

20112804/A

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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 藤原成悦

平成 24 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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 藤原成悦

平成 24 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. 慢性活動性 EB ウイルス感染症における炎症性サイトカインの動態解析 及び骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植の有効性に関する研究 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 の臨床応用に関する研究 木村宏	15
3. 慢性活動性 EB ウイルス感染症における EBV 感染 T/NK 細胞のクローン解析 清水則夫	21
4. 慢性活動性 EB ウイルス感染症の遺伝的素因に関する研究 森尾友宏	27
5. 慢性活動性 EB ウイルス感染症の全国調査 (2005～2010 年) 脇口宏	31
6. CAEBV モデルマウスの開発と応用 藤原成悦	37
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	43
IV. 研究成果の刊行物・別刷	47

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総括研究報告書

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 ①慢性活動性 EB ウイルス (EBV) 感染症 (CAEBV) 成人例に対する骨髄非破壊的造血幹細胞移植の有効性を検討し、病勢が非活動性の症例に対しては良好な結果を得た。②CAEBV 患者血清中に健常者と比べて高濃度の TNF- α 、ING- γ 、IL-6 を検出した。また、ING- γ と IL-6 に対する抗体は、EBV 感染 T/NK 細胞の VP-16 によるアポトーシスを促進した。③高感度特異的 EBV 感染細胞を主に用いて診断した EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患患者 108 例に対して臨床・病理・ウイルス学的な前方視的解析を行い、EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患の診断と治療介入決定に有用な知見を得た。④一人の CAEBV 患者から多数の EBV 感染 T 細胞株を樹立して解析したところ、CD4+CD8-TCR $\alpha\beta$ +, CD4-CD8+ TCR $\alpha\beta$ +, CD4-CD8-TCR $\gamma\delta$ + の 3 種類のクローンが同定された。これらの 3 クローンは、EBV 末端繰り返し配列の解析により一つの EBV 感染細胞に由来するクローンであることが分かったため、TCR リアレンジメントが起きる以前の未熟 T 細胞に EBV が感染し、後に上記の 3 クローンに分化したと推測された。⑤CAEBV の類縁疾患である EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症 (EBV-HLH) の患者末梢血単核細胞を NOG マウスに移植し、EBV 感染 T 細胞の全身性の増殖、高サイトカイン血症などの病態を再現するモデルマウスを作成した。⑥アンケート調査により、CAEBV の治療として造血幹細胞移植を行う例が増加し、それに伴い死亡率が低下傾向にあることが示唆された。⑦先天性免疫不全症を背景に発症した CAEBV 症例にエクソーム解析を行い、有力な原因遺伝子候補を同定した。

研究分担者：

新井文子；東京医科歯科大学大学院血液
内科学・講師

木村宏；名古屋大学大学院ウイルス学分
野・准教授

清水則夫；東京医科歯科大学難治疾患研
究所・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

慢性活動性 EB ウイルス (EBV) 感染症 (CAEBV) は EBV 感染 T 或いは NK 細胞の増殖を特徴とし、持続或いは再発を繰り返す伝染性単核症様症状を呈する。診断には EBV 感染細胞の正確な同定が必要とされ、造血幹細胞移植以外に根治的治療法はない。本研究では CAEBV の診断法及び治療法の確立を最終目標とし、アンケート調査による治療実態の解明、患者における病態の詳細な解析、モデルマウス作成による病態解析、骨髄非破壊

的造血幹細胞移植の検討、発症の遺伝的背景の探索など多角的な研究を進めた。

B. 研究方法

1. CAEBV 成人例に対する骨髄非破壊的造血幹細胞移植

2009年から2011年の間に、東京医科歯科大学附属病院において骨髄非破壊的造血幹細胞移植を受けた7症例を後方視的に解析した。年齢は20歳から62歳。女性5例、男性2例。前処置は、3例がFlu+Mel+TBI、4例がFlu+Mel+ATGであった。

2. CAEBV における炎症性サイトカインの動態解析と治療への応用の検討

2009年から2011年の間に、東京医科歯科大学附属病院において骨髄非破壊的造血幹細胞移植を受けたCAEBVの7症例を後方視的に解析した。

3. CAEBV 患者由来EBV感染T細胞のクローン解析

患者は19歳男性、3歳時、蚊刺過敏症を発症した。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培養液に700IU/ml rIL-2と10%非動化ヒト血清を添加して用いた。

4. CAEBV の治療法、予後等に関するアンケート調査

小児科、皮膚科、内科、耳鼻咽喉科を対象に、約2000の診療科にアンケート調査票を郵送し、CAEBVの臨床症状、検査成績、病態、経過、治療内容、予後について調査した。

5. EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症 (EBV-HLH) モデルマウスの作成と解析

NOGマウスにEBV-HLH患者由来末梢血単核細胞 ($1 \sim 4 \times 10^5$ cells) を静脈内接

種した。接種後末梢血EBV DNAレベルをモニターするとともに一般状態を観察し、8~12週後に安楽死させ、ウイルス学的・病理学的解析を加えた。

6. 先天性免疫不全症を背景に発症したCAEBV 症例における責任遺伝子の探索

患者検体から得たDNAをGenomiPhiを用いて増幅し、断片化後、全エクソンをAgilentのsureselectを用いて捕捉し、Illumina HiSeq2000を用いてwhole exome解析を行った。

(倫理面への配慮)

CAEBV患者由来ヒト細胞を利用する研究は、ヘルシンキ宣言に則った倫理的配慮をもって行った。患者本人あるいは保護者に対して、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、患者の個人情報情報は厳重に管理された。骨髄非破壊的造血幹細胞移植に関する探索的臨床研究は、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。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と実験動物委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1. CAEBV 成人例に対する骨髄非破壊的造血幹細胞移植の有効性の検討

移植時の病勢が非活動性であった5例は、移植後6~39ヶ月で全例寛解した。一方活動性であった2例(1例は発熱、1例は皮膚および筋への浸潤の進行)は、

それぞれ敗血症、病気進行で移植後 12 日、46 日に死亡した。前処置として抗 T リンパ球抗体(ATG) を投与した 3 例は全例、移植後に EBV 関連 B リンパ増殖性疾患を発症したが、Rituximab により寛解した。

