

特集 血液疾患の診かた—血液専門医以外のための血液疾患対応マニュアル—

プライマリ・ケア医に必要な血液疾患の知識

血球貪食症候群

大賀正一

九州大学大学院医学研究院周産期・小児医療学 教授

治療 (J. Therap.) 別刷
Vol.92, No.10 (2010.10)

株式会社 南山堂

プライマリ・ケア医に必要な血液疾患の知識

血球貪食症候群

大賀正一

九州大学大学院医学研究院周産期・小児医療学 教授

プライマリ・ケアにおけるポイント

こんな所見があれば本症を疑う

- ・ 抗生薬に不応の高熱が持続し、血球減少、播種性血管内凝固および肝脾腫がみられたら、血球貪食症候群を疑う。
- ・ 高フェリチン血症、低コレステロール血症、高トリグリセリド血症、血清可溶性IL-2受容体の上昇が特徴的で、骨髓に血球貪食組織球が増加する。
- ・ まれな単一遺伝子病である原発性と、感染症、膠原病および悪性リンパ腫に合併する続発性に分けられる。
- ・ 小児ではEBウイルス関連、成人ではリンパ腫関連が多い。

紹介する際の注意

- ・ 播種性血管内凝固の進行が予後を左右する。
- ・ 感染症関連では自然軽快するものもあるが、EBウイルス関連ではエトボシドを必要とする重症例が多い。
- ・ 膠原病や自己免疫疾患に伴うものにはシクロスポリンが有用である。
- ・ 原発性では同種造血細胞移植が根治療法となる。
- ・ 本症を疑ったら、早急に検査を進め血液専門医へ紹介することが望ましい。

はじめに

血球貪食症候群(HPS)は、単一遺伝子病として、また感染症、膠原病や悪性腫瘍の合併症として発症する¹⁾。患者は高熱が持続し、急速に播種性血管内凝固(DIC)が進行するため、本症を疑ったら早期の治療介入が必要である。HPSの共通病態となる、免疫の過剰活性化をきたす疾患と誘因は

多様である。続発性の臨床像は、自然軽快する軽症例から造血細胞移植の必要な重症例まで幅広い。ため、疫学を理解し、治療と平行しながら原疾患の診断を進めていく。

本稿では、HPSの歴史と疫学を紹介し、診断および治療方針について概説する。

I 疾患概念の変遷

歴史的には、Scottらが1939年に網内系組織球症として報告した6例にさかのぼる(表1)。家族性HPS(FHL)はFargularらの1952年の報告に始まる。Rappaportらは1960年代に、病理の立場から悪性組織球症/細網症の概念を提唱したが、成人のリンパ腫関連HPSが主体であったと推測される。1983年、Risda11らがVAHSを報告して感染症関連HPSが目されるようになった。EB

ウイルス(EBV)など特異抗体価による感染症診断の進歩が背景にあったと思われる。Henterらは1991年にHLHの診断ガイドラインを、1994年に治療プロトコルを提唱した。一方、自己免疫疾患では全身性紅斑性狼瘡(SLE)の増悪などに伴うマクロファージ活性化症候群(MAS)が、HPSと同じ病態として注目されるようになった。EBV-HLHは2000年ごろにEBV DNAの定量PCRが普

及して解析が進んだ。河ら日本のグループが主に報告してきたEBV関連T/NKリンパ増殖症(LPD)の概念は、2008年のWHOリンパ腫分類で全身型EBV陽性Tリンパ増殖症とされている²⁾。1999年

以降、FHLの原因遺伝子が次々と同定された。現在、HPSはHLHと同義で、その概念はFHLによる原発性とEBVやリンパ腫関連による続発性に整理される。

II 基礎疾患と誘因

HPSを、基礎疾患と誘因から「原発性・遺伝性」と「続発性・後天性」に分類する(図1)。原発性HPSは本来、原因不明のすべてのHPSを

表す。以前は、原発性HPSと診断せざるを得なかった「家族歴のない第1子HPS」もより正確に鑑別されるようになった。成人発症FHLも見つかり、

表1 HPSにおける疾患概念の変遷

疾患概念	報告(報告年)
histiocytic medullary reticulosis (HMR)	Scott & Robb-Smith (1939)
familial hemophagocytic reticulosis (FHR)	Fargular & Clairreaux (1952)
malignant reticulosis, malignant histiocytosis (MH)	Merkiw 1964, Rappaport (1966)
virus-associated hemophagocytic syndrome (VAHS) cf. bacteria-(BAHS), infection-(IAHS)	Risdall (1979)
lymphoma-associated hemophagocytic syndrome (LAHS) cf. malignancy-(MAHS)	Jaffe (1983)
hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH)	Henter (1991)
macrophage activation syndrome (MAS)	Stephan (1993)
autoimmune-associated hemophagocytic syndrome (AAHS)	Kumakura (2001)
EBV-associated T/NK-cell lymphoproliferative disease	Kawa (2002)
systemic EBV-positive T-cell LPD (EBV-HLH, CAEBV in Asia)	Cohen (2008)
identification of FHL genes Perforin, Munc13-4, Syntaxin11, STXBP2	(1999, 2003, 2004, 2009)

EBV : Epstein-Barr virus, LPD : lymphoproliferative disease.

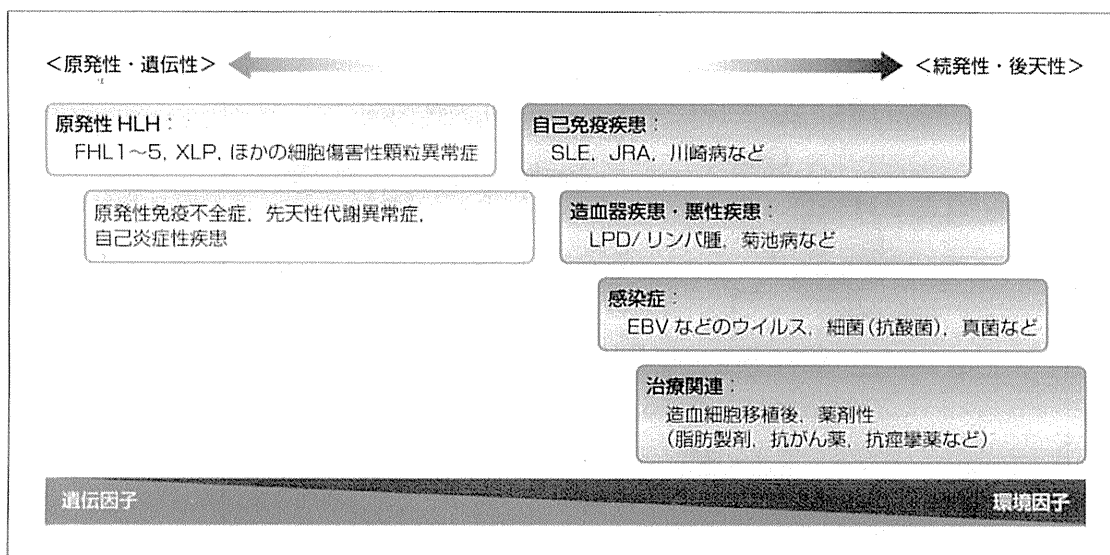


図1 HPSの基礎疾患と誘因

EBV-HLH成人例の報告も増加している。FHL 責任遺伝子の機能は、perforin など細胞傷害性顆粒代謝に関与し、ほかの顆粒異常症 (Griscelli 症候群など) にも HPS 発症が確認され、現在、これらを包括して原発性 HLH と呼ぶ³⁾。HPS は、IL-2R α 鎖異常症、 γ C 鎖異常症などの細胞性免疫不全症にも合併するが、その機序は明らかでない。また、リジン尿性タンパク不耐症など一部の先天性代謝異常症との関連も古くから知られているが、この発症機序も不明である。

続発性には、脂肪製剤・抗痙攣薬などによる薬剤

性のものがある。近年、造血幹細胞移植後の生着期に発症する HPS も注目されている。感染症は後天性 HPS の代表であるが、原発性である X 連鎖リンパ増殖症や Chediak-Higashi 症候群では、EBV 感染の重症化 (致死性伝染性単核球症、accelerated phase) が知られていた。FHL もウイルス感染が発症誘因となる。Perforin 欠損マウスは、特異病原体のない飼育環境では FHL2 モデルとして認識されにくい。EBV-HLH の宿主因子もまだ見つかっていない。臨床報告の蓄積が、発症における宿主と感染の関係を明らかにするであろう。

III 病態

HPS はリンパ球とマクロファージの過剰な活性化が持続し、制御不能なサイトカイン過剰産生に陥る高サイトカイン血症が共通病態である。活性化した組織球は血球を貪食し、臓器に浸潤する。多彩な基礎疾患と誘因から、これに至る過程は十分明らかでないが、原発性と続発性について FHL と EBV-HLH を例に説明する (図 2)。

FHL は、現在 5 型 (FHL1: 9 番染色体連鎖, FHL2:

PRF1 変異, FHL3: *UNC13D* 変異, FHL4: *STX11* 変異, FHL5: *STXB2*) に細分類される。患者の 10~30% の原因遺伝子はまだ不明である。細胞傷害性 T 細胞は perforin などの顆粒を有し、感染細胞や腫瘍細胞を標的とする。また、役割の終わった活性化 T 細胞や抗原呈示細胞も標的として免疫の活性化を調節する。したがって、細胞傷害性顆粒の産生から分泌までの過程に異常がある

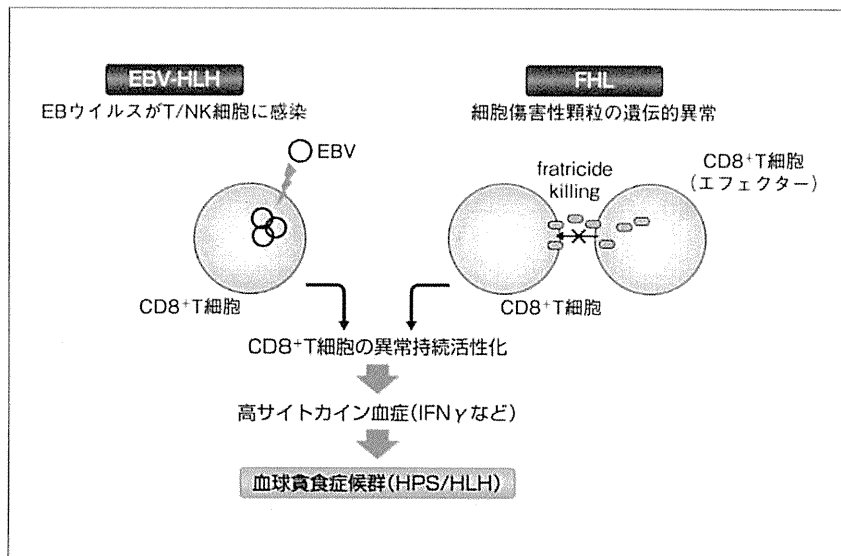


図 2 EBV-HLH と FHL における共通病態

と、活性化した免疫細胞が制御されない。感染細胞の排除障害も活性化の持続に関与する。一方、EBV-HLHでは、EBV感染CD8⁺T細胞がクローン増殖する。感染細胞はEBV特異的LMP1を発現する。これはNFκBを介しTNFα産生を誘導して血管内皮を傷害するとともに、TNFαRIを介して感染細胞自身のアポトーシスを抑制し、感染T細胞の持続活性化をきたす⁴⁾。

