

201024135A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

(H22-難治-一般-080)

慢性活動性 EB ウイルス感染症の診断法及び治療法確立に関する研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 藤原成悦

平成 23 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

(H22-難治-一般-080)

慢性活動性 EB ウイルス感染症の診断法及び治療法確立に関する研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 藤原成悦

平成 23 年 3 月

## 目次

I. 総括研究報告	
慢性活動性 EB ウイルス感染症の診断法及び治療法確立に関する研究 藤原成悦	1
II. 分担研究報告	
1. EB ウイルスによる T および NK 細胞腫瘍発症機構の解析および 慢性活動性 EB ウイルス感染症成人症例の治療法の開発に関する研究 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	15
3. 慢性活動性 EB ウイルス感染症におけるウイルス感染細胞クローンの解析 清水則夫	21
4. 慢性活動性 EB ウイルス感染症の臨床像解析 森尾友宏	27
5. 中枢神経再発時に EB ウイルスゲノム陰性であり、診断に苦慮した EB ウイルス関連 NK 細胞リンパ腫 脇口宏	31
6. CAEBV モデルマウスの開発と応用 藤原成悦	41
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	47
IV. 研究成果の刊行物・別刷	53

## 慢性活動性 EB ウイルス感染症の診断法及び治療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 (CAEBV) の診断法及び治療法確立を目的とする研究において以下の結果を得た。①分類不能型免疫不全症 199 症例の中から 4 例の CAEBV 発症が認められたことにより、CAEBV 発症の背景に何らかの先天性免疫不全が存在する可能性が考えられた。②CAEBV 由来の EBV 感染 T 及び NK 細胞においては EBV 蛋白質 LMP1 による細胞転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化がアポトーシスを抑制していることが示された。またこれらの細胞には薬物を細胞外に排出する機能をもつ P 糖蛋白質 (P-gp) が強く発現されているために、化学療法に対する感受性が低下している可能性が示された。③CAEBV 患者における EBV 感染 T 及び NK 細胞クローンの解析により、臓器によって異なる EBV 感染細胞クローンが存在していることが示された。また、ある患者には  $\alpha\beta$ T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、及び NK 細胞のフェノタイプをもつ 3 種類の EBV 感染細胞が存在し、EBV DNA 末端配列によるクローン解析ではモノクローナルであったことから、この症例では T 細胞と NK 細胞が分化する以前の未熟な細胞に EBV が感染したものと推定された。④EBER in situ hybridization とフローサイトメトリーを組み合わせた高感度特異的 EBV 感染細胞同定法を CAEBV 診断に応用した結果、低侵襲的で正確な診断が可能となった。⑤NOG マウスへの異種移植モデルを用いた実験により、CAEBV 由来の EBV 感染 T 及び NK 細胞の増殖には CD4+ T 細胞が重要な役割を果たすことが示され、この細胞を標的とする新しい治療法の可能性が示唆された。⑥5 例の CAEBV 成人症例に対する探索的臨床研究において L-asparaginase の有効性は示されなかった。⑦再発時に EBV ゲノムが脱落し CD56 発現が消失した NK 細胞リンパ腫症例が報告された。

### 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、EBV 感染 T 或いは NK 細胞の増殖を特徴とする予後不良の疾患である。診断には EBV 感染細胞の正確な同定が必要である。造血幹細胞移植以外に根治的治療法はない。また、幹細胞移植前の初期治療については、特に成人に

において副作用などの問題が指摘されている。我々は平成 21 年度に奨励研究 (H21-難治一般-094) を実施し、アンケート調査による患者発生状況の把握、CAEBV の新規診断法および疾患モデル動物の開発などに成果をあげた。本研究ではこれらの成果を踏まえ、CAEBV 治療法の実態把握と標準化治療プログラムの策定、新規 CAEBV 診断法のキット化による普及、新しい初期治療法の検証、疾患モデル動物による治療法開発を目的とする研究を行う。今年度は、EBV による T 及び NK 細胞増殖誘発メカニズムの解析、CAEBV 患者における EBV 感染 T 及び NK 細胞クローンの解析、CAEBV モデルマウスにおける EBV 感染 T 及び NK 細胞の増殖機構の解析、CAEBV との関連において興味深い NK 細胞リンパ腫の症例解析が行われた。

## B. 研究方法

### 1. EBV 感染 T 及び NK 細胞における NF- $\kappa$ B 活性化の解析

CAEBV 患者由来の EBV 感染 T 及び NK 細胞株及び CAEBV 患者より分離した新鮮 EBV 感染 T 及び NK 細胞を用い、western blot 法及び electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 法により NF- $\kappa$ B 活性化を解析した。

### 2. CAEBV 成人症例に対する L-asp の探索的臨床研究

十分な腎機能をもつ成人 CAEBV 患者 5 例に対し、L-asp (6,000 U/m<sup>2</sup>) を一日一回、隔日で 7 回投与した。

### 3. CAEBV 由来 EBV 感染 T 及び NK 細胞の NOG マウスへの生着条件の検討

CAEBV 患者から分離した末梢血単核細胞 (PBMC) の全体、PBMC から分離し

た特定の細胞分画、PBMC から特定の細胞分画を除去した残り、のそれぞれを NOG マウスに移植し、生着の有無を調べた。また PBMC を移植した直後に OKT-4 抗体を投与し、CD4+細胞を除去した場合の生着の有無を調べた。

### 4. CAEBV 患者における EBV 感染細胞のクローン解析

2 例の CAEBV 患者から分離した PBMC を 96-well マイクロプレートで培養し、多くの細胞クローンを樹立し、細胞表面マーカー発現解析、T 細胞抗原受容体遺伝子再構成の解析、EBV DNA 末端繰り返し配列の解析などを通じてクロナリティを調べた。

### 5. 高感度特異的 EBV 感染細胞診断法

以下のプロトコールによった。

- 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°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。

#### (倫理面への配慮)

本研究は CAEBV 患者由来ヒト細胞を利用することから、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 は 厳重に管理された。L-aspl の探索的臨床研究は、東京医科歯科大学医学部附属病院施設内審査委員会の承認、患者の文書による同意を得て施行した。また、UMIN-CTR への登録を行った(UMIN 試験 ID : UMIN000003498)。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. 分類不能型免疫不全症と CAEBV の関連に関する調査