2. CAEBV における炎症性サイトカインの動態解析と治療への応用の検討

CAEBV 患者では、健常者と比べて血清中 TNF- α 、ING- γ 、IL-6 濃度が有意に高かった。また、ヒト T 細胞株に EBV を感染させると TNF- α 産生が亢進した。さらに、In vitro で EBV 感染 T、NK 細胞を抗 TNF- α 抗体 infliximab および抗 IL-6 抗体 tocilizumab で処理すると VP-16 の apoptosis 誘導作用が相乗的に亢進した。

3. EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患に関する前方視的な臨床・病理・ウイルス学的解析

名古屋大学医学部で診断した EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患 108 例を対象として前方視的解析を行った。患者の発症年齢は 1 歳から 50 歳で (中央値 8 歳)、64 例が T 細胞に、44 例が NK 細胞に感染していた。臨床的には、慢性活動性 EBV 感染症 80 例、EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症 15 例、蚊刺過敏症 9 例、種痘様水疱症 4 例に分けられた。これらの臨床型別は EBV 感染細胞のフェノタイプと極めて密接に関連しており、CAEBV では主に CD4+T 細胞或いは NK 細胞、EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症では主に CD8+T 細胞、蚊刺過敏症では主に NK 細胞、種痘様水疱症では主に $\gamma\delta$ T 細胞に感染していた。観察期間中 47 例が臓器合併症などで死亡し、13 例は明白な白血病/リンパ腫に進展した。59 例が造血幹細胞移植を受け、そのうち 66% が生存していた。8 歳以上の発症、肝障害が生命予後不良因子

であり、移植を受けた患者は生命予後がよかった。また、移植時の年齢および疾病の活動性が低い患者の生存率が有意に高かった。

4. CAEBV 患者由来 EBV 感染 T 細胞のクローン解析

計 18 クローンが樹立され、細胞表面マーカー解析から、①CD3/CD4/TCR $\alpha\beta$ 陽性、CD8/CD19/TCR $\gamma\delta$ 陰性、②CD3/CD8/TCR $\alpha\beta$ 陽性、CD4/CD19/TCR $\gamma\delta$ 陰性の $\alpha\beta$ T 細胞系の細胞 2 種と③CD3/TCR $\gamma\delta$ 陽性、CD4/CD8/CD19/TCR $\alpha\beta$ 陰性の $\gamma\delta$ T 細胞系の細胞の 3 群に大別された。TCR 遺伝子の解析結果は上記の TCR 発現解析結果と一致していた。EBV の末端繰り返し配列の解析からは、これらの 3 クローンが単一細胞に由来する、すなわち同一のクローンであることが強く示唆された。

5. CAEBV の治療法、予後等に関するアンケート調査

2005~2010 年度の死亡率は 32% (21/65) であり、2001~2004 年度 (48%) と比較して低下する傾向にあった。造血幹細胞移植が行われたのは 59% (39/66) であり、2001~2004 年度の 35% (16/46) と比較して増加していた。移植の方法としては、骨髄非破壊的前処置によるいわゆるミニ移植が多く施行されていた。

6. EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症 (EBV-HLH) モデルマウスの作成と解析

EBV-HLH 患者末梢血単核細胞移植後の NOG マウスでは、EBV 感染 CD8⁺ T 細胞が増殖し、IFN- γ 、IL-8、RANTES などの高サイトカイン血症が引き起こされた。この EBV-HLH モデルマウスを前年度までに作成した CAEBV モデルマウスと比較すると、EBV 感染細胞の増殖が早く急

激に重篤な状態に陥ること、血中サイトカインレベルがより高いこと、出血性病変が胸腔や腹腔に認められること、脾臓と肝臓でEBV感染B細胞が認められること、等の違いが認められた。

7. 先天性免疫不全症を背景に発症したCAEBV症例における責任遺伝子の探索

先天性免疫不全症を背景に発症した2名の患者において、NKT細胞の減少が観察された。また、1名は低身長や汎血球減少を呈しており、何らかのDNA損傷修復異常症を基盤としている可能性が示唆された。これらの患者のエクソーム解析から、1名において有意と思われる変異を確定した。

D. 考察

CAEBV成人例に対して骨髄非破壊的造血幹細胞移植が有効であったが、病勢がコントロールされた状態での移植が望ましいと考えられた。抗ING- γ 抗体及び抗IL-6抗体によりVP-16のアポトーシス誘導作用が亢進したことから、これらの抗体とVP-16の併用療法が有効である可能性が考えられた。

EBV関連T/NKリンパ増殖性疾患に関する前方視的な臨床・病理・ウイルス学的解析から得られた知見は、EBV関連T/NKリンパ増殖性疾患の診断・治療介入決定に有用であるのみならず、本症の発症病理への理解を深め、将来的な疾患分類の制定にも役立つと考えられる。

CAEBV患者由来EBV感染T細胞のクローン解析の結果は、EBVがTCR遺伝子リアレンジメントが起きる以前の未熟T細胞に感染し、その後CD4+CD8-TCR $\alpha\beta$ +、CD4-CD8+ TCR $\alpha\beta$ +、CD4-CD8-TCR $\gamma\delta$ +の3種類のクローンに分化したことを強

く示唆する。未熟T細胞への感染がCAEBVの発症の過程で重要なステップとなる可能性が考えられた。

CAEBVに関するアンケート調査の結果から、2005~2010年度には死亡率が2001~2004年度と比較して低下していることが示唆された。これは、移植を受けた患者の増加と関連することが推測された。その一方で、移植未施行でも軽症のまま長期生存する症例も存在するため、このような軽症例に対する移植の適応やタイミングの決定が今後の課題と考えられた。また、近年は内科医により診断される成人例CAEBVが増加する傾向にあり、内科医における疾患認知度が向上した結果と考えられた。成人例の治療プロトコールを小児例と差別化する必要があるかどうかは、今後検討する必要があると考えられた。

EBV-HLHモデルマウスには出血性病変など、幾つかの特徴的な病態が再現されていた。今後EBV-HLHおよびCAEBVモデルマウスの比較により、両者の正確な病態の比較に基づく疾患概念の整理が可能になることが期待される。

先天性免疫不全症を背景として発症したCAEBVにおいて有力な責任遺伝子候補が同定された。今後この遺伝子のCAEBV発症における役割を詳細に解析する計画である。また、免疫不全症と合併しないCAEBV症例についても同様のエクソーム解析を行う予定である。

E. 結論

①CAEBV成人例に対する骨髄非破壊的造血幹細胞移植の有効性を検討し、病勢が非活動性の症例に対しては良好な結果を得た。②CAEBV患者血清中に健常者と比べて高濃度のTNF- α 、ING- γ 、IL-6を検出した。

