

- Recipients with Chronic High Epstein-Barr Viral Loads. *J Infect Dis* 202:461-469, 2010
- 4) Kawabe S, Ito Y, Ohta R, Sofue A, Gotoh K, Morishima T, **Kimura H**. Comparison of the cerebrospinal fluid levels and serum concentrations of human herpesvirus 6 (HHV-6) DNA and cytokines in children with HHV-6 encephalopathy. *J Med Virol* 82:1410-1415, 2010
- 5) Ushijima Y, Luo C, Kamakura M, Goshima F, **Kimura H**, Nishiyama Y. Herpes simplex virus UL56 interacts with and regulates the Nedd4-family ubiquitin ligase Itch. *Virology J* 7:179, 2010
- 6) 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
- 7) 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
- 8) Gotoh K, Ito Y, Suzuki E, Kaneko K, Kiuchi T, Ando H, **Kimura H**. Effectiveness and safety of inactivated influenza vaccination in pediatric liver transplant recipients over three influenza seasons. *Pediatr Transplant* 15: 112-116, 2011
- 9) 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
- 10) Ohta R, Torii Y, Imai M, **Kimura H**, Okada N, Ito Y. Serum concentrations of complement anaphylatoxins and proinflammatory mediators in patients with 2009 H1N1 influenza. *Microbiol Immunol* 55:191-8, 2011
- 11) Hayashi S, **Kimura H**, Oshiro M, Kato Y, Yasuda A, Suzuki C, Watanabe Y, Morishima T, Hayakawa M. Transmission of cytomegalovirus *via* breast milk in extremely premature infants. *J Perinatol in press*
- 12) 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*
- 13) Esaki S, Goshima F, **Kimura H**, Ikeda S, Katsumi S, Kabaya K, Watanabe M, Hashiba M, Nishiyama Y, Murakami S. Auditory and Vestibular Defects Induced by Experimental Labyrinthitis Following Herpes Simplex Virus in Mice. *Acta Oto-Laryngologica in press*
- 14) Esaki S, Kitoh J, Katsumi S, Goshima F, **Kimura H**, Safwat M, Yamano K, Watanabe N, Nonoguchi N, Nakamura T, Coffin RS, Miyatake S, Nishiyama Y, Murakami S. Hepatocyte growth factor incorporated into herpes simplex virus vector accelerates facial nerve regeneration after crush injury. *Gene Therapy in press*
- 15) Torii Y, **Kimura H**, Gotoh K, Ochi N, Kaneko K, Ando H, Kiuchi T, Ito Y. Immunogenicity of inactivated 2009 H1N1 influenza vaccine in pediatric liver transplant recipients. *Vaccine in press*

2. 学会発表

- 1) **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).
- 2) Gotoh K, Ito Y, Ohta R, Iwata S, Nishiyama Y, **Kimura H**. Immunologic and Virologic analyses in Pediatric Liver Transplant Recipients. Restricted EBV genome expression in pediatric liver transplant recipients with chronic high Epstein-Barr viral loads. The 14th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr virus & Associated Diseases, Birmingham, UK (2010.9)
- 3) 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)

3. その他

特になし。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし。

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

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、EBV 感染 T/NK 細胞を体内から免疫学的に排除することができず、末梢血中に持続的に検出され続けるのが特徴である。EBV 感染 T/NK 細胞から分泌されるサイトカインが CAEBV 患者の病態と密接に関連しているとともに、感染細胞はリンパ腫の原因ともなる。本研究は、CAEBV 原因である EBV 感染 T/NK 細胞がどのように成立・維持されているのかを探る事を目的に行った。その結果、患者末梢血中には複数の EBV 感染細胞クローンが存在し、その中からリンパ腫細胞が生じていると考えられる例や、細胞種の違う複数の EBV 感染細胞が末梢血中に検出される症例があることを見出した。これらの結果は、CAEBV 患者には当初複数の細胞クローンが存在し、その中から悪性形質を獲得した細胞が選択され、症状の重篤化やリンパ腫に至っている可能性を示唆している。

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、患者のほとんどは数年から十数年の経過で死亡する。抗ヘルペスウイルス剤（アシクロビルやガンシクロビル）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、長い経過を経て症状が徐々に悪化し、臓器不全、血球貪食症候群やリンパ腫の発症により死に至るケースが多い。

これまでの研究から、CAEBV の原因は EBV 感染 T/NK 細胞と考えられているが、EBV 感染 T/NK 細胞の成立過程や症状が持続的に進行する原因は必ずしも明らかになっていない。その理由は、in vitro で T 細胞や NK 細胞に EBV を実験的に感染し、感染細胞を長期

間維持して詳しく解析することが出来ない事が原因である。

我々は、CAEBV 患者末梢血から EBV 感染細胞株を樹立する方法を確立し、これまでに多くの EBV 感染 T/NK 細胞株を樹立することに成功した。本研究では、患者末梢血から得た単核球を小 Well に播種して（96well プレートを利用）EBV 感染細胞クローンを多数分離し、分離した細胞クローンを詳しく解析することにより、EBV 感染 T/NK 細胞クローンの成立過程や細胞の悪性形質獲得に至る道筋を考察することを目的に研究を行った。

B：研究方法

1. EBV 感染細胞クローンの分離培養

a. CAEBV 患者

患者 A: 24 歳女性 繰り返す咽頭炎と発熱により受診し CAEBV と診断され、咽頭潰瘍、悪性リンパ腫を発症した。その後、造血幹細胞移植を受けるが、その後間質性肺炎、敗血症により死亡。

患者 B: 23 歳男性 蚊刺過敏症にて発症し、約 3 年間の経過中症状の変化はない。

b. 細胞培養

患者末梢血より比重遠心法により単核球を分離し、 1×10^5 cells/well の割合で 96 well plate に播種した。細胞培養には、RPMI1640 + 700IU/ml rIL-2 + 10%非動化ヒト血清 培地を使用した。

2. EBV 感染細胞クローンの解析

a. EBV-DNA の検出 (定量的 PCR)

Forward primer : cggaagccctctggacttc

Reverse primer : ccctgtttatccgatggaatg

Probe:

6FAM-tgtacacgcacgagaaatgcgcc-iowaBK

PCR 条件

使用機器 : ABI7300

Primer 濃度 : $0.5 \mu\text{M}$

Probe 濃度 : $0.2 \mu\text{M}$

反応液組成

DNA $8 \mu\text{l}$

2X Buffer $10 \mu\text{l}$

Primer, Probe $0.6 \mu\text{l}$

Taq 酵素 $0.4 \mu\text{l}$

H₂O $1.0 \mu\text{l}$

Total $20 \mu\text{l}$

反応条件

Denature $95^\circ\text{C} 10$ 秒

PCR 反応 $95^\circ\text{C} 5$ 秒, $60^\circ\text{C} 20$ 秒

45 サイクル

b. 細胞表面抗原解析

フローサイトメーター : EPICS XL (ベックマンコールター)