分類不能型免疫不全症 (Common variable immunodeficiency: CVID) 患者 199 名中 4 名において CAEBV の発症が認められた。これは一般より有意に高い発症率である。これらの患者はすべて女性であったが、X 連鎖リンパ増殖症の責任遺伝子である SAP と XIAP に変異を認めなかった。一方既知の CVID 遺伝子についても SNP 以外の塩基置換や欠失・挿入などを認めなかった。免疫学的検討では SAP 異常症や XIAP 異常症と同様の NKT 細胞パーセンテージの低下を示す症例が認められた。ウイルス特異的 T 細胞は検討した全員で低値であった。

#### 2. EBV 感染 T 及び NK 細胞における NF- $\kappa$ B 活性化の解析

CAEBV 由来 EBV 感染 T 及び NK 細胞株と 10 例の CAEBV 患者由来新鮮 EBV 感染 T 及び NK 細胞を調べたところ、NF- $\kappa$ B 構成蛋白質である p52, p50, RelA の核局在と DNA 結合が示され、NF- $\kappa$ B が古典経路と非古典経路の両者により活性化

されていることが示された。また、NF- $\kappa$ B 阻害薬である Bortezomib 投与によりこれらの細胞が apoptosis に陥ること、EBV 陰性細胞に EBV 遺伝子 LMP1 を導入すると NF- $\kappa$ B が活性化されることが示された。以上により、EBV 感染 T 及び NK 細胞においても B 細胞と同様に、LMP1 による NF- $\kappa$ B 活性化が細胞の生存と増殖に関与することが示された。

細胞からの薬物の排出を促進し抗がん剤などに対する抵抗性を与える P-gp が EBV 陽性 T/NK 細胞において強く発現されること、P-gp を阻害する cyclosporine A を培養液に加えると Doxorubicin による apoptosis 誘導が亢進することが示され、CAEBV 由来 EBV 感染 T 及びの NK 細胞の抗がん剤抵抗性には P-gp が関与することが示唆された。

#### 3. CAEBV 患者における EBV 感染 T 及び NK 細胞のクローン解析

2 名の CAEBV 患者において解析を行った。1 名の患者においては、①リンパ節から回収した細胞、②咽頭潰瘍部から回収した細胞、③末梢血から樹立した EBV 感染細胞株の 3 者を比較した。3 者はすべて NK 細胞であったが、EBV DNA 末端繰り返し配列の解析により、咽頭潰瘍部には 2 クローン、リンパ節ではこの 2 クローンに加えてもう一つ別種の 1 クローンが存在すること、末梢血からの細胞株はこの 3 番目のクローンと同一であることが判明した。

もう 1 名の患者からは、 $\alpha$ B T、 $\gamma$  $\delta$  T、NK の 3 つの異なるタイプの EBV 感染細胞クローンが樹立された。これらのクローンにおいて EBV DNA 末端繰り返し配列を解析したところ、すべてのクローンが同じ長さの繰り返し配列を有していたこと

から、同一クローンであると推測された。

#### 4. 高感度特異的 EBV 感染細胞同定法の CAEBV 診断への応用

CAEBV18 例を含む 26 症例の EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患の診断に本法を応用した。26 例のうち、全リンパ球中 0.5% 以上の EBV 陽性細胞率を示す患者 23 例では EBV 感染細胞の同定が可能であった。23 症例のうち、NK 細胞に主に EBV が感染していた患者が 8 例、 $\gamma\delta$ T 細胞が 6 例、CD8+T 細胞が 5 例、CD4+T 細胞が 4 例、NKT 細胞が 2 例であった。また、種痘様水疱症を伴う慢性活動性 EBV 感染症患者 8 例中では、 $\gamma\delta$ T 細胞 5 例、NK 細胞 1 例、NKT 細胞 1 例に EBV の感染を認めた。特に、複数の細胞群に EBV が感染している症例では、EBV 感染細胞の同定に本法が有用であることが示された。

#### 5. CAEBV 由来 EBV 感染 T 及び NK 細胞株の NOG マウスへの生着条件の検討

EBV 感染 T 及び NK 細胞の生着には CD4<sup>+</sup>細胞が必須の役割を果たすことが示された。また PBMC を移植後に OKT-4 抗体をマウスに投与して CD4<sup>+</sup>細胞を除去すると EBV 感染細胞の生着を防ぐことができたことから、CD4<sup>+</sup>細胞を標的とする新しい治療法の可能性が考えられた。

#### 6. L-asparagine の探索的臨床研究

20~62 歳の女性患者 5 名を対象とした。治療開始後一ヵ月後の末梢血中 EBV 量は、1 例で治療前の 0.08 倍に減少したが、1 例で 22 倍に増加、2 例は不変であった。もう 1 例は投与中鼻粘膜病変が増悪したため途中で投与を中止した。L-asparagine の効果に影響を与える可能性がある Asparagine synthetase (AS) の発現は、L-asparagine が効果を示した症例で有意に低かった。有害事象として grade2、3 の肝障害が、2 例 (2/5

40%) grade3 の好中球減少が 1 例 (1/5 10%) に認められた。

#### 7. 再発時に EBV ゲノム脱落と CD56 発現消失を認めた NK 細胞リンパ腫の症例報告

14 歳男子の縦隔原発 EBV 陽性 NK 細胞リンパ腫に対して同種骨髄移植を行ったところ、移植後 15 ヶ月で中枢神経限局的な再発を認めた。再発時のリンパ腫細胞は EBV ゲノムを欠き、CD56 発現も消失していた。この症例は、EBV が腫瘍形質の維持に不要である場合があること、EBV コピー数のモニタリングのみでは再発を見逃す可能性があることを示唆している。