また、ING- γ とIL-6に対する抗体は、EBV感染T/NK細胞のVP-16によるアポトーシスを促進した。③高感度特異的EBV感染細胞を主に用いて診断したEBV関連T/NKリンパ増殖性疾患患者108例に対して臨床・病理・ウイルス学的な前方視的解析を行い、EBV関連T/NKリンパ増殖性疾患の診断と治療介入決定に有用な知見を得た。④一人のCAEBV患者から多数のEBV感染T細胞株を樹立して解析したところ、CD4+CD8-TCR $\alpha\beta$ +、CD4-CD8+TCR $\alpha\beta$ +、CD4-CD8-TCR $\gamma\delta$ +の3種類のクローンが同定された。これらの3クローンは、EBV末端繰り返し配列の解析により一つのEBV感染細胞に由来するクローンであることが分かったため、TCRリアレンジメントが起きる以前の未熟T細胞にEBVが感染し、後に上記の3クローンに分化したと推測された。⑤CAEBVの類縁疾患であるEBV-HLHの患者末梢血単核細胞をNOGマウスに移植し、EBV感染T細胞の全身性の増殖、高サイトカイン血症などの病態を再現するモデルマウスを作成した。⑥アンケート調査により、CAEBVの治療として造血幹細胞移植を行う例が増加し、それに伴い死亡率が低下傾向にあることが示唆された。⑦先天性免疫不全症を背景に発症したCAEBV症例にエクソーム解析を行い、有力な原因遺伝子候補を同定した。

F. 健康危機情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nomura K, Kanegane H, Otsubo K, Wakiguchi H, Noda Y, Kasahara Y, Miyawaki T.: Autoimmune lymphoproliferative syndrome mimicking chronic active Epstein-Barr virus infection. *International Journal of Hematology*, 93, 760-764, 2011.
- 2) Kunitomi A, Kimura H, Ito Y, Naitoh K, Noda N, Iida H, Sao H. Unrelated bone marrow transplantation induced long-term remission in a patient with life-threatening Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Clin Exp Hematop* 51:57-61, 2011
- 3) 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* 129: 2263-2273, 2011
- 4) Nakamura M, Iwata S, Kimura H, Tokura Y. Elevated expression of activation-induced cytidine deaminase in T and NK cells from patients with chronic active Epstein-Barr virus infection. *Eur J Dermatol* 21: 780-2, 2011
- 5) Ukeba-Terashita Y, Saita Y, Ito Y, Kanegane H, Kimura H, Kobayashi I. Chronological changes in Epstein-Barr virus genome and subsets of peripheral mononuclear cells in a case of HLH. *Open Journal of Pediatrics* 1:30-33, 2011
- 6) Iwata S, Saito T, Ito Y, Kamakura M, Gotoh K, Kawada J, Nishiyama Y, Kimura H. Antitumor activities of valproic acid on Epstein-Barr virus-associated T and natural killer lymphoma cells. *Cancer Sci* 103:375-8, 2012
- 7) Kimura H, Ito Y, Kawabe S, Gotoh K, Takahashi Y, Kojima S, Naoe T, Esaki S, Kikuta A, Sawada A, Kawa K, Ohshima K,

- Nakamura S. Epstein-Barr virus (EBV)-associated T/NK lymphoproliferative diseases in non-immunocompromised hosts: prospective analysis of 108 cases. *Blood* 119:673-86, 2012
- 8) Isobe Y, Aritaka N, Setoguchi Y, Ito Y, Kimura H, Hamano Y, Sugimoto K, Komatsu N. T/NK-cell type chronic active Epstein-Barr virus (EBV) disease in adults: an underlying condition for EBV-associated T/NK-cell lymphoma. *J Clin Pathol* 65: 278-82, 2012
- 9) Hirai Y, Yamamoto T, Kimura H, Ito Y, Tsuji K, Miyake T, Morizane S, Suzuki D, Fujii K, Iwatsuki K. Hydroa vacciniforme is associated with increased numbers of Epstein-Barr virus-infected $\gamma\delta$ T-cells. *J Invest Dermatol* in press
- 10) Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakazawa A, Kawano F, Ichikawa S, Shimizu N, Yamamoto N, Morio T, Ohga S, Nakamura H, Ito M, Miura O, Komano J, and Fujiwara S. Novel Mouse Xenograft Models Reveal a Critical Role of CD4+ T Cells in the Proliferation of EBV-Infected T and NK Cells. *PLoS Pathogens*, 7(10): e1002326, 2011.
- 11) Arai A, Imadome K, Wang L, Nan W, Kurosu T, Wake A, Ohta Y, Harigai M, Fujiwara S, and Miura O. Recurrence of chronic active Epstein-Barr virus infection from donor cells after achieving complete response through allogeneic bone marrow transplantation. *Inter Med*, in press.
- 12) Ng SB, Selvarajan V, Huang G, Zhou J, Feldman AL, Law M, Kwong YS, Shimizu N, Nagami Y, Aozasa K, Salto-Tellez M and Chng WJ. Activated oncogenic pathways and therapeutic targets in extranodal nasal-type NK/T cell lymphoma revealed by gene expression profiling. *J Pathol*. 2011; 223:496-510.
- 13) Ng SB, Yan J, Huang G, Selvarajan V, Tay J, Lin B, Bi C, Tan J, Kwong YL, Shimizu N, Aozasa K, Chng W. Dysregulated MicroRNAs Affect Pathways and Targets of Biological Relevance in Nasal-type Natural Killer / T-cell Lymphoma. *Blood*. 118(18):4919-4929. 2011 Nov 3.
- 14) Ramakrishnan R, Donahue H, Garcia D, Tan J, Shimizu N, Rice AP and Ling P. Epstein-Barr virus BART9 miRNA modulates LMP1 levels and affects growth rate of nasal NK T cell lymphomas. *PLoS ONE*, 2011;6(11):e27271 2011 Nov 11.
- 15) Arai A, Imadome K, Watanabe Y, Yoshimori M, Koyama T, Kawaguchi T, Nakaseko C, Fujiwara S, Miura O. Clinical features of adult-onset chronic active Epstein-Barr virus infection: a retrospective analysis. *Int J Hematol*. 2011, 93(5):602-9.
2. 著書
- 1) 脇口宏 : A. ウイルス感染症 : 1 . DNA ウイルス感染症/Epstein-Barr ウイルス感染症. 感染症専門医第 I 部解説編テキスト (日本感染症学会編集), 785-790, 南江堂, 2011
3. 学会発表 (国際学会)
- 1) Morio T. Dissection of Common Variable immunodeficiency With Distinct Phenotype. 2011 Pediatric Academic Societies & Asian Society for Pediatric Research Joint Meeting Denver, Colorado, USA. 2011.4.30 - 5.3
- 2) Kimura H, Gotoh K, Maruo S, Takada K,

Iwata S, Goshima F, Nishiyama Y, Ito Y.: Ex vivo model for Epstein-Barr virus primary infection using human tonsil tissue explants. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan (2011.9) .

