

- 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) Yamaguchi M, Kwong YL, Kim WS, Maeda Y, Hashimoto C, Suh C, Izutsu K, Ishida F, Isobe Y, Suzumiya J, Kodama T, **Kimura H**, Hyo R, Nakamura S, Oshimi K, Suzuki R. Phase II study of SMILE chemotherapy for newly-diagnosed stage IV, relapsed or refractory extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type: the NK-cell Tumor Study Group (NKTSG) study. *J Clin Oncol* 29: 4410-4416, 2011
 - 7) Ito Y, Kawabe S, Kojima S, Nakamura F, Nishiyama Y, Kaneko K, Kiuchi K, Ando H, **Kimura H**. Identification of Epstein-Barr virus-infected CD27⁺ memory B cells in patients after transplantation. *J Gen Virol* 92:2590-5, 2011
 - 8) Gotoh K, Ito Y, Maruo S, Takada K, Mizuno T, Teranishi M, Nakata S, Nakashima T, Iwata S, Goshima F, Nakamura S, **Kimura H**. Replication of Epstein-Barr virus primary infection in human tonsil tissue explants. *PLoS One* 6: e25490, 2011
 - 9) Takahashi E, Ohshima K, **Kimura H**, Hara K, Suzuki R, Kawa K, Eimoto T, Nakamura S. Clinicopathological analysis of the age-related differences in patients with Epstein-Barr virus-associated extranasal NK/T-cell lymphoma with reference to the relationship with aggressive NK cell leukemia and chronic active Epstein-Barr virus infection-associated lymphoproliferative disorder. *Histopathology* 59:660-671, 2011
 - 10) 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
 - 11) **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
 - 12) 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
 - 13) Kawada J, Iwata N, Kitagawa Y, **Kimura H**, Ito Y. Prospective monitoring of Epstein-Barr virus and other herpesviruses in patients with juvenile idiopathic arthritis treated with methotrexate and tocilizumab. *Mod Rheumatol in press*
 - 14) 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*

2. 学会発表

- 1) **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) .
- 2) 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)

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。
3. その他
特になし。

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

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

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（CAEBV）は、EBV 感染 T/NK 細胞を原因細胞とする予後不良の疾患である。患者末梢血から EBV 感染細胞クローンを分離し、その解析により EBV 感染 T/NK 細胞の成立・維持機構を解明することを目的に研究を行った。今回、同一患者から細胞種の異なる複数の EBV 感染クローンを長期培養することに成功し詳しく解析したところ、得られた細胞クローンは $\alpha\beta$ T 細胞（CD4 陽性と CD8 陽性）と $\gamma\delta$ T 細胞の 3 種類に分類できるものの、いずれも同一クロナリティを持つことが示された。これらの結果は、EBV は $\alpha\beta$ T 細胞と $\gamma\delta$ 細胞に分化する以前の未分化な T 細胞リニエージの細胞に感染し、その後独立に $\alpha\beta$ T 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞へと分化したことを示唆している。本知見は、CAEBV の原因細胞の成立機序の解明に極めて重要であり、今後症例数を増やして検討を続けていく予定である。

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、適切に治療しないと患者のほとんどは数年から十数年の経過でリンパ腫・臓器不全・血球貪食症候群などにより死亡する。抗ウイルス剤や抗ガン剤による治療が行われているが、これらの薬剤治療では根治は望めず、造血幹細胞が現在のところ唯一の根治治療法である。しかし、造血幹細胞移植は長い入院期間を必要とするとともに移植関連死亡率が高く、患者負担が大きく非常にリスクの高い治療法である。したがって、EBV を標的とした治療薬の開発が急務であるが、現在までに有効性が確立した抗 EBV 剤は実用化されていない。

一方、CAEBV 患者末梢血中には、EBV 潜伏

感染 T/NK 細胞が持続的に検出される。感染細胞分泌される様々なサイトカインが、CAEBV 患者の病態と密接に関連しているとともに EBV 関連リンパ腫の原因ともなっていると考えられている。したがって、CAEBV の成立の要因や病態を正しく理解するためには EBV 陽性 T/NK 細胞の成立・維持の機構を解明することが極めて重要である。

我々は CAEBV 患者末梢血から EBV 感染細胞を長期培養する手法を確立し、これまでに多くの EBV 陽性 T/NK 細胞株を樹立するとともに、一部の患者末梢血中には複数の細胞種の EBV 感染クローンが存在することを見出した。本研究では、複数の細胞種の EBV 感染クローンが存在する患者の末梢血から、異なった細胞

腫の EBV 感染細胞クローンを多数分離培養し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を明らかに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

患者は 19 歳男性、3 歳のころより蚊刺により発熱と水疱性丘疹を繰り返えず蚊刺過敏症を発症しており、精密検査により皮膚への EBV 陽性細胞浸潤と末梢血中の EBV ゲノム高値、EBV 関連抗体価高値が判明し、CAEBV と診断された。

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%非動物化ヒト血清 を添加した培地を使用した。

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 μl
2X Buffer	10 μl
Primer, Probe	0.6 μl
Taq 酵素	0.4 μl
H ₂ O	1.0 μl
Total	20 μl

反応条件 :

Denature	95°C10 秒
PCR 反応	95°C5 秒, 60°C20 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, CD21, CD25, CD56, CD57, TCR $\alpha \beta$, TCR $\gamma \delta$ (ベックマンコールター)

c. 分子生物学的解析

サザンブロットティングにより、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 μ 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)

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. EBV 陽性細胞クローンの分離

患者末梢血単核球を播種した 4 枚の 96well プレートから 18 クローンの細胞が得られた。得られた細胞クローンはすべて EBV 陽性であることが PCR 解析の結果示された。