#### D. 考察

CAEBV の発症においては、EBV 感染 T 或いは NK 細胞の増殖が根本要因となることは疑いないと考えられるが、なぜ一部の宿主のみでこれらの細胞が免疫機構により排除されず増殖するのかは全く謎である。東アジアおよび中南米に患者が多いことから何らかの遺伝的背景があると考えられてきたが、詳細は不明であった。Common Variable Immunodeficiency (CVID) 症例の中から 4 例の CAEBV 患者が見いだされたことは、EBV 感染 T 及び NK 細胞が免疫機構により排除されない原因として何らかの先天性免疫不全が存在することを示唆している。今後エクソーム解析などを通じて CAEBV 発症につながる遺伝子変異が発見される可能性が考えられる。

EBV による T 及び NK 細胞の増殖誘発のメカニズムについてもほとんど知られていない。今回の実験により、T 及び NK 細胞においても B 細胞と同様に、EBV 蛋

白質 LMP1 による細胞転写因子 NF- $\kappa$ B 活性化を経てアポトーシスが抑制されることが重要なステップとなっていることが示唆された。また、EBV 感染 T 及び NK 細胞では、薬物の細胞外への排出に関わる P-gp が強く発現されるため、CHOP などの化学療法の効果が減弱すると考えられた。

一人の CAEBV 患者から  $\alpha\beta$ T、 $\gamma\delta$ T、及び NK の三つのフェノタイプを示す EBV 感染クローンが見つかり、それらのクローンが EBV DNA 末端配列の解析から同一細胞に由来する単一クローンであることが示されたことは、T 及び NK 細胞が分化する以前の未分化な段階の細胞に EBV が感染することが CAEBV 発症の要因となる可能性を示唆している。今後、未分化 T 及び NK 細胞に対する感染実験を行い、この点を検証したい。

CAEBV 由来 EBV 感染細胞の生着に CD4+細胞が必要であることは、この細胞が厳密な意味での自律増殖能を獲得していないことを示しており、少なくとも CAEBV の初期においては、EBV 感染が悪性度の低い細胞であることを示唆している。また、CD4+細胞を標的とする新規治療法の可能性が考えられる。

EBER in situ hybridization とフローサイトメトリーを組み合わせた新規 EBV 感染細胞同定法の開発により、侵襲が少なく精度の高い CAEBV 診断が可能となり、正確な診断に基づく適切な治療の実施が可能となったと考えられる。

CAEBV 成人例に対する L-asp の探索的臨床試験においては、残念ながらその効果を示すことが出来なかった。しかし、AS 発現の低い細胞で L-asp の有効性が高いことを示唆する結果が得られたことは、

今後の治療プロトコルを考える上で意義があると考えられる。

## E. 結論

①分類不能型免疫不全症 199 症例の中から 4 例の CAEBV 発症が認められたことにより、CAEBV 発症の背景に何らかの先天性免疫不全が存在する可能性が考えられた。

②CAEBV 由来の EBV 感染 T 及び NK 細胞においては EBV 蛋白質 LMP1 による細胞転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化がアポトーシスを抑制していることが示された。またこれらの細胞では、P 糖蛋白質 (P-gp) が化学療法に対する感受性低下に関わることが示唆された。

③CAEBV 患者では、臓器によって異なる EBV 感染細胞クローンが存在していることが示された。またある患者では、T 細胞と NK 細胞が分化する以前の未熟な細胞に EBV が感染したものと推定された。

④EBER in situ hybridization とフローサイトメトリーを組み合わせた高感度特異的 EBV 感染細胞同定法を CAEBV 診断に応用した結果、低侵襲的で正確な診断が可能となった。

⑤CAEBV 由来の EBV 感染 T 及び NK 細胞の増殖には CD4+ T 細胞が重要な役割を果たすことが示され、この細胞を標的とする新しい治療法の可能性が示唆された。

⑥5 例の CAEBV 成人症例に対する探索的臨床研究において L-asp の有効性は示されなかった。

⑦再発時に EBV ゲノムが脱落し CD56 発現が消失した NK 細胞リンパ腫症例が報告された。

## F. 健康危機情報

該当なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表



- 1) Arai A., Imadome K, Watanabe Y., Yoshimori M., Koyama T., Kawaguchi T., Nakaseko C., Fujiwara S., and Miura O., Clinical features of adult-onset chronic active Epstein-Barr virus infection: a retrospective analysis. *Int J Hematol.* 2011. DOI 10.1007/s12185-011-0831-x
- 2) Arai A, Imadome K, Fujiwara S, 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* 49:325-329,2010
- 3) Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsui N, Takagi M, Matsuda K, Muramatsu H, Doisaki S, Nagasawa M, Morio T, Kasahara Y, Koike K, Kojima S, Takao A, Mizutani S. Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome Like Disease With Somatic KRAS Mutation. *Blood* [Nov 9, Epub ahead of print], 2010.
- 4) Okamoto K, Iwai Y, Ohhara M, Yamamoto M, Morio T, Aoki K, Ohya K, Jetten AM, Akira S, Muta T, Takayanagi H. I $\kappa$ B $\alpha$  regulates TH17 development by cooperating with ROR nuclear receptors. *Nature.* 464: 1381–1385, 2010.
- 5) Albert MH, Bittner TC, Nonoyama S, Notarangelo LD, Burns S, Imai K, Espanol T, Fasth A, Pellier I, Strauss G, Morio T, Gathmann B, Noordzij JG, Fillat C, Hoenig M, Nathrath M, Meindl A, Pagel P, Wintergerst U, Fischer A, Thrasher AJ, Belohradsky BH, Ochs HD. X-linked thrombocytopenia (XLT) due to WAS mutations: Clinical characteristics, long-term outcome, and treatment options. *Blood.* 115:3231-3238, 2010.
- 6) Nagasawa M., Ogawa K., Nagata K., Shimizu N. Serum granulysin as a possible biomarker of NK cell neoplasm. *Br J Haematol.* 148(5):812-814, 2010.
- 7) Zhang Y, Ohyashiki JH, Shimizu N, Ohyashiki K. Aberrant expression of NK cell receptors in Epstein-Barr virus-positive gammadelta T-cell lymphoproliferative disorders. *Hematology.* 15(1):43-47, 2010.
- 8) Kariya Y, Hamatake M, Urano E, Yoshiyama H, Shimizu N, Komano J. Dominant-negative derivative of EBNA1 represses EBNA1- mediated transforming gene expression of Epstein-Barr virus infection independent of rapid loss of viral genome. *Cancer Sci.* 101(4):876-881, 2010.
- 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.* 91(Pt1):42-50, 2010.
- 10) Chan KK, Shen L, Au WY, Yuen HF, Wong KY, Guo T, Wong ML, Shimizu N, Tsuchiyama J, Kwong YL, Liang RH, Srivastava G. Interleukin-2 induces NF-kappaB activation through BCL10 and affects its subcellular localization in natural killer lymphoma cells. *J Pathol.* 221(2):164-74, 2010.
- 11) Iwata S, Yano S, Ito Y, Ushijima Y, Gotoh K, Kawada J, Fujiwara S, Sugimoto K, Isobe Y, Nishiyama Y, Kimura H. Bortezomib Induces Apoptosis in T Lymphoma Cells and Natural Killer Lymphoma Cells Independent of Epstein-Barr Virus Infection. *Int J Cancer* 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* 202;461-469, 2010.

