

Antifungal Susceptibilities of *Aspergillus fumigatus* Clinical Isolates Obtained in Nagasaki, Japan

Masato Tashiro,^a Koichi Izumikawa,^a Asuka Minematsu,^a Katsuji Hirano,^a Naoki Iwanaga,^a Shotaro Ide,^a Tomo Mihara,^a Naoki Hosogaya,^{a,b} Takahiro Takazono,^a Yoshitomo Morinaga,^c Shigeki Nakamura,^a Shintaro Kurihara,^d Yoshifumi Imamura,^a Taiga Miyazaki,^a Tomoya Nishino,^a Misuzu Tsukamoto,^d Hiroshi Kakeya,^a Yoshihiro Yamamoto,^a Katsunori Yanagihara,^c Akira Yasuoka,^d Takayoshi Tashiro,^e and Shigeru Kohno^a

Department of Molecular Microbiology and Immunology^a and Department of Health Sciences,^e Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, and Department of Laboratory Medicine^c and Nagasaki University Infection Control and Education Center,^d Nagasaki University Hospital, Nagasaki, Japan, and Department of Internal Medicine II, University of Yamanashi, Chuo, Japan^b

We investigated the triazole, amphotericin B, and micafungin susceptibilities of 196 *A. fumigatus* clinical isolates in Nagasaki, Japan. The percentages of non-wild-type (non-WT) isolates for which MICs of itraconazole, posaconazole, and voriconazole were above the ECV were 7.1%, 2.6%, and 4.1%, respectively. A G54 mutation in *cyp51A* was detected in 64.2% (9/14 isolates) and 100% (5/5 isolates) of non-WT isolates for itraconazole and posaconazole, respectively. Amphotericin B MICs of ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ and micafungin minimum effective concentrations (MECs) of ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ were recorded for two and one isolates, respectively.

The clinical importance of *Aspergillus* infection has increased as the number of immunocompromised patients has risen (16). Antifungals recommended for treatment of patients with invasive pulmonary aspergillosis (IPA) or chronic pulmonary aspergillosis (CPA) are triazoles, amphotericin B, and echinocandins (13, 15, 37). Patients with CPA often need years of treatment (13, 37). Although oral therapy is important for carrying out long courses of treatment, azoles (with the exception of fluconazole) are the only class of oral drugs licensed for the treatment of aspergillosis (14, 37).

Aspergillus fumigatus is the most common and pathogenic species of *Aspergillus* (34, 37). Antifungal resistance of *A. fumigatus*, especially to azoles, is one of the concerns in treatment of aspergillosis. During the last decade, many cases of treatment failure due to azole-resistant *Aspergillus* infection have been reported, and in the past few years a growing body of papers about antifungal susceptibilities of *A. fumigatus* has been accumulating (1, 3–6, 9, 10, 12, 18, 23–27, 31–33, 35, 36). Even though an increased rate of azole resistance has been reported recently in the Netherlands and the United Kingdom, the prevalence of azole resistance reportedly remains low in other countries (1, 3, 6, 9, 12, 23, 25, 33).

The azole target protein lanosterol 14 α -demethylase of *Aspergillus* is encoded by the *cyp51A* gene, and mutations of *cyp51A* are a major mechanism of azole resistance (8, 17, 19, 20, 22, 32). Some mutational hotspots, such as G54, M220, and TR/L98H, have been identified as causes of azole resistance (2, 21, 22). Of these mutations, TR/L98H is especially prevalent in the Netherlands. An environmental origin (resulting from agricultural antifungal drug usage) is suspected, in spite of the fact that the mechanism(s) of mutation induction has not been shown definitively (24, 31, 32).

We studied the antifungal susceptibility of 196 *A. fumigatus* clinical isolates obtained in the Pneumology Department of Nagasaki University Hospital, Nagasaki, Japan. The isolates were collected between February 1994 and April 2010. All of the isolates were subjected to susceptibility testing and *cyp51A* sequence analysis. All isolates were identified as *A. fumigatus* by macroscopic colony morphology, micromorphological characteristics, and the ability to grow at 48°C. Non-wild-type (non-WT) isolates were

subjected to additional molecular identification by amplification of ribosomal internal transcribed spacers (ITSs) and ribosomal large-subunit D1-D2 sequencing as described previously (11). MICs of itraconazole, posaconazole, voriconazole, and amphotericin B and minimum effective concentrations (MECs) of micafungin were determined using the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M38-A2 broth microdilution method. Assays were performed using RPMI 1640 broth (0.2% dextrose), final inoculum concentrations ranging from 0.4×10^4 to 5×10^4 CFU/ml, and 48 h of incubation at 35°C (7). The MIC was defined as the lowest drug concentration that produced complete growth inhibition; the MEC was read as the lowest concentration of drug that led to the growth of small, rounded, compact hyphal forms compared to the hyphal growth seen in the control well. Susceptibility tests of non-WT isolates were performed at least three times for each isolate; each test was performed on different days. Because clinical breakpoints have not been established yet, we used epidemiological cutoff values (ECVs) to evaluate azole susceptibility (9, 25, 29). Wild-type (WT) isolates of *A. fumigatus* (MIC \leq ECV) were distinguished from non-WT isolates (MIC $>$ ECV), which may exhibit acquired low-susceptibility mechanisms. ECVs used in this study were as follows: itraconazole, 1 $\mu\text{g/ml}$; posaconazole, 0.5 $\mu\text{g/ml}$; voriconazole, 1 $\mu\text{g/ml}$, all as previously suggested (9, 25).

For sequence analyses, genomic DNA was extracted from non-WT isolates using a MasterPure yeast DNA purification kit (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI). The full coding region of the *cyp51A* gene was amplified as previously described (32). DNA sequences were determined using a BigDye Terminator ver-

Received 27 July 2011 Returned for modification 7 October 2011

Accepted 18 October 2011

Published ahead of print 24 October 2011

Address correspondence to Koichi Izumikawa, koizumik@nagasaki-u.ac.jp.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.05394-11

TABLE 1 MIC and MEC distributions of five antifungals

Antifungal agent	No. of isolates ^a											% of non-WT isolates
	Total	With a MIC or MEC ^b ($\mu\text{g/ml}$) of:										
		≤ 0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0	≥ 16	
Triazoles												
Itraconazole	182 (14)			1	28	107	46	(8)	(4)	(1)	(1)	7.1
Posaconazole	182 (14)	14	108	35	24 (2)	(8)	(1)	1 (2)			(1)	2.6
Voriconazole	182 (14)			1 (3)	20 (7)	101 (2)	53 (1)	7 (1)				4.1
Polyene												
Amphotericin B	182 (14)		6	8 (1)	19 (1)	90 (7)	57 (5)	2				
Echinocandin												
Micafungin	182 (14)	177 (14)	2	1							2	

^a MIC distributions for each agent were obtained by subtracting from the total isolates tested the 14 non-WT isolates resistant to itraconazole. The MIC distribution for the 14 non-WT isolates is in parentheses.

^b MICs are shown for amphotericin B, itraconazole, posaconazole, and voriconazole; MECs are shown for micafungin.

sion 1.1 cycle sequencing kit (ABI) and an ABI 3100xl DNA analyzer. Sequence alignments were performed against the sequence from an azole-susceptible strain (GenBank accession no. AF338659) using MacVector10.0 software (MacVector, Inc., Cary, NC) (20). Mutations were confirmed three times by repeating the PCR and sequencing the relevant region using the closest primer.

In this study, using the ECVs, the percentages of non-WT isolates for which MICs of itraconazole, posaconazole, and voriconazole were above the ECV were 7.1%, 2.6%, and 4.1%, respectively (Table 1). To exclude the possibility of increased proportions of non-WT isolates due to clonal spread (notably, the potential repeated isolation of a drug-resistant strain originating from one patient), we confirmed those proportions on a per-case basis, which (for non-WT isolates) were 7.5%, 4.3%, and 6.5% for itraconazole, posaconazole, and voriconazole, respectively. These proportions of non-WT isolates were not much different from previous data from other regions, with the exception of data for the Netherlands and the United Kingdom (3, 9, 12, 23, 25, 33). All the itraconazole-resistant isolates ($\text{MIC} \geq 4 \mu\text{g/ml}$) were obtained from 1998 to 2001. No consistent trend of increased proportion of non-WT isolates was observed. Amphotericin B MICs of $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ were recorded for 1.0% of the isolates (2/196); micafungin MECs of $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ were recorded for 1.0% of the isolates (2/196) (Table 1). For these antifungals, the proportions of resistant isolates were low and similar to those in previous reports (3, 10, 23, 26).

In Japan, posaconazole has not been approved for clinical use; nonetheless, non-WT isolates for posaconazole already existed (Table 1). Resistance in these isolates might reflect native biological variability. Alternatively, this phenomenon could be associated with cross-resistance between itraconazole and posaconazole, because 80% (4/5) of non-WT isolates for posaconazole were also non-WT isolates for itraconazole (Table 2). In addition, non-WT isolates for itraconazole tended to be more resistant to posaconazole, though not to voriconazole (Table 1). Cross-resistance between itraconazole and posaconazole, but not with voriconazole, may result from the G54 mutation of *cyp51A*, which was present in 64.2% (9/14) of the non-WT isolates for itraconazole and also present in 100% (5/5) of the non-WT isolates for posaconazole (Table 2). There is a known structural basis for the association of the G54 mutation with this pattern of cross-

resistance among the azoles: unlike voriconazole, itraconazole and posaconazole have long side chains that clash with the amino acid side chain of the residue replacing G54 in the mutated CYP51A protein (8, 27, 32, 38).