2. 細胞クローンの表面抗原解析

得られたクローンを個別に拡大培養し、それらの細胞表面マーカーを解析した。その結果

細胞クローンは、A:CD3/CD4/TCR $\alpha\beta$ 陽性、CD8/CD19/TCR $\gamma\delta$ 陰性 B:CD3/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 C: CD3/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。一方、3種類の細胞クローンはいずれもCD21の発現は陰性だった。

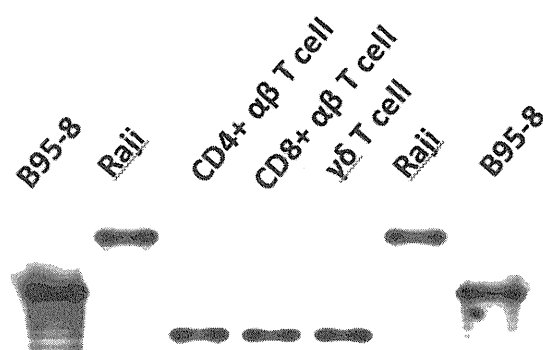
3. 培養細胞クローンのT細胞受容体遺伝子の解析

患者末梢血から得た細胞クローンのTCRおよびIg遺伝子解析を行い、分子生物学的に細胞種の同定を試みた。その結果、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CD4陽性細胞・CD8陽性細胞ともに、C β 1, J γ 1遺伝子リアレンジメント陽性、J δ 1, J δ 3遺伝子は欠失、J γ 1, J η 遺伝子リアレンジメント陰性であり、いずれも $\alpha\beta$ T細胞と確定した。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 β 1, J γ 1, J δ 3遺伝子リアレンジメント陽性、J δ 1遺伝子は欠失、J η 遺伝子リアレンジメント陰性の $\gamma\delta$ T細胞と確定した。

4. EBV-TRを用いたクロナリティー解析

EBVが細胞に感染すると、ウイルスゲノムは環状で細胞核に存在する。ウイルス粒子中ではゲノムは直鎖状でパッケージされ、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。EBVゲノムは感染すると環状化し細胞分裂と同調して増幅するが、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。したがって、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。

患者末梢血から得られた細胞クローンからDNAを抽出・BamHI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TRの長さを測定した。その結果、いずれのクローンからも単一のバンドが検出され、その長さは3群の細胞クローンすべてで完全に一致することが明らかとなった(下図参照)。



D: 考察

同一のCAEBV患者の末梢血から細胞表面抗原の発現パターンが異なる3種類のEBV感染細胞クローン(CD4陽性およびCD8陽性 $\alpha\beta$ T細胞とCD4/CD8陰性 $\gamma\delta$ T細胞)が分離された。それらが $\alpha\beta$ T細胞と $\gamma\delta$ T細胞であることはT細胞受容体遺伝子のリアレンジメント解析により確認された。これらの細胞クローンはEBV-TRを用いたクロナリティー解析では、同じサイズの単一のバンドが検出され、同一のクロナリティーを持つことが示された。

この結果は、EBVが $\alpha\beta$ T細胞と $\gamma\delta$ T細胞に分化する以前の未分化なT細胞あるいはそれよりも分化段階が低いリンパ球に感染し、その後ことなる細胞種のリンパ球に分化したことを示唆している。T細胞分化は、CD44+CD25 $^-$ \rightarrow CD44+CD25 $^+$ (Pro-T) \rightarrow CD44 $^-$ CD25 $^+$ (Pre-T) \rightarrow CD44 $^-$ CD25 $^-$ の順に進むとの報告がある。TCR- β and - γ リ

アレンジメントは DN ステージの胸腺細胞に存在し、 γ δ T 細胞は pre-T あるいはそれ以前の細胞から分化するとされている。本研究により得られた知見より、EBV は T 細胞受容体遺伝子リアレンジメントが起きる前の段階の幼弱な T 細胞に感染したと予想される。また、得られた 3 種類の T 細胞クローンはいずれも EBV リセプターとして知られる CD21 が陰性だった。CD21 は幼弱な T 細胞に発現しているとの報告が多数あり、まず初めに幼弱な T 細胞に EBV が感染し、その後 3 種類の T 細胞に分化したと考えると説明がつく。一方、上皮細胞への EBV 感染は CD21 に依存しないとの報告もあり、T 細胞への EBV 感染も CD21 非依存性である可能性も否定できない。今後、ヒト B および T 細胞の発生を許容する NOG マウスを利用したヒト化マウスから骨髓細胞や胸腺細胞を分離し、EBV 感染実験を行い T 細胞への EBV 感染の詳細を解析していく予定である。

E: 結 論

CAEBV の原因細胞である 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い、同一患者から細胞種の異なる 3 種類の EBV 感染クローンを長期培養することに成功した。細胞を詳しく解析したところ、得られた細胞クローンは α β T 細胞 (CD4 陽性と CD8 陽性) と γ δ T 細胞の 3 種類に分類できるが、いずれも同一クロナリティを持つことが示された。これらの結果は、EBV は α β T 細胞と γ δ 細胞に分化する以前の未分化な T リンパ球に感染し、その後感染細胞は独立に α β T 細胞と γ δ T 細胞へと分化したことを示唆しており、CAEBV の成立要因を探るうえで重要な知見である。

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 Ophthalmol*. 2011; 95:345-349.
2. 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.
3. Abe T, Segawa Y, Watanabe H, Yotoriyama T, Kai Y, Yasuda A, **Shimizu N** and Tojo N. Point-of-Care Testing System Enabling 30-min Detection of Influenza Genes. *LAB CHIP*. 2011; 11:1166-1167.
4. Yagasaki H, Kato M, **Shimizu N**, Shichino H, Chin M and Mugishima H. Autoimmune hemolytic anemia and autoimmune neutropenia in a child with erythroblastopenia of childhood (TEC) caused by human herpesvirus-6 (HHV6). *Ann Hematol*. 2011; 90(7):851-852.
5. Watanabe A, Tagawa H, Yamashita J, Teshima K, Nara M, Iwamoto K, Kume M, Kameoka Y, Takahashi N, Nakagawa T, **Shimizu N** and Sawada K. The role of microRNA-150 as a tumor suppressor in malignant lymphoma. *Leukemia*. 2011; 25(8):1324-1334.
6. Sugita S, Ogawa M, Inoue S, **Shimizu N** and Mochizuki M. Diagnosis of ocular toxoplasmosis