13) Ito Y, Takakura S, Ichiyama S, Ueda M, Ando Y, Matsuda K, Hidaka E, Nakatani A, Ishioka J, Nobori T, Sasaki M, Kimura H. Multicenter evaluation of prototype real-time PCR assays for Epstein-Barr virus and cytomegalovirus DNA in whole blood samples from transplant recipients. *Microbiol Immunol* 54:516-22, 2010.

14) Calatini S, Sereti I, Scheinberg P, Kimura H, Childs R, Cohen JI. Detection of EBV genomes in plasmablasts/plasma cells and non-B cells in the blood of most patients with EBV lymphoproliferative disorders using Immuno-FISH. *Blood* 116:4546-59, 2010.

15) Hoshino Y, Nishikawa K, Ito Y, Kuzushima K, Kimura H. Kinetics of Epstein-Barr Virus Load and Virus-Specific CD8+ T Cells in Acute Infectious Mononucleosis. *J Clin Virol* 50: 244246, 2011.

16) Dohno S, Maeda A, Ishiura Y, Sato T, Fujieda M, Wakiguchi H : Diagnosis of infectious mononucleosis caused by Epstein-Barr virus in infants. *Pediatrics International*, 52(4), 536-540, 2010, 8.

17) 今村秀明, 水上智之, 下之段秀美, 布井博幸, 西口俊裕, 佐藤哲也, 前田明彦, 脇口 宏 : Behcet 病様症状が主体であった慢性活動性 EB ウイルス感染症の 1 例. *日本小児科学会雑誌*, 114 巻 11 号 , 1733-1738, 2010.

## 2. 著書

なし。

## 3. 学会発表

1) 渡部優子、高橋真由美、今留謙一、藤原成悦、三浦修、新井文子. Epstein-Barr virus-positive T- or NK-cell lymphoproliferative disorder 成人例の臨床的特徴と化学療法の効果. 第 20 回 EB ウイルス感染症研究会 2010 年 3 月東京

2) Takahashi M, Imadome K, Kurata M, Koyama T, Fujiwara S, Miura O, Arai A. P-glycoprotein expression is enhanced in Epstein-Barr Virus (EBV)-infected T or NK cells and may cause drug resistance of Chronic Active EBV Infection. The 15th Congress of European Hematology Association, June 2010 Barcelona.

3) Arai A, Watanabe Y, Imadome K, Takahashi M, Fujiwara S, Miura O. Clinical features and response to chemotherapy of Chronic Active EBV Infection in adulthood: A retrospective analysis. The 15th Congress of European Hematology Association, June 2010 Barcelona.

4) Arai A, Takahashi M, Imadome K, Koyama T, Saitoh Y, Yamaoka S, Fujiwara S, Miura O. NF-kB Is Constitutively Activated in EBV-infected T or NK Cells and Can Be a Molecular Target for EBV-positive T/NK-cell Lymphoproliferative Disease Treatment. The 52nd Annual meeting of American society of Hematology December 2010 Orlando.

5) Ken-Ichi Imadome, Misako Yajima, Ayako Arai, Atsuko Nakagawa, Fuyuko Kawano, Sayumi Ichikawa, Hiroyuki Nakamura, Osamu Miura, Mamoru Ito, Norio Shimizu, Naoki Yamamoto, and Shigeyoshi Fujiwara. A XENOTRANSPLANT MODEL OF CHRONIC ACTIVE EPSTEIN-BARR

VIRUS (EBV) INFECTION BY USE OF NOG MICE. The 14th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr Virus & Associated Diseases. Sep. 7, 2010, Birmingham, UK.

6) 今留謙一、矢島美彩子、川野布由子、中澤温子、市川紗弓、中村浩幸、清水則夫、伊藤守、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製と解析. 第 25 回ヘルペスウイルス研究会、2010 年 5 月 27-29 日、浜松.

7) 今留謙一、矢島美彩子、川野布由子、新井文子、中澤温子、市川紗弓、中村浩幸、清水則夫、伊藤守、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製と解析. 第 7 回 EB ウイルス研究会、2010 年 7 月 9 日、札幌.

8) 田中久美子、今留謙一、川野布由子、市川紗弓、松田剛、藤原成悦. NOG マウスを利用した EB ウイルス感染細胞の同定. 第 7 回 EB ウイルス研究会、2010 年 7 月 9 日、札幌.

9) 今留謙一、矢島美彩子、川野布由子、市川紗弓、清水則夫、中村浩幸、松田剛、駒野淳、山本直樹、藤原成悦. EB ウイルス関連血球貪食症候群モデルマウスの作製と解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 9 日、徳島.

10) Kimura H, Ito Y, Kawabe S, Gotoh K, Iwata S, Nishiyama Y. Noninvasive identification of EBV-infected lymphocyte subtypes in EBV-associated T/NK lymphoproliferative diseases. The 14th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr virus & Associated Diseases, Birmingham,

UK (2010.9).

