

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591593

研究課題名(和文)小児肝移植後の分子生物学的手法によるEBウイルス感染診断と至適免疫抑制療法の開発

研究課題名(英文)Development of detection of EBV infection and monitoring of immunosuppression by molecular analysis after pediatric liver transplantation

研究代表者

福田 晃也(Fukuda, Akinari)

独立行政法人国立成育医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：60455417

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：小児生体肝移植後のEBV感染頻度は高く、進行すれば致死率の高いPTLDを発症する。そこで、EBV感染からPTLDへの進展を予防し、かつ拒絶反応に対する至適免疫抑制状態のモニタリング法としてCD4+Tリンパ球のATP活性値の測定の有用性について検討した。ImmuKnow値によるEBV感染状態及び免疫抑制状態の評価に関する有用性は限定的であった。EBV感染の診断において乳幼児における血液サンプルの採取には患児の苦痛と十分なサンプル量を得ることができない場合も少なくないため、唾液の採取による定性的EBV-PCRによる非侵襲的なスクリーニング法の開発を試みた20名の患児にて唾液中EBVを検出した。

研究成果の概要(英文)：The immune function assay is a measure of cell-mediated immunity based on the peripheral CD4+ T cell adenosine triphosphate (ATP) activity. The aim of this study was to assess the correlations between the CD4+ T cell ATP activity assay and the clinical status in pediatric LDLT recipients. The recipient's status was classified as follows: stable, infection or rejection. The CD4+ T cell ATP activity in the pediatric LDLT recipients with a clinically stable status had a lower immune response range (median 162 [interquartile range: IQR, 85-297] ATPng/ml). The correlations between the CD4+ T cell ATP activity and the status of rejection or EBV viremia were limited. We developed the method of isolation of EBV from saliva.

研究分野：移植外科

キーワード：EBウイルス 低侵襲検査法 免疫抑制療法 小児肝移植 細胞障害性T細胞活性

1. 研究開始当初の背景

ヘルペスウイルス科に属する Epstein-Barr Virus (EBV) は B リンパ球を主な標的細胞とする 1)。EBV の感染を受けたナイーブ B 細胞は活性化され増殖した後、胚中心を通過して記憶 B 細胞に分化し長期の潜伏感染が成立する。EBV による B 細胞の活性化・増殖は、抗原刺激と T 細胞ヘルプによる生理的な活性化と共通の細胞内分子機構によると考えられている。このように、EBV のライフサイクルは B 細胞の正常な増殖・分化の機構を巧みに利用したものとなっている。

伝染性単核球症、バーキットリンパ腫、ホジキン病、免疫抑制(不全)状態におけるリンパ増殖性疾患 (lymphoproliferative disorder: LPD)などは EBV 感染 B 細胞の増殖を伴う疾患である。一般的に小児肝移植症例の多くは移植前には EBV-seronegative な状態であるが移植後 3 か月の間にその 60% が無症候性のもも含めて seroconvert すると報告されている 2)。

また、EBV は時に T 細胞や NK 細胞にも感染し、慢性活動性 EBV 感染症、血球貪食症候群、鼻腔リンパ腫、末梢 T 細胞リンパ腫などの原因となる。このようなリンパ球への感染の他に、上皮細胞への EBV 感染が疾患の原因として報告されているものに胃癌、上咽頭癌などがある。さらに、EBV 感染は全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群など自己免疫疾患の誘因となることも知られている。

2. 研究の目的

EBV の初回感染後は EBV に感染したリンパ球は不死化しリンパ球の増殖により EBV も増殖する。通常の免疫力をもった健常人では、不死化 EBV 感染リンパ球は細胞障害性 T リンパ球 (CTL) の活性化により排除され顕性化しない。しかし、生体肝移植後に使用する免疫抑制剤であるカルシニューリン阻害剤 (CNI) は T リンパ球の CTL 活性を低下させることが主要な作用機序であるため、免疫抑制療法中の患児では CTL 活性が低下することにより不死化 EBV 感染リンパ球は排除されず不死化 EBV 感染リンパ球が増殖し、最悪の場合臓器移植後 LPD に進展する。さらに、他の単純ヘルペス、水痘帯状疱疹ウイルスまたはサイトメガロウイルスなどとなり、アシクロビル・ガンシクロビルなどの抗ウイルス薬が奏功する割合は非常に低く、CNI の減量のみが有効な治療とされている。従来 CNI の血中濃度のみを指標とする免疫抑制剤の調節では、EBV 感染の発生頻度は移植後 3 ヶ月で約 60% と高いことが報告され、また我々の検討でも 55% の頻度で EBV 感染をきたしている。過度の免疫抑制療法による EBV 感染症の臨床症状は多岐にわたり、最重症の場合には極めて致死率の高い移植後リンパ球増殖症 (post transplant

lymphoproliferative disorder; PTLD) に至る場合もまれではない。そのため T リンパ球の活性化をモニタリングすることで CTL 活性を正確に評価し、患児の免疫状態を把握することが可能となり感染症も拒絶反応を起こさない至適な免疫療法を実現することができると考えられる。