3) Yoshimori M, Arai A, Imadome K, Ludan W, Fukuda T, Koyama T, Fujiwara S, Miura O. CD137 expression is induced by Epstein-Barr virus (EBV) infection and activates NF- κ B contributing to the development of EBV-positive T/NK-cell lymphoproliferative disease. Annual Meeting of the European Hematology Association, June 2011, London.

4) Arai A, et al. L-asparaginase Monotherapy for T- and NK-Cell Type of Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection in adults: A Pilot Study. Annual Meeting of the American Association for Hematology, November 2011, San Diego.

5) Ayako Arai, Mayumi Yoshimori, Ken-Ichi Imadome, Wang Ludan, Tetsuya Fukuda, Takatoshi Koyama, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura. CD137 expression is induced by Epstein-Barr virus (EBV) infection and activates NF- κ B contributing to the development of EBV-positive T/NK-cell lympho- proliferative disease. The 16th Congress of European Hematology Association, June 2011 London.

6) Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakazawa A, Shimizu N, Yamamoto N, Morio T, Ohga S, Ito M, Komano J, Fujiwara S. Novel mouse xenograft models of CAEBV and EBV-HLH reveals a critical role of CD4+ T cells in the proliferation of EBV-infected T and NK cells. XV. International Congress of Virology, Sep 11-16, 2011, Sapporo.

(国内学会)

1) 木村 宏. EB ウイルスリンパ関連 T/NK リンパ増殖性疾患. 第 43 回, 日本小児感染症学会、教育講演. 岡山 (2011.10)

2) 仁多美奈子、新井文子、今留謙一、吉森真由美、王路丹、小山高敏、斉藤愛記、山岡昇司、藤原成悦、三浦修. EBV infection to T or NK cells activates NF-kB leading to lymphoproliferative diseases development. 日本血液学会学術集会、2011 年 9 月.

3) 新井文子、斉藤愛記、山岡昇司、藤原成悦、三浦修. EB ウイルスは T あるいは NK 細胞に感染後 NF- κ B 活性化を介して腫瘍発症に寄与する. 第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 3-5 日、名古屋.

4) Arai A, Saitoh Y, Yamaoka S, Fujiwara S, Miura O. EBV infection of T or NK cells activates NF-kB leading to lymphoproliferative diseases development. 第 73 回日本血液学会学術集会 2011 年 10 月名古屋.

5) Jinta M, Imadome K, Yoshimori M, Koyama T, Fujiwara S, Miura O, Arai A. L-asparaginase monotherapy for chronic active Epstein-Barr virus infection: A pilot study. 第 73 回日本血液学会学術集会 2011 年 10 月名古屋.

6) Yamada C, Imadome K, Arai A, Nakazawa A, Kawano F, Ichikawa S, Shimizu N, Yamamoto N, Morio T, Ohga S, Ito M, Koyama T, Miura O, Komano J, Fujiwara S. High level of human cytokines were detected in a novel mouse xenograft model of CAEBV and EBV-LHL. 第 73 回日本血液学会学術集会 2011 年 10 月名古屋.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし。

慢性活動性 EB ウイルス感染症における炎症性サイトカインの動態解析
及び骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植の有効性に関する研究

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 2 項目について研究を行った。

①CAEBV成人例に対する骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植 reduced-intensity conditioning (RIC) stem cell transplantation の有効性の検討

当施設で造血幹細胞移植を行った成人 CAEBV7 例を後方視的に解析した。移植時病勢が非活動性であった 5 例は寛解を得た一方で、活動性であった 2 例は早期に死亡した。CAEBV に対し RIC は有効であるが、移植前の病勢コントロールが重要である。前処置に ATG を使用した例は全例 lymphoproliferative disorders (PTLD) を発症したが、Rituximab 投与で全例 EBV は陰性化した。ATG 使用例は PTLD 発症に注意が必要である。

② CAEBV における炎症性サイトカインの動態解析と治療への応用の検討

CAEBV6 例の血清中のサイトカイン濃度を測定し、健常者との差、臨床経過との相関を検討した。TNF- α 、IL-6、IFN- γ の濃度は CAEBV 患者で優位に高く、臨床経過、重症度と相関した。EBV 感染 T、NK 細胞株、および CAEBV 患者細胞を用いた *in vitro* での解析では、TNF- α の産生が RNA および蛋白レベルで示された。また抗 TNF- α および抗 IL-6 抗体である infliximab、tocilizumab は VP16 との併用により細胞死を相乗的に亢進させた。以上から TNF- α 、IL-6、IFN- γ は病勢のバイオマーカーとなり得、TNF- α 、IL-6 は治療標的として有用と考えられた。

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 の感染した 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、2008 年に改訂された 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、その発症機構は不明で、至適な治療法はいまだ確立されていない。私たちの解析からも (Int J Hematol. 2011

May;93(5):602-9.)、CHOP 療法、大量 Cytarabine 療法をはじめとする従来の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。そこで本年は治療法開発を目的に以下を検討した。

①CAEBV成人例に対する骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植 reduced-intensity conditioning (RIC) stem cell transplantation の有効性の検討

CAEBV に対しては、造血幹細胞移植の有効性が報告されており 2010 年に河ら

は 29 例を後方視的に解析し、骨髄非破壊的移植を行った患者では 90%以上の 3 年生存率を得たと報告している。しかし、この報告は、小児例 (1 歳~37 歳、中央値が 14 歳)を中心としたものであった。そこで、近年報告が増加しており、かつ小児例より予後の悪い成人例に対する移植の有効性を検討した。

②CAEBV における炎症性サイトカインの動態解析と治療への応用の検討

CAEBV は T、NK 細胞腫瘍であると同時に、強い炎症症状を合併する炎症性疾患でもあり、進行すると血球貪食症候群を来し死亡する。そこで炎症の発症機構を炎症性サイトカインに注目し解析、かつ治療への応用を検討した。

