

総括研究報告書

課題番号：27-2

課題名：「簡便で安価な病原微生物迅速診断法の開発と実践および難治性ウイルス疾患の新規診断法・治療法の開発についての研究」

今留 謙一

(所属施設) 国立成育医療研究センター
(所属・役職) 高度感染症診断部 部長

(研究成果の要約)

本研究班のミッションは①実際の患者に対する多項目迅速ウイルス検査の実施 ②簡便で安価な迅速検査法の開発 ③小児における日和見感染症関連ウイルスに対する診断基準・ガイドラインの作成 ④難治性ウイルス感染症に対する新規診断法と治療法の開発 である。

3年目の本年は①ウイルス迅速診断の実践：ウイルス迅速診断の流れは、(1)定性解析（ウイルスがいるかないかを検査）(2)定量解析（定性で陽性となったものはどれだけの量のウイルスがいるかを検査）である。今年度もこれまで継続してきた多項目ウイルス迅速診断の実践を進めた。解析ウイルスはEBV/HSV1,2/CMV/VZV/HHV-6,7/HBV/JCV/BKV/parvoB19/HHV-8/Adenovirus1~48(網羅)の13ウイルスを日和見感染関連ウイルスセットとして迅速診断の実践をした。これまでのEBV,CMVを中心におこなってきた迅速診断を13ウイルスに拡大し定量解析まで行うことで、どれだけの量のウイルスがいるか（定量解析）まで確定診断した。H27年度解析ウイルス数は7,163件（検査項目24,674項目）である。②ウイルス迅速診断法の開発：EBV,CMVの定量ストリップで実際の検体による修正することで開発/改良と実際の検体を用いた実戦を並行して行い開発時間の短縮を図った。EBV,CMV定量解析は実際の検体での検査を通し、改善点の改良も完了し治験開始に至っている。また、多項目ウイルス同時迅速診断法（マルチ解析）キットを島津製作所から販売し標準化を図り、ジッサイの検体でのデータ収集を完了しカットオフ値の設定を完了した。③造血幹細胞移植の患者、再生不良性貧血に対するATGによる免疫抑制療法後の日和見感染症関連ウイルスの制御を目的に、移植後どのようなウイルスがどの時期に末梢血中に検出されるかについてウイルス量と合わせて前方視的に検討を進めた。④SCID患者は、確定診断時にはすでに重症ウイルス感染を呈する場合が多く、またT細胞が欠損することから抗ウイルス薬の使用によってもウイルス量の低下は難しいとされる。感染のコントロールには造血幹細胞移植による免疫能の再構築が必要であるが、重度の感染は前処置化学療法の実施を困難にする。今回経験したX-SCID患者でも、紹介時にはすでに重症CMV感染症を発症していたため前処置を実施せずに造血幹細胞の投与を行った。T細胞のみの生着で、CMV感染は消失したが、その後再移植が必要となった。SCID患者における早期からのウイルス検査の重要性が認識された。網羅的なウイルス解析システムは短時間に多項目のウイルスを同定し、定量することが可能になり、免疫不全症や移植医療後の患児においてウイルス感染症の早期発見と早期治療介入を可能にするばかりでなく、無駄な抗菌薬使用の抑制と的確な治療の選択を短時間に可能にする。患者予後だけでなく医療費の抑制の点からもその成果は計り知れないと考えている。

1. 研究目的

本研究の目的：本研究の目的と特徴は、患者中

心の感染症医療を実現するために、開発・臨床応用・汎用化を一気に進めることにある。具体

的には、迅速診断によるウイルス診断法の応用、高度医療申請、病原体迅速診断システムの標準化、難治性ウイルス疾患における新規治療法の開発である。高度先駆的及び標準的な予防、診断、治療法の開発の推進に関する研究で、小児期に特有の感染症に関する新規診断法・予防法・治療法の開発を推進することにつながる。ウイルスの迅速診断システムを利用し、患者の厳格な感染症の制御と治療成績向上を目指すことをその目的とする。

2. 研究組織

- 今留謙一 国立成育医療研究センター研究所高度先進医療研究室
 内山 徹 国立成育医療研究センター研究所成育遺伝研究部・病院免疫科
 大隅朋生 国立成育医療研究センター病院小児がんセンター
 清水則夫 国立東京医科歯科大学再生医療センター

