

200936149A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

(H21-難治-一般-094)

慢性活動性 EB ウイルス感染症の実態解明と診断法確立に関する研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 藤原成悦
(独立行政法人 国立成育医療研究センター研究所)

平成 22 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

(H21-難治-一般-094)

慢性活動性 EB ウイルス感染症の実態解明と診断法確立に関する研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 藤原成悦
(独立行政法人 国立成育医療研究センター研究所)

平成 22 年 3 月

目次

I. 総括研究報告

- 慢性活動性 EB ウイルス感染症の実態解明と診断法確立に関する研究
藤原成悦……………1

II. 分担研究報告

1. 慢性活動性 EB ウイルス感染症成人症例の病態解析および EB ウイルスによる T および NK 細胞腫瘍発症機構の解析に関する研究
新井文子……………9
2. 高感度特異的 EBV 感染細胞同定法による新規慢性活動性 EBV 感染症診断法キットの作成と普及に関する研究
木村宏……………13
3. 慢性活動性 EB ウイルス感染症の実態解明と診断法確立に関する研究：
定量 PCR による EBV 遺伝子発現解析
清水則夫……………19
4. 慢性活動性 EB ウイルス感染症の実態解明と診断法確立に関する研究
森尾友宏……………25
5. 慢性活動性 EB ウイルス感染症の実態解明と診断法確立に関する研究：
CAEBV の患者発生状況と治療実態に関する研究
脇口宏……………29
6. CAEBV の病態解析および疾患モデル作製
藤原成悦……………37

III. 研究成果の刊行に関する一覧表……………43

IV. 研究成果の刊行物・別刷……………51

慢性活動性 EB ウイルス感染症の実態解明と診断法確立に関する研究

研究代表者 藤原成悦 国立成育医療研究センター研究所・母児感染研究部・部長

研究要旨 慢性活動性 EB ウイルス (EBV) 感染症 (chronic active EBV infection: CAEBV) は発症機構不明、予後不良の疾患であり、EBV 感染 T 或いは NK 細胞の増殖を特徴とする。本研究では、CAEBV の実態解明と診断法の確立を目的として研究を行い、以下の結果を得た。①全国の医療機関へのアンケート調査により、CAEBV 患者発生状況を調査した。②新規患者と文献から抽出した症例の解析により、CAEBV 成人症例では小児例と比較して、CHOP 療法および大量 Cytarabine 療法の効果が低く副作用が強いこと、T 細胞型が多く予後が不良であることが示された。③EBV 感染 T/NK 細胞の生存に CD137 分子が関わることを示された。④CAEBV の病勢の指標として EBV 遺伝子発現を迅速に解析するための mRNA 定量法を開発した。⑤EBV がコードする小分子 RNA と細胞表面マーカー分子をフローサイトメトリーで同時に検出する高感度特異的 EBV 感染細胞同定法を確立し、CAEBV 診断に応用することに成功した。⑥CAEBV 患者末梢血単核細胞を免疫不全マウスに移植することにより、CAEBV の主要病態を再現する異種移植モデルの作成に成功した。

研究分担者：

新井文子；東京医科歯科大学大学院血液
内科学・講師

木村宏；名古屋大学大学院ウイルス学分
野・准教授

清水則夫；東京医科歯科大学難治疾患研
究所ウイルス治療学・准教授

森尾友宏；東京医科歯科大学大学院小児
科学・准教授

脇口宏；高知大学教育研究部医療学系・
教授

A. 研究目的

CAEBV は、持続あるいは再発する伝染性単核症様症状と、末梢血および病変組織における EBV DNA 量の増加を特徴と

する予後不良の疾患である。造血幹細胞移植以外に根治的治療法はない。診断指針はすでに作成されているが、発症機構や病態の解明が不十分であるため、疾患概念が不明確である。病態に共通点がある EBV 関連血球貪食症候群 (EBVAHS) などの類縁疾患との区別も不明確である。また、成人症例と小児症例が疾患として同一であるかどうかについても議論がある。そこで本研究では、CAEBV の患者数と治療実態に関する調査を行うとともに、基礎研究により病態解明を進め疾患概念の確立を図った。また、新規 EBV 感染細胞同定法を CAEBV 診断に応用し、正確かつ迅速な診断を可能とすることを試みた。本研究により、CAEBV の実態解明が

進み、正確な診断にもとづく適切な治療の実施が可能となると考えられる。

B. 研究方法

1. CAEBV の患者発生状況に関するアンケート調査

小児科、皮膚科、内科、耳鼻咽喉科を対象に、約 2,000 の診療科にアンケート調査票を郵送し、発症時および診断時年齢、性別、死亡の有無、診療科名、施設名について回答を得た。

2. 成人 CAEBV 症例の病態解析

東京医科歯科大学血液内科で治療した CAEBV 成人例 5 例および文献から抽出した成人例 19 例について、その臨床像と病態を解析した。

3. EBV による T/NK 細胞腫瘍発症機構の解析

CAEBV 患者末梢血から EBV 感染細胞を分離し、CD137 の発現を RT-PCR およびフローサイトメトリーで確認した。また、Jurkat 細胞への EBV 感染実験および EBV 遺伝子導入実験により、その発現機構を解析した。さらに、CD137 発現と転写因子 NF- κ B の関連を調べた。

4. EBV 遺伝子発現の解析による CAEBV の病勢判定の試み

CAEBV の病勢判定の 1 指標とすることを目指し、EBV 潜伏感染遺伝子 mRNA を定量するための RT-PCR を確立した。

5. 高感度特異的 EBV 感染細胞同定法の CAEBV 診断への応用

以下のプロトコールを用いた。

- 1) 蛍光色素 PE もしくは PC5 標識した単クローン抗体を用いて細胞表面抗原を標識。
- 2) 4%パラホルムアミド/1%酢酸処理（室温 40 分）にて細胞を固定。

3) Tween20/PBS で 10 分間処理し細胞および核膜に孔をあける。

4) EBER 特異的 FITC 標識 PNA probe (Dako) と 56°C 1 時間 hybridization 反応。

5) 抗 FITC Alexa Fluor 488 標識抗体を用い蛍光強度を増幅。

6) BD FACS Calibur にて flow cytometry により測定。

6. CAEBV モデルマウスの作成と解析

CAEBV 患者末梢血単核細胞を免疫不全マウスの一系統である NOD/Shi-*scid*/IL-2R γ c^{null} (NOG マウス) の尾静脈に注射し、異種移植モデルを作成した。

