Academy of Pediatrics, 2006.
17. Guris D, Jumaan AO, Mascola L, Watson BM, Zhang JX, Chaves SS, Gargiullo P, Perella D, Civen R, Seward JF. Changing varicella epidemiology in active surveillance sites—United States, 1995–2005. *J Infect Dis* 197 Suppl 2:S71–75, 2008
18. Marin M, Zhang JX, Seward JF. Near elimination of varicella deaths in the US after implementation of the vaccination program. *Pediatrics* 128:214–220, 2011
19. Hata A, Asanuma H, Rinki M, Sharp M, Wong RM, Blume K, Arvin AM. Use of an inactivated varicella vaccine in recipients of hematopoietic–cell transplants. *N Engl J Med* 347:26–34, 2002
20. Asano Y, Yoshikawa T, Suga S, Kobayashi I, Nakashima T, Yazaki T, Ozaki T, Yamada A, Imanishi J. Postexposure prophylaxis of varicella in family contact by oral acyclovir. *Pediatrics* 92:219–222, 1993
21. Suga S, Yoshikawa T, Ozaki T, Asano Y. Effect of oral acyclovir against primary and secondary viraemia in incubation period of varicella. *Arch Dis Child* 69:639–642, 1993; discussion 642–643.
22. Bate J, Chisholm J, Heath PT, Breuer J, Skinner R, Manley S, Patel S, Wheatley K, Ramsay M, Kearns PR, Hambleton S. PEPTalk: postexposure prophylaxis against varicella in children with cancer. *Arch Dis Child* 96:841–845, 2011

臓器移植患者における感染病理学的診断

国立感染症研究所感染病理部

片野 晴隆

1. はじめに

移植医療における病理の役割は、移植前の原疾患に対する病理診断および移植後の生着、治療効果判定のための診断が中心と考えられてきた¹⁾。しかし、近年の免疫抑制剤の進歩により、急性拒絶反応は減少し、今や HLA や血液型の壁も乗り越えつつある。現在では、病理診断の重点課題は長期生着例での生着臓器の診断にシフトしつつある。免疫抑制剤の改良とは免疫抑制効果の高い薬剤が使われることであり、高度な免疫抑制状態を長期間保つことができるようになったことを意味する。それはすなわち、感染症の発症リスクが増加することにほかならず、今後、移植医療における病理の役割の中で、感染症の病理診断は重要な位置を占めるようになるであろう²⁾。病理は生検サンプルからの感染症の確定診断を期待される。しかし、移植患者から採取された組織は宿主の免疫状態によりさまざまな修飾を受けており、感染症の病理診断は必ずしも容易ではない。免疫抑制剤による免疫不全状態では、ウイルス、細菌、真菌など、さまざまな感染症が発症する。健常者では常在ウイルス、常在菌として存在する微生物が、免疫不全者では再活性化し、疾患の原因となる場合がある。健常者ではまれにしか発症しない感染症もしばしば発症する。移植症例の感染症の診断には宿主の免疫反応と病原微生物の病理病態について幅広い知識が要求されるのである。本稿では臓器移植の際の病理検査で注意すべき感染症についてその概要を述べ、ヘルペスウイルス感染症を中心に、病理学的特徴と病原体の同定法について述べる。

2. 臓器移植における病理検査と感染症

移植臓器の生検は生着の判定に重要な情報をもたらすことから、術前生検、術中生検 (one hour biopsy)、定期生検 (protocol biopsy)、エピソード生検 (episode biopsy) など、さまざまな時期に実施され、複数回行われることもしばしばである。拒絶反応の監視が一義的な目的であるが、感染症は生着の可否を左右する大きな要因の一つであることは言うまでもない。サンプルには針生検が多いが、一般的に使用されている 20% 中性緩衝ホルマリン固定液で固定したパラフィン包埋切片で形態の観察は十分である。多くのウイルスはホルマリン固定パラフィン包埋切片で検出可能であるが、ウイルス核酸の検出などでは凍結標本を用いた方が検出感度がよい場合がある。

臓器移植における感染症の病原体はドナー由来のものとレシピエント由来のものがある²⁾。ドナーの臓器は通常、肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus, HIV) などのスクリーニングを行ってから、移植に使用するために、問題となる症例は多くない。一方、原疾患がウイルス感染症である場合はレシピエント由来の病原体が問題となる。下記に各臓器移植、および、造血細胞移植における感染症病理の特徴と、ヘルペスウイルス感染症以外のもので病理として注意すべき感染症を列挙する。