蛍光標識抗体 : CD3, CD4, CD8, CD16, CD19,

CD25, CD56, CD57, TCR $\alpha \beta$, TCR $\gamma \delta$ (ベックマンコールター)

c. 細胞のクロナリティー解析

サザンブロッティングにより、TCR β , γ , δ 鎖遺伝子と免疫グロブリン遺伝子のリアレンジメントの有無および EBV-TR のリピート数を解析し、分子生物学的な細胞種の特定期および EBV ゲノムのクロナリティー解析を行った。実験には、FITC でラベルした C β 1, J γ 1, J δ 1, J δ 3 および J_H プローブを使用し、Fluorescein Gene Images System (Amersham) を用いて検出した。

(倫理面への配慮)

患者検体は、採取医療機関の倫理委員会の許可と患者のインフォームドコンセントを得て採取し、EBV 遺伝子と TCR および免疫グロブリン遺伝子以外の遺伝子解析は行わなかった。

C : 結果

1. 培養細胞クローンの表面抗原解析

2 名の患者末梢血から得た複数の細胞クローンの細胞表面マーカーを解析したところ、患者 A から得た細胞クローンは全て CD3, CD4, CD8, CD19, TCR $\alpha \beta$, TCR $\gamma \delta$ 陰性、CD16, CD56 陽性の NK 細胞に分類される細胞だった。一方、患者 B からは CD3, CD4, CD8, TCR $\alpha \beta$ 陽性、CD19, TCR $\gamma \delta$ 陰性の $\alpha \beta$ T 細胞系の細胞、CD3, TCR $\gamma \delta$ 陽性、CD4, CD8, CD19, TCR $\alpha \beta$ 陰性の $\gamma \delta$ T 細胞系の細胞、および CD3, CD4, CD8, CD19, TCR $\alpha \beta$, TCR $\gamma \delta$ 陰性、CD16, CD56 陽性の NK 細胞系の細胞の 3 種類の細胞クローンが分離された。

2. 培養細胞クローンの分子生物学的解析

患者 A から得た細胞クローンの TCR および Ig 遺伝子解析を行った結果、C β 1, J γ 1, J

$\delta 1$, $J\delta 3$ および J_H 遺伝子のリアレンジメントは陰性であり、得られた細胞クローンは全て NK 細胞であることが示された。

患者 B から得た細胞クローンの表面抗原解析結果から $\alpha\beta$ T 細胞系と推定された細胞クローンは $C\beta 1$, $J\gamma 1$ 遺伝子リアレンジメント陽性、 $J\delta 1$, $J\delta 3$ 遺伝子は欠失、 $J\gamma 1$, J_H 遺伝子リアレンジメント陰性であり、 $\alpha\beta$ T 細胞であることが確定できた。表面抗原解析から $\gamma\delta$ T 細胞系と考えられた細胞クローンは、 $C\beta 1$, $J\gamma 1$, $J\delta 3$ 遺伝子リアレンジメント陽性、 $J\delta 1$ 遺伝子は欠失、 J_H 遺伝子リアレンジメント陰性の $\gamma\delta$ T 細胞だった。表面抗原解析から NK 細胞と考えられた細胞クローンは、TCR および Ig 遺伝子のリアレンジメントは検出されず、NK 細胞であることが裏付けられた。

3. EBV-TR を用いた細胞のクロナリティー解析

EBV ゲノムはウイルス粒子中では直鎖状でパッケージされており、ゲノム DNA の両端には繰り返し配列 (Terminal Repeat: TR) が存在し、その繰り返し配列の数はウイルス粒子間で 2~10 以上とバリエーションがあることが知られている。EBV が細胞に感染すると感染細胞中では両端が結合して閉環状となり細胞核に存在し、感染細胞の増殖に伴って EBV ゲノムも同時に増幅するが、TR の数は感染当初のウイルスゲノムに由来する TR の数が維持されることが知られており、細胞クローンの TR 数を解析することで複数の細胞クローンが同じ親細胞に由来するの否かを知る事が可能となる。

患者 A から得られた細胞クローンおよび患者 A の組織 (リンパ節と咽頭潰瘍部) から得た DNA を BamHI で消化し、TR プローブを用いたサザンブロッティングにより解析した

ところ、図 1 のような結果を得た。

結果は、咽頭潰瘍部には 2 つの細胞クローンが存在するが、リンパ節には同じ 2 つのクローンに加えて 3 番目のクローンが存在すること、そして培養細胞クローンはリンパ節に存在する 3 番目のクローンとクロナリティーが一致することが明らかとなった。

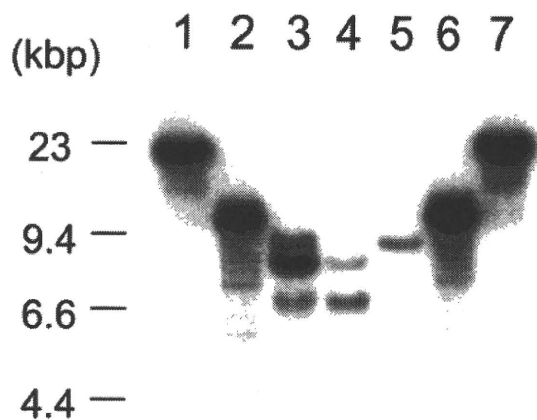


図 1 患者 A から得られた細胞クローンおよび患者 A 組織の EBV-TR を利用したクロナリティー解析 Lane 1, 7: Raji 細胞 (EBV ゲノムの複製が生じないためバンドは 1 本、Lane 2, 6: B95-8 細胞 (ウイルス複製が起きているためラダーバンドが認められる)、Lane 3: A リンパ節、Lane 4: 咽頭潰瘍部、Lane 5: 培養細胞クローン

患者 B から得られた細胞クローンの TR 解析の結果、すべての細胞クローンからは同じサイズの 1 本のバンドが検出され、これらの細胞クローンは同一の親細胞に由来することが示唆された。

D: 考 察

1. 患者 A の末梢血から分離された培養細胞クローンは全て NK 細胞だった。患者 A の組織中には多数の EBV 感染細胞が浸潤していることが ISH 法により明らかになっていたことから、組織中の EBV 感染細胞と培養細胞

クローンのクロナリティーを EBV-TR を用いたサザン法で解析した。その結果、咽頭潰瘍部とリンパ節には同じクロナリティーをもつ2つのクローンが存在し、リンパ節にはその2つに加えて3番目のクローンが存在し、末梢血中から得られた細胞クローンはリンパ節にのみ存在する3番目のクローンとTRのリポート数が完全に一致した。このことから、培養細胞クローンは他のEBV陽性NK細胞クローンよりも *in vitro* での増殖活性が高いと推定され、さらに患者が最終的にはリンパ腫を発症していることから、この3番目の細胞クローンがリンパ腫の原因細胞である可能性が高いと考えられる。しかし、リンパ腫細胞の詳細な解析を行えなかったため、確定的ではない。この症例の解析結果から、CAEBV患者では当初ポリクローナルあるいはオリゴクローナルなEBV感染細胞が存在するが、その中から悪性度の高い細胞クローンが選択的に増殖し、リンパ腫の発生につながる経路の存在が示唆された。