B. 研究方法

CAEBV の診断は Okano らの診断指針 (Am J Hem 2005; 80,p64) に基づいて行った。

① 2009 年から 2011 年まで当施設で治療した以下の 7 例を対象として移植成績を検討した。寛解の定義は臨床症状が消失し、かつ末梢血 EBV-DNA 量が健常者レベルである $<10^{2.5}$ copies/ μ gDNA を示すものとした。Post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD) の診断は、発熱、リンパ節腫脹、肝機能障害などの症状を有し、末梢血 EBV-DNA 量が $>10^3$ copies/ μ gDNA であるものとした。EBV 特異的 Cytotoxic T cell(CTL)の検出には HLA2402 テトラマーを用いた。

② 2009 年から 2011 年まで当施設で治療した CAEBV 6 例を対象とし血清中のサイトカイン濃度を ELISA 法で測定した。サイトカインの産生機構および抗サイトカイン薬の効果の解析には 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) は EBV 陰性 T および NK 細胞腫瘍株、もしくは健常者末梢血単核球 (PBMC)を用いた。In vitro EBV infection は B95-8 細胞培養上清から抽出したウイルスを用い、T 細胞株 MOLT-4 と共培養し感染させた。サイトカインの産生は RT-PCR 法により転写レベルで、ELISA 法により蛋白質レベルで検討した。

(倫理面への配慮)

以上の研究は東京医科歯科大学倫理委員会で承認され (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。

C. 研究結果

①年令は 20 歳から 62 歳。女性 5 例、男性 2 例。EBV 感染細胞は CD4、CD8、CD56 陽性細胞がそれぞれ 3 例、2 例、2 例。移植時病勢は、発熱などの臨床症状のある状態が継続している症例を活動性、消失している症例を非活動性と定義すると、非活動性 5 例、活動性 1 例 (発熱)、そして活動性かつ進行性 1 例 (皮膚および筋への浸潤が進行) であった。移植は非血縁骨髄 6 例、臍帯血 1 例で、HLA は全アリル一致 5 例、血清型一致で 1 アリル (DR) 不一致 1 例。臍帯血例は 3 アリル (A、B、DR) 不一致であった。前処置は Flu+Mel+TBI 3 例、Flu+Mel+ATG 4 例で、GVHD 予防は FK か CsA+短期 MTX を用いた。移植時病勢が非活動性であった 5 例は移

植後観察期間 6~39 か月で全例寛解した。活動性、進行性であった 2 例はそれぞれ敗血症、病気進行で移植後 12 日、46 日に死亡した。全体の 2 年全生存率は 71.4%であった。ATG 使用 3 例は移植後 2 週~2 か月後に PTLD と診断した。感染細胞はいずれもドナー由来 B 細胞で、Rituximab 投与で全例 EBV は陰性化した。7 例中 3 例で EBV 特異的ドナー CTL を確認した。うち 1 例では経過中 CTL が消失したが寛解を維持した。

③患者の内訳は、年齢は 21 歳から 64 歳。女性 5 例、男性 1 例。EBV 感染細胞は CD4、CD8、CD56 陽性細胞がそれぞれ 3 例、1 例、2 例。対照として 5 名の健常者を用いた。CAEBV では、血清中の INF- γ 、IL-6、TNF- α 濃度は健常者に比べ優位に上昇していた。1 人の患者では治療後病勢（血球貪食症候群、肝機能障害）の改善とともにこれらは低下し、再発と共に上昇した。次にこれらのサイトカイン産生機序を解析した。CAEBV 患者の EBV 陽性細胞において TNF- α の転写が亢進していたこと、EBV 陽性細胞株 SNT8 の培養上清中の TNF- α 濃度の上昇をみとめたことから TNF- α は EBV 陽性 T 細胞から産生されていると考えられた。さらに T 細胞株 MOLT-4 へ *in vitro* で EBV を感染させると(感染効率>60%)、TNF- α の発現が亢進した。これらの結果から EBV の感染によって T 細胞の TNF- α の産生が亢進することが示された。

In vitro で EBV 感染 T、NK 細胞を抗 TNF- α 抗体 infliximab および抗 IL-6 抗体 tocilizumab で処理すると VP-16 の apoptosis 誘導作用を相乗的に亢進させた。以上から、INF- γ 、IL-6、TNF- α は CAEBV の病態形成に重要な働きをし、かつ治療

標的となりうると考えられた。

D. 考察

①私たちの 2011 年の報告(Int J Hematol. 2011 May;93(5):602-9.)では、化学療法や免疫抑制療法のみを行った成人 CAEBV13 例の解析では 10 例 (77%) は治療後平均 13 カ月で死亡していた。本研究の結果をそれと比較すると、成人 CAEBV に対して RIST は有効であると考えられる。

移植時病勢が活動性であった 2 例は早期死亡をみており、移植に当たっては病勢がコントロールされた状態での施行が望ましいと考えられた。

ATG 使用 3 例は全例で PTLD を発症した。ATG は Donor T-cell のみならず EBV 感染 T、NK 細胞も抑制することで疾患を制御しうるため、ATG (+TBI)を含んだ前処置は有効である。しかし今回の結果から ATG 使用時には PTLD のリスクが増すことが示されたため、定期的な EBV-DNA 量のモニタリングが必要であると考えられた。

移植後 EBV 特異的 CTL が 3 例で誘導されたが、1 例では途中で消失した。しかしその後も寛解を維持しており、疾患コントロールには必ずしも CTL は必要でない可能性がある。CTL のみならず、宿主免疫の発症への関与について今後は多数例で、移植前後の解析が必要である。

②CAEBV 患者では血中の IL-6、TNF- α 、INF- γ などの炎症性サイトカイン濃度が上昇していた。さらにその値は病勢を反映していた。これらの阻害剤は単独では EBV 感染細胞の増殖抑制には至らなかったが、VP16 との併用は化学療法への抗サイトカイン試薬導入の良い適応になる可能性を示唆した。今後 infliximab、

tocilizumab、etanercept は血球貪食症候群に効果を認めたという報告もあり、CAEBV に合併する炎症反応、特に致死的合併症 HPS を抑える可能性があり今後検討していきたい。

E. 結論

①成人 CAEBV に対して骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植成績は有効である。

②炎症性サイトカインはEBV感染細胞から産生放出され、病態形成に関与する。病勢のバイオマーカーかつ治療標的となりうる。

F. 研究危険情報なし。

G. 研究発表

1. 刊行物

原著論文

- 1) Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakazawa A, Kawano F, Ichikawa S, Shimizu N, Yamamoto N, Morio T, Ohga S, Nakamura H, Ito M, Miura
Novel mouse xenograft models reveal a critical role of CD4+ T cells in the proliferation of EBV-infected T and NK cells. PLoS Pathog. 2011 Oct;7(10):e1002326. Epub 2011 Oct 20. •
- 2) Arai A, Imadome K, Watanabe Y, Yoshimori M, Koyama T, Kawaguchi T, Nakaseko C, Fujiwara S, Miura O.
Clinical features of adult-onset chronic active Epstein-Barr virus infection: a retrospective analysis. Int J Hematol. 2011, 93(5):602-9.

