

II. 原 著

II. 4 網羅的ウイルス PCR 法を用いた臍帯血移植後ウイルス再活性化の解析

先端医療センター 細胞治療科 永野 誠 治 橋本 尚 子
細胞管理室 小林 利英子 丸山 京子

要 旨

臍帯血移植は、同種造血幹細胞移植の中でも極めて重篤な免疫不全状態が遷延するため、種々のウイルス感染症がその予後に重大な影響を及ぼすとされている。しかし、その移植後ウイルス感染の種類、時期、特徴などに関する詳細な検討はほとんどなされていない。今回我々は臍帯血移植後のウイルス感染症の特徴を検討する目的で、移植前から退院までの間に行われた multiplex RQ-PCR 法を用いたウイルス血症のスクリーニングを用い、後方視的に解析した。

2008年11月から2012年2月に移植を実施され生着が得られた臍帯血移植患者 (CBT) 12名、骨髄移植および末梢血幹細胞移植患者 (BMT / PBSCT) 42名を対象とした。観察期間は移植後60日まで、対象ウイルスはHSV-1, HSV-2, VZV, ParvoB19, HHV-6, HHV-7, HHV-8, CMV, EBV, BKV, JCV, HBVとした。その結果、BMT / PBSCT例、CBT例それぞれにおいて移植後にウイルス血症陽性化を示した例は、HHV-6: 17名 (41%)、9名 (75%)、CMV: 26名 (66%)、7名 (58%)、BKV: 8名 (19%)、1名 (8%)、またBMT / PBSCT群にのみJCVを6名 (14%)、HHV-7を1名 (2.3%)、EBVを3名 (7.1%) に認めた。CBT例とBMT / PBSCT例のそれぞれでHHV-6再活性化とCMV再活性化の累積発症率を求め比較したところ、HHV-6再活性化が臍帯血移植で有意に認めたのに対し、CMV再活性化に違いは認められなかった。このことから臍帯血移植後早期のウイルス再活性化の特徴として、BMT / PBSCTに比しHHV-6再活性化が有意に増加するが、CMV再活性化はBMT / PBSCT群と差がないことが分かった。[キーワード]

multiplex RQ-PCR、臍帯血移植、ウイルス血症、HHV-6再活性化、CMV再活性化

(神戸市立病院紀要 51: 42 - 46, 2012)

Analysis of characteristics of viral reactivation after cord blood transplantation by comprehensive virus examinations

Seiji Nagano¹⁾, Rieko Kobayashi²⁾, Kyoko Maruyama²⁾, Hisako Hashimoto¹⁾

Department of Cell Therapy, Institute of Biomedical Research and Innovation Hospital¹⁾

Division of Cell Processing Center, Institute of Biomedical Research and Innovation²⁾

Abstract

Viral infection is one of the major complications after allogeneic stem cell transplantation, especially in the case of cord blood transplantation because of extreme immune-suppression. Characteristics of viral infection after CBT are not fully elucidated yet. We retrospectively analyzed the profiles of viral reactivation in the course of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with the comprehensive virus examinations by using polymerase chain reaction (PCR) assays; multiplex RQ-PCR. Peripheral blood samples were collected from each patient before transplantation and then weekly until discharge. We obtained 12 patients with cord blood transplantation (CBT) and 42 patients with bone marrow transplantation or peripheral blood stem cell transplantation (BMT / PBSCT) from November 2008 to February 2012. The observation period was up to day60, and HSV-1, HSV-2, VZV, ParvoB19, HHV-6, HHV-7, HHV-8, CMV, EBV, BKV, JCV, and HBV were examined by multiplex RQ-PCR. Each virus reactivations were defined as the detection of more than 1.0×10^2 copies of viral DNA/ml. As a result, HHV-6 was detected by 9/12 cases (75%) - 17/41 cases (41%); CMV was 7/12 cases (58%) - 26/39 cases (66%); BKV was 1/12 (8%) - 8/42 cases (19%) in BMT / PBSCT group - CBT group respectively. JCV was detected by 6/42 cases (14%); HHV-7 was 1/42 case (2.3%); EBV was 3/42 cases (7.1%) only in BMT / PBSCT group.