(倫理面への配慮)

本研究は直接ヒトを対象とする医療行為を含まないが、CAEBV 患者由来ヒト細胞を利用すること、アンケート調査を行うことから、ヘルシンキ宣言に則った倫理的配慮を必要とする。患者本人あるいは保護者に対して、本研究に関する十分な説明を文書と口頭で行い、自由意思による同意書への署名を得ることによりインフォームドコンセントを取得した。試料および臨床情報は匿名化され、患者の個人情報厳重に管理された。動物実験においては、動物実験指針を遵守し、動物愛護の観点から十分な配慮をした。本研究は国立成育医療研究センターおよび国立感染症研究所の倫理委員会および実験動物委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1. CAEBV の患者発生状況に関するアンケート調査

2005 年～2009 年の報告患者数は、平均 23.8 人/年で、2001～2004 年度までの 20 人～27 人（平均 23.8 人/年）と同等であ

った。小児科から48%、内科からは47%の症例が報告された。2001~2004年と比べ、内科からの報告が増加し、小児科に報告数で肩を並べていた。患者の診断時年齢は6歳~20歳にピークがあり、発症年齢は多い順に0~5歳、6~10歳、11歳~15歳であった。これはCAEBVが慢性の経過をとること、診断に年余の期間を要することに一致する結果と考えられた。さらに30歳代~60歳代にも多くの患者が分布しており、青年・壮年に加えて高齢者の報告も増加する傾向がみとめられた。2005年~2009年報告例の平均死亡率は23.6%で、2001~2004年の30.5%よりも低い値となっていた。

2. 成人CAEBV症例の病態解析

東京医科歯科大学血液内科で診断、治療を行った成人CAEBV5症例について、後方視的に解析を行った。5例にCHOP療法を施行したが、末梢血中のウイルス量の減少は1例で1ログ認めたのみであった。3例に大量cytarabin療法を施行したが、全例でgrade4の非血液毒性を認め投与を中止した。次いで文献的に報告されている19例を加えた成人発症CAEBV23例を解析した。87%がT細胞型で、死亡率は69%、治療開始から死亡までは平均11か月であった。

3. EBVによるT/NK細胞腫瘍発症機構の解析

CAEBV患者から分離したEBウイルス感染TおよびNK細胞において、共刺激分子CD137が細胞表面に発現していることを見出した。Jurkat細胞を用いたEBV遺伝子導入実験により、CD137の発現がEBV蛋白質LMP1により誘導されることが示された。さらにCD137リガンド(CD137L)発現CHO細胞との共培養実

験においてNF- κ B活性化が亢進し、VP16による細胞死が抑制された。

4. EBV mRNA 定量法の開発

12種類のEBV潜伏感染遺伝子のうち6種類(EBNA1, EBNA2, LMP1, LMP2A, LMP2B, EBER2)について、検出感度10 copies/reactionのmRNA定量系を開発した。

5. 高感度特異的EBV感染細胞同定法のCAEBV診断への応用

高感度特異的EBV感染細胞同定法を用い、EBV関連移植後リンパ増殖症、NK細胞性白血病、およびCAEBVの末梢血単核球中のEBER陽性細胞を測定したところ、1.3-49.2%でEBER陽性細胞を認めた。一方、健常成人ではEBER陽性細胞は検出されなかった。本法により、感染リンパ球の表面抗原解析が可能であり、個々の症例においてEBV感染細胞が同定できた。CAEBV患者では、種痘様水疱症を伴う3例すべてに末梢血 $\gamma\delta$ T細胞へのEBV感染が確認された。また、蚊刺過敏症を伴う1例では末梢血NK細胞へのEBV感染が確認された。移植後リンパ増殖症の末梢血ではB細胞への感染が確認された。これらの結果は磁気ビーズ法/定量PCR法の結果と合致していた。

6. CAEBVモデルマウスの作成と解析

CD4⁺細胞、CD8⁺細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、NK細胞にEBVが感染する各タイプのCAEBV患者から末梢血単核細胞を分離してNOGマウスに移植したところ、すべてのタイプにおいて、EBV感染細胞が生着し、脾、肝、肺、腎、小腸など多くの臓器に浸潤した。T細胞抗原受容体レパトワの解析により、ドナー患者末梢血およびNOGマウス末梢血で同一クローンのT細胞がモノクローナルに増加していた。マウスにおける感染細胞のEBV遺伝

子発現パターンは latency II 型に一致し、患者末梢血と同じであった。マウス末梢血では、IL-8, RANTES, IFN- γ などのサイトカイン/ケモカインが上昇し、CAEBV の特徴である高サイトカイン血症が再現されていた。

D. 考察

今回のアンケート調査の規模と有効回答率から、我が国における実際の CAEBV 患者発生数は年間 100 例程度と推測された。従来主に小児科において診断されていた CAEBV が、内科において診断される件数が増加し、現在では両科によりほぼ同数が診断されていると考えられた。これは、主に内科医における本疾患の認知度が向上しているためと考えられた。今後も内科医にたいする啓発を続けることが有効であると考えられた。

東京医科歯科大学での治療例と文献から抽出した症例の解析から、CAEBV 成人例では、CHOP 療法と大量 Cytarabine 療法の効果が低く副作用が強いことが示された。また、成人例では小児例と比較して T 細胞感染型が多く、予後が不良であることが強く示唆された。これらの結果は CAEBV 成人例と小児例の病態には違いがあること、治療法も区別する必要があることを示唆している。EBV がコードする LMP1 の作用により CD137 発現が誘導され、CD137L から CD137 へのシグナルがアポトーシスを抑制し、EBV 感染細胞の腫瘍化に関与することが示唆された。CD137 は CAEBV 治療の標的となりうると考えられた。

EBV 潜伏感染遺伝子 12 種類のうち 6 種類について mRNA 定量系の開発に成功した。今後は残りの 6 種類の定量系を開

発すると同時に、EBV 遺伝子発現と病勢との関連を解析する計画である。

CAEBV の診断には EBV 感染細胞の同定が必須であり、治療法決定にも重要な情報を与える。従来は、リンパ球を分画した後に各分画の EBV DNA 量をリアルタイム PCR により測定していたが、時間と労力を要した。本研究で確立された高感度特異的 EBV 感染細胞同定法により、CAEBV の正確かつ迅速な診断が可能となった。今後はこの方法を普及させるため、これを用いた診断法キットを作成する計画である。また最終的には健保採用を目指し、まず先進医療への指定を申請する予定である。高感度特異的 EBV 感染細胞同定法は、CAEBV 以外の EBV 関連疾患の診断にも応用が可能である。