FHLもEBV-HLHも、活性化CD8⁺T細胞が

IFNγを過剰に産生し、高サイトカイン血症を引き起こす。T細胞はIFNγやTNFαを産生し、単球・マクロファージからIL-1β、IL-6、TNFα産生を誘導する。マクロファージはIL-12/18も産生し、Th1細胞とNK細胞からIFNγ関連ケモカインを誘導する。活性化リンパ球からsIL-2RやsFas/sFasLも過剰に放出される。Th2サイトカインのIL-10も増加するが、調節性T細胞やTh17の関与はまだ明らかでない。

IV 診断ガイドラインの注意点

HPSの診断ガイドラインを示す(表2)⁵⁾。①または②の5項目を満たせば診断する。各項目は基礎疾患を反映する。脾腫はFHLとEBV-HLHに顕著である。血球減少は2系統以上を有意とするが、川崎病、JIA・SLE、また造血細胞移植後は血球数の動態から判断する。

診断には疫学情報が重要である。図3にHPSの基礎疾患と発症年齢について、全国調査(n=469)の結果を示す⁶⁾。感染関連が64%を占め、その55%がEBV関連であった。年齢別では、15歳未満が52%。その半分はEBV-HLHでFHLはすべ

て小児例であった。青壮年例の1/3～半数はリンパ腫関連で、T/NK細胞性が優位であった。60歳以上は18%、その2/3はリンパ腫関連(主にB細胞由来)であった。EBVとリンパ腫が日本のHPSにおける主な背景因子である。EBV-HLHのT/NK細胞感染は欧米でも確認されるようになった⁷⁾。海外では Dengue 熱やリーシュマニアによる例もある。

FHL患児に奇形徴候はない。ほかの原発性のうち、Griscelli症候群では白子、Hermansky-Pudlak症候群では眼皮膚白皮症と小頭症、Chediak 東症候群では白血球異常顆粒が特徴である。

表2 HPS/HLHの診断ガイドライン

以下の①または②のいずれかを満たせばHLHと診断する	100,000/μL、好中球<1,000/μL
① FHLに一致した遺伝子異常(<i>PRF1</i> , <i>MUNC13-4</i> , <i>STX11</i> , <i>STXBP2</i>)を有するか、家族歴あり	4) 高TG血症(空腹時≥265mg/dL)または低フィブリノーゲン血症(≤150mg/dL)
② 以下の8項目のうち5つ以上を満たす	5) NK細胞活性低値または欠損
1) 発熱≥38.5℃	6) 血清フェリチン≥500ng/mL
2) 脾腫あり	7) 可溶性IL-2受容体≥2,400U/mL
3) 血球減少(末梢血3系統のうち少なくとも2系統に以下の異常があること): Hb<9.0g/dL、血小板<	8) 骨髄、脾臓、またはリンパ節に血球貪食像あり、悪性所見なし

付記1): 診断基準には含まれないが、診断に有用な所見: (a) 髄液細胞増多(単核球)かつ/または髄液蛋白増加、(b) 肝で慢性持続性肝炎に類似した組織像(生検にて)。

付記2): 診断を示唆するほかの所見: 髄膜刺激症状、リンパ節腫大、黄疸、浮腫、皮疹、肝酵素上昇、低蛋白血症、低Na血症、VLDL値上昇、HDL値低下。

注意1): 遺伝子異常の確定には日時を要するので、実際には蛋白発現解析で異常があれば遺伝子異常ありとみなしてよい。

注意2): 症例によっては発症時に上記の基準をすべて満たすわけではなく、経過とともにいくつかを満たすことが少なくない。したがって、診断基準を満たさない場合は注意深く観察し、基準を満たした(同時期に症状・所見が揃った)時点で診断する。

注意3): FHLの発症は通常乳児期であるが、思春期や成人でも報告されている。二次性HLHはすべての年齢で見られる。

(文献9)より改変)

V 診断と治療における包括的アルゴリズム

診断と治療方針の流れを図4に示す。発熱とDICの進行が病勢を反映する。HPSを疑ったら、診断項目(表2)をよく検討し、原発性か続発性か、何による続発性かを考える。鑑別すべき疾患が多いため、可能な検査を早急に進めながら血液専門医へ紹介する。感染症関連では無治療軽快例もあるが、EBV-HLHは重症化することが多い。

血清フェリチン高値の特異性は高い。sIL-2R、IFN γ などが血中に増加する。高トリグリセリド

かつ低コレステロール血症がみられる。IFN γ 産生を示す血中および尿中の β_2 -ミクログロブリン、ネオプテリンもマーカーとなる。血清リゾチーム、アンギオテンシン転換酵素なども組織球活性化の指標である。空包化した成熟組織球と血球貪食組織球が骨髄・脾・リンパ節、末梢血や脳脊髄液に出現する。血球貪食組織球は骨髄スミア標本1枚当たり少なくとも2個以上、成熟組織球は骨髄有核細胞の3%または2,500細胞/ μ L以上が有意と

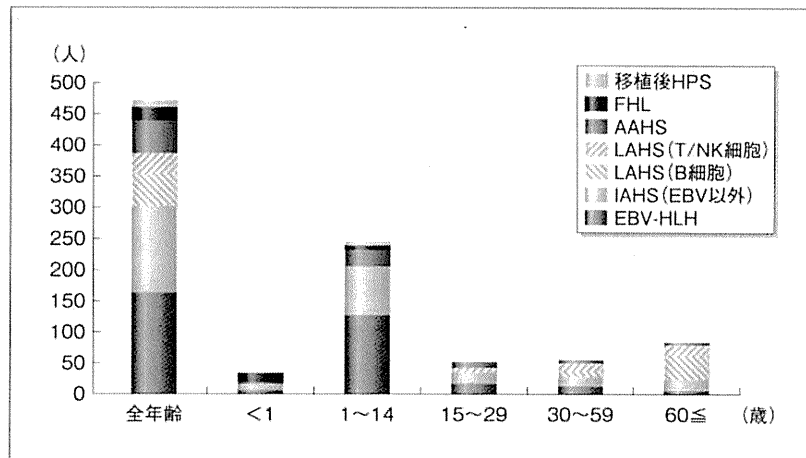


図3 HPSの発症年齢と基礎疾患

(文献6)より改変)

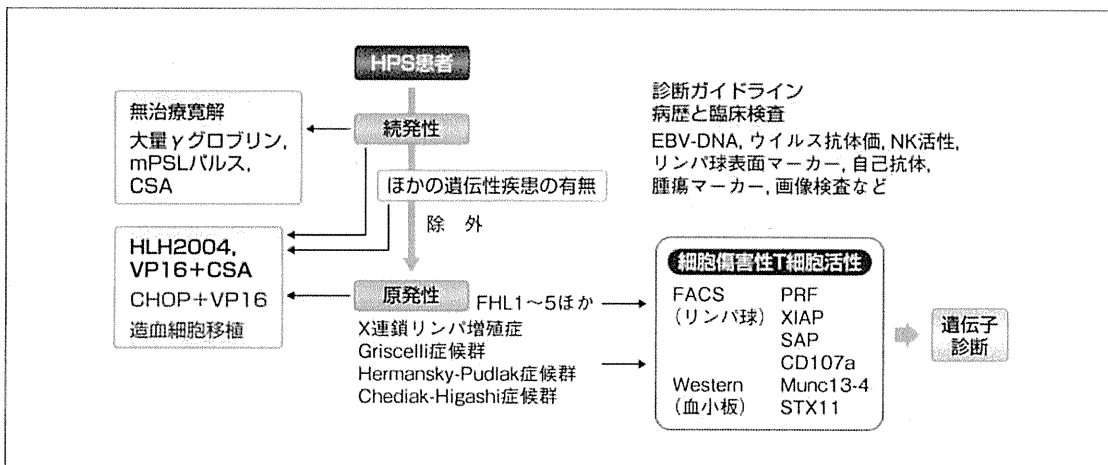


図4 HPSの診断と治療における包括的アルゴリズム

されるが、定量的評価は難しい。EBV-HLH患者には顆粒リンパ球増多をみることがある。

感染症は培養、ウイルス抗体価、遺伝子検査などから評価する。EBV-HLHの診断に、EBV DNA定量が有用である。カットオフ値が問題であるが、スクリーニングには全血法を用いる。EBV抗体価は初感染・再活性化のいずれのパターンもある。感染細胞の同定は、重症伝染性単核球症と慢性活動性EBV感染症の鑑別に有用である。EBV-HLHではCD8⁺T細胞優位な感染とクローン増殖が確認される。原発性HPSではNK活性が著減するが、膠原病関連でもNK活性が低下する。CTL活性の検討には細胞株樹立が必要である。フローサイトメトリーにて活性化T細胞を評価する。

原発性診断の特殊検査として、フローサイトメトリーによるperforinのCD8/56細胞内発現およびWestern blotによる血小板のMunc13-4とSTX11

発現解析がある。CD107a発現はSTXBP2も含めたスクリーニングとなろう。血球が保たれる時期にこれらを解析し、遺伝子診断を進める。

急性期の出血と臓器不全に注意し、適切な免疫化学療法を行う。膠原病関連にはシクロスポリンが有効である。感染が否定できない場合は大量γグロブリンから開始する。大量ステロイド療法はリンパ腫の有無を確認して使用したい。不応な場合は速やかにエトポシドを開始する。HLH-2004プロトコールに反応すれば8週以内に治療を中止する。EBV-HLHとEBV関連リンパ腫の鑑別が難しい。原発性には同種造血細胞移植を計画するが、造血細胞移植が必要なEBV-HLHはきわめてまれである。EBV-HLHとFHLのわが国の小児の移植後10年全生存率はそれぞれ86%と66%である⁶⁾。臍帯血移植の成績が比較的良好ではあるが、さらに方法について検討が必要である。

おわりに

FHLは遺伝的な細胞傷害活性不全から、EBV-HLHは感染細胞の持続活性化から、高サイトカイン血症に至りHPSを発症する。一方、発症機序の不明なHPSも多い。新生児から高齢者まで全年

齢で発症するHPSを的確に診断し、治療することは難しい。診断のための特殊検査を集約化し、造血細胞移植の可能な施設へ速やかに搬送するシステムを血液内科・小児科で整備する必要がある。



参考文献

- 1) Gupta S, Weitzman S: Primary and secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis: clinical features, pathogenesis and therapy. *Expert Rev Clin Immunol*, 6: 137-154, 2010.
- 2) Cohen JL, Kimura H, Nakamura S, et al: Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease in non-immunocompromised hosts: a status report and summary of an international meeting, 8-9 September 2008. *Ann Oncol*, 20: 1472-1482, 2009.
- 3) de Saint Basile G, Ménasché G, Fischer A: Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nat Rev Immunol*, 10: 568-579, 2010.
- 4) Chuang HC, Lay JD, Chuang SE, et al: Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein-1 down-regulates tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) receptor-1 and confers resistance to TNF-alpha-induced apoptosis in T cells: implication for the progression to T-cell lymphoma in EBV-associated hemophagocytic syndrome. *Am J Pathol*, 170: 1607-1617, 2007.
- 5) Henter JL, Horne A, Aricó M, et al: HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer*, 48: 124-131, 2007.
- 6) Ishii E, Ohga S, Imashuku S, et al: Nationwide survey of hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. *Int J Hematol*, 86: 58-65, 2007.
- 7) Beutel K, Gross-Wieltsch U, Wiesel T, et al: Infection of T lymphocytes in Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in children of non-Asian origin. *Pediatr Blood Cancer*, 53: 184-190, 2009.
- 8) Ohga S, Kudo K, Ishii E, et al: Hematopoietic stem cell transplantation for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. *Pediatr Blood Cancer*, 54: 299-306, 2010.