また、口腔粘膜擦過および唾液をサンプルとして定性的 EBV-PCR を行い血液サンプルによる定量的 EBV-PCR 検査との比較検討を行い、EBV 感染を非侵襲的にスクリーニングできる可能性を検討する。

3. 研究の方法

国立成育医療研究センターにおける「適応評価委員会」にてドナー・レシピエントともに承認を得た小児生体移植初回手術症例を対象とする。

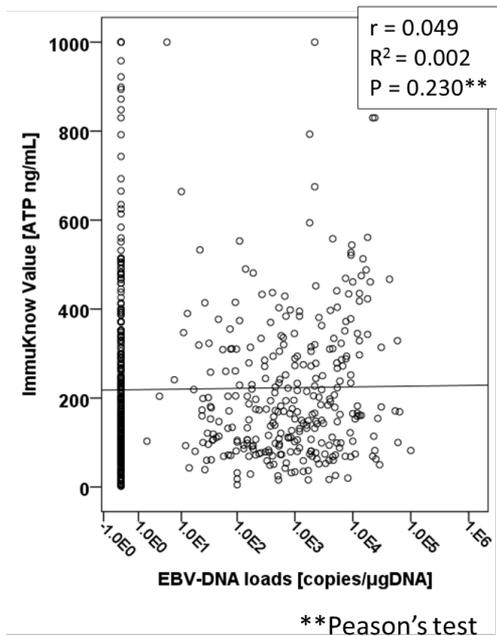
移植後レシピエントの血液サンプルを用いた定量的 EBV-PCR 検査を施行しゲノム数の変化を追跡する。同時に口腔粘膜擦過および唾液により得られたサンプルを用いた定性的 EBV-PCR 検査を施行する。

T 細胞をはじめとする免疫細胞表面抗原の発現解析をフロー・サイトメトリー (FCM) 法を用いて、CTL 活性のモニタリングにより免疫抑制剤投与量の調節を行い、EBV 感染症をはじめとする感染症の罹患頻度を低下させ、かつ拒絶反応を呈さない至適な免疫療法の確立を目指す。従来カルシニューリン阻害薬の血中濃度のモニタリングに加えて、EBV-PCR のゲノム数、フロー・サイトメトリーを新規マーカーとしてカルシニューリン阻害薬を個々の症例毎に調節し、EBV 感染状態の変化、その他の感染症発生頻度、T-cell の subset のプロファイリングにつき検討する。口腔粘膜擦過によりえられたサンプルの定性的 EBV-PCR 検査法の検出率と血液中の定量的 EBV-PCR 検査の結果とを比較検討し、口腔粘膜擦過サンプルによるスクリーニングの可能性を検証する。免疫抑制剤の血中濃度以外の新しいパラメーターとして感染リンパ球に対する細胞障害性 T 細胞活性の測定による患児免疫状態を評価。小児肝移植後における CD4 陽性リンパ球 ATP 活性値の推移について検討した。