3) Arai A, Imadome K, Wang L, Wu N, Kurosu T, Wake A, Yamamoto H, Ota Y, Harigai M, Fujiwara S, Miura O.
Recurrence of chronic active Epstein-Barr virus infection from donor cells after achieving complete response through allogeneic bone marrow transplantation Int Medicine, 2012;51(7):777-82.

4) 内田慧美、本間りこ、五十嵐愛子、倉田盛人、今留謙一、大本英次郎、三浦修、新井文子 血漿中 EBV-DNA 量を経時的に測定した EBV 陽性 Hodgkin リンパ腫臨床血液,2012,53(1) : 87-91

総説

原発性眼内リンパ腫の診断と治療
Diagnosis and treatment of primary intraocular lymphoma

血液内科 科学評論社 62

p106-111,2011

著書

・新井文子

Splenic marginal zone lymphoma

脾辺縁帯リンパ腫 p393-400

みんなに役立つ悪性リンパ腫の基礎と臨床改訂版 2011年1月1日

医薬ジャーナル社 押味和夫編

・新井文子/片岡純

多発性骨髄腫 p103-109

病態生理ビジュアルマップ3 2011年1月1日

医学書院 佐藤千史/井上智子編

・新井文子

発熱 p2-6

緊急度・重傷度からみた症状別看護過程 2011年11月1日

医学書院 井上智子/佐藤千史編

2. 学会発表

国内学会

第 33 回日本造血細胞移植学会総会

2011 年 2 月 松山

・梅澤佳央、野上彩子、五十嵐愛子、山本正英、大木学、黒須哲也、福田哲也、新井文子、三浦修

低用量 thymoglobulin を含んだ前処置による同種移植後に EBV 関連リンパ増殖性疾患 (EBV-LPD) を発症した 2 例における EBV-DNA 定量モニタリング

第 166 回日本血液学会例会 2011 年 7 月 東京

・石田信也、秋山めぐみ、梅澤佳央、五十嵐愛子、山本正英、黒須哲也、福田哲也、新井文子、村上直己、三浦修
皮膚、髄膜浸潤を伴い、緩徐な経過の後急速な悪化を来した T-PLL の 1 例

第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 名古屋

・Ayako Arai, Yasunori Saitoh, Shoji Yamaoka, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura

EBV infection of T or NK cells activates NF- κ B leading to lymphoproliferative diseases development

第 73 回日本血液学会学術集会 2011 年 10 月 名古屋

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

EBV infection of T or NK cells activates NF- κ B leading to lymphoproliferative diseases development

・Minako Jinta, Ken-Ichi Imadome, Mayumi Yoshimori, Takatoshi Koyama, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura, Ayako Arai

L-asparaginase monotherapy for chronic active Epstein-Barr virus infection: A pilot study

・Ludan Wang, Aiko Sato-Otsubo, Sunao Sugita, Hiroshi Takase, Manabu Mochizuki, Yoshihiko Usui, Hiroshi Gotoh, Osamu Miura, Seishi Ogawa, Ayako Arai

High-resolution genomic copy number profiling of primary intraocular lymphoma by SNP microarray

・Chihiro Yamada, Ken-Ichi Imadome, Ayako Arai, Atsuko Nakazawa, Fuyuko Kawano, Sayumi Ichikawa, Norio Shimizu, Naoki Yamamoto, Tomohiro Morio, Syouichi Ohga, Mamoru Ito, Takatoshi Koyama, Osamu Miura, Jun Komano, Shigeyoshi Fujiwara

High level of human cytokines were detected in a novel mouse xenograft model of CAEBV and EBV-LHL

国際学会

The 16th Congress of European Hematology Association, June 2011 London

・Ayako Arai, Mayumi Yoshimori, Ken-Ichi Imadome, Wang Ludan, Tetsuya Fukuda, Takatoshi Koyama, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura

CD137 EXPRESSION IS INDUCED BY EPSTEIN-BARR VIRUS (EBV) INFECTION AND ACTIVATES NF- κ B CONTRIBUTING TO THE DEVELOPMENT OF EBV-POSITIVE T/NK-CELL LYMPHOPROLIFERATIVE DISEASE

The 53rd Annual meeting of American society of Hematology December 2011

San Diego

• Ludan Wang, Aiko Sato-Otsubo, Sunao Sugita, Hiroshi Takase, Manabu Mochizuki, Yoshihiko Usui, Hiroshi Gotoh, Osamu Miura, Seishi Ogawa, Ayako Arai
High-Resolution Genomic Copy Number Profiling of Primary Intraocular Lymphomas using SNP Microarrays

H. 知的財産権の出願・取得状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

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感染症診断法の臨床応用に関する研究

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

Epstein-Barr ウイルス (EBV) 関連 T/NK リンパ増殖性疾患は、EBV が感染した T 細胞もしくは NK 細胞のクローナルな増殖に特徴づけられる全身性疾患であり、慢性活動性 EBV 感染症、EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症、蚊刺過敏症、種痘様水疱症などが含まれる。非免疫不全宿主に発症した EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患患者 108 例に対して臨床・病理・ウイルス学的な前方視的解析を行った。感染細胞同定には我々が独自に開発した高感度特異的 EBV 感染細胞同定法などを用いた。患者の発症年齢は 1 歳から 50 歳で (中央値 8 歳)、64 例が T 細胞に、44 例が NK 細胞に感染していた。臨床的には、慢性活動性 EBV 感染症 80 例、EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症 15 例、蚊刺過敏症 9 例、種痘様水疱症 4 例に分けられた。これらの臨床型別は EBV 感染細胞のフェノタイプと極めて密接に関連していた。観察期間中 47 例が臓器合併症などで死亡し、13 例は明白な白血病/リンパ腫に進展した。59 例が造血幹細胞移植を受け、そのうち 66%が生存していた。8 歳以上の発症、肝障害が生命予後不良因子であり、移植を受けた患者は生命予後がよかった。これらの知見は、EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患の診断・治療介入決定に有用であるのみならず、本症の発症病理への理解を深め、将来的な疾患分類の制定にも役立つと考えられる。