症例報告

成人 EB ウイルス関連血球貪食症候群 5 例の検討

安部康信¹, 白土基明¹, 永澤恵理子¹, 大塚理恵¹,
喜安純一¹, 佐田絵里子¹, 井筒拳策¹, 古藤和浩¹,
西村純二², 大賀正一³, 高柳涼一¹

Epstein-Barr ウイルス (EBV) 関連血球貪食症候群 (HLH) は, EBV 感染 T 細胞と活性化組織球の相互作用により血球減少や肝障害, 凝固障害といった重症病態をひきおこし, 小児での報告が多い。今回, 成人 EBV-HLH5 症例を経験したので報告する。年齢は中央値 17 歳 (16~40 歳) で, 初感染後, 2ヶ月以内に発症した例が 4 例であり, 1 例は再活性化のパターンを示した。末梢血 EBV ゲノム量は $2 \times 10^2 - 3 \times 10^6$ コピー/ml と高値を示し, すべての症例で EBV 感染 T 細胞のクローン性増殖を認めた。治療法は, 免疫抑制剤エトポシドが主体であり, 重症例の 2 例では血漿交換を施行した。3 例は完全寛解 (観察期間 13, 19, 30 か月) を維持しているが, 2 例は治療抵抗性となり, 多剤併用化学療法も効果なく死亡した。

EBV-HLH は的確な初期診断, 治療が重要であり, 今後成人例に関しても認知度をあげていく必要がある。(臨床血液 51 (1): 74~79, 2010)

Key words: Adult, Epstein-Barr virus, Hemophagocytic lymphohistiocytosis

緒言

伝染性単核症 (infectious mononucleosis: IM) は Epstein-Barr virus (EBV) の初感染により, 感染した B 細胞の増殖と, 免疫応答として活性化された細胞傷害性 T 細胞の増殖をひきおこすが, 一般的には self-limited な疾患である。EBV 関連血球貪食症候群 (EBV-HLH: hemophagocytic lymphohistiocytosis) は, EBV の初感染あるいは再活性化に伴い, EBV が感染した T 細胞がクローン性増殖をきたし, 活性化組織球との相互作用により血球減少や肝障害, 凝固障害といった様々な重篤な病態をひきおこすが, 主に小児例での報告が多く, 成人領域での認知度は十分とはいえない。今回若年を含め成人 5 例の EBV-HLH 症例を経験したので報告する。

対象症例および方法

2002 年 8 月より 2008 年 2 月までに当科で経験した EBV-HLH5 症例に関して解析をおこなった。慢性活動

性 EBV 感染症の経過中に発症した症例は除外した。血球貪食を示す検査値異常としては, Henter らの基準¹⁾を用いた。重症度の評価としては, 血球貪食症候群のスコアリングシステム²⁾を使用した。末梢血単核細胞を免疫磁気ビーズ法を用いて CD3 陽性細胞 (T 細胞), CD16 陽性細胞 (NK 細胞) に分離し, リアルタイム PCR 法で EBV ゲノム量を測定し, 優位な細胞を EBV 感染細胞とした。EBV クローナリティの解析は, 骨髓あるいは末梢血単核細胞を使用し, terminal repeat をプローブとしたサザンブロット法を施行した。一部の症例では T 細胞受容体 β 鎖遺伝子の再構成も検討した。

結果

年齢は 16~40 歳 (中央値 17 歳) で, 4 例が 20 歳以下と若年者であった。性別は, 男性 2 例, 女性 3 例であり, 免疫異常等の基礎疾患は認めなかった (表 1)。

症例 1-4 は, 初感染 (IM 発症) 後, 2 か月以内の短期間に EBV-HLH を発症した。症例 1, 2 では発熱, 咽頭痛, 倦怠感等の初発症状が, 一旦軽快した後に発症したが, 症例 3, 4 では初発症状に引き続き発症した。症例 5 は抗 EADR-IgG 抗体価が 640 倍と高値であり, EBV の再活性化にもとづく EBV-HLH と考えられたが, 慢性活動性 EBV 感染症を疑う前駆症状は病歴上認めなかった。全例で血漿中の EBV ゲノム量の増加 (cut off

受付: 2009 年 5 月 26 日

受理: 2009 年 9 月 3 日

¹ 九州大学大学院医学研究院 病態制御内科学

² 九州大学生体防御医学研究所 免疫病態学

³ 九州大学大学院医学研究院 成長発達医学 (小児科)

表 1 EBV 関連検査

症例	性	発症年齢	IM 症状から発症までの期間	EBV-DNA		EBV 抗体価			clonality EBV/ TCR	EBV 感染細胞
				血漿 (コピー/ml)	VCA-IgM	VCA-IgG	EA-IgG	EBNA		
1	男	16	約 2 か月	7×10^5	$< \times 10$	$\times 160$	$< \times 10$	$\times 10$	+/+	CD3
2	女	19	約 1.5 か月	9×10^4	$\times 10$	$\times 160$	$< \times 10$	$< \times 10$	+/+	CD3
3	女	16	約半月	2×10^2	$< \times 10$	$\times 40$	$< \times 10$	$< \times 10$	+/nd	CD3
4	女	17	約 1 か月	3×10^6	$\times 10$	$\times 160$	$\times 80$	$< \times 10$	+/nd	CD3
5	男	41	約 1 か月	1×10^6	$< \times 10$	$\times 320$	$\times 640$	$\times 40$	+/+	CD3

nd: 施行せず

表 2 入院時検査所見

症例	WBC (Neutro)/ μ l	Hb g/dl	Plt $\times 10^4/\mu$ l	AST/ALT IU/l	LDH IU/l	中性脂肪 mg/dl	Fib mg/dl	Ferritin ng/ml	sIL-2R IU/ml	Score
1	600 (520)	8.7	4.5	541/416	2,280	303	292	34,509	28,100	4
2	5,430 (1,411)	12.4	2.4	215/419	1,238	111	314	4,755	6,000 以上	2
3	2,230 (740)	8.2	3.4	139/111	1,054	226	102	8,796	4,459.4	2
4	1,200 (540)	11.8	3.7	2,413/500	14,743	432	119	99,280	12,274	7
5	5,110 (4,011)	9.5	6.7	1,203/454	4,368	349	75	55,775	6,000 以上	7

値： 2×10^2 コピー/ml 未満) を認め、CD3 陽性細胞 (T 細胞) に優位に感染していた。EBV の terminal repeat をプローブとしたサザンブロット解析では、全例で EBV 感染細胞の単クローン性増殖を認め、T 細胞受容体 β 鎖遺伝子の再構成は解析した 3 例で陽性であった (表 1)。

検査所見では、全例で総ビリルビン (2.0~8.2 mg/dl, 中央値 4.3 mg/dl) および FDP の高値 (14.5~132.7 μ g/ml, 中央値 41.9 μ g/ml) を認めた。Henter らの HLH 診断ガイドライン¹⁾に記載されている検査異常としては、貧血 (Hb < 9 g/dl); 2 例, 好中球減少 (< 1,000/ μ l); 3 例, 血小板減少 (< $10 \times 10^4/\mu$ l); 5 例, 中性脂肪高値 (> 265 mg/dl); 3 例, フィブリノーゲン低値 (< 150 mg/dl); 3 例, フェリチン高値 (> 500 ng/ml); 5 例, 可溶性 IL-2 レセプター高値 (> 2,400 IU/ml) を 5 例に認めた (表 2)。血小板数に比較し好中球数, Hb は比較的保たれており, 凝固異常を高率に認めた。全例でフェリチンおよび可溶性 IL-2 レセプターは著明高値を示した。血球貪食症候群の重症度²⁾は, 中等症から重症とされる 4 点以上を 3 例にみとめ, うち 2 例 (症例 4, 5) は最高点の 7 点であった (表 2)。この 2 例に関しては, 血漿交換により初期の病勢のコントロールが可能であった。重症例に関しては, 高サイトカイン血症をすみやかに是正するため血漿交換が有用と考えられた³⁾。

当科ではメチルプレドニゾン等のステロイドとシクロスポリンの併用による免疫抑制療法を第 1 選択としており, 重症例に関しては, エトポシドの併用や血漿交換を随時追加している (表 3)。症例 2, 3 は免疫抑制のみで改善したが, 症例 1 では, 一旦改善傾向を認めるも, 短期間で再燃し, 同種造血幹細胞移植 (臍帯血移植および HLA3 座不一致の母児間同種末梢血幹細胞移植) を含めた種々の治療に抵抗性であり, 原疾患の悪化のため, 発症後約 7.5 か月で死亡した。経過の詳細に関して, 症例 1, 2 に関してはすでに報告した⁴⁾。再活性化が示唆された症例 5 では, 血漿交換および免疫抑制+エトポシドで一旦軽快するも, 約 1 か月で再燃し, 多剤併用化学療法を施行するも効果なく, 原疾患の悪化にて発症後約 6 か月で死亡した。生存例は 3 例であるが, 悪性リンパ腫との鑑別が困難であった症例 4 に関して詳述する。

症例 4: 17 歳, 女性で生来健康。2008 年 1 月中旬より咽頭痛・発熱が出現し, 解熱しないため 2 月初旬に前医を受診。EBV の抗 VCA IgM 抗体陽性, 抗 EBNA 抗体陰性であり伝染性単核症と診断, 血小板減少 ($5.0 \times 10^4/\mu$ l) と肝機能障害を認め, 経過観察を行っていたが, 以後も 39°C 以上の発熱が 5 日間持続し, 汎血球減少 (白血球数 1,200/ μ l, Hb 11.8 g/dl, 血小板数 $3.7 \times 10^4/\mu$ l) およびフェリチン (99,280 ng/ml), LDH (14,743 IU/l), FDP (132.7 μ g/ml) の高値を認めたため,

表3 治療および予後

症例	治療	予後 (month)
1	m-PSL + CsA + ETP, 多剤併用化学療法 (CHOP 等), 同種造血幹細胞移植 (RIST2 回)	7.5 mo
2	m-PSL パルス, CsA+m-PSL	30 mo+
3	m-PSL パルス, CsA+PSL	19 mo+
4	血漿交換, m-PSL パルス, CPM+ETP, PSL+CsA+ETP	13 mo+
5	血漿交換, m-PSL パルス, CsA+PSL+ETP, 多剤併用化学療法 (CHASE)	6 mo

+ 生存中

略語: (m)-PSL; (メチル) プレドニゾロン, CsA; シクロスポリン, CPM; シクロホスファミド, ETP; エトポシド, RIST: reduced intensity stem cell transplantation
 CHOP: シクロホスファミド+ドキシソルピシン+ビンクリスチン+プレドニゾロン
 CHASE: シクロホスファミド+大量シタラピン+デキサメタゾン+エトポシド