Among mutations of the *cyp51A* gene, TR/L98H has received the most attention, notably because this mutation was seen in a specific country and found in *A. fumigatus* isolated from the environment (17, 22, 24, 31–33). Similarly, TR/L98H was recently detected in a multi-azole resistant isolate in China (17), suggesting that the TR/L98H mutation could be selected in Asia as well as in Europe. Of all 22 non-WT isolates in our study of Japanese isolates, CYP51A mutations were detected as follows: G54W, two isolates; G54R, one isolate; I266N, two isolates; G54E plus I266N,

TABLE 2 MICs and Cyp51A substitutions in 22 non-WT *Aspergillus fumigatus* isolates

Isolate	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			Cyp51A substitution
	Itraconazole	Posaconazole	Voriconazole	
MF-452	>8	0.5	0.5	I266N
MF-469	8	1	0.25	G54E, I266N
MF-460	4	2	0.25	G54E, I266N
MF-357	4	0.5	0.5	I266N
MF-468	4	0.5	0.25	G54E, I266N
MF-329	4	0.5	0.25	None
MF-331	2	>16	0.25	G54W
MF-327	2	2	0.12	G54R
MF-439	2	0.5	0.25	G54E, I266N
MF-473	2	0.5	0.25	G54E, I266N
MF-454	2	0.5	0.12	G54E, I266N
MF-472	2	0.5	0.12	G54E, I266N
MF-843	2	0.25	2	None
MF-748	2	0.25	1	ND ^a
MF-1011	1	2	0.12	G54W
MF-855	1	0.25	2	None
MF-336	1	0.25	2	None
MF-486	1	0.25	2	None
MF-520	1	0.25	2	None
MF-1091	0.5	0.25	2	None
MF-474	0.5	0.25	2	None
MF-303	0.5	0.12	2	None

^a ND, not determined.

seven isolates (Table 2). No TR/L98H-bearing isolates were detected. The I266N mutation, which has (to our knowledge) not been reported previously, was also seen in other azole-susceptible isolates; therefore, it might not be directly related to azole resistance. Of 21 non-WT isolates, 9 had no CYP51A substitution (Table 2). Interestingly, most non-WT isolates for voriconazole did not possess a *cyp51A* mutation. Although Bueid et al. reported an increase of frequency of azole-resistant isolates without *cyp51A* mutations, other possible resistant mechanisms (e.g., upregulation of efflux pump) have not yet been fully identified (6, 28, 30), and further analysis is warranted.

Only a few previous analyses have examined changes in susceptibility over time; therefore, it is not clear that the frequency of azole-resistant *A. fumigatus* is increasing worldwide (12, 25, 33). Nevertheless, mechanisms of resistance induction in clinical settings or the environment (e.g., selection following agricultural antifungal exposure) remain poorly understood. Given that azole usage varies from one country to another, the mechanism of azole resistance may differ between regions.

In this study, we found a low prevalence of resistance to triazoles in Japanese isolates of *A. fumigatus*, a clinically important fungus of increasing concern in respiratory medicine. The proportions of non-WT isolates were similar to those previously reported for other countries. In the future, Japanese *A. fumigatus* isolates may develop azole resistance by different mechanisms (such as TR/L98H); therefore, we urge the continued monitoring of azole susceptibility in this species.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Kayo Yamakoshi for technical assistance.

REFERENCES

- Alanio A, et al. 2011. Low prevalence of resistance to azoles in *Aspergillus fumigatus* in a French cohort of patients treated for haematological malignancies. *J. Antimicrob. Chemother.* 66:371–374.
- Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Sanglard D. 2011. Probing the role of point mutations in the *cyp51A* gene from *Aspergillus fumigatus* in the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Med. Mycol.* 49:276–284.
- Arabatzi M, et al. 2011. Polyphasic identification and susceptibility to seven antifungals of 102 *Aspergillus* isolates recovered from immunocompromised hosts in Greece. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:3025–3030.
- Arendrup MC, et al. 2010. Development of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy associated with change in virulence. *PLoS One* 5:e10080.
- Bellele B, et al. 2010. Acquired resistance to voriconazole and itraconazole in a patient with pulmonary aspergilloma. *Med. Mycol.* 48:197–200.
- Bueid A, et al. 2010. Azole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*: 2008 and 2009. *J. Antimicrob. Chemother.* 65:2116–2118.
- Clinical Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi, 2nd ed. Approved standard M38–A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Diaz-Guerra TM, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. 2003. A point mutation in the 14 α -sterol demethylase gene *cyp51A* contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:1120–1124.
- Espinel-Ingroff A, et al. 2010. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for the triazoles and six *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38–A2 document). *J. Clin. Microbiol.* 48:3251–3257.
- Espinel-Ingroff A, et al. 2011. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for caspofungin and *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38–A2 document). *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:2855–2859.
- Hinrikson HP, Hurst SF, Lott TJ, Warnock DW, Morrison CJ. 2005. Assessment of ribosomal large-subunit D1–D2, internal transcribed spacer 1, and internal transcribed spacer 2 regions as targets for molecular identification of medically important *Aspergillus* species. *J. Clin. Microbiol.* 43:2092–2103.
- Howard SJ, et al. 2009. Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerg. Infect. Dis.* 15:1068–1076.
- Izumikawa K, Takazono T, Kohno S. 2010. Chronic *Aspergillus* infections of the respiratory tract: diagnosis, management and antifungal resistance. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 23:584–589.
- Kohno S, Izumikawa K. 2010. Posaconazole for chronic pulmonary aspergillosis: The next strategy against the threat of azole resistant *Aspergillus* infection. *Clin. Infect. Dis.* 51:1392–1394.
- Kohno S, et al. 2010. Intravenous micafungin versus voriconazole for chronic pulmonary aspergillosis: a multicenter trial in Japan. *J. Infect.* 61:410–418.
- Kume H, et al. 2011. Epidemiology of visceral mycoses in autopsy cases in Japan: comparison of the data from 1989, 1993, 1997, 2001, 2005 and 2007 in annual of pathological autopsy cases in Japan. *Med. Mycol. J.* 52:117–127.
- Lockhart SR, et al. 2011. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from the ARTEMIS global surveillance is primarily due to the TR/L98H mutation in the *cyp51A* gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:4465–4468.
- Lockhart SR, et al. 2011. In vitro echinocandin susceptibility of *Aspergillus* isolates from patients enrolled in the Transplant-Associated Infection Surveillance Network. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:3944–3946.
- Mann PA, et al. 2003. Mutations in *Aspergillus fumigatus* resulting in reduced susceptibility to posaconazole appear to be restricted to a single amino acid in the cytochrome P450 14 α -demethylase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:577–581.
- Mellado E, Diaz-Guerra TM, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. 2001. Identification of two different 14- α sterol demethylase-related genes (*cyp51A* and *cyp51B*) in *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. *J. Clin. Microbiol.* 39:2431–2438.
- Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. 2004. Substitutions at methionine 220 in the 14 α -sterol demethylase (CYP51A) of *Aspergillus fumigatus* are responsible for resistance in vitro to azole antifungal drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:2747–2750.
- Mellado E, et al. 2007. A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of *cyp51A* alterations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:1897–1904.
- Mortensen KL, et al. 2011. A prospective survey of *Aspergillus* spp. in respiratory tract samples: prevalence, clinical impact and antifungal susceptibility. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 40:1355–1363.
- Mortensen KL, et al. 2010. Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergilli* in Austria, Denmark, and Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:4545–4549.
- Pfaller M, et al. 2011. Use of epidemiological cutoff values to examine 9-year trends in susceptibility of *Aspergillus* species to the triazoles. *J. Clin. Microbiol.* 49:586–590.
- Pfaller MA, et al. 2010. Wild-type minimum effective concentration distributions and epidemiologic cutoff values for caspofungin and *Aspergillus* spp. as determined by Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 67:56–60.
- Pfaller MA, et al. 2008. In vitro survey of triazole cross-resistance among more than 700 clinical isolates of *Aspergillus* species. *J. Clin. Microbiol.* 46:2568–2572.
- Rajendran R, et al. 2011. Azole resistance of *Aspergillus fumigatus* biofilms is partly associated with efflux pump activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:2092–2097.
- Rodriguez-Tudela JL, et al. 2008. Epidemiological cutoffs and cross-resistance to azole drugs in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:2468–2472.
- Slaven JW, et al. 2002. Increased expression of a novel *Aspergillus fumigatus* ABC transporter gene, *atrF*, in the presence of itraconazole in an itraconazole resistant clinical isolate. *Fungal Genet. Biol.* 36:199–206.
- Snelders E, et al. 2009. Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:4053–4057.
- Snelders E, Karawajczyk A, Schaftenaar G, Verweij PE, Melchers WJG. 2010. Azole resistance profile of amino acid changes in *Aspergillus fumigatus*.

- tus* CYP51A based on protein homology modeling. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:2425–2430.
33. Snelders E, et al. 2008. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS Med.* 5:e219.
 34. Tashiro T, et al. 2011. Diagnostic significance of *Aspergillus* species isolated from respiratory samples in an adult pneumology ward. *Med. Mycol.* 49:581–587.
 35. Thors VS, Bierings MB, Melchers WJ, Verweij PE, Wolfs TF. 2011. Pulmonary aspergillosis caused by a pan-azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in a 10-year-old boy. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 30:268–270.
 36. Verweij PE, Howard SJ, Melchers WJG, Denning DW. 2009. Azole-resistance in *Aspergillus*: proposed nomenclature and breakpoints. *Drug Resistance Updates* 12:141–147.
 37. Walsh TJ, et al. 2008. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 46:327–360.
 38. Xiao L, et al. 2004. Three-dimensional models of wild-type and mutated Forms of Cytochrome P450 14 α -sterol demethylases from *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* provide insights into posaconazole binding. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:568–574.