2. 患者Bの末梢血から得られた培養細胞クローンは、細胞表面マーカーおよびTCR・Ig遺伝子解析の結果から、 $\alpha\beta$ T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、NK細胞の異なる3種類の系統の細胞であることが示された。しかし、EBV-TRのリポート数によるクロナリティー解析では3種類とも同一のクロナリティーと判定された。この結果は、3種類の細胞クローンは細胞種の系統は明らかに違うが、同じ親細胞クローンから派生した細胞クローンであることを示唆している。したがって、EBVがT細胞とNK細胞に分化する前の幼若な細胞に感染し、その後細胞分化が進んで3種類の細胞になった可能性が高いと考えられる。この結果は、CAEBVの原因細胞であるEBV陽性T/NK細胞の成立過程を考える上で、重要な示唆を

与えている。一方、EBV-TRのリポートの数のバリエーションは10数種類とそれほど多くはなく、確率的には低いものの3つの培養細胞クローンのリポート数がたまたま一致した可能性が完全には否定できない。

今後他の多くの症例の解析を続けることにより、このような現象の普遍性を研究し、CAEBV患者のEBV陽性T/NK細胞の成立過程の研究に繋げていきたい。

E：結論

CAEBV原因であるEBV感染T/NK細胞がどのように成立・維持されているのかを探る事を目的に研究を行った。その結果、患者末梢血中には複数のEBV感染細胞クローンが存在し、その中からリンパ腫細胞が生じている例や、細胞種の違う複数のEBV感染細胞が末梢血中に検出される症例があることを見出した。これらの結果は、CAEBV患者には当初複数の細胞クローンが存在し、その中から悪性形質を獲得した細胞が選択され、症状の重篤化やリンパ腫に至っている可能性を示唆している。今後解析する症例数を増やして、CAEBV患者のEBV陽性T/NK細胞の成立過程の研究に繋げていく予定である。

F：健康危険情報

なし

G：研究発表

論文発表

- 1.Sugita S, **Shimizu N**, Watanabe K, Katayama M, Horie S, Ogawa M, Sugimoto Y and Mochizuki M. Diagnosis of bacterial endophthalmitis by broad-range quantitative PCR. *Br J Haematol*. Jul 31, 2010 [Epub ahead of print].
- 2.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.

3. 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.

4. 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.

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.* **91**(Pt1):42-50, 2010.

6. Miyagawa Y., Kiyokawa N., Ochiai N., Imadome K., Horiuchi Y., Onda K., Yajima M., Nakamura H., Katagiri Y., Okita H., Morio T., Shimizu N., Fujimoto J. and Fujiwara S. Ex vivo expanded cord blood CD4 T lymphocytes exhibit a distinct expression profile of cytokine-related genes from those of peripheral blood origin. *Immunology.* **128**(3):405-419, 2010.

7. 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.

国内学会発表

1. 小川学、杉田直、井上静、望月學、片山未来、

渡邊健、清水則夫、森尾友宏 ヘルペスウイルスの関与が疑われるぶどう膜炎に対する眼内液PCR検査の有用性の検討 第114回日本眼科学会 2010年4月 名古屋市

2. 小川学、杉田直、井上静、清水則夫、赤尾信明、望月學 PCR法を用いたアカント・アメーバ角膜炎の補助診断 第21回臨床寄生虫学会 2010年6月 東京

3. 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、伊藤守、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 徳島市

4. 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、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 札幌市

5. 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：EBウイルス関連T/NKリンパ増殖性疾患モデルマウスの政策と病態発現解析、第20回EBウイルス感染症研究会、東京、2010年3月

6. 満生紀子、遠藤明史、青木由貴、小野敏明、高木正稔、梶原道子、長澤正之、峯岸志津子、落合 央、清水則夫、森尾友宏、水谷修紀：当科で施行した造血幹細胞移植患者における網羅的PCR法による経時的ウイルス、第32回日本造血細胞移植学会総会、2010年2月、浜松市

国際学会発表

1. Ogawa M, S. Sugita S, Shimizu N, Morio T, Mochizuki M. Use of Human Herpes Virus (HHV) PCR Assays to Detect Viral DNA in Ocular Fluids of Patients with Herpetic Eye Diseases. ARVO

2010, Fort Lauderdale, Florida.

2.Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakagawa A, Kawano F, Ichikawa S, Miura O, Ito M, Shimizu N, Yamamoto N and Fujiwara S. A xenotransplant model of chronic active EB virus infection by use of NOG mice. The 14th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr Virus & Associated Diseases, Sept 2010, Birmingham, UK.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

慢性活動性EBウイルス感染症の臨床像解析
研究分担者 東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学分野 森尾友宏

研究要旨

慢性活動性EBウイルス感染症は予後不良のEBV-DNA量の増加とT細胞あるいはNK細胞への感染を特徴とする疾患であるが、その原因や最適な根治的治療についてはまだ明らかになっていない。この研究ではCAEBV患者の臨床的フォローに加え、その根本的原因を探るため、免疫不全症の見地から解析を行った。その結果CAEBVの背景として、一部の患者では免疫不全症があることが明らかになった。

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EBVDNA量の増加を特徴とする予後不良の疾患である。本疾患においては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り、造血幹細胞移植以外に根本的治療法はない。今年度の分担研究ではCAEBVの分子機構や患者における免疫機能を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) 当院CAEBV患者における臨床データの集積
今までの11名に加えて、2名の新規患者が当科にてフォローアップとなり、検査及び治療を開始した。

2) CAEBVの遺伝的背景に関する研究
CAEBVの中で、先天性免疫不全症を背景に発症した症例を蓄積し、患者において下記の解析を実施した。

A. 免疫担当細胞表面抗原分析(B細胞亜群、T細胞亜群、Thサブセット、TCRVβレパートア、NKT細胞、DC細胞など):細胞内外抗原を4 color FACSにて解析する。

B. 候補遺伝子解析(SAP, XIAP, BAFFR, CD19, CD21, CD81, ICOS, TACI):患者から得たgenomic DNAを用いて、全エクソン及びエクソン・イントロン境界領域の塩基配列を決定する。

C. ウイルス特異的T細胞応答解析: 健康人及び患者の末梢血リンパ球に、EBNA1, BZLF1ペプチドで刺激後にIFN-γ capture assayを用いて、特異的反応を示す細胞群を同定する。

3) ウイルス感染細胞の同定及びウイルスコピー数の測定

ISH-Flow法を確立すると共に、従来の方法にてEBVコピー数を測定する。

(倫理面への配慮)

本研究は、患者検体を用いて解析を行う。診療に役立つ情報が得られるが、採取量及び、採取時の苦痛には十分な配慮を行う。また今回の解析においては遺伝子解析が含まれており、各種指針を遵守し、個人情報管理に十分配慮した研究を行う。なお本

解析については、医学部遺伝子解析に関わる倫理審査委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1) 当院CAEBV患者における臨床データの集積