- by two polymerase chain reaction (PCR) examinations: qualitative multiples and quantitative real-time. *Jpn J Ophthalmol.* 2011; Jul 13. 55(5):495-501.
7. Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Katayama M, Horie S, Ogawa M, Sugimoto Y and Mochizuki M. Detection of Candida & Aspergillus species DNA using broad-range real-time PCR for fungal endophthalmitis. *Graefe Arch Clin Exp.* in press.
 8. 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.
 9. 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*, 2011;7(10):e1002326. Epub 2011 Oct 20.
 10. Kuwana Y, Takei M, Yajima M, Imadome K, Inomata H, Shiozaki M, Inomata H, Ikumi N, Nozaki T, Shiraiwa H, Kitamura N, Takeuchi J, Sawada S, Yamamoto N, Shimizu N, Ito M and Fujiwara S Epstein-Barr Virus Induces Erosive Arthritis in Humanized Mice. *PloS ONE* 2011;6(10):e26630. Epub 2011 Oct 19.
 11. 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.

国内学会発表

1. 伊藤仁也、橋本尚子、永井謙一、清水則夫、永野誠司、有馬浩史、田端淑恵、松下章子、柳田宗之、渡邊 健、丸山京子、初山麻子、高橋隆幸
網羅的ウイルス・真菌PCR法を用いた造血細胞移植後肺障害の迅速診断
Use of multiplex PCR to detect universal virus or fungus in bronchoalveolar lavage of patients with lung disease after hematopoietic stem cell transplantation
第33回日本造血細胞移植学会 2011年3月10日 松山市
2. 谷ヶ崎博、加藤麻衣子、清水則夫、七野浩之、陳基明、麦島秀雄
非血縁骨髄ドナー由来の Chromosomal integrate HHV-6 (CIHHV-6) の1 女児例
第33回日本造血細胞移植学会 2011年3月10日 松山市

国際学会発表

1. Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakazawa A, Shimizu N, Yamamoto N, Morio T, Ohga S, Ito M, Komano J and Fujiwara S. Novel mouse xenograft models of CAEBV and EBV0HLH reveals a critical role of CD4+ T cells in the proliferation of EBV-infected T and NK cells. XV International Congress of Virology, Sept 2011, Sapporo, JAPAN.

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

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
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EBV感染症(Chronic active EB virus infection: CAEBV)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、その真の原因についての探索は限定的である。本研究では、CAEBVの分子基盤を明らかにするために、その責任遺伝子探索研究を行い、候補遺伝子の策定を行った。

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。T細胞やNK細胞へのEBVの持続感染が特徴とされており、また治療としては造血細胞移植が有効であることが示されているものの、本疾患の根本的原因は不明である。本研究ではCAEBVの遺伝的背景について検討を加えた。

B. 研究方法

- 1) 当院CAEBV患者における臨床データの集積
- 2) CAEBVの免疫学的特性に関する研究
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、免疫学的特徴について、multicolor flow cytometryによる免疫細胞亜群同定、B細胞・T細胞新生能解析を行った。またEBNA1, BZLF1などのペプチド刺激後の細胞内IFN- γ を測定し、ウイルス特異的T細胞の頻度を測定した(研究分担者である新井文子先生との共同研究)。
- 3) 上記患者の末梢血単核球よりDNAを抽出して、全エクソン解析を行った(研究分担者である新井文子先生との共同研究)。

(倫理面への配慮)

本研究は、患者検体(末梢血)を用いて解析を行った。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実施した。本研究に関しては、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実施した。

C. 研究結果

- 1) 当院CAEBV患者における臨床データの集積及び免疫学的特性の解析
今回解析を行った患者は2名共に造血細胞移

植が行われているが、移植前の解析により、NKT細胞の低値が観察された。また1名において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。

2) 遺伝的背景の研究

2名の患者検体から得たDNAをGenomiPhiを用いて増幅し、断片化後、全エクソンをAgilentのsureselectを用いて捕捉して、Illumina HiSeq2000を用いてwhole exome解析を行った。検査結果はRead mapping genome build 37 (hg19): (Genome Reference Consortium human build 37:UCSC human genome 19) with BWA version 0.5.9を用いて解析し、またVariationはSAM (Sequence Alignment/Map) tools version 0.1.18を用いて検出した。その結果、固有の変異と思われるものがそれぞれ300-400カ所に、homozygous/compound heterozygous mutationは50前後の領域に認められた。まず50カ所の異常についてはcapillary sequencingで確認し、1名においては有意な変異を確定した。

D. 考察

本年の研究では、免疫不全症を背景としたCAEBV患者に絞って解析を行い、CAEBVの病態の背景には遺伝的欠陥があることを示唆する所見を得た。昨年も指摘したように、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、その責任遺伝子数も増加傾向にある。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。今回行った全エクソン解析を端緒としてさらに解析を進めることにより、CAEBVの根本原因を明らかにし、さらには予防法、根治的治療法の開発に繋がることが期待できる。

E. 結論

免疫不全症を背景に発症したCAEBVにおいて、その遺伝子解析から、発症に関与すると思われるいくつかの遺伝子変異を抽出した。今後さらに責任遺伝子の同定を進める予定である。