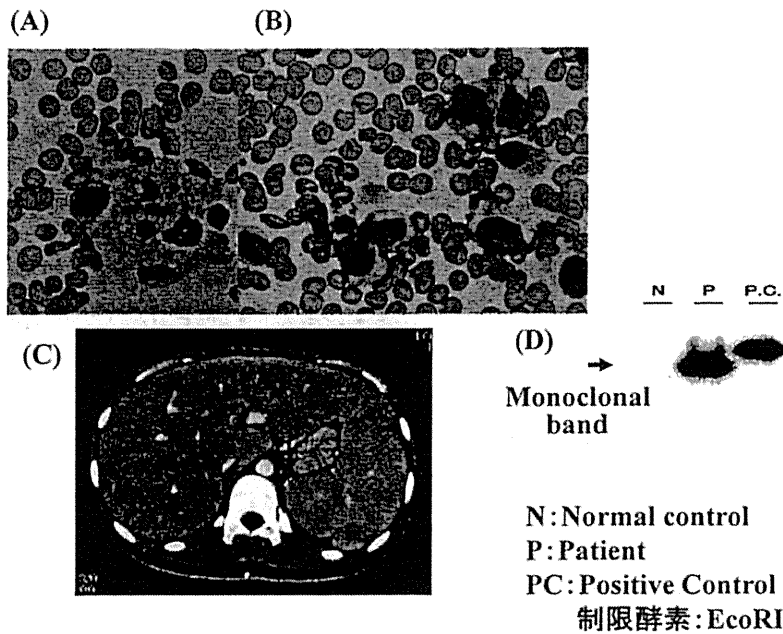


図1 症例4の入院時所見。骨髓塗抹標本(メイギムザ染色×1,000): 活性化組織球による血球貪食像(A)及び異型リンパ球を81.2%認めた(B)。腹部CT検査: 肝脾腫を認めた(C)。サザン法によるEBVクローナリティ解析(骨髓): EBV感染細胞の単クローン性増殖を認めた(D)。

当院に救急搬送となった。当院来院時の骨髓塗抹標本では、血球を貪食した組織球が散見(図1A)される以外に、異型リンパ球を81.2%に認め、表面マーカーの検索では、リンパ球領域の解析で95%前後がCD3+CD8+HLA-DR+であった(図1B)。また可溶

性IL-2レセプターも12,274 IU/mlと著増し、肝脾腫も認めた(図1C)ため、当初は悪性リンパ腫との鑑別が困難であった。血漿中のEBVゲノム量は 3×10^6 コピー/mlと増加していた。高サイトカイン血症をすみやかに是正するため血漿交換やメチルプレドニゾロンパル

ス療法を施行し、末梢性T細胞リンパ腫が鑑別にあがるため、CHOP+エトポシド療法を予定したが、すでに血管漏出によると思われる肺水腫を併発しており、腫瘍崩壊にもとづく高サイトカイン血症を極力抑えるためシクロホスファミドとエトポシドの分割投与を施行した。治療中にも肺水腫の悪化あり、また全身状態も不良であり、ドキシソリンとビンクリスチンの投与は断念したが、治療によく反応し血漿EBVゲノム量も 1×10^3 コピー/mlと減少した。本例では、入院時の骨髓単核細胞を使用したサザンブロット解析で、EBV感染細胞の単クローン性増殖が示された(図1D)が、免疫抑制+エトポシド治療の反応が良好であったことより、病歴などからEBV-HLHと診断し、HLH-2004プロトコール¹⁾を参考にプレドニゾン+シクロスポリン+エトポシドの治療に変更した。その後の反応も良好であり、全身状態や検査所見の改善を認め、治療開始後1カ月で血漿EBVゲノムは検出されなくなった。エトポシドの投与は 150 mg/m^2 を計8回施行し、プレドニゾンおよびシクロスポリンは漸減中止した。現在、約1年経過するも、検査異常はすべて正常化しており再発は認めていない。本症例では、ステロイド、免疫抑制剤、エトポシド単独の抗がん剤治療に対する反応が良好で、通常悪性リンパ腫とは異なる経過を示した。血球減少を認めてから、診断までの期間が約5日間と長引いたため、血球貪食に伴う血球減少と、異型リンパ球の増加が更に進行し、悪性リンパ腫との鑑別が困難であったと考えられた。

考 察

EBVの初感染によるIMは、self-limitedな経過をたどる良性の疾患であるが、EBV-HLHは、EBVの初感染あるいは再活性化後に、速やかにEBV感染細胞(活性化CD8陽性細胞)⁵⁾の単クローン性増殖をきたし、血球減少、凝固障害、肝障害等をきたし急激な経過を辿る疾患であり、fulminant EBV+T-cell lymphoproliferative disorder等として報告されている⁶⁾。感染細胞は単クローン性増殖を示し、リンパ増殖性疾患としての性格も有しているため、悪性リンパ腫との異同も問題となる。

EBV-HLHに関しては、標準治療は確立されていないが、HLH-2004プロトコール¹⁾等を参考に、Tリンパ球や組織球の活性化に関連する高サイトカイン血症を是正するため、まず免疫抑制剤が使用されることが多い。同時にEBV感染細胞および活性化組織球の制御のためエトポシドが併用される。2001年から2005年にかけての全国調査⁷⁾では、EBV-HLH(163人)の約80%は14歳以下の小児であり、小児例では5年生存率が87.3%と良好であるのに対し、若年者も含めた成人例では68%前

後と不良である。成人でのEBV-HLH症例の報告は少なく、多くは予後が不良とされているが⁶⁻⁹⁾、EBVの感染状況(初感染あるいは再活性化等)が不明であったり、明らかなT/NKリンパ腫合併例が含まれていたり、HLH-2004プロトコールに準じた治療内容でないものも多いため、小児例との比較が困難である。成人例でのまとまった報告例であるImashukuらの報告¹⁰⁾では、20例中9例は文献からの考察であり、情報が十分とはいえず、一定の限界はあるが、エトポシドを4週以内に使用した7人の2.5年生存率が $85.7 \pm 13.2\%$ に対し、エトポシドを4週以内に使用しなかった13人の2.5年生存率は $10.3 \pm 9.4\%$ と、エトポシドの早期必要性が示唆されている。すなわち、成人例であっても、早期からの機会を逸さない適切な治療が必要であり、初期治療に反応悪く、発熱等の臨床症状や検査所見の改善を認めない場合は、速やかにエトポシドを追加すべきとされている。

エトポシドは血球貪食症候群におけるkey drugであり、投与機会を逸してはならないが、2次発がんの問題もあり、過剰投与には注意が必要である。一部の症例では、EBV感染細胞のクローナルな増殖があっても、免疫抑制のみで治療可能である¹¹⁾ことから、エトポシドの至適投与時期や免疫抑制剤の至適投与期間等不明な点も多い。症例3ではシクロスポリンの内服を約50日で自己中断したため、その後、4~5日で発熱や、一旦正常化していたフェリチン値の上昇や、肝障害、血球減少の進行とともに、血漿中のEBVゲノム量の再増加を認めた。その後、シクロスポリン+プレドニゾンの再投与で、再度寛解状態となったため、ステロイドは約3か月で中止し、シクロスポリンは、血中トラフ濃度が $150 \sim 200 \text{ mg/l}$ を維持するように、約6か月投与を続け、漸減中止したが、その後、再発を認めていない。Imashukuらは、EBV-HLHをHLHプロトコールで治療するに際して、8週間のデキサメサゾン+エトポシドで完全寛解(臨床症状の消失および検査所見、特に血清フェリチンの正常化)に到達しない例には、シクロスポリンも含んだ6~12ヶ月の維持療法を施行している^{12,13)}。

血球貪食症候群のスコアリングシステム²⁾と予後との関連については、重症例では生存率が低下することが示されている⁷⁾。今回、少数例の検討ではあるが、点数が低い群では免疫抑制療法のみ、高い群では血漿交換やエトポシドの併用等、より集約的治療が必要となる可能性が示唆された。重症度診断基準に基づく治療の層別化の可能性について今後より多数例での検討が必要である。

一方、免疫抑制剤にエトポシドを併用しても、一時的な効果しか示さない治療抵抗例も存在する。このような例に対しては、悪性リンパ腫に準じた多剤併用療法が選

扱われるが、その効果は必ずしも十分とはいえず^{7,11)}、早期の同種造血幹移植の介入等新たな治療戦略の確立が望まれる。

高サイトカイン血症に伴う病態は、時間～日単位で悪化していくため、早期の診断、治療が重要であり、EBV-HLH 症例の死亡例の半数は、診断後2か月以内の早期死亡（出血、感染）といった報告もある¹²⁾。また、診断までの期間が長引くと、症例4のように悪性リンパ腫との鑑別が困難な場合も生じ得る。EBV-HLHは激的な症状を呈する疾患であるが、今回の我々の経験や過去の報告¹⁴⁾からは、初感染から移行するものは、若年成人例ではあっても、小児同様⁷⁾、HLHプロトコールに準じた適切な治療で制御可能と考えられ、適切な早期診断治療により、良好な予後が望める疾患である。本邦でも近年、EBV初感染年齢が欧米並みに青年期にシフトしている¹⁵⁾ことより、IMのみならずEBV-HLH等のEBV関連重症疾患が、成人においても増加する可能性がある。IMの経過中、あるいは一旦改善した後も、持続する発熱や血球（特に血小板）減少、AST優位でLDH高値や肝脾腫を伴う肝障害、高フェリチン血症や凝固異常（FDP高値、フィブリノーゲン低値等）を認める際は、速やかに専門施設へ紹介してもらうべく、血液内科のみならず、感染症内科や肝臓内科等、IMを診療する機会が多い診療科を含め、認知度をあげていく必要がある。

文 献

- 1) Henter JI, Horne A, Aricó M, et al. HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer*. 2007; **48**: 124-131.
- 2) Kawa K. Hemophagocytic syndrome. Treatment strategies according to classification and scoring system. Education Program Book, Annual Meeting of JSH/JSCH 2005. 2005; 72-75.
- 3) Matsumoto Y, Naniwa D, Banno S, Sugiura Y. The efficacy of therapeutic plasmapheresis for the treatment of fatal hemophagocytic syndrome: two case reports. *Ther Apher*. 1998; **2**: 300-304.
- 4) 井筒拳策, 安部康信, 松島孝充, ほか. 初感染後早期にEBウイルス感染細胞のモノクローナルな増殖及び血球貪食症候群を来した若年成人2症例. *臨血*. 2008; **49**: 1541-1547.
- 5) Kasahara Y, Yachie A, Takei K, et al. Differential cellular targets of Epstein-Barr virus (EBV) infection between acute EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis and chronic active EBV infection. *Blood*. 2001; **98**: 1882-1888.
- 6) Quintanilla-Martinez L, Kumar S, Fend F, et al. Fulminant EBV (+) T-cell lymphoproliferative disorder following acute/chronic EBV infection: a distinct clinicopathologic syndrome. *Blood*. 2000; **96**: 443-451.
- 7) Ishii E, Ohga S, Imashuku S, et al. Nationwide survey of hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. *Int J Hematol*. 2007; **86**: 58-65.
- 8) Satoh N, Koike T, Takato H, Fujiwara M, Emura I, Kaneganed H. Fatal primary Epstein-Barr virus infection due to clonal CD8+ T-lymphocyte proliferation in an immunocompetent adult. *Int J Hematol*. 2005; **82**: 169-170.
- 9) Elazary AS, Wolf DG, Amir G, et al. Severe Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic syndrome in six adult patients. *J Clin Virol*. 2007; **40**: 156-159.
- 10) Imashuku S, Kuriyama K, Sakai R, et al. Treatment of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis (EBV-HLH) in young adults: a report from the HLH study center. *Med Pediatr Oncol*. 2003; **41**: 103-109.
- 11) 大賀正一, 野村明彦, 高田英俊, 菅尚浩, 原寿郎. 難治性EBウイルス関連疾患に対する治療の現況. *臨とウイルス*. 2006; **34**: 152-157.
- 12) Imashuku S, Teramura T, Tauchi H, et al. Longitudinal follow-up of patients with Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Haematologica*. 2004; **89**: 183-188.
- 13) Imashuku S, Hibi S, Ohara T, Iwai A, et al. Effective control of Epstein-Barr virus-related hemophagocytic lymphohistiocytosis with immunochemotherapy. *Histiocyte Society*. *Blood*. 1999; **93**: 1869-1874.
- 14) *横山明弘, 高山信之, 佐藤範英, 鈴木亮, 甫守正史, 吉野秀朗. EBウイルス関連血球貪食症候群4症例の検討. *臨血*. 2007; **48**: 963.
- 15) Takeuchi K, Tanaka-Taya K, Kazuyama Y, et al. Prevalence of Epstein-Barr virus in Japan: trends and future prediction. *Pathol Int*. 2006; **56**: 112-116.