2症例が新規症例として加わった。2症例ともに造血細胞移植を受け存命中である。1例では移植後にHHV6肺炎、原因不明の脳症を起こしたが、GVHDなく当科転院となった。転院後著しい右心不全となり、肺高血圧として入院加療を必要とした。新規症例以外の1例においては、最初に臍帯血移植を行ったが拒絶され、父親からのハプロ一致移植を実施した。しかし移植後のCMV感染症により逝去となった。もう1例のCAEBV患者は化学療法への反応は不良で、ウイルスコピー数に変化はなく、移植待機中であるが、HLAフルマッチドナーは骨髓バンクに見つけれず、1座不一致でコーディネート中である。

2) 遺伝的背景の研究

分担者が実施した分類不能型免疫不全症(Common variable immunodeficiency: CVID)の全国調査において、CVID患者199名の中で4名CAEBVの発症を認めており、有意に発症率が高いことが明らかになった。これらの患者はすべて女性であったが、X連鎖リンパ増殖症候群(致死性EBV感染症)の責任遺伝子でありX染色体上に位置するSAP, XIAPに遺伝子変異を認めなかった。一方既知のCVID遺伝子についても塩基配列には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異常症で認められるNKT細胞の%が低下している症例があった。ウイルス特異的T細胞は検討した全員で低値であった。

3) ウイルス感染細胞の同定及びコピー数の解析

ISH-Flow法にて感染細胞を同定することが可能になった。また従来通り、リアルタイムPCRによってウイルスコピー数を測定しフォローアップに用いた。

Immunomagnetic beads法による細胞精製とreal time PCRによりウイルス感染細胞の同定が可能となっている。一方FACSによる解析は、single color解析では十分な解像度を得るまでに至っているが、multi-colorではまだ改善の余地がある。

3) 特異的T細胞免疫応答の解析

健康人ではCD4, CD8 T細胞共に0.1-0.5%にEB

NA1 specificあるいはBZLF1 specific T細胞が認められた。その%は個人差が大きく、またEBNA1 specific, BZLF1 specific T細胞の%は必ずしも合致しなかった。

D. 考察

CAEBVには免疫不全症を背景とした病態が隠れていることが示唆される所見が得られたが、その分子機構については今後の検討を待つ必要がある。中でもNKTの減少はSLAM関連分子などが関与するシグナル伝達経路の位置する分子の異常を示唆するものである。また今回は検討を加えなかったが、CGH array, SNP arrayなどで片アレルの欠失を検出する手法も用いる必要があるかもしれない。

ヘルペス属ウイルスにおいてはde novoの自然免疫系シグナル異常による重症ヘルペスウイルス感染症が報告されており、またEBVでも同様に男性にて脆弱性を示す疾患が判明している。今回の解析を展開することにより、CAEBVの病態がより明確になることが期待される。おそらくwhole exome sequencingなどの手法が必要となると考えられる。

E. 結論

CAEBVの臨床においては移植医療の合併症などに未だに課題を残すことを示す症例が蓄積した。CVIDとの合併症例から、CAEBVの分子病態が明らかになることが期待されるデータが得られた。

F. 健康危険情報

報告すべき健康被害、健康危険情報は無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsui N, Takagi M, Matsuda K, Muramatsu H, Doi 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.
2. Shin MJ, Shim JH, Lee JY, Chae WJ, Lee HK, **Morio T**, Park JH, Chang EJ, Lee SK. Qualitative and quantitative differences in the intensity of Fas-mediated intracellular signals determine life and death in T cells. *Int J. Hematol.* 92:262-70, 2010.
3. Seki M, Kimura H, Mori A, Shimada A, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y, Agematsu K, **Morio T**, Yachie A, Kato M. Prominent eosinophilia but less eosinophil activation in a patient with Omenn syndrome. *Pediatr. Int.* 52:e196-9, 2010
4. Inoue H, Takada H, Kusuda T, Goto T, Ochiai M, Kinjo T, Muneuchi J, Takahata Y, Takahashi N, **Morio T**, Kosaki K, Hara T. Successful cord blood transplantation for a CHARGE syndrome with CHD7 mutation showing DiGeorge sequence including hypoparathyroidism. *Eur. J. Paediatr.* 169:839-44,

2010.

5. Okamoto K, Iwai Y, Ohhora M, Yamamoto M, **Morio T**, Aoki K, Ohya K, Jetten AM, Akira S, Muta T, Takayanagi H. I κ B ζ regulates TH17 development by cooperating with ROR nuclear receptors. *Nature.* 464: 1381-1385, 2010.
6. 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.

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. Morio T, Tomizawa D, Atsuta Y, Nagamura T, Kato K, Ariga T, Kawa K, Koike K, Tauchi H, Kajiwara M, Hara S, and Kato S. Unrelated umbilical cord blood transplantation for patients with primary immunodeficiency in Japan. The 52nd ASH Annual Meeting. Orlando, Florida, USA. December 2010.
2. Morio T, Tomizawa D, Atsuta Y, Nagamura T, Kato K, Ariga T, Kawa K, Koike K, Tauchi H, Kajiwara M, Hara S, and Kato S. Unrelated umbilical cord blood transplantation for patients with primary immunodeficiency in Japan. XIVth meeting of the European Society for Immunodeficiencies. Istanbul, Republic of Turkey. October 2010.
3. Morio T. Btk Controls ROS Production and Apoptosis in Human Neutrophils. XIVth meeting of the European Society for Immunodeficiencies. Istanbul, Republic of Turkey. October 2010.
4. Morio T. Immunomonitoring and T-cell immunotherapy in CBT. The Second Korea-Japan Cord Blood Transplantation Symposium. Yokohama in Japan. September 2010.
5. Morio T, Terada N, Nanki T, Miyasaka N, Kobata T, Matsumoto K, Azuma M, Mizutani S. PP-102-32 - Impaired CD4 and CD8 Effector Function and Decreased Memory T-cell Populations in ICOS-deficient Patients. 14th International Congress of Immunology 2010. Kobe in Japan. August 2010.
6. Okamoto K, Iwai Y, Oh-hora M, Yamamoto M, Morio T, Jetten A M, Akira S, Muta T, Takayanagi H. WS/PP-014-02 - I κ B ζ is required for the transcriptional program in Th17 development. 14th International Congress of Immunology 2010. Kobe in Japan. August 2010.
7. Shin M J, Shim J, Lee J, Chae W, Lee H, Morio T, Park J H, Chang E, Lee S. PP-059-37 - Functional analysis of Fas-mediated activation signaling pathways in T cells. 14th International Congress of

Immunology 2010. Kobe in Japan. August 2010.