F. 健康危険情報

報告すべき健康被害、健康危険情報はない。

G. 研究発表

国外

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

国内

1. 大川哲平、遠藤明史、富澤大輔、今井耕輔、高木正稔、長澤正之、森尾友宏、水谷修紀. IKBA 遺伝子異常(外胚葉形成不全免疫不全症)に対し非血縁者間骨髄移植を施行した1例. 第5回日本免疫不全症研究会, 東京, 2012年1月21日
2. 磯田健志、高木正稔、森尾友宏、水谷修紀、河本宏. ATM 欠損早期 T 細胞分化におけるリンパ球分化異常と発がんへの分岐点を可視化. 第5回日本免疫不全症研究会, 東京, 2012年1月21日
3. 力石健、北沢博、森尾友宏、峯岸正好、笹原洋二、土谷滋: 悪性リンパ腫を合併した成人期 Wiskott-Aldrich 症候群患者に対する骨髄非破壊的前処置による造血細胞移植の経験、第53回日本小児血液・がん学会学術集会、前橋、2011年11月25日-27日
4. 磯田健志、高木正稔、朴今花、増田喬子、伊川友活、東みゆき、森尾友宏、河本宏、水谷修紀: 遺伝性毛細血管拡張性小脳失調症の Double Negative 期における T リンパ球分化以上と発がんメカニズムの関係、第53回日本小児血液・がん学会学術集会、前橋、2011年11月25日-27日
5. 町田静香、富澤大輔、高木正稔、金子節子、金親あや乃、原田浩之、大川哲平、遠藤明史、梶原道子、長澤正之、森尾友宏、水谷修紀: 毛細血管拡張性運動失調症の女兒に発症した diffuse large B-cell lymphoma に対する rituximab 併用化学療法 of の経験、第

53回日本小児血液・がん学会学術集会、前橋、2011年11月25日-27日

6. 東良紘、長谷川俊史、平野玲史、橘高節明、森尾友宏、市山高志: 肺膿瘍をきたした高 IgE 症候群の1男児、第43回日本小児感染症学会総会・学術集会、第53回日本小児血液・がん学会学術集会、前橋、2011年11月25日-27日
7. 東良紘、長谷川俊史、平野玲史、橘高節明、森尾友宏、市山高志: 肺膿瘍をきたした高 IgE 症候群の1男児例、第43回日本小児感染症学会総会・学術集会、岡山、2011年10月29日-30日
8. 田中沙季、松原知代、三浦真梨子、田中登、鈴木恭子、大日方薫、清水俊明、森尾友宏: 血球貧食症候群を呈した重症複合型免疫不全症の乳児例、第43回日本小児感染症学会総会・学術集会、岡山、2011年10月29日-30日
9. 渡辺恵理、渡辺信和、森尾友宏、安部泰子、原寿郎、中内啓光: 重症複合免疫不全症に対する前処置軽減臍帯血移植後の混合キメリズム病態の解析、第73回日本血液学会学術集会、名古屋、2011年10月14日-16日
10. 森尾友宏: 分類不能型免疫不全症の病態解明へのアプローチ、第39回日本臨床免疫学会総会・学術集会、東京、2011年9月17日
11. 磯田健志、高木正稔、森尾友宏、水谷修紀: 毛細血管拡張性小脳失調症 (AtaxiaTelangiectasia) における細胞分化異常の解析、第39回日本臨床免疫学会総会・学術集会、東京、2011年9月15日
12. 高木正稔、篠田邦大、朴今花、満生紀子、森 真理、松田和之、村松秀城、土居崎小夜子、長澤正之、森尾友宏、笠原善仁、小池健一、小島勢二、高尾 明、Oliveira Joao B、水谷修紀: RAS associated ALPS like disease(RALD)の提唱、第114回日本小児科学会学術集会 教育セミナー、東京、2011年8月12日
13. 森尾友宏: T 細胞系免疫異常症における遺伝子診療、第18回日本遺伝子診療学会大会、第35回日本遺伝子カウンセリング学会学術集会、第17回日本家族性腫瘍学会学術集会、京都、平成23年6月16日~19日

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金 分担研究報告書
(難治性疾患克服研究事業 H22-難治-一般-080)研究

研究課題名(公募番号):

慢性活動性 EB ウイルス感染症の全国調査(2005~2010 年)

研究代表者 藤原成悦

分担研究者 脇口 宏

研究要旨

慢性活動性 EB ウイルス感染症(Chronic active EBV infection; CAEBV)は、T 細胞およびNK細胞への EB ウイルス感染に基づく腫瘍性リンパ増殖症で、数年経過で進行し致死的となる重症難治性疾患である。この疾患の現況を把握する目的で、アンケートによる全国調査を行い、患者発生状況を検討した。一次アンケートで CAEBV 症例ありと回答のあった施設に二次アンケートを送付し、臨床症状、検査所見、治療、予後等に関して集計、解析した。二次アンケートを送付した 148 例中 66 例から回答を得た(回収率 45%)。感染細胞は T 細胞、NK 細胞が主であり、感染細胞別での予後の差は認めなかった。造血幹細胞移植が施行された症例は 39 例(59%)で 2001~2004 年度(16 例/46 例; 35%)と比較して割合が増加していた。二次アンケート登録例での死亡率は 32%であり、2001~2004 年度(48%)と比較して低下していた。CAEBV の根治療法は造血幹細胞移植であり、造血幹細胞移植の進歩に伴う移植割合の増加が、予後改善に貢献していると考えられた。

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

佐藤哲也(助教)、堂野純孝(学内講師)、

久川浩章(講師)、藤枝幹也(准教授)

前田明彦(高知県立幡多けんみん病院小児科)

A.研究目的

慢性活動性 EB ウイルス感染症(Chronic active EBV infection; CAEBV)は、T 細胞およびNK細胞への EB ウイルス感染に基づく腫瘍性リンパ増殖症で、数年経過で進行し致死的となる重症難治性疾患である。患者は主として小児や働き盛りの若年青年層が主体であることから、この疾患の病態解明、治療の開発は患者個人にとっても、また、社会にとっても極めて重要である。