II. 抗ウイルス薬の特性と適応・使い分け

抗サイトメガロウイルス薬

安岡 彰

Anti-cytomegaloviral drugs

Akira Yasuoka

Infection Control and Education Center, Nagasaki University Hospital

Abstract

Cytomegalovirus infection is often life threatening in immunocompromised patients. Three anti-CMV drugs, ganciclovir, valganciclovir and foscarnet are available in commercial basis in Japan. In addition to them, cidofovir is provided for patients with HIV by a research group supported by Ministry of Health, Labour and Welfare. Every anti-CMV drug has serious side effects, as bone marrow suppression with ganciclovir and valganciclovir, renal toxicity with foscarnet and both with cidofovir. Strict dose adjustment to the renal function and close monitoring with laboratory examinations are essential when using those drugs.

Key words: herpesvirus, ganciclovir, valganciclovir, foscarnet, cidofovir

はじめに

主に細胞性免疫不全者に発症する重症感染症であるサイトメガロウイルス(cytomegalovirus: CMV)にも、適応疾患に限定はあるものの有効な抗ウイルス薬がある。

1. CMVとその感染症

CMVはエンベロープをもつDNAウイルスであるβヘルペスウイルスに分類され、ヒトのみを宿主とし、ヒトに感染するウイルスとしては最大の大きさ(直径約180nm)である。このほかヘルペス属β群にはHHV-6, 7ウイルスがある。唾液などの体液や母乳によっても感染するためヒトに普遍的に感染しているウイルスで、国や地域によって感染率は異なるものの、成人

の60-95%が既感染となっている。他のヘルペス属ウイルスと同様、いったん感染すると体内で潜伏感染状態となる。

CMVの病型としては初感染時の伝染性単核症、潜伏感染後に宿主が細胞性免疫不全となった場合に潜伏感染が再活性化されて生ずる全身臓器感染症、妊娠中に初感染を受けることによって胎児が感染する先天感染の3つの病型がある。

CMVの診断は感染細胞の細胞質内に巨大封入体を形成することから、病変部の組織・細胞診で封入体細胞を検出することが確定診断となる。ウイルスの活性化の指標として、血液のサイトメガロウイルス抗原血症(アンチゲネミア)や血漿を用いたPCRによるウイルス定量も診断の補助として用いられる。また血清のCMV

表1 サイトメガロウイルス治療薬

薬剤	商品名	投与経路	剤形	治療量投与量 (維持量)	主たる副作用
ガンシクロビル	デノシン	点滴静注	500 mg/V	5 mg/kg×2回 (5 mg/kg×1回)	骨髄抑制
バルガンシクロビル	バリキサ	経口	450 mg 錠	900 mg×2回 (900 mg×1回)	骨髄抑制
ホスカルネット	ホスカビル	点滴静注	6 g/V (24 mg/mL)	90 mg/kg×2回 (90-120 mg/kg×1回)	腎機能障害 電解質異常
シドフォビル	Vistide	点滴静注	375 mg/V	5 mg/kg/週1回を2回 以後2週に1回	腎機能障害 骨髄抑制

に対するIgMとIgG抗体の測定も感染状態の判定に用いられる。

2. 抗ウイルス薬(表1)

1) ガンシクロビル

ガンシクロビルはCMVの遺伝子複製時にデオキシグアノシン三リン酸(dGTP)と競合して取り込まれることにより、遺伝子の伸延を阻害する核酸アナログである。剤形としてガンシクロビル注射剤と、このプロドラッグであるバルガンシクロビルの経口剤がある。ガンシクロビルがウイルスの蛋白質キナーゼでガンシクロビルーリン酸となり、更に細胞の酵素でガンシクロビル三リン酸となって抗ウイルス活性を発揮する。バルガンシクロビルはバリンエステルを結合したプロドラッグで、腸管からの吸収過程でガンシクロビルとなる。

本剤は大部分が未変化体のまま主に尿路から排出されるため、腎障害がある患者では用量の調節が必要である。

重要な副作用として骨髄抑制があり、このため好中球数 $500/\text{mm}^3$ 未満または血小板数 $25,000/\text{mm}^3$ 未満の場合は使用禁忌となっている。骨髄抑制は投与開始1週間くらいから顕性化する。このため本剤投与開始後は頻回の臨床検査が必須であり、週2-3回の頻度でチェックし、早期発見に努める必要がある。骨髄抑制が認められた場合は減量または治療の中断が必要である。また腎障害や肝障害にも注意が必要である。動物実験により催奇形性が示されており、妊婦への投与は禁忌となっている。

前述のように本剤は活性体となるのにウイルス酵素を必要とするため、ウイルス遺伝子の変異により耐性を生じることがある。特に本剤による長期治療を受けた履歴がある場合に耐性化のリスクがある。この場合ガンシクロビルの効果は期待できないので、他剤による治療が必要となる。ホスカルネット、シドフォビルとの交差耐性は認められない(ウイルスが両剤に対するそれぞれの耐性変異を獲得することはありうる)。

a. ガンシクロビル(注射剤)

ガンシクロビルは点滴静注で使用される。経口剤形もあったが、腸管からの吸収率が極めて低いため治療効果は期待できず、維持・発症予防としてのみ使用されていた。後述のバルガンシクロビルの登場によって経口剤はその役割を終えた。

体重によって投与量の調整が必要で、 $5\text{mg}/\text{kg}$ を1日2回投与するのが標準投与量である。腎機能によって用量調節が必要で、クレアチニンクリアランスが $70\text{mL}/\text{min}$ 未満では減量する。2週間程度の投与によって効果を確認し、治療効果や副作用発現の度合いをみて、治療の延長または維持量への減量、中止を検討する。維持量は $5\text{mg}/\text{kg}$ を1日1回投与するものであり、治療が有効で病状が安定しているが、基礎疾患の状態から再燃が懸念される場合にこの量を維持する。維持量であっても治療長期化に伴って骨髄抑制のリスクがあるため、定期検査は必須である。

b. バルガンシクロビル

バルガンシクロビルは 450mg の錠剤であり、

1回 900 mg を 1日 2回投与するのが治療量としての標準量である。この投与量で血中のガンシクロビル濃度のピーク (Cmax) は 5-6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に達すると報告されており、ガンシクロビルを点滴静注した場合と遜色ない移行を示している。ただ CMV 感染症は多くの場合致死的风险のある感染症であるため、治療開始はガンシクロビルの経静脈投与で開始して、治療効果がみられた段階で経口のバルガンシクロビルに切り替えるという使用法が主流である。CMV 網膜炎の初期や軽症の食道病変などでは、最初からバルガンシクロビルによる治療を行うことも可能である。

治療維持量は 900 mg 1日 1回投与で、効果が安定した場合にはこの量への減量も可能である。

ガンシクロビルよりはマイルドではあるものの本剤でも骨髄抑制は必至であり、定期的な血液検査が不可欠である。

2) ホスカルネット

ホスカルネットはウイルス DNA ポリメラーゼの阻害薬で、そのままで活性体である。ガンシクロビルと異なりウイルス酵素による代謝を必要としないため、薬剤耐性を生じにくいとされている。

本剤は HIV 感染者の CMV 感染症では 90 mg/kg を 1日 2回投与する方法と 60 mg/kg を 1日 3回投与する方法があるが、抗 CMV 効果に目立った違いがみられないため、投与の簡便さから 90 mg/kg 1日 2回投与が主に行われている。造血幹細胞移植患者の CMV 感染症では 60 mg/kg を 1日 2回が用量となっている。治療効果が現れた場合は、ガンシクロビルと同様投与回数を 1回に減らす (投与量は 90-120 mg/kg) ことで維持量とする。

本剤は腎機能障害、血中の Mg, Ca, K 濃度低下といった電解質異常をきたしやすい。このためガンシクロビルと同様定期的な血液検査が必須であり、また投与に際しては 1回あたり生理食塩液 500-1,000 mL の輸液を追加することが推奨される。また腎機能に応じたきめ細かい用量調節が必須であり、特に腎機能低下が出現した場合は速やかな減量・中止を行うことが重

要である。

3) シドフォビル

日本では認可されていないが、第 3 の CMV 治療薬としてシドフォビルがある。ガンシクロビルとホスカルネットの両剤が無効な CMV に対しても効果がある。効果と副作用の持続が長いいため、治療開始時は週に 1 回の投与、3 回目以降は 2 週に 1 回の投与で臨床効果がある。本剤は骨髄抑制と腎機能障害の両方の副作用が発現しやすく、腎機能障害を低減するためにプロベネシドの併用と投与時の輸液負荷が必須である。いったん副作用が発現すると遷延し、また 1 回の投与でも腎障害が発生することがあり、コントロールに難渋する薬剤である。腎障害は不可逆的であるとされている。HIV 感染者の CMV 感染症に対してのみ、厚生労働省エイズ治療薬研究班から入手することができる。使用が認可されている米国でも適応はエイズ患者の CMV 網膜炎に限定されている。