8. Honda F, Ikeda Y, Takahashi I N, Lee S, Mizutani S, Morio T. WS/PP-034-04 - Btk controls ROS production and apoptosis in human neutrophil. 14th International Congress of Immunology 2010. Kobe in Japan. August 2010.
9. 森尾友宏. 血球系の減少を伴う免疫不全症. 第4回 21世紀血液免疫研究会 2010年11月18日 東京
10. 森尾友宏. 免疫不全症・免疫異常症の多様な姿: 診療のABCから今後の展望まで. 山梨血液感染症セミナー 2010年9月30日 山梨
11. 森尾友宏. 原発性免疫不全症の診断と治療 -そのABCと今後の展望-. 三重免疫不全・感染症講演会 2010年9月16日 三重
12. 森尾友宏, 慢性活動性EBV感染症と免疫不全症、平成22年度厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「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」班、平成22年7月7日、東京
13. 大坪善数, 徳富友紀, 合田裕治, 角至一郎, 上玉利彰, 中下誠郎, 森内浩幸, 森尾友宏. 慢性活動性EBV感染症を合併する毛細血管拡張性小脳失調症の1幼児例. 第113回日本小児科学会学術集会 2010年4月23日-25日 岩手

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

研究課題名(公募番号):

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 (21210201)

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

研究代表者 藤原成悦

分担研究者 脇口 宏

研究要旨

縦隔原発と思われ、右肺、大網をふくめ全身播種を伴う CD16⁺CD56⁺の EB ウイルス(EBV) 関連 NK 細胞リンパ腫の 14 歳男子例を経験した。合併症の HLH を制御した後に on disease で同種骨髄移植を行い完全緩解が得られた。

移植 15 ヶ月後に頭痛、嘔吐、吃逆などが出現した。原疾患の再発と決定づける根拠は十分でなく、統合的に説明することが困難であった。最終的には NK 細胞リンパ腫が、CD56 の陰性化という Phenotype の変化をともなって、EBV が脱落しウイルス陰性細胞が優位になった状態で中枢神経限局性に再発したとものと結論づけた。

EBV 関連腫瘍の再発時に EBV 陰性になる現象があることを示す症例であり、EBV が腫瘍維持に不可欠でないことを示唆する点、腫瘍再発監視の目的には EBV 量モニタリングは再発の診断漏れが生じる可能性があることを示唆する点で重要な症例であった。

分担研究者

高知大学小児思春期医学 脇口 宏(教授)

協力研究者

前田明彦(講師)、富田 理(医員)、佐藤哲也(助教)、高杉尚志(助教)、堂野純孝(助教)、久川浩章(講師)、藤枝幹也(准教授)

A. 研究目的

EBV 関連 NK 細胞リンパ腫は、EBV が病態に関与することが想定されているが、その発症メカニズムや病態の詳細は明らかではない。著者らは、初発時に腫瘍組織に多量の EBV が認められ、病勢の把握を目的としてウイルス量をモニターしたが、中枢神経再発時に EBV が検出されず、診断に苦慮した 1 例を経験した。疾患の病態や管理方法を考える上で貴重な症例と考えられたので報告す

る。

B. 症例報告

1) 初発時

症例は 14 歳男子。初発時は、発熱を主訴に高知大学医学部附属病院小児科に入院した。2009 年 2 月上旬から軽い咳嗽が出現した。2 月 14 日に 40℃ 台の発熱が出現した。近医を受診し抗菌薬を投与されたが、37℃ 台の微熱が続いたため 2 月 17 日に再診した。

CRP 1.8 mg/dl、WBC 2,500 /ul (stab 16.5 %、seg 39.0 %)であった。以後も発熱が続き19日に再診したところ、胸部 X 線、CT で右上葉無気肺をみとめ、精査加療目的に当科へ紹介入院となった。既往歴に特記事項なし。家族歴として、母が造影剤ショックにより 31 歳で死没している。

初診時現症では、発熱と多呼吸をみとめ、右肺野のエア入りが不良で打診上濁、深吸気時に湿性ラ音をみとめた。肝 3cm 脾2cm を触知し、顎下部リンパ節5mm 大を触知した。WBC 2,200 /mm³ と減少し、CRP 1.5 mg/dl、LDH 617 U/L、PT 60.2 %、APTT 49.1 %、フェリチン 325.7 ng/ml、TChol 105 mg/dl、TG 195 mg/dl、胸部 X 線で左上肺野は著明な透過性低下を認め CT および MRI で左上肺野に無気肺と腫瘤影をみとめた(図1)。

入院当日は、マイコプラズマ肺炎を第一に疑い、ミノサイクリン投与で治療を開始した。血球減少傾向、LDH 高値、脂質異常を示しており、高サイトカイン血症を併発していると考えられた。尿検査でレジオネラ抗原陽性のため、抗菌薬をシプロキサシン、クラリスロマイシンに変更した。38~40℃の弛張熱は継続し、胸水貯留を認めるようになった。

2月23日に胸腔穿刺を施行した。胸水の抗酸菌を含む細菌検査は陰性であった。胸水からアズール顆粒を伴う大型の異型リンパ球を認め、この細胞は71.4%がCD16陽性、80.8%がCD56陽性(表1)でNK細胞であることが示唆された。PET-CT(図2)で右上肺野、縦隔、両側頸部リンパ節、大網および腹腔の広範囲におよぶ強い集積部位が検出された。

骨髄検査で多数の血球貪食像(図3)と胞体が泡沫に富む活性化マクロファージの増

加を認めた。骨髄細胞はCD16⁺細胞が46.3%、CD56⁺細胞が47.8%を占め、NK細胞のPhenotypeが増加していた。

2月26日にPET-CTで集積が確認された頸部リンパ節生検を行った。リンパ節中央部にはCD4⁺やCD8⁺細胞が多くみられ、angiocentric、angiodestructive な所見は認めなかった。CD56⁺CD16⁺細胞 Granzyme B 陽性細胞は少数で、リンパ節辺縁~リンパ節外組織に多く認めた。

胸水、骨髄、生検リンパ節から得られた細胞はいずれも一部共通の変化を伴う染色体異常が認められた(表2)。

EBVに関する解析の結果を示す。リアルタイムPCRによるEBVDNA定量の結果、胸水細胞が10⁷ copy / μgDNA、末梢血液単核細胞3.1×10⁵ copy/ μgDNA、骨髄細胞3.0×10⁵ copy/ μgDNAと著明な高値であった。*in situ* hybridization (ISH)法により、骨髄、リンパ節ともにEBER陽性細胞が多数認められた。EBV terminal repeat 領域を標的としたサザンブロット解析で(図4)、胸水細胞、生検リンパ節ともに、EBVのモノクローナルな増殖が確認された。

EBV感染細胞の同定を試みた。骨髄細胞から分離された単核細胞をマグネットビーズ法で各分画を分離精製した(精製度は約90%)後に、EBV量を定量した。CD4⁺分画が2.79×10⁴、CD8⁺1.68×10⁴、CD19⁺2.75×10⁴、CD56⁺分画6.42×10⁵ copy/ μgDNAであり、分離精製前の3.00×10⁵ copy/ μgDNAに比べてCD56分画のウイルス量が多く、CD56陽性細胞が感染細胞と確認された。名古屋大学木村宏博士に依頼したEBER-FISHを用いたFACS解析でEBER陽性細胞はCD56⁺、CD16⁺、CD3⁻、

CD19⁻, CD4⁻, CD8⁻, TCR α β ⁻, TCR γ δ ⁻であることが確認された。

2) 診断と治療経過

EBV 関連節外性 NK 細胞リンパ腫(縦隔原発で骨髄、頸部リンパ節、大網転移を伴う)に血球貪食性リンパ組織球症(HLH)を合併したものと診断した。

臨床経過を図5に示す。2月23日からプレドニゾロン(PSL;のちにデキソメサゾン DEXAに変更)投与を開始し、26日からHLHに対してシクロスポリン A(CsA)とエトポシド(VP-16)投与を開始し、速やかに解熱し血球数の回復、LDH低下を認めた。

