

博士論文

The Significance of Viral Infections in Modern-days:
Focusing on Immunocompromised Status and Drug-resistance

(今日におけるウイルス感染症の意義;免疫不全状態および
薬剤耐性に焦点を当てて)

垣 内 五 月

目次

要旨	3
序文	6
第 I 章 造血幹細胞移植後急性期患者における呼吸器ウイルス感染症：パライ ンフルエンザウイルス 3 型の重要性	9
I-1 背景と目的	9
I-2 患者と方法	10
I-2-1 患者	10
I-2-2 標本採取	12
I-2-3 ウイルス学的手法	13
I-2-4 統計学的手法	16
I-3 結果	16
I-3-1 HSCT100 日以内の呼吸器感染症	16
I-3-2 月別 PIV3 分離数、PIV3 分離株の分子系統樹解析	20
I-3-3 PIV3 感染症の臨床的特徴、罹患リスク因子、下気道炎の発症因 子	25
I-4 考察	29
第 II 章 造血幹細胞移植患者における単純ヘルペスウイルス 1 型の再活性化お よびアシクロビル耐性についての検討	36
II-1 背景と目的	36
II-1-1 単純ヘルペスウイルス 1 型とアシクロビル	36
II-1-2 造血幹細胞移植と HSV-1	38
II-2 患者と方法	39
II-2-1 患者・検体	39
II-2-2 使用した細胞、ウイルスおよび抗ウイルス剤	40
II-2-3 標本採取、ウイルス分離・同定	40
II-2-4 プラーク減少法 (plaque reduction assay, PRA)	41
II-2-5 耐性原因遺伝子解析および ex vTK-APA assay による vTK 機能 解析	41
II-2-6 統計学的分析	44

II-3	結果	44
II-3-1	分離 HSV-1 株概要	44
II-3-2	HSV-1 再活性化および ACV 耐性 HSV-1 出現頻度	48
II-3-3	ACV 耐性 HSV-1 出現と移植予後との関連	49
II-4	考察	52
第III章	新生児ヘルペス脳炎を引き起こした単純ヘルペスウイルス 1 型のアシクロビル耐性についての検討	62
III-1	背景と目的	62
III-2	検体	63
III-3	方法と結果	64
III-3-1	CSF 検体における vTK 遺伝子の増幅・塩基配列の決定	64
III-3-2	変異 vTK 発現プラスミドの作成	66
III-3-3	細胞での vTK 発現、発現細胞への TAR 感染、増殖評価	66
III-3-4	ACV 耐性 vTK-Q125H 変異の他薬剤耐性の有無	68
III-4	考察	69
	総括	74
	謝辞	75
	文献	76
	巻末表	95

要旨

今日の医療の中で、免疫不全状態における感染症や薬剤耐性ウイルスによる感染症は重要性を増してきている。第Ⅰ章では造血幹細胞移植治療後急性期の呼吸器ウイルス感染症におけるパラインフルエンザウイルス 3 型の重要性を明らかにし、院内感染予防につながるための知見を得た。第Ⅱ章では造血幹細胞移植治療後における単純ヘルペスウイルス 1 型(HSV-1)の再活性化および薬剤耐性について検討し、薬剤耐性を引き起こす複数の新規遺伝子変異や、臨床因子との関連を見出した。第Ⅲ章では新生児ヘルペス脳炎における HSV-1 の薬剤耐性についての検討を行い、アシクロビル耐性 HSV-1 による新生児ヘルペス脳炎をウイルス学的に初めて証明した。

(略語表)

ACV: acyclovir

ADV: adenovirus

ALL: acute lymphocytic leukemia

AML: acute myelogenous leukemia

BM: bone marrow

BVDU: brivudine

CDV: cidofovir

CPE: cytopathic effect

CR: complete remission

CSF: cerebrospinal fluid

DNA-pol: DNA polymerase

EB-VAHS: Epstein-Barr virus associated hemophagocytotic syndrome

EV: enterovirus

ex vTK-APA assay: expressed vTK-acyclovir phosphorylation activity assay

FOS: foscarnet

GCV: ganciclovir

GVHD: graft versus host disease

HAD: hemadosorption test

HCoV: human coronavirus

HEL: human embryo lung

HL: Hodgkin lymphoma

HMPV: human metapneumovirus

HN: hemagglutinin-neuraminidase

HRV: human rhinovirus

HSCT: hematopoietic stem cell transplantation

HSE: herpes simplex virus encephalitis

HSV: herpes simplex virus

IASR: infectious agent surveillance report

IC₅₀: 50% inhibitory concentration

ICA: immunochromatography assay

IPS: interstitial pneumonia syndrome

LRTI: lower respiratory tract infection

MDS: myelodysplastic syndrome

MM: multiple myeloma

MPCR: multiplex PCR

NHE: neonatal herpes simplex virus encephalitis
NHL: non-Hodgkin lymphoma
PBSC: peripheral blood stem cell
PCV: penciclovir
PFU: plaque forming unit
PIV: parainfluenza virus
PMF: primary myelofibrosis
PRA: plaque reduction assay
RIV: relative inhibition value
RSV: respiratory syncytial virus
SAA: severe aplastic anemia
TMA: thrombotic microangiopathy
URTI: upper respiratory tract infection
VACV: valacyclovir
VC: viral culture
vTK: viral thymidine kinase

序文

近代化以前の人類にとって、感染症は長らく最も重要な死因であった

(1)。18 世紀より実用化され始めた予防接種は発展をつづけ、天然痘の根絶に至り (2)、そのほかにも多種多様の病原体に応用され、人類の健康に大きく寄与している (3)。また、20 世紀の医療において最も画期的な発見の一つであるペニシリンの実用化以降、さまざまな抗微生物化学療法が発達し、一部の感染症の治療が可能となり、文明化に伴う衛生環境および栄養状態の改善とあいまって、長寿化をもたらしている (4)。しかしながら、21 世紀を迎えた人類は、新興 (5)/再興感染症 (6,7)、薬剤耐性病原体による感染症 (8)、免疫不全状態における感染症 (9) など新たな困難に直面している。本研究ではこれらの中で、今後ますますその重要性を増してゆくであろう、免疫不全患者における感染症や薬剤耐性病原体の問題に焦点を当てた。

医原性免疫不全状態の代表的な臨床的状況の一つに、造血幹細胞移植 (hematopoietic stem cell transplantation, HSCT) がある。HSCT は血液悪性腫瘍疾患をはじめとする種々の疾患において標準的治療としての地位を確立し (10,11)、世界的にも広く用いられるようになってきている (12)。HSCT 患者は極度の免疫不全状態に置かれるため感染症が大きな問題となる。このうち、呼吸器ウイルス感染症については多種の病原体が類似した非特異的な症状を引き起こすた

め、網羅的な診断には手間と時間を要するウイルス分離が必要となる (13)。また、同じウイルス感染であっても無症状から最重度の呼吸不全まで多岐にわたる症状が出現する (14)。このことから、その実態の把握のためには、網羅的・包括的な診断法を用い、前向きコホートにより無症候感染者まで含めた研究が必要となるが、そのような研究はこれまで数少ない。そこで第 I 章の主題は、HSCT 急性期患者における呼吸器感染症について網羅的、前方視的かつ症状の有無に関わらず検討することとした。

HSCT 患者では、体内に潜伏感染している病原体の再活性化も大きな問題である (14)。単純ヘルペスウイルス 1 型 (herpes simplex virus type 1、HSV-1) もその一つであり、近年ではアシクロビル (acyclovir、ACV) 耐性 HSV-1 の HSCT 患者における意義への注目も高まりつつある (15)。しかしながら、HSCT 患者における ACV 耐性 HSV-1 の出現状況を前方視的に症状の有無に関わらず全数調査したものはこれまでにない。そこで第 II 章では、HSCT 急性期における HSV-1 の再活性化や ACV 耐性化の状況と予後との関連について検討した。

HSV-1 の ACV 耐性化は一部のウイルス遺伝子機能低下によりもたらされるため、従来では ACV 耐性 HSV-1 の病原性は高くないとされ、中枢神経感染症のような重篤な疾患は起こしにくいと考えられてきた (16)。一方、ACV 治療に十分な反応が見られず耐性ウイルスの存在が疑われたヘルペス脳炎患者の報

告は存在するものの (17)、ヘルペスウイルスによる中枢神経感染症においては脳脊髄液 (cerebrospinal fluid、CSF) から病原ウイルスを分離することは通常不可能なため (18)、これが病原ウイルスの薬剤耐性によるものかどうかを検討することは非常に困難である。また、新生児領域における ACV 耐性 HSV-1 による感染症はほとんど報告がないうえ、新生児ヘルペス脳炎において ACV 耐性 HSV-1 によるものであることがウイルス学的に証明されたものは皆無である。そこで第Ⅲ章においては、分子生物学的手法を用いて、ACV 治療に抵抗性を示した新生児ヘルペス脳炎患者の CSF 中に存在した HSV-1 が ACV 耐性を示すかをウイルス学的に解析し、証明した。

第 I 章 造血幹細胞移植後急性期患者における呼吸器ウイルス感染症：パラインフルエンザウイルス 3 型の重要性

I-1 背景と目的

造血幹細胞移植 (hematopoietic stem cell transplantation, HSCT) は血液悪性腫瘍等疾患の治療として確立され、数多くの患者に福音をもたらしている (10-12)。HSCT 患者は、原疾患による免疫抑制に加え、移植前の化学療法・放射線照射により、細胞性免疫・液性免疫ともに大きく障害される。さらに、移植造血細胞生着後にも、移植片対宿主病 (graft versus host disease、GVHD) の予防・治療に際して免疫抑制剤の使用がしばしば必要となり、患者は細菌感染・真菌感染・原虫感染・サイトメガロウイルス等日和見感染症の危険にさらされる (19)。呼吸器ウイルス感染も免疫不全状態ではより罹患しやすくより重症化しやすいと考えられるため、HSCT 患者では厳格な接触感染予防策がとられているにもかかわらず、外来のみならず入院病棟においても呼吸器ウイルス感染症は流行する。RS ウイルス (respiratory syncytial virus、RSV)・インフルエンザ (influenza virus, Flu)・パラインフルエンザウイルス (parainfluenza virus、PIV)・アデノウイルス (adenovirus、ADV)・ライノウイルス (human rhinovirus、HRV)・ヒトコロナウイルス (human coronavirus、HCoV)・ヒトメタニューモウイルス

(human Metapneumovirus, HMPV) 等の HSCT 病棟における呼吸器ウイルスの流行が報告されている (20-23)。呼吸器ウイルス感染症は、多種のウイルスにより引き起こされ、その症状が同様に非特異であるため病原診断は容易ではない。また、HSCT 患者における呼吸器ウイルス感染は一般に下気道炎に進展しやすく、慢性閉塞性呼吸不全に至る場合もある一方で (20)、無症候性のウイルス排出の報告もある (24,25)。過去のほとんどの研究は症状に基づいた症例シリーズ等の後ろ向き研究であり、前向きコホートを採用したものにおいても、症状の有無に関わらず、前方視的にかつ病原体を広く網羅的に検討されたものは極めて少ない。

第 I 章における研究の目的は、HSCT 患者における移植後急性期における呼吸器ウイルス感染症の実態を明らかにすることである。病原体側からは、いかなるウイルス種が HSCT 患者に呼吸器感染症をおこすか、またどのような経路で感染しているかを明らかにし、流行予防の改善につながる知見を明らかにすることを目的とした。患者側については、発症や重症化への臨床的リスク因子を解析することを目的とした。

I-2 患者と方法

I-2-1 患者

本研究の開始にあたって、虎の門病院血液内科で前向きコホートを設定した。虎の門病院血液内科（東京都港区虎ノ門 2-2-2）では、年間約 150 件の HSCT が実施されている。研究に関わったすべての施設において、倫理委員会の審査を受け承認を得た。対象患者は、2010 年 6 月から 2012 年 5 月まで 24 か月間に HSCT を受けた入院患者で、ヘルシンキ宣言に則った文書による同意が得られ、少なくとも退院または移植後 100 日までの観察が可能であった 252 名の患者である。これらの患者において 275 回の HSCT が実施された。うち 7 例は移植 100 日以内の再移植（生着不全 4 例、再発 3 例）であり、18 例では初回移植より 100 日以降の再発に対する再移植であった。本研究では、同一患者での 100 日以内の再移植については単一の移植、100 日以降の同一患者での再移植は別件の移植とみなしたため、最終的に対象は 268 移植事例となった。患者は原疾患・移植細胞種等により最適化された化学療法および放射線療法レジメンによる前処置ののち移植を受け、生着までは HEPA フィルター装備の個室に陽圧隔離、生着後は大部屋で治療を受けた。化学療法および放射線照射による前処置は疾患種別・状況に応じて骨髄破壊性/非破壊性レジメンのいずれかが選択された。具体的には、ブスルファン 16mg/kg 以上の使用または 8Gy 以上の全身放射線照射を骨髄破壊性レジメンと定義した。骨髄生着日の定義は連続して末梢血好中球数 500/ μ l 以上を達成した 3 日目とした。タクロリムスあるいはシクロスポリン単

独、もしくはこれにミコフェノール酸モチフィルまたは短期メトトレキセートを加えた GVHD 予防が HLA 不適合同種移植に対して行われた。GVHD 重症度は一般的な基準に基づいて分類され、治療された (26)。

I-2-2 標本採取

造血幹細胞移植および検体採取の流れを図式的に示したのが図 I-1 である。

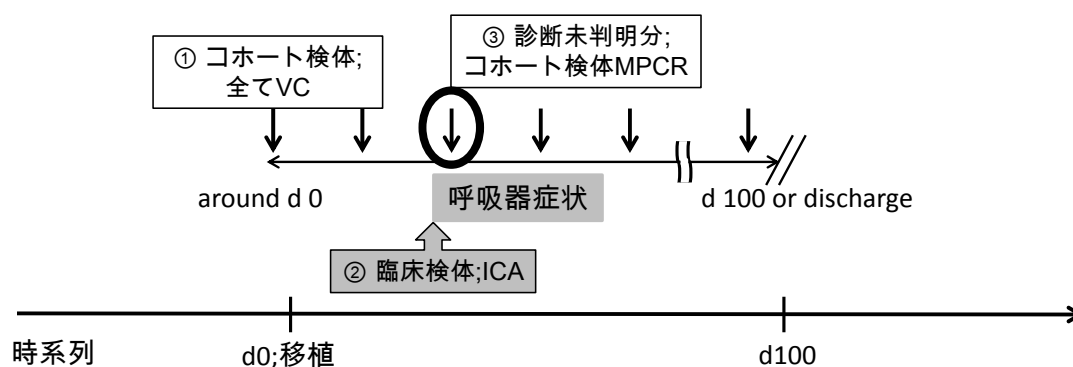


図 I-1 造血幹細胞移植およびサンプル採取のタイムテーブル
 移植日を 0 日と定義し、0 日前後から 100 日または退院までの期間、週一回口咽頭スワブ(コホート検体)を採取し、全検体をウイルス分離(①viral culture, VC)に供した。期間中何らかの呼吸器症状がみられウイルス感染症が疑われた場合、別に呼吸器検体が採取され immunochromatography assay (②ICA) やその他細菌・真菌等についての診断が試みられた。すべての結果判明後①、②いずれでも説明のつかない呼吸器症状に関しては multiplex PCR (③MPCR) 診断が試みられた。③にあたっては、-80°C 保存コホート検体のうちから、呼吸器症状の発症に最も近い時期のものを各患者 1 検体のみ選出して行った。

各患者担当医によって、移植日を第 0 日とし、そこから 100 日後までの期間で週 1 回口咽頭ぬぐい液を症状の有無に関わらず採取した (コホート検体、268

移植事例において 2,747 検体)。全コホート検体が国立病院機構仙台医療センターのウイルスセンターにおいてウイルス分離 (viral culture、VC) に供された。VC に用いられたコホート検体の残りは-80℃で保存し国立感染症研究所に移送、一部は後に示すマルチプレックス PCR (multiplex PCR, MPCR) に使用した。患者が呼吸器症状を発症した際には、これとは独立して臨床検体が採取され、細菌・真菌感染等の検査のほかに、流行状況等に応じて抗原迅速検出キットを用いたウイルス診断が主治医の判断において試みられた。当該期間に使用可能であったのは、免疫クロマトグラフィーアッセイ (immunochromatography assay、ICA) を用いた市販キット (RSV、Flu A/B、ADV) である。患者症状、VC 結果、ICA 結果をレビューし診断 (上気道炎、下気道炎区別、病原体診断) を行い、そこで病原体不明とされた場合には、-80℃保存コホート検体のうち呼吸器症状発症時に最も近いものをピックアップし、MPCR によるウイルス病原体診断が試みられた。MPCR は 268 移植事例中 69 事例が対象となった。

I-2-3 ウイルス学的手法

VC 基本的なウイルス検出法としては網羅性を重視し、gold standard とされる VC を選択した。用いた細胞は Vero、HEL、MDCK、Hep-2、HMV-2、LLC-MK2 の 6 種類である。採取されたコホート検体は同日に 4℃で仙台医療センターウイルスセンターに運搬され、これら細胞に接種された。検体接種細胞

における細胞変性効果（cytopathic effect、CPE）の出現について最大 21 日まで観察された。また、CPE がみられない検体については 7 日目および 14 日目に血液吸着試験（hemadosorption test、HAD）が行われた。CPE または HAD 陽性検体については上清および細胞が回収され、それを用いてエンテロウイルス（enterovirus、EV）や ADV が疑われる場合には抗血清を用いた中和法で、Flu や PIV の同定には抗血清を用いた赤血球凝集阻止法、単純ヘルペスウイルスは直接蛍光抗体法、HRV は酸抵抗性試験法によってウイルス族だけでなく血清型についても同定した。

ICA Flu A/B、ADV、RSV 検出 ICA 市販キットが保険適応でカバーされており、症状・流行状況などから主治医の判断において適切なものが使用された。

MPCR 上記診断手法における偽陰性を可能な限りカバーするため、MPCR を行った。病原体不明とされた呼吸器症状患者検体については、-80℃保存コホート検体残液のうち、呼吸器症状発症に最も近い時期に採取されたものを患者毎に 1 検体ずつ選択した。High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche、Basel、Switzerland) を用いてウイルス核酸抽出し、それをテンプレートとして 1st strand cDNA synthesis kit (TAKARA、Tokyo、Japan) を用いて逆転写・cDNA 合成をした。PCR 反応には 2 種類の MPCR システムを用いた。一つは市販の COSMO[®]

用い、Clustal-X でアライメントしたデータを MEGA ver. 6 により最尤法にて分子系統樹を作成した。比較のため、仙台医療センター小児科外来で同研究期間に分離された PIV3 株を対照として系統樹解析に用いた。

I-2-4 統計学的手法

結果（下記）に示すように診断された呼吸器ウイルスの中では圧倒的に PIV3 が多数であったため、PIV3 感染の罹患群・および非罹患群にわけて、臨床的危険因子を解析した。さらに、より重症と考えられる下気道炎進展の危険因子も解析した。二元的因子の解析に当たっては、Fisher 正確性検定を用い、年齢、生着日数等の連続変数の検討にあたっては Mann-Whitney U 検定を用いた。単変量解析によって P 値が 0.05 未満であった因子については、多変量ステップワイズ解析により独立性を評価した。すべての解析にあたっては、JMP11 (SAS Institute, Cary, NC) が用いられた。

I-3 結果

I-3-1 HSCT100 日以内の呼吸器感染症

268 移植事例の患者背景を表 I-1 に、コホート全体の状況を図 I-2 に示す。

Characteristic	No
Median age, y (range)	53 (16-74)
Sex, male (%)	166 (62%)
Underlying disease	
Acute leukemia	183
Chronic leukemia	16
Myelodysplastic syndrome	20
Non-Hodgkin lymphoma	31
Hodgkin lymphoma	6
Multiple myeloma	3
Primary myelofibrosis	2
Severe aplastic anemia	6
EB-VAHS	1
Disease risk	
High	188
Intermediate	56
Low	24
Donor type	
Cord blood	187
Related PBSC	19
Related PBSC (haplo)	3
Related BM	4
Unrelated BM	47
Auto PBSC	7
Myeloablative conditioning	188
Engraftment	232
Median days to engraftment (range)	19 (9-62)
GVHD > or = grade2	152
Use of steroids	178
Use of biological drugs	49
Death until d100	89

表 I -1 268 移植における患者背景
 高リスクの血液悪性腫瘍が大半を占め、臍帯血移植の比率が高かった。
 EB-VAHS: Epstein-Barr virus associated hemophagocytotic syndrome, PBSC:
 peripheral blood stem cell, BM: bone marrow.