- 1) 腎臓移植:日本で最も症例数の多い臓器移植であり, 2010 年には年間 1,400 件を超える腎移植が行われている³⁾. 5 年生着率も生体腎で 9 割を超え, 技術的には確立してきている. サイトメガロウイルス (cytomegalovirus, CMV) 感染症, エプスタイン・バーウイルス (Epstein-Barr virus, EBV) による移植後リンパ増殖性疾患 (post-transplant lymphoproliferative disorder, PTLD), C 型肝炎ウイルスなどが頻度の高い感染症であるが, 近年, 注目されているのがポリオマウイルス腎症である. BK ウイルスによるポリオマウイルス腎症については後述する.
- 2) 肝臓移植:本邦では年間 400-500 例ほどの実施例がある³⁾. ほとんどは生体肝移植である. ヘルペスウイルスでは CMV 感染症, EBV による PTLD, 単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus, HSV) 感染症, 水痘帯状疱疹ウイルス (varicella zoster virus, VZV) 感染などが問題となるが, 肝移植の場合, やはり, 頻度が高いのは肝炎ウイルスである. 原疾患が C 型肝炎ウイルスによる肝硬変などである場合, C 型肝炎ウイルスを移植前に完全に排除することは困難であり, C 型肝炎の再発が大きな問題となる. 組織学的には門脈域, 特に胆管への炎症性細胞浸潤が見られ, 急性の拒絶反応との区別が困難であり, インターフェロンを早期に投与する施設が多い.
- 3) 肺移植:日本では 2010 年までに 187 例が行われ, 2010 年のみでは 36 件の実施例がある. 肺は外来の病原微生物の侵入門戸であるために, 多くの感染症が報告されており, 術後早期の緑膿菌, クレブジラ, 黄色ブドウ球菌などの細菌感染症やカンジダやアスペルギルスのような真菌感染症にも注意が必要である. ウイルスでは CMV の頻度が最も高く, HSV, パラインフルエンザ, RS ウイルス, メタニューモウイルス, コロナウイルスなどが肺炎を起こす. EBV による PTLD も移植後の 6%に見られる⁴⁾.
- 4) そのほかの臓器移植:心, 膵, 小腸移植については海外から多くの報告例があるが, 日本ではいずれも症例数が少ない. 心, 膵移植は 2010 年の臓器移植法改正後, 実施例は増加し, 2010 年にはいずれも 20 件を超える数が実施されている³⁾. CMV 感染症と EBV による PTLD が問題となる. 特に小腸移植ではパイエル板が PTLD の母体となることがあり, 生検組織で EB virus-encoded small RNA (EBER) の in situ hybridization により, EBV 感染細胞を同定することは重要である.
- 5) 造血細胞移植:骨髄移植, 造血幹細胞移植などを含め, 年間 4000 件を超える実施例がある⁵⁾. CMV 感染症, カンジダ症, アスペルギルス症やさまざまな細菌感染症が見られ, EBV による PTLD も報告されている. 頻度の詳細は日本造血細胞移植学会の 2008 年の全国調査を参照されたい⁶⁾.

3. 病理検体における病原微生物の同定

免疫抑制状態にある個体では病原体の増殖速度が速いため, 病理標本でも病原体が検出しやすいのでは, と思われがちである. しかし, 実際の病理組織標本での病原体検索では, 炎症などの免疫反応を手掛かりに病原体の局在を知ることが多く, 免疫抑制状態では, かえって病原体発見が難しくなることもある. 以下, 病理検体における病原体検出の一般論と移植患者での注意点を述べる.

1) パラフィン標本における病原体同定

パラフィン切片における病原体同定の第一歩は HE 染色標本の炎症や組織破壊が起

きている部位ないし周辺部を高倍率で丹念に観察することである。病原体が増殖、浸潤している周囲には通常、炎症、変性、出血、壊死など、なんらかの宿主側の反応が起きていることから、こうした微細な変化を手掛かりに病原体の検索をする。しかし、移植患者の場合は免疫抑制剤の影響で宿主側の反応が乏しい場合があり、健常者のサンプルよりも、微細な変化を見落とさないよう細心の注意が必要である。

細菌以上の大きさを持つ微生物は顕微鏡で直接観察が可能である。大きな菌塊や太い菌糸の観察は顕微鏡でも比較的容易であるが、菌数が少ない場合や、マイコプラズマやリケッチアのごく小さい細菌類は顕微鏡での直接の菌体の観察は困難である。真菌は大きさがあるために、HE染色に加え、PAS染色、グロコット染色で、菌糸の形状の形態的な観察から、多くの症例で菌種まで区別することが可能である。細菌感染症の病理標本における菌体の同定はHE染色の他に、グラム染色、PAS染色、グロコット染色などで可能であるが、菌種の同定にはPCRや免疫染色が必要である。結核などの特異性炎を誘導するものは、その病変部の組織学的特徴とチールネルゼンなどの特殊染色の結果から菌種を推定することができる。ウイルスに関しては感染細胞が特徴的な形態を示す場合がある。免疫染色、in situ hybridization、遺伝子検査などがあり、病原体により適切な方法を選択する。

