

胞を NOG マウスに移植した後生着・増殖した細胞のフェノタイプを解析することにより、感染細胞の正確な同定を行うことを試みた。

B. 研究方法

1. CAEBV 患者

発熱、リンパ節腫脹、肝脾腫、肝機能障害、末梢血 EBV DNA 量上昇などの所見により CAEBV を疑われた。

2. リンパ球分画と EBV DNA 定量

比重遠心法により単核細胞分画を得た後、順番に磁気ビーズ付抗 CD19、抗 CD4、抗 CD8、抗 CD56、抗 CD14 抗体と反応させ、それぞれのマーカーを発現する細胞の分画を得た。単核細胞全体、それぞれの細胞分画、どの抗体とも反応しなかった分画のそれぞれについてリアルタイム PCR 法により EBV DNA 量を測定した。

3. NOG マウスへの異種移植

末梢血単核細胞より CD56⁺細胞を磁気ビーズ付抗体により除去した後、 5×10^5 個の細胞を6週齢の雌 NOG マウスの尾静脈内に接種した。接種後毎週末梢血 EBV DNA 量を測定し、 1×10^5 copies/ μ g DNA に達した段階で安楽死させ、全採血を行った。その後上記と同様の方法でリンパ球を分画し、それぞれの EBV DNA 量を測定した。

(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、CAEBV 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の倫理審査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

本患者の末梢血解析の結果、各細胞分画の EBV DNA レベルは以下の通りであった：全単核細胞分画、 2.1×10^4 copies/ μ g DNA；CD19⁺分画、検出感度以下；CD4⁺分画、検出感度以下；CD8⁺分画、 8.6×10^3 copies/ μ g DNA；CD56⁺分画、 1.3×10^6 copies/ μ g DNA；CD14⁺分画、検出感度以下；その他 (CD19⁻CD4⁻CD8⁻CD56⁻CD14⁻)、 6.5×10^2 copies/ μ g DNA。さらに詳しい解析により CD56⁺CD8⁻CD16⁺分画に確実に EBV が感染していることが判明した。しかし上記のように CD8⁺分画にも中程度の EBV DNA 量が検出されたことから、CD56⁺CD8⁻CD16⁺分画以外のフェノタイプの細胞にも感染している可能性が考えられた (図 1A)。そこでこの可能性を検証すること、またそのような細胞があるとしたらその詳細なフェノタイプを決定することを目的として NOG マウスへの移植実験を行った。患者末梢血単核細胞から磁気ビーズ付き抗体により CD56⁺細胞分画を除去した後 NOG マウスに移植した。患者末梢血において最も EBV DNA レベルが高かった CD56⁺分画を除いてもマウスに EBV 感染細胞が生着・増殖し、そのフェノタイプは CD56⁺CD16⁺CD8⁺であった (図 1B)。以上より、複数の lineage の細胞に EBV が感染していて患者末梢血を用いた解析ではそのフェノタイプ決定

が困難な場合でも、NOG マウスに移植し EBV 感染細胞を選択的に増幅することにより、詳細なフェノタイプ決定が可能となる場合があることが分かった。

D. 考察

CAEBV 患者末梢血単核細胞を NOG マウスに移植すると EBV 感染細胞が選択的に増殖するため、フェノタイプ解析のために十分な数の感染細胞を得ることができ、患者末梢血では不可能であった解析を行うことができた。以前に私たちは CAEBV 患者末梢血細胞を移植された NOG マウスでは、患者と同一の EBV 感染細胞クローンが増殖していることを示しており、マウスへの移植により患者のものとは異なる感染細胞クローンが増殖した例は経験していない。以上より、複数の lineage に EBV が感染している場合や血液量が少ない場合など感染細胞のフェノタイプ決定が困難である場合に、NOG マウスへの移植を行うことにより正確な解析が可能になる場合があると考えられた。ただし、複数の感染細胞クローンが存在する場合、どのクローンも同じ効率でマウスに生着し同じスピードで増殖するかどうかは、ケースにより異なる可能性も考えられ、今後の検討が必要である。

E. 結論

複数の EBV 感染細胞クローンが存在するため、患者末梢血を用いて EBV 感染細胞のフェノタイプ解析が困難であった症例において、末梢血単核細胞を NOG マウスに移植し EBV 感染細胞を増殖させることにより、正確なフェノタイプ解析が可能となった症例を経験した。NOG マウスへの移植は EBV 感染細胞の正確な同定を

するための補助手段として有用であると考えられた。

F. 健康危機情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Siddiquey MN, Nakagawa H, Iwata S, Kanazawa T, Suzuki M, Imadome KI, Fujiwara S, Goshima F, Murata T, Kimura H. Anti-tumor effects of suberoylanilide hydroxamic acid on Epstein-Barr virus-associated T- and natural killer- cell lymphoma. *Cancer Sci.* 2014; 105(6):713-22.

2) Yoshimori M, Imadome KI, Komatsu H, Wang L, Saitoh Y, Yamaoka S, Fukuda T, Kurata M, Koyama T, Shimizu N, Fujiwara S, Miura O, Arai A. CD137 expression is induced by Epstein-Barr virus infection through LMP1 in T or NK cells and mediates survival promoting signals. *PLoS ONE*, 2014 Nov 19;9(11):e112564.

3) Fukuda A, Imadome K-I, Sakamoto S, Shigeta T, Uchida H, Matsunami M, Sasaki K, Kanazawa H, Kawano F, Nakazawa A, Fujiwara S, and Kasahara M. Evaluation of the Immune Function Assay in Pediatric Living Donor Liver Transplantation. *Pediatr Transplant* 2014 Nov 23. doi: 10.1111/ptr.12402. [Epub ahead of print]

4) Fujiwara S, Kimura H, Imadome K, Arai A, Kodama, E, Morio T, Shimizu N, and Wakiguchi H. Current research on chronic active Epstein-Barr virus infection in Japan. *Pediatr Int*, 56:159-66. 2014.

5) Fujiwara S, Imadome K, and Takei M.

Modeling EBV infection and pathogenesis in new-generation humanized mice. *Exp Mol Med* 47, e136; doi:10.1038/emm.2014.102
Published online 23 January 2015.

2. 著書

なし

3. 学会発表

(国際学会)

1) Imadome K, Matsuda G, Kawano F, Kodama E, Arai A, Shimizu N, Fujiwara S. Applications of mouse models of EBV-associated diseases for the evaluation of novel therapies. 16th International Symposium on EBV and Associated Diseases. Brisbane, 16-19 July, 2014.

2) Imadome K, Matsuda G, Kawano F, Kodama E, Arai A, Shimizu N, Fujiwara S. Preclinical studies of novel therapies for Epstein-Barr virus-associated diseases in humanized mouse models. 39th Annual International Herpesvirus Workshop. Kobe, 20-23 July, 2014.

3) Siddiquey M, Nakagawa H, Iwata S, Kanazawa T, Suzuki M, Imadome K, Fujiwara S, Goshima F, Murata T, Kimura H. Anti-tumor effects of suberoylanilide hydroxamic acid on Epstein-Barr virus-associated T- and natural killer-cell lymphoma. 39th Annual International Herpesvirus Workshop. Kobe, 20-23 July, 2014.

(国内学会)

1) Honami Komatsu, Ken-Ichi Imadome, Tomotaka Yata, Takatoshi Kiyama, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura, Ayako Arai. STAT3 is activated by EBV infection through LMP1 in EBV-T-LPDs and can be a therapeutic target. 第76回日本血液学会 2014.10.31 - 11.2 大阪.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

図 表

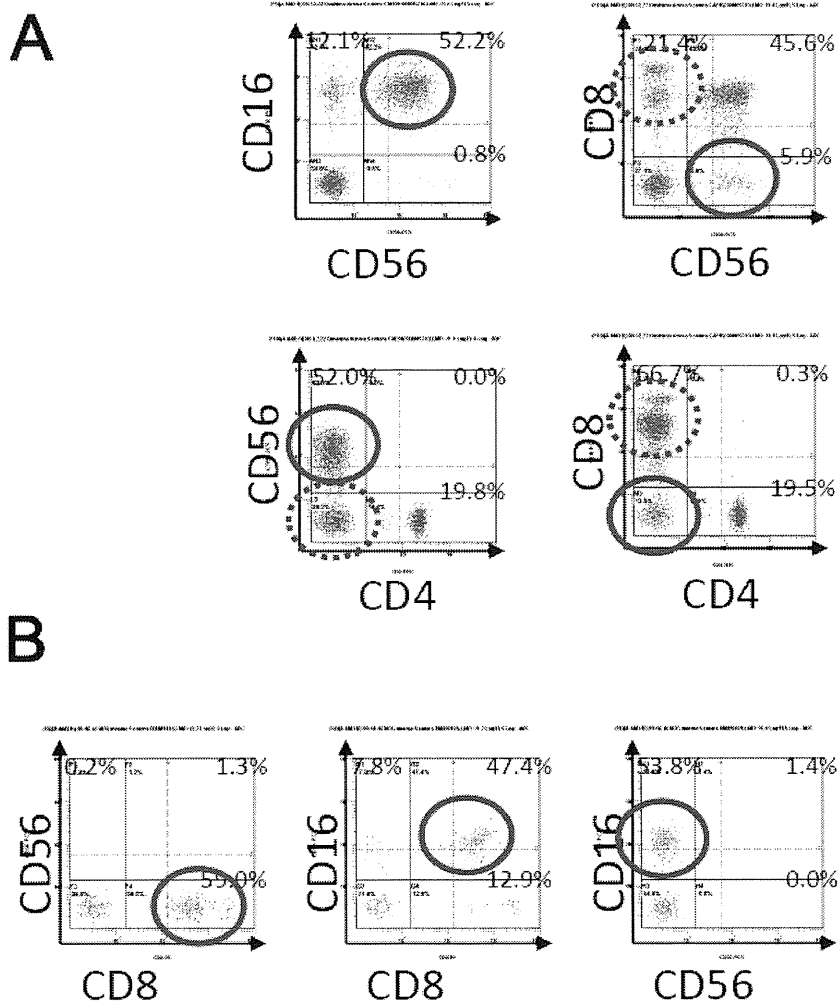


図 1. NOG マウスへの移植を介する EBV 感染細胞分画の決定. A. 患者末梢血単核細胞の解析. EBV DNA が確実に検出された分画を実線、低レベルで検出された分画を破線の丸で示す. B. 患者細胞を移植したマウス末梢血の解析. 患者末梢血単核細胞から CD56+細胞を除去した後 NOG マウスに移植した. EBV 感染細胞が生着した後末梢血単核細胞を解析した. EBV DNA が確実に検出された分画を実線の丸で示す.

厚生労働科学研究費補助金
 (難治性疾患等政策研究事業 (難治性疾患政策研究事業))
 分担研究報告書

NK/T 細胞リンパ腫における JAK3 に関する研究

研究分担者 氏名 大島孝一 所属 久留米大学医学部病理 職名 教授

研究要旨

最近シンガポールのグループより Janus Kinase 3 (JAK3)の活性化に関する遺伝子変異の報告があり、それらの遺伝子変異の解析を 59 例の末梢性 T 細胞性リンパ腫 (PTCL) および節外性の NK/T 細胞性リンパ腫 (ENKTL) について解析を行った。3 例に 4 カ所の遺伝子変異を見つけたが、それらは、すべて ENKTL の症例であり、ENKTL の 15.8% に相当する。しかしながら、シンガポールからの報告は活性化に関する遺伝子変異であったが、我々の症例ではサイレントな変化であった。また JAK2 のリン酸化を免疫染色で解析したところ ENKTL の 30.8% が陽性であった。

A. 研究目的

Janus Kinase 3 (JAK3) は造血細胞の分化に重要な役割を示されており、最近シンガポールのグループより Janus Kinase 3 (JAK3) の活性化に関する遺伝子変異の報告があり、35.4% の ENKTL での活性化遺伝子変異の報告が見られている。今回、それらの遺伝子変異の重要性を末梢性 T 細胞性リンパ腫 (PTCL) および節外性の NK/T 細胞性リンパ腫 (ENKTL) について解析を行った。

B. 研究方法

対症：久留米大学およびタイ、マヒドン大学で診断を行った症例：ATLL：14 例、PTCL-NOS：11 例、CAEBV：4 例、AITL：11 例 (久留米大学)、ENKTL 19 例 (マヒドン大学)

方法：ホルマリン固定材料、パラフインブロックを用い解析を行った。遺伝子解析は JAK3 の exon13 領域を PCR 法で増幅し、遺伝子配列の解析を行った。また、

リン酸化 JAK2 に対する抗体を用い免疫染色を行った。

倫理面への配慮)

ヘルシンキ宣言に従って研究を実施した。

C. 研究結果

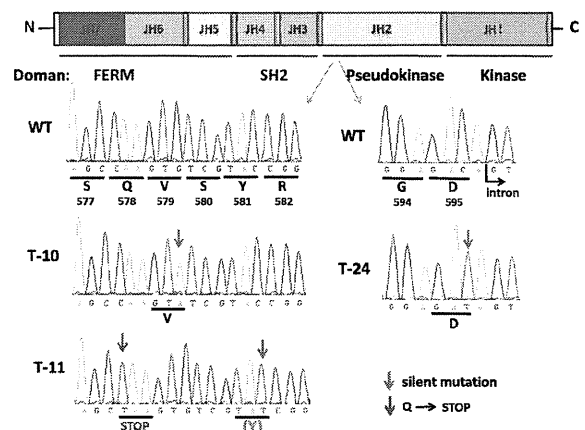


Figure 1. JAK3 mutation sites detected by singer sequencing

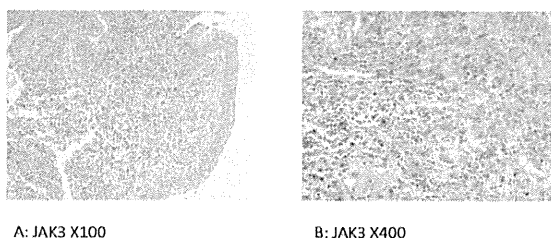


Figure 2. Immunostaining of JAK3 (phospho Y785) against NK/TCL

3例に4カ所の遺伝子変異を見つけたが、それらは、すべてENKTLの症例であり、ENKTLの15.8%に相当する。しかしながら、シンガポールからの報告は活性化に関する遺伝子変異であったが、我々の症例ではサイレントな変化であった。またJAK2の磷酸化を免疫染色で解析したところENKTLの30.8%が陽性であった。

D. 考察

Janus Kinase 3 (JAK3)は造血細胞の分化に重要な役割を示されており、これまで、ATLLやリンパ増殖性疾患での遺伝子変異の報告がある。また、最近シンガポールのグループよりJanus Kinase 3 (JAK3)の活性化に関する遺伝子変異の報告があり、35.4%のENKTLでの活性化遺伝子変異の報告が見られている。しかしながら、我々の検索においては、3例に遺伝子変異を見つけたが、それらは、すべてENKTLの症例でサイレントな変化であった。しかしながら、JAK2の磷酸化を解析したところENKTLの30.8%が活性化されており、遺伝子変異によらない活性化経路があると考えられる。

E. 結論

今後、JAK2の活性化経路の解析することで治療法の進展の可能性があると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Activated janus kinase 3 expression not byactivating mutations identified in natural killer/T-cell lymphoma. Guo Y, Arakawa F, Miyoshi H, Niino D, Kawano R, Ohshima K. *Pathol Int.* 2014;64(6):263-6.
2. Epstein-Barr virus is rarely associated with diffuse large B cell lymphoma in Taiwan and carries a trend for a shorter median survival time. Chang ST, Lu YH, Lu CL, Weng SF, Lin SH, Kuo SY, Chuang YT, Takeuchi K, Ohshima K, Chuang SS. *J Clin Pathol.* 2014 Apr;67(4):326-32
3. MicroRNA-150 inhibits tumor invasion and metastasis by targeting the chemokine receptor CCR6, in advanced cutaneous T-cell lymphoma. Ito M, Teshima K, Ikeda S, Kitadate A, Watanabe A, Nara M, Yamashita J, Ohshima K, Sawada K, Tagawa H. *Blood.* 2014 Mar 6;123(10):1499-511
4. Loss of NDRG2 expression activates PI3K-AKT signalling via PTEN phosphorylation in ATLL and other cancers. Nakahata S, Ichikawa T, Maneesaay P, Saito Y, Nagai K, Tamura T, Manachai N, Yamakawa N, Hamasaki M, Kitabayashi I, Arai Y, Kanai Y, Taki T, Abe T, Kiyonari H, Shimoda K, Ohshima K, Horii A, Shima H, Taniwaki M, Yamaguchi R, Morishita K. *Nat Commun.* 2014 Feb 26;5:3393.
5. Pediatric Subcutaneous Panniculitis-Like T-Cell Lymphoma with Favorable Result by Immunosuppressive Therapy: A Report of Two Cases. Nagai K, Nakano N, Iwai T, Iwai A, Tauchi H, Ohshima K, Ishii E. *Pediatr Hematol Oncol.* 2014 Mar 31. [Epub ahead of print]
6. Relationship between 2-deoxy-2-[(18)F]-fluoro-d-glucose uptake and clinicopathological factors in patients with diffuse large B-cell lymphoma. Hirose Y, Suefuji H, Kaida H, Hayakawa M, Hattori S, Kurata S, Watanabe Y, Kunou Y, Kawahara A, Okamura T, Ohshima K, Kage M,

- Ishibashi M, Hayabuchi N. Leuk Lymphoma. 2014 Mar;55(3):520-5.
7. Gene expression profiling of Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly reveals alterations of characteristic oncogenetic pathways. Kato H, Karube K, Yamamoto K, Takizawa J, Tsuzuki S, Yatabe Y, Kanda T, Katayama M, Ozawa Y, Ishitsuka K, Okamoto M, Kinoshita T, Ohshima K, Nakamura S, Morishima Y, Seto M. Cancer Sci. 2014 May;105(5):537-44.
 8. CD5-positive follicular lymphoma characterized by CD25, MUM1, low frequency of t(14;18) and poor prognosis. Miyoshi H, Sato K, Yoshida M, Kimura Y, Kiyasu J, Ichikawa A, Ishibashi Y, Arakawa F, Nakamura Y, Nakashima S, Niino D, Sugita Y, Ohshima K. Pathol Int. 2014 Mar;64(3):95-103.
 9. Array-comparative genomic hybridization profiling of immunohistochemical subgroups of diffuse large B-cell lymphoma shows distinct genomic alterations. Guo Y, Takeuchi I, Karnan S, Miyata T, Ohshima K, Seto M. Cancer Sci. 2014 Apr;105(4):481-9.
 10. Microarray analysis of gene expression by microdissected epidermis and dermis in mycosis fungoides and adult T-cell leukemia/lymphoma. Hashikawa K, Yasumoto S, Nakashima K, Arakawa F, Kiyasu J, Kimura Y, Saruta H, Nakama T, Yasuda K, Tashiro K, Kuhara S, Hashimoto T, Ohshima K. Int J Oncol. 2014 Sep;45(3):1200-8.
 11. Dysregulation of BMI1 and microRNA-16 collaborate to enhance an anti-apoptotic potential in the side population of refractory mantle cell lymphoma. Teshima K, Nara M, Watanabe A, Ito M, Ikeda S, Hatano Y, Ohshima K, Seto M, Sawada K, Tagawa H. Oncogene. 2014 Apr 24;33(17):2191-203.
 12. Activated janus kinase 3 expression not by activating mutations identified in natural killer/T-cell lymphoma. Guo Y, Arakawa F, Miyoshi H, Niino D, Kawano R, Ohshima K. Pathol Int. 2014 Jun;64(6):263-6.
 13. Lineage-specific growth inhibition of NK cell lines by FOXO3 in association with Akt activation status. Karube K, Tsuzuki S, Yoshida N, Arita K, Kato H, Katayama M, Ko YH, Ohshima K, Nakamura S, Kinoshita T, Seto M. Exp Hematol. 2012 Dec;40(12):1005-1015.
 14. Comprehensive gene expression profiles of NK cell neoplasms identify vorinostat as an effective drug candidate. Karube K, Tsuzuki S, Yoshida N, Arita K, Kato H, Katayama M, Ko YH, Ohshima K, Nakamura S, Kinoshita T, Seto M. Cancer Lett. 2013 Jun 1;333(1):47-55.
 15. Molecular characterization of chronic-Type adult T-cell leukemia/lymphoma. Yoshida N, Karube K, Utsunomiya A, Tsukasaki K, Imaizumi Y, Taira N, Uike N, Umino A, Arita K, Suguro M, Tsuzuki S, Kinoshita T, Ohshima K, Seto M. