

**Table I.** Cont'd

No./sex/age, y	Intercellular deposits on DIF	Anti-intercelluar substances on IIF	Type	HHV-8 DNA			
				Lesional skin	PBMCs	Serum IgG	ISP therapy
55/M/47	/	1:1024	PV	/	/	+	×
56/M/36	/	1:64	PV	/	/	-	×
57/F/54	/	1:32	PV	/	/	-	×
58/F/55	IgG, IgA, C3	/	PV	/	/	-	×

C3, Complement 3; DIF, direct immunofluorescence; F, female; HHV, human herpesvirus; IIF, indirect immunofluorescence; ISP, immunosuppressive; M, male; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; PE, pemphigus erythematosus; PF, pemphigus foliaceus; PV, pemphigus vulgaris; PVE, pemphigus vegetans; /, not available; +, positive; -, negative; √, received; ×, not received.

Biotechnology Dalian Co) as recommended by the manufacturer. Retrieved products (5 μL) were digested with 10 U of restriction endonuclease PstI (Gibco-BRL, Gaithersburg, Md) at 37°C for 3 hours. The digests were analyzed on 12% polyacrylamide gels.

**ELISA**

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using HHV-8 open reading frame (ORF) 65 and K8.1 oligopeptides as antigens were undertaken as described previously.<sup>47</sup> A serum dilution of 1:100 was used. HHV-8-specific IgG antibody positive sera that were obtained from patients with HIV-positive KS and distilled water were used as positive and negative controls, respectively. ELISA without coating the oligopeptides was performed to monitor nonspecific reactions. The cut-off value was defined as the mean plus 5 SD of optical density values obtained from control subjects whose PBMCs were negative for HHV-8 DNA in the nested PCR. When 1 of the 3 types of the oligopeptide antigens (ie, ORF65, K8.1, and their mixture) provided positive results in ELISAs, tested serum specimens were considered HHV-8-specific antibody positive.

**Statistical analysis**

The differences in prevalence of HHV-8 DNA or specific IgG antibodies between the pemphigus cases and control subjects were analyzed by chi-square test.

**RESULTS**

**HHV-8 DNA sequence in lesional skin and PBMCs of patients with pemphigus**

After first round PCR, HHV-8 DNA was detected in 2 pemphigus lesional skin biopsy specimens, 1 pemphigus PBMC, and 5 blood donors' PBMCs. After nested PCR, HHV-8 DNA was detected in 13 pemphigus lesional skin biopsy specimens, 4 pemphigus PBMCs, 1 normal skin biopsy specimen, and 18 blood donors' PBMCs (Table II and Fig 1). In all positive cases, PstI digestion generated 138-bp and

**Table II.** Human herpesvirus-8 DNA and specific IgG antibodies in pemphigus and control subjects

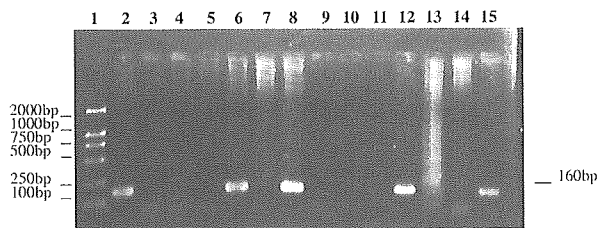
	Pemphigus	Control subjects
DNA in lesional skin	13/36 (36.1%)	1/18 (5.6%)
DNA in PBMCs	4/13 (30.8%)	18/230 (7.8%)
Serum IgG antibodies	10/29 (34.5%)	8/109 (7.3%)

PBMCs, Peripheral blood mononuclear cells.

95-bp fragments from the 233-bp fragment, and 99-bp and 61-bp fragments from the 160-bp fragment, confirming the PCR products were HHV-8 specific (Fig 2). In addition, the presence of HHV-8 DNA in subsets of the specimens was further examined by using a nested PCR assay with a different primer set, and concordant results were obtained in this additional assay (data not shown). Prevalence of HHV-8 DNA detected in lesional skin biopsy specimens and in PBMCs from patients with pemphigus were both statistically higher than those of control subjects (chi-square = 4.35, *P* < .05; chi-square = 5.32, *P* < .05). There was perfect concordance of the PCR results between lesional skin biopsy specimens and PBMCs from the patients with pemphigus (2 positive and 8 negative cases).

**HHV-8-specific IgG antibodies in sera of patients with pemphigus**

Of 29, 10 (34.5%) sera from patients with pemphigus and 8 of 109 (7.3%) blood donors' sera were positive for HHV-8-specific IgG antibodies (Table II). Positive rate of serum IgG antibodies for patients with pemphigus was statistically higher than that of blood donors (chi-square = 12.58, *P* < .005). There was good concordance among ELISAs using the individual ORF65 and K8.1 oligopeptides and their mixture. In addition, the mean and SD of the ELISA optical density values from patients with seropositive pemphigus were 1.36 and 0.38, respectively, whereas those from seropositive control subjects were 0.81 and 0.20, respectively, in the ELISA using both oligopeptides as antigens. In 10 patients tested



**Fig 1.** Amplified 160-bp products by nested polymerase chain reaction. *Lane 1*, DNA marker; *lane 2*, BC-1 DNA (345 ng of total DNA); *lane 3*, negative control; *lanes 4 to 15*, results in some patients.

for both HHV-8 DNA and specific antibodies, all 4 patients who were positive for HHV-8 DNA were also HHV-8 seropositive.

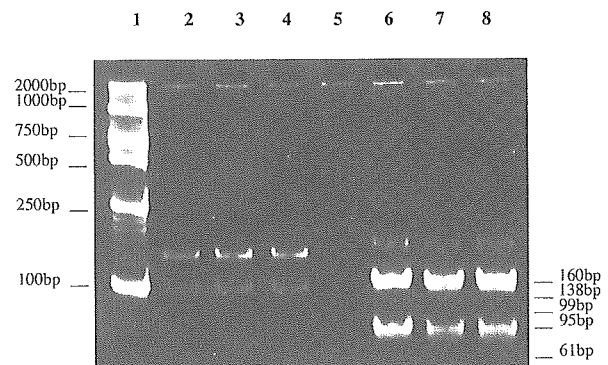
### Insignificance of immunosuppressive therapy and pemphigus types

In the 15 patients who were HHV-8 DNA positive, only 4 received immunosuppressive therapy before their specimens were taken. In addition, in the 6 patients who were positive for both HHV-8 DNA and antibodies, only 3 received an immunosuppressive therapy.

Based on positive detection of either HHV-8 DNA or IgG antibody, HHV-8 infection was found in 14 of 37 cases of PV, 1 of 1 case of pemphigus vegetans, 2 of 4 cases of PF, and 4 of 16 cases of pemphigus erythematous. A statistical analysis of these results did not find any significant difference in the positive rates between PV/pemphigus vegetans and PF/pemphigus erythematous (chi-square = 0.509,  $P > .05$ ).

### DISCUSSION

HHV-8 DNA sequence has been detected in lesional skin biopsy specimens from patients with PV who had neither HIV infection nor KS. Detection of viral DNA in perilesional vascular endothelium and basal keratinocytes, but not in nonlesional skin, of the patients or normal skin of the control subjects suggested an important role of HHV-8 in the onset, development, or both of pemphigus.<sup>35-37</sup> In this study, HHV-8 DNA sequence was detected in 36.1% of the lesional skin biopsy specimens and 30.8% of PBMCs; HHV-8-specific IgG antibodies were detected in 34.5% of sera from patients with pemphigus. A statistical analysis of the results obtained in the two different assays revealed a higher prevalence of HHV-8 infection in patients with pemphigus than in control subjects. In addition, the average IgG titers against HHV-8 of the patients who were seropositive were also higher than those of the control subjects. Of 58, 21 (36.2%) patients were positive for HHV-8 DNA sequence and/or specific



**Fig 2.** *Pst*I-digests of 233-bp and 160-bp products. *Lane 1*, DNA marker; *lanes 2 to 4*, digests of 233-bp products; *lane 5*, negative control; *lanes 6 to 8*, digests of 160-bp products.

IgG antibodies. These results are partly in agreement with the previous reports that described the association of pemphigus with HHV-8, although the HHV-8 prevalence in the patient group of our study was lower than those studies.

Because of the high sensitivity of PCR, there is always an argument whether positive detection is real or a result of cross-contamination in a laboratory. The previous studies demonstrated the specificity of their PCR results by comparing HHV-8 DNA sequences of the PCR products.<sup>35,36</sup> In this study, we took precautions to avoid cross-contamination: extraction of DNA from specimens was undertaken before DNA amplification; each procedure for DNA extraction and for mixing PCR reagents was undertaken in a separate room in which neither virus preparation nor amplification of plasmids encoding the PCR region has been operated previously; positive-displacing pipettes and filtered pipette tips were used; and positive, negative, and internal controls were included in the nested PCR to monitor cross-contamination. Importantly, a nested PCR assay with a different primer set provided consistent results. There was also perfect concordance of the PCR results between lesional skin biopsy specimens and PBMCs in the 10 patients from whom both specimens were obtained. Thus, we do not think that our results represent laboratory cross-contamination. Moreover, we conducted a serologic assay for HHV-8 and confirmed the higher prevalence of HHV-8 infection in the pemphigus group. A high concordance of the results between HHV-8 DNA and specific IgG antibodies in the patients whose DNA and sera were available also argues against the potential PCR contamination.

Several groups reported results inconsistent with ours.<sup>28,38-44</sup> To interpret the discrepancy between the positive and negative findings of HHV-8 association

with pemphigus, some issues should be considered. First, our study demonstrated a higher prevalence of HHV-8 for patients with pemphigus, but the viral components were found only in one third of the patients, indicating that HHV-8 is a contributing rather than a sole or decisive factor. The onset and progression of pemphigus may depend on a combination of genetic and environmental factors, including HHV-8 infection. In other words, HHV-8 prevalence and presence of a risk factor or factors accompanied with the infection may be different among the studied populations. HHV-8 prevalence varies by the risk factors for transmission and by geographic locations.<sup>48</sup> Among healthy individuals worldwide, HHV-8 is more prevalent in Africa than in the United States and northern Europe. In the United States and Europe, HHV-8 transmits predominantly by a sexual route, and some types of behavioral and sexual practices are considered risk factors. In contrast, in Africa, it is likely that most transmission occurs postnatally from mothers to children or between siblings. Although KS is rare in China, the HHV-8 prevalence and the main transmission route in the whole regions of China is not defined yet. Compared with the publications by others, the positive rate of HHV-8 DNA in control subjects of our study was surprisingly high. Interestingly, the HHV-8 seroprevalence in the northwestern area of China was reported very high.<sup>49</sup> Further studies might be useful to examine environmental or behavioral risk factors for activation of HHV-8 lytic infection in the northern parts of China, because a high incidence of nasopharyngeal carcinoma in the southern China exemplified the importance of an environmental factor accompanied with viral infection. Practical issues that may cause the discrepancy include enrollment size, source of materials, and assay methods. Former studies enrolled a relatively small number of patients, and their specimens examined were mainly formalin-fixed and paraffin-embedded.<sup>36,41,44</sup> In our study, a relatively larger number of freshly excised or cryopreserved lesional skin biopsy specimens, PBMCs, and sera were used, which may increase the sensitivity and reliability. Some studies reporting the negative association used latent antigen-based serologic assays.<sup>38,39,44</sup> Although the latent antigen-based assays were useful for KS cases, they were less sensitive than the lytic antigen-based assays for detection of HHV-8 infection in non-KS populations.<sup>50</sup> In our study, we used ELISAs based on the ORF65 and K8.1 oligopeptides, of which performance was good and well-defined.<sup>50</sup>