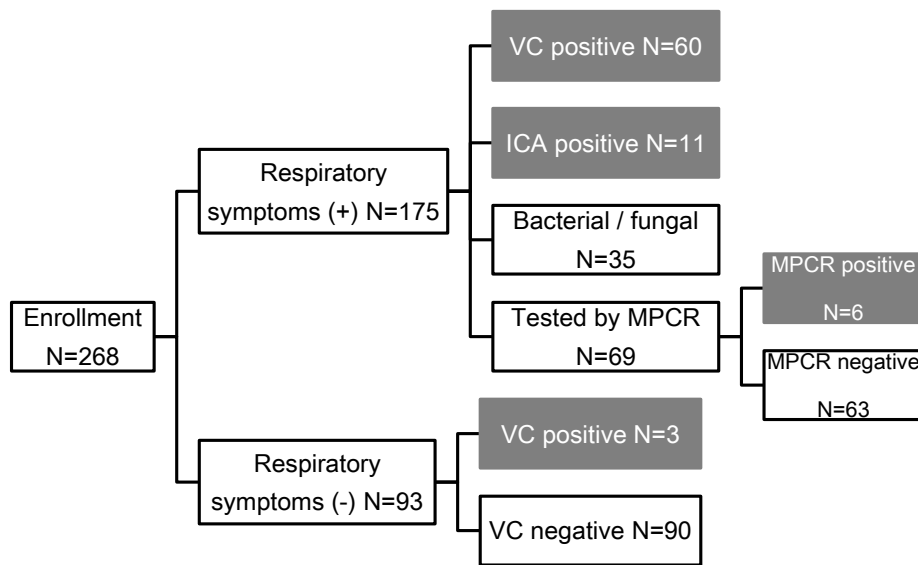


図 I -2 コホート全体の状況

268 移植例のうち、約 2/3 にあたる 175 例で呼吸器症状が 100 日までに出現し、うち 77 例で呼吸器ウイルス感染症と診断された。残り 93 例では呼吸器症状がみられなかったが、この中の 3 例で VC 陽性により無症候性呼吸器ウイルス感染症が見出された。合計 80 例の呼吸器ウイルス感染症が診断された。

268 移植のうち 175 例で移植 100 日以内に呼吸器症状が現れた。このうち、77 例で呼吸器ウイルス感染症と診断され、35 例で細菌性/真菌性と診断された。残りの 63 例ではいかなる病原体も検出されなかった。一方、何ら呼吸器症状を示さなかった 93 例のうち、3 例でウイルス分離陽性があり、無症候性呼吸器ウイルス感染症と考えられた。結果として、合計 80 例の呼吸器ウイルス感染症が診断された。表 I -2 と図 I -3 に各ウイルス別の詳細な病原診断を示す。

		PIV 1	PIV 2	PIV 3	RSV	RSV+ ADV	ADV	Flu A	EV	Total
Methods	VC	2	4	51	2		1	2	1	63
	MPCR			6						6
	ICA				9	1		1		11
Diagnosis	LRTI	1	3	34	8	1	1	1	0	49
	URTI	0	1	21	3	0		2	1	28
	Asymptomatic	1	0	2	0	0		0	0	3
cases		2	4	57	11	1	1	3	1	80

表 I -2 ウイルス種別・診断分類の内訳

PIV3 が 57 例と最も多く、RSV が 11 例と続いた。その他のウイルスは数が少なかった。診断分類としては、呼吸器ウイルス感染症のうち、下気道炎が全体の 6 割を占めた。LRTI: lower respiratory tract infection, URTI: upper respiratory tract infection

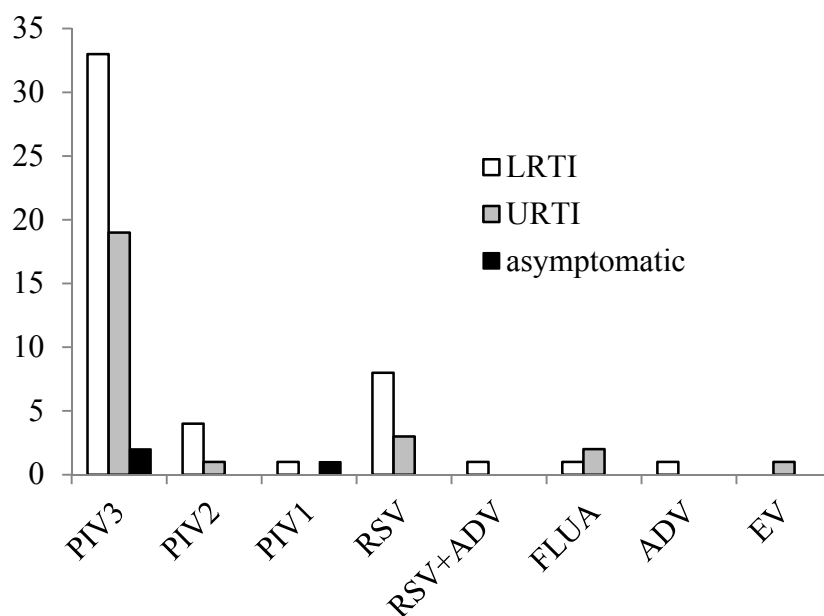


図 I -3 ウイルス毎の臨床診断
無症候性感染は PIV にのみ認められた。

80 例中 63 例で VC により呼吸器ウイルス感染症が診断された。内訳は、PIV3 が 51 例、PIV2 が 4 例、Flu A が 2 例、RSV が 2 例、PIV1 が 2 例、ADV が 1 例、EV が 1 例であった。ICA によって 11 例の呼吸器感染症が診断された（RSV が 9 例、RSV と ADV 混合感染が 1 例、Flu A が 1 例）。MPCR は 69 例に施行され、6 例で PIV3 陽性であった。呼吸器ウイルス感染陽性患者の 61% (80 例中 49 例) が下気道炎 (lower respiratory tract infection、LRTI) と診断され、重症度の高さが示された一方で、PIV3 で 2 例、PIV1 で 1 例は症状を呈さなかった (いわゆる無症候性感染)。

I-3-2 月別 PIV3 分離数、PIV3 分離株の分子系統樹解析

PIV3 が高い割合で検出されたため、PIV3 に焦点をあてて解析を行った。

図 I-4 は月別のコホート検体における PIV3 分離数である。市中での流行状況との関連を示すため、国立感染症研究所により、各地方衛生研究所からの検出数をまとめオンライン <http://www.nih.go.jp> に掲示される IASR (Infectious Agent Surveillance Report) と同一グラフにプロットした。

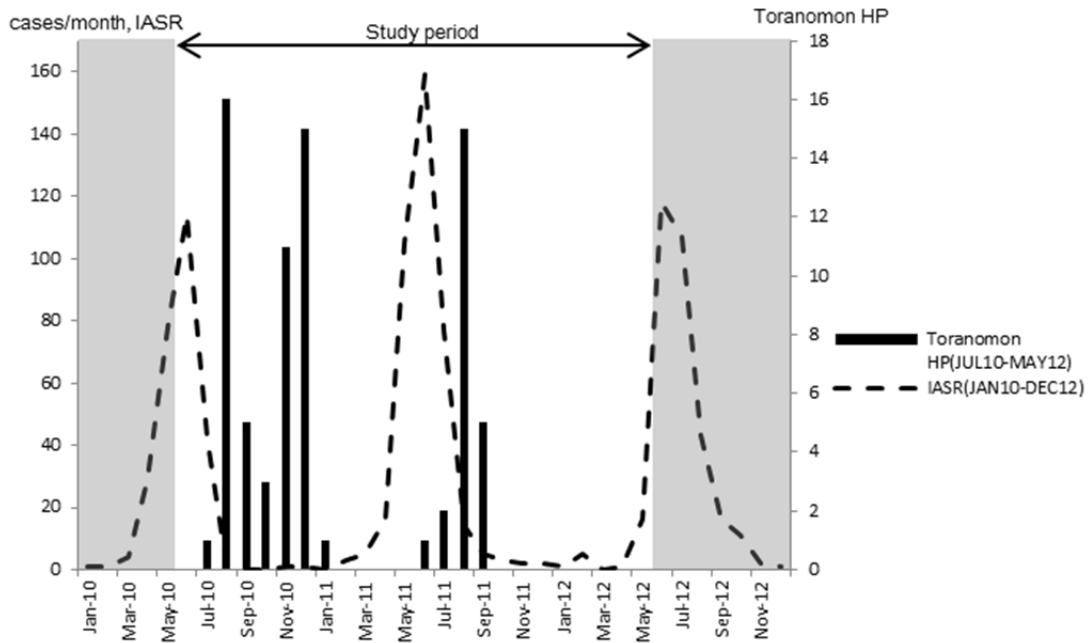


図 I-4 PIV3 月別検出数

コホート検体での分離件数を棒グラフで、IASR の件数を破線の折れ線で示した。兩年とも市中に 2 か月遅れて院内ではピークが見られた。特に、1 年目の院内分布は二峰性のピークを示し、後半のピーク時期には市中での検出はほとんどなかった。

コホート検体での PIV3 分離はどちらの年度においても IASR 報告より 2 か月遅れでピークを迎えた。特に興味深いのは 1 年目の月別分布で、コホート内での分離は IASR に代表される市中からの報告のほとんどない冬場にまで続き、二峰性のピークを示した。そこでさらにこの初年度の月別分布に着目し、PIV3 分離患者 34 名の入院状況・呼吸器症状・ウイルス分離状況を示したのが図 I-5 である。

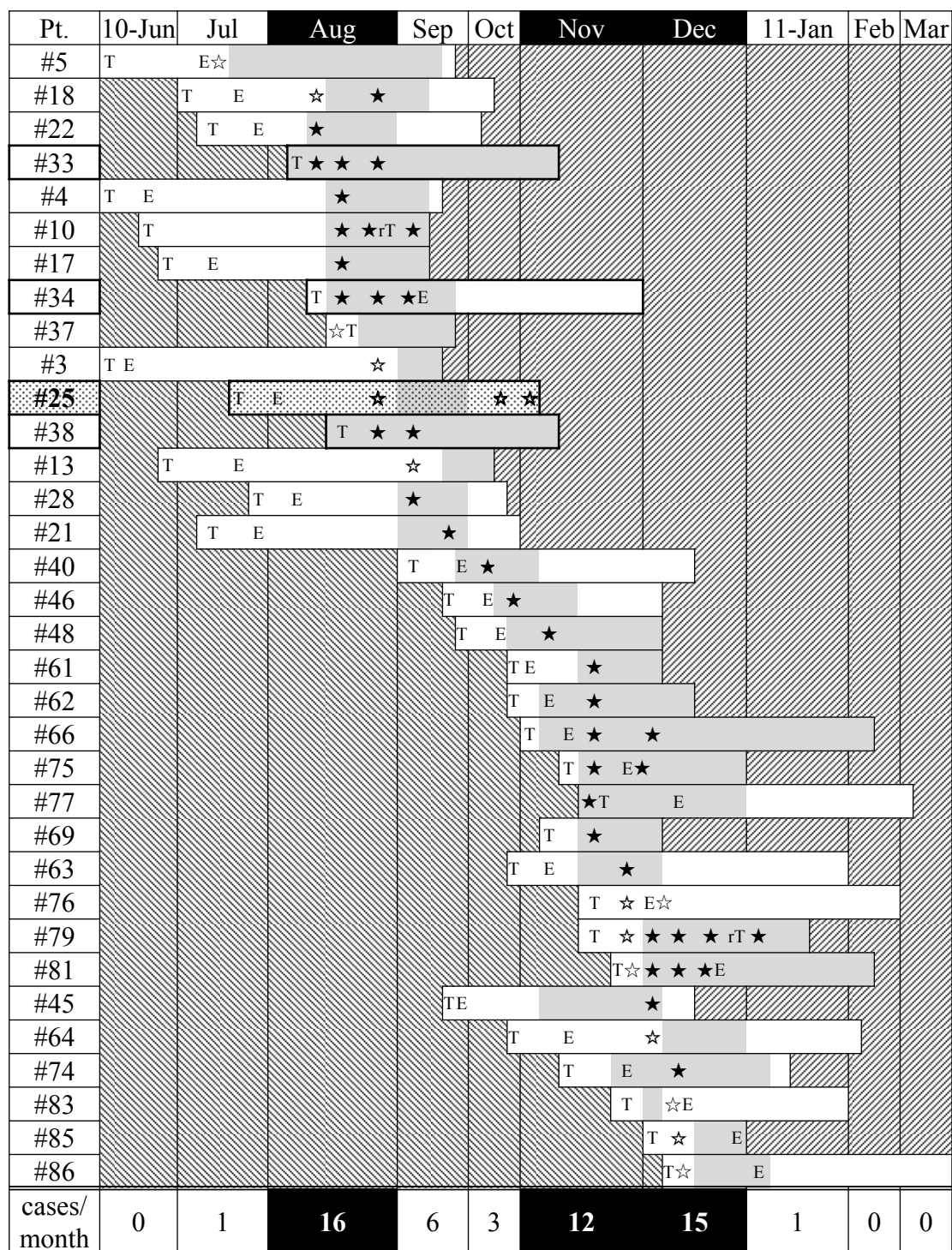



図 I -5 PIV3 感染患者の入院状況・ウイルス排泄状況・呼吸器症状
T; transplantation、rT; re-transplantation、E; engraftment、☆ ; PIV3 分離・症状なし、★ : PIV3 分離・症状あり、□ : 症状なしの期間、■ : 症状ありの期間、

: 両ピーク期間を通じて入院かついずれでも無症候性ウイルス排泄（☆）ありの患者（Pt. #25）。症状発現前の PIV3 分離☆がしばしばみられる。

1名の無症候感染患者（#76）を除き、すべての患者で PIV3 感染によると考えられる呼吸器症状が見られていたが、34名中 11名で PIV3 分離は呼吸器症状出現に先行していた。4名の患者（#33, #34, #25, #38）で入院期間が両方のピーク月にまたがっていたが、なかでも患者（#25）は3か月間にわたり PIV3 排泄がみられ、無症候性ウイルス排泄が両方のピーク月にまたがっていた唯一の患者であった。このような長期無症候性ウイルス排泄が原因となって院内流行が比較的長期にわたり持続した可能性が示唆された。この知見は分子系統樹解析（図 I -6）により裏付けられる。

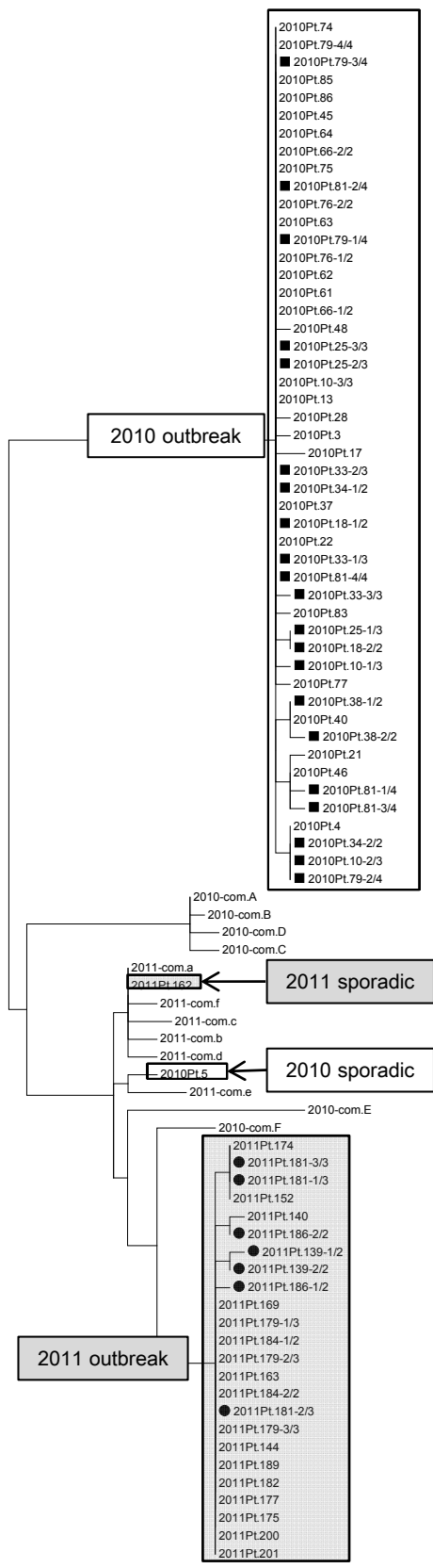


図 I -6 PIV3 分離株の分子系統樹解析

HN 遺伝子前半 881 塩基に基づいて分子系統樹科解析がなされた。外来分離株では多様性に富むのに対し、院内分離株では各年とも 1 株をのぞき、単一の outbreak cluster に収束した。■(2010)、●(2011)で示すように、その中には 1-2 塩基のバリエーションが見られた。

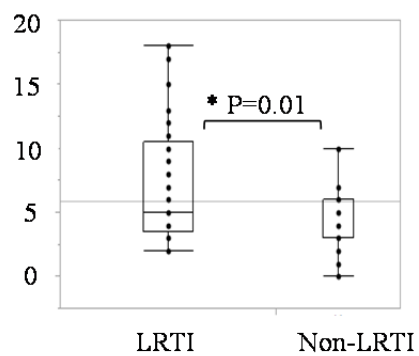
各年度それぞれ 1 株をのぞくすべての分離株は、一つのクラスターにおさまり、同一株の院内流行であることが明らかにされた。各年とも、流行クラスター内において解読された 881 塩基の内、2 塩基までのバリエーションが見られたが、2010-11 年シーズンでは■で、2011-12 年シーズンでは ●で示したように、同一患者からの分離株同志でもこのようなバリエーションが観察されており、同一株の流行として矛盾しない。患者#25 より分離された株はいずれもこの流行クラスター内のものであり、上記の推論を裏付ける結果であった。これらの解析より、標準感染予防策が徹底されている病棟環境であっても、PIV3 の性質として無症候時ウイルス排泄があることにより、PIV3 が病棟内に侵入すると病棟内患者間でウイルス伝播が起きうることを示唆された。

I -3-3 PIV3 感染症の臨床的特徴、罹患リスク因子、下気道炎の発症因子

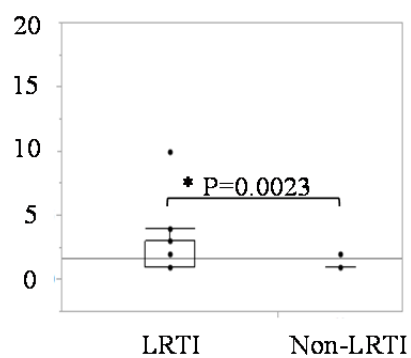
下気道炎とそれ以外に分けて発症後 100 日予後、症状持続期間、ウイルス排泄期間を比較した (図 I -7)。下気道炎 (LRTI) 群では生存率が有意に低く、

症状持続期間・ウイルス排泄期間がいずれも有意に長く、予後および QOL への影響がより大きいことが示された。

A. Duration of respiratory symptoms (weeks)



B. Duration of PIV3 isolation (weeks)



C

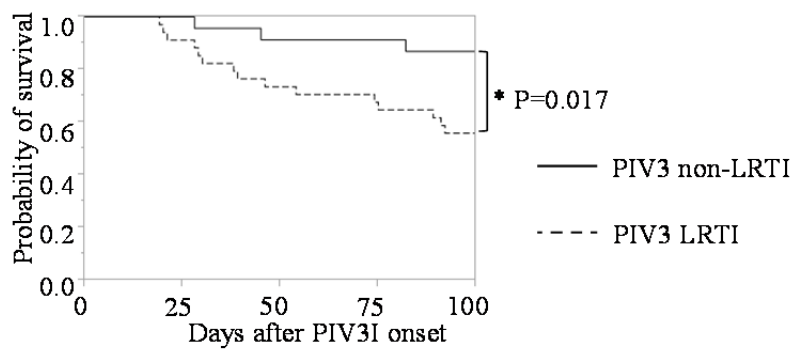


図 I -7 PIV3 感染症の下気道感染とその他での比較

A：症状持続期間 B：ウイルス分離期間 C：感染後の生存率曲線

下気道炎では症状とウイルス分離期間はより長く、感染後の生存率はより低かった。LRTI: lower respiratory tract infection, PIV3I: PIV3 infection

次に PIV3 感染罹患リスク因子を検討した（表 I -3）。骨髓破壊性レジメンによる前処置・臍帯血移植・HLA ミスマッチ移植が単変量・多変量解析双方で有意に危険因子と判明した。

	PIV3I (N=57)	Non-PIV3I (N=211)	P value in univariate analysis	P value in multivariate analysis	Odds ratio (95% CI)
Median age (range)	51 (20-72)	53 (16-74)	0.30		
Disease risk high	44 (77%)	143 (68%)	0.20		
Myeloablative conditioning*	48 (84%)	140 (66%)	0.0089*	0.0089	2.70 (1.26-5.82)
Cord blood transplant*	47 (82%)	140 (66%)	0.022*	0.019	2.38 (1.14-5.00)
Mismatched donor*	50 (88%)	149 (71%)	0.0099*	0.0088	2.97 (1.28-6.92)
Relapse	37 (64%)	135 (64%)	1.0		
Engraftment	51 (89%)	181 (86%)	0.66		
Days to engraftment	19 (11-61, n=51)	19 (9-62, n=181)	0.65		
GVHD > or = grade 2	36/51 (71%)	113/181 (62%)	0.35		
Use of steroids	40 (70%)	135 (64%)	0.63		

表 I -3 PIV3 感染に関わるリスク因子

*は多変量解析も行った因子。骨髄破壊性レジメン、臍帯血移植、ドナーミスマッチはそれぞれ PIV3 感染の独立した危険因子であった。

さらに PIV3 罹患患者の中で、下気道炎発症リスクを解析した（表 I-4）。ここでは PIV3 罹患と関連していた因子の影響はなく、PIV3 罹患のタイミングのみが有意に影響した。すなわち、移植幹細胞生着前に感染すると、有意に下気道炎発症のリスクが高まることが示された。

	LRTI (N=34)	Non-LR TI (N=23)	P value in univariate analysis	P value in multivariate analysis	Odds Ratio (95% CI)
Age, median (range)	54 (20-72)	45 (24-69)	0.20		
Disease risk high	26 (76%)	18 (78%)	1.0		
Myeloablative conditioning	28 (82%)	19 (83%)	1.0		
Mismatched donor	4 (12%)	3 (13%)	1.0		
Cord blood transplant	29 (85%)	18 (78%)	0.50		
Days to engraftment	19 (12-33, n=29)	17 (11-61, n=22)	0.86		
Presence of respiratory co-pathogen*	5 (15%)	0 (0%)	0.054*	0.054	
Infection before engraftment*	23 (67%)	5 (22%)	0.0011*	0.00067	7.52 (2.21-25.6)
aGVHD > or = grade 2	21/29 (72%)	15/22 (68%)	0.77		
Use of steroids	25 (74%)	16 (70%)	0.77		

表 I-4 PIV3 感染患者において下気道炎発症のリスク因子

*は多変量でも解析した因子。移植幹細胞の生着前に感染することのみが独立した下気道炎発症の危険因子であった。

I-4 考察

本前向きコホート調査研究により、2年間にわたる単一施設における HSCT 後 100 日以内の患者における症候性および無症候性両方の呼吸器ウイルス感染症の実態が明らかとなった。PIV3 が HSCT 患者の呼吸器ウイルスの中で大きな割合を占めた。定期的に口咽頭スワブを採取しウイルス分離に供したことにより、HSCT 患者における PIV3 感染症の臨床的・疫学的特徴が明らかにされた。HSCT 患者では無症候性にかつ継続的に PIV3 が排泄される場合があることが明らかにされた。これにより院内感染が起こっている可能性が浮き彫りとなった。また、臨床情報の統計解析により PIV3 感染および重症化の危険群が明らかとなり、これらの結果は HSCT 患者病棟における感染予防の重要性を示し、感染症予防対策に重要な知見を与える。

まず、全体的な疫学的解析により、以下の事項が明らかにされた。呼吸器ウイルス感染症は入院中の移植後 100 日以内 HSCT 患者において、およそ 30%に罹患が認められる。中でも、PIV3 はその 71%を占め、最も頻度の高い病原体であり、2 番目に多かった RSV を大幅に上回った。PIV1、PIV2、FluA、EV、ADV 感染は少数ながら検出されたが、病棟内の感染拡大という事象は認められ

なかった。なお、ウイルス分離は保険適応外であり PIV3 の迅速診断キットは未開発である現状から、従来の診療体制では 80 例のうちのわずか 11 例の呼吸器ウイルス検出に留まっていたものと考えられる。したがって、今回のコホート調査により PIV3 をはじめとする多種の呼吸器ウイルス感染症が HSCT 病棟で発生し、かつ PIV3 による病棟内感染が発生していることが明らかにされた意義は大きい。過去の HSCT 後の同じ時期に着目した調査と比較すると、PIV3 は多いか同等で、他のウイルスは少ないか同等である (23,24,31,32)。本研究でも PIV3 感染に関しては、他のウイルスと比べ予防がより困難であることが示された。また、PIV3 感染症と予後との関連も示されたことから、予防策の検討が急務である。

なぜほかのウイルスとは異なり PIV3 は病棟内感染が拡大したのであろうか。PIV3 は研究期間の 2 年間続いて多くの患者から分離された。市中で最も多く報告される時期に分離され始め、遅れてピークを迎え、特に 1 年目の場合は市中では全く PIV3 が分離されなくなった時期にまで流行が持続した。従来の報告では、市中での流行と平行であると考えられていたが (31)、本研究では時間的なずれが観察された。患者入院状態、ウイルス分離動向、分子系統樹によって解析したところ、流行期に病棟に入り込んだ少数株が病棟内流行を起こした可能性が強く示唆された。本研究では、症状の有無にかかわらず継続的

に標本採取を行ったことにより、無症候ウイルス感染の存在や、ウイルス分離と症状発現のタイミングを観察することができた。無症候性感染・ウイルス排出（とくに症状発症前に多い）という特徴は、PIV 感染患者に認められ、ほかのウイルス感染患者では観察されなかった。さらに一部の患者では無症候性ウイルス排出が長期にわたって認められた。このような長期無症候ウイルス排出患者が病棟内感染増幅源となっていると考えられた。なお、調査二か年目においては流行の持続は遷延しなかったのは、PIV3 を一か月以上の長期にわたって排泄した患者は存在しなかった（データ示さず）ためと考えられた。PIV3 のこういった無症候性排泄の性質は過去にも報告され(24,33-36)、また HSCT 患者における PIV3 の院内流行に関する報告もされている(30,37-42)。今回他のウイルスでは無症候性持続ウイルス排泄事例や群発は認められておらず、この特徴は PIV3 に特にみられやすい現象である可能性がある。PIV3 は免疫健全者では通常軽微な上気道炎にとどまり、特別な治療は必要ない (43)。HSCT 患者では下気道炎となって重症化することもあるために、吸入/内服/静注のリバビリンと免疫グロブリンを組み合わせた治療を重症例に試みた報告もあるが、その効果に対する評価は一定しない (21, 33, 44-46)。また、現時点では有効なワクチンも存在しない。それゆえ、たとえ困難であっても、病棟内感染予防の徹底が最も重要なことであると考えられる。健全者においても無症候性・長期 PIV3 排泄があ

るとされており(43)、患者同士の接触以外の水平感染の可能性も考えられる。現時点で提案できることは、PIV3の流行期である春から夏にかけては、すべての入院患者において、PIV3の排出状態を把握し、患者間の水平感染を阻止することである。この目的のためには、今回用いられた網羅的ウイルス分離検査方法による診断では迅速性に欠け、また費用も高額であることから、迅速・高感度・安価な PIV3 抗原検出システムを開発することが求められる。

呼吸器ウイルス感染症は、通常は軽微な上気道炎にとどまることが多い。ところが HSCT 患者では 60%以上が下気道炎に至ることが示された。この点も過去の報告とおおむね合致する (20)。また PIV3 感染に関して解析したところ、ドナーとの HLA ミスマッチが PIV3 感染リスクを高めることも過去の報告と合致した (31)。GVHD そのものは両群で差がなかったため、予防的な免疫抑制剤使用が発症の有無に影響を与えているのかもしれない。骨髄破壊性レジメンがリスクを高めることも過去の報告 (47)に一致するが、CD4 陽性細胞減少がリスクを高めるとの報告 (48)と合わせて考えると、やはり非骨髄破壊性レジメンの適用により温存された宿主の T 細胞が感染に対しては保護的に働くものと考えられる。臍帯血移植と PIV3 感染の関連について述べられたことはこれまでにないようである。臍帯血は成人骨髄液にくらべ免疫学的に未熟であるため、臍帯血移植患者において HHV-6 脳症 (49)、深在性真菌症 (50)、BK ウイルス膀胱炎

(51)、細菌感染症 (52,53)のリスクが高まることが指摘されているが、本研究でも PIV3 感染に関しても同様のことが示された。しかしながら、他の多くの面における臍帯血移植のメリットは依然として揺るがなく (10,11)、今後も重要な血液幹細胞移植源であることは言うまでもない。つまりこの視点からも PIV3 感染症対策の重要性が示された。

HSCT 患者における呼吸器ウイルス感染による下気道感染症が予後に影響を与え、死亡率を高めることは、過去にいくつも報告されている (33, 36, 54, 55)。今回はこれらの報告による知見に加え、PIV3 による下気道感染では症状がより長く続き、ウイルス排泄期間がより長いことも示され、生命予後のみならず患者 QOL にも影響を与えていることを示した。HSCT 患者における PIV3 感染の下気道炎誘因因子に関する分析では、免疫状態に関わるような他の患者背景には特に差がなく、感染のタイミングのみに有意な関連が認められた。この結果は、骨髄生着前は極めて強い免疫抑制状態にあることが原因であると推測されるが、明確な研究成果として本研究で初めて示された。過去の報告にある PIV3 感染の下気道炎進展リスクは、ステロイドの使用 (33)、好中球減少/リンパ球減少 (47)、小児における APACHE II スコア高値 (56)である。一番目のステロイドについては、今回の検討では差がみられなかった。ステロイド投与状況は患者層の違いや GVHD 予防および治療方針にも左右され、主治医・施設ご

との細かい投与法の差異によっても相違がみられると考えられる。二番目の好中球減少/リンパ球減少についてであるが、骨髄生着前はリスクが高いという今回の結果と一致する。三番目の APACHE II スコアについては本研究では検討できていない。

今回の検討における制限は、単一施設での検討というところにあり、患者背景・施設特有の方針/状況などがバイアスとなってはたらく可能性は否定できない。今回の標本が口咽頭スワブであったという点も、ウイルスによっては鼻咽腔吸スワブ・吸引液・洗浄液などが感度に優れる場合もあるため、結果に影響しうる。また、診断基準の統一も重要である。なぜなら、近年の HSCT 患者での PIV3 の予後に関する報告で、ウイルス検出部位や画像診断を併せて、下気道炎を厳格に‘proven’、‘probable’、‘possible’と下気道炎を分類して、その分類により明確に予後が分かれたという報告もあるからである (55)。コホート全体の中では 63 名の患者において呼吸器症状の存在にも関わらず何ら病原体を指摘できなかった。この点に関して、メタゲノム解析等より近代的な方法を用いれば、分離不可能なウイルス等の病原体の存在を明らかにし、新たな知見を得られる可能性がある。今後の課題の一つである。

第一章の結論としては、HSCT 後の急性期における呼吸器ウイルス感染症は珍しいものではなく、また PIV3 が原因として大きな役割をはたしているこ

とが示された。PIV3 が厳格な標準予防策が取られた入院病棟内でも流行できる理由には、無症候性ウイルス排泄や長期ウイルス排泄があると考えられた。標準予防策に加え、PIV3 感染症に対しては高感度迅速抗原検出システムを構築し、流行期には無症候患者・医療従事者まで含めたスクリーニングを行って流行拡大を予防することが今後の課題である。また、PIV3 感染の危険因子をいくつか挙げることはできたが、HSCT 治療の上では一般的なものであり、特定の危険群を集中的に保護する方法はとりづらい。しかしながら、下気道炎発症因子の最たるものは移植前に感染してしまうことであり、とくに移植超急性期の患者の感染をより一層予防する努力をしなくてはならないことは間違いない。

第Ⅱ章 造血幹細胞移植患者における単純ヘルペスウイルス 1 型の再活性化およびアシクロビル耐性についての検討

Ⅱ-1 背景と目的

Ⅱ-1-1 単純ヘルペスウイルス 1 型とアシクロビル

単純ヘルペスウイルス 1 型 (herpes simplex virus-1, HSV-1) は、 α ヘルペスウイルスに分類される二本鎖 DNA ウイルスであり、10kb 程度のゲノムに 80 以上の遺伝子をコードしている。ヒトにおいてはほとんどの場合幼少期に初感染し、歯肉口内炎を引き起こし、治癒すると終生三叉神経節等に潜伏する。宿主の免疫力低下時には再活性化し、口唇ヘルペスや眼瞼ヘルペスを引き起こす (57)。グアノシンアナログであるアシクロビル (ACV, acyclovir) が抗 HSV 効果を持ち、本邦でも 30 年ほど前から HSV や水痘・帯状疱疹ウイルス感染症に臨床応用されるようになった (16)。ACV の作用機序を図Ⅱ-1 に示す。

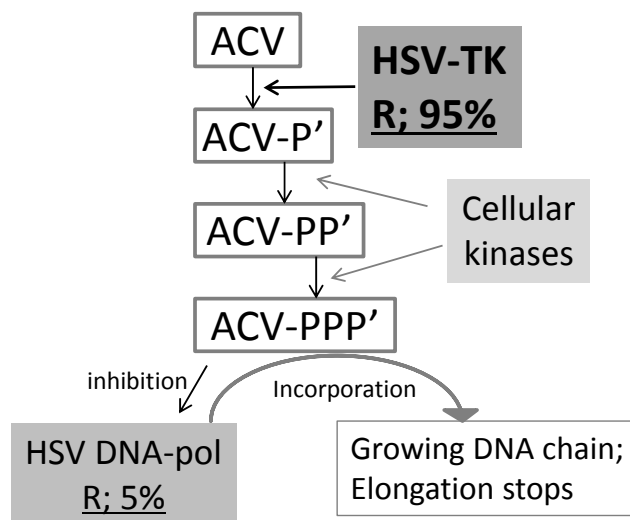


図 II -1 ACV 作用機序および HSV の ACV 耐性機序

ACV: acyclovir, P: phosphate, TK: thymidine kinase, DNA-pol: DNA-polymerase, R: resistance.

HSV にとって必須でない TK の変異による耐性獲得が大半を占める。

ACV は α ヘルペスウイルスがコードするウイルス性チミジンキナーゼ (viral thymidine kinase、vTK) によって第一リン酸化されるが、細胞性のリン酸化酵素ではリン酸化を受けない。それに続くリン酸化は細胞性キナーゼによって受ける。三リン酸化 ACV (ACV-triphosphate, ACV-TP) は、グアノシン三リン酸に拮抗して合成中の DNA 鎖にとりこまれウイルス DNA 伸長が停止することと、また ACV-TP 自体がウイルス性 DNA ポリメラーゼ (DNA polymerase, DNA-pol) を阻害し複製を抑制することによって、抗ウイルス効果を発揮する。HSV の ACV 耐性の原因はこの vTK および DNA-pol 遺伝子の変異のいずれかによって説明される。ウイルス増殖にとって必須ではない vTK の変異が、耐性原因の 95% を占

めると報告されている (16,58)。ACV 耐性 HSV-1 感染症の治療には、vTK によるリン酸化を必要としないため vTK 変異耐性株に効果があると考えられるフォスカルネット (Foscarnet, FOS) が用いられることが多いが、DNA-pol 変異株は FOS に交叉耐性を示す場合が多いという問題がある (59,60)。薬剤耐性判断は、迅速性の観点から遺伝子型によって行うことが望ましいが、vTK・DNA-pol 両遺伝子ともに自然多様性に富んでおり、薬剤耐性関連変異については不明な点も多い (16)。このため臨床耐性株から得られた遺伝子変異情報を集積し、データベース化してゆくことが求められている。

II-1-2 造血幹細胞移植と HSV-1

HSCT に際しては、患者は高度免疫抑制状態にあるため、HSV-1 の再活性化は頻繁で、病変は難治化・慢性化し、時に致死的な経過をとることもある。成人では HSV-1 の抗体陽性率が高いことから HSCT 患者でのユニバーサルな ACV 予防投与が一般化し、その頻度・程度は抑制されるようになった。しかし依然として、特に急性期を中心に患者は粘膜病変に苦しみ、その一部は HSV-1 との関連が示唆される (61-64)。この患者群では ACV 耐性 HSV-1 の分離頻度が高いこともいくつかの調査から報告されている (15,65-69)。しかしながら、過去の報告はいずれも症状が出現した際に分離されたウイルスについての後方視的検討であり、前向きコホートを用いた前方視的研究は存在しない。このため、

HSCT 患者における ACV 耐性 HSV-1 の出現率や意義については不明な部分が残されている。

第 II 章の研究においては、第 I 章で述べた前向き患者コホートをを用いて、HSCT 患者における HSV-1 の再活性化の頻度、ACV 耐性 HSV-1 出現頻度、耐性の原因となったウイルス遺伝子変異、ACV 耐性 HSV-1 の臨床的意義について検討した。