A. 研究目的

Epstein-Barr virus (EBV) は伝染性単核症の原因ウイルスであり、バーキットリンパ腫・ホジキン病の一部・移植後リンパ増殖症など B 細胞リンパ腫/リンパ増殖性疾患と関連している。一方、EBV は B 細胞のみならず T 細胞・NK 細胞に感染し、様々な T/NK リンパ腫・白血病・リンパ増殖性疾患との関連が明らかにされてきた。慢性活動性 EBV 感染症、EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症 (HLH)、種痘様水疱症、蚊刺過敏症は、EBV が T 細胞もしくは NK 細胞に感染することによって生じる T/NK リンパ増殖

性疾患である。本症は難治であり、我が国をはじめとした東アジアの小児に多くみられる。なぜ、普遍的なウイルスである EBV が一部の小児に T/NK リンパ増殖性疾患をもたらすのか、EBV がどのような機序で T/NK 細胞に感染するのか、感染した T/NK 細胞がなぜ排除されないのかなど、その発症病理には不明な点が多い。また、その疾患定義は必ずしも定まっておらず、互いにオーバーラップする部分も多い。

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、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診断に応用してきた。今回我々は、我々が独自に開発した高感度特異的 EBV 感染細胞同定法を主に用いて診断した EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患患者 108 例に対して臨床・病理・ウイルス学的な前方視的解析を行った。

B. 研究方法

対象は 1998 年以降、名古屋大学医学部に EBV 感染細胞の診断依頼が有り、1) 末梢血中に有意な EBV-DNA の上昇を認め ($10^{2.5}$ copies/ μ g DNA 以上)、2) EBER 特異的 PNA プローブを用いた高感度特異的 EBV 感染細胞同定法、もしくは磁気ビーズ法により EBV が T 細胞または NK 細胞に感染していると診断された 108 症例。

除外項目として、1) 原発性もしくは続発性 (医原性を含む) 免疫不全患者、2) 病理組織診にて節外性 NK/T リンパ腫、アグレッシブ NK 細胞性白血病、末梢性 T 細胞リンパ腫と診断された症例。

診断時に、骨髄検査および可能な限り病理組織診断を依頼施設にて施行した。更に、以下のウイルス学的解析を行った。

- 1) 定量的 PCR 法による末梢血中の EBV-DNA 量の測定。
- 2) EBV terminal repeat を用いたサザンブロット法によるクロナリティ解析。
- 3) PCR 法による T 細胞受容体再構成の有無。
- 4) 末梢血もしくは骨髄液を用いた染色体分析。
- 5) EBV 関連抗体価測定 (VCA-IgG, VCA-IgM, EA-DR-IgG, EBNA)。

概ね 3 年毎に診療経過・施行した治

療・転帰を問うアンケートを主治医に送付し、回収した。最終調査は、2010 年 12 月に施行した。

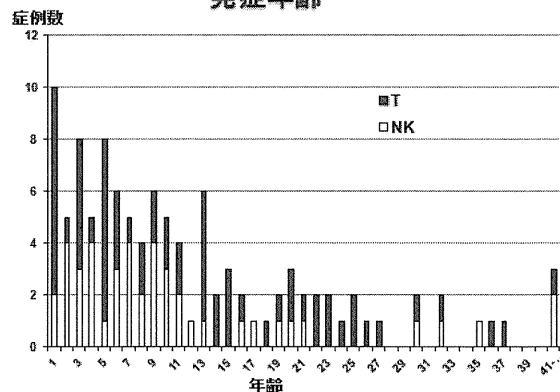
(倫理面への配慮)

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

患者は 50 例が男性、58 例が女性で、発症年齢は 1 歳から 50 歳に渡っていた (中央値 8 歳)。64 例が T 細胞に、44 例が NK 細胞に感染していた。図 1 に感染細胞別に分けた年齢分布を示す。小児期発症例が多かったが 20 代の若年成人も少なからず認めた。感染細胞による年齢差異は認められなかつ

図 1. EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患 108 例 発症年齢

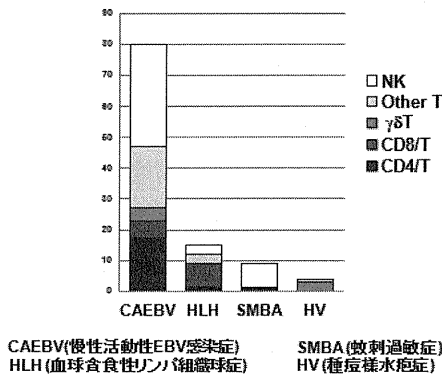


た。

臨床的には、慢性活動性 EBV 感染症 80 例、EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症 15 例、蚊刺過敏症 9 例、種痘様水疱症 4 例に分けられた。図 2 にこれら疾患群別の EBV 感染細胞を示す。慢性活動性 EBV 感染症では CD4

陽性 T 細胞、NK 細胞が多いものの、CD8 陽性 T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞に主として感染している症例も認められた。一方、EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症では CD8 陽性 T 細胞が、蚊刺過敏症では NK 細胞が、種痘様水疱症では $\gamma\delta$ T 細胞が、主たる感染細胞であった。以上のごとく臨床型別は EBV 感染細胞のフェ

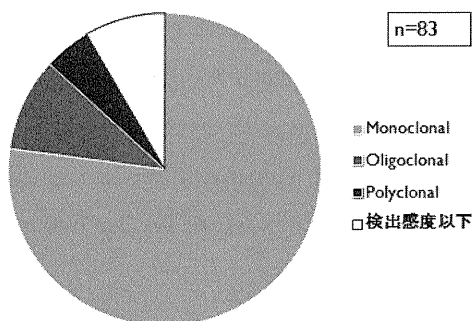
図2. EBV関連T/NKリンパ増殖性疾患108例臨床型別感染細胞



ノタイプと極めて密接に関連していた。

図3にサザンブロット法による感染細胞のクローナリティを示す。3/4以上の患者ではモノクローナルであったが、一部の患者はオリゴクローナルもしくはポリクローナルであった。