What is the implication of the higher HHV-8 prevalence in patients with pemphigus? It is possible

that immunosuppressive therapy for autoimmune diseases allows an opportunistic infection or reactivation of HHV-8 as observed in bullous pemphigoid.<sup>51-53</sup> However, HHV-8 DNA sequence was detected in lesional skin from patients with PF and PV who had not received any immunosuppressive therapy.<sup>36</sup> In our study, 14 of 21 patients who were positive for HHV-8 DNA sequence and/or specific IgG antibodies had not received any systemic immunosuppressive therapy before the collection of the specimens, suggesting that HHV-8 infection induced by the therapy is unlikely. In addition, HHV-8 DNA was detected in the lesional biopsy specimens of only 1 of the 3 seropositive cases with the therapy (Nos. 9, 11, and 23), whereas it was detected in all of the 3 seropositive cases without the therapy (Nos. 8, 17, and 22), suggesting that the therapy has little effect on reactivation of latently infected HHV-8 or on proliferation of cells latently infected with HHV-8. It is also possible that pemphigus and HHV-8 infection share common risk factors and that HHV-8 infection is just a bystander of pemphigus. However, an alternative and attractive working hypothesis is that HHV-8 infection contributes to triggering and/or progression of pemphigus. For example, HHV-8 infection could potentially mediate the tissue damage by expressing its cytokine homologs, or by up-regulating cellular factors that contribute to the development of pemphigus. There is some similarity in the involvement of IL-6 in the lesions between HHV-8-associated neoplasms and pemphigus. IL-6 that can act as an autocrine or paracrine growth factor is overexpressed in HHV-8-associated neoplasms.<sup>54-58</sup> Higher IL-6 in sera was reported not only in multicentric Castleman's disease but also for patients with pemphigus,<sup>59,60</sup> and IL-6 and tumor necrosis factor alpha were expressed around the pemphigus blister.<sup>61</sup> HHV-8 encodes viral IL-6 that induced cell proliferation and immune evasion of interferon activity in lymphoma cells<sup>62</sup>; HHV-8 gene products also induce cellular IL-6 synthesis.<sup>63,64</sup> Alternatively, in genetically predisposed patients, HHV-8 infection might enhance the presentation of autoantigen. Cytokines such as interferon gamma produced by virus-activated T lymphocytes might induce the expression of HLA antigen type II antigens on membranes of keratinocytes, and then form immunoreactive structural sites of pemphigus antigen. If it is accompanied with virus infection or reactivation, cytokines may shift from T helper 1 cell type to T helper 2 cell type, with more IL-4 and IL-10 being produced, which further stimulates the antibody response. In this manner, autoantigen chain can be activated, more autoantibodies can be produced, and then pemphigus may be induced

through some cytotoxic effectors and pathogenic autoantibodies.<sup>25,43</sup> To elucidate the role of HHV-8 in the pathogenesis of pemphigus, further studies are necessary. These may include monitoring viral load and immune responses, immunohistochemistry, in situ hybridization and electron microscopic analyses of lesional and nonlesional skin biopsy specimens, and epidemiologic studies to screen risk factors.

In conclusion, higher prevalence of HHV-8 infection in pemphigus was demonstrated in our study, which warrants further studies on the HHV-8 association with the pathogenesis of pemphigus.

We thank Y. Chang for BC-1 cells, T. Spira for HIV positive KS patient sera, C-P. Pong for the HHV-8 oligopeptides, and F. R. Stamey for English-language editing.

#### REFERENCES

- Rucco V, Pisanl M. Induced pemphigus. *Arch Dermatol Res* 1982;274:123-40.
- Amar A, Rubinstein N, Hacham-Zadeh S, Cohen O, Cohen T, Brautbar C. Is predisposition to pemphigus vulgaris in Jewish patients mediated by HLA-Dw10 and DR4? *Tissue Antigens* 1984;23:17-22.
- Scharf SJ, Friedmann A, Brautbar C, Szafer F, Steinman L, Horn G, et al. HLA class II allelic variation and susceptibility to pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:3504-8.
- Ahmed AR, Yunis EJ, Khatri K, Wagner R, Notani G, Awdeh Z, et al. Major histocompatibility complex haplotype studies in Ashkenazi Jewish patients with pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:7658-62.
- Ahmed AR, Wagner R, Khatri K, Notani G, Awdeh Z, Alper CA, et al. Major histocompatibility complex haplotype and class II genes in non-Jewish patients with pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:5056-60.
- Lombardi ML, Mercurio O, Tecame G, Fusco C, Ruocco V, Salerno A, et al. Molecular analysis of HLA DRB1 and DQB1 in Italian patients with pemphigus vulgaris. *Tissue Antigens* 1996;47:228-30.
- Carcassi C, Cottoni F, Floris L, Vacca A, Mulargia M, Arras M, et al. HLA haplotypes and class II molecular alleles in Sardinian and Italian patients with pemphigus vulgaris. *Tissue Antigens* 1996;48:662-7.
- Cerna M, Fernandez-Vina M, Friedman H, Moraes ME, Diaz L, Lo Schiavo A, et al. Genetic markers for susceptibility to endemic Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in Xavante Indians. *Tissue Antigens* 1993;42:138-40.
- Lombardi ML, Mercurio O, Ruocco V, Lo Schiavo A, Lombardi V, Guerrera V, et al. Common human leukocyte antigen alleles in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus Italian patients. *J Invest Dermatol* 1999;113:107-10.
- Petzl-Erlor ML, Santamaria J. Are HLA class II genes controlling susceptibility and resistance to Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem)? *Tissue Antigens* 1989;33:408-14.
- Niizeki H, Inoko H, Narimatsu H, Takata H, Sonoda A, Tadakuma T, et al. HLA class II antigens are associated with Japanese pemphigus patients. *Hum Immunol* 1991;31:246-50.
- Gonzalez-Escribano MF, Jimenez G, Walter K, Montes M, Perez-Bernal AM, Rodriguez MR, et al. Distribution of HLA class II alleles among Spanish patients with pemphigus vulgaris. *Tissue Antigens* 1998;52:275-8.
- Lee CW, Yang HY, Kim SC, Jung JH, Hwang JJ. HLA class II allele associations in Korean patients with pemphigus. *Dermatology* 1998;197:349-52.
- Geng L, Zhai N, Zhang QR, Li B, He WD, Song FJ. Study on association of pemphigus vulgaris of Han nation in North China with HLA-DRB1 alleles [in Chinese]. *Chin J Med Genet* 2000;17:303-4.
- Geng L, Zhai N, Xiao D, Wang LM, Song FJ, Chen H-D. Study on association of pemphigus vulgaris of Han nation in North China with HLA-DQB1 alleles [in Chinese]. *Chin J Dermatol* 2000;33:277.
- Ahmed AR, Rosen GB. Viruses in pemphigus. *Int J Dermatol* 1989;28:209-17.
- Ruocco V, Wolf R, Ruocco E, Baroni A. Viruses in pemphigus: a casual or casual relationship? *Int J Dermatol* 1996;35:782-4.
- Krain LS. Pemphigus, epidemiologic and survival characteristics of 59 patients, 1955-1973. *Arch Dermatol* 1974;110:862-5.
- Nabai H, Rahabari H. Multinucleated epithelial cells in pemphigus vulgaris: possible association of viral infection. *J Am Acad Dermatol* 1980;2:175-6.
- Ogilvie MM, Kessler M, Leppard BJ, Goodwin P, White JE. Herpes simplex infection in pemphigus: an indication for urgent viral studies and specific antiviral therapy. *Br J Dermatol* 1983;109:611-3.
- Negosanti M, Cevenini R, Ghetti P, Fanti PA, Gasponi A, Tosti A. Severe gingivostomatitis associated with pemphigus vulgaris. *Arch Dermatol* 1984;120:540-2.
- Grunwald MH, Katz I, Friedman-Bimba R. Association of pemphigus vulgaris and herpes simplex virus infection. *Int J Dermatol* 1986;25:392-3.
- Takeshita TT. Bilateral herpes simplex virus keratitis in a patient with pemphigus vulgaris. *Clin Exp Dermatol* 1996;21:291-2.
- Markitziu A, Pisanty S. Pemphigus vulgaris after infection by Epstein-Barr virus. *Int J Dermatol* 1993;32:917-8.
- Ruocco V, Rossi A, Satriano RA, Sacerdoti G, Astarita PM. Pemphigus foliaceus in a hemophilic child: cytomegalovirus induced? *Acta Derm Venereol* 1982;62:534-7.
- Schlupen EM, Wollenberg A, Hanel S, Stumpfenhausen G, Volkenandt M. Detection of herpes virus simplex in exacerbated pemphigus vulgaris by polymerase chain reaction. *Dermatology* 1996;192:312-6.
- Takahashi I, Kobayashi TK, Suzuki H, Nakamura S, Tezuka F. Coexistence of pemphigus vulgaris and herpes simplex virus infection in oral mucosa diagnosed by cytology, immunohistochemistry, and polymerase chain reaction. *Diagn Cytopathol* 1998;19:446-50.
- Tufano MA, Baroni A, Buommino E, Ruocco E, Lombardi ML, Ruocco V. Detection of herpesvirus DNA in peripheral blood mononuclear cells and skin lesions of patients with pemphigus by polymerase chain reaction. *Br J Dermatol* 1999;141:1033-9.
- Yonus J, Ahmed AR. The relationship of pemphigus to neoplasia. *J Am Acad Dermatol* 1990;23:498-502.
- Gili A, Ngan BY, Lester R. Carstleman's disease associated pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 1991;25:955-9.
- Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi sarcoma. *Science* 1994;266:1865-9.
- Ablashi DV, Chatlynne LG, Whitman JE Jr, Cesarman E. Spectrum of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, or human herpesvirus 8, diseases. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:439-64.
- Moore PS, Chang Y. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. In: Fields B, Knipe D, Howley P, editors. *Field's virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippencott-Raven Publishers; 2001. p. 2803-33.
- Blauvelt A. The role of human herpesvirus 8 in the pathogenesis of Kaposi's sarcoma. *Adv Dermatol* 1999;14:167-207.