従来、CAEBV はわが国、韓国、台湾から多数報告例がみられた。近年、ヨーロッパから同疾患患者の報告がなされはじめており、注目度も上がっている。わが国では約 20 年前から熱心に研究されており、学術的にも診療レベルも高く、パイオニア的な役割を担っていることから、本研究の意義は国際的にもきわめて高い。

今回の研究は、過去の全国調査結果と比較し、治療予後の変化について検討し、より有効

な治療方法を明らかにする事を目的とした。

B.研究方法

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、発症時および診断時年齢、性別、死亡の有無、診断名、施設名について回答してもらい、CAEBV 患者発生状況を調査し集計した。今回は 2005～2010 年度の一次調査で CAEBV の症例ありと回答のあった施設に二次アンケートを送付し、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・検討する。

(倫理面への配慮)

アンケート調査では患者氏名はすべて匿名化し患者の個人情報の守秘を徹底した。

C.研究結果

二次アンケートを送付した 148 例中 66 例から回答を得た (回収率 45%)。性別は男 36 例で女 30 例であった。発症年齢は 1 歳～76 歳 (22.4±18.0 歳:中央値 18 歳) であった。

1. 発症時症状

発症時に伝染性単核症 (Infectious mononucleosis ; IM) 様症状、血球貪食症候群 (Hemophagocytic syndrome; HPS) を呈した割合はそれぞれ 41%、24%であった。

2. 臨床症状

臨床症状で頻度の高いものは発熱 (86%)、脾腫 (58%)、肝腫大 (55%)、リンパ節腫大 (42%) であった。

3. 続発症・合併症

続発症・合併症として最も多かったのは HPS (26%) であり、以下悪性リンパ腫 (17%)、皮膚潰瘍 (15%) の順であった。

4. 抗体価、DNA 量

抗体価に関しては、2002 年に作成した診断指針で示された目安である、VCA-IgG 抗体価 640 倍以上、EA-IgG 抗体価 160 倍以上の上昇を認めた例はそれぞれ 34 例 (52%)、24 例 (36%) であった。末梢血単核球中の EBV-DNA 量 (定量 PCR) は単核球では 10^5 copy/ μ gDNA レベルでの報告が多く認められた。

5. 感染細胞の同定と予後

CAEBV では主として T 細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞に EB ウイルスが感染している。今回の調査では感染細胞は T 細胞 29 例、NK 細胞 22 例であり、両方に感染している例は 3 例認められた。感染細胞別の予後に関する検討では死亡率は T 細胞 21% (6 例/29 例)、NK 細胞 23% (5 例/22 例) でほぼ同程度であった。T/NK 重複感染例では 33% (1 例/3 例) であった。

6. EBV 感染細胞のクロナリティ

CAEBV では感染細胞が腫瘍性に単クローン性(monoclonal)の増殖を呈する。今回の調査では、クロナリティが検索できた症例 50 例中 43 例 (86%)が monoclonal であった。その他に oligoclonal 4 例(8%)、polyclonal 3 例(6%)であった。

7. 死亡率、発症年齢別の予後

二次アンケート登録例での死亡率は 32% (21 例/65 例) であり、2001～2004 年度 (48%) と比較して低下していた。また発症から死亡に至るまでの期間は 1 カ月～7 年 (平均 2.3 ±2.1 年) であった。

発症年齢別の予後に関する検討では、20 歳代と 50 歳代以降で、他の年代より比較的死亡率が高い傾向が認められた。

8. 初回治療

回答のあった 56 例中 41 例 (73%) で化学療法が行われており、大半が免疫化学療法を先行後 cytoreduction 目的で強力な多剤併用化学療法を行っていた。化学療法の効果判定では、寛解導入 (CR) された例は 3 例のみであり、その他は、部分寛解 (PR) 12 例, 病状不変 (SD) 13 例, 病状進行 (PD) 10 例であった。

9. 造血幹細胞移植

報告例のうち造血幹細胞移植が施行された症例は 39 例 (59%) で 2001~2004 年度 (16 例/46 例; 35%) と比較して割合が増加していた。

移植症例 39 例中死亡例は 6 例 (15%) であった。移植ドナーは血縁と非血縁がほぼ同程度の割合であり、HLA 一致と不一致の割合もほぼ同程度であった。移植材料は骨髄、臍帯血、末梢血幹細胞の順が多かった。前処置は、近年急速に進歩した、前処置の強度を落とし移植後免疫反応による抗腫瘍効果を期待した骨髄非破壊的処置 (ミニ移植) が多く施行されていた。

移植の有無と感染細胞のタイプでの予後に関しては、移植例では T 細胞と NK 細胞で明らかな差は認められなかった。移植未実施例では、T 細胞例で予後が良い傾向が認められた。

D. 考察

初発時の臨床症状、合併症、続発症は 2001~2004 年度の調査と大きな差は認めなかった。感染細胞別の予後では T 細胞と NK 細胞で死亡率はほぼ同程度であった。造血幹細胞移植が施行された症例の割合が 2001~2004 年度の調査と比較して増加していた。CAEBV の根治治療は造血幹細胞移植であり、骨髄非破壊

的同種造血幹細胞移植の進歩や、移植を念頭に置いた治療の浸透により、移植割合が増加したと考えられた。正確な長期予後は反映していないが、今回の解析では 2001~2004 年度の調査と比較して死亡率は低下しており、造血幹細胞移植の増加が、予後の改善に貢献している可能性が考えられた。一方で移植未施行例でも無病生存している症例があり、こうした軽症例に対する移植の適応、タイミングの決定が今後の課題と考えられた。