11) Kawada J, Iwata S, Yano S, Gotoh K, Ito Y, Fujiwara S, Isobe Y, Sugimoto K, Nishiyama Y, Kimura K. Bortezomib Induces Apoptosis in T Lymphoma Cells and Natural Killer Lymphoma Cells Independent of Epstein-Barr Virus Infection. The 14th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr virus & Associated Diseases, Birmingham, UK (2010.9)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

EB ウイルスによる T および NK 細胞腫瘍発症機構の解析および  
慢性活動性 EB ウイルス感染症成人症例の治療法の開発に関する研究  
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）の病態解明と新規治療法の開発を目的に以下の 3 項目について研究を行った。

①EBV 陽性 T/NK リンパ増殖症における NF- $\kappa$ B 活性化：EBV 陽性 T/NK リンパ増殖症の EBV 感染腫瘍細胞では恒常的に NF- $\kappa$ B が活性化していた。発現ベクターを用いた解析では EBV 蛋白 LMP1 を介し NF- $\kappa$ B が活性化することが示された。それらの細胞は NF- $\kappa$ B の阻害剤 Bortezomib 処理によって apoptosis が誘導された。以上から EBV 陽性 T/NK リンパ増殖症の発症には LMP1 を介した NF- $\kappa$ B の活性化が関与していると考えられた。

②CAEBV と P-glycoprotein (P-gp) 発現：CAEBV の EBV 感染腫瘍細胞では薬剤耐性に関与する分子 P-gp が強く発現し、薬剤排出機能を示すことを見出した。さらに P-gp の阻害剤 Cyclosporin A 処理により Doxorubicin による apoptosis 誘導は亢進することが示された。以上から P-gp は CAEBV の化学療法耐性の原因のひとつであることが示された。

③CAEBV 成人例に対する L-asparaginase (L-asp) 単剤療法の検討：至適治療法開発のため、5 人の CAEBV 成人例に対し、L-asp の効果を検討する前向き探索的研究を施行した。末梢血中 EBV 量は 1 例で 0.08 倍の減少を見たが、1 例で 22 倍に増加、2 例は不変であった。1 例は投与中鼻粘膜病変が増悪したため途中で中止した。各々の症例に対して EBV 感染腫瘍細胞の Asparagine synthetase (AS) の発現の検討を行ったところ、効果を示した症例では発現が有意に低かった。以上から L-asp の有効性は AS 依存性である可能性が示唆された。

## A. 研究目的

慢性活動性 Epstein-Barr ウイルス (EBV) ウイルス感染症 (CAEBV) は、近年 EBV 感染 T もしくは NK 細胞のクローン性増殖を伴う事が明らかになり、腫瘍であるとの位置づけがなされ、2008 年度版 WHO 造血器腫瘍分類にリンパ腫のひとつとして記載された。疾患の周知に従い、近年症例報告は増加しているが、その発

症メカニズム、特に EBV が本当に腫瘍発症に寄与しているのかは証明されていない。また 2009 年度の研究で私達が明らかにしたとおり(業績、論文 1)、CHOP 療法、大量 Cytarabine 療法をはじめとする化学療法に抵抗性の症例が多く、予後は極めて不良である。

本研究では、それらの問題点を解析、解決するために、以下の 3 つの解析を行っ

た。

① **EBV 陽性 T/NK リンパ増殖症**における **NF-kB 活性化**: EBV 陽性 T/NK リンパ増殖症腫瘍細胞の不死化メカニズムを NF-kB の活性化に注目し検討した。

② **CAEBV と MDR1 発現**: CAEBV の化学療法抵抗性の原因について、薬剤耐性に関与する分子のひとつ、P-glycoprotein (P-gp) に注目し、その発現量、機能を患者の細胞を用いて解析した。

③ **CAEBV 成人例**に対する **L-asparaginase (L-asp) 単剤療法**の検討: CAEBV 治療法確立のため L-asp 単剤の有効性を前向きに検討した。L-asp は CAEBV 同様 EBV 陽性 T/NK 腫瘍である extranodal NK/T-cell lymphoma nasal type (ENKL) 治療の中心的薬剤であり、同疾患に対しても単剤で有効であるとの報告がある。よって効果が期待された。

## B. 研究方法

① 解析には EBV 陽性 T/NK リンパ増殖症細胞株 (SNT8,15,16, SNK6: 清水則夫博士より供与)、および CAEBV 患者の末梢血から磁気ビーズを用いて分離した EBV 感染細胞を用いた。対照には EBV 陰性 T および NK 細胞腫瘍株を用いた。NF-kB 活性化は Western blotting および electrophoretic mobility shift assay (EMSA) で検討した。EBV 感染と NF-kB 活性化の関連は、EBV 蛋白発現ベクターと reported plasmid を用いた一過性発現実験系で検討した。最後に NF-kB 阻害剤 Bortezomib で細胞を処理し apoptosis 誘導を検討した。

② 解析は①同様、EBV 陽性 T/NK リンパ増殖症細胞株 (SNT8,15,16, SNK6: 清水則夫博士より供与)、および CAEBV 患者

の末梢血から磁気ビーズを用いて分離した EBV 感染細胞を用い、それらにおける P-gp の発現を RNA(RT-PCR) および蛋白 (Western blotting) レベルで確認した。

また P-gp の薬剤排出機能を Rhodamine efflux assay で検討した。対照には、EBV 陽性 B 細胞リンパ腫細胞株、EBV 陰性 T および NK 細胞腫瘍株を用いた。また、これらの細胞に対し P-gp 阻害剤 Cyclosporin A (CsA) を用いて Doxorubicin に対する apoptosis の変化を検討した。

③ 治療法開発のため EBV 感染症研究会診断指針に基づいて診断され、十分な肝腎機能を持つ患者に対し L-asp を一日一回、6000 U/m<sup>2</sup> を隔日で 7 回投与した。主評価項目は一ヵ月後の末梢血 EBV-DNA 量の減少率、副評価項目は有害事象発現率とした。また、EBV 感染腫瘍細胞の Asparagine synthetase (AS) の発現を RT-PCR 法で解析し、L-asp の効果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承認され (臨床試験は東京医科歯科大学医学部附属病院施設内審査委員会の承認、患者の文書による同意を患者の同意を得て施行した。③は UMIN-CTR へ登録し、施行した (UMIN 試験 ID : UMIN000003498)。