2) 病理検体を用いた病原体遺伝子検査

病原体遺伝子検査は可能であれば凍結材料から抽出した核酸を用いたほうが感度がよい。しかし、ホルマリン固定パラフィン包埋標本(formalin-fixed paraffin-embedded sample, FFPE)でも病原体遺伝子検査は可能である。ただし、ホルマリン固定によりDNAは通常200bp以下に断片化される点に注意が必要である。抽出核酸の質は重要で、近年はFFPEの切片から高品質のDNAまたはRNAを抽出する、優れたキットが発売されている。薄切の際には新しい替え刃を使う、検体ごとにホルダーの清掃を行うなど、他の材料のコンタミネーションを避けるための細心の注意を払う必要がある。以下、病原体遺伝子検査の方法として最も一般的な定量的PCR、PCR法と最近開発された新しい方法を紹介する。

- ① Real-time PCR, PCR: FFPEから抽出した核酸は断片化しているため、ampliconが200bp以上の通常のPCRでは極端に感度が落ちる。そこで、FFPEサンプルから抽出した核酸の遺伝子検査には、ampliconが200bp以下のreal-time (RT-)PCRが有効である。Real-time PCRでは目的遺伝子のコピー数が検出されることで、病原体と疾患との関連を考える上で大きな参考となる。Forward primerを逆転写酵素のプライマーとして併用するOne-step real-time RT-PCRを用いることで、RNAウイルスの検出も可能である⁷⁾。
- ② 病原体遺伝子検査の新しい方法: 近年の分子生物学の進化はめざましく、病原体遺伝子を検出する方法も高感度な遺伝子検査が可能となったことで、大きく変化しようとしている。ここでは、現在は研究段階にあるが、将来的に広く使われることになるであろう2つの方法を紹介する。

A) Real-time PCRを用いたウイルスの網羅的検出法

Real-time PCRを応用して、5-10 mgのDNA、RNAから96ウェルプレート1

枚で約 160 種類のヒトに病原性のあるウイルスを網羅的に検出する方法である⁸⁾。国立感染症研究所感染病理部で開発されたもので、原因不明の病理検体のうち約 1 割は本検出系により病原ウイルスが同定されている。現在では 1 検体当たりのコストが高いのが難点であるが、いずれ簡易型、普及型が開発されるのを待ちたい。

B) 次世代シーケンサーによる遺伝子の網羅的解読

大量の遺伝子配列を一気に、網羅的に解読する大型の遺伝子解析装置である。現在、のべ 200 Gbp もの配列を一度に解読が可能で、解読された遺伝子断片の配列 (read) からデータベース上に登録されている病原体の配列と一致するものをコンピューターで選別する。すべての遺伝子情報が解読される点は大きなインパクトがあり、FFPE の病理検体でも使用可能で、ウイルス遺伝子の同定などに使用されている⁹⁾。

4. 臓器移植の際に問題となるヘルペスウイルス感染症の病理診断の実際

1) サイトメガロウイルス (cytomegalovirus, CMV)

CMV は免疫抑制下の造血細胞／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の一つである。免疫不全患者における CMV 感染症は肺、脳、眼、消化管、副腎、肝臓など、あらゆる臓器に発症する可能性がある。血液からの CMV の検出にはアンチゲネミア、PCR などが一般的であるが、病理組織ではフクロウの目といわれる特徴的な核内封入体を持つ感染細胞の同定と、免疫染色で CMV 抗原を検出することが重要である (図 1)。CMV は多くの細胞種の感染可能であるが、臓器ごとにある程度、臓器内の局在に傾向がみられる。たとえば、脳では感染細胞は主に脳室周囲に認められ、白質などの実質深くに入り込むことはまれである。眼では網膜にほぼ限定して感染細胞が見られる。唾液腺では腺房細胞に、消化管では潰瘍を起こし、潰瘍底から潰瘍周辺部に感染細胞が見られる。肺ではおもに肺胞上皮にみられる。副腎は免疫不全患者で CMV 感染細胞が見られる頻度の高い臓器であり、感染細胞は主に皮質に見られるが、髄質に見られることも多い。パラフィン切片でも検出可能な抗体が発売されており、免疫染色は CMV 感染細胞を同定する方法としてきわめて有効な方法である。特に感染細胞数が少ない場合は HE 染色のみでは見逃す恐れがあり、臨床で CMV 感染が疑われるのに、HE 標本では明らかな感染細胞を認めないような場合、免疫染色で確認を行う必要がある。