35. Memar OM, Rady PL, Goldblum RM, Tyring SK. Human herpesvirus-8 DNA sequences in a patient with pemphigus vulgaris, but without HIV infection or Kaposi sarcoma. *J Invest Dermatol* 1997;108:118-9.
36. Memar OM, Rady PL, Goldblum RM, Yen A, Tyring SK. Human herpesvirus 8 DNA sequences in blistering skin from patients with pemphigus. *Arch Dermatol* 1997;133:1247-51.
37. Jang HS, Oh CK, Lim JY, Jun ES, Kim YS, Kwon KS. Detection of human herpesvirus 8 DNA in pemphigus and chronic blistering skin diseases. *J Korean Med Sci* 2000;15:442-8.
38. Dupin N, Franck N, Calvez V, Gorin I, Grandadam M, Huraux JM, et al. Lack of evidence of human herpesvirus 8 DNA sequences in HIV-negative patients with various lymphoproliferative disorder of the skin. *Br J Dermatol* 1997;136:827-30.
39. Dupin N, Marcelin AG, Gorin I, Bossi P, Franck N, Weill B, et al. Prevalence of human herpesvirus 8 infection measured by antibodies to a latent nuclear antigen in patients with various dermatologic diseases. *Arch Dermatol* 1998;134:700-2.
40. Kohler S, Kamel OW, Chang PP, Smoller BR. Absence of human herpesvirus 8 and Epstein-Barr virus genome sequences in cutaneous epithelial neoplasms arising in immunosuppressed organ-transplant patients. *J Cutan Pathol* 1997;24:559-63.
41. Cathomas G, Stalder A, Regamey N, Erb P, Itin PH. No evidence of HHV-8 infection in patients with pemphigus vulgaris/foiaceus. *Arch Dermatol* 1998;134:1162.
42. Cohen SS, Weinstein MD, Herndier BG, Anhalt GJ, Blauvelt A. No evidence of human herpesvirus 8 infection in patients with paraneoplastic pemphigus, pemphigus vulgaris, or pemphigus foliaceus. *J Invest Dermatol* 1998;111:781-3.
43. Dupin N, Macerlin AG, Calvez V, Andr C. Absence of link between human herpesvirus 8 and pemphigus. *Br J Dermatol* 1999;141:154-79.
44. Bezold G, Sander CA, Flaig MJ, Peter RU, Messer G. Lack of detection of human herpesvirus (HHV)-8 DNA in lesional skin of German pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus patients. *J Invest Dermatol* 2000;114:739-41.
45. Cesarman E, Moore PS, Rao PH, Inghirami G, Knowles DM, Chang Y. In vitro establishment and characterization of two acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma cell lines (BC-1 and BC-2) containing Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like (KSHV) DNA sequences. *Blood* 1995;86:2708-14.
46. Saiki RK, Scharf S, Faloon F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230:1350-4.
47. Spira TJ, Lam L, Dollard SC, Meng Y-X, Pau CP, Black JB, et al. Comparison of serologic assays and PCR for diagnosis of human herpesvirus 8 infection. *J Clin Microbiol* 2000;38:2174-2180.
48. Martin J. Diagnosis and epidemiology of human herpesvirus 8 infection. *Semin Hematol* 2003;40:133-42.
49. Dilnur P, Katano H, Wang ZH, Osakabe Y, Kudo M, Sata T, et al. Classic type of Kaposi's sarcoma and human herpesvirus 8 infection in Xinjiang, China. *Pathol Int* 2001;51:845-52.
50. Corchero JL, Mar EC, Spira TJ, Pellett PE, Inoue N. Comparison of serologic assays for detection of antibodies against human herpesvirus 8. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8:913-21.
51. Trattner SS, Hodak E, David M, Sandbank M. The appearance of Kaposi's sarcoma during corticosteroid therapy. *Cancer* 1993;72:1779-83.
52. Gaspari AA, Marchese S, Powell D, Rady PL, Tyring SK. Identification of HHV-8 DNA in the skin lesions of Kaposi sarcoma in an immunosuppressed patient with bullous pemphigoid. *J Am Acad Dermatol* 1997;37:843-7.
53. Sato-Matsumura KC, Matsumura T, Nabeshima M, Katano H, Sata T, Koizumi H. Serological and immunohistochemical detection of human herpesvirus 8 in Kaposi's sarcoma after immunosuppressive therapy for bullous pemphigoid. *Br J Dermatol* 2001;145:633-7.
54. Aoki Y, Tosato G, Fonville TW, Pittaluga S. Serum viral interleukin-6 in AIDS-related multicentric Castleman disease. *Blood* 2001;97:2526-7.
55. Drexler HG, Meyer C, Gaidano G, Carbone A. Constitutive cytokine production by primary effusion (body cavity-based) lymphoma-derived cell lines. *Leukemia* 1999;13:634-40.
56. Foussat A, Wijdenes J, Bouchet L, Gaidano G, Neipel F, Balabanian K, et al. Human interleukin-6 is in vivo an autocrine growth factor for human herpesvirus-8-infected malignant B lymphocytes. *Eur Cytokine Netw* 1999;10:501-8.
57. Oxholm A, Oxholm P, Permin H, Bendtzen K. Epidermal tumour necrosis factor alpha and interleukin 6-like activities in AIDS-related Kaposi's sarcoma: an immunohistological study. *APMIS* 1989;97:533-8.
58. Miles SA, Rezai AR, Salazar-Gonzalez JF, Vander Meyden M, Stevens RH, Logan DM, et al. AIDS Kaposi sarcoma-derived cells produce and respond to interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:4068-72.
59. D'Auria L, Bonifati C, Mussi A, D'Agosto G, De Simone C, Giacalone B, et al. Cytokines in the sera of patients with pemphigus vulgaris: interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels are significantly increased as compared to healthy subjects and correlate with disease activity. *Eur Cytokine Netw* 1997;8:383-7.
60. Ameglio F, D'Auria L, Cordiali-Fei P, Trento E, D'Agosto G, Mastroianni A, et al. Anti-intercellular substance antibody log titres are correlated with serum concentrations of interleukin-6, interleukin-15 and tumor necrosis factor-alpha in patients with pemphigus vulgaris relationships with peripheral blood neutrophil counts, disease severity and duration and patients' age. *J Biol Regul Homeost Agents* 1999;13:220-4.
61. Lopez-Robles E, Avalos-Diaz E, Vega-Memije E, Hojyo-Tomoka T, Villalobos R, Fraire S, et al. TNF alpha and IL-6 are mediators in the blistering process of pemphigus. *Int J Dermatol* 2001;40:185-8.
62. Chatterjee M, Osborne J, Bestetti G, Chang Y, Moore PS. Viral IL-6-induced cell proliferation and immune evasion of interferon activity. *Science* 2002;298:1432-5.
63. An J, Lichtenstein AK, Brent G, Rettig MB. The Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) induces cellular interleukin 6 expression: role of the KSHV latency-associated nuclear antigen and the AP1 response element. *Blood* 2002;99:649-54.
64. Roan F, Inoue N, Offermann MK. Activation of cellular and heterologous promoters by the human herpesvirus 8 replication and transcription activator. *Virology* 2002;301:293-304.

## Lack of Human Herpesvirus 8 Infection in Lungs of Japanese Patients with Primary Pulmonary Hypertension

Harutaka Katano,<sup>1</sup> Kinji Ito,<sup>2</sup> Kazutoshi Shibuya,<sup>2</sup> Tsutomu Saji,<sup>3</sup> Yuko Sato,<sup>1</sup> and Tetsutaro Sata<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology, National Institute of Infectious Diseases, and Departments of <sup>2</sup>Pathology and <sup>3</sup>Pediatrics, School of Medicine, Toho University, Tokyo, Japan

Samples of lung tissue, taken at autopsy, from 10 Japanese patients with primary pulmonary hypertension (PPH) and samples of lung tissue from 12 Japanese patients with secondary pulmonary hypertension were tested for the presence of human herpesvirus 8 (HHV-8). All samples from patients with PPH contained plexiform lesions around pulmonary arterial vessels, but immunohistochemistry failed to detect the HHV-8–encoded latency-associated nuclear antigen. HHV-8 DNA could not be amplified by polymerase chain reaction for the HHV-8–encoded K1 and KS330<sub>233</sub> genes in any sample. These data suggest that HHV-8 infection is not associated with PPH in Japanese patients.

Primary pulmonary hypertension (PPH) is a rare disease that leads to severe right heart failure, which is characterized histologically by vascular lesions in the lung and the proliferation of endothelial cells and smooth muscle cells in the pulmonary arterial walls; these conditions then induce luminal obstruction, resulting in elevation of pressure in the pulmonary arteries. Some cases of PPH are associated with genetic mutations in bone morphogenetic protein receptor 2 (BMP2) [1]. Recently, human herpesvirus 8 (HHV-8)—also known as Kaposi sarcoma (KS)—associated herpesvirus—was identified, by polymerase chain reaction (PCR), in 10 of 16 samples of lung tissue from patients with PPH, and the expression of latency-associated nuclear antigen (LANA), encoded by HHV-8, was detected, by immunohistochemistry, in the vascular “plexiform” lesions in these patients’ lungs, suggesting an association between HHV-8 and

the pathogenesis of PPH [2]. Because only 2 of these 10 HHV-8–positive patients had BMP2 mutations, HHV-8 infection did not correlate with BMP2 mutations in these patients [2].

HHV-8 is categorized as a gamma herpesvirus [3], and the seroprevalence of HHV-8 varies geographically. HHV-8 has a high seroprevalence in the general population in African countries (40%) and in southern European countries (10%), but a low prevalence has been suggested in the United States (3%) and in Asian countries, including Japan (1.4%) [4]. HHV-8 has been detected in KS, primary effusion lymphoma (PEL), and some cases of multicentric Castleman disease (MCD) [3]. HHV-8–encoded LANA is always expressed in the cells of KS and PEL, suggesting an HHV-8 infection in the latent phase. In contrast, not only LANA but also other lytic antigens of HHV-8 are expressed in the cells of MCD, implying that it has a different pathogenesis than do KS and PEL [5]. LANA, however, plays an important role in the pathogenesis of KS and PEL [3]. The histological features of the plexiform lesions of PPH—proliferation of spindle-shaped cells with vascular slits—resemble the histological features of KS [2]. Although mutations of BMP2 have been detected in some isolated cases of PPH and in some cases of familial PPH in Japan [6], the pathogenesis of most cases of PPH is still unknown. In the present study, we investigated the presence of HHV-8 in the lung tissue from 10 Japanese patients with PPH and from 12 Japanese patients with secondary pulmonary hypertension (SPH).

**Subjects, materials, and methods.** During 1981–2003, 10 Japanese patients with PPH underwent autopsy at Toho University Hospital in Tokyo, Japan, and samples of their lung tissue were taken for analysis; samples of lung tissue were also taken from 12 Japanese patients, living in the Tokyo area, who had SPH and were not infected with HIV (table 1). The mean age of the patients with PPH was 23.4 years (range, 0–51 years), and the mean age of the patients with SPH was 31.4 years (range, 0–83 years). Immunohistochemistry was performed to investigate the expression of LANA on cells of lung tissue, as described elsewhere [5]. A rabbit polyclonal antibody to LANA (dilution, 1:3000 [5]) and a rat monoclonal antibody to LANA (dilution, 1:3000; Advanced Biotechnologies) were used as primary antibodies. Samples of KS tissue obtained from additional patients were used as positive controls. For PCR analysis, DNA was extracted from samples of lung tissue that were fixed in formalin and embedded in paraffin. DNA from a sample of KS tissue obtained from an additional patient was used as a positive control, and DNA from a sample of healthy skin obtained from an additional patient was used as a negative control [5]. PCR

Received 21 April 2004; accepted 30 June 2004; electronically published 25 January 2005.  
Financial support: Ministry of Health, Labor, and Welfare, Japan (grants-in-aid for scientific research).

Reprints or correspondence: Dr. Harutaka Katano, Dept. of Pathology, National Institute of Infectious Diseases, Toyama 1-23-1, Shinjuku, Tokyo 162-8640, Japan (katano@nih.go.jp).

*The Journal of Infectious Diseases* 2005;191:743–5

© 2005 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.  
0022-1899/2005/19105-0014\$15.00

**Table 1. Characteristics of the study population and results of polymerase chain reaction (PCR) and immunohistochemistry (IHC).**

Patient	Age, years	Sex	No. of paraffin blocks tested	Diagnosis	K1, by nested PCR	KS330 <sub>233</sub> , by PCR	$\beta$ -globin, by PCR	No. of plexiform lesions	LANA, by IHC
1	29	M	3	PPH	—	—	+	124	—
2	41	M	3	PPH	—	—	+	50	—
3	0	F	3	PPH	—	—	+	103	—
4	39	F	3	PPH	—	—	+	81	—
5	0	F	1	PPH	—	—	+	18	—
6	21	F	5	PPH	—	—	+	119	—
7	16	F	3	PPH	—	—	+	24	—
8	24	M	3	PPH	—	—	+	110	—
9	13	F	2	PPH	—	—	+	41	—
10	51	F	2	PPH	—	—	+	42	—
11	61	M	1	SPH (ASD)	—	—	+	10	—
12	51	M	1	SPH (gastric cancer)	—	—	+	30	—
13	0	F	1	SPH (ECCD)	—	—	+	6	—
14	1	M	1	SPH (TGA)	—	—	+	20	—
15	1	F	2	SPH (DS, ASD, VSD)	—	—	+	39	—
16	8	M	1	SPH (ECCD)	—	—	+	0	—
17	0	F	1	SPH (DS, ASD, VSD)	—	—	+	0	—
18	83	F	1	SPH (RA)	—	—	+	21	—
19	47	F	2	SPH (ASD)	—	—	+	102	—
20	59	M	1	SPH (MI)	—	—	+	15	—
21	18	F	1	SPH (ASD, VSD)	—	—	+	6	—
22	48	M	1	SPH (ALS)	—	—	+	48	—

**NOTE.** For patients with secondary pulmonary hypertension (SPH), the primary condition (or related conditions) is listed in parentheses. ALS, amyotrophic lateral sclerosis; ASD, atrial septal defect; DS, Down syndrome; ECCD, endocardial cushion defect; LANA, latency-associated nuclear antigen; MI, myocardial infarction; PPH, primary pulmonary hypertension; RA, rheumatoid arthritis; TGA, transposition of great arteries; VSD, ventricular septal defect; —, not detected; +, detected.