CAEBV 患者末梢血単核細胞を NOG マウスに移植して作成された異種移植モデルは、EBV 感染 T および NK 細胞の増殖、latency II 型 EBV 遺伝子発現、高サイトカイン血症など、CAEBV の主要な病態を再現することが分かった。このモデルを用いて CAEBV 発症メカニズムの解析と治療薬（法）の開発が可能と考えられる。

今後、CAEBV 治療法に関する詳細なアンケート調査を行い、現行治療法の問題点を洗い出し、標準的治療プログラムの確立を目指して研究を進めたい。

E. 結論

①アンケート調査により、我が国の年間 CAEBV 患者発生数は約 100 人と推測された。②CAEBV 成人症例では小児例と比較して、CHOP 療法および大量 Cytarabine 療法の効果が低く副作用が強いこと、T 細胞型が多く予後も不良であることが示された。③EBV 感染 T/NK 細

胞の生存に CD137 分子が関わることが示された。④CAEBV の病勢判定に応用することを目的として、EBV mRNA 定量法を開発した。⑤新しい高感度特異的 EBV 感染細胞同定法を確立し、CAEBV 診断に応用することに成功した。⑥CAEBV のモデルマウスを作成し、その主要病態を再現することに成功した。

F. 健康危機情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Dohno S, Maeda A, Ishiura Y, Sato T, Fujieda M, Wakiguchi H: Diagnosis of infectious mononucleosis caused by Epstein-Barr virus in infants. *Pediatr Internat* (in press)
- 2) 佐藤哲也、前田明彦、藤枝幹也、脇口宏：特集：小児の治療指針「EB ウイルス感染症」小児科診療増刊号（73 巻増刊号）（印刷中）
- 3) 脇口 宏：小児感染症のすべて。II 感染症の原因微生物別に小児感染症を考える。13. サイトメガロウイルス，EB ウイルス。化学療法の領域 25（増）：1095-1104，2009。
- 4) Wakabayashi, S., Arai, A., Oshikawa, G., Araki, A., Watanabe, M., Uchida, N., Taniguchi, S., and Miura, O., Extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type, of the small intestine diagnosed by double-balloon endoscopy. *Int J Hematol*. 90: 605-10. 2009.
- 5) Iwata S, Wada K, Tobita S, Gotoh K, Ito Y, Demachi-Okamura A, Shimizu N, Nishiyama Y, Kimura H. Quantitative Analysis of Epstein-Barr Virus (EBV)-Related Gene

Expression in Patients with Chronic Active EBV Infection. *J Gen Virol*. 2009 Sep 30. [Epub ahead of print]

- 6) Yamanaka Y, Tagawa H, Takahashi N, Watanabe A, Guo Y-M, Iwamoto K, Yamashita J, Saitoh H, Kameoka Y, Shimizu N, Ichinohasama R, and Sawada K. Aberrant overexpression of microRNAs activate AKT signaling via down-regulation of tumor suppressors in natural killer-cell lymphoma /leukemia. *Blood* 114: 3265 – 3275, 2009
- 7) Hasegawa D, Kaji M, Takeda H, Kawasaki K, Takahashi H, Ochiai H, Morio T, Omori Y, Yokozaki H, Kosaka Y. Fatal degeneration of specialized cardiac muscle associated with chronic active Epstein-Barr virus infection. *Pediatr Int*. 51:846-8, 2009.
- 8) Nomura Y, Kimura H, Karube K, Yoshida S, Sugita Y, Niino D, Shimizu K, Kimura Y, Aoki R, Kiyasu J, Takeuchi M, Hashikawa K, Hirose S, Ohshima K. Hepatocellular apoptosis associated with cytotoxic T/naturalkiller-cell infiltration in chronic active EBV infection. *Pathol Int* 59: 438-442, 2009.
- 9) Kimura H, Miyake K, Yamauchi Y, Nishiyama K, Iwata S, Iwatsuki K, Gotoh K, Kojima S, Ito Y, Nishiyama Y. Identification of Epstein-Barr virus (EBV)-infected lymphocyte subtypes by flow cytometric in situ hybridization in EBV-associated lymphoproliferative diseases. *J Infect Dis* 200 : 1078-87, 2009.
- 10) Cohen JI, Kimura H, Nakamura S, Ko Y-H, Jaffe ES. Epstein-Barr virus Associated Lymphoproliferative Disease in Non-Immunocompromised Hosts. *Ann Oncol*

20: 1472-82, 2009

11) Iwata S, Wada K, Tobita S, Gotoh K, Ito Y, Demachi-Okamura A, Shimizu N, Nishiyama Y, Kimura H. Quantitative Analysis of Epstein-Barr Virus (EBV)-Related Gene Expression in Patients with Chronic Active EBV Infection. *J Gen Virol* in press.

12) Gotoh K, Ito Y, Ohta R, Iwata S, Nishiyama Y, Nakamura T, Kaneko K, Kiuchi T, Ando H, Kimura H. Immunologic and Virologic Analyses in Pediatric Liver Transplant Recipients with Chronic High Epstein-Barr Viral Loads. *J Infect Dis* in press

13) Yajima, M., Imadome, K., Nakagawa, A., Watanabe, S., Terashima, K., Nakamura, H., Ito, M., Shimizu, N., Yamamoto, N., and Fujiwara, S. T-cell-mediated control of Epstein-Barr virus infection in humanized mice. *J Infect Dis.* 200: 1611-1615, 2009.