3. 抗ウイルス薬の使い分けと注意点

CMV 感染症で治療を考慮する場合は、基礎疾患の状態、患者の腎機能、骨髄機能をはじめとした生体・代謝機能と、合併する感染症への治療内容などを考慮して治療薬を選択する。腎障害がある場合やニューモシスチス肺炎治療のペンタミジンを使用しているときなどはガンシクロビルを、骨髄抑制がみられる場合はホスカルネットを選択する。いずれの問題もない場合は治療効果と副作用の調節のしやすさからガンシクロビルが第 1 選択となる。

いずれの薬剤も体重と腎機能による補正を厳密に行って投与量を決定し、原則として治療量で開始する。いずれの薬剤の副作用も 1 週間投与した頃から顕性化するので、特にこの頃の臨床検査値には十分注意を払う必要がある。薬剤を中止した後も副作用はしばらく持続/進行するという印象があるため、機能障害が出現したら早め早めの減量・中止の判断が必要である。副作用出現時に臨床効果が不十分であった場合は、可能であれば他剤 (ガンシクロビル治療中であればホスカルネット) に変更して治療を継

続する。

CMVの病変にもよるが、原則として2週間程度治療量を投与した後、臨床効果を判定し治療量を維持するか、維持量に減量するかを検討する。ガンシクロビル治療例であれば重症でないCMV網膜炎などでは治療効果が明らかになった段階でバルガンシクロビルに切り替えて、外来で治療することも可能である。

CMV治療薬の効果は生体の免疫機能によって大きく影響を受ける。免疫不全程度が高ければ治療薬単独での効果は限定的である。基礎疾

患の改善を図ったり、CMV抗体高力価のガンマグロブリン製剤や、場合によっては両ウイルス薬の併用などが必要な場合もある。

おわりに

CMVは免疫不全状態に発症する重篤な感染症であるが、治療薬は他のウイルス薬と比べて重篤な副作用が起こりやすく、一方抗ウイルス効果は十分とはいえない。十分なモニタリングと適時適切な臨床判断が必要な治療薬であることを、十分理解したうえでの使用が求められる。

■ 文 献

- 1) Crumpacker CS, Zhang JL: Cytomegalovirus. In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 7th ed (ed by Gerald L, et al), p1971-1987, Elsevier, 2010.
- 2) Kaplan JE, et al: Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents. MMWR Recomm Rep 58(RR-4): 1-207, 2009.

A Answer

長崎大学病院
感染制御教育センター
教授

安岡 彰

AKIRA YASUOKA

背景

抗HIV療法(anti-retroviral therapy: ART)が標準的に行われるようになった今日、HIV感染による日和見感染症の85%以上はHIV感染症が判明していない新規の患者に発症している。しかし、本例のような通院の中断など適切なHIV感染症治療を受けずに発症する例もHIV感染者の増加に伴い少しずつ増加している。

治療方針

AIDSのクリプトコックス症は頭痛・嘔気といった初期症状が軽微で、本例のように意識障害で発見されることが少なくないが、病状の進行を意味し、予後不良である。

HIV感染症無治療の日和見感染症発症例では、まず適切な日和見感染症の治療を導入することが最優先である。進行したクリプトコックス症では脳内の占拠性病変や全身播種を起こすリスクがあるため、頭部MRIやCT、真菌対応の血液ボトルを用いた血液培養、尿培養などを速やかに行い病状を評価する。また、免疫不全状態にある患者ではニューモシスチス肺炎、トキソプラズマ症、サイトメガロウイルス感染症、結核・非結核抗酸菌症やB型肝炎、C型肝炎、アメーバ症などの合併感染がないかについても検索を進める必要がある。

治療薬

クリプトコックス髄膜炎/全身播種に対する治療は、アムホテリシンB(AMPH-B)とフルシトシン(5-FC)の併用が標準治療である。米国感染症学会(IDSA)のガイドラインでは、エビデンスの集積とコストの観点からAMPH-B 0.7~1.0mg/kg/日の経静脈投与を第一選択として推奨しているが、効果と副作用

の観点からはリポソーム化AMPH-B 3~4mg/kg/日の経静脈投与が勧められる。AMPH-Bでは腎機能障害、高カリウム(K)血症が高頻度にみられ、また投与後の発熱の頻度も高い。十分な輸液負荷や血液生化学検査を週に数回行うなど、注意深い対応が必要である。

5-FC 100mg/kg/日を併用するのが原則であるが、HIV感染者では造血(骨髄)機能が疲弊しており、容易に副作用の好中球減少症が出現する。経口のみ剤形であるため、本例のような意識障害例では経管投与をするなどの工夫を要する。また、血液細胞数検査を頻回に行い副作用の早期検出を図る。AMPH-B+5-FC治療の主役はAMPH-Bであり、5-FCの併用についてはあまり深追いしないほうがよいようである。

AMPH-B+5-FCによる治療を2週間以上継続し臨床的改善が得られれば、フルコナゾール(FLCZ)400mg/日による経口投与に移行する。なお、非AIDS例でのAMPH-B標準治療期間は従来6週間である。AIDS例で2週間以上とされているのは副作用の観点から主であるので、AMPH-Bが耐用できていればなるべく長く使用することを推奨する。FLCZ 400mg/日による治療期間は、8週間以上が推奨されている。臨床症状の改善と培養陰性が確認されれば、FLCZ 200mg/日による維持治療に移行する。末梢血CD4数が $100/\mu\text{L}$ 以上でかつHIV-RNA量が検出限界以下となってから3ヵ月以上経過した場合、治療の中止を考慮できる。

補助治療

クリプトコックス髄膜炎では、脳圧亢進が予後悪化因子である。本例の22cmCSFはさほど高い値ではないが、治療中に上昇することもあるため定期的に髄液圧と髄液中のクリプトコックスの塗抹・培養所見を観察し、圧の上昇(目安として25cmCSF)や頭痛などの脳圧亢進症状がみられる場合は排液による減圧を図る必要がある。この目的でのステロイドの投与は推奨されない。

ARTと免疫再構築症候群

AIDSの日和見感染症は免疫不全を背景として発症

しており、その根本治療を早期に行うことは病状の改善と他の感染症併発の防止のために必要である。しかしながら、ARTを開始することにより日和見感染症の治療薬に加えて3剤以上の抗HIV薬を投与することになり、治療の複雑化と薬剤相互作用、副作用の発生リスクが高まることにも注意が必要である。さらには、急速な免疫の回復が病原体(抗原)に対する強い免疫応答を引き起こすことになり、日和見感染症の病態の悪化を招く可能性がある。このようなARTによる日和見感染症の悪化や出現を免疫再構築症候群(immune reconstitution inflammatory syndrome: IRIS)と呼んでいる。

ARTをどのタイミングで行うかは未解決の問題であるが、クリプトコックス髄膜炎ではIRISによって意識障害や脳機能の後障害を残す可能性があり、一般にいわれる早期のARTがよいかどうかは疑問が多い。筆者は、少なくとも初期のAMPH-Bを用いた治療中はクリプトコックス髄膜炎の治療に専念し、FLCZ治療にスイッチした段階で患者の状態をみながら治療開始することを提唱する。実際、クリプトコックス髄膜炎によるIRISについて検討したBicanicらの検討¹⁾では、ARTを開始した時期はクリプトコックス髄膜炎治療開始から44~47日後と報告している。また、この研究結果をもとにDHHSガイドライン²⁾でも、ART開始を少し遅らせたほうがよい日和見感染症の1つとしてクリプトコックス髄膜炎を挙げている。ただし、クリプトコックス治療薬の副作用などの難治例を除いて、ARTを数ヶ月以上も延期することは他の合併症のリスクもあり推奨できない。IRISを起こさないこと

を目標にするのではなく、重篤なIRISを防ぎながらなるべく早期にARTを導入することが重要であり、IRISの発症を予測し適切なコントロールをすることを目指すべきであろう。

IRIS発症時の対処

クリプトコックス髄膜炎でのIRISでは発熱や頭痛に加えて、容易に意識障害や脳機能障害を惹起する。したがって、微熱のみといった軽微な場合を除き、早期に対処すべきである。第一選択は副腎皮質ステロイドホルモンの投与であり、プレドニゾロン換算で0.5~1.0mg/kgからそれ以上のデキサメタゾンを経静脈的に投与する。症状の改善をみながら、2~6週間かけて漸減終了を目指す。また、クリプトコックス髄膜炎の治療は可能であればAMPH-Bに戻すか、FLCZは400mg/日かそれ以上の量とすることを考慮する。

ステロイドでも改善傾向がみられなければ、ARTの一時中止を考慮すべきである。

文 献

- 1) Bicanic T, Meintjes G, Rebe K, et al: Immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV-associated cryptococcal meningitis; a prospective study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 51: 130-134, 2009
- 2) Department of Health and Human Services: Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. 1-239, March 27, 2012 (<http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>)

種が最も基本となる予防法です。なお、ワクチンの効果とは、「未接種で罹患した人のうち、接種していれば罹患しないで済んだのは何%か?」という数字です。

■ ワクチンの集団免疫効果

ワクチンには、本人への発症予防効果（直接的効果）以外に、ある程度の接種率であれば他人に感染させない集団免疫効果（間接的効果）があり、この間接的効果はインフルエンザでも報告されています⁴⁾。インフルエンザを患者にうつす可能性を下げるためにも、医療従事者は毎年インフルエ

ンザワクチンを接種するべきです。

文 献

- 1) Song, JY, et al. Long-term immunogenicity of influenza vaccine among the elderly : Risk factors for poor immune response and persistence. *Vaccine*. 28 (23) . 2010. 3929-35.
- 2) Fiore, AE, et al. Prevention and control of influenza with vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) . 2010. *MMWR*. 59 (RR-8) . 2010. 1-62.
- 3) 日本臨床内科医会インフルエンザ研究班. “インフルエンザワクチンの有効性と安全性”. インフルエンザ診療マニュアル (第5版). 東京, 日本臨床内科医会, 2010. 12-7.
- 4) Charu, V, et al. Influenza-related mortality trends in Japanese and American seniors : evidence for the indirect mortality benefits of vaccinating schoolchildren. *PLoS One*. 6. 2011. e26282.