## C. 研究結果

① EBV 陽性 T/NK 細胞株および 10 例の CAEBV 患者細胞で NF-kB の構成分子である p52、p50、RelA が核に恒常的に局在し、DNA 結合能を持つ事が示された。つまり NF-kB が古典的および非古典的経路両者を介して恒常的に活性化してい

た。Reporter assay では EBV 蛋白 LMP1 によって NF- $\kappa$ B の活性化がもたらされた。さらに NF- $\kappa$ B の阻害剤 Bortezomib 処理によってこれらの細胞では apoptosis が誘導された。以上から EBV 陽性 T/NK リンパ増殖症発症では LMP1 を介した NF- $\kappa$ B の活性化がおこり細胞の不死化、腫瘍発症に寄与していると考えられた。

② EBV 陽性 T/NK 細胞株および 12 例の CAEBV 患者細胞で P-gp が強く発現し、薬剤排出機能を示すことを見出した。以上はコントロール細胞では認められなかった。さらに P-gp の阻害因子 CsA によりこれらの細胞で Doxorubicin による apoptosis 誘導は亢進することが示された。以上から P-gp は CAEBV の化学療法耐性に寄与することが示された。

③対象患者は女性 5 名。年齢は 20～62 歳の成人。感染細胞は CD8 陽性 T 細胞 1 例、CD4 陽性細胞 2 例、CD56 陽性細胞 2 例であった。

治療開始後一ヵ月後の末梢血中 EBV 量は、1 例で治療前の 0.08 倍へ減少を見たが、1 例で 22 倍に増加、2 例は不変であった。1 例は投与中鼻粘膜病変が増悪したため途中で投与を中止した。EBV 感染腫瘍細胞の AS の発現の検討では同分子は効果を示した症例で発現が有意に低かった。

有害事象として grade2、3 の肝障害が、2 例 (2/5 40%) grade3 の好中球減少が 1 例 (1/5 10%) に認められた。いずれも ALL 治療時と比較し高いと考えられた。

#### D. 考察

① 今回の私達の解析では、T もしくは NK 細胞でも、B 細胞同様に EBV 蛋白

LMP1 により NF- $\kappa$ B を介したシグナルが実際に活性化され不死化を誘導することがしめされた。このことは、CAEBV においてクローン性に増殖している EBV 陽性 T もしくは NK 細胞が腫瘍の性質を持つことを強く裏付ける。CAEBV は果たして腫瘍であるのか？そして EBV が実際に T/NK 細胞においても腫瘍発症の原因となっているのか？今回の結果はこの問題の解決へ、つまり腫瘍であるという方向へ一歩前進しえたと考える。今後は T もしくは NK 細胞に対する EBV 感染実験を試み、それによる NF- $\kappa$ B 活性化、さらに不死化に対する EBV の直接の影響をしめす必要がある。

また、今回の結果から NF- $\kappa$ B は CAEBV の治療の標的分子となりうる可能性が示された。今後はマウスモデルを用いた検討を加えた上で Bortezomib をはじめとする NF- $\kappa$ B 阻害剤の効果を検討する新規治療法開発に向け治療法開発臨床試験を行う予定である

② 今まで私たちは CAEBV に対し CHOP 療法をはじめとした化学療法が抵抗性を示すことを明らかにしてきた。今回の結果から P-gp による薬剤の細胞外への排出がその原因のひとつであることがしめされた。今後は P-gp に影響を受けない薬剤の検討が望まれる。しかし、①で検討した Bortezomib も含め多くの化学療法剤は、P-gp により細胞外へくみ出されることが知られている。今回の結果では P-gp 阻害剤である CsA と Doxorubicin の併用の有効性も示唆されている。これらの結果をもとに今後多剤併用療法の開発を行っていく予定である。

③ L-asparaginase は、CAEBV と同じく EBV 感染腫瘍で P-gp の発現が高く CHOP 抵抗

性をしめすENKLで効果を認めることは周知であり、さらにP-gpの影響を受けない。よって効果が期待された薬剤であったが治療効果は明らかにはならなかった。その原因のひとつはCAEBVの病態の複雑さにあると考える。今回の検討では、L-asplの効果に影響を与えるとの報告もあるASの発現が患者ごとに大きく異なっていた。AS発現のみならず、CAEBVは感染細胞、臨床像など、非常に多様性がある。今後は多くの症例を引き続き解析することで、それらの因子の詳細な検討を重ね、因子別の治療効果の検討が必要と考える。

#### E. 結論

EBVはLMP1を介してNF- $\kappa$ Bを活性化しEBV陽性T・NK細胞腫瘍発症の原因になる事が示された。またCAEBVの治療抵抗性の原因のひとつはP-gpであることも示された。

L-asplのCAEBVに対する有効性は示せなかったが、今回の検討結果を元に今後、Bortezomib、CsAなどを含めた新規治療法を検討する予定である。

#### F. 研究危険情報 なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 刊行物

##### 論文発表

1. Arai A., Imadome K, Watanabe Y., Yoshimori M., Koyama T., Kawaguchi T., Nakaseko C., Fujiwara S., and Miura O., Clinical features of adult-onset chronic active Epstein-Barr virus infection: a retrospective analysis. *Int J Hematol.* 2011. DOI 10.1007/s12185-011-0831-x

2. Arai A, Imadome K, Fujiwara S, 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* 49:325-329,2010

3. Kuninaka N, Kurata M, Yamamoto K, Suzuki S, Umeda S, Kirimura S, Arai A, Nakagawa Y, Suzuki K, Kitagawa M Expression of Toll-like receptor 9 in bone marrow cells of myelodysplastic syndromes is down-regulated during transformation to overt leukemia. *Exp Mol Pathol* 88:293-298,2010

4. Nakagawa Y, Suzuki K, Hirose T, Chou T, Fujisawa S, Kida M, Usuki K, Ishida Y, Taniguchi S, Kouzai Y, Tomoyasu S, Miyazaki K, Higashihara M, Ando K, Aoki S, Arai A, Akiyama N, Hatake K, Okamoto S, Dan K, Ohyashiki K, Urabe A Clinical efficacy and safety of biapenem for febrile neutropenia in patients with underlying hematopoietic diseases: a multi-institutional study. *J Infect Chemother* 17:58-67,2010