CAEBV は従来小児科で診療される事が多かったが、内科で診療される患者が増加していた。内科医師の疾患認知度が向上している事が推測された。高齢者では移植適応のない症例もあり、また化学療法を小児と同等のプロトコルで行うかどうかは今後の検討課題である。また、今回の解析では十分検討出来ていない項目もあり、長期予後の検討等、引き続き追跡調査を含めて今後の課題とする予定である。

E. 結論

2005~2010 年度にかけての CAEBV 例に関して、アンケートによる全国調査を行い検討した。2001~2004 年度と比較して死亡率が低下しており、造血幹細胞移植の進歩に伴う移植割合の増加が、予後改善に貢献していると考えられた。

CAEBV はわが国から発信された疾患概念であり、これまでの全国調査によって目覚ましく病態解明が進み、2003 年に診断基準が確立された。今後もこうした多数例を対象とした大規模調査を継続して行う事により、適切な診断、治療成績の向上に貢献出来ると考えられる。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hosokawa T; Kumon Y; Kobayashi T; Enzan H; Nishioka Y; Yuri K. Hiroshi Wakiguchi; Tetsuro Sugiura. Neutrophil infiltration and oxidant-production in human atherosclerotic carotid plaques, *Histology and Histopathology*, 26, 1-11, 2011

2) Fujieda M, Morita T, Naruse K, Hayashi Y, Ishihara M, Yokoyama T, Toma T, Ohta K, Wakiguchi H.: Effect of pravastatin on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Hum Exp Toxicol*, 30, 603-605, 2011

3) 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.

4) 脇口宏：カンジダ症～エールリヒア感染症. 最新感染症ガイド R-Book 2009 (米国小児科学会編集, 岡部信彦監修), 245-286, 日本小児医事出版社, 2011

5) 脇口宏：IX感染症. 小児科学テキスト第2版(清野佳紀, 小田 慈編集), 205-236, 南江堂, 2011

6) 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

7) 佐藤哲也, 前田明彦, 脇口宏：VII感染症 6. ヘルペス群ウイルスに対する抗ウイルス薬の処方根拠は？. EBM 小児疾患の治療 2011-2012(五十嵐隆, 石井正浩, 滝田順子,

平岩幹男, 水口 雅, 横田俊平, 横谷 進, 渡辺とよ子編), 359-612, 中外医学社, 2011
8) 佐藤哲也, 前田明彦, 脇口宏：V各論 B. ウイルス感染症 4)単純ヘルペス. 小児感染症学 改訂第2版(岡部信彦編), 324-329, 診断と治療社, 2011

9) 前田明彦, 佐藤哲也, 堂野純孝, 久川浩章, 藤枝幹也, 脇口 宏：ウイルス感染症と免疫異常. ウイルス関連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

10) 前田明彦, 佐藤哲也, 藤枝幹也, 脇口宏：ウイルスの今日的意味 臨床ウイルス学の観点から Epstein-Barr ウイルスのさまざまな病態. 化学療法の領域, 27, 657-666, 2011

11) 脇口 宏：【よくみる子どもの感染症 Q&A】 ウイルス感染にどう対処するか EB ウイルス. 小児科学レクチャー, 1, 348-355, 2011

12) 脇口 宏：【内科 疾患インストラクションガイド 何をどう説明するか】 感染症 Epstein-Barr ウイルス感染症(伝染性単核球症). *Medicina*, 48, 538-540, 2011

2. 学会発表

1) Olshi t, Maeda A, Sato T, Takasugi H, Hisakawa H, Wakiguchi H : Erythema Multiforme Occurs Following The Clinical Course Of Exanthema Subitum . 67Th American Academy of Allergy, Asthma & Immunology (AAA&I), San Francisco(USA)

2) 脇口 宏：EB ウイルス関連疾患 (特別講演). 第22回高知県感染症研究会, 2011, 4, 高知

3) 脇口 宏：EB ウイルス感染とアレルギー

一（特別話題）. 第 23 回中国・四国臨床アレルギー研究会, 2011, 9, 岡山

4) 堂野純孝, 富田 理, 久川浩章, 佐藤哲也, 高杉尚志, 前田明彦, 阿部孝典, 脇口宏: 移植 15 カ月後、髄液中に LGL を認めた EBV 関連 NK リンパ腫の 1 例. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2011, 11, 前橋

5) 阿部孝典, 木村正宏, 品原久美, 久川浩章, 堂野純孝, 脇口 宏: 高フェリチン血

症が自然軽快した Hemophagocytic lymphohistiocytosis の 1 カ月女児例. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

CAEBV モデルマウスの開発と応用

研究分担者 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

研究協力者 今留謙一 国立成育医療研究センター研究所 母児感染研究部
新井文子 東京医科歯科大学大学院血液内科
駒野 淳 国立感染症研究所エイズ研究センター

研究要旨 EB ウイルス（EBV）関連血球貪食性リンパ組織球症（EBV-HLH）は、慢性活動性 EBV 感染症（CAEBV）とともに EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患に分類され、T 或いは NK 細胞のモノ（オリゴ）クローナルな増殖など CAEBV と共通の病態をもつが、主に EBV 初感染に続発し急性で重篤な経過をとるなど相違点も多い。本年度は、両疾患の病態の違いをさらに詳しく解析するために、EBV-HLH 患者末梢血単核細胞を NOD/Shi-*scid*/IL-2R γ c^{null}（NOG マウス）に移植し、その病態をマウスで再現することを試みた。移植後のマウスでは、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。これらのモデルマウスを用いて、EBV-HLH と CAEBV の病態解析と治療法開発が進展することが期待される。

A. 研究目的

EB ウイルス（EBV）関連血球貪食性リンパ組織球症（EBV-HLH）は、骨髄等における血球貪食像、高サイトカイン血症、血液凝固の異常などを特徴とする極めて重篤な疾患であるが、EBV 感染 T（時に NK）細胞のモノ（オリゴ）クローナルな増殖という点で慢性活動性 EBV 感染症（CAEBV）と類似しており、ともに EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患に分類されている。CAEBV 患者に EBV-HLH が合併することも希では