Five cases of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in adult

Yasunobu ABE¹, Motoaki SHIRATSUCHI¹, Eriko NAGASAWA¹, Rie OHTSUKA¹,
Junichi KIYASU¹, Eriko SADA¹, Kensaku IDUTSU¹, Kazuhiro KOTOH¹,
Junji NISHIMURA², Shouichi OHGA³, Ryoichi TAKAYANAGI¹

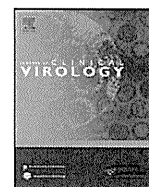
¹ Department of Medicine and Bioregulatory Science, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University.

² Department of Clinical Immunology, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University.

³ Department of Pediatrics, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

Key words : Adult, Epstein-Barr virus, Hemophagocytic lymphohistiocytosis

Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis (EBV-HLH) is more common in children, and is characterized by pancytopenia, liver dysfunction and coagulopathy caused by interactions between EBV-infected T cells and activated macrophages. We describe here five adults with EBV-HLH. The median age was 17 years (range 16~40). HLH developed in 4 patients within 2 months after the primary infection, and in the other one during the reactivation. All patients had a high EBV viral load in peripheral blood ($2 \times 10^2 - 3 \times 10^6$ copies/ml) and monoclonal proliferation of EBV-infected T cells. All patients received immunosuppressive therapy with or without etoposide, and two patients required plasmapheresis due to the severity. Three patients are alive in complete remission (follow up periods; 13, 19, 30 months), while two patients became refractory to chemo-immunotherapy and died despite multidrug chemotherapy. EBV-HLH should be more widely recognized in adults in order to achieve early diagnosis and appropriate treatment.



Clonal origin of Epstein-Barr virus (EBV)-infected T/NK-cell subpopulations in EBV-positive T/NK-cell lymphoproliferative disorders of childhood

Shouichi Ohga^{a,*}, Masataka Ishimura^a, Goichi Yoshimoto^b, Toshihiro Miyamoto^b, Hidetoshi Takada^a, Tamami Tanaka^a, Koichi Ohshima^c, Yoshiyasu Ogawa^d, Ken-Ichi Imadome^e, Yasunobu Abe^f, Koichi Akashi^b, Toshiro Hara^a

^a Department of Pediatrics, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

^b Department of Medicine and Biosystemic Science, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

^c Department of 2nd Pathology, Faculty of Medicine, Kurume University School of Medicine, Kurume, Japan

^d Molecular Genetic Testing Department, Mitsubishi Chemical Medicine Corporation, Tokyo, Japan

^e Department of Infectious Diseases, National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo, Japan

^f Department of Medicine and Bioregulatory Science, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 April 2010

Received in revised form

31 December 2010

Accepted 20 January 2011

Keywords:

Epstein-Barr virus

Chronic active Epstein-Barr virus infection

T-cells

Natural killer cells

CD34⁺ cells

Lymphoproliferative disease

ABSTRACT

Background: In Japan, chronic active Epstein-Barr virus infection (CAEBV) may manifest with infection of T-cells or NK-cells, clonal lymphoid proliferations, and overt lymphoid malignancy. These EBV-positive lymphoproliferative disorders (EBV⁺LPD) of childhood are related to, but distinct from the infectious mononucleosis-like CAEBV seen in Western populations. The clonal nature of viral infection within lymphoid subsets of patients with EBV⁺LPD of childhood is not well described.

Objectives: Viral distribution and clonotype were assessed within T-cell subsets, NK-cells, and CD34⁺ stem cells following high purity cell sorting.

Study design: Six Japanese patients with EBV⁺LPD of childhood (3 T-cell LPD and 3 NK-cell LPD) were recruited. Prior to immunochemotherapy, viral loads and clonal analyses of T-cell subsets, NK-cells, and CD34⁺ stem cells were studied by high-accuracy cell sorting (>99.5%), Southern blotting and real-time polymerase chain reaction.

Results: Patient 1 had a monoclonal proliferation of EBV-infected $\gamma\delta$ T-cells and carried a lower copy number of EBV in $\alpha\beta$ T-cells. Patients 2 and 3 had clonal expansions of EBV-infected CD4⁺T-cells, and lower EBV load in NK-cells. Patients 4, 5 and 6 had EBV⁺NK-cell expansions with higher EBV load than T-cells. EBV-terminal repeats were determined as clonal bands in the minor targeted populations of 5 patients. The size of terminal repeats indicated the same clonotype in minor subsets as in the major subsets of four patients. EBV was not, however, detected in the bone marrow-derived CD34⁺ stem cells of patients.

Conclusions: A single EBV clonotype may infect multiple NK-cell and T-cell subsets of patients with EBV⁺LPD of childhood. CD34⁺ stem cells are spared, suggesting infection of more differentiated elements.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Background

More than 90% of adults have been infected with Epstein-Barr virus (EBV). Primary infection often occurs in children and adolescents and may manifest as an acute infectious mononucleosis (IM) in the latter group. The γ herpes virus enters CD21⁺B cells, and persists throughout life by establishing latent infection in memory B-cell pools and evading immune elimination by EBV-specific cytotoxic T-cells.¹ Chronic active EBV infection (CAEBV) is a rare mononucleosis syndrome affecting otherwise immunocompetent individuals and is characterized by high levels of circulating EBV DNA and recurrent IM-like symptoms, along with cardiac, cerebral, and intestinal involvement.^{2,3} This typical CAEBV was

Abbreviations: Abs, antibodies; BM, bone marrow; CAEBV, chronic active Epstein-Barr virus infection; EBV, Epstein-Barr virus; EBEB, Epstein-Barr virus-encoded mRNA; EBNA, Epstein-Barr virus-nuclear antigen; FITC, fluorescein isothiocyanate; HSC, hematopoietic stem cells; HLH, hemophagocytic lymphohistiocytosis; HIV, human immunodeficiency virus; HMB, hypersensitivity to mosquito bites; Ig, immunoglobulin; IM, infectious mononucleosis; LMP, latent membrane protein; LPD, lymphoproliferative disorder; MNC, mononuclear cell; Lin, lineage; NK, natural killer; PB, peripheral blood; PCR, polymerase chain reaction; PE, phycoerythrin; TCR, T-cell receptor; TR, terminal repeat.

* Corresponding author. Tel.: +81 92 642 5421; fax: +81 92 642 5435.

E-mail address: ohgas@pediatr.med.kyushu-u.ac.jp (S. Ohga).

Table 1
Clinical profiles of patients studied.

Patient	1	2	3	4	5	6
Sex	f	f	m	f	m	m
Age (yrs) at onset, at the study	6, 7	8, 25	2, 5	4, 4	1, 10	3, 8
Involvement						
CAL	no	no	no	yes	no	no
Enteral	no	no	no	yes	no	no
HMB	no	yes	no	yes	yes	yes
HV	yes	yes	no	no	yes	yes
Anti EBV-Abs						
VCA-IgG	160	640	1280	640	160	160
-IgM	<10	<10	<10	<10	<10	<10
-IgA	<10	40	20	<10	<10	<10
EADR-IgG	<10	160	640	40	10	10
-IgA	na	na	<10	160	<10	<10
EBNA	40	10	40	40	80	80
EBV DNA ^a PB/MNC	100/10 ⁶	300/10 ⁴	600/na	3000/na	300/10 ⁵	2000/na
Major targeted subsets	$\gamma\delta$ T	CD4	CD4	CD56	CD56	CD56
CD3/CD19/CD56 (%)	70/28/2	75/18/7	69/24/7	82/5/13	47/17/36	58/15/27
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ (%)	14.4	21.5	15.8	14.2	0.6	5.9
CD4/CD8	1.6	0.8	5.3	2.0	3.3	2.9
Clonality ^b EBV-TR	M	B	M	B	M	M
TCR	R	R	na	G	G	G
Outcome	AOD	Death	ADF	ADF	AOD	AOD
		Post-SCT	Post-SCT	Post-SCT		

^a Each value means the copy number of EBV DNA (PB: /ml, MNC: / μ g DNA).

^b Clonality was screened by Southern blotting for PB-MNC derived DNA probed with EBV-TR, TCR and IgH genes. There was no evidence of clonally proliferating B cells. EBV, Epstein-Barr virus; CAL, coronary artery lesion; CNS, central nervous system; HMB, hypersensitivity to mosquito bites; HV, hydroa vacciniforme; VCA, viral capsid antigen; EBNA, EBV nuclear antigen; PB, peripheral blood; MNC, mononuclear cells; TR, terminal repeat; TCR, T-cell receptor; M, monoclonal; B, biclonal; R, rearrangement; G, germ line; AOD, alive on disease; ADF, alive on disease free state; SCT, stem cell transplantation.

first described in Western populations and rarely progresses to lymphoproliferative disease (LPD). In contrast, CAEBV in Asian populations, including Japan, is characterized by ectopic infection of natural killer (NK)-cells and T-cell subsets.^{4,5} Emergence of clonal T-cell or NK-cell proliferations and often frank lymphoid malignancy is common in this setting.⁶ Affected patients need allogeneic stem cell transplantation (SCT) for the cure of disease.⁷ The World Health Organization, to avoid confusion, recommends that these clonal EBV-positive T/NK-cell lymphoid proliferations be referred to as EBV⁺LPD of childhood rather than CAEBV.^{8,9} The Asian Hematopathology association recommends a grading system wherein polyclonal and oligoclonal EBV⁺T/NK-cell expansions are classified as EBV-associated T/NK-cell LPD.¹⁰ The EBV⁺LPD are often complicated by hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH). EBV-associated HLH is similarly driven by ectopic infection of CD8⁺T-cells. Despite the increasing number of reports,¹¹ the cause of T/NK-cell infection remains unclear.

The episome of EBV DNA has a variable reiteration of terminal repeat (TR) sequences that are joined by random recombination upon circularization of the linear genome at entry into cells. The TR number is maintained in the progeny of the infected cells and is an indicator of clonal infection. The study of TR sequences may further elucidate the nature of EBV infection in NK-cells and T-cells in EBV⁺LPD of childhood.

2. Objectives

This study aimed to identify the clonal origin of EBV-infected T/NK-cell subsets in EBV⁺LPD patients using high-accuracy cell sorting and molecular analysis.