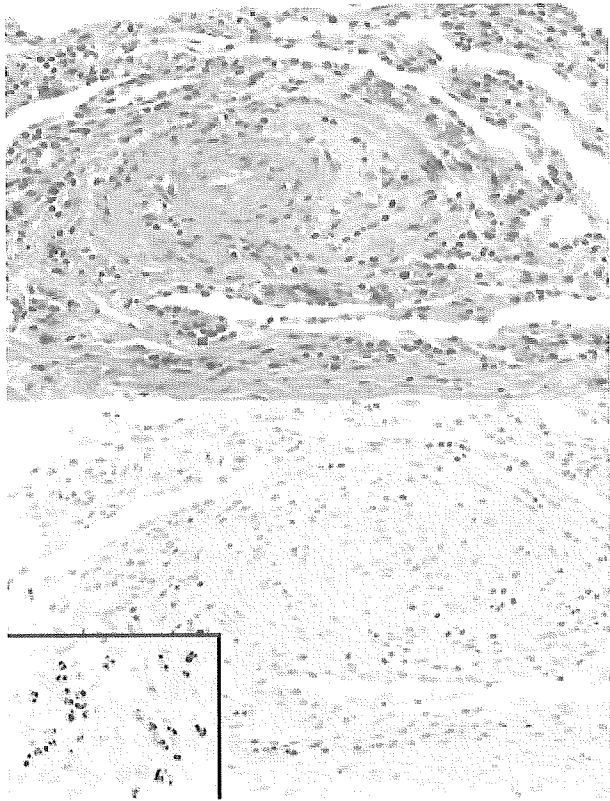
was performed, as described elsewhere [7], to detect the KS330<sub>233</sub> gene of HHV-8 (HHV-8–encoded ORF26). Nested PCR was performed to detect the K1 gene of HHV-8. For the first round of nested PCR, the external primer pair K1SF (forward primer, 5'-TTGTGCCCTGGAGTGATT-3') and K1SR (reverse primer, 5'-CAGCGTAAAATTATAGTA-3') was used to amplify a 363-bp fragment of the K1 gene of HHV-8 [8]. The conditions for the first round of PCR were 1 cycle at 94°C for 4 min, followed by 35 cycles at 94°C for 1 min, 58°C for 1 min, and 72°C for 2 min. For the second round of PCR, the inner primer pair K1VR1F1 (forward primer, 5'-TTGCCAATATCCTGGTAT-TGC-3') and K1VR1R1 (reverse primer, 5'-CAAGGTTTGTAAGACAGGTTG-3') was used to amplify a 162-bp fragment of the K1 gene; the same conditions as in the first round of PCR were used. The  $\beta$ -globin gene was amplified as a control, as described elsewhere [7].

**Results.** To investigate whether HHV-8 was present in the samples of lung tissue from patients with PPH, we first performed immunohistochemistry to detect LANA. Staining with hematoxylin-eosin revealed that all samples from patients with PPH had characteristic plexiform lesions in their pulmonary arteries (figure 1). In samples from patients with PPH, 18–124 plexiform lesions were tested (table 1). Some samples from

patients with SPH also had plexiform lesions. Immunohistochemistry by use of 2 antibodies to LANA revealed that LANA was not present in any sample obtained from patients with either PPH or SPH (table 1), whereas LANA was detected as a dot-like nuclear staining pattern in samples of KS tissue obtained from control patients (figure 1). Although sclerosing lesions and proliferation of endothelial cells and smooth muscle cells around vessels were observed in the plexiform lesions, LANA was not present. To confirm the results of the immunohistochemistry, we extracted DNA from the samples of lung tissue and performed PCR. Both PCR amplification for the KS330<sub>233</sub> gene of HHV-8 and nested PCR amplification for the K1 gene of HHV-8 failed to detect HHV-8 DNA in all samples (table 1). The control gene  $\beta$ -globin was detected in all samples. These data and the results of the immunohistochemistry suggest that the patients with PPH did not have HHV-8 infection.

**Discussion.** In the present study, we have demonstrated that 10 Japanese patients with PPH and 12 Japanese patients with SPH did not have HHV-8 infection. Although we used testing procedures similar to those employed by Cool et al. [2, 9]—immunohistochemistry and PCR—our results were completely different from theirs.

Patients with PPH are found worldwide. Only 50% of patients



**Figure 1.** Plexiform lesions in lung tissue from a patient with primary pulmonary hypertension. *Top*, Lung tissue stained with hematoxylin-eosin. *Bottom*, Detection of latency-associated nuclear antigen (LANA) by immunohistochemistry. *Inset*, Expression of LANA (dot-like nuclear staining pattern) in Kaposi sarcoma from a positive control patient.

with familial PPH have BMPR2 mutations, and no BMPR2 mutations have been detected in patients with isolated cases of PPH. Because HHV-8 was not detected in 6 of the 16 patients with PPH whom Cool et al. studied, the authors suggested that BMPR2 mutations and HHV-8 infection were not correlated [2]. The present study has demonstrated that all 10 Japanese patients with PPH were negative for HHV-8 infection. Although we were unable to examine the seropositivity of the patients with PPH, in a study published elsewhere, we demonstrated that the seroprevalence of HHV-8 was low (1.4%) in the general population in Japan [4]. These data suggest that PPH might be induced by causative factors other than HHV-8 infection and BMPR2 mutations. Therefore, it is possible that the pathogenesis of PPH in Japan is different from that of PPH in the United States. Other genetic backgrounds, modifier genes, or other pathogens may be associated with cases of PPH in Japan.

The sensitivity and methods used in the present study, however, were different from those used by Cool et al. [2]. Our immunohistochemistry succeeded in detecting LANA in all cases of KS, regardless of the stage of disease or the patient's HIV infection status, and the results of immunohistochemistry

correlated well with those of PCR [5]. Cool et al. detected LANA not only in the cells within plexiform lesions but also in bronchoepithelial cells and in inflammatory cells, including lymphocytes and macrophages [2, 9], but we were not able to detect LANA in any cells of the samples obtained from patients with PPH. LANA has been detected only in the nuclei of KS cells and not in surrounding cells, including epithelial cells, lymphocytes, and macrophages, even in samples of lung tissue from patients with KS [5]. To date, HHV-8 has been detected, by PCR, in patients with various diseases, but immunohistochemistry has yielded positive results only in samples from patients with KS, PEL, MCD, and some solid lymphomas [10, 11]. Recently, a low seroprevalence of antibodies to HHV-8 in patients with PPH in Germany was reported, suggesting that HHV-8 infection is rarely involved in the pathogenesis of PPH [12]. Further studies are required to clarify the strict association between HHV-8 infection and PPH.

## References

- Deng Z, Morse JH, Slager SL, et al. Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *Am J Hum Genet* **2000**; *67*:737-44.
- Cool CD, Rai PR, Yeager ME, et al. Expression of human herpesvirus 8 in primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* **2003**; *349*: 1113-22.
- Moore PS, Chang Y. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields virology*. 4th ed. Vol. 2. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, **2001**:2803-33.
- Katano H, Iwasaki T, Baba N, et al. Identification of antigenic proteins encoded by human herpesvirus 8 and seroprevalence in the general population and among patients with and without Kaposi's sarcoma. *J Virol* **2000**; *74*:3478-85.
- Katano H, Sato Y, Kurata T, Mori S, Sata T. High expression of HHV-8-encoded ORF73 protein in spindle-shaped cells of Kaposi's sarcoma. *Am J Pathol* **1999**; *155*:47-52.
- Uehara R, Suzuki H, Kurokawa N, et al. Novel nonsense mutation of the BMPR-II gene in a Japanese patient with familial primary pulmonary hypertension. *Pediatr Int* **2002**; *44*:433-5.
- Katano H, Sato Y, Sata T. Expression of p53 and human herpesvirus 8 (HHV-8)-encoded latency-associated nuclear antigen (LANA) with inhibition of apoptosis in HHV-8-associated malignancies. *Cancer* **2001**; *92*:3076-84.
- Zong JC, Ciufu DM, Alcendor DJ, et al. High-level variability in the ORF-K1 membrane protein gene at the left end of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome defines four major virus subtypes and multiple variants or clades in different human populations. *J Virol* **1999**; *73*:4156-70.
- Cool CD, Rai PR, Voelkel NE. HHV-8 in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* **2004**; *350*:195.
- Katano H, Sato Y, Kurata T, Mori S, Sata T. Expression and localization of human herpesvirus 8-encoded proteins in primary effusion lymphoma, Kaposi's sarcoma, and multicentric Castlemann's disease. *Virology* **2000**; *269*:335-44.
- Katano H, Suda T, Morishita Y, et al. Human herpesvirus 8-associated solid lymphomas that occur in AIDS patients take anaplastic large cell morphology. *Mod Pathol* **2000**; *13*:77-85.
- Henke-Gendo C, Schulz TE, Hoepfer MM. HHV-8 in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* **2004**; *350*:194-5.



## 19 保存臍帯より先天性サイトメガロウイルス感染症が診断された難聴乳幼児の聴力像

○馬場陽子<sup>1)2)</sup>、小川 洋<sup>2)</sup>、大森孝一<sup>2)</sup>

1) 福島県総合療育センター 耳鼻咽喉科、

2) 福島県立医科大学 医学部 耳鼻咽喉科

### 【はじめに】

先天性サイトメガロウイルス (CMV) 感染症による難聴は、アメリカでの20万例のスクリーニング検査のデータから、乳幼児の聴覚障害の原因の約30%を占めるといわれているが、出生直後に CMV 抗体の検査を受けていない児については、原因不明の感音難聴として経過観察されている。しかし、旭川医科大学小児科、福島県立医科大学微生物学のグループによって開発された、保存臍帯から PCR 法で CMV 遺伝子を検出する方法を用い、診断可能となった。そこで、福島県総合療育センターにて経過観察中の難聴乳幼児の保存臍帯から先天性 CMV 感染の有無について検査を行い、陽性例の聴力像について若干の文献的考察を加え報告する。

### 【対象と方法】

平成16年11月から平成17年4月までの6ヶ月間に当センター通院中の難聴児33症例につき臍帯提供の同意を得られた。33例の保存臍帯を PCR 法にて検索したところ8例に CMV の DNA が検出された。その内2例については先天性 CMV 感染症の診断が出生時にすでに確定していたため、今回臍帯検査により先天性 CMV 感染が判明した6例につき現病歴や検査成績聴力の経過についてまとめた。

### 【結果】

症例1 H11.9.27生 5歳9ヶ月 女 診断：両感音難聴、脳性麻痺、精神発達遅滞  
経過：40週 2344g、吸引分娩にて出生。定頸7ヶ月、寝返り8ヶ月と運動発達の遅れを認め、当センター小児科を受診した。頭部 CT では脳の萎縮、脳室拡大を認めたため CP (脳性麻痺) として経過観察されていた。MRI 所見では皮質下白質に広範多発生に異常信号像を認めた。1歳9ヶ月時に肺炎に罹患してから音に対する反応が悪くなり、2歳1ヶ月時の ABR は両側 100dB 無反応であった。3歳7ヶ月時に聾学校幼稚部に入学。4歳6ヶ月時 ASSR 施行。両耳 120dB 以上の結果であった。MR のため遊聴力検査は不能で、5歳9ヶ月の COR は 100dB 以上であり難聴の診断が確定してからは聴力の変化は認めていない。

症例2 H12.8.2生 4歳9ヶ月 女 診断：両感音難聴、精神発達遅滞  
経過：子宮内胎児発育遅延を認め、37週 1816g にて出生。出生時胎便吸引症候群、低 Ca 血症、低血糖の診断で NICU に入室した。頭部 CT では両側シルビウス裂拡大、両側脳室近傍微小石灰化を認めた。重度の MR であり4歳1ヶ月時の発達指数は37である。聴力については3歳時に初めて ABR 検査が行われ、左 V 波閾値 100dB、右 110dB 無反応であったため難聴と診断された。ASSR による推定聴力は左 90dB、右 100dB 以上であった。4歳9ヶ月時の遊聴力検査の結果は平均聴力レベル (4分法) で左 100dB、右 110dB である。補聴器を3歳10ヶ月から使用し、現在は養護施設に通園している。