Question

B 型肝炎ワクチン

3

B 型肝炎ワクチンの接種を受けましたが、抗体ができません。どうしたらよいですか？

安岡 彰 長崎大学病院 感染制御教育センター センター長・教授

Answer

■ B 型肝炎とワクチン接種

B 型肝炎は血液を介して感染する感染症としては、日本で日常的に遭遇し、感染した場合の影響が深刻な感染症です。

病原微生物は小型 DNA ウィルスで、HBs 抗原陽性者の血液に最大 10^{10} /mL と高濃度に存在し、この血液が付着した針刺しの場合、30%近い高確率で感染が成立します。感染した場合、1～4カ

月の潜伏期の後、急性肝炎を発症し、1%弱では激症化し死亡するリスクもあります。免疫不全状態や幼少時に感染すると慢性感染となります。最近ではジェノタイプ A のウィルスが増加してきており¹⁾、このウィルスでは成人でも 10%程度で慢性化するといわれています。

このように日常的に存在し、感染リスクの高い血液媒介感染症であるため、医療に関わる従業者は B 型肝炎のワクチン接種が勧奨されています。ワクチンは 3 回の接種で 1 シリーズとなり、1 回目の 1 ヶ月後、6 ヶ月後に再接種を行い、3 回目の

接種後1ヵ月以上経ってから抗体検査を行い、HBs抗体が10 IU/mL以上となれば抗体を獲得したとみなされます²⁾。

■ 抗体を獲得できない場合

接種者の90～95%では抗体を獲得しますが一部で抗体ができない場合があります。この場合も1シリーズの接種を行うことで、再接種者の50%ほどで抗体を獲得するとされています。抗体獲得率の向上の方法として製造メーカーを変えてみる、1回接種量を倍量とすること、10分の1量を皮内接種し残りを皮下または筋肉注射すること³⁾などが報告されています²⁾。後二者の方法は日本で承認されているワクチンの用法・用量にない方法ですので、実施者の責任において行うことになります。なお、B型肝炎ワクチンは白色懸濁液で、白濁した部分が抗原となる成分ですので、接種にあたっては液を十分混合し、沈殿が生じる前に注射器内に接種量を充填し、注射器の薬液すべてを注射することが肝要です（接種液量ばかりに気を取られて充填に時間をかけると、バイアル内や注射器内に成分が残存し、上澄のみを接種することになってしまいます）。

2シリーズのワクチン接種でも抗体を獲得しなかった場合は、3シリーズ目を行ってもその効果は限定的ですので一般的には推奨されませんが、接種ができないわけではありません。

いったん抗体陽性となっても、時間が経つと抗体価が下がり、抗体価が測定感度以下となる場合があります。日本ではワクチンの再接種を行うこともありますが、米国⁴⁾やヨーロッパ⁵⁾では免疫

不全がない場合は、いったん抗体陽性となっていれば抗体価が下がった状態でウイルスに曝露された場合、顕性の肝炎を発症することはないため、再接種は推奨されていません。

HBs抗体陰性者がHB陽性血に曝露した場合はHBs抗体高力価のガンマグロブリン製剤の接種と平行して、HBワクチンの接種を開始することになりますが、2シリーズ以上のワクチン接種を行っても抗体を獲得していない場合は、曝露後のワクチンの効果が限られています。CDCガイドライン⁴⁾ではこのような場合、ガンマグロブリンの接種を曝露直後と1ヵ月後の2回行うことを推奨しています。ただし2回目の接種については日本では労働災害保険の給付対象とならないものと思われれます。

文 献

- 1) 内田茂治. 献血者におけるHBV陽性率の動向とB型肝炎感染初期例のHBV遺伝子型頻度. IASR. 27, 2006, 223-4. <http://idsc.nih.gov/jiasr/27/319/dj3193.html>
- 2) 日本環境感染学会. 院内感染対策としてのワクチンガイドライン. 環境感染誌. 24, 2009, 1-15. http://www.kankyokansen.org/modules/publication/index.php?content_id=4
- 3) Nagafuchi, S. et.al. Reversal of nonresponders and postexposure prophylaxis by intradermal hepatitis B vaccination in Japanese medical personnel. JAMA. 265 (20), 1991, 2679-83.
- 4) CDC. Updated U.S. public health service guidelines for the management of occupational exposures to HBV, HCV, and HIV and recommendations for postexposure prophylaxis. MMWR. 50 (RR-11), 2001, 1-42.
- 5) European Consensus Group on Hepatitis B Immunity. Are booster immunisations needed for lifelong hepatitis B immunity?. Lancet. 355 (9203), 2000, 561-5.

サイトメガロウイルス感染症

Cytomegalovirus infection

安岡 彰* *Yasuoka Akira*

定義・概念：サイトメガロウイルス (cytomegalovirus: CMV) による感染症である。CMV は感染者の唾液などの体液を介してヒト-ヒト感染を起こし、その後生体内への潜伏感染となる。初感染によるウイルスの全身播種に伴う急性感染症と、潜伏感染が生体の免疫不全によって活性化して生じる日和見感染症、妊娠母体が急性感染を起こすことによる新生児の先天感染の病型がある。

病態生理：CMV は β ヘルペスウイルスに属し、ヒトに感染するウイルスのなかで最大のサイズを有する。他のヘルペスウイルスと同様、いったん感染すると持続感染 (潜伏感染) となり、白血球や内皮細胞を始め種々の生体細胞内で増殖可能なウイルスが存在し続ける。わが国では成人までにほとんどが感染するとされていた。わが国の HIV 感染者では感染経路にかかわらず 95% 以上が既感染となっているが、妊娠可能年齢の女性の感染率は 70~50% 台まで低下してきていることが報告されている。

小児期では感染しても無症候から他の急性ウイルス感染症と区別できない形で経過するが、思春期以降では伝染性単核球症様の病態を生じる。妊娠中の女性が感染すると児に先天性サイトメガロウイルス感染症を発症するリスクがある。

既感染者が細胞性免疫不全状態となると、CMV の再活性化により、肺炎、脳・髄膜炎、網膜炎、副腎炎、消化管潰瘍などさまざまな病態を発症する。

臨床症状・経過・予後

1. 急性感染

急性感染は既感染者の唾液・尿・母乳などの体液の曝露によって発症すると考えられており、感染から 20~60 日程度の潜伏期の後、急性熱性症状を発症する。その程度は無症候から高熱を示すものまでさまざまであるが、とくに幼少児では無症候性に経過するケースが多いと考えられている。思春期に入ると伝染性単核症様の急性症状を呈する割合が高くなる。症状は EB ウイルスによ

る伝染性単核症と類似しており、発熱、皮下リンパ節の腫脹、軽度から中程度までの肝機能障害、異型リンパ球の出現などである。後述の免疫不全がなければ 2~6 週間の経過で自然軽快する。しかし前述のとおり、他のヘルペスウイルス同様に CMV は潜伏感染状態となり、生体から排除されることはない。

新生児が経産道や母乳によって出生早期に CMV 急性感染症を発症することがある。通常出産の児であれば無症状で経過することが多いが、早産児・低出生体重児の場合、急性感染症状や CMV 肺炎・肝炎を発症するリスクがある。このためリスクが高い児では CMV 陽性の母親からの母乳を避けるなどの注意が必要である。

2. 免疫不全に伴う臓器感染症

HIV 感染症や先天性免疫不全、抗腫瘍薬、免疫抑制薬の使用により細胞性免疫の低下が持続する病態になると、CMV の再活性化が起こり、種々の臓器病変を発症する。基礎となる免疫低下に応じて、発症しやすい CMV 病変がある。造血系の悪性疾患では CMV 肺炎や消化管病変 (食道から大腸まで)、HIV 感染症では CMV 網膜炎、消化管病変、髄膜炎が起こりやすいことが知られている。いずれも難治性で早期治療が行われないと恒久的な臓器障害を残したり、致死性転帰となる割合が高い。

3. 先天感染 (子宮内感染)

妊娠中の母体が CMV の急性感染を起こした場合、5% 程度の児で何らかの症候がみられる。出血斑、肝脾腫と黄疸、小脳症、脳の石灰化、発育遅滞、運動障害、脈絡網膜炎などが知られており、重症の場合は意識障害、けいれん、呼吸障害から数週以内に死にいたる。

出生児無症候であっても、運動神経障害、聴覚・視覚障害が後になって明らかになる場合もあるため、生後数年間は経過観察と早期の対処が重要である。

診断基準：CMV 感染症の診断は特徴的な臨床症状に加えて、CMV を検出することで行われる。PCR による CMV の検出、半定量的なサイトメガロウイルス抗原血症 (CMV-アンチゲネミア) の検出がいずれの病型でも確定診断に有用である。組織診や細胞診によって特徴的な巨細胞封入体の確認や、モノクローナル抗体による病変組織におけるウイルスの確認は最も確実な診断方法である。このほか急性感染と先天性感染では IgM 型の CMV 抗体の検出、IgG 型抗体の 4 倍以上の上昇なども診断の参考となる。

