

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591247
 研究課題名（和文） 造血幹細胞・臓器移植後に発生する難治性ウイルス感染症の早期発見・予防法の確立
 研究課題名（英文） Establishment of early diagnosis and prevention for intractable virus infections in stem cell/organ transplantation
 研究代表者
 木村 宏(Hiroshi Kimura)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号：30303621

研究成果の概要：造血幹細胞・臓器移植後の免疫不全状態に伴って、様々なウイルス感染症が合併する。これらの早期発見・治療効果判定法は未だ標準化されていない。本研究ではマルチプレックス（複数・同時測定）定量 PCR 法による EB ウイルス、サイトメガロウイルス、HHV-6 の同時モニタリングシステムを確立・標準化し、造血幹細胞・臓器移植後患者に応用した。今後、このモニタリングシステムを用いることで、免疫不全状態におけるウイルス疾患の発生機構を解明し、予防および効果的な治療の開発が期待できる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：移植医療、難治性ウイルス感染症、リアルタイム PCR、モニタリング

1. 研究開始当初の背景

近年、造血幹細胞・臓器移植の増加とその技術の進歩に伴い、免疫抑制下におけるウイルス感染合併症がますます問題となってきた。移植後の免疫不全状態に伴って、様々なウイルスが活性化してくる。ことにヒトに潜伏/持続感染している EB ウイルス、サイトメガロウイルス、Human herpesvirus 6 (HHV6)、水痘帯状疱疹ウイルス、アデノウイルスなどは、移植後の細胞性免疫の抑制・再構築の遅れに伴い再活性化し、時に致命的な合併症を生じる。その中でも、EB ウイルスに

よるリンパ増殖症、サイトメガロウイルスによる間質性肺炎、HHV6 による辺縁系脳炎は、致命率も高い重篤な疾患である。

これらウイルス感染症の制御が移植の成否にかかわるため、造血幹細胞・臓器移植後にはウイルスに対するモニタリングが行われている。しかし、施設によって抗原検出法、PCR 法、ウイルス分離など様々な方法で独自に行われているのが現状である。さらに、このようなモニタリング検査は時に過剰に行われ、施設独自の基準に基づいて、過剰な抗ウイルス治療が行われていることが多い。

造血幹細胞・臓器移植に伴うウイルス感染症のモニタリングシステムとして、抗体測定、ウイルス分離、抗原検出法(アンチゲネミア法)、核酸増幅検出法(PCR法、NASBA法、LAMP法)など様々な方法が用いられてきた。このようなモニタリング法は、我が国のみならず諸外国においても、統一した方法や国際間で標準化されたものはほとんどなかった。また、ウイルスに対して、それぞれ異なった方法でモニタリングが行われており、同時に複数のウイルスを解析する手法は未だ確立されていない。

リアルタイムPCR法は蛍光標識プローブを用いた遺伝子増幅・検出システムである。同法は、迅速で再現性も高く定量性を有することから、造血幹細胞・臓器移植に伴うウイルス感染症のモニタリング法としても用いられている。私どもは世界に先駆けて、リアルタイムPCR法によるEBウイルスの定量システムを開発し、造血幹細胞・臓器移植後の致命的合併症の一つであるEBウイルス関連リンパ増殖症の早期診断に応用した。また、サイトメガロウイルス、単純ヘルペスウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、HHV6、HHV7、HHV8などに対しても、リアルタイムPCR法による定量解析法も確立し臨床応用してきた。しかし、本方法では、複数のウイルス遺伝子を同時解析することはできなかった。

2. 研究の目的

近年、蛍光検出技術の進歩に伴い、異なった蛍光色素を用いた複数遺伝子の定量解析が可能となってきた。さらに、リアルタイム定量PCRシステムの改良も相まって、このシステムを用いれば複数のウイルスを同時に定量解析するいわゆるマルチプレックス・リアルタイムPCRが可能となった。

本研究の目的は、造血幹細胞・臓器移植患者を対象に、マルチプレックス定量PCR法による複数ウイルスの同時モニタリングシステムを確立・標準化することである。マルチプレックス定量PCR法を用い、複数のウイルスを同時定量解析した報告はほとんどなく、ことに移植医療に臨床応用した研究は皆無である。さらに本研究の最大の目的は、いままで施設間でばらばらであったウイルスモニタリングシステムの標準化・統一化にある。もしウイルスモニタリングシステムが統一できれば、施設間における治療成績の比較検討が可能となり、その価値は極めて高い。さらに、この測定法には、特許申請に値する独創性・有用性があると考えられる。