症例3 H14.3.21生 3歳3ヶ月 男 診断：両感音難聴 精神運動発達遅滞  
経過：38週 3006g 自然分娩にて出生。出生時の AABR にて 70dB 両側 REFER であった。5

ヶ月で未定額であったため当センター小児科受診。頭部 CT、MRI にて軽度の脳萎縮を認め、津守稲毛式発達検査で DQ42 であり精神運動発達遅滞として経過観察されていた。2 歳 6 ヶ月時聴力についての精査のため当科紹介となる。ABR 両側 110dB 無反応、ASSR 推定聴力両側 120dB 以上、COR100dB 以上の結果であった。2 歳 8 ヶ月ごろより補聴器の装用指導を開始し経過観察中である。

症例 4 H14.12.21 生 2 歳 6 ヶ月 男 診断：両感音難聴

経過：周産期異常なく出生。1 歳 8 ヶ月頃から発語がなくなり聞こえの悪い様子が見られ、耳鼻咽喉科を受診、ABR 左 100dB 無反応、右 V 波閾値 70dB であったため感音難聴を疑われ当科を紹介され受診。COR80dB、ASSR による推定聴力は左 120dB 以上、右 90dB であった。頭部と側頭骨 CT では異常所見は見られなかった。2 歳 3 ヶ月より補聴器装用開始し、経過観察中である。

症例 5 H16.4.30 生 1 歳 2 ヶ月 男 診断：両感音難聴

経過：音への反応が不良であるため 11 ヶ月時受診。ABR 両側 110dB 無反応、ASSR による推定聴力左 110dB、右 120dB 以上。COR100dB。1 歳 1 ヶ月より補聴器の装用指導開始し、現在経過観察中である。

症例 6 H16.5.26 生 1 歳 1 ヶ月 女 診断：両感音難聴

経過：周産期異常なし。生後 6 ヶ月までは音に対する反応を認めていたが、その後音に対する反応がなくなったことを家族が心配し、耳鼻咽喉科を受診、ABR 両側 105dB 無反応であったため当科紹介となる。COR は 100dB 以上、ASSR による推定聴力は左 110dB、右 120dB 以上であった。頭部、側頭骨 CT では異常所見を認めなかった。1 歳 1 ヶ月より補聴器の装用指導を開始し経過観察中である。

#### 【まとめ】

当科で経過観察中の先天性 CMV 感染症と診断された難聴児 6 例中 3 例は進行性難聴であり、6 例はすべて 100dB 以上の高度難聴であった。6 例中 3 例に精神運動発達遅滞を認めしたが、他の 3 例は難聴のみが先天性 CMV 感染症の症状であった。これらは先天性 CMV 感染症による難聴は出生時にはなく持続するウィルスの増殖により生後難聴が出現する場合があること、難聴のみが症状として出現する場合があるとの過去の報告と一致していた。

小児の感音難聴の原因としては 50% が遺伝性、25% が非遺伝性、25% が原因不明といわれているが、今回の保存臍帯を用いた検査で先天性 CMV 感染の割合が 33 例中 8 例あったことから、20% 程度が先天性 CMV 感染によるものと推察された。

# 抗体医薬は植物で

矢野 明 国立保健医療科学院

竹腰正隆 東海大学医学部

抗体医薬は植物で作らしましょう。

これは、べつに筆者らが  
いい出したことではない。

植物の遺伝子組換えにどちらかといえば否定的で、  
情報流通が偏っている日本ではあまり知られていないが、  
北米を中心に始動しているバイオ産業の一潮流である。

ここでは、この産業動向と  
筆者らの研究について簡単に紹介したい。

## 抗体医薬とは？

前世紀を抗生物質やワクチンが感染症をコントロールした時代だとすると、今世紀はゲノムに象徴される生命科学とバイオテクノロジーを駆使して、さまざまな疾病を治療する時代となるだろう。実際、バイオテクノロジーの進展は医療を確実に変えつつある。その技術の一つが抗体医薬である。

抗体は免疫系で欠かせないタンパク質の一つである。一度インフルエンザに罹ると、同じインフルエンザウイルスが来ても感染しないのは、流行しているウイルスに特異的に結合する抗体をもつようになるからだと考えられる。抗体はさまざまな物質に特異的に結合することで、中和したり、ほかの免疫担当細胞へ貪食させたりする役目を担っている。抗体は形質細胞と呼ばれる細胞によって産生されるが、一つの形質細胞は1種類の抗体しか作らない。ヒトの体内には膨大な種類の形質細胞があり、状況に応じて必要な抗体を産生する形質細胞が増殖して対応するしくみになっている。抗体が認識するのは

ナノメートルオーダーの物質表面であり、がん細胞や病原体の弱点ともいえる部位を特異的に認識する抗体があれば、これを薬として使える。

細胞工学は特定の抗体を産生する形質細胞を選択し（モノクローン化）これを不死化して培養することで、単一抗体（モノクローナル抗体）の量産を可能にした。はじめモノクローナル抗体の技術はマウスにおいて確立されたが、ヒトの免疫系はマウス抗体を異物として認識してしまうため、そのままヒト用の薬品として使うことはむずかしい。ヒトに薬として投与するには、ヒト抗体が理想的なのだ。遺伝子工学はマウス由来のモノクローナル抗体遺伝子をヒトの遺伝子の一部組換える（キメラ化）、またはすべて組換える（ヒト化）ことで、ヒトの薬として使用することを可能にした。これが抗体医薬である。近年の抗体医薬の躍進には目覚ましいものがある。

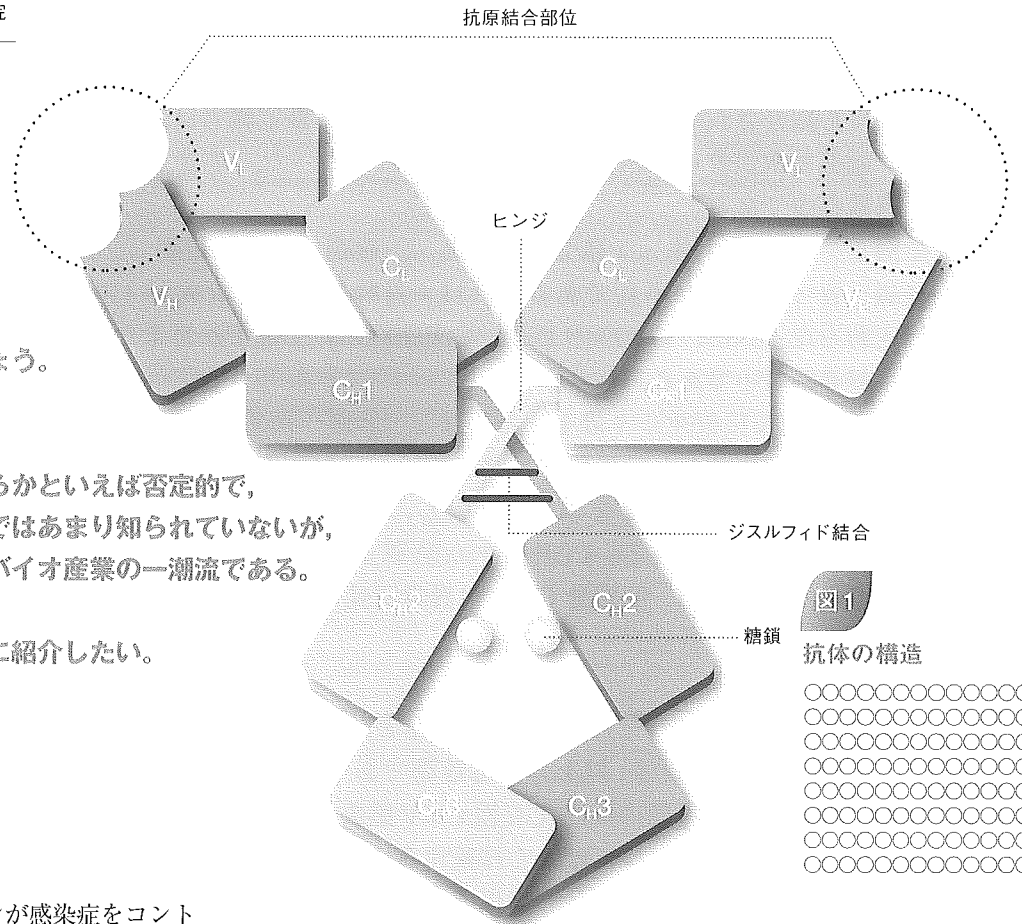


表1 世界で臨床応用されている抗体医薬

	抗体名 (商品名)	認可年	抗原	適応症
ジェネンテック社 (米)	Bevacizumab (Avastin)	2004	VEGF	転移性大腸がん
バイオジェン・アイデック社 (米)	Natalizumab (Tysabri)	2004	a4 インテグリン	多発性硬化症
イムクローン・システムズ社 (米)	cetuximab (Erbix)	2004	EGF 受容体	大腸がん
セロノ・インターナショナル社 (スイス)	efalizumab (Raptiva)	2003	LFA-1	乾癬
コルシキア社 (米)	tositumomab (Bexxar)	2003	CD20	B 細胞性リンパ腫
ジェネンテック社 (米) ノバルティス社 (スイス) タノックス社 (米)	Omalizumab (Xolair)	2003	IgE	気管支喘息
アボット社 (米)	Adalimumab (Humira)	2002	TNFα	関節リウマチ
バイオジェン・アイデック社 (米)	Ibritumab (Zevalin)	2002	CD20	B 細胞性リンパ腫
ミレニアムファーマシューティカルズ社	Alemtuzumab (Campath)	2001	CD52	白血病
セルテック社 (英)	Gemtuzumab (Mylotarg)	2000	CD33	急性骨髄性白血病
ジェネンテック社 (米)	Trastuzumab (Herceptin)	1998	HER2	乳がん
ノバルティス社 (スイス)	Basiliximab (Simulect)	1998	IL-2 受容体	腎移植後拒絶反応
メドイミュン社 (米)	Palivizumab (Synagis)	1998	RS ウイルス	ウイルス感染
セントコア社 (米)	Infliximab (Remicade)	1998	TNFα	クローン病、関節リウマチ
プロテイン・デザイン・ラブズ社 (米)	Daclizumab (Zenepax)	1997	IL-2 受容体	腎移植後拒絶反応
バイオジェン・アイデック社 (米)	Rituximab (Rituxan)	1997	CD20	B 細胞リンパ腫
セントコア社 (米)	Abciximab (ReoPro)	1994	gpIIb/IIIa	冠動脈拡張術後再狭窄

世界で臨床応用されている抗体は 10 種強にすぎないが、(表 1) 臨床試験中の抗体は百種を超える勢いである。

### 不足する製造設備

現在臨床応用されている抗体製剤は、すべては乳類培養細胞、CHO 細胞\*1 を用いて生産されている。つまり、ヒト型に組換えたキメラ抗体やヒト化抗体遺伝子を CHO 細胞に導入して作っているのである。CHO 細胞の培養に用いるタンク設備は 2 億 5 千から 4 億 5 千ドルする。通常培養には無血清培地を使用するが、成長ホルモンなどの高価な血清成分が必要である。製品バルクは 1 グラムあたり 300 ~ 1000 ドル、これらを使用する患者の年間負担は平均 1 万ドルだという。現在世界の抗体生産能力は製薬業界の努力で毎年増強されているが、新薬の開発スピードはそれを上回る。2001 年の時点で、少なくとも 50 種のタンパク質製剤が Phase III にあり、Phase I, II を含めると抗体医薬は 85 種に上る。FDA は 2006 年までに抗体を含めた 35 のタンパク質製剤が市場に登場し、その後 2010 年まで毎年 6 から 8 種のタンパク質製剤が誕生するとの予想をしている<sup>(1)</sup>。さて、これらの開発製造コストを回収しようと新薬は世界に流通するであろうが、超高齢化で厳しい局面にある日本の医