5. Nakauchi Y, Takase H, Sugita S, Mochizuki M, Shibata S, Ishiwata Y, Shibuya Y, Yasuhara M, Miura O, Arai A Concurrent administration of intravenous systemic and intravitreal methotrexate for intraocular lymphoma with central nervous system involvement. *Int J Hematol* 92:179-185,2010

6. Okuhashi Y, Itoh M, Arai A, Nara N, Tohda S Gamma-secretase inhibitors induce erythroid differentiation in erythroid leukemia cell lines. *Anticancer Res* 30:4071-4074,2010

7. Oshikawa G, Kurosu T, Arai A, Murakami N, Miura O Clonal evolution with double Ph

followed by tetraploidy in imatinib-treated chronic myeloid leukemia with e19a2 transcript in transformation. *Cancer Genet Cytogenet* 199:56-61,2010

### 著書

1. 新井文子 眼附属器 MALT リンパ腫の臨床病理学的特徴と治療 血液・腫瘍科 60:521-525, 2010 科学評論社

### 2. 学会発表

#### 国内学会

第 32 回日本造血細胞移植学会総会 2010 年 2 月浜松

・中枢神経浸潤を伴った悪性リンパ腫に対して自己末梢血幹細胞移植

(BU/CY/TEPA) を施行した 3 例

大木学、糸川華枝、佐々木宏治、村田論孝、山本正英、黒須哲也、福田哲也、新井文子、東田修二、小山高敏、村上直巳、三浦修

・同種移植後難治性出血性膀胱炎に対し高圧酸素療法が奏効した一例

佐々木宏治、糸川華枝、村田論孝、山本正英、大木学、黒須哲也、福田哲也、新井文子、大橋一輝、秋山秀樹、坂巻壽、三浦修

第 164 回日本血液学会例会 2010 年 2 月東京

・再生不良性貧血の経過中に反応性形質細胞増加を合併した一例

糸川華恵、佐々木宏治、村田論孝、山本正英、大木学、黒須哲也、福田哲也、新井文子、三浦修、村上直巳

第 20 回 EB ウイルス感染症研究会 2010 年 3 月東京

・ Epstein-Barr virus-positive T- or NK-cell lymphoproliferative disorder 成人例の臨床的特徴と化学療法の効果

渡部優子、高橋真由美、今留謙一、藤原成悦、三浦修、新井文子

・ 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製と病態発現解析  
今留謙一、矢島美彩子、川野布由子、中川温子、新井文子、市川紗弓、森尾友宏、大賀正一、大石勉、清水則夫、山本直樹、藤原成悦

第 27 回日本 TDM 学会・学術大会 2010 年 6 月札幌

・メトトレキサートの静脈内・眼内投与併用時の血清及び硝子体液の薬物濃度モニタリング

柴田聡子、石渡泰芳、渋谷有香、安原真人、中内祐介、新井文子、三浦修、高瀬博、杉田直、望月學

第 72 回日本血液学会学術集会 2010 年 9 月横浜

・ Intraocular lymphoma with CNS involvement treated with concurrent intravenous and intravitreal MTX

Yusuke Nakauchi, Hiroshi Takase, Sunao Sugita, Manabu Mochizuki, Satoko Shibata, Yasuyoshi Ishiwata, Yuka Shibuya, Masato Yasuhara, Osamu Miura, Ayako Arai

・ P-glycoprotein expression is enhanced in EBV-infected T or NK cells in CAEBV and may cause its chemoresistance

Mayumi Takahashi, Ken-Ichi Imadome, Morito Kurata, Takatoshi Koyama, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura, Ayako Arai



第64回日本臨床眼科学会 2010年11月神戸

・眼内リンパ腫に対する治療と全身予後の検討

高瀬博、岩永洋一、菅本良治、川口龍史、高橋仁美、横田眞子、鴨居功樹、宮永将、杉田直、望月學、新井文子

### 国際学会

The 15th Congress of European Hematology Association, June 2010 Barcelona

・ Mayumi Takahashi, Ken-Ichi Imadome, Morito Kurata, Takatoshi Koyama, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura, Ayako Arai

P-glycoprotein expression is enhanced in Epstein-Barr Virus (EBV)-infected T or NK cells and may cause drug resistance of Chronic Active EBV Infection

・ Ayako Arai, Yuko Watanabe, Ken-Ichi Imadome, Mayumi Takahashi, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura

Clinical features and response to chemotherapy of Chronic Active EBV Infection in adulthood: A retrospective analysis

The 14th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr Virus & Associated Diseases

September 2010, Birmingham

・ Ken-Ichi Imadome, Misako Yajima, Ayako Arai, Atsuko Nakagawa, Fuyuko Kawano, Sayumi Ichikawa, Hiroyuki Nakamura, Osamu Miura, Mamoru Ito, Norio Shimizu, Naoki Yamamoto, and Shigeyoshi Fujiwara

A xenotransplant model of chronic active Epstein-Barr virus(EBV) infection by use of NOG mice

The 52nd Annual meeting of American society of Hematology December 2010 Orlando

・ Ayako Arai, Mayumi Takahashi, Ken-Ichi Imadome, Takatoshi Koyama, Yasunori Saitoh, Shoji Yamaoka, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura

NF- $\kappa$ B Is Constitutively Activated in EBV-infected T or NK Cells and Can Be a Molecular Target for EBV-positive T/NK-cell Lymphoproliferative Disease Treatment

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

新規開発した高感度特異的 EBV 感染細胞同定法を、慢性活動性 EBV 感染症患者を含む EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患患者 26 症例に対して応用した。患者末梢血リンパ球中 0.15~67%のリンパ球が EBV 陽性で、EBV 陽性細胞率 0.5%以上の症例では感染細胞の同定が可能だった。本法による EBV 陽性細胞率とリアルタイム PCR 法の EBV-DNA 量の間に関連を認めた。種痘様水疱症を伴う慢性活動性 EBV 感染症患者では $\gamma\delta$ T 細胞 5 例、NK 細胞 1 例、NKT 細胞 1 例に感染を認めた。また 2 例の患者では 2 種類の細胞群に EBV の感染を認めた。以上より、一定以上の感染細胞が存在する場合、本法による EBV 感染細胞の同定が可能であることがわかった。特に複数の lineage の細胞に EBV が感染する疾患の診断に有用である。本法は侵襲的かつ一部の患者では行い得ない病理学的診断を補完し、T/NK リンパ増殖性疾患の疾患分類や発症病理の解析に役立つと考えた。