3. 研究成果

本年度の研究は、

(1)ウイルス迅速診断の実践:EBV ウイルス定量解析を成育先進医療としてH25年度より本研究班で実践開始している。H29年度も引続き先進医療としてのEBV 定量解析を実施した。

平成 29 年度 ウイルス迅速診断集計 多項目同時ウイルス迅速診断実施件数

	定性解析	定量解析 (ウイルスがどれだけいるかを解析)														計
	多項目同時解析 (マルチプレックス)	EBV	EBV (Liver)	CMV	HHV6	HHV7	HSV-1	HSV-2	BKV	JCV	VZV	ADV	HBV	PVB19	感染細胞同定	
成育 計	346	1470	29	584	202	76	0	0	128	128	0	48	0	0	8	3049

13種類の日和見感染症関連ウイルスを迅速診断
 どのウイルスが存在するかを調べる
 13 x 346 = 4,498ウイルス検査(定性解析)

2,665ウイルス検査(定量解析)

注1 マルチプレックス(網羅的ウイルス定性解析):多項目同時迅速診断(13種類のウイルスを同時解析)
 EBV(EBウイルス)/HSV-1(単純ヘルペス1型)/HSV-2(単純ヘルペス2型)/CMV(サイトメガロウイルス)/VZV(帯状疱疹ウイルス)/
 HHV-6/HHV-7/HHV-8/ HBV(B型肝炎ウイルス)/JCV(ICウイルス)/BKV(BKウイルス)/ParvoB19(パルボウイルス)/
 Adenovirus1~48(網羅)(アデノウイルス) 免疫力が落ちる(移植や免疫不全症)と病気を起こすウイルス

H29年度: 7,163ウイルス解析を実施

昨年よりも2,000件以上の解析数(7,163解析:成育内)を実践した。原因病原体がウイルスであることを迅速に確定診断することにより不必要な抗菌薬使用を防ぎ、医療費削減に貢献した。実際、外部検査会社へ依頼した場合より8千万円近くの検査日の削減と、検査依頼当日に結果が次報告され夜には治療開始可能な体制はお金では変えられない医療の質の向上と治療成績向上につながる。

(2) 難治性 EBV 関連疾患中央診断: 534 件

難治性 EBV 関連疾患に対する中央診断の実施の広報活動を学会、総説などの紙面でおこなった。

②簡便で安価な迅速検査法の開発: 迅速・簡便にそして作業者の習熟度に依存せずにウイルス

量を正確に定量するための新しい検査系「定量ストリップ」(図1)を成育医療で必要とされるすべてのウイルスで確立を進めている。本年はEBV, CMV に関し実際の検体で実用化研究をおこなった。

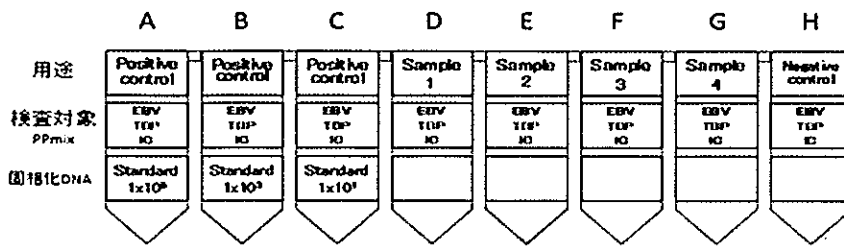


図1(A)：定量ストリップの模式図 (EBV)

EBV 定量ストリップ

定量ストリップとはリアルタイム PCR 用の 8 well ストリップ に検量線を描くための陽性コントロールを添加した well (A~C) とサンプル測定用の well (D~G) と陰性コントロール測定用の well (H) を設定し、EBV-DNA 増幅用のプライマー・プローブをすべての well に添加し、乾燥・固相化したものである。

A B C D E F G H



図1(B)：EBV 定量ストリップ

定量ストリップの技術は汎用性があり、様々な病原体や細胞の DNA あるいは RNA の定量に応用できる。図1(B)は EBV 定量ストリップで、A~C well には EBV と TBP (TATA binding protein: 細胞 DNA の定量用) の 2 つの陽性コントロールがそれぞれ 10⁵ (A), 10³ (B), 10¹ (C) copies/well 添加され、さらに EBV と TBP のプライマー・プローブそしてコンタミネーションによる偽陽性を検知するためのインターナルコントロール (IC) 検出用のプローブが添加・固相化されている (プローブ 3 種類は違った波長の蛍光色素で標識されているため識別可能)。したがって、検査に際して水と酵素を加えて固相化されている試薬を溶解してリアルタイム PCR 操作を行えば、EBV と TBP の 2 つの検量線を描くことができる。D と F は EBV 測定用の well、E と G は TBP 測定用の well で、それぞれ EBV あるいは TBP のプライマー・プローブと IC 検出用のプローブが固相化されており、サンプル (抽出 DNA) と酵素を添加するだけで増幅・検出操作を実施できる。したがって、定量ストリップを使用すれば陽性コントロールの希釈やプライマー・プローブの添加操作を行うことなく、EBV ゲノム量を copies/ μ g DNA として定量することが可能になる Ready-to-Use 試薬である。高濃度の陽性コントロールが添加された well の近傍にサンプル測定用の well が配置

されているために陽性コントロールが混入することによる偽陽性が懸念されるが、偽陽性と真の陽性を区別するため、陽性コントロールには EBV-DNA には存在しない特異的な配列 (IC) を挿入しており、IC 特異プローブにより検出可能なため、偽陽性を即座に検知することが可能である。

(2) EBV 定量ストリップの性能検証

EBV 定量ストリップを作成し、その感度・特異性などの性能検証を行った。

反応条件: 95°C 10 分

95°C 15 秒・60°C 1 分 (45 サイクル)

増幅試薬: Amplitaq Gold DNA polymerase (Lifetechnologies)

解析: 2nd Derivative Maximum 法

性能検証用検体: EBV 陽性細胞株 SNT-8 から抽出した DNA を使用した。

(3) 臨床検体を用いた性能検証

成育医療研究センターで採取した CAEBV 患者 (3 名) の末梢血に含まれる EBV-DNA 量を定量ストリップで測定するとともに、従来法による測定も行って結果を比較した。

③ 免疫不全症児におけるウイルス迅速診断の実践

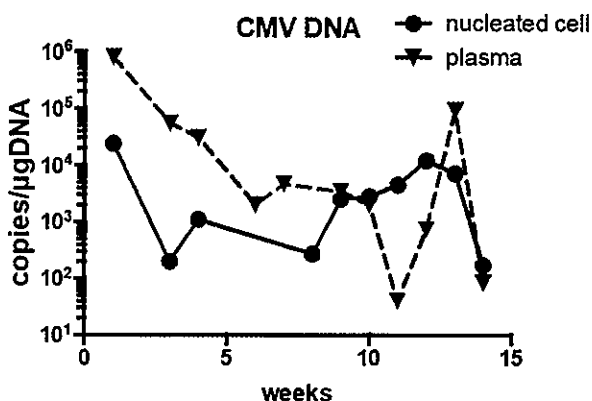
(1) アデノシンデアミナーゼ (ADA) 欠損症患者

当院にて診断・治療を行った 2 名の ADA 欠損症患者に対してウイルスの網羅的および経時的検索を行った。1 例目は 3 か月の女児であり、生後 2 か月時に発熱にて入院治療を受けた。細菌による肺炎を認め、抗生剤の投与にて軽快した。3 か月時にリンパ球減少から再度入院となり、精査の結果、ADA 欠損症と診断された。再入院時より無菌環境下での管理と定期的なウイルス検査 (1 回/週) を行い、PEG-ADA による酵素補充療を開始した。早期のウイルスモニタリングにより、酵素補充によるリンパ球増加を得られるまで重症ウイルス感染を発症せずに管理することができた。

2 例目は 3 か月男児であり、1 例目の母方従弟で

あった。生後1か月より嘔吐を認め、画像検査にて肝臓及び肺の膿瘍を認めた。リンパ球および血清IgG値の減少を認めたことから精査を行い、2か月時にADA欠損症と診断された。確定診断時に、既に血液中に570 copies/μg DNAのCMVを検出したためガンシクロビル(GCV)の投与を開始した。1週間後に113 copies/μg DNAまで低下したところで、酵素補充療法目的に当センターに転院となった。しかし、高度先進医療研究室による検索では、血漿、血球とも非常に高いウイルス量(10^4 - 10^5 copies/μg DNA)を認めたため、GCV抵抗性と判断し、ホスカルネットへの治療に切り替えた。週1回のウイルス解析を継続し、ウイルス量によって治療強度を増減し、CMVの増加を防ぐことが出来た。しかし、酵素補充療法を実施したものの、CMVの根絶は出来ず、10か月時に多臓器不全にて永眠された(図1)。

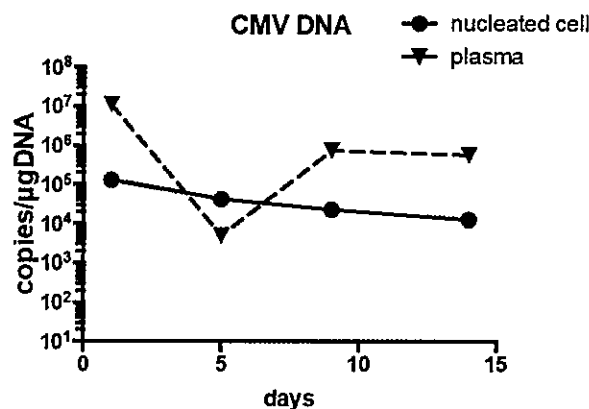
図1. Pt2 (ADA-SCID) におけるCMVの推移



(2) X連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) :

血球食食症候群を疑われ当センターに入院となった1か月男児に対してフローサイトメトリーによる免疫解析を行ったところT細胞欠損が認められ、遺伝子解析によりX-SCIDと診断した。同時にウイルス解析を行ったところCMVが高値を示したためGCVによる治療を開始した。徐々にCMVが増加したためホスカルネットを併用したところウイルス量の上昇は止まった。しかし、CMVの減少は期待できず、緊急の移植適応と考え、HLA一座不一致の父親からの造血幹細胞移植を行った。CMVの存在から前処置を行わずに父親の末梢血幹細胞を輸注したところ、T細胞の生着を認め移植後2か月目でCMVが消失した。

図2. X-SCIDにおけるCMVの推移



(3) 胸腺低形成：胸腺低形成による複合免疫不全を呈するCHARGE症候群の1歳男児に対して、発熱時のウイルス検索を継続している。根治的治療が無く、ウイルス感染の早期発見・治療が極めて重要であり、今後も定期的なウイルス検索が必要であると考えられる。

4. 研究内容の倫理面への配慮

本研究の病原体迅速診断における検体採取の際には、患者、または保護者から同意書を得た上で検査を行う。得られたサンプルにおいては、プライバシーの保護には十分配慮をし、成果を公表する場合には患者を同定できるような情報を一切含めず、匿名化を行い個人情報保護を行う。その方法として、患者の情報と検体番号は、患者識別対応表を作ることによって、匿名化され、その対応表は、当院の個人情報管理者によって管理され、他の人がアクセス出来ないようにする。研究終了後の検体は、今後発見される可能性のあるウイルスに対しての検索を行うために、採取されてから10年間、保存されるが、その後に廃棄される。その確認方法として、検査を始めた10年後の6月と12月に、保管されている検体のリストを確認し、10年経過したサンプルを廃棄する。学会、論文発表に際しては患者本人からの承諾を得、さらに氏名は非公開とし、生年月日は非公開で年齢のみを表記し、住所は表記しない。個人情報については、院内の医療情報管理に従い、プライバシーの損害を招かないように配慮する。

ヒト化マウス実験においては使用匹数を必要最小限になるよう工夫し、頻繁に観察することで、死亡することが予測できる場合は死亡するまで待たずに安楽死処置を施し苦痛軽減措置を図る。

<倫理審査委員会において承認された研究課題等>

当研究においては、

“当院におけるウイルス感染症迅速診断の確

立とその臨床応用（367）”

“肝移植後の EB ウイルス関連リンパ増殖性疾患に関する研究（410）”

“EB ウイルス関連疾患の病態解明に関する研究(790)”

として、国立成育医療研究センター倫理委員会にて承認を得た。

事業計画書に記載した研究は随時倫理委員会の承認申請を行う予定である。