2. 著書

なし

3. 学会発表

1) 石原正行、佐藤哲也、森田拓、石浦嘉人、堂野純孝、前田明彦、藤枝幹也、脇口宏、堤康、久野正貴、田中絵里子、近本裕子、秋岡祐子、服部元史：血清中 EB ウイルスの検出は小児腎移植患者の PTLD 発症の予測因子となるか。第 44 回日本小児腎臓病学会学術集会、2009 年 6 月、東京

2) 前田明彦、佐藤哲也、堂野純孝、脇口宏：シンポジウム：炎症疾患をどう理解するか「EB ウイルス関連血球貪食性リンパ組織球症 (EBV-HLH)」。第 41 回日本小児感染症学会 2009 年 11 月福井

3) 佐藤哲也、前田明彦、石原正行、高杉尚志、堂野純孝、久川浩章、藤枝幹也、脇口宏、上松一永：低 γ -グロブリン血症と B リンパ球減少に慢性活動性 EBV 感染症を合併した 1 女性例。第 20 回 EB ウイルス感染症研究会、2009 年 3 月、東京

4) 新井文子、今留謙一、藤原成悦、山本浩平、北川昌伸、和気敦、谷口修一、三浦修。Epstein-Barr virus positive T-cell lymphoproliferative disorders 成人例 第 71 会日本血液学会総会 2009 年 10 月 京都

5) 高橋真由美、今留謙一、中昂一、福田哲也、小山高敏、藤原成悦、三浦修、新井文子。Epstein-Barr virus 感染 T および NK 細胞には CD137 が発現し抗アポトーシスシグナルを伝達する。第 71 会日本血液学会総会 2009 年 10 月 京都。

6) Ayako Arai, Ken-Ichi Imadome, Mayumi Takahashi, Tetsuya Fukuda, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura. CD137 expression is enhanced in EBV-infected T or NK cells by viral protein LMP1 and mediates anti-apoptotic intracellular signaling through NF- κ B activation. 米国血液学会年次総会 2009 年 12 月 New Orleans.

7) 木村 宏、河邊慎司、後藤研誠、伊藤嘉規、岩田誠子、西山幸廣：FISH 法を用いた EBV 関連リンパ増殖性疾患の非侵襲診断および病態解析：第 57 回日本ウイルス学会学術集会、ワークショップ、東京 (2009. 10)

8) Kimura H, Miyake K, Yamauchi Y, Iwata S, Kawabe S, Gotoh K, Ito Y, Nishiyama Y: The 34th International Herpesvirus Workshop, July 26, 2009, Ithaca, USA (2009.7)

9) Fujiwara S, Yajima M, Imadome K,

Nakagawa A, Watanabe S, Terashima K, Nakamura H, Ito M, Shimizu N, and Yamamoto N. T cell-mediated control of Epstein-Barr virus infection in humanized mice. 14th International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections, Oct. 6-8, Kobe.

10) 今留謙一、矢島美彩子、川野布由子、清水則夫、中川温子、伊藤守、中村浩幸、山本直樹、藤原成悦. NOG マウスを用いた慢性活動性 EB ウイルス感染症異種移植モデルの作製と解析. 第 6 回 EB ウイルス研究会、2009 年 6 月 5 日、東京.

11) 今留謙一、矢島美彩子、川野布由子、清水則夫、中村浩幸、渡邊哲、寺嶋一夫、山本直樹、藤原成悦. EB ウイルス関連 T/NK リンパ増殖性疾患モデルマウスの作成と解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会. 2009 年 10 月 25 日、東京.

12) 今留謙一、矢島美彩子、山本直樹、中村浩幸、藤原成悦. NOG マウスを用いた慢性活動性 EBV 感染症異種移植モデル. 第 39 回日本免疫学会学術集会. 2009 年 12 月 2 日、大阪.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

国際特許出願 PCT/JP2009/001173(WO)

ウイルス感染細胞の検出・同定法及びキット.

発明者 ; 木村 宏、西山幸廣

出願日 ; 2009 年 3 月 17 日

厚生労働省科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

慢性活動性 EB ウイルス感染症成人症例の病態解析
および EB ウイルスによる T および NK 細胞腫瘍発症機構の解析に関する研究

分担研究者 新井文子 (東京医科歯科大学大学院血液内科学 講師)

研究要旨

慢性活動性 EB ウイルス感染症(CAEBV)成人症例の病態解析: 東京医科歯科大学血液内科で診断、治療を行った成人 CAEBV 5 症例について、後方視的に解析を行った。5 例に CHOP 療法を施行したが、末梢血中のウイルス量の減少は 1 例で 1 ログ認めただけであった。3 例に大量 cytarabin 療法を施行したが、全例で grade4 の非血液毒性を認め投与を中止した。次いで文献的に報告されている 19 例を加えた成人発症 CAEBV23 例を解析、87%が T 細胞型で、死亡率は 69%、治療開始から死亡までは平均 11 か月であった。以上より、成人発症例は小児例に比べ予後が悪く、臨床経過が短いと考えられ、両者は異なった病態をとることが示唆された。

EBV による NK 細胞腫瘍発症機構の解析: CAEBV 患者から分離した EB ウイルス感染 T および NK 細胞において、共刺激分子 CD137 が細胞表面に発現していることを見出した。Jurkat 細胞を用いた発現実験では、同分子は LMP1 によって発現が誘導された。さらに CD137L 発現 CHO 細胞との共培養実験において NF- κ B 活性化が亢進し、VP16 による細胞死が抑制された。以上から CD137 は CAEBV 発症および病態形成に寄与していると考えられた。

A. 研究目的

CAEBV は小児において、その疾患概念が提唱され、報告されてきたが、近年 Epstein-Barr ウイルス (EBV)による T および NK 細胞の腫瘍性疾患であることが明らかになり、その観点から診断基準が作成された (Am J Hem 2005; 80,p64)。その結果、成人例の存在も報告されるようになった。しかし、報告症例数は少なくその臨床像は不明である。また、治療は小児例に対するレジメンに基づき施行されているが、その効果は検討されておらず、成人例の予後は不良とされている。また、CAEBV の発症のメカニズム、つ

まり、一部のヒトでなぜ EBV は T もしくは NK 細胞に感染し腫瘍発症の原因になるのか不明である。

本研究では、それらを解析、解明するために、以下の 2 つの解析を行った。

- ① 成人例を後方視的に解析し、小児報告例と比較した。
- ② CAEBV 患者の細胞を用いて腫瘍化の分子機構を共刺激分子である CD137 の機能を中心に解析した。

B. 研究方法

- ① 成人 CAEBV 症例の病態解析: 当科で治療 (小児例に用いられるプロトコ

ル：CHOP療法、Capizzi療法に続く造血幹細胞移植 Am J Hem 2008;58,p209)を行ったCAEBV成人例5例の治療効果を解析した。さらに論文から抽出した症例を加え、成人発症例の臨床像と病態を解析した。論文報告例はOkanoらの診断基準 (Am J Hem 2005; 80,p64) を満たし、発症年齢が明らかに20歳以上で、EBV感染細胞が同定された症例を選択した。