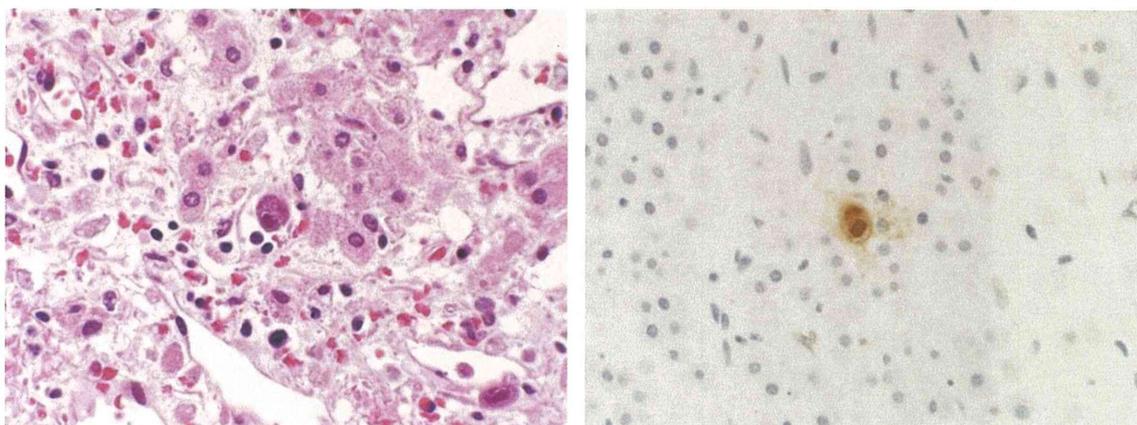


図 1. サイトメガロウイルス感染症. (左)HE 染色. 中央の細胞に halo を伴う好酸性の核内封入体が見られる. (右)免疫染色. CMV の免疫染色では封入体を持った細胞が陽性となる.

2) エプスタイン・バーウイルス (Epstein-Barr virus, EBV)

EBVによる移植後リンパ増殖性疾患はCMV感染症とともに移植後のヘルペスウイルス感染症としては頻度の高い疾患である. 組織学的には early lesions, Polymorphic PTLD, Monomorphic PTLD, Hodgkin lymphoma type PTLD の4つのタイプに分けられる(表)^{10, 11)}.

表. EBV 関連 PTLD (WHO 分類第 4 版からの改変)

病理分類	組織学的特徴	免疫染色	EBER	クローナリティ
Early lesions	小リンパ球, 形質細胞に免疫芽球が混ざる. リンパ濾胞の過形成	おもに B 細胞で, T 細胞が混ざる.	しばしば陽性	みられない.
Polymorphic PTLD	リンパ節の構造は破壊され, さまざまな分化段階のリンパ球が混ざる.	おもに B 細胞で, T 細胞が混ざる.	しばしば陽性	B 細胞のクローナルな増殖
Monomorphic PTLD	B細胞またはT/NK細胞リンパ腫としての形態	B または T/NK 細胞	さまざま	B または T/NK 細胞のクローナルな増殖
Hodgkin lymphoma type PTLD	ホジキンリンパ腫としての形態	腫瘍細胞は B 細胞	症例による.	—

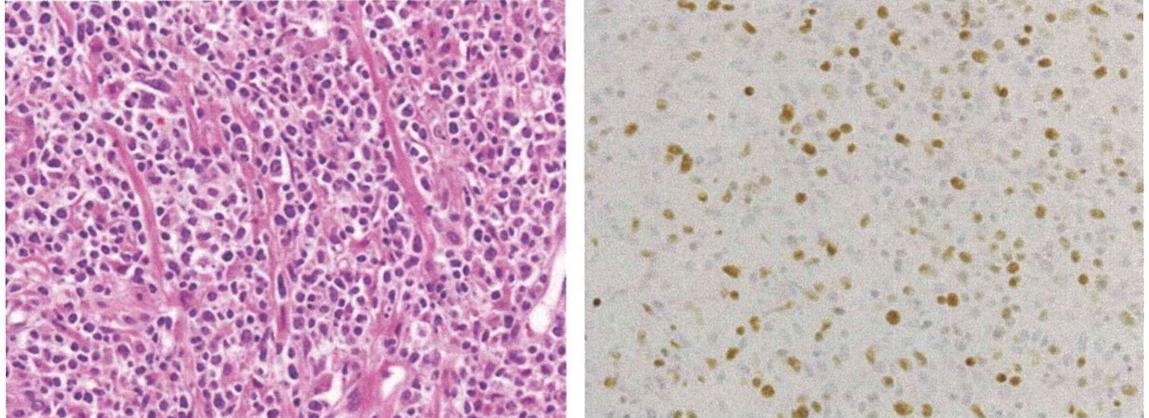


図 2. EBV が関連するリンパ増殖性疾患. 免疫不全患者に合併した EBV 関連リンパ増殖性疾患. (左)HE 染色. 小型から中型のリンパ球に大型の異型の強いリンパ球の増生が見られる. (右)EBER の in situ hybridization. 多くの浸潤リンパ球が EBER 陽性となる.