鑑別としては急性感染では EB ウイルスによる伝染性

表 CMV 治療薬と特徴

治療薬	ガンシクロビル	バルガンシクロビル	ホスカルネット
適応	後天性免疫不全症候群, 臓器移植, 悪性腫瘍における CMV 感染症		後天性免疫不全症候群患者の CMV 感染症 造血幹細胞移植患者における CMV 血症 および CMV 感染症
小児への投与	小児に対する安全性は確立されていない 長期投与による発癌性および生殖毒性の可能性 があることを慎重に考慮		小児に対する安全性は確立されていない 菌あるいは骨への沈着が成人より小児で 多いことが予想される
治療投与量(1日)	5 mg/kg×2 回	900 mg×2 回(成人)	90 mg/kg×2 回
維持投与量(1日)	5 mg/kg×1 回	900 mg×1 回(成人)	90 mg/kg×1 回
投与方法	点滴静注	経口	点滴静注(十分な補液)
とくに注意すべき 副作用	骨髄機能抑制 腎機能障害	同左	腎機能障害 電解質異常(Mg ↓, Ca ↓, K ↓など) 骨髄機能抑制
備考	初期は隔日に血液検査	定期的な血液検査	初期は隔日に腎機能検査 点滴ごとに 0.5~1 L の生理食塩水を補液

単核症, HIV やその他のウイルス感染の急性感染などがあげられる。免疫不全の場合はさまざまな日和見感染症の鑑別が必要になる。先天感染では, 他の TOR(C)H などの先天感染症を鑑別する。

治療方針・治療基準: CMV の治療薬としては, Ganciclovir とそのプロドラッグである Valganciclovir, Foscarnet のみが日本で使用できる薬剤である。いずれも造血機能抑制や腎障害, 電解質異常など強い副作用のある薬剤であり, 免疫不全に伴う CMV 感染症・CMV 血症のみが適応となっている。治療薬の概要を表に示した。急性感染では髄膜炎など重篤な病態がみられない限り, 抗ウイルス薬の適応とはならない。

免疫不全の場合は基本的に治療が必要であるが, HIV

感染症とそれ以外では対処がやや異なる。前者では病態をみながら治療を行うが, 後者では血中の CMV ウイルスが検出された場合は明らかな臓器病変がみられなくても早期の治療開始が肝要とされている。いずれの薬剤も小児への投与に関する経験は少なく, 治療を行う場合には十分な検討とインフォームド・コンセントが必要である。

Key Words: ヘルペスウイルス, 免疫不全, 先天感染, ガンシクロビル, ホスカルネット

*長崎大学病院感染制御教育センター
〔〒 852-8501 長崎市坂本 1-7-1〕
TEL 095-819-7200
E-mail: ayasuoka@nagasaki-u.ac.jp

* * *

特集

よく遭遇する感染症と感染対策，看護ケア

呼吸器感染症と感染対策

②結核

塚本美鈴 *Tsukamoto Misuzu* 長崎大学病院感染制御教育センター

結核の概念と特徴

結核は空気感染で伝播する。患者が咳やくしゃみ，会話をする際に飛散した飛沫中の水分が蒸発し軽くなり，飛沫核となった結核菌を肺内に吸入することにより感染が成立する。

結核は感染と発病とは別に考えなくてはならず，肺内に吸入されても諸免疫機構がはたらき，実際には結核菌に曝露した人のうち半分程度に感染が成立し，そのうち10～20%の人が発病する。発病する人の約80%は感染後2年以内に，残りは数年から数十年後に発病する。

結核は感染症法の2類感染症に分類され，感染症法第12条より医師は結核と診断した患者があった場合にはただちに最寄りの保健所に届け出なければならない。患者の死亡後に結核と判明した場合，あるいは結核と診断された直後に死亡した場合にも届出を行う必要がある。また，同法第53条により病院管理者は結核患者が入院または退院したときは7日以内に保健所長に届出を行う。

結核の疫学

わが国における2011年の全結核患者数は22,681人で，人口10万対罹患率は17.7，そのうち菌喀痰塗抹陽性肺結核者数は8,654人，喀痰塗抹陽性罹患率は人口10万対6.8であった¹⁾。低下傾向ではあるものの，諸先進国と比べると罹患率は2～5倍とまだまだ中蔓延国といえる。

特徴の1つとしては，70歳以上の高齢者結核が半数以上を占めるようになってきていることである。その約半数は呼吸器症状がなく，微熱，全身倦怠感，食欲不振，体重減少といった症状のみであり，発見の遅れにつながるがあるので注意が必要である。

また，わが国の医療従事者における結核罹患率は一般人口より高いことが知られており，とくに看護師，臨床検査技師の罹患率は他職種の同年齢層の罹患率と比較して高い²⁾。

一方，病院・診療所・老人保健施設などの医療施設における結核集団感染発生は事業所における発生に続き，約18%を占めている(図1)³⁾。結核集団感染の定義は同一の感染源が，2家族以上にまたがり，20人以上に結核を感染させた場合をいう。ただし，発病者1人は6人が感染し

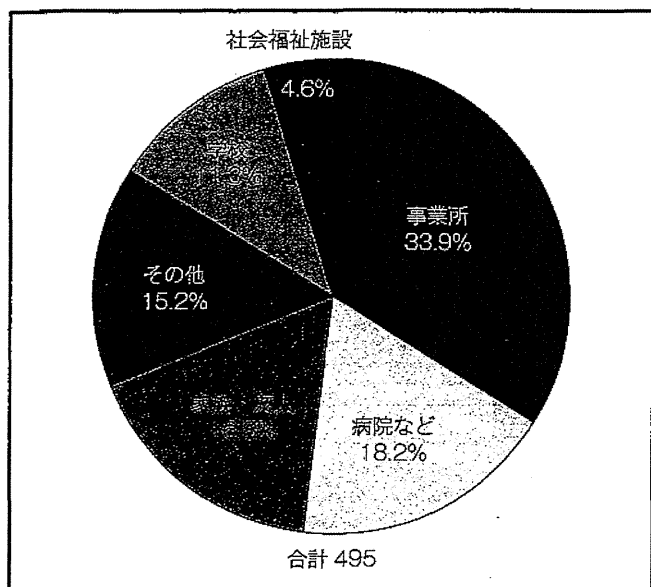


図1 結核集団発生場所(平成14~23年, 厚生労働省健康局結核感染症課調査より)

たものとして感染者を計算する。

結核の感染対策

結核の院内感染防止は多方面からの方策をとらなければならない。

1▶▶▶ 早期発見

まずは感染源となる結核患者の診断を早期に発見することが院内伝播を予防する第一歩である。感染源になり得る結核とは肺結核および喉頭結核が代表である。とくに喀痰塗抹陽性例では感染性が高い。

また、結核性胸膜炎や粟粒結核でも肺実質に病変をみとめ、喀痰から結核菌が排出されていれば感染源となり得る。2週間以上続く咳では積極的に胸部X線写真を撮り、異常があれば必ず抗酸菌検査を行う。

高齢者や免疫抑制状態にある患者(悪性腫瘍, 糖尿病,

免疫抑制剤により治療中の患者など), HIV感染者などの結核のハイリスクグループでは、咳のほかにも痰、血痰、胸痛、全身倦怠感、発熱などをみとめた場合には常に念頭に結核の存在をおき、これらの検査を行う⁴⁾。

その他、外来患者で咳が激しいものは外科用マスクを着用させ(そのような症状があれば申し出るよう表示も必要)、他の待合室に隔離し、他患者との接触をできるだけ避ける。救急外来や呼吸器内科外来などでは陰圧室が1つはあることが望ましい。このような患者では優先的診療(トリアージ)を行う体制を整備しておくことも重要である。

また、外来で結核が強く疑われて採痰する場合、陰圧室がない場合は専用の採痰ブースにて採痰する。採痰ブースが設置できない場合は人のいない風通しのよい場所で行う。

2▶▶▶ 患者発生時の対応

結核と診断された(または疑う)患者は陰圧個室に隔離し、保健所に届出を行い、治療を開始する。また、喀痰塗抹で抗酸菌陽性であるが、胸部X線所見上は非結核性抗酸菌症が疑われる、肺外結核の診断はついているが、胸部の精査は行っていないなどといった場合も、培養、PCR、胸部CTなどで肺結核が除外されるまでは個室収容が安全である。

陰圧個室がない場合は、転院可能な患者は転院まで、基礎疾患が重篤で転院できない者は転院できるようになるまで、ひとまずは通常の個室へ隔離する。その際、空調設備が再循環式の場合(病室または特定区域からの排気の一部を循環させて、吸気の一部に用いる方式)でHEPAフィルターが備えられていない環境では、空調を止める必要がある。

また、そのような場合、簡易式のHEPAフィルター内蔵空気清浄機を使用する。できればこのような事態も想定して結核病床のない一般病院でも1~2室の全排気方式の隔離室を備えていることが望ましい。