② EBVによるNK細胞腫瘍発症機構の解析：CAEBV患者から抗体付き磁気ビーズを用いて感染細胞を分離し、CD137の発現をRT-PCRおよびフローサイトメトリーで確認した。さらに、その発現分子機構についてJurkat細胞を用いた一過性発現系で検討した。最後にCD137からの細胞内分子シグナリングとその機能について解析を行い腫瘍発症との関連を検討した。

(倫理面への配慮)

以上の研究は東京医科歯科大学倫理委員会で承認され、患者の文書による同意を得て施行した。

C. 研究結果

① 成人CAEBV症例の病態解析：当院の治療経験症例は5例。男性2名、女性3名。発症年齢は1例のみ7歳で発症、他3例は28～72歳の成人発症であった。治療開始年齢は24～72歳。感染細胞はCD8陽性T細胞3例、CD4陽性細胞2例であった。5名全例にcyclosporine Aとprednisoloneによる前治療(CP療法)に続いてCHOP療法を施行した。効果は、発熱等の臨床症状の改善を3例で認めたが、末梢血中EBV-DNA量は1ログの減少を1例に認めたのみで4例は減少を認

めず1例は治療開始後15日後に死亡した。全例でgrade4の好中球減少を認めた。大量cytarabine療法を3名に施行したが、全例でgrade4の、高熱もしくは心嚢水貯溜を認め投与を中止した。

ところで、当科で治療した症例中、7才時に発症した症例は治療開始まで17年経過観察が可能であった。一方で、残り4例の成人発症例は、発症から治療まで12か月と明らかに短かった。Kimuraらの小児例の解析では、小児例の治療開始までの期間は平均71か月である (Blood 2001; 98,p280)。以上から、小児発症例と成人発症例は病態が異なる可能性があると考え、検証した。論文から抽出した19例を加えた成人発症例23例を解析した。男性14名、女性9名。年齢は24～72歳(中央値36)。診断前罹病期間は2週間～108か月(中央値19)で、小児発症例と比較し経過が短い傾向があった。感染細胞はT細胞20名、NK細胞3名で、それぞれが同率の小児例に対してT細胞感染型が多かった。抗EBV抗体価は、VCA-IgGおよびEA-IgGが高く、VCA-IgMは低値で再活性化からの発症と考えられた。経過の記載のある21例中12例(69%)が死亡した。治療開始から死亡までの期間は6-72ヶ月(平均21ヶ月)であった。

② EBVによるNK細胞腫瘍発症機構の解析：EBV陽性TおよびNK細胞株4種(SNT8,SNT15,SNT16,SNK6)に加え、EBV陽性TおよびNK細胞リンパ増殖症(慢性活動性EBV感染症)患者9例(T細胞型5例、NK細胞型4例)の末梢血リンパ球を用いCD137の発現をフローサイトメトリーおよびRT-PCR法で検討した。13細胞中11細胞で細胞表面のCD137蛋白の発現が確認された(n=10、

MFIR4.1±5.6)。また検索しえた細胞すべてでCD137のmRNAの発現をみとめた。対照としたEBV陰性T細胞株であるJurkat細胞ではCD137の発現は蛋白質、RNAどちらのレベルでも認めなかった。CD137Lの発現は全例で認めなかった。上記EBV感染T、NK細胞のうちCD137蛋白質の発現を認める細胞をCD137L遺伝子導入CHO細胞と共培養するとVP-16に対するapoptosis誘導が抑制された。EBV感染T、NK細胞株においてNF-κB活性化の恒常的活性化が認められCD137L遺伝子導入CHO細胞と共培養により増強を認めた。

D. 考察

① 成人CAEBVはCHOP療法に抵抗性をしめした。CAEBV細胞内にはP糖蛋白質が強く発現していることを最近私達は見出したが、P糖蛋白質によるDoxorubicin、Vincristineなどの細胞外への排泄は治療抵抗性の機序のひとつであると考えられる。今後はさらにその詳細な解析と薬剤耐性の克服法を検討する予定である。

CAEBVの予後不良因子として、KimuraらはT細胞感染型、年齢8歳以上を報告している(J inf Dis 2003; 187, p527)。成人発症例が小児発症例より、より急激な経過をとり、予後が不良である原因として、T細胞型が多いことが関連していると考えられた。加えて、CAEBVとして報告されている成人発症例の中には、臨床経過が6か月以内と急速に進行し予後が悪い症例が存在し、特に高齢者に多い傾向もあった。以上の詳細な解析にはさらなる症例の蓄積が必要である。

② EBV感染による腫瘍発症の分子機構

として、T、NK細胞表面にはCD137が発現し、同分子からNF-κBを介し細胞生存を正に制御するシグナルが伝達され腫瘍発症に寄与している可能性があることが示された。一方CD137は共刺激受容体であり、CD137L発現細胞に対しても何らかの作用を示す可能性がある。CD137LはTもしくはB細胞に発現しており、EBV感染細胞以外のそれらの細胞が病態の形成に関わっていると考えられる。これらの機能についても今後解析の予定である。

E. 結論

成人CAEBVに対してCHOPは十分な効果を認めなかった。Capizzi療法はgrade4以上の強い非血液毒性を施行全例に認めた。成人発症例は小児発症例とは異なりT細胞型が多く、急速に進行し予後が悪い傾向があった。

またEBV感染によってT、NK細胞表面にはCD137が発現し、同分子からNFκBを介し細胞生存を正に制御するシグナリングが伝達され腫瘍発症に寄与している可能性があると考えられた。

病態の解明と適切な治療法開発のために、更なる症例の解析が必要であり、CD137を介したシグナリングの制御はCAEBV治療の標的となりうると考えられた。

F. 研究危険情報

なし。

G. 研究発表

1.論文発表

1. Arai, A., Imadome, K., Fujiwara, S., and Miura, O., Autoimmune hemolytic anemia accompanied by reactivation of an Epstein-Barr virus infection with suppressed

CTL response to EBV-infected cells in an elderly man. Intern Med. 49: 325-9. 2010
2. Wakabayashi, S., Arai, A., Oshikawa, G., Araki, A., Watanabe, M., Uchida, N., Taniguchi, S., and Miura, O., Extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type, of the small intestine diagnosed by double-balloon endoscopy. Int J Hematol. 90: 605-10. 2009.