II-2 患者と方法

II-2-1 患者・検体

第 I 章で述べたコホートで採取された 2,747 検体の咽頭ぬぐい液(コホート検体)を用いた。対象患者は、2010 年 6 月から 2012 年 5 月まで 24 か月間に虎の門病院血液内科において HSCT を受けた入院患者で、ヘルシンキ宣言に則った文書による同意が得られ、少なくとも退院または移植後 100 日までの観察が可能であった 268 移植事例である。研究に関わったすべての施設において、倫理委員会の審査を受け承認を得た。移植日を第 0 日として 100 日目あるいは退院までの期間、週 1 回咽頭スワブ検体を採取し、ウイルス分離に供された。移植における一般的な治療方針・定義等はすでに第一章に述べたとおりで、患者背景も表 I-1 に示した。なお、全患者において虎の門病院血液内科における

HSCT時の予防ポリシーにより、抗ヘルペス剤投与の治療的投与を受けている場合を除き、期間中を通してACV予防的投与がなされていた。検体採取は虎の門病院において、ウイルス分離は国立仙台医療センター内ウイルスセンターにおいて、分離ウイルスの解析は国立感染症研究所ウイルス第一部において行った。

II-2-2 使用した細胞、ウイルスおよび抗ウイルス剤

Vero (アフリカミドリザル腎臓由来細胞) および HEL (human embryo lung fibroblast、ヒト胎児肺線維芽細胞) の2種類の細胞がウイルス分離培養に用いられた。293T細胞 (ヒト胎児腎由来) は後述する ex vTK-APA assay (expressed vTK Acyclovir Phosphorylation Activity assay) において、vTKの発現に用いられた。すべての細胞はATCC (American Type Culture Collection、Manassas、VA) より入手した。レファレンス株として、vTK陽性HSV-1 TAS株 (ACV感受性) とvTK陰性HSV-1 TAR株 (ACV耐性) が用いられた(70)。TAR株は後述する ex vTK-APA assay においても使用された。抗ウイルス剤は、ACV、GCV (Wako、Osaka、Japan) およびFOS (Sigma Chemical Company、St. Louis、MO) に対する各分離株の薬剤感受性をプラーク減少法(71)により解析した。

II-2-3 標本採取、ウイルス分離・同定

期間中、口咽頭ぬぐい液2,747検体が採取された。検体は症状の有無にかかわらず、移植日当日を第0日と規定して、100日または退院までの期間を

対象として週一回採取された。採取後 4°Cに保管し、即日国立仙台医療センター内ウイルスセンターに送付、Vero および HEL 細胞に接種、2%胎児ウシ血清添加 Eagle 最小培地で培養された。HSV-1 に特有の CPE が出現した場合、細胞および上清を回収し直接蛍光法を利用した MicroTrak® HSV-1/-2 identification kit (Trinity Biotech、Wicklow、IE) キットにより CPE をきたしたものが HSV-1 であることが確認された (54)。分離されたウイルスは国立感染症研究所に送付され、Vero 細胞で増幅し 2 継代以内に使用した。

II-2-4 プラーク減少法 (plaque reduction assay、PRA)

全 HSV-1 分離株の ACV 感受性は、過去の報告に従い Vero 細胞を用いた PRA によって行った (71)。耐性の基準は従来のものにしたがって、単独株の場合 ACV-IC₅₀ (50% inhibitory concentration) が 2μg/ml 以上とし、同一患者で複数回分離された場合には ACV-IC₅₀ 値の 5 倍以上の上昇を ACV 耐性の出現と定義した (16)。ACV 耐性 HSV-1 については、ガンシクロビル (ganciclovir、GCV) および FOS についても PRA により感受性を調べた。一般的に、FOS-IC₅₀ > 100μg/ml の場合を耐性と考えた (16)が、GCV については基準がないため TAS を標準として GCV-IC₅₀ の 5 倍以上の上昇を耐性と定義した。

II-2-5 耐性原因遺伝子解析および ex vTK-APA assay による vTK 機能解析

ACV 耐性の原因遺伝子解析のために、ACV 耐性 HSV-1 については vTK

遺伝子を解析し、原因変異を同定できない場合はさらに DNA-pol 遺伝子解析を行った。過去の報告に従って分離株から核酸抽出し、各遺伝子を増幅・塩基配列を決定した (70)。用いたプライマー、PCR 条件は巻末表 S II-1 (vTK 遺伝子)、表 S II-2 (DNA-pol 遺伝子) に示す。塩基配列データは Clustal-X によりアライメントし、Genbank 登録の他の HSV-1 株と比較した。フレームシフト以外の vTK 変異については、ACV 耐性変異であるのかどうかを ex vTK-APA assay に行った。この方法は、ウイルスタンパクである vTK を哺乳動物細胞で発現させ、vTK の ACV リン酸化能を間接的に評価する方法である。この組み換え vTK 発現 293T 細胞における、ACV の TAR 株に対する増殖抑制効果を評価し、当該 vTK を発現する HSV-1 の ACV 耐性の有無を判定する(72)。図式的にこの方法を 図 II-2 に示した。

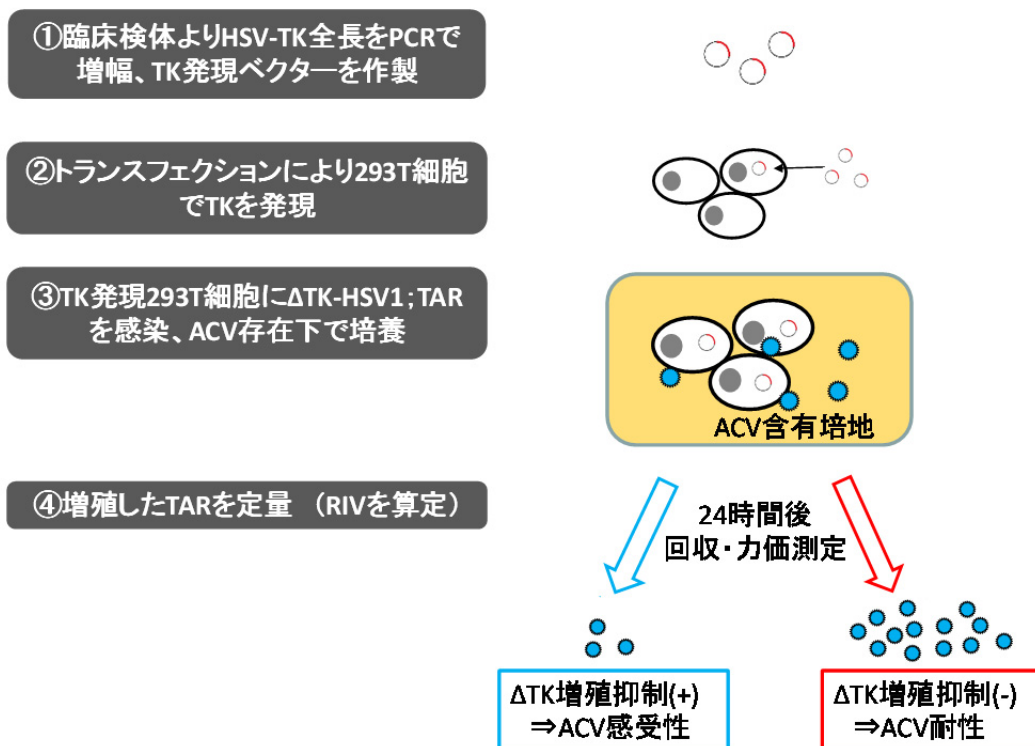


図 II -2 ex vTK-APA assay の図式的説明

vTK に認められた一アミノ酸置換が耐性の責任変異であるかどうかを判定する方法 (Shiota T, et al. Antiviral Research 91: 142-149, 2011 から引用、一部改変)。TAR (TK 欠損 HSV-1 株) は ACV により増殖が抑制されることはないが、細胞により発現された vTK の ACV リン酸化活性が正常であれば抑制され (=感受性)、ACV リン酸化活性低下が認められれば、増殖抑制が軽減~消失する (=耐性)。

まず、① 検討対象である変異を含む vTK 全長を分離株から PCR にて増幅し、発現ベクター pTARGET (Promega, Madison, WI) にクローニングして組み換え vTK 発現プラスミドを作成する。② vTK 発現プラスミドをトランスフェクションし、293T 細胞に組み換え vTK を発現させる。③ 組み換え vTK 発現細胞に vTK 欠損 HSV-1 である TAR 株を感染させ、ACV 存在下 (各濃度 0、0.4、4、40 μ g/ml)

で 24 時間増殖させる。④ 増殖させた細胞を培地ごと回収して TAR の感染力価を測定し、各濃度における ACV の組み換え vTK 発現細胞における TAR の増殖抑制効果を見る。なお、独立した別々の実験間の補正においては、増殖抑制効果は TAS の vTK を発現させ、ACV を 40 μ g/ml で使用した時を-3log として全体を補正した (relative inhibition value、RIV) (72)。

II-2-6 統計学的分析

二元的因子の解析に当たっては、Fisher 正確性検定を用い、年齢、生着日数等の連続変数の検討にあたっては Mann-Whitney U 検定を行った。単変量解析によって P 値が 0.2 未満であった因子については、多変量ステップワイズ解析により独立性を評価した。また、移植後 100 日以内の死亡に関連する因子の検討には、多変量ロジスティック解析を行った。すべての解析にあたっては、JMP11 (SAS Institute、Cary、NC) を利用した。

II-3 結果

II-3-1 分離 HSV-1 株概要

268 名 2,747 検体中、39 名 103 検体から HSV-1 が検出された。全 103 分離株に対する ACV-IC₅₀ 値を表 II-1 に示す。

Pt	Strain	IC50	Pt	Strain	IC50	Pt	Strain	IC50	Pt	Strain	IC50	
	2/14	0.21	90	90/46	<0.1		166/5	0.28		221/5	1.4	
	2/21	0.19				166	166/12	1.1		221/12	1.7	
2	2/28	0.17	109	109/49	<0.1		166/19	0.13		221/19	1.8	
	2/35	10		109/56	<0.1		166/26	<0.1	221	221/26	1	
	2/42	8.2	115	115/6	<0.1		179/12	<0.1		221/33	1.3	
8	8/60	0.8		115/13	<0.1		179/19	0.58		221/47	1.7	
				116/-1	6.7	179	179/26	0.22		221/54	1.9	
12	12/59	0.7		116/6	7.2		180/20	0.17		221/61	1.6	
	17/18	<0.1		116/13	5.9	180	180/27	0.16		227/13	0.17	
	17/25	0.1		116/20	5.4		185/56	0.22		227/20	1.3	
	17/32	0.12	116	116/41	6.4	185	185/63	0.22	227	227/27	1.3	
17	17/39	0.54		116/48	6.1		185/72	1.7		227/34	1.5	
	17/46	0.56		116/56	7.4		190/6	<0.1		227/83	1.2	
	17/53	0.54		116/63	6.7	190	191/18	<0.1		227/90	1.7	
	23/14	<0.1	118	118/-3	3.8	191	191/25	0.13		229	229/36	<0.1
	23/21	0.68		118/4	2.0		200/19	<0.1		250	250/-2	<0.1
23	23/28	0.37	124	124/81	<0.1		200/26	<0.1		264/6	0.22	
	23/42	1.3	134	134/48	0.23		200/40	0.32		264/13	0.18	
				136/55	<0.1	200	200/47	0.13		264/20	0.13	
	37/20	<0.1	136	136/62	5.6		204/12	0.10	264	264/27	0.16	
	37/27	<0.1					206/18	<0.1		264/48	0.9	
	63/8	0.19	148	148/53	0.14		206/25	17		264/55	1.1	
	63/15	0.64	152	152/14	0.10	206	206/32	7.3		264/62	0.79	
	63/43	<0.1		153/21	<0.1					265/13	0.24	
71	71/7	<0.1	153	153/28	<0.1					265/20	0.18	
	77/5	<0.1		158/12	0.14					273	273/15	<0.1
	79/11	<0.1	158	158/26	0.37							
	79/18	<0.1		164/6	<0.1							
79	79/25	<0.1	164	164/20	0.12							

表 II-1 分離 HSV-1 全株の ACV に対する IC₅₀ 値

一人の患者から HSV-1 が一度だけ分離された場合は ACV-IC₅₀>2μg/ml を耐性、同一患者から複数回分離された場合には 5 倍以上 ACV-IC₅₀ が上昇した場合に耐性と判断し、遺伝子塩基配列等の解析に供した。

太文字で示した 11 名の患者における 35 株が ACV 耐性と判断された。ACV 耐性 HSV-1 が出現した 11 名の患者より分離された 52 株の HSV-1 の遺伝子型および表現型を表 II-2 に示した。

Patient	strain	IC50 (µg/ml)			Non-synonymous mutations	
		ACV	GCV	FOS	TK gene	DNA pol gene
#2	2/14	0.21			-	n.d.
	2/21	0.19			-	n.d.
	2/28	0.17	0.067	28	-	n.d.
	2/35	10	8.5	23	G del. Nts615-9	n.d.
	2/42	8.2			G del. Nts615-9	n.d.
#23	23/14	<0.1	0.023	25	-	<i>L216I</i>
	23/21	0.68	0.024	112	-	<i>L216I, I890M</i>
	23/28	0.37			-	<i>L216I</i>
	23/42	1.3	0.019	137	-	<i>L216I, I890M</i>
	116/-1	6.7			C del. Nts1061-4	n.d.
#116	116/6	7.2			C del. Nts1061-4	n.d.
	116/13	5.9			C del. Nts1061-4	n.d.
	116/20	5.4			C del. Nts1061-4	n.d.
	116/41	6.4	5.5	75	C del. Nts1061-4	n.d.
	116/48	6.1			C del. Nts1061-4	n.d.
	116/56	7.4			C del. Nts1061-4	n.d.
	116/63	6.7			C del. Nts1061-4	n.d.
	118/-3	3.6	0.49	55	L327R	<i>L216I</i>
#118	118/4	2			L327R	<i>L216I</i>
	136/55	<0.1	0.063	16	-	n.d.
#136	136/62	5.6	3	18	Q342st	n.d.
	166/5	0.28	0.014	41	-	<i>R700G, A748V, K908Q</i>
#166	166/12	1.1	0.016	115	-	<i>R700G, A605V, A748V, K908Q</i>
	166/19	0.13			-	<i>R700G, A748V, K908Q</i>
	166/26	<0.1			-	<i>R700G, A748V, K908Q</i>
#185	185/56	0.22			<i>G279D</i>	n.d.
	185/63	0.22			<i>G279D</i>	n.d.
	185/70	1.7	1.2	57	G56D, G279D	n.d.
#206	206/18	0.1	0.014	12	-	<i>V278A, A1131T</i>
	206/25	17	4.9	26	G200D	<i>V278A, A1131T</i>
	206/32	7.3	2.3	32	E95st	<i>V278A, A1131T</i>
	221/5	1.4			-	<i>I182V, A605V</i>
#221	221/12	1.7			-	<i>I182V, A605V</i>
	221/19	1.8	0.067	>200	-	<i>I182V, A605V</i>
	221/26	1			-	<i>I182V, A605V</i>
	221/33	1.3			-	<i>I182V, A605V</i>
	221/47	1.7			-	<i>I182V, A605V</i>
	221/54	1.9			-	<i>I182V, A605V</i>
	221/61	1.6			-	<i>I182V, A605V</i>
	227/13	0.17	0.034	44	<i>C6G, L32P, Q89R</i>	<i>D672N, P920S</i>
#227	227/20	1.3	0.035	152	<i>C6G, L32P, Q89R</i>	<i>D672N, S724N, P920S</i>
	227/27	1.3			<i>C6G, L32P, Q89R</i>	<i>D672N, S724N, P920S</i>
	227/34	1.5			<i>C6G, L32P, Q89R</i>	<i>D672N, S724N, P920S</i>
	227/83	1.2			<i>C6G, L32P, Q89R</i>	<i>D672N, S724N, P920S</i>
	227/90	1.7			<i>C6G, L32P, Q89R</i>	<i>D672N, S724N, P920S</i>
#264	264/6	0.22			-	-
	264/13	0.18			-	-
	264/20	0.13			-	-
	264/27	0.16	0.029	28	-	-
	264/48	0.9	0.054	45	-	A719V
	264/55	1.1			-	A719V
	264/62	0.79			-	A719V
Reference strains	TAS	0.36	0.11	33		
	TAR	12	30	27		

表 II -2 ACV 耐性株出現 11 患者における分離株、遺伝子変異、各 genotype の GCV・FOS 感受性
株名太文字；ACV 耐性株、IC₅₀ 値太文字；耐性判定、遺伝子変異太文字；耐性変異(イタリック：自然多様性)
n.d.: not done

患者レベルでの耐性原因の内訳は、vTK 変異によるものは 55% (6/11)、DNA-pol 変異によるものが 45% (5/11) であり、後者の比率が従来報告より高かった。他の抗ウイルス剤への感受性に関しては、vTK 関連 ACV 耐性 HSV-1 は基本的に FOS 感受性・GCV 耐性、DNA-pol 変異株は FOS 耐性・GCV 感受性であった。興味深いことに、患者 #206 では 2 種類の異なる vTK 変異を有する HSV-1 株が別々に分離された。一方、DNA-pol の genotype はこの 3 株で同一であった。このためこの現象は再感染によるものではなく、親株に含まれた quasispecies の中から薬剤圧力によりそれぞれ選択された HSV-1 が分離された結果と考えられた。Genbank 登録データに照らすと、vTK に関しては L327R と G56D、DNA-pol に関しては I890M の、計 3 つの新規 ACV 耐性誘導変異が同定された。この中で、患者#118 は vTK-L327R 変異をもつ ACV 耐性株のみが分離されたため、この変異が耐性を誘導するかどうかは、遺伝子型と表現型との比較で判断することが不可能であった。下記する ex vTK-APA assay による解析結果により、この変異は ACV 耐性を誘導する変異であることが示された (図 II-3)。

ex vTK-APA assay の結果を図 II-3 に示す。上述の L327R (患者 # 118) 変異のほか、すべての vTK ミスセンス変異をここでは検討した。遺伝子型-表現型比較に一致して E95St、G200D (患者 #206)、G56D (患者 #185)、Q342St (患者 #136) 変異は耐性をきたし、G279D (患者 #185) 変異は耐性に関係のない自然

多様性であることが示された。

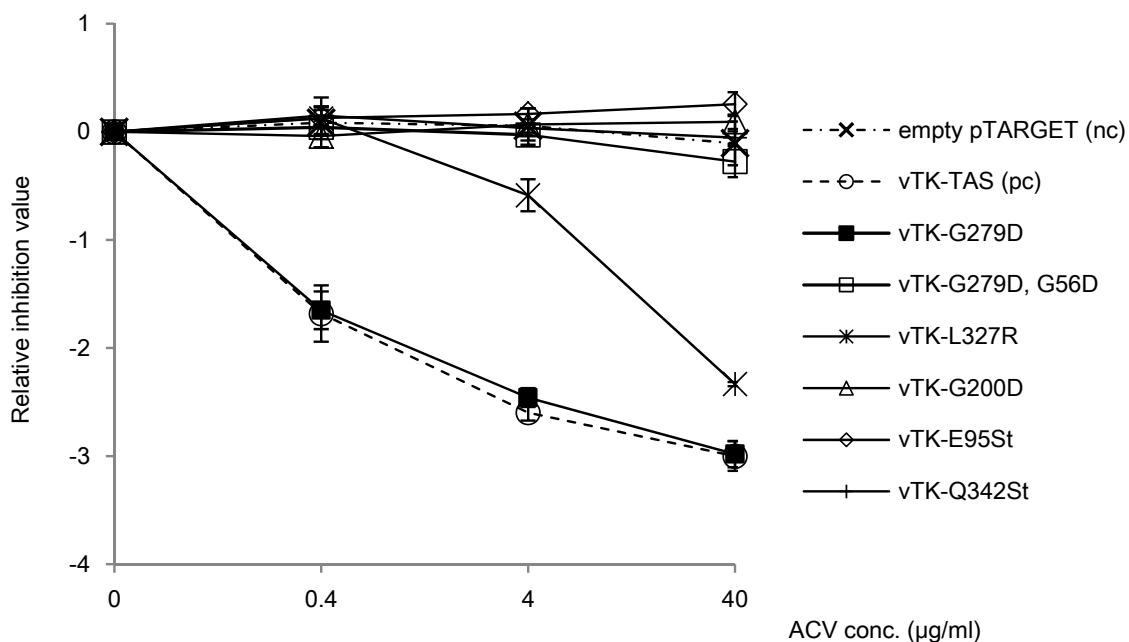


図 II-3 ex vTK-APA assay 結果

vTK 変異 7 種の変異のうち 2 つの frameshift 変異を除く 5 つの 1 アミノ酸置換 (G56D+G279D, L327R, G200D, E95St, Q342St) と、G56D+G279D の感受性親株 (G279D) の 6 種を解析した。G56D/G200D/E95St/Q342St は高度耐性、L327R は軽~中等度耐性、G279D は自然多様性であることが示された。G56D および L327R は新規 ACV 耐性誘導変異であった。