患者が入室している陰圧個室は差圧計またはスモークテストなどで毎日陰圧を確認する。

空調設備の具体的な内容は「平成20年度厚生労働科学研

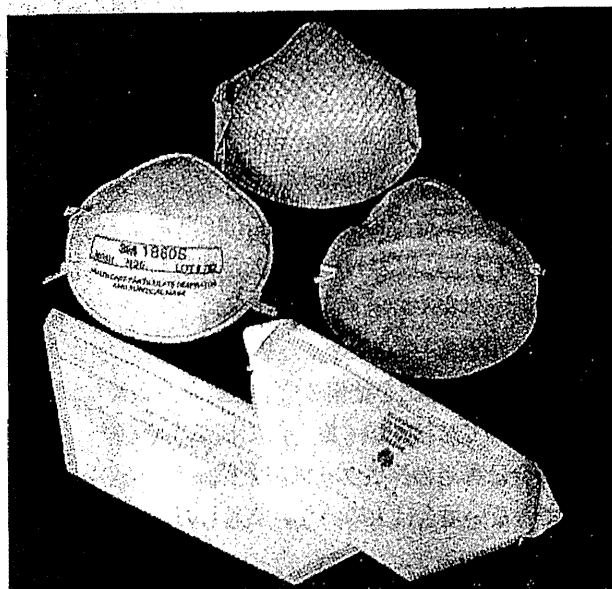


図2 種々の N95マスク



図3 フィットテストの様子

究費補助金(新興再興感染症研究事業)我が国における一類感染症の患者発生時の臨床的対応に関する研究, 分担研究報告書, 結核を想定した感染症指定医療機関の施設基準に関する研究平成21年3月」を参照いただきたい。

病室に入る前には, 職員および面会者は N95マスクを着用する(図2)。自分に合ったサイズのマスクを着用し,

表1 1時間あたりの換気回数と空气中的汚染物質(飛沫核)の除去効率

換気回数	空气中的汚染物質(飛沫核)を99%または99.9%除去するのに要する時間(分)	
	99%	99.9%
2	138	207
4	69	104
6	46	69
12	23	35
15	18	28
20	7	14
50	3	6
400	<1	1

〔Centers for Disease Control and Prevention: Guidelines for preventing the transmission of Mycobacterium tuberculosis in Health-care settings, 2005. MMWR 2005 ; 54(No. RR-17). より〕

きちんと着用できているかの確認をフィットテストにて行うことが重要である(図3)。

やむなく病室外で検査などを行わなければならない場合は, 患者には N95マスクではなく外科用マスクを着用してもらう。検査室やエレベータあるいは廊下では可能な限り他の患者と接しないルートあるいは時間帯を設定しておく。また, 検査室や関係部署には空気感染対策が必要である旨を伝達しておかねばならない。同様に, 検査などの医療関係者が病室に入る場合, 空気感染対策中であることがわかる表示を院内共通の認識事項として周知しておくことも伝播を予防するためには重要である。

患者が使用した食器は通常の処理を行い, リネン類も標準予防策に準じて洗濯を行う。患者家族にも食器やリネンの取り扱いについては特別に処理する必要はないことを十分説明する。血圧計, 聴診器などは専用にする必要はない。喀痰は専用のごみ箱を設置し, 室内でビニール袋などを用いて密閉して感染性廃棄物として廃棄する。2類感染症である結核の治療および検査で使用した後のものは感染性廃棄物となるが, 日常生活から出る一般のゴミは通常どおり処理する。

患者が退去した後は, 部屋の入口扉を閉め, 空气中的飛沫核が除去されるまで空室にする。除去されるまでの時間は1時間あたりの換気回数による(表1)。通常1時間あた

り12回の換気では、約30分で99.9%の飛沫核を除去できる⁵⁾。

部屋の清掃やデスポーザブルでない医療機器の消毒、滅菌についてはガイドラインや院内マニュアルに従い通常どおり行う。

3) 患者発生後の対応

1) 接触者健診

医療施設で発生した場合でも、自施設のみで事後対処せず、保健所長の指導のもと協働して行う。その際、濃厚接触者、非濃厚接触者、非接触者の判断をすることになるが、面会の家族を除いた考えられる医療施設内の濃厚接触者とは、同室患者、主治医、担当看護師、気管支鏡検査や採痰を担当した医師、看護師、検査技師があげられる。同室患者の主治医と担当看護師、X線技師などは非濃厚接触者に入るであろう。接触者健診の詳細は『感染症法に基づく結核の接触者健康診断の手引き改訂第4版』を参照いただきたい。

2) 結核早期発見のための職員健康管理

日本結核病学会予防委員会では雇い入れ時の健康診断に際しては法令に定められた検査項目のほか、クオンティフェロン(QFT)検査の実施を推奨している。とくに結核患者と常時接する職場(結核病棟など)で強く奨めている。コスト面で難しい面もあるが、もしQFT検査を行わない場合、明らかに結核患者との接触歴がない者はベースライン陰性として扱う。

曝露後、本検査で陽性化したものには化学予防を行うが、専門医に相談のうえ、服用を開始するのが望ましい。そのほか、毎年の健康診断は必ず受診する体制が必要である⁶⁾。

4) その他

1) 細菌検査

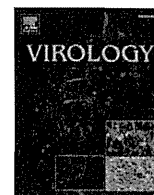
痰や培養菌などを取り扱う際は安全キャビネット内で操作し、できれば検査室は陰圧の環境とするのがよい。

2) 気管支鏡検査

結核が疑わしいがどうしても喀痰で診断がつかない場合、やむなく気管支鏡を施行することもあり得るが、その際にはできるだけ最後に検査を組み入れ、陰圧の気管支鏡室が確保できなければ、簡易式のHEPAフィルター内蔵空気清浄機を設置するなどの工夫が必要である。

引用文献

- 1) 結核予防会結核研究所疫学情報センター、<http://www.jata.or.jp/rit/ekigaku/http://www.jata.or.jp/rit/ekigaku/>
- 2) 大森正子、星野齊之、山内祐子、他：職場の結核の疫学動向。結核、82：85-93、2007。
- 3) 結核集団感染の件数(平成14年～23年)厚生労働省調べ、<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000002gv1g.html>
- 4) 日本結核病学会・編：結核診療ガイドライン、改訂第2版、南江堂、東京、2012、pp.33-34
- 5) Centers for Disease Control and Prevention: Guidelines for preventing the transmission of Mycobacterium tuberculosis in Health-care settings, 2005. MMWR, 2005 : 54(No. RR-17) .
- 6) 日本結核病学会予防委員会：医療施設内結核感染対策について。結核、85：477-481、2010。



Novel monoclonal antibodies for identification of multicentric Castleman's disease; Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded vMIP-I and vMIP-II

Kazushi Nakano ^{a,1}, Harutaka Katano ^{c,1}, Kenjiro Tadagaki ^b, Yuko Sato ^c, Eriko Ohsaki ^a, Yasuko Mori ^{d,e}, Koichi Yamanishi ^e, Keiji Ueda ^{a,*}

^a Division of Virology, Department of Microbiology and Immunology, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

^b Institut Cochin, Université Paris Descartes, CNRS (UMR 8104) Inserm U1016, Paris, France

^c Department of Pathology, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

^d Division of Clinical Virology, Kobe University Graduate School of Medicine, 7-5-1, Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe, 650-0017, Japan

^e Division of Biomedical Research, National Institute of Biomedical Innovation, Ibaraki, Osaka, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 August 2011

Returned to author for revision 2 October 2011

Accepted 11 January 2012

Available online xxxx

Keywords:

Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus

Kaposi's sarcoma

Multicentric Castleman's disease

Viral macrophage inflammatory protein

vMIP-I

vMIP-II

Chemokine

KSHV

HHV-8

ABSTRACT

Recent studies have indicated that vMIP-I and vMIP-II play important roles in the pathogenesis of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)-related diseases due to the effects of these proteins on vascularization. We developed monoclonal antibodies against KSHV-encoded viral macrophage inflammatory protein-I (vMIP-I) and vMIP-II to study these expression profiles and reveal the pathogenesis of KSHV-related diseases. The MAbs against vMIP-I and vMIP-II reacted to KSHV-infected cell lines after lytic induction. Both vMIP-I and the vMIP-II gene products were detected 24 h post-induction with 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate until 60 h in the cytoplasm of primary effusion lymphoma cell lines. In clinical specimens, both vMIP-I and vMIP-II gene products were detected in the tissues of patients with multicentric Castleman's disease. On the other hand, only vMIP-II was detected in a subset of Kaposi's sarcoma. We concluded that these antibodies might be powerful tools to elucidate the pathogenesis of KSHV-related diseases.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV), also known as human herpesvirus 8 (HHV-8), is a gammaherpesvirus originally identified in HIV-positive Kaposi's sarcoma (KS) tissues (Chang et al., 1994). KSHV is responsible for AIDS associated cancers such as Kaposi's sarcoma (KS), primary effusion lymphoma (PEL), and multicentric Castleman's disease (MCD) (Cesarman et al., 1995; Schalling et al., 1995; Soulier et al., 1995). As is the case for all herpesviruses, KSHV has two life cycles, one latent and the other lytic. Lytic gene expression can be induced by the treatment of latently infected cells with chemical agents such as 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), sodium butyrate (Arvanitakis et al., 1996; Miller et al., 1997). It has been demonstrated that two KSHV-encoded chemokines, K6 (which encodes a vMIP-I) and K4 (which encodes a vMIP-II), are expressed in the course of lytic infection (Moore et al., 1996; Sun et al., 1999). Previous reports showed that both vMIP-I and vMIP-II induced Ca²⁺ signal transduction

via certain chemokine receptors and the receptor-dependent migration of cells (Benelli et al., 2000; Chen et al., 1998; Endres et al., 1999; Kledal et al., 1997). In addition, in a chick chorioallantoic membrane assay, the both proteins showed strong angiogenic properties (Boshoff et al., 1997). However, little is known about the contribution of vMIPs to KSHV malignancy under physiologic conditions.