ない。しかし、CAEBV が慢性の経過をとるものの根治的治療には造血幹細胞移植を必要とするのに対し、EBV-HLH は急激で重篤な経過をとりながら、免疫化学療法や血漿交換などの治療により治癒が期待できる疾患である。同じく EBV 感染 T 或いは NK 細胞の増殖を特徴としながら、このような大きな病態の違いを示す理由は分かっていない。そこで本年度は CAEBV と EBV-HLH の病態の違いを詳しく解析するために、後者のモデルマウス作成を試みた。

B. 研究方法

1. NOD/Shi-*scid*/IL-2R γ c^{null} (NOG) マウス

NOG マウスは NOD/Shi-*scid* マウスと、IL-2 受容体コモン γ 鎖ノックアウトマウスを掛け合わせたもので、造血幹細胞を含めたヒト造血系細胞の生着に最も適した免疫不全マウスの一つである。NOG マウスは実験動物中央研究所より購入し、国立感染症研究所無菌飼育室で飼育した。

2. EBV-HLH 患者末梢血単核細胞の移植

末梢血より Ficoll 比重遠心法により単核細胞を分離し、 $1\sim 5 \times 10^6$ 細胞を尾静脈より注射した。移植後定期的に、末梢血中の EBV DNA 量およびヒト CD45⁺細胞数を測定し、EBV 感染細胞生着の指標とした。

3. EBV DNA の定量および EBV 遺伝子発現解析

EBV DNA は木村らの方法を用いてリアルタイム PCR 法により測定した。EBV 遺伝子の発現解析は、RT-PCR 法、免疫化学染色、*in situ hybridization* (EBER の場合) によった。

4. リンパ球マーカー発現の解析

リンパ球表面マーカー発現解析は、蛍光標識モノクローナル抗体を結合させた後、ベックマン・コールター社フローサイトメーターCytomics FC500 を用いて解析した。

5. 血中サイトカインレベルの測定

ヒトサイトカイン特異的 ELISA キット (R&D Systems) を用いて、マウス血漿中の IFN- γ 、IL-8、RANTES レベルを測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は直接ヒトを対象とする医療行為を含まないが、EBV-HLH 患者由来ヒト

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

C. 研究結果

1. EBV-HLH 患者由来 EBV 感染 T 細胞の NOG マウスへの生着

4名の EBV-HLH 患者末梢血由来単核細胞を用いて計 14 回の移植実験を行ったところ、全ての実験において EBV 感染 CD8⁺T 細胞が NOG マウスに生着した (表 1)。移植後 3-4 週間後にマウス末梢血に EBV DNA が出現し $10^5\sim 10^6$ copies/ μ g DNA まで急激に上昇した (表 1、図 2)。マウス末梢血では CD8⁺T 細胞が増加しており、この分画から DNA を抽出してリアルタイム PCR により解析したところ EBV DNA が検出されたため、患者におけるのと同様に CD8⁺細胞に EBV が感染していることが分かった (図 1)。マウスの体重は急激に減少し一般状態が極めて不要となったため移植後 4-6 週間後に倫理的配慮に基づき安楽死させた。解剖時の肉眼的所見としては、脾腫大が全てのマウスに認められた (図 3)。また、一部のマウスでは、胸腔或いは腹腔内に肉眼的な出血性病変が多数認められた (図 4)。

2. EBV-HLH 由来 EBV 感染 T 細胞が生着

したマウス末梢血におけるサイトカイン測定

IL-8 は約 400 pg/ml、IFN- γ は約 4,000 pg/ml であり、CAEBV 患者の数倍～10 倍程度と極めて高い値を示した。RANTES は 1,000 pg/ml であり、CAEBV とほぼ同程度であった (図 5)。

3. EBV-HLH マウスの病理組織学的解析

EBV-HLH の 4 症例の末梢血単核細胞を用いて作成したモデルマウスの脾臓及び肝臓組織を用い、EBER in situ hybridization と CD20 或いは CD45RO の二重染色を行ったところ、ほぼ全ての EBER 陽性細胞は CD20 陽性の B リンパ球であった (図 6)。

D. 考察

EBV-HLH 患者由来の EBV 感染 T 細胞も、CAEBV の場合と同様に末梢血単核細胞の静脈内接種により生着し全身的な増殖を示すことが分かった。このことは、EBV-HLH が基本的に CAEBV と同様な EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患であることを示していると考えられた。一方 CAEBV モデルマウスと EBV-HLH モデルマウスの間には明らかな違いも存在していた。まず、EBV-HLH マウスでは末梢血単核細胞移植後の末梢血 EBV-DNA 上昇がより早期に起こり、全身状態の悪化も急激であった。これは、CAEBV が基本的に慢性疾患であるのに対し、EBV-HLH が急性かつ重篤な疾患であることと一致していると考えられる。次に、EBV-HLH マウスでは CAEBV マウスと比べて末梢血ヒトサイトカインレベルが高く、EBV-HLH の極めて高度の高サイトカイン血症を再現していると考えられた。また、EBV-HLH マウスでは胸腔内或いは腹

腔内に多数の出血性病変が認められ、EBV-HLH の特徴的症候である凝固異常を再現している可能性があると考えられた。さらに、CAEBV マウスでは脾臓、肝臓においても EBV 感染 T 或いは NK 細胞が見つかり、末梢血と一致していたのに対し、EBV-HLH マウスでは、脾臓及び肝臓において主に EBV 感染 B 細胞が見つかり、末梢血と一致していなかった。臓器と末梢血で主たる EBV 感染細胞分画が異なっていること理由は現時点では不明である。しかし、実際の EBV-HLH 症例の臓器における EBV 感染細胞の同定はこれまでほとんど報告がないため、今後脾臓や肝臓で EBV 感染 B 細胞が検出される可能性は残されていると考えられる。