II-3-2 HSV-1 再活性化および ACV 耐性 HSV-1 出現頻度

患者ごとにみると、HSV-1 は 268 名中 39 名で分離され、うち 11 名で ACV 耐性 HSV-1 の出現が認められた。それぞれの群での臨床的特徴を表 II-3 に示す。コホート全体では、移植 100 日以内の死亡は 268 名中 89 名で起こっており、原因は第一に感染、続いて移植関連死、再発が占めた。ACV 耐性 HSV-1 群では高い死亡率の存在が示唆された。

Total N=268	Patients without HSV-1 shedding (N=229)	Patients with ACVs HSV-1 shedding (N=28)	Patients with ACVr HSV-1 shedding (N=11)
Median age, y (range)	52 (16-74)	58.5 (27-73)	60 (23-71)
Sex, male (%)	144 (63%)	14 (50%)	8 (73%)
Underlying disease			
Acute leukemia	153 (68%)	22 (79%)	8 (73%)
Chronic leukemia	14 (6.1%)	2 (7.1%)	
MDS	19 (8.3%)	1 (3.6%)	
NHL	28 (11%)	1 (3.6%)	2 (18%)
HL	5 (2.2%)	1 (3.6%)	
MM	2 (0.9%)	1 (3.6%)	
PMF	1 (0.4%)		1 (9.1%)
SAA	6 (2.6%)		
EB-VAHS	1 (0.4%)		
Disease risk			
High	157 (69%)	22 (79%)	9 (82%)
Intermediate	50 (22%)	5 (18%)	1 (9.1%)
Low	22 (9.6%)	1 (3.6%)	1 (9.1%)
Donor type			
Cord blood	157 (69%)	20 (71%)	10 (91%)
Related PBSC	15 (6.6%)	4 (14%)	
Related PBSC (haplo)	3 (1.3%)		1 (9.1%)
Related BM	4 (1.7%)		
Unrelated BM	43 (19%)	4 (14%)	
Auto PBSC	7 (3.1%)		
Myeloablative conditioning	161 (70%)	22 (79%)	5 (45%)
Engraftment	201 (89%)	23 (82%)	10 (91%)
Median days to engraftment	19 (9-62)	19 (15-30)	20 (15-60)
GVHD > or = grade2	126/198 (64%)	19/23 (83%)	7/10 (70%)
Use of steroids	150 (66%)	19 (68%)	9 (82%)
Use of biological drugs	39 (17%)	6 (21%)	4 (36%)
Death until d100	71 (31%)	11 (39%)	7 (64%)

表 II -3 HSV-1 非分離群・ACV 感受性 HSV-1 分離群・ACV 耐性 HSV-1 分離群それぞれの臨床的特徴。

移植 100 日での死亡が ACV 耐性 HSV-1 分離群でより高い。

MDS: myelodysplastic syndrome, NHL: non Hodgkin lymphoma, HL: Hodgkin lymphoma, MM: multiple myeloma, PMF: primary myelofibrosis, SAA: severe aplastic anemia, EB-VAHS: Epstein-Barr virus associated hemophagocytotic syndrome, PBSC: peripheral blood stem cell, BM: bone marrow, ACVs HSV-1: ACV sensitive HSV-1, ACVr HSV-1: ACV resistant HSV-1.

II -3-3 ACV 耐性 HSV-1 出現と移植予後との関連

表 II -4 には全ての ACV 耐性 HSV-1 陽性患者 11 名の概要を示した。移

植時の状況としては再発悪性腫瘍患者が多く骨髄非破壊性レジメンの使用が多かった。11名全員でACV以外の抗ヘルペス剤の使用がされていた。11名中7名が移植100日以内に死亡しており、短期予後不良との関連が示唆された。しかしながら、死因は4名ではHSV-1以外の感染、3名では治療関連死で、HSV-1による重篤な疾患も見られず再発による死亡もこの中にはなかった。

ID	Age	Sex	Disease / status	Type of conditioning	HSV-related symptoms	Antiviral used	outcome until d100/ cause of death
#2	71	M	AML/ 2nd relapse	myeloablative	anal pain	ACV, FOS, GCV	d65/ IPS
#21	23	F	ALL/ 2nd relapse	myeloablative	stomatitis	ACV, FOS, GCV	d62/ aspiration pneumonia
#116	59	M	AML/ relapse	Non-myeloablative	stomatitis	ACV, FOS	Survival
#118	62	M	AML/ relapse	myeloablative	none	ACV, FOS	d73/ pneumonia (E. faecium)
#136	66	M	PMF	Non-myeloablative	stomatitis	ACV, FOS	Survival
#166	60	M	ALL/ relapse	Non-myeloablative	none	FOS, GCV	d34, pneumonia (E. faecium)
#185	53	F	AML/ CR	myeloablative	stomatitis, genitalis	ACV, FOS	d71/ sepsis (E. faecium)
#206	42	M	NHL/ relapse	Non-myeloablative	stomatitis	ACV, GCV	Survival

#221	63	M	NHL/ refractory	Non-myeloablative	stomatitis	ACV, FOS	d70/ IPS
#227	46	F	AML/ relapse	Non-myeloablative	stomatitis	VACV, FOS, ACV	Survival
#264	63	M	AML/ 2nd relapse	myeloablative	stomatitis	ACV, CDV, VACV, FOS, GCV	d97/ TMA

表 II -4 ACV 耐性 HSV-1 分離患者の特徴

再発悪性腫瘍患者が多く、非骨髄破壊性レジメンが多かったが、再発による死亡はなかった。重篤な HSV-1 による症状はみられず、ACV 以外の抗ウイルス剤の使用が全員でされていた。AML: acute myelogenous leukemia、ALL: acute lymphocytic leukemia、CR: complete remission、VACV: valacyclovir、CDV: cidofovir、IPS: interstitial pneumonia syndrome、TMA: thrombotic microangiopathy

次に ACV 耐性 HSV-1 出現危険因子を検討したところ（表 II -5）、再発悪性腫瘍に対する移植が統計学的に有意差をもって危険因子であった。非骨髄破壊性レジメンの使用もその傾向があったが、有意差には至らなかった。

	Patients without ACVr HSV-1 (N=257)	Patients with ACVr HSV-1 (N=11)	P value in univariate analysis	P value in multivariate analysis
Sex, male (%)	158 (61%)	8 (73%)	0.54	
Age>65	22 (8.6%)	2 (18%)	0.25	
Disease risk high	178 (69%)	9 (82%)	0.51	
Relapsed malignancy	85 (33%)	8 (73%)	0.018*	0.0068
Non-myeloablative conditioning	73 (28%)	6 (55%)	0.088*	0.063

Cord blood transplant	177 (69%)	10 (91%)	0.18*	0.12
HLA matched donor	67 (26%)	1 (9.1%)	0.30	
Engraftment	221 (86%)	10 (91%)	1.0	
Median days to engraftment	19 (9-62)	20 (15-60)	0.30	
GVHD > or = grade2	145/221 (66%)	7/10 (70%)	1.0	
Use of steroids	169 (66%)	9 (82%)	0.34	
Use of biological drugs	45 (18%)	4 (37%)	0.11*	0.11

表 II-5 ACV 耐性 HSV-1 分離のリスク因子
再発悪性腫瘍が基礎疾患としてある場合、ACV 耐性 HSV-1 出現リスクが高かった。

さらに移植 100 日以内の死亡をアウトカムに取り、ACV 耐性 HSV-1 出現と再発悪性腫瘍との関連を多変量回帰分析により検討したところ、ACV 耐性 HSV-1 出現は独立した予後不良規定因子でないことが示された (表 II-6)。

	death within d100 (n=89)	survival (n=179)	P value	
			univariate analysis	multivariate analysis
relapsed malignancy	37 (42%)	56 (31%)	0.096	NS (0.18)
emergence of ACVr HSV-1	7 (7.9%)	4 (2.2%)	0.029	NS (0.06)

表 II-6 予後と各要素の関連
ACVr HSV-1 の出現は、移植 100 日以内の死亡に関連する独立因子ではなかった。
NS: not significant

II-4 考察

ACV が α ヘルペスウイルスの治療に実用化されて約 30 年となるが、

HSV-1 の ACV 耐性率は免疫正常者においてはこの期間を通じて上昇していないとされる (73-79)。これは、vTK 変異は再活性化能に、DNA-pol 変異は増殖能にそれぞれ影響し、変異 HSV-1 は宿主免疫により排除されやすく疾患を起こしにくいためと考えられている (16)。しかしながら、免疫不全患者においては ACV 耐性 HSV-1 による重症感染症が多数報告されており、ACV 耐性率が高いことも知られている (77,79-81)。中でも HSCT 患者は最も耐性化率が高い患者群である (15, 65, 67, 78, 82-85)。しかしながら、過去の調査報告は症状に基づき分離された HSV-1 についての症例シリーズであり、前向きコホートにおいて定期的なサンプリングを行い、HSV-1 感染症や ACV 耐性 HSV-1 感染症を解析した報告はこれまでにない。今回の検討では HSCT 患者における HSV-1 の再活性化の程度、ACV 耐性化率について信頼できるデータを得ることができた。さらに耐性遺伝子原因変異・他薬剤への感受性、ACV 耐性 HSV-1 出現と臨床予後の関連に至るまで幅広い知見を得ることができた。

まず、HSV-1 の再活性化率であるが、ユニバーサルな予防的 ACV 投与下においても、39/268 (15%) 例において HSCT 後 100 日以内に HSV-1 の再活性化が起きることが示された。次に ACV 耐性化は、分離株レベルでは 34% (35/103)、患者レベルでも 28% (11/39) であった。免疫健全者から分離された HSV-1 での耐性率は 1%以下であることを考えると、HSCT 患者では非常に高

い耐性率であることが再確認された。これまでの報告では HSCT 患者から分離された HSV-1 の ACV 耐性率は 4.1~36%とされており (15,65,67,78,82-85)、本研究における ACV 耐性率はこの範囲において高い値である。しかし、HSV-1 陽性患者の 7割では ACV 耐性変異が生じていないにもかかわらず HSV-1 陽性であった。HSV-1 の再活性化の抑制には細胞性免疫が重要とされていて (86)、核酸アナログである ACV の予防効果は補助的なのであろう。すなわち、宿主免疫の低下およびウイルス自体の遺伝子変異による ACV 耐性の両方が HSCT 患者における HSV-1 の出現に関与していることが示された。

続いて ACV 耐性の HSV-1 遺伝子変異については、これまでに報告のない新しい知見が複数得られた。まずは原因変異について、従来 HSV-1 の ACV 耐性原因遺伝子変異は通常 95%が vTK 変異、残りの 5%が DNA-pol 変異とされている。DNA-pol は HSV-1 の増殖に必須の酵素でありその変異は増殖性にも影響を与えるため、低頻度にしか出現しないと考えられている。しかし、今回の検討では DNA-pol 関連耐性ウイルスが 45%と従来の報告よりはるかに高い比率で観察された。この理由は二点考えられる。第一は患者背景によるバイアスである。最重度の免疫抑制状態にある HSCT 患者では、増殖不十分な DNA-pol 変異株であっても再活性化が可能なのかもしれない。第二には今回の検体採取方法および耐性判断方法である。IC₅₀>2μg/ml 以上という耐性基準はプラーク精製さ

れた株における想定であり、臨床分離株は感受性の親株と耐性変異株の mixed population であるため、前者の混入の比率により IC₅₀ は多少低めに算定されてしまう (16)。今回の研究では、検体を連続採取し微妙な IC₅₀ 変化に注目して耐性株をスクリーニングした。これにより、もともとさほど IC₅₀ の高くない DNA-pol 関連 ACV 耐性 HSV-1 をより鋭敏に発見することができたという可能性がある。新規の耐性変異も複数確認された。ここでも連続検体採取により、同一患者から感受性・耐性療法の株が得られた場合には表現型と遺伝子型の比較が有用であった。表現型と遺伝子型の比較が不可能な vTK 遺伝子変異のミスセンス変異については ex vTK-APA assay が耐性原因変異であるかどうかの評価に有用であった。vTK 変異では 6 名の患者において 7 種類の耐性遺伝子型が確認され、G56D と L327R の二つが新規変異であった。塩基挿入/欠失によるフレームシフト変異や停止コドン変異はもれなく耐性原因となるのに対し、これらのような一塩基置換では耐性変異なのか自然多様性であるのかについてのさらなる検討が必要となる。患者 #185 で認められた G56D 変異は表現型と遺伝子型の比較でも耐性原因と判断できるし、また ex vTK-APA assay による機能解析もこのことを裏付けた。vTK の第 56 番アミノ残基は ATP binding site に位置し、G56S/V が耐性を誘導することは既に報告されていることとも一致する (16)。ここで見られた興味深い点は、機能解析と表現型の間に見られた乖離である。ex vTK-APA assay

では図 II-3 に示したように G56D 変異により完全に vTK の ACV リン酸化能は失われるようであるが、それに比べ PRA での IC₅₀ 上昇は比較的軽度であった (表 II-2)。これは分離株 #185/70 中にある程度非変異の親株が quasispecies として存在していることにより説明される。つまり ex vTK-APA assay では純粋に vTK の ACV リン酸化活性を間接的に評価することができ、プラーク精製を経なくとも変異によりもたらされる耐性化の程度をも評価できると考えられた。患者 #118 に見られた L327R 変異に関しては、この遺伝子型の ACV 耐性 HSV-1 しか分離されず、表現型との比較が不可能であった。ここで ex vTK-APA assay による評価が唯一の決め手となり、これが耐性を誘導する変異であることが判明した。このアミノ酸残基は保存領域外であり、L327M 変異は耐性を引き起こさないと報告されている (87)。この違いはアミノ酸の性質の違い (L および M ; 非極性親水性、R ; 極性疎水性) により、vTK タンパク質の高次構造が異なってくることによるものと思われる。患者 #206 においては異なる遺伝子型の耐性株 (G200D を持つ #206/25 と E95st をもつ #206/32) が分離されたことは興味深い。これまでに同様の事例 2 例報告されている。一つは HSCT 患者において比較的短期間に様々な遺伝子型の ACV 耐性 HSV-1 が分離されたという報告 (87)、もう一つは剖検検体の三叉神経節から PCR により各患者で複数の ACV 耐性 vTK バリエーションが増幅されたという報告である (88)。HSCT のような

高度免疫抑制状態に誘導され、もともと個人の三叉神経内に潜伏している HSV-1 の quasispecies 内の ACV 耐性 HSV-1 が薬剤選択圧に応じて再活性化したと推測された。

DNA-pol 変異株にみられた 5 つの遺伝子型のうち、保存領域 I の I890M 変異は今回の検討で見つかった新規変異である。この付近の領域は DNA-pol 活性に重要な部位であるらしく、これまでにこのアミノ酸を除く第 885 から 892 アミノ酸残基すべてでアミノ酸置換による耐性化が報告されている (16)。

DNA-pol 変異では機能解析が困難であるため、ここで認められた自然多様性変異も重要な情報である。各変異を一つ一つ登録しておくことで、将来的には遺伝子型による耐性判定が可能になるものと期待される。L216I (患者 #23 および #118)、R700G、A748V、K908Q (患者 #166)、V278A、A1131T (患者 #206)、I182V (患者 #221) はこれまでに Genbank 上登録されていない変異であったが、HSV-1 の DNA-pol 遺伝子の非耐性自然多様性としてここに明記できる。

表現型で重要な事項として DNA-pol 関連 ACV 耐性株には、遺伝子型とも連動しているが、FOS 交叉耐性が比較的多く認められたことである。DNA-pol 変異株が FOS に交叉耐性の場合が多いことは過去の様々な報告でも示されているが (61-67)、前述のとおり従来的にはほとんどの場合 vTK 変異が HSV-1 の ACV 耐性機序と考えられているため、vTK の作用に関係ない FOS が第一選択として推

奨されている (16)。しかしながら HSCT 患者においては今回の結果から、常に FOS が適応できるとは限らないことが示された。一方、興味深いことに GCV への感受性はこれらの株においては保存されていた。DNA-pol 変異 ACV 耐性 HSV-1 と GCV 効果の機序に関連してはこれまで詳細な検討はなく、今後の研究による解明が待たれる。いずれにせよ、HSCT 患者において ACV 耐性 HSV-1 による疾患で FOS が代替的に使用されても効果不十分な場合には、GCV も治療オプションとなりうることを念頭に置かなければならない。

HSCT 患者の予後と ACV 耐性 HSV-1 の出現に着目した報告はこれまでにわずかしかない。また、HSCT 患者における、ACV 耐性 HSV-1 の出現に関連する臨床的リスク因子に関する検討はこれまでに例がない。まず予後に関して、HSCT 急性期の HSV-1 再活性化群は長期予後が不良であることを報告した論文 (89,90)があるが、ACV 耐性についての議論はされていない。最近発表されたケースコントロールスタディ (91)において ACV 耐性 HSV-1 群で予後が不良との報告があるが、前向きコホート観察で検討されたのは今回が初めてである。本研究においても、ACV 耐性 HSV-1 出現患者は移植 100 日以内の予後が不良な傾向にあった。しかし、HSV-1 による重篤な疾患はみられず、多変量解析により独立した短期死亡の危険因子でないことも示された。また、ACV 耐性 HSV-1 の出現に関わる臨床的リスク因子について検討したところ、再発悪性疾患に対す

る移植が ACV 耐性 HSV-1 出現の独立したリスク因子であることが示された。この理由として、第一に再発患者は一般に長い治療経過から、免疫低下による日和見感染のリスクが高くなる。第二にこのような患者では ACV 予防投与を必要とする期間もより長く、薬剤圧力も高まっていると考えられる。その他に意外な結果として得られたのは、非骨髄破壊性レジメンが ACV 耐性 HSV-1 出現に関しては保護的な効果を持たなかったところか、有意差には至らないもののむしろリスク因子側の傾向が認められたことである。放射線/化学療法を軽減した非骨髄破壊性レジメンでは、宿主の T 細胞がある程度温存され、移植後の感染症を減らす意味からは有利であると考えられている (47,92)。しかしながら、今回の患者群では、前処置のタイプはランダム化して割り付けられたわけではなく、患者状態に合わせて決定されている。結果に示された通り、ACV 耐性 HSV-1 出現患者は再発患者も多かった。このような場合、全身状態への配慮から大量の化学療法・放射線療法を選択できなかった患者も多いものと考えられる。この基礎的な予後不良因子を、非骨髄破壊レジメンの免疫保持による優位性が上回れなかったことによる可能性が考えられる。以上をまとめると、HSCT 患者における ACV 耐性 HSV-1 の出現は、予後不良の直接原因ではないながら、患者の疾患状態や免疫抑制程度などの重症度を反映し、それゆえ予後不良のマーカーの一つになり得ると考えられた。