3. Study design

3.1. Patients

Six Japanese patients with CAEBV¹² treated in Kyushu University between 2002 and 2008, were recruited (Table 1). The presence

of clonal T-cells in Patient-1 and development of frank lymphoma in Patient-2 (see Section 4.1) met WHO criteria for EBV⁺T-cell LPD.⁸ Monoclonal/biclonal TR band(s) in other patients (see Section 4.2) were consistent with lower grade EBV⁺LPD according to Asian Hematopathology guidelines.¹⁰ The median age at onset was 3.5 years. The unique symptoms included hypersensitivity to mosquito bite (HMB) ($n=4$), hydroa vacciniforme ($n=4$), and coronary artery lesion ($n=1$). Three patients had abnormal patterns of anti EBV-antibodies (Abs). The primary targets were T-cells in 3 or NK-cells in 3 patients. Peripheral blood (PB) or bone marrow (BM) samples were collected before chemotherapy, after obtaining informed consent. Previously tested EBV-seropositive patients were used as controls.

3.2. Cell sorting

Magnetic activated cell sorting (MACS) was performed on PB mononuclear cells (MNCs) using Vario-MACS columns (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) after staining with anti-CD3, CD4, CD8 and CD56 immunobeads (Miltenyi Biotec). Anti-fluorescein-isothiocyanate (FITC) and phycoerythrin (PE) (Miltenyi Biotec) immunobeads were used to collect $\alpha\beta$ T-cells and $\gamma\delta$ T-cells after staining with FITC-conjugated anti-T-cell receptor (TCR)V δ 2 and PE-conjugated TCRpan α/β monoclonal Abs (Immunotech; Beckman Coulter, Marseille, France), respectively. CD56⁺NK-cells were collected using Lymphocyte Separation column, after depleting CD3⁺ cells by Lymphocyte Depleting column (Miltenyi Biotec). The procedures yielded >97% purity. CD3⁺T-cells, $\gamma\delta$ T-cells, and $\alpha\beta$ T-cells were further purified (>99.9%) using the FACS Aria Flow Sorter (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). CD34⁺ cells were enriched from BM cells by Indirect CD34 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec).¹³ To further purify CD34⁺ cells (>99.9%), lin⁻CD34⁺ cells were sorted from BM by FACS Aria after staining with conjugated lineage mixtures of (a) PE-Cy5-conjugated anti-CD3, CD4, CD8, CD10, CD20, CD11b, CD14, and CD235a (Immunotech), (b) FITC-conjugated anti-CD3, CD4 and V δ 2 (Immunotech), (c) PE-conjugated anti-TCRpan α/β , CD16 and CD56 (Immunotech), and

(d) allophycocyanin-conjugated anti-CD34 (BD Biosciences). Non-viable cells were excluded by propidium iodide staining (MBL, Nagoya, Japan). Isotype-matched control Abs determined backgrounds. Second sorting avoided contaminations. Flow-cytometric data were analyzed with FlowJo software (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA). More than 99.9% of purity was confirmed by re-analysis.

3.3. Real-time polymerase chain reaction (PCR) for EBV DNA

TaqMan real-time PCR for EBV DNA was performed as described previously.⁵ Gene dosages were analyzed by ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). DNA was mixed with TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), primers, and TaqMan probe. PCR conditions were 50 °C for 2 min and 95 °C for 10 min, followed by 50 cycles at 95 °C for 15 s, and 60 °C for 1 min. EBV-seropositive healthy persons show <200 copies EBV/ml and <40 copies EBV/μgDNA in PB and MNCs, respectively.

3.4. Southern blotting for EBV-TR or TCR/immunoglobulin (Ig) genes

Blotting analyses were performed by the established protocols.¹⁴ Briefly, 5 μg of high molecular weight DNA were digested with EcoRI and/or BamHI, and were electrophoresed on 0.9% agarose gels. DNA was transferred to Byodine-B membranes (Pall Life Sciences, Ann Arbor, MI, USA) and hybridized with ³²P-labeled probe of a 5.2-kb BamHI–EcoRI fragment containing the EBV-TR sequence, TCR genes (Cβ1, Jβ1, Jβ2, and Jγ) and IgH gene (JH). Normal control DNA was extracted from MNC of healthy EBV-seropositive adults.

3.5. Sequencing of TCRδ and TCRγ gene rearrangements

Genomic DNA was extracted from γδT-cells by conventional methods. Direct sequencing of PCR product of N-regions was completed for TCRδ-gene and TCRγ-gene. The exon and exon-intron boundary regions of each gene were amplified by PCR, and the products were then subjected to direct sequencing using BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and 3130xl Genetic Analyzer (Life Technologies Corp., CA, USA).

3.6. Double staining for EBV and lymphocyte markers

Double staining of BM clot samples was performed by *in situ* hybridization for EBER and immunostaining for lymphocyte marker to detect EBV-infected cells.¹⁵ Briefly, sections were de-waxed, dehydrated and then treated with proteinase-K. The sections were hybridized with FITC-conjugated EBER probe (Dako, Copenhagen, Denmark). EBER positivity was detected by the combination with anti-FITC Abs, ChemMateENVISION (horseradish peroxidase-labeled polymer reagent, Dako), and diaminobenzidine substrate kit (Dako). The same slide was stained with either Abs against CD34 or each lymphocyte marker to search for EBER⁺CD34⁺BM cells.

4. Results

4.1. Target cells and clinical phenotype of patients

4.1.1. T-cell type

Patient-1 had fever and skin lesions. CD4⁺CD8⁻γδT-cells increased to 30% of PB-MNC, exclusively expressing Vδ2/Vγ9 (Fig. 1). PCR products amplified by Vδ2/Vγ9 primers indicated clonal proliferation of Vδ2/Vγ9 T-cells. Sequencing of Vγ9-JγP1 transcripts determined an N-region sequence (Table 2). γδT-cells and αβT-cells had 4 × 10⁵ and 4 × 10³ copies EBV/μgDNA, respectively. Southern blotting using MNC showed rearranged TCRγ

Table 2
Nucleotide sequence of Vγ9-JγP1 junctional transcripts expressed by γδT-cells.

	Vγ9	N region	JγP1
Germiline	ATT CCG TCA GCC *TAC	TGT GCC TTG TGG GAG GTG	ACCACTGGT TGG ATC
Pt		TGT GCC TTG TGG GAG GTG C A L W E V Q	ACCACTGGT TGG TTC AAG ATA TTT GCT GAA GGG ACT AAG

The germiline sequences of the 3' end of Vγ9, N region, and the 5' end of JγP1 gene segments are at the top. N region, and the 5' end of JγP1 gene segments are at the top.

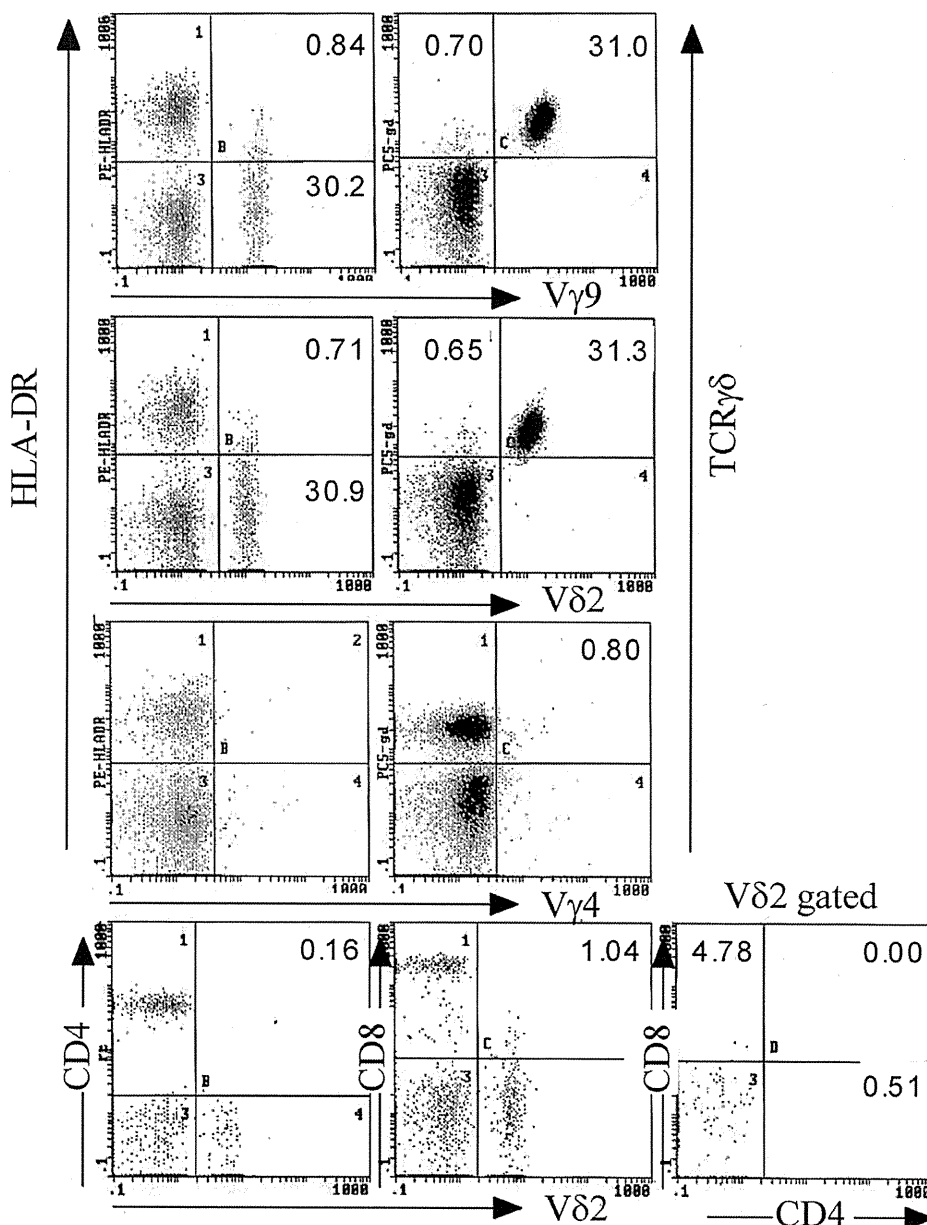


Fig. 1. A representative flow-cytometric analysis of lymphocytes in Patient-1. TCR $\gamma\delta$ cells increased to ~30% of peripheral blood lymphocytes, exclusively expressing V γ 9/V δ 2, but with only a negligible expression of HLA-DR. V γ 4⁺ or V δ 3⁺ cells were <1% of lymphocytes. More than 99% of V δ 2⁺ lymphocytes were CD4⁺CD8⁻ T-cells.

genes. EBV⁺V δ 2/V γ 9 T-cells have been sustained in this patient for 6 years after diagnosis. Patient-2 suffered hydroa vacciniforme characterized by cutaneous disease often associated with photosensitivity and HMB. CD3⁺T-cells, CD8⁺T-cells and NK-cells carried 2×10^5 , 5×10^3 and 9×10^3 copies EBV/ μ gDNA, respectively. It indirectly indicated a higher percentage of EBV⁺CD4⁺T-cells. She received a sibling donor SCT at 25 years of age for cutaneous lymphoma (EBER⁺CD4⁺T-cells and NK-cells). Patient-3 had fever and hepatitis. CD4⁺T-cells, CD8⁺T-cells and NK-cells had 3×10^4 , 90 and <40 copies EBV/ μ gDNA, respectively. He received a sibling donor BMT.