2. 学会発表

1. 新井文子、今留謙一、藤原成悦、山本浩平、北川昌伸、和気敦、谷口修一、三浦修

Epstein-Barr virus positive T-cell lymphoproliferative disorders 成人例
第71会日本血液学会総会 2009年10月
京都

2. 高橋真由美、今留謙一、中昂一、福田哲也、小山高敏、藤原成悦、三浦修、新井文子

Epstein-Barr virus 感染 T および NK 細胞には CD137 が発現し抗アポトーシスシグナルを伝達する

第71会日本血液学会総会 2009年10月
京都

3. Ayako Arai, Ken-Ichi Imadome, Mayumi Takahashi, Tetsuya Fukuda, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura.

CD137 expression is enhanced in EBV-infected T or NK cells by viral protein LMP1 and mediates anti-apoptotic intracellular signaling through NF- κ B activation

米国血液学会年次総会 2009年12月
New Orleans

H. 知的財産権の出願・取得状況
なし

高感度特異的EBV感染細胞同定法による新規慢性活動性EBV感染症診断法キットの
作成と普及に関する研究

研究分担者 木村 宏 名古屋大学大学院医学系研究科ウイルス学 准教授

研究要旨

EBV 関連疾患の診断・発症病理の解明には、EBV 感染細胞の定量と同定が必須である。今回我々は、高感度特異的 EBV 感染細胞同定法を用い、血液で EBV 感染細胞の定量と同定を同時に行う迅速システムを確立し、慢性活動性 EBV 感染症へ応用を試みた。慢性活動性 EBV 感染症患者の末梢血単核球の 1.3-49.2%が EBV 陽性で、感染リンパ球の表面抗原解析も可能であった。種痘様水疱症を伴う慢性活動性 EBV 感染症患者 3 症例では、いずれも末梢血の $\gamma\delta T$ 細胞が EBV に感染していた。今回確立した高感度特異的 EBV 感染細胞同定法は、末梢血中の EBV 感染細胞を特異的かつ高感度に検出できる新規技術である。この方法を用いれば、EBV 感染細胞数の定量のみならず、細胞特性の詳細な解析が可能となるため、慢性活動性 EBV 感染症をはじめとする EBV 関連疾患の診断・発症病理解析に極めて有用である。

A. 研究目的

Epstein-Barr virus (EBV) は B 細胞のみならず、T 細胞、NK 細胞などのリンパ球に感染し、伝染性単核症、血球貪食症候群、慢性活動性 EBV 感染症や鼻性 NK リンパ腫、EBV 関連 T リンパ腫、NK 白血病、移植後リンパ増殖症など、様々なリンパ増殖性疾患/悪性リンパ腫の原因となる。EBV 関連リンパ増殖性疾患の診断・発症病理の解明には、EBV 感染細胞の定量と同定が必須である。ことに慢性活動性 EBV 感染症は EBV に感染した T 細胞もしくは NK 細胞が短クローン性に増殖する T/NK リンパ増殖性疾患であることが明らかとされてきており、EBV 感染細胞を同定することは本症の診断上必須である。また、感染細胞により予後が異なること、感染細胞表面抗原をターゲットとし

た分子標的治療の開発などにより、予後判定や治療法の決定のためにも、感染細胞を同定することは意義深いと考えられる。

病理組織では、感染細胞核内で多量に発現している EBV encoded small RNA (EBER) を *in situ* hybridization 法を用い検出する感染細胞同定法が確立されている。しかし、血液を用いた非侵襲的な感染細胞同定法はなく、その開発が望まれていた。近年、我々は EBV encoded small RNA (EBER) 特異的 Peptide Nucleic Acid (PNA) プローブを用い、細胞表面抗原と EBER を連続的に染色する高感度特異的 EBV 感染細胞同定法を確立した。今回、この高感度特異的 EBV 感染細胞同定法を慢性活動性 EBV 感染症を含む EBV 関連疾患患者の末梢血へ応用し、本疾患の非侵襲的診断と病態解析に有用で

性を検証した。

B. 研究方法

症例はEBV関連移植後リンパ増殖症1例、NK細胞性白血病1例、慢性活動性EBウイルス感染症6例。EBV既感染の健常成人5例を対照とした。末梢血より単核球を分離し、以下の手順で、高感度特異的EBV感染細胞同定法によるEBV感染細胞の定量・同定を行った。

- 1) 蛍光色素PEもしくはPC5標識した単クローン抗体を用いて細胞表面抗原を標識。
- 2) 4%パラホルムアミド/1%酢酸処理（室温40分）にて細胞を固定。
- 3) Tween20/PBSで10分間処理し細胞および核膜に孔をあける。
- 4) EBER特異的FITC標識PNA probe (Dako) と56°C1時間hybridization反応。
- 5) 抗FITC Alexa Fluor 488標識抗体を用い蛍光強度を増幅。
- 6) BD FACS Caliburにてflow cytometryにより測定。

比較対象として、単核球を磁気ビーズ法によりCD3⁺、CD19⁺、CD3-CD56⁺、TCR $\alpha\beta$ ⁺、TCR $\gamma\delta$ ⁺分画に分けた後に、定量PCR法によりEBV-DNAを定量し、感染分画を決定した。

（倫理面への配慮）

本研究は、患者に対して診断的検査を行うのみで、治療的介入は行わない。また、ヒトの遺伝子解析は行わないため、ヒト遺伝子研究には該当しない。

参加症例に対しては、平成15年7月30日付厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針」に則り、十分な説明を施した上で、患者および親権者よりインフォームドコンセントを得た。さらに検体の採取法、患者情報の取り扱いについても倫理規定を遵守し、個人情報擁護に努めることとした。また本研究は、名古屋大学医学部倫理委員会に

て承認されている。

C. 研究結果

高感度特異的EBV感染細胞同定法を用い、各EBV関連疾患の末梢血中末梢血単核球中のEBER陽性細胞を測定したところ、1.3-49.2%でEBER陽性細胞を認めた（図1）。一方、健常成人ではEBER陽性細胞は検出されなかった。本法により、感染リンパ球の表面抗原解析が可能であり、個々の症例においてEBV感染細胞が同定できた。慢性活動性EBV感染症患者では、種痘様水疱症を伴う3例すべてに末梢血 $\gamma\delta$ T細胞への（図2）、蚊刺過敏症を伴う1例で末梢血NK細胞へのEBV感染を認めた。移植後リンパ増殖症の末梢血ではB細胞への感染が確認された。これらの結果は磁気ビーズ法/定量PCR法の結果と合致していた（表1）。