今回の研究にはいくつかの制限がある。一つは、限られた期間の単一施設での調査であることである。患者背景や管理方針における施設間差異により、結果が変わってくる可能性がある。また、コホート全体では 268 例の移植と、比較的多数の患者を対象としたが、ACV 耐性 HSV-1 の出現患者は 11 名と限られていた。時間軸的にも、HSCT の管理指針や抗ウイルス剤予防投与方針の変遷などにより、HSV-1 の再活性や ACV 耐性化に関する様相は今後も変化していく可能性がある。また、今回の検討では HSV-1 の日本人成人における抗体保有率は高いとされているために、ほぼ全員が潜伏感染状態にあるとの想定で、抗体保有状況に関しては調べていない。HSV-1 は濃厚接触による感染であることを考えると、今回のコホートでは初感染は考えにくく、潜伏状態からの再活性化であると考えられる。したがって、再活性化率を低く見積もっている可能性はある。今回ほどに網羅的に、かつ前方視的に多くの HSCT 患者からのサンプリングとウイルス分離検査は費用・手間の点から難しいにせよ、HSCT 患者における HSV-1 の分離状況・分離 HSV-1 の ACV 耐性について、多施設において今後も調査を続けていくことによりその臨床的意義・治療・予防についてのさらなる深い理解につながると考えられる。

第二章の結論としては、HSCT 患者における ACV 耐性 HSV-1 出現は、宿主の免疫状態を反映し、直接死亡と関連する訳ではないが移植の短期予後を

評価するマーカーとなると考えられた。この患者群では ACV 耐性 HSV-1 の原因に DNA-pol 変異株で FOS 交叉耐性・GCV 非耐性が従来の報告より多く認められ、治療において薬剤選択にはウイルス学的検査が重要であることが示された。

第Ⅲ章 新生児ヘルペス脳炎を引き起こした単純ヘルペスウイルス 1 型

のアシクロビル耐性についての検討

Ⅲ-1 背景と目的

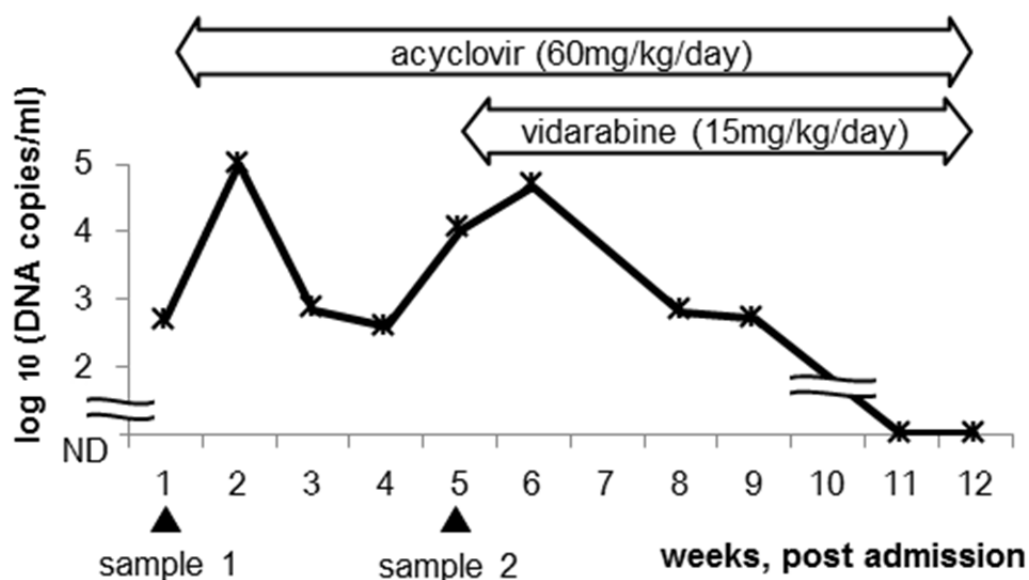
第Ⅱ章において、ACV 耐性 HSV-1 の造血幹細胞移植患者における意義が示されたが、その他の患者においてはどうかであろうか。先にも述べたとおり、HSV の ACV 耐性は vTK や DNA-pol 遺伝子変異によりもたらされ (16)、前者はウイルスの再活性化に必要で (93)、後者は効率よい増殖に必須であるため (94,95)、これらの変異を持つウイルスは低病原性とされる (16)。このため免疫健全者では容易に排除され、耐性率は 1%以下と低く、また、ACV 耐性 HSV は重篤な疾患を起こしにくいと考えられている (16)。しかし、免疫不全でない成人においても、ACV 耐性 HSV-1 によると考えられたヘルペス脳炎の報告はわずかながら存在するが (17)、ウイルス学的な証明はされていない。この背景には、ヘルペス脳炎においては原因ウイルスを脳脊髄液 (CSF: cerebrospinal fluid) からウイルスを分離することはできないということがあり、証明が困難なためもある。一方、新生児は免疫学的に未熟と考えられるが、ACV 耐性 HSV による疾患の報告はこれまで極めて数少なく (96-8)、そのうち中枢神経感染症についての報告は皆無である。HSV-1 または HSV-2 による新生児ヘルペスウイルス感染症

は皮膚型、全身型および中枢神経型に分類され、中枢神経型新生児ヘルペスは新生児ヘルペス脳炎 (neonatal herpes simplex virus encephalitis, NHE) と称される。NHE には ACV が有効な治療薬であり、生命予後を改善はしたものの、依然として高い神経後遺症率が知られている (99)。NHE でも、ほとんどの場合 CSF からウイルスを分離することはできないため、診断は CSF から PCR 法により HSV-DNA を検出することによる (18)。このため、NHE が ACV 治療抵抗性であった場合にも、原因ウイルスが ACV 耐性かどうか判断することは従来の方法(分離ウイルスを用いたプラーク減少法) によってはやはり不可能であり、ウイルス学的に証明されたものは皆無である。本章においては、ACV 治療抵抗性を示した NHE 患者における病原 HSV-1 の ACV 耐性について検討した。

III-2 検体

国立感染症研究所ウイルス第一部に、HSV-1 の ACV 耐性を検討する目的に送付された NHE 患者 1 名の CSF 検体を材料とした。患者の臨床経過を表 III-1 に示した。患者は初診時日齢 12 男児で、HSV-1 による NHE と診断された。ただちに入院の上 ACV 治療が開始され、4 週目までは CSF 中のウイルスゲノム量が低下していたが、その後ウイルスゲノム量が再上昇に転じた。このため ACV 耐性 HSV-1 による HSE を疑われ、ビダラビンを追加して治療されていた。患者

の保護者から、文書による同意を得たうえで、治療開始前 (sample 1) および薬剤追加前 (sample 2) の 2 点の検体が供され、国立感染症研究所の倫理委員会の承認を得て解析が行われた。



図Ⅲ-1 患者の臨床経過

当初 ACV 治療に反応し CSF 中ウイルスゲノム量が低下してきていたが、5 週目より再上昇に転じ、ビダラビンが追加され感染は終息した。ACV 治療開始前 (sample 1)、ビダラビン追加前 (sample 2) の二点の CSF が解析対象となった。

Ⅲ-3 方法と結果

第Ⅱ章でも示した ex vTK-APA assay (72)にいくつかの改変を加えて行った。以下に各ステップの方法を結果とともに順を追って示す。

Ⅲ-3-1 CSF 検体における vTK 遺伝子の増幅・塩基配列の決定

まず CSF 検体から、High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche) を用いて核酸抽出を行った。文献 (94) に基づいて vTK 遺伝子全長 (1131 塩基対) の増幅を nested PCR によりまず試みた。増幅が陰性の場合には、vTK 遺伝子を 6 領域に分けて全領域の塩基配列が解読可能となるようプライマーをデザインし、nested PCR によりそれぞれの領域を増幅した。PCR に用いたプライマーセットおよび PCR 条件を巻末表 SIII-1 に示す。酵素としては GC-rich PCR System (Roche) を用いた。増幅産物を PCR に用いたプライマーを使い BigDye reagents および ABI3300 シーケンサー (ともに Applied Biosystems) を用いてダイレクトシーケンスにて塩基配列を決定した。結果を表 III-2 に示す。

	Results	
	sample 1	sample 2
amplification by PCR	full-length	segmented
variation in amino acid sequence (comparison with TAS)	Q89R, V348I	Q89R, Q125H, V348I

表 III-2 PCR およびシーケンス結果

治療開始前の CSF (sample 1) では全長の vTK が増幅でき、塩基配列の決定およびクローニングが可能であった。薬剤追加前の CSF (sample 2) では分割して増幅・塩基配列の決定が可能であった。後者では新たに 1 アミノ酸置換 Q125H 変異が出現していた。

sample 1 からは vTK 全長を増幅できた。HSV-1 TAS 株と比べ、Q89R/V348I の二つのアミノ酸相違が見られた。sample 2 では分割してのみ PCR・シーケンス

が可能であり、この二つの相違に加え Q125H 変異が出現していた。この変異 vTK 遺伝子の保存領域外の一アミノ酸置換で、耐性変異であるかどうかの報告はこれまでになかった。そこで、引き続きこの変異が ACV 耐性を誘導するか否かについて解析した。

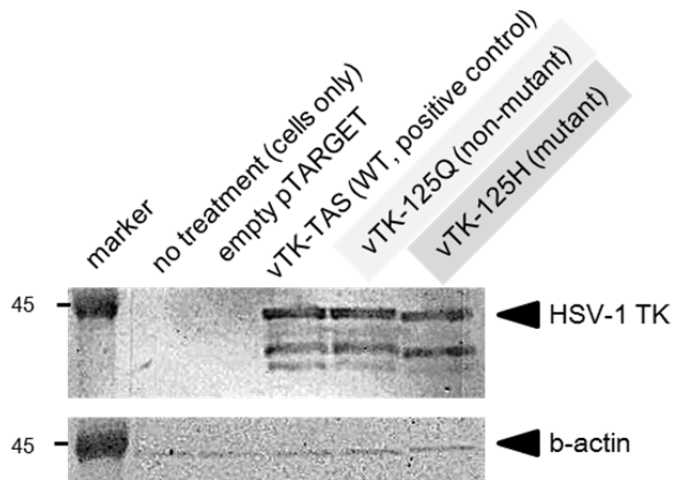
III-3-2 変異 vTK 発現プラスミドの作成

耐性の可能性のある変異 Q125H を含む vTK 全長を一括して増幅することができず、直接クローニングして vTK 発現ベクターを作製することはできなかった。そこで site directed mutagenesis を用いて、1 アミノ酸変異を挿入し、その機能解析をすることとした。そこで sample 1 からの PCR 産物の vTK 全長を TA クローニングにて pTARGET (Promega) に組み込んだプラスミドを作製 (vTK-125Q) し、これを鋳型として変異挿入し変異 vTK 発現プラスミド (vTK-125H) を作成した。Inverse PCR に用いたプライマー・PCR 条件を巻末表 SIII-2 に示した。また、PCR 酵素、Dpn I 処理、セルフライゲーションにはすべて KOD-Plus7 Mutagenesis kit (Toyobo) を用いた。

III-3-3 細胞での vTK 発現、発現細胞への TAR 感染、増殖評価

コラーゲンコートされた 24 ウェルプレートに 293T 細胞を 80% confluent の状態で定着させ、その細胞に各 vTK 発現ベクターを Fugene HD (Roche) を用いてそれぞれトランスフェクションした。48 時間後にはウェスタンブロットに

よって vTK 発現が確認された。図Ⅲ-1 にその結果を示す。



図Ⅲ-1 ウェスタンブロットによる vTK 発現の確認

vTK-TAS、vTK-125Q、vTK125H のいずれも細胞における発現が同様に確認された。(グレーの網掛けは表Ⅲ-2 と対応。)

引き続き vTK 発現細胞に vTK 欠損 HSV-1 株である TAR を感染させ、ACV 含有 MEM-2%FBS 培地で培養し、この際 ACV の濃度は 0、0.4、4、40 $\mu\text{g/ml}$ の 4 段階の濃度 (それぞれ n=3 ウェル) で検討した。感染 24 時間後に細胞を培養液ごと回収し、凍結融解後、Vero 細胞を用いたプラークアッセイにて TAR の感染力価を測定した (plaque forming unit, PFU)。各々の ACV 濃度でどの程度 TAR の増殖抑制が見られたかが、発現された vTK の ACV リン酸化活性の指標となる。

この値を $\Delta\log_{10}\text{PFU}$ として、図Ⅲ-2 にプロットした。この結果、患者でもともとみられていた Q89R、V348I は自然多様性で、経過中新たに出現した Q125H は中等度耐性変異と判断された。

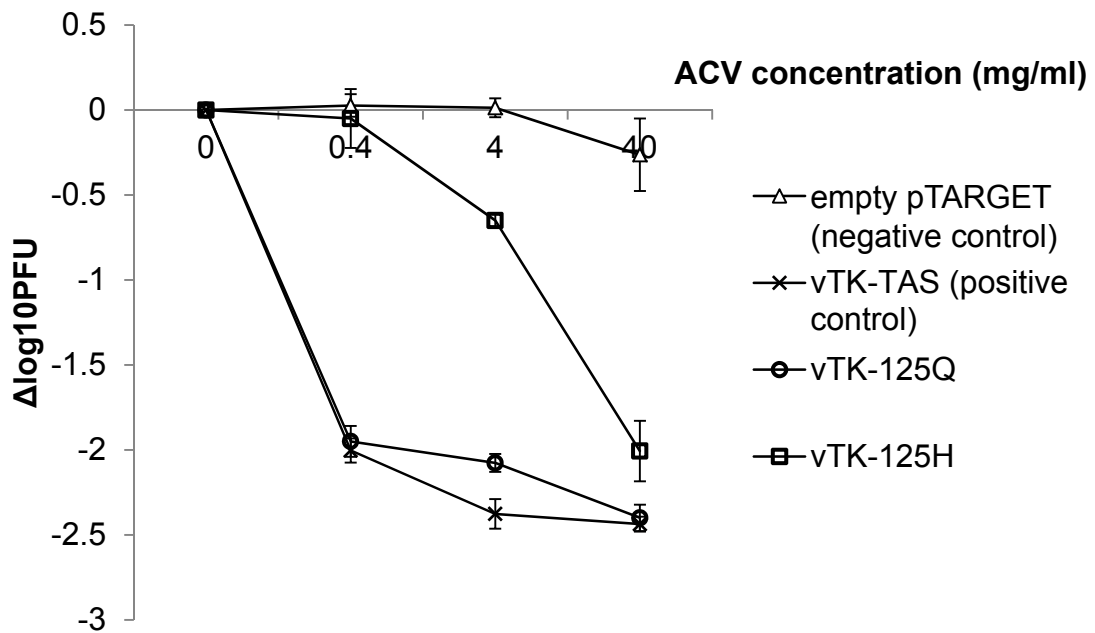
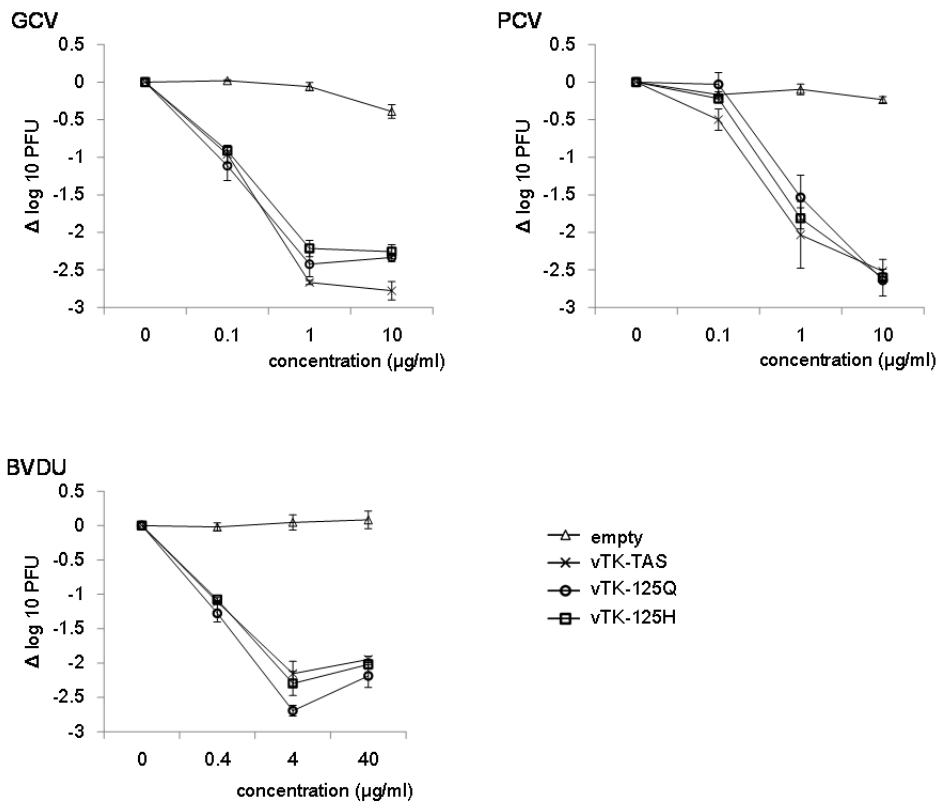


図 II -2 ACV 感受性結果

もともと認められた variation (Q89R, V348I) は自然多様性で、薬剤開始後にこれらに加え出現した変異 (Q125H) は耐性変異であることが示された。

III-3-4 ACV 耐性 vTK-Q125H 変異の他薬剤耐性の有無

GCV、BVDU (brivudine)、PCV (penciclovir) も ACV 同様 vTK 関連抗 HSV-1 薬である。これらの薬剤についても同様の検討を行ったところ、Q125H 変異はこれら薬剤に耐性を誘導しないことが示唆された。



図Ⅲ-3 GCV、PCV、BVDUに関する結果
 vTK-Q125H 変異はこれら薬剤に対する耐性はもたらさなかった。

Ⅲ-4 考察

HSV-1 は主にヘルペス性歯肉口内炎や口唇ヘルペス、HSV-2 は主に性器ヘルペスの原因ウイルスであるが、いずれも神経向性を持ち、中枢神経感染症を起こしうる。新生児における HSV-1 または HSV-2 による中枢神経感染症は NHE であり、小児および成人におけるものはヘルペス脳炎 (Herpes simplex virus encephalitis, HSE) である。いずれも診断は CSF 中の HSV-DNA 検出等によつてなされ、原因ウイルスを脳脊髄液から分離することは通常不可能であるため

(18)、ACV 耐性 HSV-1 によるものかどうかを判定することは極めて困難である。免疫不全のない成人患者における ACV 耐性 HSV-1 による HSE とされるこれまで唯一の報告は、CSF 中 HSV-DNA を検討し、vTK 遺伝子に耐性候補変異 R41H がみられたというものである (17)。しかしこの変異が実際耐性をきたすかは不明であるため、ウイルス学的に証明されたものとなると皆無である。つまり、vTK 遺伝子変異を認めた場合にも、耐性についての評価がされていないものに関しては、機能的な解析を行わないとウイルス学的証明とならない。今回、vTK の変異を同定した上で、哺乳動物細胞において変異 vTK を発現させ、そこに vTK 欠損ウイルスを感染させ、その増殖が ACV によりどの程度抑制されるかを非変異 vTK 発現した場合と比較し、感受性解析を行った。この結果、ACV 耐性 HSV-1 による NHE が初めてウイルス学的に証明された。