療財政はどうなってしまうのだろうか。抗体生産のために何らかのブレイクスルーが必要とされている。

組換えインスリンのように大腸菌で作らせればいいのではないかと考える人もいるかもしれない。しかし大腸菌にとって、抗体は複雑で大きすぎるタンパク質である。2 本の重鎖と 2 本の軽鎖が正確に会合する必要がある、重鎖の一部には糖鎖が付加されなくてはならない(図 1)。大腸菌では不溶化しやすい上に、糖鎖を付加することもできない。では、酵母なら抗体を作れるのではないかと。確かに酵母は抗体を産生するための宿主の候補に入るが臨床試験に入ったものなどがあるかどうか、われわれは情報をもたない。工業的に利用されている酵母の多くは、抗体に付加される糖鎖構造がヒトと大きく異なり、実用的な生産にはさらなる研究開発が必要なのである。

その他、ヒト抗体産生法として、ヒト抗体遺伝子を導入した遺伝子組換え動物がある。ヒト抗体遺伝子を導入した牛などの家畜に、抗体を生産させるもので、特に乳に抗体を分泌させて抗体の回収の簡便化をはかろうとするものである。開発途上にあり、実用化されるかどうかは今後の動向を見守る必要がある。

意外に思われるかもしれないが、植物による抗体の産生は現実的な解決策として認識され、大手

\*1 CHO 細胞  
チャイニーズ・ハムスター・卵巣由来の培養細胞。抗体などのタンパク質の生産以外にも、バイオ研究のさまざまな場面で利用されている。

表2 世界で臨床応用されている抗体医薬

組織	プラットフォーム	対象
アグロソーマ・バイオサイエンス社 (カナダ) www.agrisoma.com	ACE システム (遺伝子導入-発現プラットフォーム)	高機能穀物 (工業用, 医療用タンパク質)
バイエル・クロップサイエンス社 (多国籍) www.bayercropscience.com	植物全般	抗体
バイオレックス社 (米) www.bioplex.com	浮き草	インターフェロン, 抗体等
シーアイジービー (キューバ) www.cigb.edu.cu	タバコ	抗体
コベントバイオテック社 (デンマーク) www.cobento.dk	シロイヌナズナ	トランスコバラミン
ダウ・アグロサイエンス社 (米) www.dowagro.com	植物細胞	抗体, ワクチン, 感染症, 自己免疫疾患,
イーアールエイ・プランテック社 (スペイン) www.eraplantech.com	様々な植物のプロテインボディ	生産性向上支援
フラウンホーファー・アイエムイー (ドイツ) www.ime.fraunhofer.de	タバコ, どうもろこし, 米, 小麦, トマト, 植物培養細胞	抗体, ワクチン, 酵素, がん, 感染症
グリーンオベーション・バイオテック社 (ドイツ) www.greenovation.com	コケ	抗体等
アイコンジェネティクス社 (ドイツ) www.icongenetics.com	タバコ, ニコチアナ属, ほうれん草, 赤かぶ	感染症, がん, 酵素, ワクチン, 抗体,
ウイルス学研究所 (アルゼンチン)	アルファルファ	家畜用ワクチン
ケンタッキー・タバコ研究開発センター (米) www.uky.edu/ktrdc	タバコ, ニコチアナ属	タバコによる医薬品製造企業のサポート, 栽培法の確立等
ラーズスケールバイオロジー社 (米) www.lsbcc.com	ニコチアナ属	酵素, ヒト及び動物用ワクチン, がん
マルタジェンフォーシャング (ドイツ) www.maltagen.com	大麦	ラクトフェリン, アルブミン, ワクチン
メディカゴ社 (カナダ) www.medicago.com	アルファルファ	血清タンパク質, 抗体
メリステム・セラピューティクス社 (フランス) www.meristem-therapeutics.com	どうもろこし, タバコ	リパーゼ, コラーゲン, ラクトフェリン等
ネクスジェンバイオテクノロジー社 (韓国) www.nexgenbiotech.com	タバコ, メロン, キュウリ	検査用抗原等
オーアールエフ・ジェネティクス社 (アイスランド) www.orfgenetics.com	大麦, レタス	成長ホルモン, プロテアーゼ, 抗体, ワクチン
プラネットバイオテクノロジー社 (米) www.planetbiotechnology.com	タバコ	抗体
プランテクノ社 (イタリア) www.planttechno.com	米, 小麦, トマト, どうもろこし, ポプラ, 大麦等	酵素, ファイトレメディエーション
プランチゲン社 (カナダ) www.lhsc.on.ca/plantigen	タバコ	サイトカイン等
プラントリサーチインターナショナル (オランダ) www.plant.wageningen-ur.nl	様々な植物種に適応可能なプラットフォーム	抗体, ワクチン, DDS
プロディジーン社 (米) www.prodigene.com	どうもろこし	酵素, その他
マレーシア・ゴム研究所 (マレーシア)	ゴムの木	アルブミン
スクリプス研究所 (米)	藻	抗体
セムバイオシス・ジェネティクス社 (カナダ) www.sembiosys.com	サフラワー	医療用タンパク質, インスリン, 動物用ワクチン等
スノール・モルキュラー社 (米) www.sunolmolecular.com	レタス, アラビドプシス	抗体
シンジェンタ社 (スイス) www.syngenta.com/en/biopharma	サフラワー	抗体, 酵素等
ユニクロップ社 (フィンランド) www.unicrop.fi	ナズナ	抗体, アルブミン, 酵素
ベントリア・バイオサイエンス社 (米) www.ventria.com	米, 大麦	ラクトフェリン, リゾチウム

製薬企業をはじめ、化学、穀物メジャー、バイオベンチャーなど、多くの企業が抗体をはじめとするタンパク質製造設備としての研究開発を多数おこなっているのである(表2)。不思議なことに、遺伝学上ヒトと大きく離れている植物は、タンパク質上にヒトとよく似た構造の糖鎖を付加できる。さらに植物は生態学的には生産者に位置づけられており、さまざまな物質生産を得意とする。学术界に植物で抗体を産生することを広めた Julian KC Ma 博士の2003年のレビュー<sup>(2)</sup>では、植物培養細胞を用いた生産系のコストは、大腸菌や酵母などの生産系と同程度、植物体を用いた生産系ならば、これらを大きく上回る低コストな生産が可能だと結論付けている。何しろ植物は光、二酸化炭素、水、その他栄養素から抗体を生産することができるのである。

## 血清からモノクローナル抗体へ

現在の抗体医薬ブームはモノクローナル抗体製剤の登場によって1990年代に始まった。がん治療や

慢性関節炎などの治療薬が有名だが、呼吸器疾患を引き起こすRSVというウイルスに対する中和モノクローナル抗体も実用化されている。実は感染症やヘビ毒に関しては、ブームよりずっと前から抗体が使用されている。毒蛇にかまれたとき、ヘビ毒を中和することができる抗体を大量に含んだ馬血清が投与される。また麻疹の重症小児患者、急性B型肝炎の治療に高ガンマグロブリン製剤が使われるが、これらガンマグロブリン製剤は麻疹ウイルスやB型肝炎ウイルスに対する抗体を多く含むヒトの血清から作られているものである。抗体は毒素やウイルスを中和し、発症や感染を抑える。エボラ出血熱などの新興感染症においても回復期の患者の血清が治療に用いられている。このように、血清やガンマグロブリン製剤という形で使われてきたのだが、いまやこれらの製剤も培養タンクや、さらには植物で生産できる可能性が出てきた。

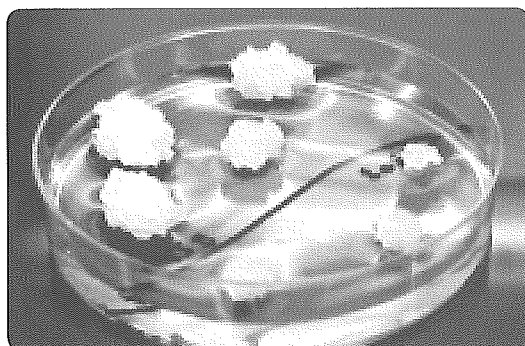
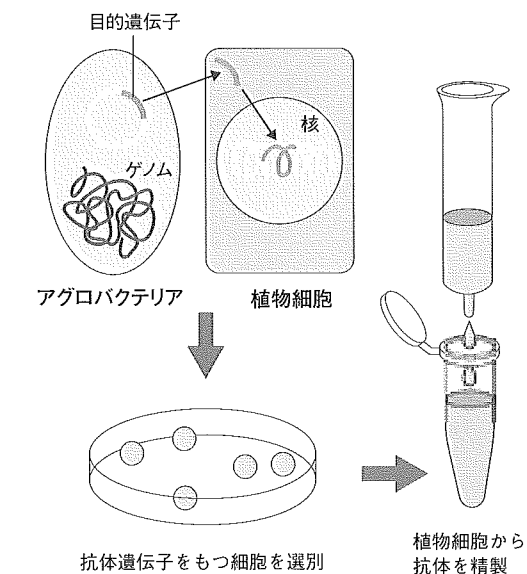
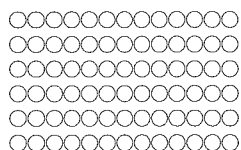
昨年6月、われわれは植物細胞でB型肝炎ウイルスに対するヒト抗体を生産したという論文を出版した<sup>(3)</sup>。B型肝炎ウイルスは血液などを介して出産時の母子間、性交渉などによって感染する。日本ではワクチンやガンマグロブリン製剤の使用により母子間の感染はほとんどなくなっているが、感染者は数百万人存在する。アジア諸国でも感染防止プログラムが進行中であるが、感染者は数億人規模で存在するといわれる。われわれの植物抗体は世界のB型肝炎ウイルスのコントロールに役立つ可能性がある。ただし1種類の抗体のみを使用すると、その抗体から逃れるエスケープミュータントが出現しやすいことがB型肝炎ウイルスでは報告されているため、数種の肝炎抗体を生産する必要がある。動物培養細胞を用いたモノクローナル抗体を複数混合したB型肝炎ウイルス用カクテル製剤については、欧米ですでに臨床試験が始まっている。しかし抗体の数が多いとよりコストがかかり、どの程度の価格で流通可能であるか注目している。われわれも、カクテル製剤化に向けて研究を進めている。

## 植物抗体の作り方

抗体の遺伝子を植物細胞に導入すれば抗体ができる。不思議な感じもするが、本当である。われわれはもっとも一般的な植物への遺伝子導入方法であるアグロバクテリウム法によって抗体遺伝子をタバコ培養細胞の染色体上に組込んだ。もちろん抗体遺伝子とともに遺伝子発現効率に優れたプロモーターな

図2

### 植物細胞による抗体の作製手順



抗体を産生する植物細胞

どを導入する必要がある、植物抗体開発を進める各企業や研究者はさまざまな工夫を凝らして抗体産生量を上げようとしている。抗体がヒトの体内で作られるときは、抗体遺伝子が転写、翻訳されたのち、小胞体、ゴルジ体などの細胞内小器官を輸送される。重鎖と軽鎖が重合し、糖鎖修飾を受け、細胞外の血液やリンパ液、粘膜分泌液中などに分泌される。したがって植物の細胞においても分泌経路を経て産生する必要がある。

抗体の前駆体タンパク質には、抗体本体のアミノ酸配列に加え20残基程度の分泌シグナル配列(リーダー配列)がある。これが抗体前駆体を分泌経路に導く。ヒトのリーダー配列も植物で問題なく働くことが多数の報告から経験的に明らかだが、われわれは植物細胞で分泌効率が高いことがわかっている植物のタンパク質由来のシグナル配列を使用することなどにより、抗体産生効率の向上をこころみた。その結果タバコ培養細胞1Lあたり最高16mgという多量のヒトB型肝炎ウイルス抗体を得ることができた。植物の場合、分泌経路をへて生産される抗体の多くは細胞壁領域に蓄積していると考えられるが、細胞壁は硬く回収は困難な作業である。われわれは最終的にモーターホモジナイザーを使った機械的な破碎によってタンパク質を回収したが、細胞の破碎が十分でなかったり、逆に破碎作業が長引き抗体が失活してしまったりとトラブルが多かった。16mgというのはあくまで最高値であり、6回調製した中で一番良かった値である。抗体産生後の処理も含め、トータルな生産系開発は今後の課題である。