D. 考察

高感度特異的EBV感染細胞同定法は、末梢血中のEBV感染細胞数の定量のみならず、どんな細胞に感染しているかを同時に同定できるため、EBV関連疾患の非侵襲かつ迅速な診断として極めて有用である。また、今回の解析により、種痘様水疱症を伴う慢性活動性EBV感染症患者で $\gamma\delta$ T細胞へのEBV感染が明らかとなり、EBV関連リンパ増殖性疾患の発症病理解析にも有用であることが示された。種痘様水疱症とは、日光暴露部位の皮膚に局限し、水疱性丘疹が出現するもので、近年EBVとの関連が明らかになっている。種痘様水疱症で皮膚局所に集族しているEBV感染細胞の由来についてはこれまで様々な報告があり一定の見解は得られてなかった。

我々は独自に開発したこの高感度特異的EBV感染細胞同定法を平成20年度に国内特許出願したのに続いて、平成21年度には国際特許出願に至っている。慢性活動

性 EBV 感染症の診断には、EBV がどのリンパ球分画（T、NK、または B）に感染しているかを決定することが必須である。従来は磁気ビーズ法あるいはセルソーターによりリンパ球を分画したのちに、定量 PCR 法により EBV DNA を定量する方法が用いられてきたが、労力と時間を要した。高感度特異的 EBV 感染細胞同定法を末梢血中 EBV 感染細胞に応用することにより、慢性活動性 EBV 感染症の非侵襲かつより精度の高い診断が可能となり、本疾患の実態解明と疾患概念の明確化が促進され、正確な診断にもとづく適切な治療の実施が可能となると考えられる。

今後、我々が開発した高感度特異的 EBV 感染細胞同定法が、誰にでも利用可能で広く普及するには、プロトコール化されたキットを製作することが必要である。そのためにも、本法のキットのプロトタイプを作成し、その性能を EBV 感染細胞株および、EBV 関連疾患（慢性活動性 EBV 感染症、血球貪食症候群、悪性リンパ腫・移植後リンパ増殖症など）の患者末梢血を用いて検証する予定である。慢性活動性 EBV 感染症を正確に診断し適切な治療を行うためには、作成したキットが健保採用され広く普及することが望ましい。暫定的には、名古屋大学を始めとした複数の施設において、本診断法を先進医療として申請し、その後の健保採用を目指す。また、本方法は慢性活動性 EBV 感染症以外の EBV 関連疾患にも応用可能である。AIDS や臓器・造血幹細胞移植後の EBV 関連リンパ増殖症など診断困難で難治な疾患への応用・標準的診断法としての確立・健保採用を通しての普及を目指している。

E. 結論

我々は、EBER 特異的 PNA プローブを用い、

EBV がコードする小分子 RNA（EBER）と細胞表面蛋白質とをともに蛍光染色したのち、フローサイトメトリーにより同時に解析する検査法を開発した（高感度特異的 EBV 感染細胞同定法）。平成 21 年度はこの検査法を慢性活動性 EBV 感染症患者に対して施行し、その感度と精度を従来の感染細胞同定法と比較した。高感度特異的 EBV 感染細胞同定法を用いることにより、正確かつ迅速に EBV 感染細胞の定量・同定が慢性活動性 EBV 感染症患者で可能であることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mizuno T, Sugiura S, Kimura H, Ando Y, Sone M, Nishiyama Y, Nakashima T. Detection of cytomegalovirus DNA in preserved umbilical cords from patients with sensorineural hearing loss. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 266: 351–5, 2009
- 2) Wada K, Mizoguchi S, Ito Y, Kawada J, Yamauchi Y, Morishima T, Nishiyama Y, Kimura H. Multiplex real-time PCR for the simultaneous detection of herpes simplex virus, human herpesvirus 6, and human herpesvirus 7. *Microbiol Immunol* 53:22–29, 2009
- 3) Nomura Y, Kimura H, Karube K, Yoshida S, Sugita Y, Niino D, Shimizu K, Kimura Y, Aoki R, Kiyasu J, Takeuchi M, Hashikawa K, Hirose S, Ohshima K. Hepatocellular apoptosis associated with cytotoxic T/naturalkiller-cell infiltration in chronic active EBV infection. *Pathol Int* 59: 438–442, 2009
- 4) Ito Y, Shibata-Watanabe Y, Kawada J, Maruyama K, Yagasaki H, Kojima S, Kimura H. Cytomegalovirus and Epstein Barr virus coinfection in three toddlers with prolonged

- illness. *J Med Virol* 81:1399–1402, 2009
- 5) Tanaka–Kitajima N, Iwata N, Ando Y, Sakurai H, Iwami M, Tsuzuki K, Kondo M, Ito Y, Kimura H. Acute retinal necrosis caused by herpes simplex virus type 2 in a 3–year–old Japanese boy. *Eur J Pediatr* 168:1125–, 2009
- 6) Kimura H, Miyake K, Yamauchi Y, Nishiyama K, Iwata S, Iwatsuki K, Gotoh K, Kojima S, Ito Y, Nishiyama Y. Identification of Epstein–Barr virus (EBV)–infected lymphocyte subtypes by flow cytometric in situ hybridization in EBV–associated lymphoproliferative diseases. *J Infect Dis* 200: 1078–87, 2009
- 7) Ushijima Y, Goshima F, Kimura H, Nishiyama Y. Herpes simplex virus type 2 tegument protein UL56 relocalizes ubiquitin ligase Nedd4 and has a role in transport and/or release of virions. *Virology J* 6: 168, 2009
- 8) Cohen JI, Kimura H, Nakamura S, Ko Y–H, Jaffe ES. Epstein–Barr virus Associated Lymphoproliferative Disease in Non–Immunocompromised Hosts. *Ann Oncol* 20: 1472–82, 2009
- 9) Iwata S, Wada K, Tobita S, Gotoh K, Ito Y, Demachi–Okamura A, Shimizu N, Nishiyama Y, Kimura H. Quantitative Analysis of Epstein–Barr Virus (EBV)–Related Gene Expression in Patients with Chronic Active EBV Infection. *J Gen Virol in press*
- 10) Funahashi Y, Iwata S, Ito Y, Kojima, Yoshikawa T, Hattori R, Gotoh M, Nishiyama Y, Kimura H. Multiplex Real–time PCR Assay for Quantifying BK Polyomavirus, JC Polyomavirus, and Adenovirus DNA Simultaneously. *J Clin Microbiol in press*
- 11) Gotoh K, Ito Y, Ohta R, Iwata S, Nishiyama Y, Nakamura T, Kaneko K, Kiuchi