新生児におけるヘルペスウイルス感染症は、通常は産道における母子間伝達による感染で、頻度は 3,500-5,000 出生に 1 例程度と推測されている。新生児ヘルペスは皮膚型、中枢神経型すなわち NHE、全身型に分類され、30%が NHE とされる (99,100)。NHE の致死率は 6%、後遺症率は 50-70%と高く、依然として重篤な疾患である (101)。本患者においては、母体性器ヘルペス既往はなく、新生児にも母体からの移行 IgG 抗体がみとめられなかったため (データ示さず)、感染経路は不明であった。病原ウイルスが性器ヘルペスに多い HSV-2 ではなく

HSV-1 であり、しかも発症日齢が 12 と出生から比較的経過していることも考慮すると、無症候性にウイルス排泄をしていた母親以外の家族などとの濃厚接触による感染であった可能性も考えられる。また、この耐性 HSV-1 は ACV 治療が開始されたのち出現していたため、薬剤圧力により患者体内で選択または変異獲得して出現したことが考えられた。vTK はウイルスの再活性化に必要なタンパクで、その変異および機能低下を持つウイルスは低病原性で重篤な疾患を起こしにくいと従来は考えられている (16) が、今回は新生児の未熟な免疫能のため排除が不十分であったと推察された。

ACV 治療は NHE や HSE の治療に有効であるが、臨床の場面では反応が不十分な場合も存在する。しかし、上述した通り ACV 耐性 HSV による NHE の報告は今回が初めてであり、免疫不全のない成人 HSE においてはウイルス学的な証明が得られたものは皆無である。ウイルスが分離できないために証明が難しいことも考えられるが、実際にウイルス側には耐性がなくても宿主の過剰な免疫反応により炎症が持続し治療抵抗性が生じる場合もあると考えられる。実際、抗炎症作用をもつステロイド投与により、HSE の予後が改善できることを示唆する動物実験結果 (102) や臨床データ (103) もある。これを考量すると、ACV 治療抵抗性の NHE や HSE においては、ビダラビンや FOS 等別系統の薬剤を併用することも大切であるが、抗炎症療法等、支持療法の充実も同時に考慮

すべきであると考えられた。

vTK 遺伝子の 125 番グルタミンアミノ酸残基は保存領域の中には入っていないが、タンパク 3 次元構造上核酸結合ポケットの直上にあるとされている (104)。今回の検討ではこのアミノ酸残基をヒスチジンに置換すると ACV 感受性が低下することがはじめて示された。なお、これまでの報告ではグルタミン酸やロイシンに置換すると耐性に、アスパラギンに置換すると高度感受性に変化することが示されている (105, 106)。興味深いことに Q125H 変異は GCV、PCV、BVDU への感受性には影響を与えないことも示された。

今回の方法における限界のひとつは時間的な制約に対応できないことである。プラークタイトレーションの段階をリアルタイム PCR に置き換えることなどである程度短縮することは可能だが、塩基配列の決定や site directed mutagenesis などこれ以上の時間的短縮は難しく、後方視的な検討とならざるを得ない。したがって現時点では、臨床における薬剤変更や支持療法強化などの方針決定は、臨床経過に基づいて薬剤感受性を予想して遅滞なく行わねばならない。vTK 遺伝子のアミノ酸置換に関してはさらに知見を集め、耐性変異と感受性変異をデータベース化してゆけば、耐性診断が遺伝子型のみで迅速にできるであろう。また、DNA-pol 変異に関しては検討できていない点も今後の課題である。DNA-pol は遺伝子全長が長く、PCR も容易でない。vTK 遺伝子に耐

性変異がなかった場合にも、ACV 耐性化が完全に否定できるものではないことも考慮しなくてはならない。

第Ⅲ章の結論として、ACV 耐性 HSV-1 による NHE がウイルス学的に初めて証明された。耐性ウイルスは薬剤圧力により本患者体内で出現し、新生児がゆえの免疫未熟性により変異ウイルスの排除が不十分であった可能性が考えられた。ウイルス学的には、HSV-1 の vTK-Q125H 変異が ACV 耐性変異であることが新たに示された。(Copyright © American Society for Microbiology, J. Clin. Microbiol. January 2013 51:356-359, doi:10.1128/JCM.02247-12 に掲載。)

総括

近代化以降も依然として、感染症は人類にとって最も大きな健康問題の一つである。これらの中で、近年重要性が増している、免疫不全患者における感染症や薬剤耐性病原体の問題に焦点を当てて研究を行った。第Ⅰ章では、高度免疫不全状態の HSCT 患者における感染症、その中でもこれまでの研究が比較的手薄な呼吸器ウイルス感染症に着目した。従来の検査では診断されていなかった PIV3 感染症の病棟内流行を把握し、その臨床的特徴や病棟内流行予防に関する知見を得た。第Ⅱ章では HSCT 患者における HSV-1 の再活性化および ACV 耐性化 HSV-1 出現状況について検討した。ACV 耐性 HSV-1 の出現は、直接原因ではないが予後不良のマーカーとなること、従来の報告よりも高い割合で DNA-pol 変異による ACV 耐性 HSV-1 が存在すること、よって FOS 交差耐性も少なくないことを明らかにした。第Ⅲ章では、NHE 患者における検討で ACV 耐性を示す HSV-1 が治療経過中に出現したことをウイルス学的に世界ではじめて証明した。免疫不全状態における感染症および薬剤耐性病原体による感染症は今後さらに増加すると予想され、継続した研究と対策が必要である。

謝辞

本研究にあたり御指導下さいました、国立感染症研究所ウイルス第一部部長西條政幸氏、同第三室室長林昌宏氏、同主任研究官伊藤睦代氏、同医療情報センター研究員木下一美氏、海南医学院熱検学院免疫教研室講師王麗欣氏、虎の門病院血液内科部長谷口修一氏、同分院血液内科医師辻正徳氏、国立病院機構仙台医療センター臨床検査科長西村秀一氏、同ウイルスセンターの皆様、岐阜薬科大学生命薬学大講座感染制御学研究室教授井上直樹氏、防衛医科大学小児科学講座教授野々山恵章氏、土屋小児病院院長子川和宏氏、東京大学大学院医学系研究科国際保健学専攻国際生物医科学講座発達医科学分野教授水口雅氏、同生殖・発達・加齢医学専攻小児医学講座教授岡明氏、独立行政法人国立成育医療研究センター総長/理事長五十嵐隆氏に深謝申し上げます。特に辻正徳氏と西村秀一氏には多大な御協力御指導を賜り、心より御礼申し上げます。また、研究の主旨を御理解いただき検体提出を御承諾下さいました患者様方と担当の先生方に深謝申し上げます。

1. 厚生労働省大臣官房統計情報部 人口動態・保健統計課、平成 24 年人口動態統計月報年計(概数の概況)、2014 年.
2. World Health Organization. The global eradication of smallpox. Final report of the global commission for the certification of smallpox eradication. In History of International Public Health No. 4. Geneva, World Health Organization, 1980.
3. Andre FE, Booy R, Block HL, Clemens J, Datta SK, John TJ, Lee BW, Lolekha S, Peltola H, Ruff TA et al. Vaccination greatly reduced disease, disability, death and inequity worldwide. Bull World Health Organ 86:140-146. 2008.
4. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol Mol Biol Rev. 74:417-433. 2010.
5. Van Doorn HR. Emerging infectious diseases. Medicine (Abingdon) 42 (1): 60-63, 2014.
6. Borqdorff MW and van Soolingen D. The re-emergence of tuberculosis: what have we learnt from molecular epidemiology? Clin Microbiol Infect. 19(10); 889-901 2013.
7. Sadoh AE, Oladokun RE. Re-emergence of diphteria and pertussis. Vaccine. Nov 26;30(50):7221-8. 2012.
8. Ravi PN Mishra, Ernesto Oviedo-Orta, Prachi Prachi, Rino Rappuoli and Fabio

- Bagnoli. Vaccines and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol.* 15(5); 596-602, 2012.
9. Fishman JA. Opportunistic infections: coming to the limits of immunosuppression? *Cold Spring Harb Perspect Med.* 3(10); a015669, 2013.
 10. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *New England Journal of Medicine.* 354(17):1813-26, 2006.
 11. Liungmann P, Urbano-Ispizua A, Cavazza-Calvo M, Demirer T, Dini G, Einsele H, Gratwohl A, Madriqal A, Niederwieser D, Passweg J, Rocha V, Saccardi R, Shouten H, Shmitz N, Socie G, Sureda A, Aerley J; European Group for Blood and Marrow. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definitions and current practice in Europe. *Bone Marrow Transplant.* 37(5): 439-449. 2006.
 12. Gratwohl A, Baldomero H, Aljurf M, Pasquini MC, Bouzas LF, Yoshimi A, Szera J, Lipton J, Shwendener A, Gratwohl M, Frauendorfer K, Niederwieser D, Horwitz M, Kodaera Y; Worldwide Network of Blood and Marrow Transplantation. Hematopoietic Stem Cell Transplantation, A Global Perspective. *JAMA;* 303(16): 1617-24, 2010.
 13. Leland DS and Ginocchio CC. Role of Cell Culture for Detection in the Age of Technology. *Clin. Microbiol Rev.;* 20(1):48-78, 2007.

14. Lin R and Liu Q. Diagnosis and treatment of viral diseases in recipients of hematopoietic stem cell transplantation. *J Hematol Oncol.*: 6; 94, 2013.
15. Chen Y, Scieux C, Garrait V, et al. Resistant herpes simplex virus type 1 infection: an emerging concern after allogeneic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis.* 31:927-935, 2000.
16. Piret, J., and G. Boivin. Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management. *Antimicrob Agents Chemother.* 55:459-72, 2011.
17. Schulte EC, Sauerbrei A, Hoffmann D, Zimmer C, Hemmer B, Muhlau M. Acyclovir resistance in herpes simplex encephalitis. *Ann Neurol.* 67:830-833, 2010.
18. Nahmias AJ, Whitley RJ, Visintine AN, Takei Y, Alford CA, Jr. Herpes simplex virus encephalitis: laboratory evaluations and their diagnostic significance. *J Infect Dis.* 145:829-836, 1982.
19. Jakob R. Passweg, Jörg Halter, Christoph Bucher, Sabine Gerull, Dominik Heim, Alicia Rovó, Andreas Buser, Martin Stern, André Tichelli. Hematopoietic stem cell transplantation: a review and recommendations for follow-up care for the general practitioner. *Swiss Med Wkly.* 142:w13696, 2012.
20. Shah, D. P., S. S. Ghantoji, V. E. Mulanovich, E. J. Ariza-Heredia, and R. F.

Chemaly. Management of respiratory viral infections in hematopoietic cell transplant recipients. *Am J Blood Res* 2:203-18, 2012.

21. Chemaly, R. F., S. S. Hanmod, D. B. Rathod, S. S. Ghantaji, Y. Jiang, A. Doshi, K. Vigil, J. A. Adachi, A. M. Khoury, J. Tarrand, C. Hosing, and R. Champlin. The characteristics and outcomes of parainfluenza virus infections in 200 patients with leukemia or recipients of hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 119:2738-45, 2012.

22. Renaud, C., and A. P. Campbell. Changing epidemiology of respiratory viral infections in hematopoietic cell transplant recipients and solid organ transplant recipients. *Curr Opin Infect Dis* 24:333-43, 2011.

23. Whimbey, E., R. E. Champlin, R. B. Couch, J. A. Englund, J. M. Goodrich, I. Raad, D. Przepioraka, V. A. Lewis, N. Mirza, H. Yousuf, J. J. Tarrand, and G. P. Bodey. Community respiratory virus infections among hospitalized adult bone marrow transplant recipients. *Clin Infect Dis* 22:778-82, 1996.

24. Peck, A. J., J. A. Englund, J. Kuypers, K. A. Guthrie, L. Corey, R. Morrow, R. C. Hackman, A. Cent, and M. Boeckh. Respiratory virus infection among hematopoietic cell transplant recipients: evidence for asymptomatic parainfluenza virus infection. *Blood* 110:1681-8, 2007.

25. Srinivasan, A., P. Flynn, Z. Gu, C. Hartford, R. Lovins, A. Sunkara, D. K. Srivastava, W. Leung, and R. T. Hayden. Detection of respiratory viruses in asymptomatic children undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer* 60:149-51, 2013.
26. Koc, S., W. Leisenring, M. E. Flowers, C. Anasetti, H. J. Deeg, R. A. Nash, J. E. Sanders, R. P. Witherspoon, R. Storb, F. R. Appelbaum, and P. J. Martin. Therapy for chronic graft-versus-host disease: a randomized trial comparing cyclosporine plus prednisone versus prednisone alone. *Blood* 100:48-51, 2002.
27. Echevarria, J. E., D. D. Erdman, E. M. Swierkosz, B. P. Holloway, and L. J. Anderson. Simultaneous detection and identification of human parainfluenza viruses 1, 2, and 3 from clinical samples by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 36:1388-91, 1998.
28. Takao, S., H. Shimozone, H. Kashiwa, K. Matsubara, T. Sakano, M. Ikeda, N. Okamoto, H. Yoshida, Y. Shimazu, and S. Fukuda. [The first report of an epidemic of human metapneumovirus infection in Japan: clinical and epidemiological study]. *Kansenshogaku Zasshi* 78:129-37, 2004.
29. Swierkosz, E. M., D. D. Erdman, T. Bonnot, C. Schneiderheinze, and J. L. Waner. Isolation and characterization of a naturally occurring parainfluenza 3 virus variant. *J Clin Microbiol* 33:1839-41, 1995.

30. Lee, A. V., D. F. Bibby, H. Oakervee, A. Rohatiner, I. Ushiro-Lumb, D. A. Clark, and F. M. Mattes. Nosocomial transmission of parainfluenza 3 virus in hematological patients characterized by molecular epidemiology. *Transpl Infect Dis* 13:433-7, 2011.
31. Nichols, W. G., T. Gooley, and M. Boeckh. Community-acquired respiratory syncytial virus and parainfluenza virus infections after hematopoietic stem cell transplantation: the Fred Hutchinson Cancer Research Center experience. *Biol Blood Marrow Transplant* 7 Suppl:11S-15S, 2001.
32. Nichols, W. G., K. A. Guthrie, L. Corey, and M. Boeckh. Influenza infections after hematopoietic stem cell transplantation: risk factors, mortality, and the effect of antiviral therapy. *Clin Infect Dis* 39:1300-6, 2004.
33. Nichols, W. G., Corey, L., Gooley, T., Davis, C., Boeckh, M. Parainfluenza virus infections after hematopoietic stem cell transplantation: risk factors, response to antiviral therapy, and effect on transplant outcome. *Blood* 98:3; 573-8, 2001.
34. Templeton, K. E., R. G. Bredius, S. A. Scheltinga, E. C. Claas, J. M. Vossen, and A. C. Kroes. Parainfluenza virus 3 infection pre- and post-haematopoietic stem cell transplantation: re-infection or persistence? *J Clin Virol* 29:320-2, 2004.
35. Zambon, M., Bull, T., Sadler, C. J., Goldman, J. M., Ward, K. N. Molecular

epidemiology of two consecutive outbreaks of parainfluenza 3 in a bone marrow transplant unit. *J Clin Microbiol* 36:8;2289-93, 1998.

36. Elizaga, J., E. Olavarria, J. Apperley, J. Goldman, and K. Ward. Parainfluenza virus 3 infection after stem cell transplant: relevance to outcome of rapid diagnosis and ribavirin treatment. *Clin Infect Dis* 32:413-8, 2001.

37. Cortez, K. J., D. D. Erdman, T. C. Peret, V. J. Gill, R. Childs, A. J. Barrett, and J. E. Bennett. Outbreak of human parainfluenza virus 3 infections in a hematopoietic stem cell transplant population. *J Infect Dis* 184:1093-7, 2001.

38. Hohenthal, U., J. Nikoskelainen, R. Vainionpaa, R. Peltonen, M. Routamaa, M. Itala, and P. Kotilainen. Parainfluenza virus type 3 infections in a hematology unit. *Bone Marrow Transplant* 27:295-300, 2001.

39. Jalal, H., D. F. Bibby, J. Bennett, R. E. Sampson, N. S. Brink, S. MacKinnon, R. S. Tedder, and K. N. Ward. Molecular investigations of an outbreak of parainfluenza virus type 3 and respiratory syncytial virus infections in a hematology unit. *J Clin Microbiol* 45:1690-6, 2007.

40. Piralla, A., E. Percivalle, A. Di Cesare-Merlone, F. Locatelli, and G. Gerna.. Multicluster nosocomial outbreak of parainfluenza virus type 3 infection in a pediatric oncohematology unit: a phylogenetic study. *Haematologica* 94:833-9, 2009.

41. Hodson, A., M. Kasliwal, M. Streetly, E. MacMahon, and K. Raj. A parainfluenza-3 outbreak in a SCT unit: sepsis with multi-organ failure and multiple co-pathogens are associated with increased mortality. *Bone Marrow Transplant* 46:1545-50, 2011.
42. Sydnor, E. R., A. Greer, A. P. Budd, M. Pehar, S. Munshaw, D. Neofytos, T. M. Perl, and A. Valsamakis. An outbreak of human parainfluenza virus 3 infection in an outpatient hematopoietic stem cell transplantation clinic. *Am J Infect Control* 40:601-5, 2012.
43. Collins PL, Charnock RM, McIntosh K. Parainfluenza viruses. In: Fields BN editors. *Fields Virology*. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1205-1210, 1996.
44. Boeckh, M. The challenge of respiratory virus infections in hematopoietic cell transplant recipients. *Br J Haematol* 143:455-67, 2008.
45. Shima, T., G. Yoshimoto, A. Nonami, S. Yoshida, K. Kamezaki, H. Iwasaki, K. Takenaka, T. Miyamoto, N. Harada, T. Teshima, K. Akashi, and K. Nagafuji. Successful treatment of parainfluenza virus 3 pneumonia with oral ribavirin and methylprednisolone in a bone marrow transplant recipient. *Int J Hematol* 88:336-40, 2008.
46. Wendt, C. H., D. J. Weisdorf, M. C. Jordan, H. H. Balfour, Jr., and M. I. Hertz.

Parainfluenza virus respiratory infection after bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 326:921-6, 1992.

47. Schiffer, J. T., K. Kirby, B. Sandmaier, R. Storb, L. Corey, and M. Boeckh. Timing and severity of community acquired respiratory virus infections after myeloablative versus non-myeloablative hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 94:1101-8, 2009.

48. Chakrabarti, S., I. Avivi, S. Mackinnon, K. Ward, P. D. Kottaridis, H. Osman, H. Waldmann, G. Hale, C. D. Fegan, K. Yong, A. H. Goldstone, D. C. Linch, and D. W. Milligan. Respiratory virus infections in transplant recipients after reduced-intensity conditioning with Campath-1H: high incidence but low mortality. *Br J Haematol* 119:1125-1132, 2002.

49. Scheurer, M. E., J. C. Pritchett, E. S. Amirian, N. R. Zemke, P. Lusso, and P. Ljungman. HHV-6 encephalitis in umbilical cord blood transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Bone Marrow Transplant* 48:574-80, 2012.