図3. 感染細胞のクローナリティ EBV/TR Southern Blotting 解析結果



観察期間中 47 例が臓器合併症などで死亡し、13 例は明白な白血病/リンパ腫に進展した。59 例が造血幹細胞移植を受け、そ

表1. EBV関連T/NKリンパ増殖性疾患108例予後（死亡）に関連する因子

Factor	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	Odds ratio (95% CI)	Pvalue	Odds ratio (95% CI)	Pvalue
Sex (female)	1.40 (0.98-1.97)	0.048	1.26 (0.48-3.31)	0.64
Age at disease onset (≥ 8 years)	1.63 (1.17-2.28)	0.003	4.43 (1.61-12.2)	0.004
Past history of infectious mononucleosis	0.62 (0.35-1.11)	0.093	0.36 (0.12-1.02)	0.054
Primary infection at entry	0.47 (0.18-1.20)	0.079	0.32 (0.08-1.25)	0.10
Symptoms and signs at entry (cases)				
Liver dysfunction	1.33 (0.09-1.63)	0.006	4.25 (1.23-14.7)	0.022
Anemia	1.84 (1.18-2.88)	0.005	1.36 (0.31-5.01)	0.68
Thrombocytopenia	1.75 (1.134-2.71)	0.009	1.80 (0.44-7.33)	0.41
Transplantation	0.67 (0.045-0.98)	0.022	0.34 (0.12-0.96)	0.041
in T cell infection group	0.54 (0.30-0.97)	0.021	-	-
in NK cell infection group	0.83 (0.51-1.34)	n.s.	-	-

のうち 66% が生存していた。表 1 に単変量および多変量解析による予後関連因子を示す。多変量解析により、8 歳以上の発症、肝障害が独立した生命予後不良因子であり、逆に移植を受けた患者は生命予後が良いことが示された。

移植を受けた 59 症例のうち、最終解析時に生存していたのは 39 例 (66%) であり、残りの 20 例が死亡していた。死因は多臓器不全が 5 例、頭蓋内出血が 5 例、敗血症 2 例などであったが、移植関連合併症による死亡が 15 例に上った。予後に関連する因子としては、移植時の年齢および疾病の活動性が低い患者の生存率が有意に高いという結果が得られた (表 2)。

表2. EBV関連T/NKリンパ増殖性疾患/移植59例予後（死亡）に関連する因子

Factor	Alive (n=39)	Dead (n=20)	Pvalue
Age at disease onset, years (mean \pm SD)	11.0 \pm 9.0	13.6 \pm 9.5	>0.10
Age at transplantation, years (mean \pm SD)	15.6 \pm 9.1	21.2 \pm 8.3	0.034
Time from onset to transplantation, months (mean \pm SD)	52.2 \pm 54.7	90.0 \pm 84.8	0.059
Disease status at transplantation (active/inactive)	13/26	12/8	0.046
Preceded chemotherapy, cases (%)	27 (69)	15 (75)	>0.10
Stem cell source (bone marrow/peripheral blood/cord blood)	22/8/9	13/3/4	>0.10
Donor (MRD/MUD/MMRD/MMUD)	19/8/3/17	8/2/1/9	>0.10
Number of mismatched HLA (mean \pm SD)	0.76 \pm 0.9	0.75 \pm 0.9	>0.10
Preconditioning regimen (myeloablative/reduced)	11/28	10/10	0.086

MRD: matched related donor, MUD: matched unrelated donor, MMRD: mismatched related donor, MMUD: mismatched unrelated donor.

D. 考察

非免疫不全宿主に発症した EBV 関連 T/NK

リンパ増殖性疾患患者 108 例に対して臨床・病理・ウイルス学的な前方視的解析を行い、1) 本症が小児および若年成人を中心に発症していること、2) 臨床型別は EBV 感染細胞のフェノタイプと極めて密接に関連していること、3) 観察期間中 47 例が臓器合併症などで死亡し、13 例は明白な白血病/リンパ腫に進展していたこと、4) 59 例が造血幹細胞移植を受け、そのうち 66% が生存していたこと、5) 8 歳以上の発症、肝障害が生命予後不良因子であり、逆に移植を受けた患者は生命予後が良好であったこと、6) 更に移植を受けた患者では、発症時の年齢と疾病の活動性の低い患者の生存率が高いことを示した。これらの知見は、EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患の診断・治療介入決定に有用であろう。

これまで、EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患は、地域集積性などから、何らかの遺伝的背景の関与が推測されてきた。患者のごく一部には、XLP、XIAP、FHL、ALPS などの先天性免疫不全症候群が存在するが、大多数の患者の遺伝的背景は明らかにはなっていない。おそらくは、患者に潜在する免疫学的な異常が、EBV に感染した T/NK 細胞の増殖を許容しているのであろう。家族集積性がないことから、単一遺伝子欠損よりは遺伝子型 (SNP) やヒトゲノムコピー数多型 (CNV) などのゲノム多様性に基づく遺伝的背景が関与している可能性があり、これらを明らかにするには大規模なゲノム関連遺伝子解析が必要となろう。

2008 年に改訂された WHO のリンパ腫/白血病分類には、EBV 関連疾患として、小児全身性 EBV 陽性 T 細胞増殖症と種痘様水疱症様リンパ腫が新たに加わった。これら二つの疾患は、これまで本邦で慢性活動性 EBV 感染症、EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症と診断されてきた患者群とオー

バーラップする部分が多いものの、その疾患定義・位置づけについては不明瞭な点がある。今回我々が明らかにした、EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患の臨床像・ウイルス学的特徴は、本症の発症病理への理解を深めるのみならず、近い将来行われる WHO 分類の改訂にも役立つと考えられる

E. 結論

高感度特異的 EBV 感染細胞を主に用いて診断した EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患患者 108 例に対して臨床・病理・ウイルス学的な前方視的解析を行った。今回得られた知見は、EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患の診断・治療介入決定に有用であるのみならず、本症の発症病理への理解を深め、将来的な疾患分類の制定にも役立つと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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: 244-246, 2011
- 2) Kunitomi A, **Kimura H**, Ito Y, Naitoh K, Noda N, Iida H, Sao H. Unrelated bone marrow transplantation induced long-term remission in a patient with life-threatening Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Clin Exp Hematop* 51:57-61, 2011
- 3) 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*