4.1.2. NK-cell type

Patient-4 showed skin and enteral infiltrations with EBV⁺NK-cells. CD4⁺T-cells, CD8⁺T-cells and NK-cells carried 2×10^3 , 1×10^3 , and 4×10^5 copies EBV/ μ gDNA, respectively. She attained EBV-free

remission after cord blood transplantation. Patient-5 had fever and HMB. T-cells and NK-cells carried 3×10^4 and 8×10^5 copies EBV/ μ gDNA, respectively. Low-dose prednisolone has controlled skin infiltrations with EBER⁺CD4⁺T-cells. Patient-6 showed fever and HMB. CD4⁺T-cells, CD8⁺T-cells and NK-cells had 8×10^3 , 4×10^4 , and 4×10^5 copies EBV/ μ gDNA, respectively.

4.2. Clonality of EBV-infected subsets

The clonotype of EBV in purified cells was assessed by the TR size. The blotting sensitivity was determined to be at least 5% EBV-infected cells as determined by add-back experiments. Blot hybridization analysis of EBV-TR sequences using MNC showed a single band in Patient-1. $\alpha\beta$ T-cells (>99.9%) showed an equal-sized TR to that of $\gamma\delta$ T-cells in Patient-1 in *Eco*RI or *Bam*HI digestion (Fig. 2). Patient-2 showed a single band in NK-cells, although

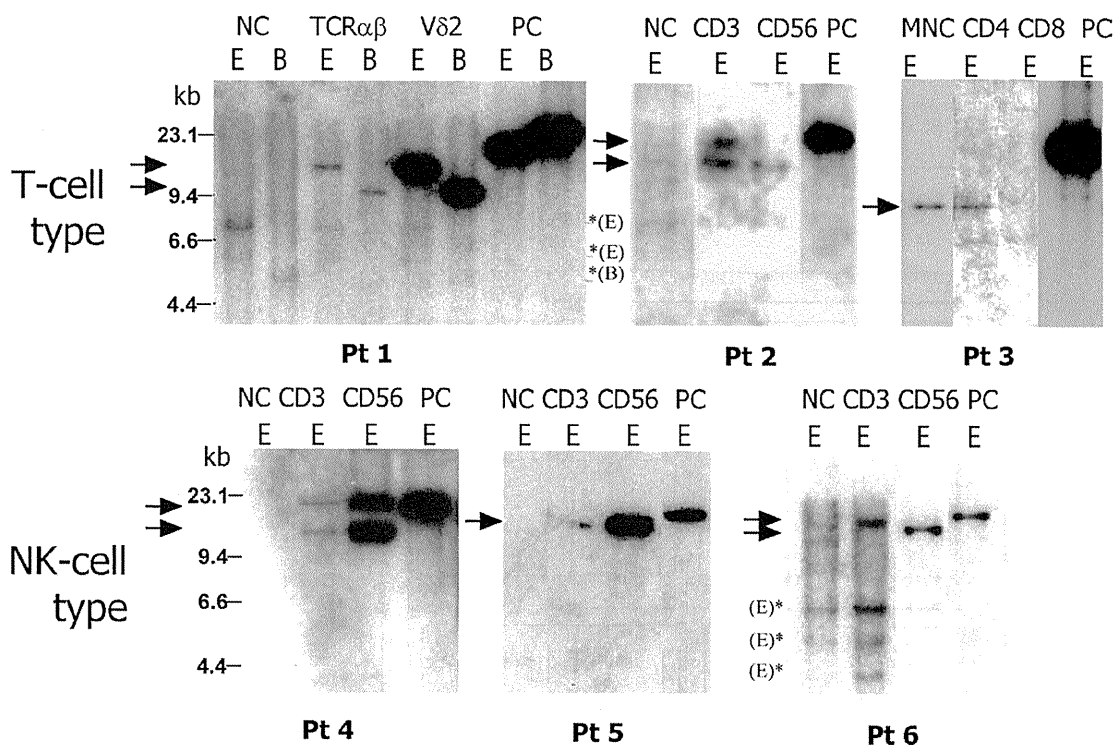


Fig. 2. Southern blotting analysis of high molecular DNA obtained from highly purified cell fractions (>99.5%) probed with EBV-terminal repeated (TR) sequence. TCR $\alpha\beta$ ⁺ cells and V δ 2⁺ cells in Patient (Pt)-1, and CD3⁺ cells and CD56⁺ cells in Pt-6 showed >99.9% of purity. EcoRI (E) or BamHI (B)-digested DNA was separated by electrophoresis (2–5 μ g/lane) and hybridized with a ³²P-labeled 5.2-kb BamHI–EcoRI fragment containing the TR repeat sequences. The blotting sensitivity was determined to be at least 0.5% contamination of EBV-infected cells. Arrow, a clonal band. *Non-specific band in each digestion. NC: normal control of EBV-seropositive healthy adult lymphocytes, PC: positive control of Raji cell lines.

CD4⁺T-cells were the major target. A TR band in NK-cells of Patient-2 was the same size as one of biconal bands in CD3⁺T-cells. Patient-3 showed a single TR band in CD4⁺T-cells but not CD8⁺T-cells.

Clonal TR bands were detected in CD3⁺T-cells (>99.5%) of all patients with NK-cell LPD. Blotting analysis of EBV-TR using MNC showed biconal bands in Patient-4. TR(s) in CD3⁺T-cells of Patient-4 (biconal) and Patient-5 (monoclonal) were the same size as those in NK-cells of the same patients. On the other hand, CD3⁺T-cells (>99.9%) from Patient-6 had a larger TR band than NK-cells (>99.9%) (Fig. 2), although the blotting using MNC showed the same sized band as NK-cells.

4.3. EBV load in BM CD34⁺ cells

Virus loads were re-quantified using highly purified subsets from PB and BM cells to further assess the origin of EBV-infection. EBV DNA was not detectable in BM-derived lin[−]CD34⁺ cells of any 5 patients studied, nor in seropositive controls (Fig. 3). EBV was not detected in CD34⁺ cells by the double staining of EBER *in situ* hybridization and immunohistochemistry for BM samples (Fig. 4).

5. Discussion

The current study found that EBV⁺T/NK-cells clonally proliferated in various subsets of patients. EBV clonotype, as determined by EBV TR size, in the minor subsets notably coincided with that in the major subsets of infection. On the other hand, BM CD34⁺ cells carried no EBV. These data suggest that EBV can infect lymphocytes having differentiation ability, that then clonally distribute to T/NK-cells, but not involve infection of CD34⁺ hematopoietic stem cells (HSCs).

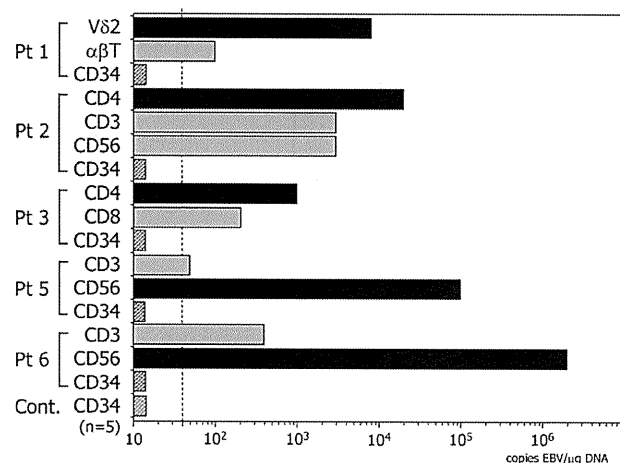


Fig. 3. Quantification of EBV DNA in highly purified cell fractions (>99.9%) obtained from patients assessed by real-time PCR. High molecular DNA was extracted from V δ 2, $\alpha\beta$ T, CD4, CD3, and CD56-expressing cells fractionated from peripheral blood, and CD34⁺ cells (hatched bar) obtained from bone marrow cells. Solid bars represent the major infected subsets with high EBV load (black bar), and the minor infected subsets with low EBV load (gray bar). EBV-seropositive healthy carriers or patients with immune thrombocytopenic purpura were used as controls.

It remains controversial in regard to whether CAEBV is an infection or clonal disease. EBER⁺T-cells and NK-cells can be found in the tonsils of acute IM patients.¹⁶ EBV-shedding T/NK-cell lines were established from CAEBV patients.^{17,18} Excessive activation of lytic virus may raise the chance of ectopic infection. While cytotoxic CD8⁺T-cells clonally expand in IM patients,¹⁹ non-CD8⁺T-cells were infected and clonally proliferated in our patients. PB $\gamma\delta$ T-cells

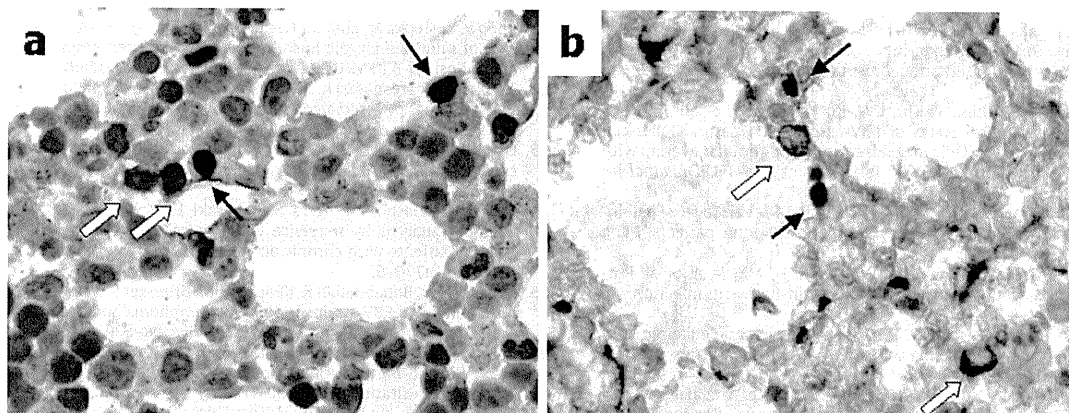


Fig. 4. Immunohistochemical staining of bone marrow (BM) cells obtained from Patient-5 (a) and Patient-6 (b). BM clot samples were stained with anti-CD34 antibody using fuchsin as a chromogen for visualization of alkaline phosphatase activity (positive: red cytosol, open arrow), and were then employed for *in situ* hybridization of EBV using diaminobenzidine as a chromogen of peroxidase (positive: brown nucleus, closed arrow). There were no double positive cells for CD34 and EBV in BM cells. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

consist of polyclonal $V\delta 2/V\gamma 9^+$ T-cells in healthy persons. This subset was clonally infected with EBV in Patient-1. Toyabe et al.²⁰ reported that a CAEBV patient with biclonal expansion of $V\beta 7^+$ and $V\beta 9^+$ cells in PB $CD4^+$ T-cells. Both clones were infected with EBV strain that was indistinguishable from each other. Endo et al.²¹ analyzed EBV clonotype in 2 CAEBV patients having biphenotypic expansions of $CD4^+$ and $CD8^+$ T-cells. Both subsets carried a TR band with the same size. Germinal center EBV⁺B-cells could evolve LPD.²² Diverse T/NK-cell infection in this line might not represent spreading lytic viruses, but differentiation and expansion of T/NK-cell clones with latent episome. An alternative explanation is integration of the EBV gene into the host genome.²³ EBV latent genes are expressed in heterogeneous and restricted patterns in CAEBV patients.²⁴ Specific integration of EBV gene rarely occurs in transformed cells. Taken together, EBV could infect T/NK-cells at differentiating stages, and these cells proliferate and enter the circulation. Multiple EBV strains affect EBV-associated tumors in a single host.²⁵ Site specific clonality should be investigated to understand EBV⁺T/NK-cell LPD.