50. Girmenia, C., A. M. Raiola, A. Piciocchi, A. Algarotti, M. Stanzani, L. Cudillo, C. Pecoraro, S. Guidi, A. P. Iori, B. Montante, P. Chiusolo, E. Lanino, A. M. Carella, E. Zucchetti, B. Bruno, G. Irrera, F. Patriarca, D. Baronciani, M. Musso, A. Prete, A. M. Risitano, D. Russo, N. Mordini, D. Pastore, A. Vacca, F. Onida, S. Falcioni, G. Pisapia,

G. Milone, D. Vallisa, A. Olivieri, A. Bonini, E. Castagnola, S. Sica, I. Majolino, A. Bosi, A. Busca, W. Arcese, G. Bandini, A. Bacigalupo, A. Rambaldi, and A. Locasciulli. Incidence and outcome of invasive fungal diseases after allogeneic stem cell transplantation: a prospective study of the Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO). *Biol Blood Marrow Transplant* 20:872-80, 2014.

51. Gilis, L., S. Morisset, G. Billaud, S. Ducastelle-Lepretre, H. Labussiere-Wallet, F. E. Nicolini, F. Barraco, M. Detrait, X. Thomas, N. Tedone, M. Sobh, C. Chidiac, T. Ferry, G. Salles, M. Michallet, and F. Ader. High burden of BK virus-associated hemorrhagic cystitis in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 49:664-70, 2014.

52. Blennow, O., P. Ljungman, E. Sparrelid, J. Mattsson, and M. Remberger. Incidence, risk factors, and outcome of bloodstream infections during the pre-engraftment phase in 521 allogeneic hematopoietic stem cell transplantations. *Transpl Infect Dis* 16:106-14, 2013.

53. Mikulska, M., V. Del Bono, R. Prinapori, L. Boni, A. M. Raiola, F. Gualandi, M. T. Van Lint, A. Dominiotto, T. Lamparelli, P. Cappellano, A. Bacigalupo, and C. Viscoli. Risk factors for enterococcal bacteremia in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 12:505-12, 2010.

54. Lewis, V. A., R. Champlin, J. Englund, R. Couch, J. M. Goodrich, K. Rolston, D. Przepiorka, N. Q. Mirza, H. M. Yousuf, M. Luna, G. P. Bodey, and E. Whimbey. Respiratory disease due to parainfluenza virus in adult bone marrow transplant recipients. *Clin Infect Dis* 23:1033-7, 1996.
55. Seo, S., H. Xie, A. P. Campbell, J. M. Kuypers, W. M. Leisenring, J. A. Englund, and M. Boeckh. Parainfluenza virus lower respiratory tract disease after hematopoietic cell transplant: viral detection in the lung predicts outcome. *Clin Infect Dis* 58:1357-68, 2014.
56. Srinivasan, A., C. Wang, J. Yang, J. L. Shenep, W. H. Leung, and R. T. Hayden.. Symptomatic parainfluenza virus infections in children undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 17:1520-7, 2011.
57. Roziman B, Knipe DM, Whiteley RJ. Herpes Simplex Viruses. In: Fields BN editors. *Fields Virology*. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven; 1823-1836, 2013.
58. Larder BA, Darby G. Selection and characterisation of acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 mutants inducing altered DNA polymerase activities. *Virology*. 146:262-271, 1985.
59. Schnipper LE, Crumpacker CS. Resistance of herpes simplex virus to acycloguanosine: role of viral thymidine kinase and DNA polymerase loci. *Proc Natl*

Acad Sci U S A. 77:2270-2273, 1980.

60. Gaudreau A, Hill E, Balfour HH, Jr., Erice A, Boivin G. Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir-resistant herpes simplex viruses from immunocompromised patients. *J Infect Dis.* 178:297-303, 1998.

61. Saral R, Burns WH, Laskin OL, Santos GW, Lietman PS. Acyclovir prophylaxis of herpes-simplex-virus infections. *N Engl J Med.* 305:63-67, 1981.

62. Shepp DH, Dandliker PS, Flournoy N, Meyers JD. Sequential intravenous and twice-daily oral acyclovir for extended prophylaxis of herpes simplex virus infection in marrow transplant patients. *Transplantation.* 43:654-658, 1987.

63. Epstein JB, Ransier A, Sherlock CH, Spinelli JJ, Reece D. Acyclovir prophylaxis of oral herpes virus during bone marrow transplantation. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 32B:158-162, 1996.

64. Wade JC, Newton B, Flournoy N, Meyers JD. Oral acyclovir for prevention of herpes simplex virus reactivation after marrow transplantation. *Ann Intern Med.* 100:823-828, 1984.

65. Chakrabarti S, Pillay D, Ratcliffe D, Cane PA, Collingham KE, Milligan DW. Resistance to antiviral drugs in herpes simplex virus infections among allogeneic stem cell transplant recipients: risk factors and prognostic significance. *J Infect Dis.*

181:2055-2058, 2000.

66. Darville JM, Ley BE, Roome AP, Foot AB. Acyclovir-resistant herpes simplex virus infections in a bone marrow transplant population. *Bone Marrow Transplant.* 22:587-589, 1998.

67. Moses SE, Osborne W, Valappil M, et al. Extensive oral herpes simplex virus type 1 infection in a haematopoietic stem cell transplant recipient not responding to aciclovir. *J Clin Virol*;52:67-69, 2011.

68. Morfin F, Souillet G, Bilger K, Ooka T, Aymard M, Thouvenot D. Genetic characterization of thymidine kinase from acyclovir-resistant and -susceptible herpes simplex virus type 1 isolated from bone marrow transplant recipients. *J Infect Dis.* 182:290-293, 2000.

69. Langston AA, Redei I, Caliendo AM, et al. Development of drug-resistant herpes simplex virus infection after haploidentical hematopoietic progenitor cell transplantation. *Blood.* 99:1085-1088 2002.

70. Saijo M, Suzutani T, Itoh K, et al. Nucleotide sequence of thymidine kinase gene of sequential acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 isolates recovered from a child with Wiskott-Aldrich syndrome: evidence for reactivation of acyclovir-resistant herpes simplex virus. *J Med Virol.* 58:387-393, 1999.

71. Saijo M, Suzutani T, Yoshida I. Effects of acyclovir, oxetanocin-G, and carbocyclic oxetanocin-G in combinations on the replications of herpes simplex virus type 1 and type 2 in Vero cells. *Tohoku J Exp Med.* 167:57-68, 1992.
72. Shiota T, Lixin W, Takayama-Ito M, et al. Expression of herpes simplex virus type 1 recombinant thymidine kinase and its application to a rapid antiviral sensitivity assay. *Antiviral Res.* 91:142-149, 2011.
73. Collins P, Ellis MN. Sensitivity monitoring of clinical isolates of herpes simplex virus to acyclovir. *J Med Virol. Suppl* 1:58-66, 1993.
74. Bacon TH, Levin MJ, Leary JJ, Sarisky RT, Sutton D. Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. *Clin Microbiol Rev.* 16:114-128, 2003.
75. Bacon TH, Boon RJ, Schultz M, Hodges-Savola C. Surveillance for antiviral-agent-resistant herpes simplex virus in the general population with recurrent herpes labialis. *Antimicrob Agents Chemother.* 46:3042-3044, 2002.
76. Boon RJ, Bacon TH, Robey HL, et al. Antiviral susceptibilities of herpes simplex virus from immunocompetent subjects with recurrent herpes labialis: a UK-based survey. *J Antimicrob Chemother.* 46:324-325, 2000.
77. Christophers J, Clayton J, Craske J, et al. Survey of resistance of herpes

simplex virus to acyclovir in northwest England. *Antimicrob Agents Chemother.* 42:868-872, 1998.

78. Danve-Szatanek C, Aymard M, Thouvenot D, et al. Surveillance network for herpes simplex virus resistance to antiviral drugs: 3-year follow-up. *J Clin Microbiol.* 42:242-249, 2004.

79. Stranska R, Schuurman R, Nienhuis E, et al. Survey of acyclovir-resistant herpes simplex virus in the Netherlands: prevalence and characterization. *J Clin Virol.* 32:7-18, 2005.

80. Englund JA, Zimmerman ME, Swierkosz EM, Goodman JL, Scholl DR, Balfour HH, Jr. Herpes simplex virus resistant to acyclovir. A study in a tertiary care center. *Ann Intern Med.* 112:416-422, 1990.

81. Nugier F, Colin JN, Aymard M, Langlois M. Occurrence and characterization of acyclovir-resistant herpes simplex virus isolates: report on a two-year sensitivity screening survey. *J Med Virol.* 36:1-12, 1992.

82. Erard V, Wald A, Corey L, Leisenring WM, Boeckh M. Use of long-term suppressive acyclovir after hematopoietic stem-cell transplantation: impact on herpes simplex virus (HSV) disease and drug-resistant HSV disease. *J Infect Dis.* 196:266-270, 2007.

83. Frangoul H, Wills M, Crossno C, Engel M, Domm J. Acyclovir-resistant herpes simplex virus pneumonia post-unrelated stem cell transplantation: a word of caution. *Pediatr Transplant.* 11:942-944, 2007.
84. Wade JC, McLaren C, Meyers JD. Frequency and significance of acyclovir-resistant herpes simplex virus isolated from marrow transplant patients receiving multiple courses of treatment with acyclovir. *J Infect Dis.* 148:1077-1082, 1983.
85. Williamson RT. Diagnosis and management of recurrent herpes simplex induced by fixed prosthodontic tissue management: a clinical report. *J Prosthet Dent.* 82:1-2, 1999.
86. Perng GC and Jones C. Towards an understanding of the Herpes Simplex Virus type 1 Latency-reactivation cycle. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2010: 262415, 2010.
87. Andrei G, Georgala A, Topalis D, et al. Heterogeneity and evolution of thymidine kinase and DNA polymerase mutants of herpes simplex virus type 1: implications for antiviral therapy. *J Infect Dis.* 207:1295-1305, 2013.
88. van Velzen M, van Loenen FB, Meesters RJ, et al. Latent acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 in trigeminal ganglia of immunocompetent individuals. *J Infect Dis.* 205:1539-1543, 2012.

89. Guimaraes AL, Gomes CC, da Silva LM, et al. Association between oral HSV-1 and survival in allogeneic hematopoietic stem cell transplanted patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 14:E62-68, 2009.
90. Gomez RS, Carneiro MA, Souza LN, et al. Oral recurrent human herpes virus infection and bone marrow transplantation survival. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 91:552-556 2001.
91. Patel D, Marchaim D, Marcus G, et al. Predictors and outcomes of acyclovir-resistant herpes simplex virus infection among hematopoietic cell transplant recipients: case-case-control investigation. *Clin Transplant*. 28:1-5, 2014.
92. Fukuda T, Boeckh M, Carter RA, et al. Risks and outcomes of invasive fungal infections in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants after nonmyeloablative conditioning. *Blood*. 102:827-833, 2003.
93. Boivin G, Coulombe Z, Rivest S. Intranasal herpes simplex virus type 2 inoculation causes a profound thymidine kinase dependent cerebral inflammatory response in the mouse hindbrain. *Eur J Neurosci*. 16(1):29-43, 2002.
94. Field H. J, Lay E. Characterization of latent infections in mice inoculated with herpes simplex virus which is clinically resistant to acyclovir. *Antiviral Res*. 4(1-2):43-52, 1984.

95. Andrei G, Fiten P, Froeyen M, De Clercq E, Opdenakker G, Snoeck R. DNA polymerase mutations in drug-resistant herpes simplex virus mutants determine in vivo neurovirulence and drug-enzyme interactions. *Antivir Ther.* 12(5):719-732, 2007.
96. Nyquist A. C, Rotbart H. A, Cotton M, Robinson C, Weinberg A, Hayward A. R, Berens R. L, Levin M. J. Acyclovir-resistant neonatal herpes simplex virus infection of the larynx. *J Pediatr.* 124(6):967-71, 1994.
97. Oram R. J, Marcellino D, Strauss D, Gustafson E, Talarico C. L, Root A. K, Sharma P. L, Thompson, K, Fingerroth, J. D, Crumpacker, C, Herold, B. C. Characterization of an acyclovir-resistant herpes simplex virus type 2 strain isolated from a premature neonate. *J Infect Dis.* 181(4):1458-61, 2000.
98. Levin M. J, Weinberg A, Leary J. J, Sarisky R. T. Development of acyclovir-resistant herpes simplex virus early during the treatment of herpes neonatorum. *Pediatr Infect Dis J.* 20(11):1094-7, 2001.
99. Whitley RJ. Neonatal herpes simplex virus infections. *J Med Virol. Suppl* 1:13-21, 1993.
100. Kimberlin DW, Lin CY, Jacobs RF, et al. Natural history of neonatal herpes simplex virus infections in the acyclovir era. *Pediatrics.* 108:223-229, 2001.
101. Kimberlin DW, Lin CY, Jacobs RF, et al. Safety and efficacy of high-dose

intravenous acyclovir in the management of neonatal herpes simplex virus infections.

Pediatrics. 108:230-238, 2001.

102. Sergerie Y. Delayed but not early glucocorticoid treatment protects the host during experimental herpes simplex virus encephalitis in mice. *J Infect Dis*. 195: 817-825, 2007.

103. Kamei S. Evaluation of combination therapy using acyclovir and corticosteroid in adult patients with herpes simplex virus encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76:1544-1549, 2005.

104. Evans, J. S., K. P. Lock, B. A. Levine, J. N. Champness, M. R. Sanderson, W. C. Summers, P. J. McLeish, and A. Buchan. Herpesviral thymidine kinases: laxity and resistance by design. *J Gen Virol* 79(9):2083-92, 1998.

105. Kussmann-Gerber, S., O. Kuonen, G. Folkers, B. D. Pilger, and L. Scapozza. Drug resistance of herpes simplex virus type 1--structural considerations at the molecular level of the thymidine kinase. *Eur J Biochem* 255:472-81,1998.

106. Vogt, J., R. Perozzo, A. Pautsch, A. Prota, P. Schelling, B. Pilger, G. Folkers, L. Scapozza, and G. E. Schulz. Nucleoside binding site of herpes simplex type 1 thymidine kinase analyzed by X-ray crystallography. *Proteins* 41:545-53, 2000.

表 SI-1; Primers and cycling condition for MPCR

Primer name	Nucleotide sequence (5'-3')	reference
PIV1+	CCGGAATTTCTCATACCTATG	
PIV1-	CTTTGGAGCGGAGTTGTTAAG	
PIV2+	CCATTTACCTAAGTGATGGAAT	
PIV2-	GCCCTGTTGTATTTGGAAGAGA	
PIV3+	ACTCCAAAGTTGATGAAAGAT	
PIV3-	TAAATCTTGTGTTGAGATTG	
hMPV+	CTTTGGACTTAATGACAGATG	
hMPV-	GTCTTCCTGTGCTAACTTTG	

temperature	time	cycles
94 °C	5 min	1
94 °C	30 sec	
50 °C	30 sec	40
72 °C	60 sec	
72 °C	10 min	1

表 SI-2; Primers and cycling condition for HN gene amplification by RT-PCR

Primer name	Nucleotide sequence (5'-3')	reference
P1	ACGCAATCCAACCTACTACTATA	
PR	CTTTGGGAGTTGAACACAGTT	

temperature	time	cycles
42°C	30min	1
95°C	2min	1
94°C	30 s	
58°C	30 s	45
72°C	2min	
72°C	10min	1

表 SII-1; Primers and cycling condition for amplification of vTK gene

Primer name	Nucleotide sequence (5'-3')	reference
S6f	ACAGCGTGCCGACAGATCTTG	
S1r	TATCGACAGAGTGCCAGCCC	

temperature	time	cycles
94	5min	1
94	40sec	
56	30sec	30
72	2min	
72	5min	1

表 SII-2; Primers and cycling condition for amplification of DNA-pol gene

Primer name	Nucleotide sequence (5'-3')	reference
pol-1F	TGCCATCCCACCCAAGCGGC	
pol-3R	GTCTCGTAGTAGTACACGTC	
pol-3F	AGAAGCGCGCGGGGTGCAC	
pol-5R	GCGGTGGTGACAGGTGCGTA	
pol-5F	TGGGGTCGACGCCACCACCC	
pol-7R	GCAGCAGGCACGTAAGACGCC	
pol-7F	GACGGACATTTACAAGGTCC	
pol-9R	TGCGCCAGGAGGTGTTGGAAG	
pol-9F	GCCAGGGTCTTGACCCAC	
pol-11R	AGGTGGGAGAAGTAATAGTCC	
pol-11F	AAGTCTGCTGTTCCGAGCTG	
pol-12R	GCTGTTTTACGACGATACCG	

temperature	time	cycles
99	5min	1
94	2min	1
94	30sec	
55	30sec	25
72	1.5min	
72	5min	1

表 SIII-1; Primers and cycling condition for amplification of vTK gene by nested PCR

Targeted segment (Nt number)	1st PCR		2nd PCR		temperature	time	cycles
	Primer name	Nucleotide sequence (5'-3')	Primer name	Nucleotide sequence (5'-3')			
Full-length (1-1131)	S6f	ACAGCGTGCCGACAGATCTTG	HSV-1TKnF	GCGCCTTGTAGAAGCGCGTATG	94	5min	1
	S1r	TATCGACAGAGTGCCAGCCC	HSV-1TKnR	GGTATTGTCTCCTCCGTGTTTC			
1 (1-216)	S6f	ACAGCGTGCCGACAGATCTTG	HSV-1TKnF	GCGCCTTGTAGAAGCGCGTATG	94	40sec	30
	TKR1	CACCTGCAGTAAGTCATCGG	TKNR1	ACGATATCGTCGCGCAACC			
2 (164-364)	TKF2	GCAAGAAGCCACGGAAGTCC	TKNF2	CCACGCTACTGCGGGTTTATATAG	94	5min	1
	TKR2	CCCAGATGAGGAGCCAGAAC	TKNR2	GCCATTGTTATCTGGGCGCTTG			
3 (340-620)	TKF3	ACAATCGCGAACATCTACACCAC	TKNF3	CCTCGACCAGGGTGAGATATCG	94	45s	30
	TKR3	ATGTGTCTGTCTCCGGAAGG	TKNR3	GATGTTGTGCGGGCAAGG			
4 (543-711)	TKF4	TCTTCGACCCCATCCCATC	TKNF4-2	GCGGATACCTTATGGGCAG	72	45s	1
	TKR4	GCCCCAAACAGGGTAAATAACG	TKNR4-2	GTATTGGCAAGCAGCCGTAAC			
5 (694-954)	TKF5	TCCGGAGGACAGACATCGAC	TKNF5	AGCGCCTTGACCTGGCTATG	94	45s	30
	TKR5	CGGGCATTGGTGTGTAATCC	TKNR5	ATAAGACGTGCATGGGACGGAG			
6 (926-1131)	TKF6	GGGACAGTTATTACCCTGTTTCG	TKNF6	CGCGACCTGTATAACGTTTTC	72	5min	1
	S1r	TATCGACAGAGTGCCAGCCC	HSV-1TKnR	GGTATTGTCTCCTCCGTGTTTC			

表 SIII-2; Primers and cycling condition for inverse PCR in site-directed mutagenesis

Targeted nucleotide substitution	Primer name	Nucleotide sequence (5'-3')	Temperature (°C)	time	cycles
G375T	Q125H-f	ATATAACAATGGGCATGCCTTATGCC	94	2min	1
	Q125H-r	GGGCGCTGTGATTACCAC	98	10sec	
			55	15sec	10
			68	7min	