In this report, we generated new monoclonal antibodies against vMIP-I and vMIP-II, and confirmed the detection of both vMIP-I and vMIP-II in histological sections of tissues from MCD patients as well as in KSHV-infected PEL cell lines. In cases of KS, vMIP-II was detected, but not vMIP-I. These results suggest that the expression properties of vMIP-I and vMIP-II might be related to KSHV-associated diseases, and may even be involved in the generation of diseases. Thus, antiviral chemokine MAbs could potentially become useful tools for the diagnosis of KSHV-related diseases.

Materials and methods

Cells

Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-positive cell lines (BC-1, BC-3, BCBL-1 and TY-1 cells) and a negative cell line (BJAB cells) were

* Corresponding author. Tel.: +81 6 6879 3780; fax: +81 6 6879 3789.

E-mail address: kueda@virus.med.osaka-u.ac.jp (K. Ueda).

¹ Equal contribution by these authors.

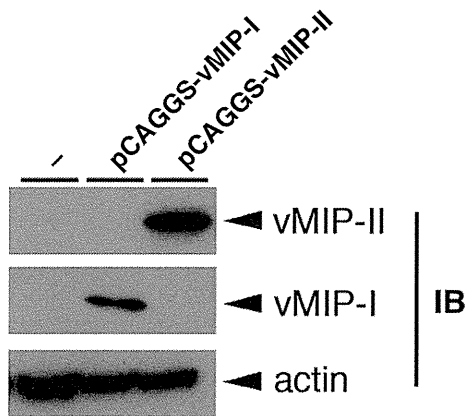


Fig. 1. Cross reactivity between anti-vMIP-I and anti-vMIP-II MAb. 293 T cells were transfected with either 2 μ g of pCAGGS- vMIP-I or 2 μ g of pCAGGS-vMIP-II plasmids. Forty-eight hours after transfection, the cells were harvested and expression of vMIP-I or vMIP-II was tested by Western blot analysis using the anti-vMIP-I or -vMIP-II MAb, respectively. Actin was also probed with anti-actin monoclonal Ab as a loading control.

obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA). These cells were grown in RPMI 1640 (Nakalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) supplemented with 10 IU/ml penicillin G, 10 μ g/ml streptomycin, 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (HyClone, Logan, UT) in a 5% CO₂ atmosphere. In addition, 293 T and 293/EBNA (Clontech) cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Nakalai Tesque, Inc.) supplemented with 10 IU/ml penicillin G, and 10 μ g/ml streptomycin, 10% FBS, and 200 mM L-glutamine.

Plasmids

In order to express vMIP-I and vMIP-II, the ORFs were cloned into the pCAGGS eukaryotic expression vector, and pCAGGS-vMIP-I and pCAGGS-vMIP-II were established. The plasmid vector, pCAGGS was kindly provided by Dr. J. Miyazaki of Osaka University (Niwa et al., 1991). Briefly, fragments including vMIP-I and vMIP-II ORFs were amplified by PCR using the following primer sets: vMIP-I-Met (5'-CGGTACCGAATTCTCCAGATGGCC-3') and vMIP-I-Ter (5'-ACTCGA-GAATTCTACTTGTTCATCGTCGCTTGTAGTCGGAAGCTATGGCAGGCAG-3'); and vMIP-II-Met (5'-AGGTACCGAATTCTAGTTATGGACACCAAGGCC-3') and vMIP-II-Ter (5'-ACTCGAGAATTCTACTTGTTCATCGTCGCTTGTAGTCGAGCGAGCAGTGACTGG-3'). The PCR products were cloned into pCR2.1 (Invitrogen) and sequenced. After digestion with *Eco*RI, the fragments were ligated into the *Eco*RI site of the pCAGGS vector. Then, the DNA fragments encoding vMIP-I and vMIP-II were liberated by *Eco*RI, and were inserted into pCAGGS to generate the expression vectors pCAGGS-vMIP-I and -vMIP-II, respectively. vMIP-I (pGEX-vMIP-I) and vMIP-II (pGEX-vMIP-II) were also generated using PCR-based technology using BCBL-1 genomic DNA as a template. The coding region, without a signal peptide, was amplified with vMIP-I-Eco (CAGAATTCGCGGGTCACTCGTGTCG-3'), vMIP-I-Sal (CTGTCCACCGTC-TAAGCTATGGCAGG-3'), vMIP-II-Eco (5'-CGGAATTCGCGTCTGGCATA-GACCG-3'), and vMIP-II-Sal (5'-GGGTCGACATTCTTCAGCGAGCAGTG-3'). The amplified vMIP-I and the vMIP-II fragments were digested with *Eco*RI and *Sal*I and inserted downstream of the GST coding of pGEX-5X-1 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) at the *Eco*RI and *Sal*I sites to construct pGEX-vMIP-I and pGEX-vMIP-II. To express a full-length and the deletion mutants of the GST-vMIP-I and GST-vMIP-II fusion protein, the genes for GvM1-Full, GvM1-D1, GvM1-D2,

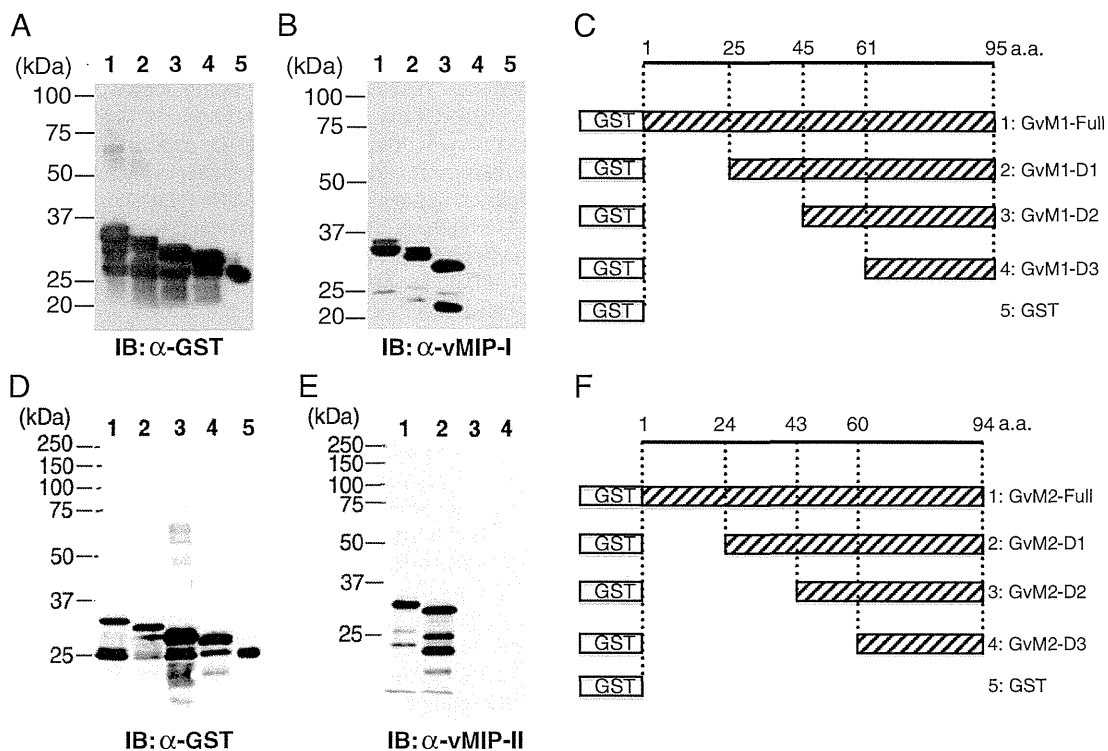


Fig. 2. Epitope mapping of the anti-vMIP-I and anti-vMIP-II MAb. To map the regions of vMIP-I and vMIP-II recognized by the anti-vMIP-I and anti-vMIP-II antibody, a series of GST-vMIP-I and GST-vMIP-II fusion proteins containing the individual regions of vMIP-I and vMIP-II were constructed as described in Fig. 2C and F, and the proteins were expressed in *E. coli*. The lysates of the fusion proteins, vMIP-I and vMIP-II, and its deletion mutants were immunoblotted with an anti-GST antibody (A and D) and an anti-vMIP-I (B) and an anti-vMIP-II antibody (E) to detect GST-vMIP-I or GST-vMIP-II fusion proteins. Lane 1, GvM1-Full; lane 2, GvM1-D1; lane 3, GvM1-D2; lane 4, GvM1-D3; lane 5, GvM1-D4; lane 6, GST in Fig. 2A and B. Lane 1, GvM2-Full; lane 2, GvM2-D1; lane 3, GvM2-D2; lane 4, GvM2-D3; lane 5, GST (in D only) in Fig. 2D and E. Summary of GST-vMIP-I (C) and GST-vMIP-II (F) deletion mutants. Individual regions of vMIP-I and vMIP-II were cloned in-frame into the pGEX-5X-1 vector to generate GST-vMIP-I and GST-vMIP-II fusion proteins, respectively. The boxes at left indicate GST, and the white boxes with slashed lines indicate individual domains of vMIP-I and vMIP-II. 1, GvM1-Full(1-95a.a.); 2, GvM1-D1(25-95a.a.); 3, GvM1-D2(45-95a.a.); 4, GvM1-D3(61-95a.a.) in Fig. 2C, and 1, GvM2-Full(1-94a.a.); 2, GvM2-D1(24-94a.a.); 3, GvM2-D2(43-94a.a.); 4, GvM2-D3(60-94a.a.) in Fig. 2F.