A. 研究目的

Epstein-Barr Virus (EBV) は B 細胞のみでなく T 細胞や NK 細胞に感染し様々な病態を引き起こす。EBV 関連疾患の診断と発症病理の解明には EBV 感染細胞の同定と定量が必須である。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重要である。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。

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 T/NK リンパ増殖性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性を検証した。

B. 研究方法

対象は慢性活動性 EBV 感染症 18 例、血球貪食性リンパ組織球症 4 例、全身性 EBV 陽性 T 細胞リンパ増殖症 2 例、末梢性 T 細胞リンパ腫 1 例、アグレッシブ NK 細胞性白血病 1 例の計 26 例。

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。

比較対照として、単核球より DNA を抽出し、リアルタイム PCR 法により EBV-DNA を定量した。

（倫理面への配慮）

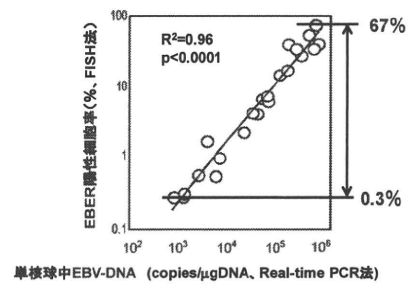
参加症例に対しては、平成 15 年 7 月 30 日付厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針」に則り、十分な説明を施した上で、患者および親権者よりインフォームドコンセントを得た。さらに検体の採取法、患者情報の取り扱いについても倫理規定を遵守し、個人情報の擁護に努めることとした。また本研究は、名古屋大学医学部倫理委員会にて承認されている。

### 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、全例の単核球中 0.3-67% に EBER 陽性細胞を認め、陽性細胞率は血液単核球中の EBV-DNA 量と相関していた（図 1）。

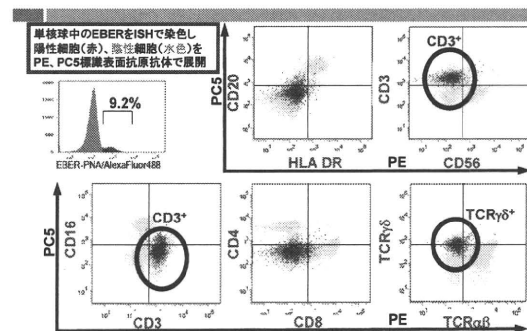
EBER 陽性細胞率 0.5% 以上の 23 症例では感染細胞の同定が可能だった。解析できた 23 症例中、NK 細胞に主に EBV が感染していた患者が 8 例、 $\gamma\delta$ T 細胞が 6 例、CD8<sup>+</sup>T 細胞が 5 例、CD4<sup>+</sup>T 細胞が 4 例、NKT 細胞が 2 例であった。

**図1 単核球中EBV-DNA量と FISH法におけるEBER陽性細胞率との相関**



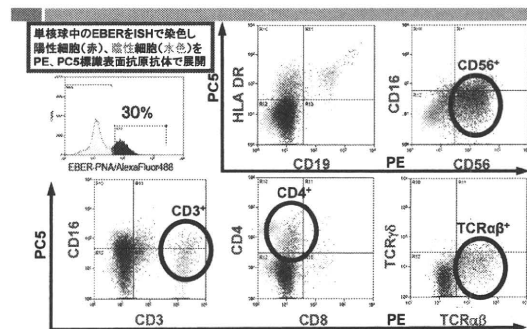
種痘様水疱症を伴う慢性活動性 EBV 感染症患者 8 例中では、 $\gamma\delta$ T 細胞 5 例、NK 細胞 1 例、NKT 細胞 1 例に EBV の感染を認めた。末梢血  $\gamma\delta$ T 細胞への EBV 感染を認めた症例の FISH 法の結果を示す（図 2）。

**図2 慢性活動性EBV感染症 6歳・女児**



更に 2 症例においては複数の細胞群に EBV 感染を認めた。図 3 に示した症例では CD56 陽性の NK 細胞に主に感染しているものの、CD3、CD4、TCR $\alpha\beta$ 陽性の T 細胞にも一部感染していると考えられた。

**図3 症例3. 8歳・男児**



## D. 考察

慢性活動性 EBV 感染症の診断には、EBV がどのリンパ球分画に感染しているかを決定することが必須である。従来は病理診断法が最も信頼性が高い診断法とされていたが、同法は侵襲が高いこと、また必ずしもすべての患者で病理組織を得られないという欠点があった。我々が新規に開発した高感度特異的 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。

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 8 例中では、 $\gamma\delta$ T 細胞 5 例、NK 細胞 1 例、NKT 細胞 1 例に EBV の感染を認めた。種痘様水疱症とは、日光暴露部位の皮膚に限局し、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簇している 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。

以上より、一定以上の感染細胞が存在する場合、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ことがわかった。特に複数の lineage の細胞に EBV が感染する疾患の診断に有用である。本法は侵襲的かつ一部の患者では行い得ない病理学的診断を補完し、T/NK リンパ増殖性疾患の疾患分類や発症病理の解析に役立つと考えた。

今後は、誰にでも利用可能で幅広く用いられるために、プロトコール化されたキットを製作すること、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をはかり、そして最終的には同法の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 と細胞表面蛋白質とをともにも蛍光染色したのち、フローサイトメトリーにより同時に解析する検査法を独自に開発した（高感度特異的 EBV 感染細胞同定法）。平成 22 年度はこの検査法を慢性活動性 EBV 感染症患者を含む EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患患者 26 症例に対して応用した。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 EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患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) 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* 90: 42-50, 2010
- 2) 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* 48: 825-30, 2010
- 3) 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