T, Ando H, Kimura H. Immunologic and Virologic Analyses in Pediatric Liver Transplant Recipients with Chronic High Epstein–Barr Viral Loads. *J Infect Dis in press*

2. 学会発表

- 1) 木村 宏、河邊慎司、後藤研誠、伊藤嘉規、岩田誠子、西山幸廣: FISH 法を用いた EBV 関連リンパ増殖性疾患の非侵襲診断および病態解析: 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、ワークショップ、東京 (2009. 10)
- 2) Kimura H, Miyake K, Yamauchi Y, Iwata S, Kawabe S, Gotoh K, Ito Y, Nishiyama Y: The 34th International Herpesvirus Workshop, July 26, 2009, Ithaca, USA (2009.7)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

国際特許出願 PCT/JP2009/001173 (W0)
ウイルス感染細胞の検出・同定法及びキット

発明者 ; 木村 宏、西山幸廣

出願日 ; 2009 年 3 月 17 日

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

図1 FISH法による末梢血単核球中のEBER陽性細胞（種痘様水疱症を伴った慢性活動性EBV感染症患者の一例）

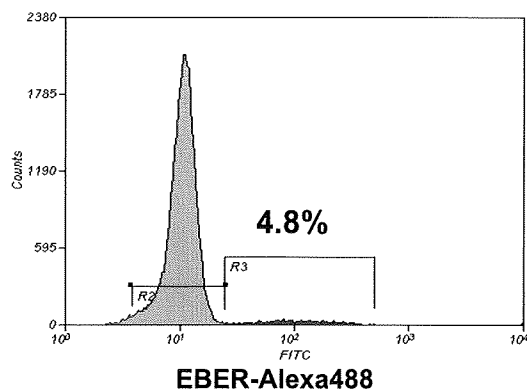


図2 FISH法による感染細胞の表面抗原形質（種痘様水疱症を伴った慢性活動性EBV感染症患者の一例：灰色がEBER陰性非感染細胞、濃い黒がEBER陽性感染細胞、EBER陽性細胞はCD3⁺TCRγδ⁺細胞）

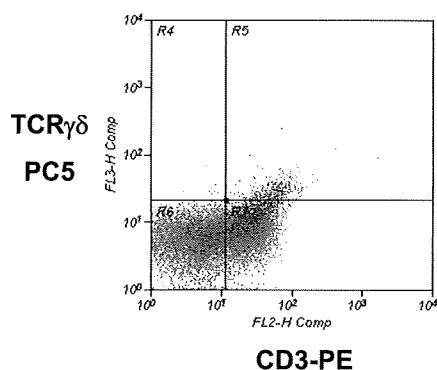


表1 磁気ビーズ法による分画後のウイルス量と TCR 遺伝子再構成

No	性	年齢 (y)	疾病	EBV DNA (コピー/μg DNA)					TCR 遺伝子 再構成	
				PBMCs	CD3	TCRαβ	TCRγδ	CD19		CD56
1	M	6	移植後リンパ増殖症	22,020	920	ND	ND	91,990	7,290	ND
2	M	14	慢性活動性EBV感染症 蚊刺過敏症	56649	1,007	1,174	15,860	ND	199,356	ND
3	M	16	慢性活動性EBV感染症 種痘様水疱症	8,100	16,380	8,310	101,210	ND	860	Vγ4/Vγ7/10/Vγ9 Vδ1/Jδ
4	M	11	慢性活動性EBV感染症 種痘様水疱症	10,040	13,230	210	87,420	ND	240	Vγ4/Vγ7/10/Vγ9 Vδ1/Jδ
5	M	6	慢性活動性EBV感染症 種痘様水疱症	41,760	46,730	6,400	190,100	9,090	6,400	Vδ1/Jδ

ND: 未検出

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

慢性活動性 EB ウイルス感染症の実態解明と診断法確立に関する研究

分担研究者：清水 則夫
（東京医科歯科大学准教授）

研究要旨 慢性活動性 EB ウイルス感染症は予後不良の疾患であるが、近年造血幹細胞移植による治療が注目されている。しかし、急激に悪化する症例が多く移植関連死亡も多いことから、移植時期の決定には困難が付きまとう。したがって、適切な時期に造血幹細胞移植を行うには、病勢を測る客観的な指標が必要である。本研究はそのような指標を得る目的で、潜伏感染遺伝子 12 種類の定量 PCR 系を確立し、EBV 感染細胞中に発現する潜伏感染遺伝子の種類と発現量を経時的に測定して病勢との比較を行うことを計画した。これまでに、6 種類の EBV 潜伏感染遺伝子定量系の作製をとバリデーション作業を終了した。

A. 研究目的

慢性活動性 EB ウイルス感染症（CAEBV）は予後不良の疾患であり、適切に治療しないと患者のほとんどは数年から十数年の経過で死亡する。主な死因はリンパ腫・臓器不全・血球貪食症候群などである。抗ウイルス剤や抗ガン剤による治療が行われているが、これらの薬剤治療では根治は望めず、造血幹細胞が現在のところ唯一の根治療法である。しかし、造血幹細胞移植は移植関連死亡率が高く簡単に移植を決断出来ない反面、病状が進んでからの移植では成功率が低くなる傾向にある。したがって、適切な時期に移植するためには病勢を測る客観的な指標が必要である。

一方、患者末梢血中には CAEBV の原因細胞である EBV 潜伏感染 T/NK 細胞が持続的に検出されるため、細胞中に発現する EBV 潜伏感

染遺伝子の種類・発現量と病状との間に関連があれば移植時期を確定するための有力な指標になると考えられる。

本研究では、EBV 潜伏感染遺伝子 12 種類の定量 PCR 系を確立し、感染細胞中に発現する潜伏感染遺伝子の種類と発現量を経時的に測定して病勢との比較を行うことを目的に研究を行った。

B：研究方法

1. EBV 潜伏感染遺伝子 mRNA 定量系の作製

a. 検査対象遺伝子

EBNA: EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C, LP

LMP: LMP1, 2A, 2B

EBER: EBER1, 2

BARF0