Assessing differences in cumulative incidence of reactivation of HHV-6 and CMV with the use of the Cox proportional-hazards method, we revealed that HHV-6 reactivation was significantly more pronounced in the CBT group than in the BMT / PBSCT group, while no differences were observed as for CMV reactivation.

[Keywords]

multiplex RQ-PCR, cord blood transplantation, viremia, HHV-6 reactivation, CMV reactivation

(Kobe City Hosp Bull 51 : 42 - 46, 2012)

はじめに

同種造血幹細胞移植後には、大量化学療法や全身放射線による前処置、免疫抑制剤や移植片対宿主病 (GVHD) の発症により、著しい細胞性および液性免疫の低下をきたす。そのため各種感染症、特にウイルス感染症のリスクは高く、予後に重大な影響を与える。移植後早期のウイルス感染症の感染経路は、人からの感染、血液製剤、移植骨髄液などによる場合もあるが、ほとんどは、自己の体内に潜在している既感染ウイルスの再活性化である。なかでもヘルペス属ウイルスの再活性化が問題となることが多く、様々な臓器機能低下を引き起こし、時に致死的となり、その予防、早期診断、早期治療が必要とされる。中でも近年ドナーソースとして成人領域でも広く用いられるようになった臍帯血は naive な T 細胞が多く、免疫学的に未熟で、骨髄移植 (BMT) や末梢血幹細胞移植 (PBSCT) に比し、免疫不全状態は遷延し、ウイルス感染発症率が高いとされている。しかし、個々のウイルスの再活性化率やその時期などについて広く検討した報告はなく、どのようなウイルスを予防、早期診断すべきであるかについての知見は乏しい。これまでウイルス感染、再活性化の診断については、造血幹細胞移植後早期などの抗体産生がほとんど起こらない状況では、個々のウイルス DNA を PCR で増幅、検出する方法で行われてきたが、煩雑かつ高価 (1 ユーザーあたり数万円) であるため、多種類のウイルス再活性化をモニタリングすることは不可能であった。そこで、当院では、東京医科歯科大学 清水則夫博士が開発した、短時間 (2~4 時間) に少量の血液 (2ml) で多種のウイルス DNA / RNA を同時に検出することができる網羅的ウイルス解析 (Multiplex RQ-PCR assay による定性・定量測定) を導入し、ウイルス血症 (viremia) を感染症に至る前に迅速に診断することが可能となった。今回我々は同種移植後のウイルス血症について、治療介入を目的として定期的にウイルス血症のモニタリングを行った結果を用い、臍帯血移植後ウイルス再活性化の特徴を解析した。

I. 対象

対象は 2008 年 11 月から 2012 年 2 月に当施設で同種幹細胞移植を受けた CBT12 例、BMT / PBSCT42 例を対象とし、治療介入を目的とした網羅的ウイルス PCR の結果を後方視的に分析した。観察期間は day60 までとした。

II. 方法

移植前および day0 以降は週 1 回の頻度で末梢血 2ml を採取し、DNA 抽出キット (Quick gene DNA whole blood kit, KURABO, Japan) により Genomic DNA を抽出し、HSV-1、HSV-2、VZV、ParvoB19、HHV-6、HHV-7、HHV-8、CMV、EBV、BKV、JCV、HBV の 12 種類のウイルスについて各々の特異的 primer を用い、Light Cycler (Roche, Switzerland) によって Multiplex PCR を行い、各ウイルス DNA の定性を行った。陽性となったウイルスについてはさらに、別の特異的部位のプロープ配列を増幅するプライマーを用い Real time PCR により定量を行った。またウイルスの陽性化した群における背景因子について Cox 解析で p 値を求めた。なお解析には StatView version5.0 (SAS Institute Inc.) および STATA 11 (StataCorp) を用いた。

III. 結果

(1) 患者背景

CBT 群 12 例の背景は表 1 のとおり、年齢は 30 歳から 59 歳 (中央値: 50 歳)、全例が血液腫瘍疾患を対象であった。前処置の強度は骨髄破壊的処置 (myeloablative conditioning: MAC) が 6 例、骨髄非破壊的処置 (reduced intensity conditioning: RIC) が 6 例、再移植は 4 例であった。GVHD 予防に全例タクロリムス (FK) および day1, 3, 6 でメトトレキサート (MTX) を使用した。BMT / PBSCT 群 42 例の背景は、年齢が 17 歳から 69 歳 (中央値 46.2 歳)、性別は男女で 19 人 / 23 人、背景疾患は良性疾患 (再生不良性貧

