

|             |                                                                                                                                                               |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名         | まつ 松 倉 規                                                                                                                                                      |
| 学 位 の 種 類   | 博 士 (医 学)                                                                                                                                                     |
| 学 位 記 番 号   | 医 博 第 2747 号                                                                                                                                                  |
| 学位授与の日付     | 平成 16 年 3 月 23 日                                                                                                                                              |
| 学位授与の要件     | 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当                                                                                                                                       |
| 研究科・専攻      | 医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻                                                                                                                                           |
| 学 位 論 文 題 目 | Significance of serial real-time PCR monitoring of EBV genome load in living donor liver transplantation.<br>(生体肝移植におけるreal-time定量PCR法を用いたEBVゲノム量連続モニタリングの意義) |
| 論文調査委員      | (主 査)<br>教 授 前 川 平 教 授 下 遠 野 邦 忠 教 授 田 中 紘 一                                                                                                                  |

### 論 文 内 容 の 要 旨

生体肝移植後EBウイルス感染症に対する real-time 定量PCR法による連続モニタリングの重要性

#### 背景

生体肝移植後Epstein-Barr ウイルス (EBV) 感染症はPTLD (post-transplantation lymphoproliferative disorder) に進展し重症化することがある。PTLDの発症率は6～13%で死亡率は10～20%である。当科では1990年から1999年の十年間に12例がPTLDを発症し4例が死亡した。これまでEBV感染症の診断は抗体価測定により血清学的に行われてきたが、簡便で迅速な検査法の開発がすすめられてきた。最近, real-time 定量PCR法が報告され, 連続でルーチンの末梢血EBV量のモニタリングが可能となった。本稿では連続モニタリングの重要性を記した。

#### 対象と方法

##### 対象症例

1999年3月から2000年4月までに京大病院で生体肝移植を行ったレシピエントは103例であった。これらの症例でEBV感染症にみられる原因不明の発熱, 上気道炎症状, 下痢, 腹水, 表在リンパ節腫脹を示した症例にEBV量連続モニタリングを行ったところ15例で症状の増悪とともにEBV量の上昇をみとめた。この15例をEBV感染症と考え今回の検討対象とした。EBV量は発症前, 急性期, 回復期の三点を選び検討した。

##### real-time 定量PCR法

末梢血1 mlをEDTA採血しFicoll-Paqueで単核球を分離, QIAamp Blood Kit でDNAを抽出した。EBVゲノムのBALF5領域から生成したプライマーと蛍光プローブを用いてパーキンエルマー社 ABI Prism 7700 自動定量PCR器でEBV DNA量を定量した。DNA量はcopy/ $\mu$ gDNAで表した。

#### 結果

EBV量連続モニタリングを行った15例中, 原因不明の発熱 (5例), 上気道炎症状 (2例), 下痢 (1例), 腹水 (3例), 表在リンパ節腫脹 (2例), PTLD (2例) の各患者のEBV量の最高値の平均は各々36,232, 16,040, 15,968, 2,485, 336,858, 60,486 copy/ $\mu$ gDNAで, 表在リンパ節腫脹とPTLDで高い傾向が見られたが有意差はなかった。治療として免疫抑制剤の減量や中止, 抗ウイルス剤の投与を行い全例で症状の改善に伴ってEBV量は減少した。発症前 (中央値0 copy/ $\mu$ gDNA), 急性期 (中央値7,514 copy/ $\mu$ gDNA), 回復期 (中央値37 copy/ $\mu$ gDNA) のEBV量にはそれぞれ有意差を認めた。なおPTLDの二例は組織病理学的には polyclonal hyperplasia であり, malignant lymphoma ではなく, 免疫抑制剤を中止し抗ウイルス剤を投与することで良好に経過した。

#### 考察

EBV量の連続モニタリングに関してはいくつかの報告が見られるが測定間隔は2から4週間と長い。われわれは個々の量よりも変化が重要と考え, 有症状例では週に1から2回測定してきた。その結果に応じて免疫抑制の程度を変更し抗ウイ

ルス剤投与を行なうことで適切な対応ができた。実際のところ、1990年の生体肝移植開始以来12例のPTLDを経験し4例を失ったがこの方法をはじめてからは死亡例はない。

#### 結論

real-time 定量PCR法によるEBV量の連続モニタリングは生体肝移植後EBV感染症およびPTLDの早期発見早期治療に有用であった。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は生体肝移植におけるEBVゲノム量連続モニタリングがゲノム量変化とEBV感染症状の推移が相関することを示し、その早期診断および治療効果判定を可能にすることを明らかにしたものである。

生体肝移植後EBV感染症は重篤な移植後リンパ増殖性疾患（post-transplantation lymphoproliferative disorder : PTLD）に進展することがあるため早期診断、早期治療が必要である。本申請者はreal-time 定量PCR装置PRISM7700を用いたゲノム量連続定量が簡便、迅速で再現性があることに注目し1999年3月から2000年4月に生体肝移植を行った103例に対しEBVゲノム量定量を行った。EBVゲノム量が増加しEBV感染症と診断した15症例に週1～2回の連続モニタリングを行った。ゲノム量と症状の推移はよく相関し、早期診断および治療効果判定の指標になることが明らかになった。ゲノム量は非EBV感染症では200コピー以下で同様の症状を有する他の感染症では上昇しなかった。PTLDでは $10^4$ コピー以上に著増する事が明らかとなったがそれ以外の症状ではゲノム量にばらつきがみられた。ゲノム量を指標とした治療戦略を立て、臨床応用することでPTLD発症率は減少し、本法導入後PTLDによる死亡例はみとめていない。

以上の研究はEBVゲノム量とEBV感染症との関連を解明し臓器移植後の致死合併症であるPTLDを減少させ、今後の移植医療の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成16年2月19日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格したものである。