3. 研究の方法

マルチプレックス定量PCR法では同時に4

種類の遺伝子の定量が可能である。まず、移植後の免疫不全状態で最も問題となるEBウイルス、サイトメガロウイルス、HHV6の3つのウイルスを同時定量するマルチプレックス定量PCR法を構築した。

- (1) それぞれのウイルスについて、遺伝子的に安定した領域に1対のプライマー/蛍光プローブを設定。標識蛍光はFAM, JOE, Cy5の3種とした。
- (2) 陽性スタンダードとして、増幅領域を含んだプラスミドを構築。
- (3) 3種類のプラスミドを混じたものをスタンダードとして、Stratagene社のリアルタイムPCR定量システムを用い同時定量を行った。
- (4) スタンダードを用い、最も感度よく同時測定ができるプライマー/プローブの濃度条件を決定した。
- (5) ウイルス標準株・臨床分離株を混じた試料を用い、同法の感度・特異度を検証。

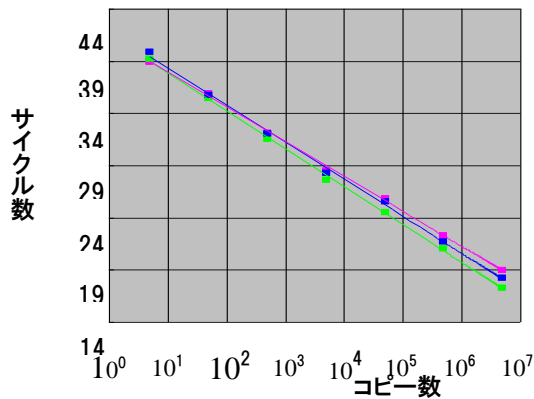
続いて、マルチプレックス定量PCR法の感度・特異度を、臨床検体を用いて検証した。対象は名古屋大学医学部附属病院にて造血幹細胞移植もしくは生体肝移植を受けた患者とした。感度・特異度の検証と平行して、どの検体を用いればもっとも有効に移植関連ウイルス感染症を診断できるかについても検討した。方法は以下のごとくである。

- (1) 造血幹細胞・生体肝移植患者あわせて46例を対象。
- (2) 移植直前から退院まで毎週、血液を採取、全血、血球、血漿分画に分けた。
- (3) 各分画からDNAを抽出し、マルチプレックス定量PCR法にてEBウイルス、サイトメガロウイルス、HHV6の3種を同時定量。
- (4) 同時に血液・咽頭ぬぐい液・尿からウイルス分離を行った。サイトメガロウイルスについてはアンチゲネミア法も行った。EBウイルス関連リンパ増殖症については、末梢血もしくは組織を用いた *in situ* hybridization 法により診断した。

4. 研究成果

EBV, CMV, HHV-6を同時に検出するマルチプレックス・リアルタイムPCR法では、陽性コントロールを用いて標準曲線を作成したところ、各ウイルス $5\sim 5\times 10^6$ copyの範囲で良好な直線が得られ、検出限界は2 copy/assayであった(図1)。また、シングル及びマルチプレックスの定量結果を比較したところ、各ウイルス共に強い相関が見られ、両測定系に差はないことが分かった。

図1 Multiplex real-time PCR 法による EBV, CMV, HHV6 同時測定法の確立 3つのウイルスに対してプライマー/蛍光プローブを設定し、プラスミドスタンダードを用いて同時測定を行った。



続いて、造血幹細胞移植・臓器移植患者を対象にマルチプレックス・リアルタイム PCR 法を臨床検体に応用したところ、移植患者 46 例中全血で 13 例、血漿で 5 例から複数のウイルス DNA が検出され、全血検体において高頻度にウイルスが検出された。CMV の全血における定量結果はアンチゲネミア法と良好な相関が得られた。EBV では症候性患者と無症候性の患者との間で、全血中の EBV-DNA 量に有意な差があったが、血漿中のウイルス量は患者間で差が認められなかった。

さらに、経時的に採血できた患者検体において、検出されたウイルス DNA 量の経時変化は移植後患者の症状、治療経過と一致した (図 2)。

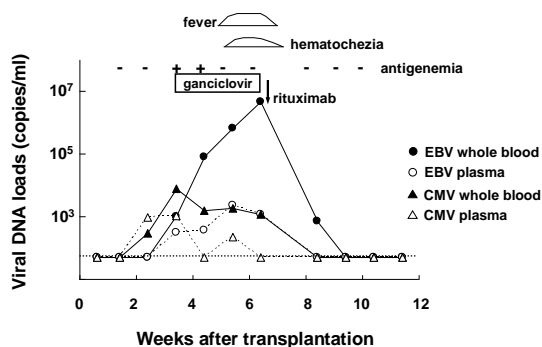


図2 移植患者におけるEBV/CMV/HHV-6の同時モニタリング マルチプレックス・リアルタイム PCR 法による EBV、CMV、HHV-6 の同時検出システムはそれぞれを単独で検出する従来の方法と比べて定量性に差はなく、有用な測定系であることが示された。また、移植患者を対象に血液中のウイルス DNA の定量を行った結果、臨床的にも非常に有用であることが示された。このシステムにより簡便、迅速な移植後ウイルス感染症のモニタリングが可能にな

り、移植成績の向上に貢献できると思われる。マルチプレックス・リアルタイム PCR 法を用いることで、3種類の異なったウイルスを同時に測定できるのみならず、測定時間の短縮、労働の減少も期待できる。直接経費だけでなく人件費も大幅に削減できるため、今後臨床分野で幅広く応用される可能性が高い。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 20 件)

- 1) Kimura H (4 人中 1 番目). Measuring Epstein-Barr virus (EBV) load: the significance and application for each EBV-associated disease. *Rev Med Virol* 18: 305-19, 2008. 査読有
- 2) Gotoh K, Kimura H (9 人中 9 番目). Clinical and virologic characteristics of 15 patients with chronic active Epstein-Barr virus infection treated with hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 46:1525-34, 2008. 査読有
- 3) Kubota N, Kimura H (7 人中 7 番目). One-step multiplex real-time PCR assay to analyse the latency patterns of Epstein-Barr virus infection. *J Virol Methods* 147: 26-36, 2008. 査読有
- 4) Yamauchi Y, Kimura H (5 人中 4 番目). The UL14 Tegument Protein of Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) is Required for Efficient Nuclear Transport of the Alpha Transducing Factor VP16 and Viral Capsids. *J Virol* 82:1094-1106, 2008. 査読有
- 5) Ushijima Y, Kimura H (5 人中 4 番目). Herpes simplex virus type 2UL56 interacts with the ubiquitin ligase Nedd4 and increases its ubiquitination. *J Virol* 82:5220-33, 2008. 査読有
- 6) Ito Y, Kimura H (7 人中 1 番目). Oligonucleotide Microarray Analysis of Gene Expression Profiles followed by a Real-time RT-PCR Assay in Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection. *J Infect Dis* 197:663-6, 2008. 査読有
- 7) Yamauchi Y, Kimura H (4 人中 3 番目). Herpes Simplex Virus Induces Extensive Modification and Dynamic Relocalisation of the Nuclear Mitotic Apparatus Protein (NuMA) in Interphase Cells. *J Cell Sci* 121:2087-2096, 2008. 査読有
- 8) Ono Y, Ito Y (11 人中 2 番目). Simultaneous monitoring by real-time PCR of Epstein-Barr virus, human

- cytomegalovirus, and human herpesvirus 6 in juvenile and adult liver transplant recipients. *Transplant Proc* 40:3578-82, 2008 査読有
- 9) Yamada K, Kimura H (11人中7番目). Successful Treatment of Neonatal Herpes Simplex-Type 1 Infection Complicated by Hemophagocytic Lymphohistiocytosis and Acute Liver Failure. *Tohoku J Exp Med* 214: 1-5, 2008 査読有
- 10) Funahashi Y, Kimura H (6人中4番目). Conversion From Mycophenolate Mofetil to Mizoribine for Patients With Positive Polyomavirus Type BK in Urine. *Transplant Proc* 40: 2268-70, 2008 査読有
- 11) Nagao T, Kimura H (9人中3番目). Prognostic Factors in Influenza-Associated Encephalopathy. *Pediat Infect Dis J* 27:384-9, 2008 査読有
- 12) Ohshima K, Kimura H, (8人中2番目). Proposed categorization of pathological states of EBV-associated T/natural killer-cell lymphoproliferative disorder (LPD) in children and young adults: Overlap with chronic active EBV infection and infantile fulminant EBV T-LPD. *Pathol Int* 58: 209-217, 2008 査読有
- 13) Kimura H, Nishiyama Y. Measles Outbreak in Adolescent. *JMA Journal* 50:412-3, 2007. 査読無
- 14) Wada K, Kimura H (13人中13番目). Simultaneous quantification of Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and human herpesvirus 6 DNA in samples from transplant recipients by multiplex real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 45:1426-32, 2007. 査読有
- 15) Hatta K, Kimura H (8人中4番目). Association of transforming growth factor- β 1 gene polymorphism in the development of Epstein-Barr virus-related hematologic diseases. *Haematologica* 92:1470-4, 2007. 査読有
- 16) Luo C, Kimura H (6人中5番目). Replication-competent, oncolytic herpes simplex virus type 1 mutants induce a bystander effect following gancyclovir treatment. *J Gene Med* 9:875-83, 2007. 査読有
- 17) Ushijima Y, Kimura H (6人中5番目). Determination and analysis of the DNA sequence of highly attenuated herpes simplex virus type 1 mutant HF10, a potential oncolytic virus. *Microb Infect* 9:142-9, 2007. 査読有
- 18) Tohyama M, Kimura H (10人中4番目). Association of human herpesvirus 6 reactivation with the flaring and severity of drug-induced hypersensitivity syndrome. *Br J Dermatol* 157: 934-40, 2007. 査読有
- 19) Ito Y (9人中1番目). Full-length EBNA1-mRNA-transduced dendritic cells stimulate CTLs recognizing a novel HLA-Cw*0303 and Cw*0304-restricted epitope on EBNA1-expressing cells. *J Gen Virol*, 88:770-80, 2007. 査読有
- 20) Morishima S, Ito Y (13人中8番目). Identification of an HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope from human papillomavirus type-16 E6: The combined effects of bortezomib and interferon-gamma on the presentation of a cryptic epitope. *Int J Cancer*, 120:594-604, 2007. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- 1) 木村 宏、山内洋平、後藤研誠、伊藤嘉規、西山幸廣. Flow cytometry/*in situ* hybridization法を用いたEBV感染リンパ球の新規定量・同定法の確立と臨床応用. 第58回日本ウイルス学会総会、ワークショップ 2008. 10. 28 岡山
- 2) Ito Y, Wada K, Mizoguchi S, Kawada J, Yamauchi Y, Morishima T, Nishiyama Y, Kimura H. Multiplex real-time PCR for the detection of herpes simplex virus, human herpesvirus 6, and human herpesvirus 7. 33rd International Herpesvirus Workshop. 2008. 7. 29 Estoril, Portugal
- 3) 木村 宏、和田かおる、伊藤嘉規、西山幸廣. Multiplex Real-time PCR法によるHSV-1, HHV-6, HHV-7同時検出システムの確立と脳炎・脳症診断への応用. 第55回日本ウイルス学会総会 2007. 10. 22 札幌
- 4) Kimura H et al. Simultaneous quantification of EBV, CMV, and HHV-6 DNA in transplant recipients by multiplex real-time PCR assay. 32nd International Herpesvirus Workshop. 2007. 7. 8 Ashville, USA

〔図書〕(計 1 件)

- 1) Quintanilla-Martinez L, **Kimura H**, Jaffe ES. EBV+ T-cell lymphoma of childhood: *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4th ed, IARC Press, Lyon, p278-80, 2008.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: ウイルス感染細胞の検出・同定法及びキット

発明者: 木村 宏、西山幸廣

権利者: 国立大学法人名古屋大学

種類: 特願

番号: 2008-073384

出願年月日: 2008 年 3 月 21 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 宏 (KIMURA HIROSHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 30303621

(2) 連携研究者

木内 哲也 (KIUCHI TETSUYA)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 40303820

伊藤 嘉規 (ITO YOSHINORI)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 20373491