血) 1人のみでその他は血液悪性腫瘍(急性骨髄性白血病19例、急性リンパ性白血病9例、骨髄異形成症候群5例、骨髄増殖性疾患2例、悪性リンパ腫5例、前リンパ球性白血病が1例)であった。BMT / PBSCT群の前処置はMAC 26例、RIC 16例、再移植は3例であった。また血縁間移植は15例でそのうち3例は末梢血幹細胞移植となっていた。血縁BMT / PBSCT群におけるHLA (アレル)一致移植は11例でこれらにはGVHD予防はシクロスポリン(CsA)とday1, 3, 6のMTXを使用し、残りのHLA不一致移植31例にはCBT同様のFK+MTXを用いている。これらよりCBTとBMT / PBSCTの両群間で表2の様に背景因子を比較したが、再移植以外は有意差を認めなかった。

(2) ウイルス再活性化

全ウイルスとも陽性化は 1.0×10^2 copy/ml以上の検出とし、移植後に初めて末梢血でウイルスDNA陽性化したものをウイルス再活性化とした。CBT症例ではday60までに再活性化をきたしたウイルスはHHV-6(9例(75%))、CMV(7例(58%))、BKV(1例(8%))のみであり、その他のウイルスは検出されなかった(表1)。BMT / PBSCT例ではHHV-6 17名(41%)、CMV 6名(66%)、BKV 8名(19%)、JCV 6名(14%)、HHV-7 1名(2.3%)、EBV 3名(7.1%)に認めた。

表1 臍帯血移植患者背景と検出 (1.0×10^2 copy/ml以上の検出を陽性)されたウイルス結果(初回同定の移植後日数XをdXで示す)

年齢性	疾患	移植回数	前処置	HHV6	CMV	BKV
30F	MDS	1	CA+CY+TBI	MAC	d40	
42M	ANKL	1	CA+CY+TBI	MAC	d18	
43F	AML	2	CY+TBI	MAC	d16	
44F	AML	1	CA+CY+TBI	MAC	d18	d32
48M	AML	1	CA+CY+TBI	MAC	d22	
55M	ML	1	Flu+Mel+TBI	RIC	d13	
56M	ML	1	CA+CY+TBI	MAC	d53	d18 d53
56F	AML	1	Flu+Mel+TBI	RIC	d19	
57M	AML	2	Flu+Mel+TBI	RIC	d18	d40
58M	ML	1	Flu+Mel+TBI	RIC	d19	d19
58F	CML	2	FLU+BU	RIC		
59F	AML	2	Flu+Mel+TBI	RIC	d16	d42

MDS: myelodysplastic syndrome, ANKL: aggressive NK-cell leukemia, AML: acute myeloid leukemia, ML: malignant lymphoma, CML: chronic myeloid leukemia, CA: cytarabine, CY: cyclophosphamide, TBI: total body irradiation, MA: myeloablative condition, RI: reduced intensity condition, FK506: tacrolimus, MTX: methotrexate

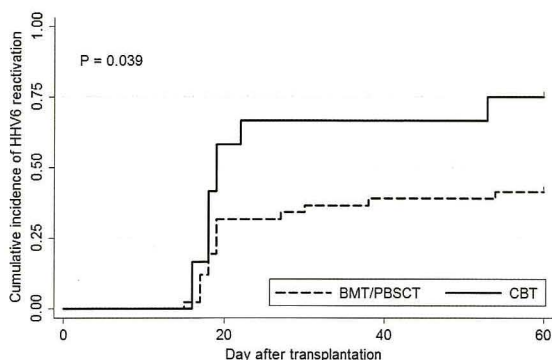
CBT群で検出されたHHV-6とCMVについて、BMT / PBSCTの群との比較を行った。HHV-6およびCMV再活性化の累積発症率をそれぞれ図1(a)および1(b)に示す。CMVでは両者間において累積発症率の差を認めなかったが、HHV-6については、CBT群において累積発症率は有意に高かった。そこで両ウイルス再活性化の危険因子(RF)を解析するためにいくつかの背景因子を抽出し、そのHazard RatioについてCox解析にてp値を求めたところ、HHV-6陽性化のRFはCBTで有意であり($p=0.03$)、MACで多い傾向($p=0.08$)を示した。同様にCox解析での多変量解析の結果はCBTとMACがHHV-6再活性化の有意なRFとなった(各々 $p=0.03$) (表3(a))。一方CMV陽性化のRFについては、CBT群とBMT / PBSCT群で差を認めなかった(表3(b))。