EBV-HLH の根本的病態は EBV 感染 T (時に NK) 細胞及びそれに応答する T リンパ球やマクロファージからの大量のサイトカイン産生にあると考えられている。今後 IFN- γ 、IL-8 等に対する抗体の投与によりサイトカインレベルを下げた場合のマウスにおける治療効果を検討し、EBV-HLH に対する抗サイトカイン治療の基礎実験を行う計画である。

E. 結論

EBV-HLH 患者の末梢血単核細胞を NOG マウスに移植することにより、EBV 感染 T 細胞の全身的増殖、高サイトカイン血症、出血性病変など EBV-HLH に特徴的な病態を再現することに成功した。このモデルにより EBV-HLH の発症機構解明と治療法開発が促進されると期待する。また、CAEBV との病態の違いも明らかになる可能性がある。

F. 健康危機情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

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 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.

2) Kuwana Y, Takei M, Yajima M, Imadome K, Inomata H, Shiozaki M, Ikumi N, Nozaki T, Shiraiwa H, Kitamura N, Takeuchi J, Sawada S, Yamamoto N, Shimizu N, Ito M, and Fujiwara S. Epstein-Barr Virus Induces Erosive Arthritis in Humanized Mice. *PLoS ONE*, 6(10): e26630, 2011.

3) 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.

2. 著書

なし

3. 学会発表

(国際学会)

1) 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.

2) 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.

3) 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) 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- κ B leading to lymphoproliferative diseases development. 日本血液学会学術集会、2011年9月.

2) 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.

3) 今留謙一、福田晃也、川野布由子、市川紗弓、今井由美、望月雅司、重田孝信、阪本靖介、笠原群生、藤原成悦. 小児生体肝移植後の免疫抑制剤減量に伴うEBV特異的CTL誘導の検討. 第8回EBウイルス研究会、2011年7月8日、大阪.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

表1 EBV-HLH患者とNOGマウスへの末梢血単核細胞移植の結果

Patient number	Diagnosis	sex	age	Type of infected cells	¹ EBV DNA load in the patients	² Engrafted cells in mice	³ Engraftment	¹ EBV DNA load in mice
1	EBV-HLH	M	10	CD8	2.8~38×10 ⁴	CD8, CD4	2/2, 2/2	6.5~9.9×10 ⁴
2	EBV-HLH	M	50	CD8	6.2×10 ⁵	CD8, CD4	4/4	7.0~45×10 ⁴
3	EBV-HLH	M	1	CD8	3.1×10 ⁵	CD8, CD4	2/2	6.0~9.1×10 ⁴
4	EBV-HLH	M	64	CD8	3.2~3.9×10 ⁵	CD8, CD4	2/2, 2/2	5.0~30×10 ⁵

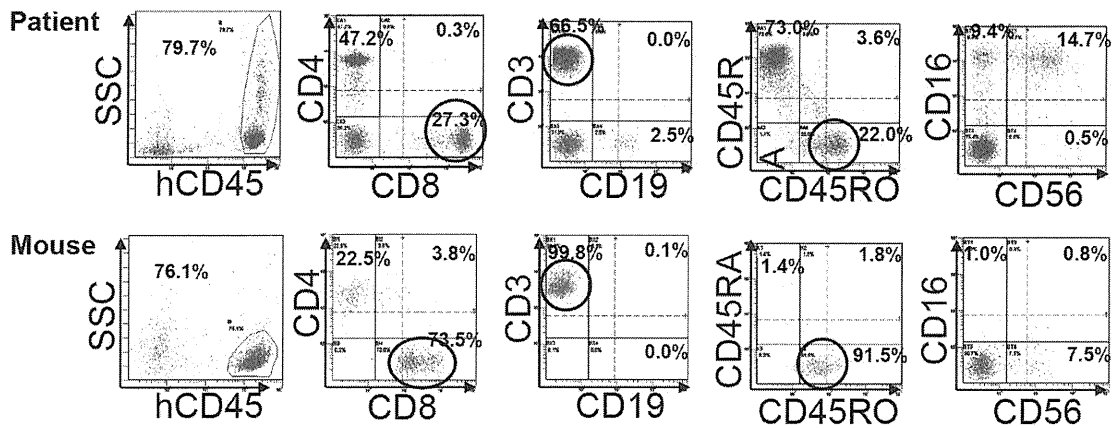


図1. EBV-HLH患者とモデルマウスにおけるEBV感染細胞の同定. 表1の患者? (上)とその患者の末梢血単核細胞を移植して得られたモデルマウス(下)の末梢血におけるフローサイトメトリー解析の結果を示す. EBV DNAが検出された分画を○で示す. 患者とマウスでは同じフェノタイプを有する細胞が増殖しており、その細胞にEBVが感染していた。

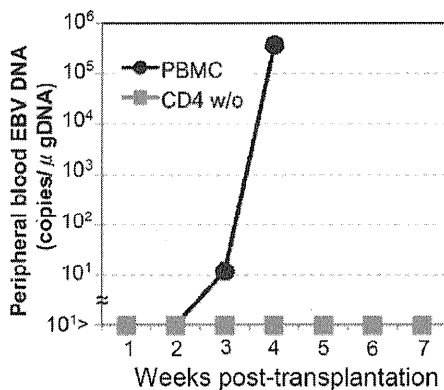


図2. EBV-HLH患者末梢血単核細胞移植後のNOGマウスにおける末梢血EBV DNA量の変化.

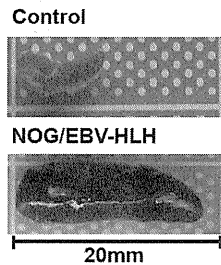


図3. EBV-HLHモデルマウスの脾腫大.