The major concern is how clonal EBV⁺T/NK-cells are allowed to proliferate in patients. EBV⁺B-cell LPD arises in X-linked LPD patients. A Caucasian patient with B-cell type CAEBV had defective cytotoxicity due to *PRF1* mutations.²⁶ Although cytotoxic defects are implicated in CAEBV patients,²⁷ EBV-infected T/NK-cells may have altered cytotoxicity. Neither a genetic defect nor familial occurrence has been identified in T/NK-cell type CAEBV or EBV-HLH.^{28,29} The end-to-end length of fused TR itself may drive the clonal selection of EBV-infected cells as an oncogenic component during primary infection.³⁰

This study demonstrated that BM $CD34^+$ cells were not a niche of EBV infection. Human immunodeficiency virus (HIV)-infected $CD34^+$ HSCs were detected in HIV-positive patients.³¹ HTLV-1 or HHV8 infects $CD34^+$ HSCs.³² Primitive HSCs are resistant to HIV infection, although these cells become increasingly susceptible once they begin to differentiate into committed HSCs.³³ EBV might not infect BM, but infect peripheral or thymic $CD34^+CD4-CD8-$ T-cell precursors (DN1/2) prior to the differentiation into $\alpha\beta$ T-cells and $\gamma\delta$ T-cells. Dormant $CD34^+$ cells may be protected from infection or eliminated after infection. The curative SCT for clonal disease of EBV⁺T/NK-cell progenitors could be explained by the eradication of EBV-infected hematopoietic cells and the reset of virus-specific immunity. Further study on the origin of EBV⁺T/NK-cells may therefore shed some light on the pathogenesis and specific therapy of EBV-associated T/NK-cell LPD/lymphoma.

Conflict of interest

There are no conflicts of interest.

Ethical approval

The genetic study was approved by the ethics committee of Kyushu University, Japan (No. 45).

Acknowledgments

We thank to Drs. Shima T. (Kyushu Univ., Fukuoka, Japan), Wada M. (Otsuka Assay Lab., Tokyo, Japan), and Yamamori S. (Mitsubishi Chem. Med. Corp, Tokyo, Japan) for the quality control of experiments. We thank Dr. Brian Thomas Quinn (Associate Professor, Department of Linguistic Environment, Faculty of Languages and Cultures, Kyushu University) for kindly correcting the manuscript. This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (C2: 60233053) to Ohga S. from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

References

- Ohga S, Nomura A, Takada H, Hara T. Epstein-Barr virus associated diseases in childhood. Immunological aspects of Epstein-Barr virus infection. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002;**44**(3):203–15.
- Kimura H, Hoshino Y, Hara S, Sugaya N, Kawada J, Shibata Y, et al. Differences between T cell-type and natural killer cell-type chronic active Epstein-Barr virus infection. *J Infect Dis* 2005;**191**(4):531–9.
- Ohga S, Sanefuji M, Ishimura M, Nomura A, Torisu H, Kira R, et al. Epstein-Barr virus load in cerebrospinal fluid of patients with chronic active Epstein-Barr virus infection. *Pediatr Infect Dis J* 2008;**27**(11):1027–30.
- Kasahara Y, Yachie A, Takei K, Kanegane C, Okada K, Ohta K, et al. Differential cellular targets of Epstein-Barr virus (EBV) infection between acute EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis and chronic active EBV infection. *Blood* 2001;**98**(6):1882–8.
- Ohga S, Nomura A, Takada H, Ihara K, Kawakami K, Yanai F, et al. Epstein-Barr virus (EBV) load and cytokine gene expression in activated T cells of chronic active EBV infection. *J Infect Dis* 2001;**183**(1):1–7.
- Suzuki K, Ohshima K, Karube K, Suzumiya J, Ohga S, Ishihara S, et al. Clinicopathological states of Epstein-Barr virus-associated T/NK-cell lymphoproliferative disorders (severe chronic active EBV infection) of children and young adults. *Int J Oncol* 2004;**24**(5):1165–74.
- Sato E, Ohga S, Kuroda H, Yoshida F, Nishimura M, Nagasawa M, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for Epstein-Barr virus-associated T/natural killer-cell lymphoproliferative disease in Japan. *Am J Hematol* 2008;**83**(9):721–7.
- Quintanilla-Martinez L, Kimura H, Jaffe ES. EBV-positive T-cell lymphoproliferative disorders of childhood. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al., editors. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2008. p. 278–91.

9. Cohen JI, Kimura H, Nakamura S, Ko YH, Jaffe ES. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease in non-immunocompromised hosts: a status report and summary of an international meeting, 8–9 September 2008. *Ann Oncol* 2009;**20**(9):1472–82.
10. Ohshima K, Kimura H, Yoshino T, Kim CW, Ko YH, Lee SS, et al. Proposed categorization of pathological states of EBV-associated T/natural killer-cell lymphoproliferative disorder (LPD) in children and young adults: overlap with chronic active EBV infection and infantile fulminant EBV T-LPD. *Pathol Int* 2008;**58**(4):209–17.
11. Elazary AS, Wolf DG, Amir G, Avni B, Rund D, Yehuda DB, et al. Severe Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic syndrome in six adult patients. *J Clin Virol* 2007;**40**(2):156–9.
12. Okano M, Kawa K, Kimura H, Yachie A, Wakiguchi H, Maeda A, et al. Proposed guidelines for diagnosing chronic active Epstein-Barr virus infection. *Am J Hematol* 2005;**80**(1):64–9.
13. Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. AML1/ETO-expressing nonleukemic stem cells in acute myelogenous leukemia with 8;21 chromosomal translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**(13):7521–6.
14. Ohga S, Kimura N, Takada H, Nagano M, Ohshima K, Nomura A, et al. Restricted diversification of T-cells in chronic active Epstein-Barr virus infection: potential inclination to T-lymphoproliferative disease. *Am J Hematol* 1999;**61**(1):26–33.
15. Ohshima K, Karube K, Hamasaki M, Tutiya T, Yamaguchi T, Suefuji H, et al. Differential chemokine, chemokine receptor and cytokine expression in Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative diseases. *Leuk Lymphoma* 2003;**44**(8):1367–78.
16. Hudnall SD, Ge Y, Wei L, Yang NP, Wang HQ, Chen T. Distribution and phenotype of Epstein-Barr virus-infected cells in human pharyngeal tonsils. *Mod Pathol* 2005;**18**(4):519–27.
17. Imai S, Sugiura M, Oikawa O, Koizumi S, Hirao M, Kimura H, et al. Epstein-Barr virus (EBV)-carrying and -expressing T-cell lines established from severe chronic active EBV infection. *Blood* 1996;**87**(4):1446–57.
18. Oyoshi MK, Nagata H, Kimura N, Zhang Y, Demachi A, Hara T, et al. Preferential expansion of V γ 9-J γ P/V δ 2-J δ 3 $\gamma\delta$ T cells in nasal T-cell lymphoma and chronic active Epstein-Barr virus infection. *Am J Pathol* 2003;**162**(5):1629–38.
19. Maini MK, Gudgeon N, Wedderburn LR, Rickinson AB, Beverley PC. Clonal expansions in acute EBV infection are detectable in the CD8 and not the CD4 subset and persist with a variable CD45 phenotype. *J Immunol* 2000;**165**(10):5729–37.
20. Toyabe S, Harada W, Uchiyama M. Biclinal expansion of T cells infected with monoclonal Epstein-Barr virus (EBV) in a patient with chronic, active EBV infection. *Clin Exp Immunol* 2003;**134**(1):92–7.
21. Endo R, Yoshioka M, Ebihara T, Ishiguro N, Kikuta H, Kobayashi K. Clonal expansion of multiphenotypic Epstein-Barr virus-infected lymphocytes in chronic active Epstein-Barr virus infection. *Med Hypotheses* 2004;**63**(4):582–7.
22. Takakuwa T, Tresnasari K, Rahadiani N, Miwa H, Daibata M, Aozasa K. Cell origin of pyothorax-associated lymphoma: a lymphoma strongly associated with Epstein-Barr virus infection. *Leukemia* 2008;**22**(3):620–7.
23. Gao J, Luo X, Tang K, Li X, Li G. Epstein-Barr virus integrates frequently into chromosome 4q, 2q, 1q and 7q of Burkitt's lymphoma cell line (Raji). *J Virol Methods* 2006;**136**(1–2):193–9.
24. Shibata Y, Hoshino Y, Hara S, Yagasaki H, Kojima S, Nishiyama Y, et al. Clonality analysis by sequence variation of the latent membrane protein 1 gene in patients with chronic active Epstein-Barr virus infection. *J Med Virol* 2006;**78**(6):770–9.
25. Rey J, Xerri L, Bouabdallah R, Keuppens M, Brousset P, Meggetto F. Detection of different clonal EBV strains in Hodgkin lymphoma and nasopharyngeal carcinoma tissues from the same patient. *Br J Haematol* 2008;**142**(1):79–81.
26. Katano H, Ali MA, Patera AC, Catalfamo M, Jaffe ES, Kimura H, et al. Chronic active Epstein-Barr virus infection associated with mutations in perforin that impair its maturation. *Blood* 2004;**103**(4):1244–52.
27. Tsuge I, Morishima T, Kimura H, Kuzushima K, Matsuoka H. Impaired cytotoxic T lymphocyte response to Epstein-Barr virus-infected NK cells in patients with severe chronic active EBV infection. *J Med Virol* 2001;**64**(2):141–8.
28. Ma X, Okamura A, Yosioka M, Ishiguro N, Kikuta H, Kobayashi K. No mutations of SAP/SH2D1A/DSHP and perforin genes in patients with Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic syndrome in Japan. *J Med Virol* 2001;**65**(2):358–61.
29. Lee WI, Chen SH, Hung IJ, Yang CP, Jaing TH, Chen CJ, et al. Clinical aspects, immunologic assessment, and genetic analysis in Taiwanese children with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Infect Dis J* 2009;**28**(1):30–4.
30. Repic AM, Shi M, Scott RS, Sixbey JW. Augmented latent membrane protein 1 expression from Epstein-Barr virus episomes with minimal terminal repeats. *J Virol* 2010;**84**(5):2236–44.
31. Alexaki A, Liu Y, Wigdahl B. Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence. *Curr HIV Res* 2008;**6**(5):388–400.
32. Banerjee P, Sieburg M, Samuelson E, Feuer G. Human T-cell lymphotropic virus type 1 infection of CD34+ hematopoietic progenitor cells induces cell cycle arrest by modulation of p21(cip1/waf1) and survivin. *Stem Cells* 2008;**26**(12):3047–58.
33. Alexaki A, Wigdahl B. HIV-1 infection of bone marrow hematopoietic progenitor cells and their role in trafficking and viral dissemination. *PLoS Pathol* 2008;**4**(12):e1000215.