表2 CBT患者及びBMT/PBSCT患者の背景

Characteristic	CBT (n=12)	BMT / PBSCT (n=42)	p value
Age (mean)	50.5	46.2	$p=0.33$
Sex (M / F)	6 / 6	19 / 23	$p=0.77$
Conditioning regimen (MAC / RIC)	6 / 6	26 / 16	$p=0.45$
2nd transplantation	4	3	$p=0.01$

CBT: cord blood transplantation, BMT: bone marrow transplantation, PBSCT: peripheral blood stem cell transplantation

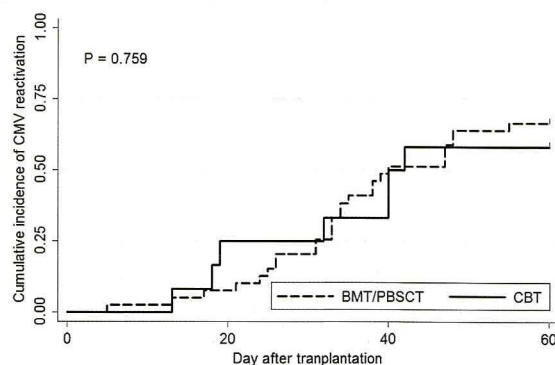
図 1 (a)



(a) HHV6 再活性化を認めた CBT および BM / PBSCT 群の累積発症率

day60 時点での HHV6 陽性患者は CBT と BMT / PBSCT それぞれで 9 名 (75.0%) (95% 信頼区間 : 49.5-93.9) と 17 名 (41.4%) (95% 信頼区間 : 28.1-57.9)

図 1 (b)



(b) CMV 再活性化を認めた CBT および BM/PBSCT 群の累積発症率

day60 時点での CMV 陽性患者は CBT と BMT / PBSCT それぞれで 7 名 (58.3%) (95% 信頼区間 : 33.4-84.7) と 26 名 (66.6%) (95% 信頼区間 : 51.9-80.7)

表 3 (a) 全移植例のうちHHV6再活性化陽性患者 (26名) の背景

	HR	95% CI	p value
Univariate analyses (Cox)			
age>50	0.85	0.39 - 1.85	p=0.68
male	1.30	0.60 - 2.81	p=0.49
MAC	2.12	0.89 - 5.06	p=0.08
2nd SCT	1.54	0.53 - 4.47	p=0.42
CBT	2.35	1.04 - 5.32	p=0.03

	HR	95% CI	p value
Multivariate analysis (Cox)			
MAC	2.80	1.07-7.32	p=0.03
2nd SCT	2.10	0.64-6.87	p=0.21
CBT	2.43	1.06-5.56	p=0.03

上表は Cox 解析で単変量解析の結果、下表は示された 3 変数での多変量解析の結果

HR: hazard ratio, 95%CI: 95% confidence interval

表 3 (b) 全移植例のうちCMV再活性化陽性患者 (33名) の背景および同様にCox解析を用いた単変量・多変量解析の結果

	HR	95% CI	p value
Univariate analyses (Cox)			
age>50	1.31	0.66 - 2.60	p=0.43
male	0.95	0.47 - 1.90	p=0.89
MAC	1.00	0.50 - 2.00	p=0.99
2nd SCT	0.46	0.14 - 1.52	p=0.20
CBT	0.87	0.38 - 2.02	p=0.75

	HR	95% CI	p value
Multivariate analysis (Cox)			
MAC	0.85	0.41-1.74	p=0.66
2nd SCT	0.41	0.11-1.50	p=0.18
CBT	1.11	0.46-2.70	p=0.80

IV. 考察

今回の検討されたウイルスは幼少期より既感染となっていることが多く、移植による免疫機構の破綻により再活性化しウイルス血症を発症すると考えられる。臍帯血に含まれるリンパ球はほとんどがナイーブ T 細胞であり、理論上種々のウイルスを特異的に認識する T 細胞が存在しないことが易感染性の原因であると考えられている。HHV-6 ウイルス再活性化が BMT / PBSCT に比して CBT で高いことは既報と一致するが^{1, 2)}、本例では移植後早期の検討ではあるが、CMV 再活性化には差が見られなかった。なぜ一部のウイルスのみが臍帯血移植において再活性化しやすい

かは不明である。Burning らは胎内感染あるいは生後早期のウイルス感染において、出生早期におけるメモリー T 細胞の出現が CMV 感染では比較的高いのにに対し、HHV-6 感染についてはほとんど出現していないデータを報告しており³⁾、このことが CBT 後に HHV-6 再活性化が多いことと関連するひとつの因子である可能性が考えられた。また、HHV-6 の初感染である乳児の突発性発疹は GVHD と類似の皮疹を伴い、HHV-6 脳炎と IL-6 などの高サイトカイン血症との関連が報告されていること^{4, 5)} などから、HHV-6 再活性化の要因は免疫抑制状態だけではない可能性も考えられた。

今回、その他のウイルス再活性化の頻度など、網羅的に複数のウイルス血症の同定を行ったことでCBT後の免疫状態についてより具体的な知見が得られた。CMV感染については、移植後に定期的にウイルス血症の有無を検討し、臓器障害を伴うウイルス感染症に至る前に治療介入行えば予後を改善させることが報告されている⁶⁾。しかし予後不良の造血幹細胞移植後の早期合併症として知られるHHV-6脳炎を予防する方法は今のところ確立されていない⁶⁾。造血幹細胞移植後のウイルス再活性化の原因が免疫抑制状態にあることは間違いないが、今回の検討からCMV再活性化を引き起こす要因とHHV-6再活性化のそれとは異なる可能性が示唆された。このことはCMVのpre-emptive therapyと同様の考えでは予防効果が得られない^{7, 8)}理由と考えられる。脳炎をはじめとするHHV-6感染症を予防し予後を改善させるためには、今回リスク因子と考えられた臍帯血移植および骨髓破壊的前処置の対象者といったハイリスク患者における予防的投薬方法の検討や、また再活性化の好発時期に焦点をあてた更なるetiologyの究明が必要である。

文 献

- 1) Tomonari A, Takahashi S, Iseki T, et al. Herpes simplex virus infection in adult patients after unrelated cord blood transplantation: a single-institute experience in Japan. *Bone Marrow Transplant* 2004 ; 33 : 317-320.
- 2) Sashihara J, Tanaka-Taya K, Tanaka S, et al. High incidence of human herpesvirus 6 infection with a high viral load in cord blood stem cell transplant recipients. *Blood* 2002 ; 100 : 2005-2011.
- 3) Bruning T, Daiminger A and Enders G. Diagnostic value of CD45RO expression on circulating T lymphocytes of fetuses and newborn infants with pre-, peri- or early post-natal infections. *Clinical & Experimental Immunology* 1997 ; 107 : 306-311.
- 4) Ogata M, Satou T, Kawano R, et al. Correlations of HHV-6 viral load and plasma IL-6 concentration with HHV-6 encephalitis in allogeneic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2009 ; 45 : 129-136.
- 5) Fujita A, Ihira M, Suzuki R, et al. Elevated serum cytokine levels are associated with human herpesvirus 6 reactivation in hematopoietic stem cell transplantation recipients. *Journal of Infection* 2008 ; 57 : 241-248.
- 6) Ljungman P, De La Camara R, Cordonnier C, et al. Management of CMV, HHV-6, HHV-7 and Kaposi-sarcoma herpesvirus (HHV-8) infections in patients with hematological malignancies and after SCT. *Bone Marrow Transplant* 2008 ; 42 : 227-240.
- 7) Ogata M, Satou T, Kawano R, et al. Plasma HHV-6 viral load-guided preemptive therapy against HHV-6 encephalopathy after allogeneic stem cell transplantation: a prospective evaluation. *Bone Marrow Transplant* 2007 ; 41 : 279-285.
- 8) Ishiyama K, Katagiri T, Hoshino T, et al. Preemptive therapy of human herpesvirus-6 encephalitis with foscarnet sodium for high-risk patients after hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2010 ; 46 : 863-869.