## 糖鎖修飾が抗体医薬製造のカギ

ヒト細胞が作る抗体と植物細胞が作る抗体に違いはないのか? 唯一の違いは糖鎖修飾である。抗体の定常領域には糖鎖が付加される部位が存在し、分泌過程においてマンノースやキシロース、フルクトース、ガラクトースなどの糖が付加される。糖鎖はさまざまな分泌タンパク質において、その生理活性にかかわっているが、抗体の場合、主として安定性向上に貢献していると考えられている。糖鎖は生物種によってその形が異なる。ヒトと、マウス、牛、豚など、同じ哺乳類の間にも違いがあり、植物とヒトの糖鎖も違いがある。ヒトにはない $\alpha$ 1,3- フコースや $\beta$ 1,2- キシロースの存在が知られているが、複合糖鎖の基本骨格はヒトに近い。植物にヒトのガラクトース転移酵素を導入すると、ヒト型に非常に近い

# 植物製医薬 Plant-Made

## Plant-Made Pharmaceuticals (PMP) とは?

**植**物由来の薬は珍しいものではない。漢方薬の多くは植物を加工したものであるし、西洋でも植物を薬として利用することは非常に古くからおこなわれてきたことである。植物由来の抗がん剤、タキソールやビンブラスチン等、植物の二次代謝産物を薬として利用することが多かったが、近年のバイオテクノロジーは、人間が病気と闘うために体内で作っている抗体や血中タンパク質、酵素などを、植物に生産させ医薬品として供給することを可能にした。バイオテクノロジーが生み出した植物由来の医薬品をPMPと呼ぶ。

現在、Society for Moleculture (<http://www.opmp2005.org>) という国際業界団体がPMP製造のためのmolecular farming(分子農業)手法に関して活発に意見交換をおこなっている。Moleculture(モルカルチャー)という言葉は、真核生物及びその細胞(主として

植物や動物)の組換え技術を、ヒトや動物の健康のために役立て、工業原料の生産やバイオレメディエーションなどに応用することをさす。この団体はモルカルチャーに関する情報の普及、産業育成などを目的とし、欧米の製薬会社や植物バイオベンチャーを始め、一般には途上国と分類されている国からも企業や研究機関が参加している。残念ながら日本からの加盟団体はない。日本で組換え植物が普及しないのに対し、途上国は組換え技術の普及に熱心だ。食糧増



糖鎖が産生されたという報告もあり<sup>(4)</sup>、糖鎖を含めた完全ヒト型の抗体を植物によって産生できる可能性は十分ある。一方で、ヒト培養細胞を用いた抗体産生においても、培地中に動物由来の糖鎖タンパク質が含まれていると、動物型の非ヒト型糖鎖が付

# Pharmaceuticals

産はもちろん、医薬品製造も低コストで可能になる希望の技術だ。

食べても安全な除草剤耐性タンパク質の遺伝子などを導入した食用の遺伝子組換え作物とは違い、医師の処方箋を必要とする医薬品を遺伝子組換え技術によって生産するPMPの分子農業をめぐって、さまざまな意見がある。毒性が低い食用作物を医薬品製造にも積極的に使っていこうとする意見。食用作物の使用は避け、他の作物や培養系などを利用すべきという意見等々。これらの議論を背景に分子農業における最新の技術トレンドは大きく2つあるようだ。ひとつは、生態学上のより厳密なセーフティー技術の確立、もう一つは

セーフティー技術が不要な新しい生産系の開発である。生産コストが最も低いと考えられる野外、開放系での医薬品生産においては、農地の場所、用いる植物種の選定、物理的隔離など栽培上の工夫のほかに、雄性不稔技術、つまり花粉をつくらない技術など、遺伝学的な遺伝子拡散防止技術適用が考えられている。また、個々の医薬品栽培品種にバーコードの役割を持つ遺伝子マーカーを付け、モニタリングを容易にする技術等も出てきている。一般的には gene use restriction technology (GURT) と呼ばれる技術群であり、医薬品製造以外の分野でも重要になるかもしれない。

加されることから、こと糖鎖のヒト化技術に関して植物系は、他の発現系と比して大きく遅れているわけではないと考えている。

われわれは、う蝕（いわゆる虫歯）の病原細菌である *S. mutans* を認識する Fab 抗体の産生にも成功している。肝炎ウイルス抗体のカクテル化、サイトメガロウイルス中和抗体なども準備中であり今後の研究の進展を以て、さまざまな感染症や生活習慣病に有用な治療薬、予防薬などのツールを提供できると考えている。

## 先を行く欧米

植物抗体に対する取り組みは、欧米諸国、とくに早くから組換え作物の導入に成功したカナダやアメリカが大きくリードしている。アメリカは2002年農務省、医薬品食品局の関係機関共同で植物抗体などの植物が製造する医薬品 (PMP: Plant-Made Pharmaceuticals: コラム参照) 製造に関するガイドラインを発表し、2003年にはPMP生産試験に関する政府広報<sup>(5)</sup>を公表するなど、PMP実現のための環境を着実に整えつつある。産業界側の米バイオインダストリー協会もこれを後押ししている。PMPに関連する基本技術や人材は大学発であり、産官学が連携し産業を興している。

さて医薬品は植物に作らせようと、動物培養細胞に作らせようと、cGMP<sup>\*2</sup>という規格に則って製造されなければならない。これは臨床薬であれば当たり前のことであり、すべての医薬品は同様の規格によって製造される。PMPの特徴は、医薬原料が植物という点である。原料生産に関してのさまざまなリスクを科学的に検証し、一つ一つ対策を立てていくリスクベースのアプローチがおこなわれている。食品とは違い、医師の処方箋を必要とする薬を生産するのであるから安全性第一のガイドラインを産官で推進している。実際の組換え植物封じ込め対策は、食品製造に使用されている、HACCPの考え方を踏襲し発展させたCACCP(封じ込め解析と要所管理法)が採用されている。細かい規定は栽培種などによっても異なるようだが、基本は物理的隔離であり、50フィートの緩衝地帯、近隣の畑との1マイル以上の距離、開花時期を一ヶ月他の畑とずらす、などが含まれるようである。また、工作機械や収穫保存倉庫などはPMP専用のものを使うことや、農務省のトレーニングを受けたものが農耕をおこなうなど細かい規定も見られる。このような取

\* 2  
cGMP  
Current Good Manufacturing Practices の略。医薬品や医療機器を製造する際の要件をまとめた、品質管理、製造管理基準。



り組みの下、アメリカでおこなわれている PMP 臨床試験の一例は表 3 のとおりである。

## 注目の植物医薬企業

日本では医薬品関連植物バイオテクノロジーの動きは鈍い。著者らを含め世界の動きから取り残されがちであるというのが正直なところだ。このような現状をふまえ、PMP 実現のため安全を大前提とした日本独自のアプローチ、たとえば食用作物を用いない、閉鎖系を第一候補とする、培養細胞を利用するなど、をみつけなくてはならないと感じている<sup>(6)</sup>。以下は、日本でも実現可能と思われる、優れた戦略をもつ注目企業を簡単に紹介する。

### ◆Biolex, Inc. (<http://www.biolex.com>)

植物 (Plant) と抗体 (Antibody) を合わせた造語、植物抗体 (PlantibodyTM) という登録商標で有名な Epicyte Pharmaceutical, Inc. を 2004 年 5 月に買収したノースカロライナ州にある有力バイオベンチャー企業。もともと LEX systemTM という独自技術を持ち、さまざまな医薬用タンパク質生産を得意としていた。Epicyte 社は組換え抗体の雄である Scripps 研究所よりスピナウトしたベンチャーで、植物抗体の基本特許を有していた。LEX system は単性生殖によって旺盛に増殖する組換え浮き草 Lemna を用いた生産系である。花粉や種子などの拡散の心配がなく、生産スケールの調整も容易である。PlantibodyTM 技術との融合により、根からの分泌生産を可能にしたことで、タンパク質回収も低コストで可能である。Bayer, Johnson&Johnson, Dow の各系列会社と関係が深く、すでに 10 種以上の臨床試験向け医薬品を各社へ提供している。

### ◆Greenovation 社 (<http://www.greenovation.com>)

組換えこけ (moss) によるタンパク質生産技術をもつドイツ企業。コケは高等植物と違い相同組換えという遺伝子組換え法を容易に用いることができる。したがって特定遺伝子の不活化 (ノックアウト個体の創出) により、コケ特有の糖鎖付加をなくし、ヒト型糖鎖修飾を施したヒトタンパク質の産生ができる。完全ヒト化抗体はもちろん、a1,6-フコースを除いたヒト抗体を産生することで、より高い ADCC 活性を発揮する抗体を産生することも可能<sup>\*3</sup>。大腸菌や培養細胞のように培養

表 3 アメリカで臨床試験が進む PMP

臨床試験	試験主体	植物種	対象疾患
第二相	モンサント社 ラーズスケールバイオロジー社 ブラネットバイオテクノロジー社 サンフランシスコ歯科大学	とうもろこし タバコ タバコ	大腸がん B 細胞性リンパ腫 う蝕
第一相終了	メリステム・セラピューティクス社 プロディーン社 + 国立衛生研究所 (NIH)	とうもろこし とうもろこし	膵臓胞性線維症 Travelers' Disease

タンク内での生育で大量生産をおこなうため、花粉や種子の拡散がない。大腸菌などの培養と異なるところは、貧栄養状態、つまり水と、ミネラル、多少の炭水化物と光だけで培養可能であること。組換えタンパク質は培養液中に分泌させ回収する。現在、30mg/L/day の産生能力を達成しているという。

植物抗体を始めとする PMP に関して日本は大きく出遅れているのが、早急に彼らの技術や戦略を分析し、適応していくべきであろう。

〈謝辞〉本研究は、厚生労働科研費の成果を含んでおり、ここに深く感謝の意を表します。

## Profile

矢野 明 (やの あきら)

大学の卒業研究でヒトのがん遺伝子を扱っていたとき、世界にとって重要な割には植物について何も知らないこと (今でも知らないことの方が多い) に気づき、植物の研究室へ進学した。博士課程では植物の耐病機構を調べていたが、就職してヒトの耐病機構=免疫関連の研究をすることになった。経験を生かし、植物細胞で抗体を作っている。最近は主にペプチドワクチンの基礎研究を行っている。

竹腰正隆 (たけこし まさたか)

ヘルペスウイルスの 1 種であるサイトメガロウイルスが専門。抗ウイルス剤が効きにくいいためファージディスプレイ法での中和抗体の開発に没頭し Fab 抗体を得た。ウイルスの中和には立体障害の大きなホール抗体が有利なので、植物によるホール抗体の産生に傾く。健康の改善につながるならどんな技術でも取り入れて研究を進める覚悟だが、この分野での日本の遅れが気がかりである。安価に医療用タンパク質を生産できる植物系を普及させたい。

[1] 米バイオテクノロジー工業会ホームページ/植物製医薬 (<http://www.bio.org/healthcare/pharmaceutical/pmp/>)

[2] Ma JK, Drake PM, Christou P: "The Production of recombinant pharmaceutical proteins in plant" Nature Reviews Genetics 4 (2003)794-805

[3] Yano A, Takekoshi M: "Transgenic tobacco cells producing the human monoclonal antibody to hepatitis B virus surface antigen" Journal of Medical Virology 73 (2004)208-215

[4] Palacpac NQ, Yoshida S, Sakai H, Kimura Y, Fujiyama K, Yoshida T, Seki T: "Stable expression of human  $\beta$  1,4-galactosyltransferase in plant cells modifies N-linked glycosylation patterns" Proc Natl Acad Sci USA 96(1999) 4692-4697