3月5日からNKリンパ腫に対してL-アスパラギナーゼ(L-Asp)を計6回隔日投与した。胸部MRIで右上肺と縦隔の腫瘍は縮小傾向にあったものの、末梢血中のNK細胞比率、EBVゲノム量は減少しなかった。

3月23日からESCAPレジメン1回目を開始、末梢血EBVゲノム量の減少が確認された。合計4クールESCAPを施行し、on diseaseでの同種骨髄移植目的に大阪母子医療センターに転院した。Flu/L-PAM/VP-16で前処置を行い、2009年7月31日に1 locus mismatchedの妹をドナーに減量強度移植前治療を用いた同種造血幹細胞移植法(RIST)を行った。

移植後は、全身状態良好で、EBV量は末梢血、骨髄ともに、感度(50 copy/ μ gDNA)以下ないし 10^2 copy/ μ gDNAと健常人レベルで推移し(図6)、異性間FISHも99%以上XX(ドナー型)で完全寛解を維持していた。末梢血液のリンパ球サブセット解析では(表3)、CD16⁺細胞は10~20%台を、CD56⁺細胞は10%未満で推移し、骨髄ではCD16⁺細

胞、CD56⁺細胞ともに10%未満に減少していた。

3) 再発時

2010年10月20日から咳嗽、頭痛、倦怠感、次いで嘔気、嘔吐、食欲低下、咽頭痛、発熱吃逆が出現し、諸治療で改善しないため、11/2に精査加療目的に入院した。

全身状態は不良であったが、身体所見、神経学的所見で特記すべきことなく、検査所見でLDH正常で著明な所見はみとめられなかった。末梢血のEBV量は、CD19⁺分画のみで191 copies/ μ gDNA、CD4⁺、CD8⁺、CD56⁺、その他の分画は検出感度以下であった。髄液検査では(図7)髄液細胞数31/3ul、単核細胞100%、総蛋白29 mg/dl、糖56 mg/dlで軽度の髄液細胞増多をみとめた。髄液細胞診でLarge granular lymphocyte (LGL)様細胞が40%を占め、小リンパ球が60%みとめられた。髄液細胞中のEBVは250 copy/ μ gDNA(1 μ gDNAは 2.5×10^5 細胞に相当する)程度であり、EBER-ISH法は陰性であった。CD56-CD16⁺の細胞を99.2%(初発時腫瘍細胞はCD16⁺CD56⁺)みとめた。Y染色体特異的塩基配列PCRは定性評価で陽性であった。髄液細胞数が少ないため全51細胞しか分析できなかったが、髄液異性間FISHでXY 3.9%、XX 94%であった。

通常、EBV関連NKリンパ腫や慢性活動性EBV感染症ではEBV量を腫瘍細胞の多寡を示すマーカーに用いているが、自験例ではEBVが末梢血、骨髄とともにEBVDNA陰性、細胞増多をみとめた髄液からのEBV量は1コピー/1000細胞の割合であった。診断に苦慮した末に、原疾患の中枢神経再発が

完全に否定できないため、メソトレキセート (MTX) + シタラビン (Ara-C) + ハイドロコルチゾン (HC) の髄腔内投与を行った結果、初回治療の 5 日後に臨床症状は改善した。合計 7 回の髄腔内投与の後に、全脳全脊髄分割放射線照射を計 12Gy 行い治療終了とした。治療終了 2 カ月を経たが、全身状態は良好で完全寛解を維持している。

C. 考察

縦隔原発と思われ、右肺、大網をふくめ全身播種を伴う CD16⁺CD56⁺ の EBV 関連節外性 NK 細胞リンパ腫の 14 歳男子例を経験した。合併症の HLH を制御した後に on disease で同種骨髄移植 (RIST) を行い完全緩解が得られた。

移植 15 ヶ月後に頭痛、嘔吐、吃逆などが出現した。髄液細胞に LGL が認められ、第一に原疾患の再発が疑われ、精査を進めた。無菌性髄膜炎の鑑別も同時進行したが、髄液のウイルス分離や単純ヘルペスウイルス PCR は陰性で病状や臨床経過からも髄膜炎は否定的と考えた。髄液細胞は CD16⁺、CD56⁻ で、腫瘍細胞と考えると、初発時の Phenotype と比較して CD56 が陽性でない点が異なっていた。EBVDNA 定量の結果、ウイルス陽性の細胞比率は髄液細胞 1000 個に 1 コピーで、初発時の胸水中腫瘍細胞の結果で 10⁷ コピー / 2.5 × 10⁵ 細胞であったのと比較して、著明に減少していた。異性間 FISH で 51 細胞のうち 2 細胞のみがレシピエントタイプ (XY) であった。末梢血、骨髄では、EBV ゲノムの増加は認められず、異性間 FISH はドナータイプ (XX) であった。

de novo の中枢神経白血病が発症した可能性は極めてまれと考えられたが、原疾患の

中枢神経限局性再発と決定づける根拠は十分でなく、統合的な説明が困難であった。最終的には NK 細胞リンパ腫が、CD56 の陰性化という Phenotype の変化をとまって、さらに EBV が脱落しウイルス陰性細胞が優位になった状態で再発したものと結論づけ治療を行い、以後良好な経過を得ている。

EBV が腫瘍原性に関与することは確実と考えられているが、そのメカニズムは未だ確定しておらず、また、腫瘍増殖の維持に EBV が不可欠かどうかについて *in vivo* の証拠はない。一方 *in vitro* では元来 EBV 陽性のバーキット腫の細胞株において、EBV が脱落する現象があり、EBV 陰性の細胞株もウイルス陽性の元の細胞株同様の増殖性を示す例は複数報告されている。また現状では慢性活動性 EB ウイルス感染症 (CAEBV) を含め EBV 関連腫瘍においては、EBVDNA 量が微小残存腫瘍 (minimal residual disease; MRD) のモニタリングに使われることが通常である。自験例は髄液細胞増多が軽微であったため、再現性の確認など解析が不十分な点がある。自験例のように EBV 関連腫瘍が EBV が脱落した状態で再発した例の報告はなく、EBV の腫瘍原性、EBV 関連腫瘍の病勢評価法を再考するうえでも重要な症例である。

E. 結論

EBV 関連腫瘍の再発時に EBV 陰性になる現象があることを示す症例である。EBV が腫瘍維持に不可欠でないことを示唆する点、臨床現場で腫瘍病勢評価の目的で EBV 量モニタリングでは再発の診断漏れが生じる可能性を示唆する点で重要な症例である。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表, 論文

- 1) 脇口 宏:【小児の発疹の診かた】 EB ウイルス感染症. 小児内科, 42 巻 1 号, 180-184, 2010, 01
- 2) 前田明彦, 佐藤哲也, 石浦嘉人, 堂野純孝, 久川浩章, 藤枝幹也, 脇口 宏: 炎症性疾患をどう理解するか Epstein-Barr ウイルス関連血球貪食性リンパ組織球症. 小児感染免疫, 22 巻 1 号, 59-66, 2010, 4
- 3) 佐藤哲也, 前田明彦, 藤枝幹也, 脇口 宏:【小児の治療指針】 感染症 EB ウイルス感染症. 小児科診療, 73 巻増刊, 183-185, 2010, 4
- 4) 脇口 宏: 検査 ONE POINT EB ウイルス感染症の抗体検査. SRL 宝函, 31 巻 1 号, 48-50, 2010, 5
- 5) 脇口 宏, 前田明彦, 藤枝幹也, 田中香織, 堤 裕幸: 新規開発酵素抗体法による伝染性単核症の血清診断と EB ウイルス抗体価の推移. 日本小児科学会雑誌, 114 巻 5 号, 847-852, 2010, 5
- 6) 石原正行, 佐藤哲也, 三浦紀子, 前田明彦, 藤枝幹也, 脇口 宏, 久野正貴, 田中絵里子, 近本裕子, 秋岡祐子, 服部元史: 血漿中 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. 日本小児腎不全学会雑誌, 30 巻, 293-295, 2010, 8
- 7) 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
- 8) 脇口 宏:【ヘルペスウイルス科ウイルスによる感染症のすべて】 EB ウイルス感

染症. 化学療法の領域, 26 巻 10 号, 2008-2015, 2010, 9

- 9) 脇口 宏:【必携 小児の薬の使い方】 疾患に対する薬剤の選び方・使い方と注意 感染症 EB ウイルス感染症. 小児内科, 42 巻増刊, 322-326, 2010, 10

論文種類: 解説/特集

- 10) 脇口 宏:【これだけは知っておきたい 検査のポイント】 免疫学的検査 感染関連検査<ウイルス関連検査> EB ウイルス. Medicina(0025-7699)47 巻 11 号 Page400-403(2010.10)

論文種類: 解説/特集

- 11) 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

- 12) 脇口 宏:【迷わない!重症感染症への 抗菌薬・抗ウイルス薬】 各種感染症・病態における診断の決め手と治療薬の選びかた 重症 EB ウイルス感染症・EB ウイルス関連血球貪食性リンパ組織球症. 小児科診療, 73 巻 11 号, 2021-2027, 2010

- 13) 前田明彦, 佐藤哲也, 堂野純孝, 久川浩章, 藤枝幹也, 脇口 宏: ウイルス関連性血球貪食性リンパ組織球症いわゆる VAHS. 臨床とウイルス, 39, 61-71, 2011

図1. 入院時画像検査
(胸部X線・CT・MRI)

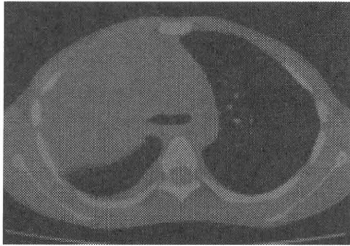
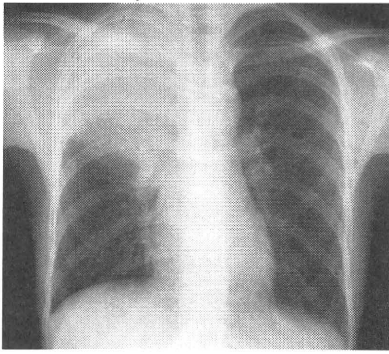


図2. FDG-PET

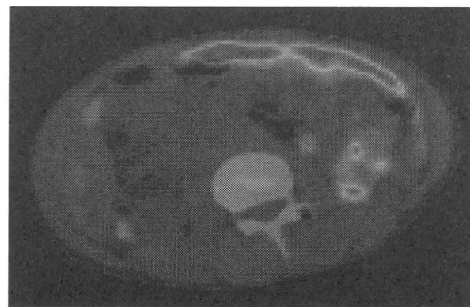
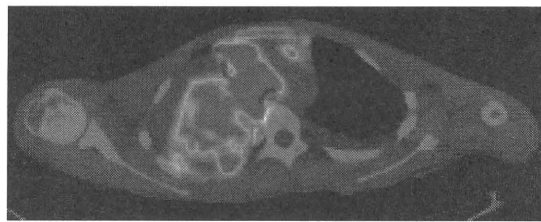
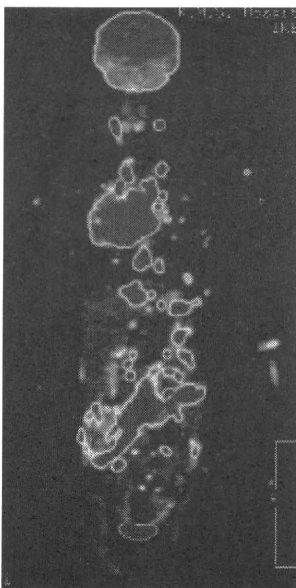


図3. 骨 髄

【病理所見】

成熟した小型リンパ球にEBER1 in situ hybridizationで少数の陽性細胞

【細胞表面マーカー解析】

CD2 91.7% CD3 48.7% CD4 23.9% CD8 27.4%
 CD19 6.9% CD20 6.9%
 CD16 46.3% CD56 47.8%

<3/16骨髄>EBER-FISHを用いたFACS解析(名古屋大学木村宏先生)

EBER陽性細胞はCD3-, CD19-, CD4-, CD8-, TCR $\alpha\beta$ -, TCR $\gamma\delta$ -
 CD56+, CD16+

【EBVゲノム量】

CD4 2.79×10^4 copy/ μ gDNA
 CD8 1.68×10^4 copy/ μ gDNA
 CD19 2.75×10^4 copy/ μ gDNA
 CD56 6.42×10^5 copy/ μ gDNA
 その他 1.72×10^5 copy/ μ gDNA
 分離前 3.00×10^5 copy/ μ gDNA

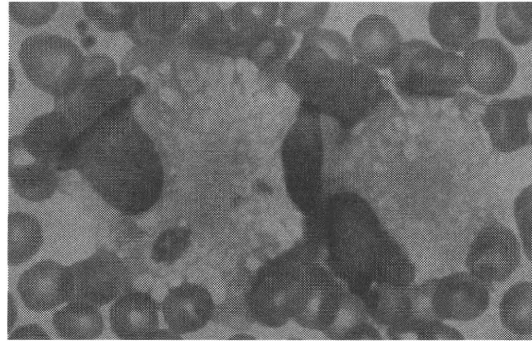


図4. EBV Terminal repeatのclonality 解析

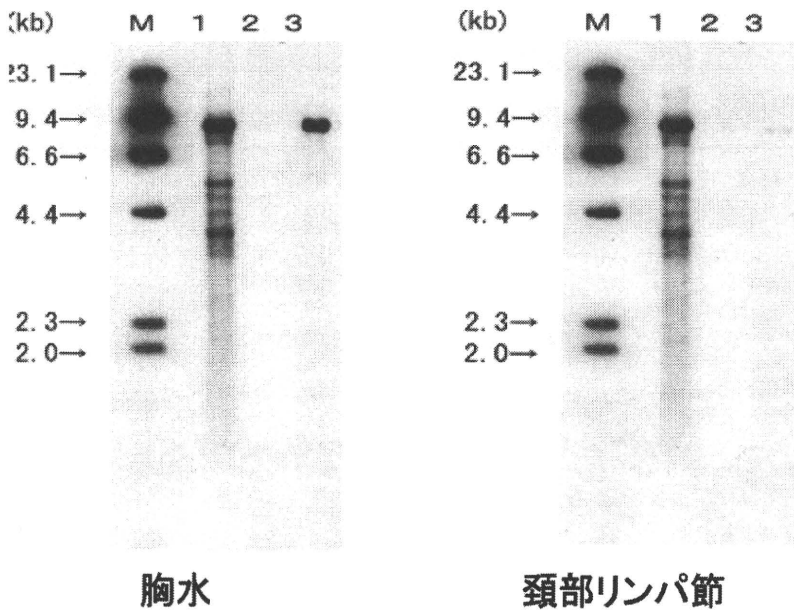


図5. 移植前の経過

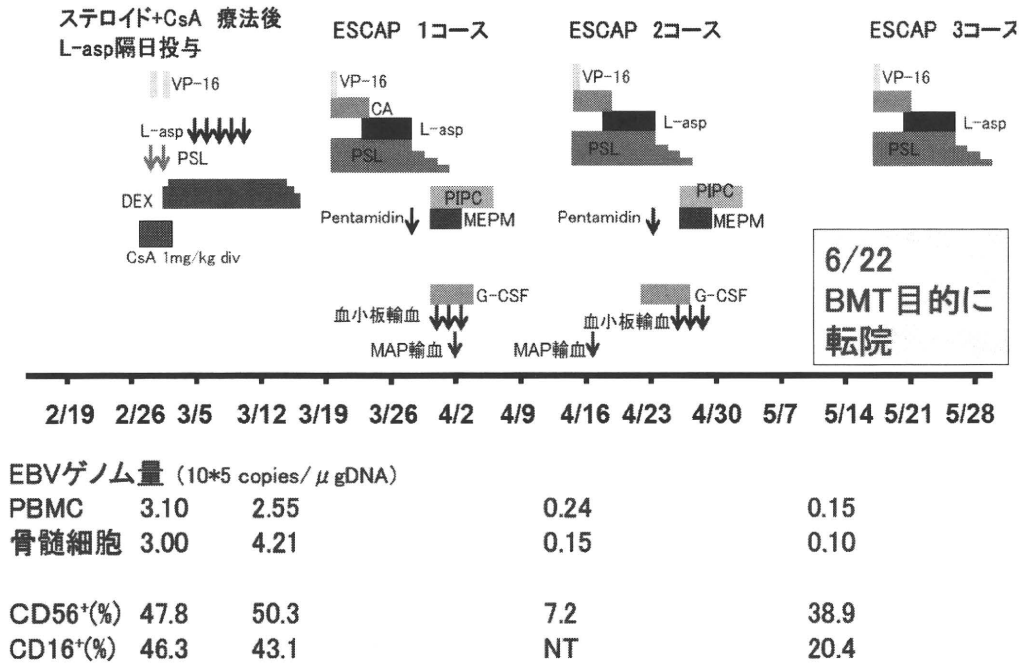


図6. 臨床経過

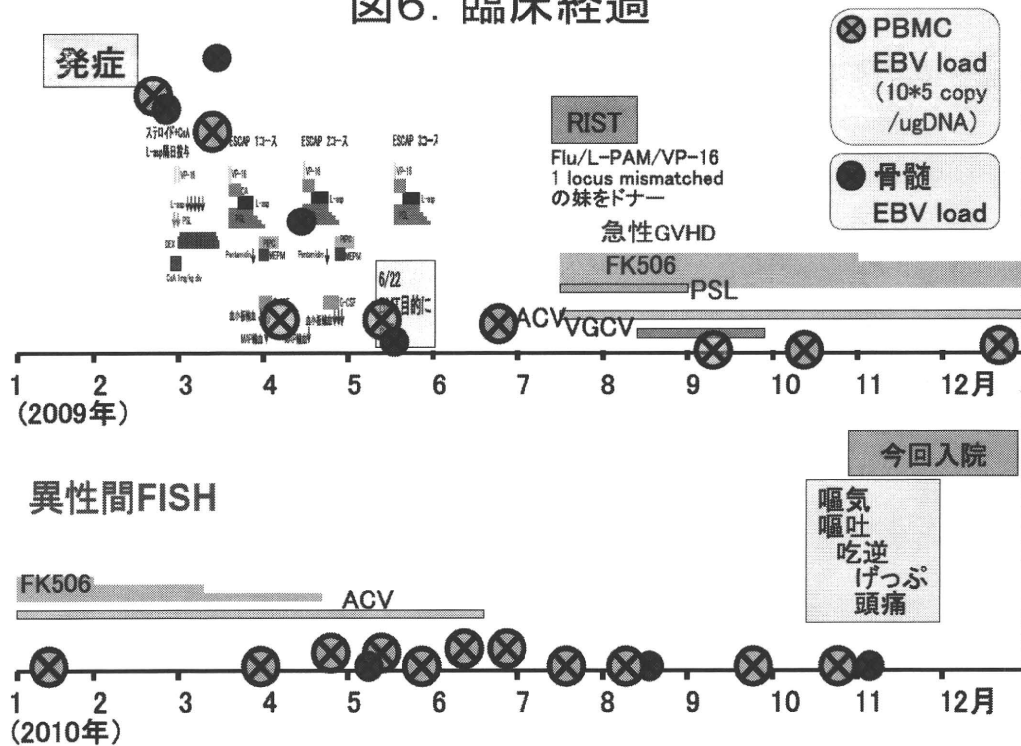


表1. 初発時の細胞表面マーカー解析

【胸水】

CD2 92.8% CD3 24.6% CD4 18.0% CD8 12.4%
CD19 0.6% CD20 0.47% HLA-DR 69.2%
CD16 71.4% CD56 80.8%

【骨髄】

CD2 91.7% CD3 48.7% CD4 23.9% CD8 27.4%
CD19 6.9% CD20 6.9%
CD16 46.3% CD56 47.8%

【頸部リンパ節】

CD2 68.2% CD3 60.9% CD4 38.4% CD5 72.6%
CD8 25.0% CD10 1.0%
CD11c 11.8% CD16 3.7% CD19 34.1% CD20 37.0%
CD22 35.0% CD23 22.0% CD25 12.9% CD30 1.6%
CD34 0.3% CD56 13.7% κ -ch 21.9% λ -ch 15.0%
→リンパ節の細胞はT細胞がメインでNK細胞はわずか

表2. 染色体解析

【胸水】

46, XY, add(15)(q24)[1] / 46, sl, -17, t(19;20)(q13;q13), +r1 [11] /
47, sl, +X [2] / 46, XY [2]

【骨髄】

46, XY, -11, add(15)(q24), +mar [1] / 46, XY [19]

【頸部リンパ節】

46, XY, add(15)(q24) [10] / 46, XY [10]