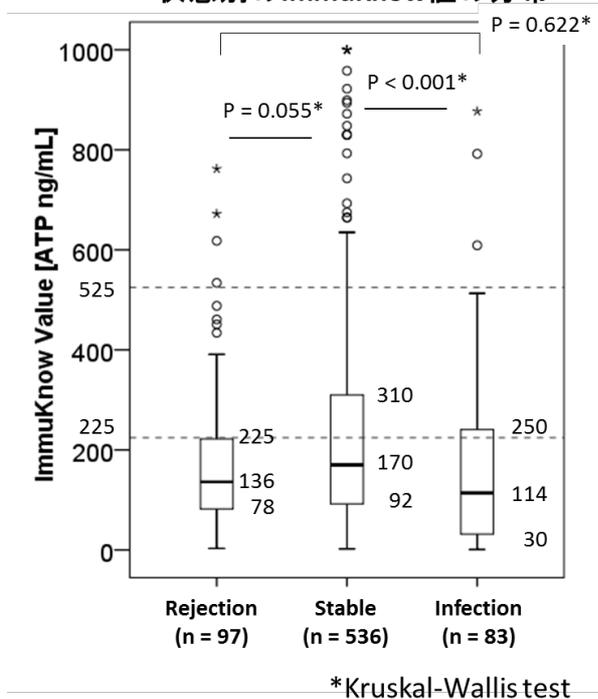
4. 研究成果

1. EBV-PCR 定量検査にて 2.4×10^3 copies/mcgDNA 以上のゲノムが検出された場合 EBV 感染ありと定義した。感染・拒絶がなく安定した肝機能を示した際の IK 値の interquartile range は 85-297 ATP ng/ml であり成人での range より低いことが示された。成人肝移植例では IK 値は感染状態で低値をとり、拒絶反応状態で高値となると報告されているが、今回の我々の検討では小児肝移植例での EBV 感染 107 例では IK 値が逆に有意に高値をとることが判明した。

EBVゲノム数とImmuKnow値との相関



状態別のImmuKnow値の分布



2. EBV 感染の診断において乳幼児における血液サンプルの採取には患児の苦痛と十分なサンプル量を得ることができない場合も少なくないため、唾液の採取による定性的 EBV-PCR による非侵襲的なスクリーニング法の開発。血球中 EBV-PCR 検査にて 10×10^4 copies/mcgDNA 以上のゲノムが検出された 20 症例に関して唾液中の EBV-PCR 検査にて EBV ゲノムが検出することが可能であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Nakazawa A, Nakano N, Fukuda A, Sakamoto S, Imadome K, Kudo T, Matsuoka K, Kasahara M. Use of serial assessment of disease severity and liver biopsy for indication for liver transplantation in pediatric Epstein-Barr virus-induced fulminant hepatic failure. *Liver Transplantation*, 査読有、2015、;21(3):362-8. doi: 10.1002/lt.24052.

Imadome K, Fukuda A, Umezawa A, Effective control of Epstein-Barr virus infection following pediatric liver transplantation by monitoring of viral DNA load and lymphocyte surface markers. *Pediatric Transplantation*, 査読有、2012、16(7): 748-57. doi: 10.1111/j.1399-3046.2012.01750.x.

Fukuda A, Imadome K, Sakamoto S, Shigetani T, Uchida H, Matsunami M, Sasaki K, Kanazawa H, Kawano F, Nakazawa A, Fujiwara S, Kasahara M, Evaluation of the immune function assay in pediatric living donor liver transplantation. *Pediatric Transplantation*, 査読有、2015、19(2):144-52. doi: 10.1111/ptr.12402.
福田晃也, 今留謙一, 笠原群生, 小児肝移植後 EB ウイルス感染症への対策, 今日
 の移植, 2014, 27 巻, 4 号, p271-278.

〔学会発表〕(計 2 件)

福田晃也, 阪本靖介, 金澤寛之, 重田孝信, 濱野郁美, 内田 孟, 佐々木健吾, 今留謙一, 中澤温子, 笠原群生, 小児生体肝移植後 Epstein-Barr virus 感染に対するアシクロビル予防投与の必要性に関する検討. 第 49 回日本移植学会総会 2013 年 9 月, 京都.

福田晃也, 阪本靖介, 金澤寛之, 重田孝信, 濱野郁美, 内田 孟, 佐々木健吾, 今留謙一, 中澤温子, 笠原群生, 小児肝移植後 EB ウイルス感染症への対策. 第 114 回日本外科学会定期学術集会 2014 年 4 月, 京都.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 晃也 (FUKUDA AKINARI)

国立成育医療研究センター・移植外科・医員
 研究者番号: 60455417

(2) 研究分担者

今留 謙一 (IMADOME KEN-ICHI)

国立成育医療研究センター・母児感染研究部・室長

研究者番号: 70392488

梅澤 明弘 (UMEZAWA AKIHIRO)

国立成育医療研究センター・生殖・細胞医療
研究部・部長

研究者番号：70213486

笠原 群生 (KASAHARA MUREO)

国立成育医療研究センター・臓器移植センタ
ー・センター長

研究者番号：30324651

阪本 靖介 (SAKAMOTO SEISUKE)

国立成育医療研究センター・臓器移植センタ
ー

研究者番号：00378689