B 細胞性が多いが T/NK 細胞のクローナリティーが確認されることもある. 免疫染色に加え, EBER の in situ hybridization と Ig 遺伝子再構成検査を行うことが重要である (図2). early lesions は組織学的には形質細胞と小リンパ球の増生が盛んなタイプ (plasmacytic hyperplasia) と免疫芽球の増生が目立つ infectious mononucleosis-like PTLD の 2 つがある. いずれも, リンパ節の構造が保たれていることで他の PTLD とは区別される. 増生している多くのリンパ球が EBER 陽性であり, infectious mononucleosis-like PTLD に出現する免疫芽球は LMP1 も陽性である. Polymorphic PTLD は免疫芽球, 形質細胞, 小～中型のリンパ球の増生によりリンパ節の構造が破壊されている像を呈する. EBER 陽性の B 細胞の増生が主体で, Ig 遺伝子再構成が見られる. さまざまな分化段階の細胞が混在している点でリンパ腫とは区別される. Monomorphic PTLD には transform した B 細胞のクローナルな増殖である B 細胞性のものと T/NK 細胞性のものがある. B 細胞性のものは diffuse large B cell lymphoma と変わらぬ, 完全な腫瘍と見てよい. 多くの大型で異型の強い細胞, 多核の細胞, Reed-Stenberg 様の細胞などが見られる. EBV は陽性のものと陰性のものがある.

3) 単純ヘルペスウイルス 1 型および 2 型 (herpes simplex virus 1 and 2, HSV-1 and -2)

1 型, 2 型とも, 移植後の大脳辺縁系脳炎の原因になる. 画像では両側側頭葉内側部に病変を来し, 組織では出血壊死巣に Full 型ないしは Cowdry A 型の核内封入体を伴う感染細胞を認める. 免疫染色ではこうした壊死巣の封入体を伴う細胞に一致して陽性シグナルを認める. 免疫染色で 1 型, 2 型を染め分けることも可能である. 定量的 PCR はヘルペス脳炎の診断にきわめて有用で, 壊死が強く, 封入体がはっきりしないような標本でも定量的 PCR により高いコピー数の HSV を検出することがある. アシクロビル投与後の生検では感染細胞数が減り, 病理学的な診断が難しくなるが, 高いコピー数が維持されており, 定量的 PCR は有用である.

4) ヒトヘルペスウイルス 6 (human herpesvirus 6, HHV-6)

移植後辺縁系脳炎の原因ウイルスとして最近注目されている¹²⁾。画像上、扁桃体、海馬、海馬傍回、側頭葉内側部に病変を認める。病理では少数の剖検例の報告があるのみで、海馬、扁桃体に神経細胞の脱落と反応性にアストロサイトの増生が認められるとするものが多い。しかし、免疫染色ではHHV-6抗原はほとんど検出されない¹³⁾。定量的PCRでは比較的高いHHV-6のコピー数が検出されることから、ウイルスの直接的な障害というよりも、サイトカインストームなどの間接的な機序が考えられる。

5) 水痘帯状疱疹ウイルス (Varicella zoster virus, VZV)

移植患者では皮膚に帯状疱疹として発症することが多いが、肝炎、脳炎、髄膜炎などを発症する例も見られる。移植後100日以上慢性期に発症する例が多い。帯状疱疹で生検されることはまれであるが、表皮内水疱を形成し、水疱周囲の表皮細胞や、水疱内に脱落した上皮細胞などにCowdry A型、またはFull型の核内封入体が見られる(図3)。真皮内の結合織内にも封入体陽性細胞が見られる。免疫染色ではウイルス抗原は水疱周囲の上皮細胞のみならず、結合組織細胞、血管内皮、リンパ管内皮などにも広く検出される。

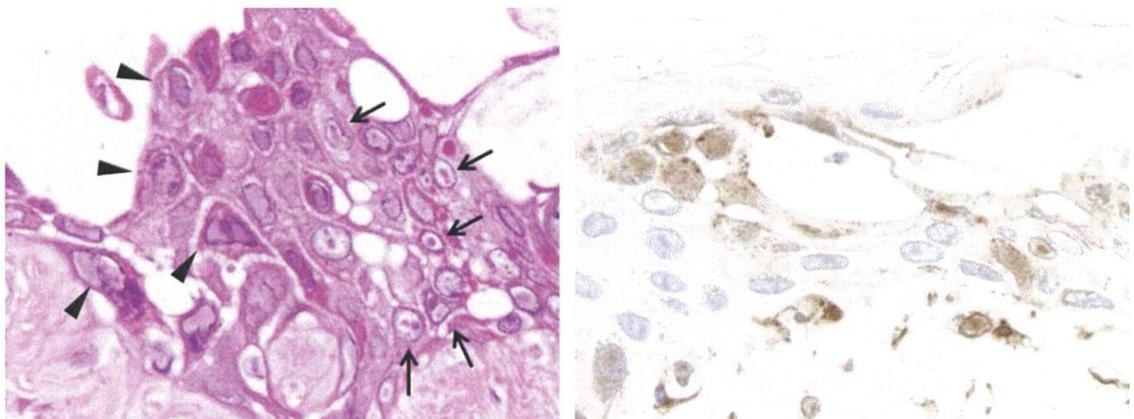


図3. 移植患者に見られた帯状疱疹。(左)HE染色。表皮内水疱の壁を構成する上皮細胞にfull型(矢頭)ないしはCowdry A型(矢印)の核内封入体が見られる。(右)免疫染色。VZVの免疫染色では封入体を持った細胞のみならず、周囲の細胞にも抗原が検出される。

6) ヒトヘルペスウイルス8 (human herpesvirus 8, HHV-8, または、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス, Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV)

海外では腎移植患者でドナー臓器に潜伏感染していたHHV-8が移植後に再活性化し、カポジ肉腫を発症した例が報告されている¹⁴⁾。日本ではこれまでのところ、確定例はない。カポジ肉腫は組織学的には紡錘形の腫瘍細胞が血管隙を伴いながら増殖している像が特徴的であり、HHV-8の潜伏感染タンパクであるLANA-1が免疫染色で検出される。HHV-8はprimary effusion lymphomaなどのリンパ増殖性疾患に関与する点も注意が必要である。

5. 臓器移植とポリオーマウイルス感染症の病理

ポリオーマウイルス感染症は臓器移植後の感染症の中でも注意すべき重要な感染症の一つである。腎移植後のポリオーマウイルス腎症は頻度が高く、移植臓器の生着率に大きく影響する。JC ウイルスはポリオーマウイルス腎症の他に、きわめて予後の悪い PML の原因として重要である。近年、発見されたメルケル細胞ポリオーマウイルスが原因のメルケル細胞癌は移植患者などの免疫不全患者で発症率が高い。

1) BK ウイルス (BK virus, BKV)

ポリオーマウイルス腎症は腎移植後の 3-5%程度に見られ、移植後の生着率に大きく影響する。原因ウイルスのほとんどが BKV である。腎移植後に尿沈査のスクリーニング検査で decoy 細胞が見られるなど、ポリオーマウイルス腎症が疑われる際には積極的に生検を行うことになっている。病理では尿細管上皮の基底膜からの剥離、脱落、壊死が顕著で、尿細管上皮には特徴的な核内封入体が見られ、免疫組織化学ではこれらの封入体が陽性となる(図 4)。生検病理組織の結果を Stage A(早期変化)から Stage B(急性、顕性化)、Stage C(慢性、硬化性変化)に分けることが提唱されており、Stage C は明らかに予後が悪い¹⁵⁾。免疫染色は SV40-T 抗原に対する抗体を用いることが多く、JC ウイルスともクロスする。

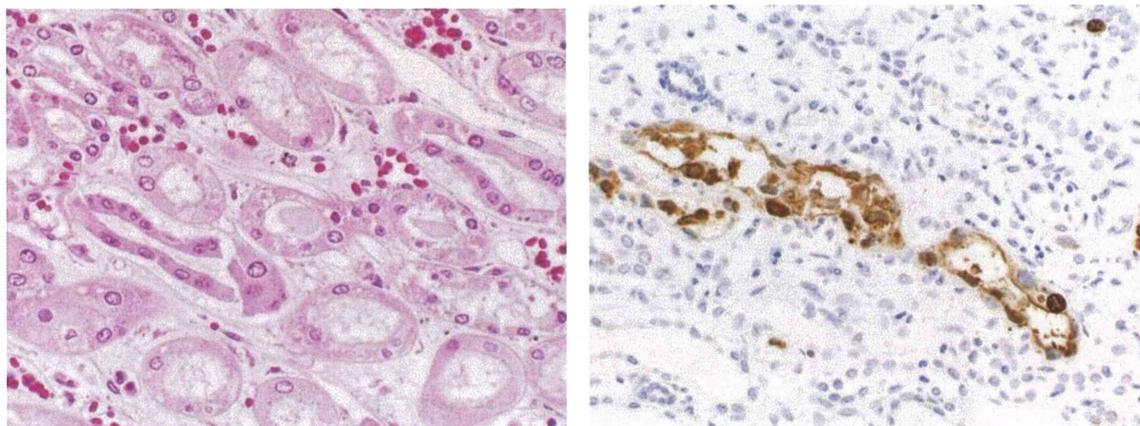


図 4. ポリオーマウイルス腎症。(左)HE 染色。尿細管上皮の脱落、変性が認められる。(右)BKV の免疫染色。変性した尿細管上皮に一致して抗原が陽性となる。

2) JC ウイルス (JC virus, JCV)

進行性多巣性白質脳症(progressive multifocal leukoencephalopathy, PML)の原因ウイルスである。まれではあるが発症すると、脳などの中枢神経を広範に破壊し、痴呆などの重篤な症状を起こす。JCV は健常者の尿中、血中にも検出され、PML 診断において最も確実な検査は、髄液や脳組織内に JCV の存在を証明することである¹⁶⁾。特に脳組織で JCV 抗原を免疫染色で検出することは直接的に脳内で JCV 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である。組織学的には脱髄が著明で、スリガラス状の封入体が見られる、腫大した核を持つ感染細胞が散在する。免疫染色ではこれらの封入体を持つ細胞に陽性シグナルが認められる(図 5)。定量的 PCR でも PML の脳組織から抽出した DNA では非常に高いコピー数の JCV が検出される。

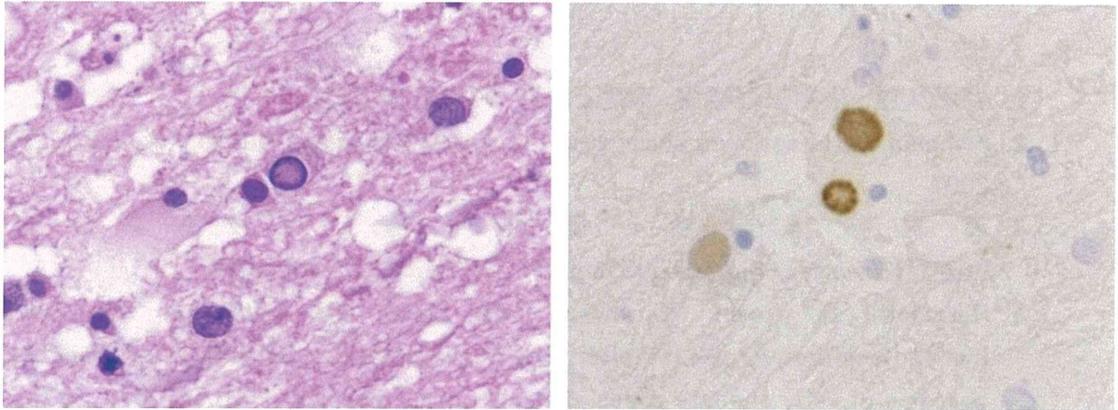


図 5. 進行性多巣性白質脳症. (左)HE 染色. 中央の細胞の核は膨化し, 核内にスリガラス状の構造物が見える. (右)JCV の免疫染色. 膨化した核を持つ細胞に JCV の抗原が検出される.

3) メルケル細胞ポリオーマウイルス (Merkel cell polyomavirus, MCPyV)

皮膚の神経内分泌系の癌であるメルケル細胞癌から発見されたウイルスであり, メルケル細胞癌の約 7-8 割から検出される. 健常者でも 6 割程度が既感染である. 移植患者ではメルケル細胞癌の発症率が健常者に比べると約 10 倍も高く, 進行も早いといわれている^{17, 18)}. メルケル細胞癌は精細なクロマチンを持ち, 明るく, 丸い核を伴う腫瘍細胞がシート状に増殖する像を呈する. メルケル細胞癌組織で MCPyV の large T 抗原に対する抗体を用いた免疫染色を行うと, 核内に陽性シグナルが認められる¹⁹⁾.

6. おわりに

この 20 年の強力な免疫抑制剤の開発により, 急性の拒絶反応の頻度が下がり, 移植医療は大きく進歩した. しかし, その反面, 移植患者では高度な免疫不全状態が長期に継続されているはずであり, 感染症のモニタリングはきわめて重要な予後因子となってきた. その流れの中で, 病理の役割は, 拒絶反応, 生着の評価をすることが中心であったが, 今後は感染症の評価の重要度が増してくると思われる. 感染症の病理診断は病原体と宿主反応の両面から確立されてきたものであるが, 免疫不全状態という, 宿主反応が乏しい状態での感染症の病理診断の歴史は浅い. 豊富な症例を持つ施設でも日本では症例数は限定される. しばらくは海外で蓄積された症例, データから, 有用な情報を読み取りつつ, 移植や感染症についての知識を積み上げていくしかない. 本稿が, 日本における移植後感染症の病理診断の一助になれば幸いである.

引用文献

1. 井藤久雄. 移植病理概論. 病理と臨床 30: 10-14, 2012
2. Fishman JA. Infection in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med* 357: 2601-2614, 2007
3. 日本移植学会. 臓器移植ファクトブック 2011: <http://www.asas.or.jp/jst/pdf/factbook/factbook2011.pdf>; 2012.
4. Paranjothi S, Yusen RD, Kraus MD, Lynch JP, Patterson GA, Trulock EP. Lymphoproliferative disease after lung transplantation: comparison of presentation and outcome of early and late cases. *J Heart Lung Transplant* 20:1054-1063, 2001
5. JSHCT データセンター. 平成 22 年度 全国調査報告書. 2011, http://www.jshct.com/report_2010/
6. JSHCT データセンター. 平成 20 年度 全国調査報告書 移植後感染症. 2008, http://www.jshct.com/report_2008/5-3-tbl5.pdf
7. Nakajima N, Hata S, Sato Y, Tobiume M, Katano H, Kaneko K, Nagata N, Kataoka M, Ainai A, Hasegawa H, Tashiro M, Kuroda M, Odai T, Urasawa N, Ogino T, Hanaoka H, Watanabe M, Sata T. The first autopsy case of pandemic influenza (A/H1N1pdm) virus infection in Japan: detection of a high copy number of the virus in type II alveolar epithelial cells by pathological and virological examination. *Jpn J Infect Dis* 63:67-71, 2010
8. 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
9. Kuroda M, Katano H, Nakajima N, Tobiume M, Ainai A, Sekizuka T, Hasegawa H, Tashiro M, Sasaki Y, Arakawa Y, Hata S, Watanabe M, Sata T. Characterization of quasispecies of pandemic 2009 influenza A virus (A/H1N1/2009) by de novo sequencing using a next-generation DNA sequencer. *PLoS One* 5:e10256, 2010
10. Knowles DM, Cesarman E, Chadburn A, Frizzera G, Chen J, Rose EA, Michler RE. Correlative morphologic and molecular genetic analysis demonstrates three distinct categories of posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Blood* 85: 552-565, 1995
11. Swerdlow SH, Webber SA, Chadburn A, Ferry JA. Post-transplant lymphoproliferative disorders. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al., eds. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues: International Agency for Research on Cancer (IARC):343-349, 2008.*
12. Drobyski WR, Knox KK, Majewski D, Carrigan DR. Brief report: fatal encephalitis due to variant B human herpesvirus-6 infection in a bone marrow-transplant recipient. *N Engl J Med* 330:1356-1360, 1994
13. Shintaku M, Kaneda D, Tada K, Katano H, Sata T. Human herpes virus 6 encephalomyelitis after bone marrow transplantation: Report of an autopsy case. *Neuropathology* 30:50-55, 2010
14. Regamey N, Tamm M, Wernli M, Witschi A, Thiel G, Cathomas G, Erb P. Transmission of human herpesvirus 8 infection from renal-transplant donors to recipients. *N Engl J Med*

- 339:1358–1363, 1998
15. Sis B, Mengel M, Haas M, Colvin RB, Halloran PF, Racusen LC, Solez K, Baldwin WM, 3rd, Bracamonte ER, Broecker V, Cosio F, Demetris AJ, Drachenberg C, Einecke G, Gloor J, Glotz D, Kraus E, Legendre C, Liapis H, Mannon RB, Nankivell BJ, Nickleit V, Papadimitriou JC, Randhawa P, Regele H, Renaudin K, Rodriguez ER, Seron D, Seshan S, Suthanthiran M, Wasowska BA, Zachary A, Zeevi A. Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am J Transplant* 10:464–471, 2010
 16. Nakamichi K, Kurane I, Saijo M. Evaluation of a quantitative real-time PCR assay for the detection of JC polyomavirus DNA in cerebrospinal fluid without nucleic acid extraction. *Jpn J Infect Dis* 64:211–216, 2011
 17. Penn I, First MR. Merkel's cell carcinoma in organ recipients: report of 41 cases. *Transplantation* 68:1717–1721, 1999
 18. Miller RW, Rabkin CS. Merkel cell carcinoma and melanoma: etiological similarities and differences. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8:153–158, 1999
 19. 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

平成23年度厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
**臓器移植患者におけるヘルペスウイルス感染症の
診断・治療・予防マニュアル**

2012年3月発行

編 集 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・治療に関する研究班
研究代表者 国立感染症研究所ウイルス第一部 西條 政幸
印 刷 瑞穂印刷株式会社