[5] Federal Register 68 (2003)11337-11340

[6] Expert Opin Biol Ther 4 (2004)1565-1568

### III. $\beta$ ヘルペスウイルス—ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) と ヒトヘルペスウイルス 6, 7 (HHV-6, 7)—

#### $\beta$ ヘルペスウイルス感染症発症機構

#### CMV の先天性感染機構

Mechanisms of congenital CMV infection

野澤直樹 井上直樹

**Key words** : 流産, 胎盤, 栄養膜細胞層, モルモット CMV, ワクチン

#### はじめに

HCMV による先天性感染は出生児数百人に 1 人という高頻度で起こり, それに伴う感染症も深刻である。本稿では, 胎児への感染機構および先天性感染を防ぐ唯一の方法となるワクチンの開発状況について述べる。

#### 1. 正常胎盤構造

CMV 先天性感染機構の理解に必要なヒト胎盤構造の模式図を示した(図 1)。胎盤組織は母体の血液中に浮いた形をとる自由絨毛(floating villi)と子宮壁内へ入り込んで胎盤を固定する固定絨毛(anchoring villi)から構成される。これらは栄養膜細胞層(cytotrophoblast)と呼ばれる特殊な細胞の分化の結果として形成される。自由絨毛表面の栄養膜細胞層は融合により多核の合胞体栄養細胞層(syncytiotrophoblast)へと分化し, 母体の血液とコンタクトする。固定絨毛内の栄養膜細胞層は単一の細胞のまま細胞柱(cell column)を形成し子宮壁と接した後, 子宮内膜(endometrium)内へ侵入し, 子宮筋層(myometrium)へと達する。そこで子宮動脈(uterine artery)の一部を突破し, 再形成により一体化する。妊娠中期には侵襲性の栄養膜細胞層が動脈

の一部と置き換わり, 胎児側と母体側が混成した脈管構造(vasculature)をとる。妊娠に伴い形成される子宮内膜を含めた組織を脱落膜(decidua)と呼ぶ。

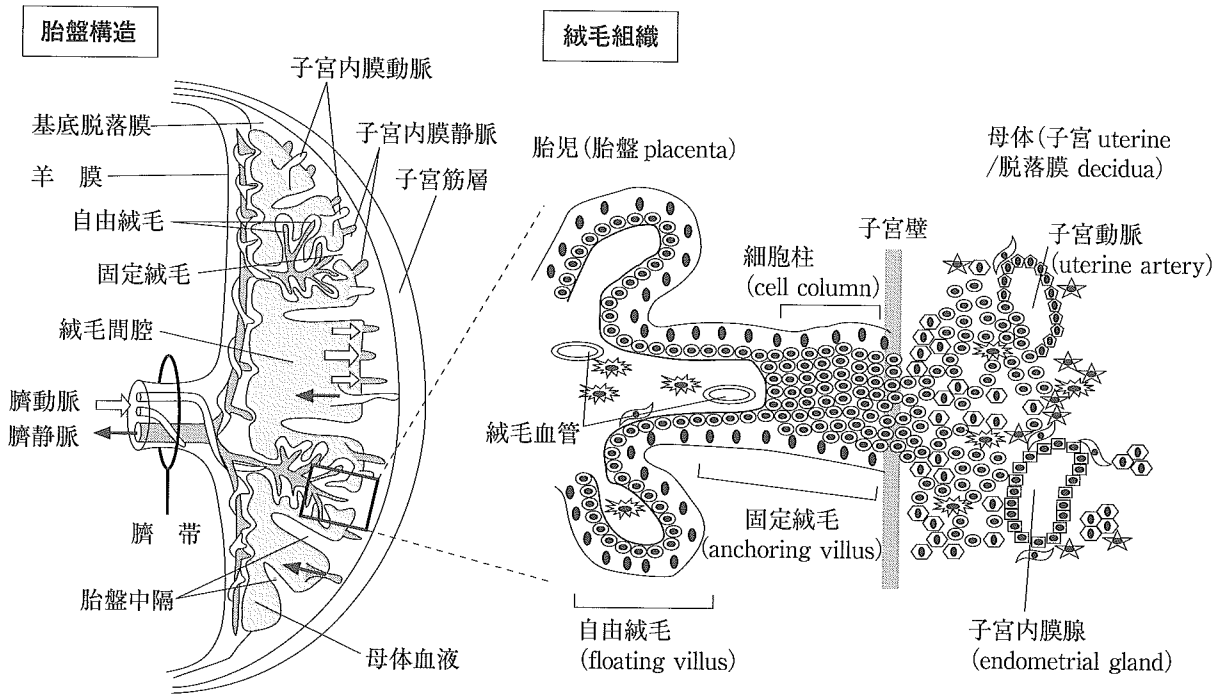
#### 2. CMV 先天性感染解析モデル

先天性感染機構の研究のアプローチとしては, ①初代培養細胞を用いたモデル, ②流産検体の生体試料の解析, ③感染動物モデル, がある。

##### a. 初代培養細胞 (*in vitro* モデル)

胎盤組織の培養系では, 栄養膜細胞層で CMV 感染・増殖はみられるが, 線維芽細胞と比べ増殖が遅く, フリーウイルスの放出量も低い<sup>1)</sup>。最近, 内皮細胞指向性を保持する臨床分離株を用いた実験により, 分化中の栄養膜細胞層への CMV 感染は cell-free のウイルス粒子もしくはウイルス感染した血管内皮細胞を介してのみ成立し, ウイルス感染した好中球を介しては成立しないことが明らかにされた<sup>2)</sup>。極性化した血管内皮細胞は apical 面からのみウイルスが感染することから, 胎盤組織の感染源としては血管から浸潤してきた CMV 感染好中球によるものではなく, 子宮動脈まで侵襲し血管内皮細胞を介して感染した栄養膜細胞層である可能性が考えられる。

Naoki Nozawa, Naoki Inoue: Department of Virology, National Institute of Infectious Diseases 国立感染症研究所 ウイルス第 1 部



細胞種類	感染パターン1	感染パターン2	感染パターン3
★ ナチュラルキラー細胞	—	—	—
◊ 樹状細胞	±*	±*	±*
☀ マクロファージ・樹状細胞	±*	±*	±*
⊖ 子宮動脈	+++	—	—
⊖ 子宮内膜腺	+++	++	—
⊖ 脱落膜細胞	+++	++	+
⊖ 栄養膜細胞層	+++	—	—
● 合胞体栄養細胞層	++*	±*	±*

\*gB 陽性の小胞がマクロファージや樹状細胞，合胞体栄養膜細胞層にも検出される。これらは貪食されたウイルス蛋白であり，ウイルス産生を示すものではない。

図1 ヒトの胎盤構造とCMV感染パターン

CMVに感染した栄養膜細胞層では  $\alpha 1\beta 1$  インテグリン発現が抑制される。また，CMVがコードするヒトIL-10ホモログの発現の結果，ヒトIL-10の産生が増加し，MMP-9活性が低下する。これらにより子宮内膜への侵襲性が損なわれ<sup>2,3)</sup>，胎盤組織の形成不全を引き起こす。CMV感染した栄養膜細胞層はTNF- $\alpha$ を誘導し，paracrineなアポトーシスにより周囲の細胞を死滅させることも報告されている<sup>4)</sup>。

線維芽細胞とは異なりCMV感染によっても

栄養膜細胞層でのMHC class I発現が抑制されないという報告<sup>5)</sup>がある。また，CMV感染した栄養膜細胞層ではHLA-G発現が抑制され，母体のNK細胞からの免疫回避機構に支障が生じるとする報告もある<sup>2)</sup>。今後，先天性感染における免疫機構についての系統的な検討が期待される。

b. 流産検体 (in utero モデル)

病理学的解析とPCRによるウイルスDNA検出の結果，他の危険因子がないCMV単独の場合

合でも、流産検体の 1/4 と高率に CMV が検出される。CMV の感染組織像は 3 パターンに分類される (図 1)。

パターン 1 は、脱落膜と固着絨毛での広範囲な感染像を特徴とする。このような検体のドナーでは抗 CMV 中和抗体価は低く、初感染のケースを反映していると思われる。パターン 2 は CMV 感染細胞が少なく、局所的な感染のみが検出されるもの。抗 CMV 中和抗体価が低～中度のドナーから得られた検体でよくみられる。パターン 3 は、わずかに感染細胞が脱落膜で検出される以外には、gB 陽性の小胞が合胞体栄養細胞層、マクロファージ、樹状細胞にのみ検出されるもの。高い中和抗体価を示すドナーの検体でこの傾向が高く、CMV 再活性化のケースと考えられている。

通常の胎盤形成過程における妊娠早期には、絨毛表面を覆う合胞体栄養細胞層で IgG Fc レセプターの発現が増強されており<sup>9)</sup>、母体から胎児への IgG 輸送を促進する。流産検体の解析の結果、合胞体栄養細胞層に存在する IgG を含んだ無数の小胞は CMV の gB と共局在していた。このような細胞で CMV が増殖しているか否かは不明だが、母体由来 IgG-CMV 粒子複合体が経細胞輸送(transcytosis)され、受動感染を引き起こす可能性を示している<sup>9)</sup>。

また、胎盤を構成する細胞に潜伏感染していた CMV が、細菌性膣炎の病原細菌などの感染を介した母体の炎症反応により再活性化し、先天性感染を起こす可能性も指摘されている<sup>2)</sup>。

### c. 動物実験(動物モデル)

CMV は種特異性が高く、ヒト CMV はヒトにしか感染しないことに加え、複雑かつ高度に調節された分化過程を経る子宮(母体)-胎盤(胎児)という特殊な環境のため、CMV 先天性感染機構の解明には動物モデルを用いた解析が不可欠となる。これらの動物モデルにはマウス、アカゲザル、チンパンジー、モルモットがある。

マウス CMV について、筒井らによって胎盤への直接接種や脳組織スライス培養などによる解析が精力的に行われ、CMV 先天性感染による脳障害発生のメカニズムが解明されつつある。

詳細については前稿 III-3-3) を参照されたい。

アカゲザル CMV の先天性感染モデルでは、胎児へ直接行った腹腔内接種による子宮内での発達障害や小頭症、石灰化、大脳実質内での封入体形成など、胎児への病原性がヒト CMV と極めて病態が類似する<sup>7)</sup>。飼育や実験施設設置などの煩雑さなどが克服できれば貴重なモデルとなる。ほとんどのサルが CMV 陽性であることから、CMV フリーのコロニー作出の必要性がある。また、チンパンジー CMV での報告<sup>8)</sup>と同様、経胎盤感染については検討結果が報告されていない。

一方、モルモット CMV では妊娠モルモットへのウイルス接種による経胎盤での先天性感染の成立が確認されており、その病原性についても多くの報告がなされてきた<sup>9)</sup>。我が国においても倉田らによる聴覚障害モデルや、筒井らによる特異的モノクローナル抗体の作製が報告されている。また抗モルモット CMV 抗体の受動免疫やワクチン効果の検討に有用だと考えられる<sup>9)</sup>。モルモット CMV の全遺伝子配列が報告されていないことや、モルモット購入にマウスの 10 倍を超える費用がかかることや、マウスのように宿主遺伝子欠損動物を用いた解析ができないという点はあるものの、CMV 先天性感染モデルとしての歴史の長さや動物としての扱いやすさなど、非常に有益な動物モデルであり、今後の分子生物学的手法を取り入れた研究が期待され、著者らも組換え体ウイルスの作製などを行っている。

## 3. ワクチン開発

CMV 既感染にもかかわらず、先天性感染が発生するケースも少数例報告されているが<sup>10)</sup>、大半の先天性感染が初感染によるため、ワクチンが唯一かつ有効な防御方法であるとの共通認識が広がっている<sup>11,12)</sup>。米国アカデミーの Institute of Medicine レポートでは、CMV ワクチンを最も経済効果の高いものの一つにあげている<sup>13)</sup>。これまでの CMV ワクチン候補を表 1 にまとめた。弱毒生ワクチンとしての Towne 株は病原性が低い反面、防御効果が不十分であっ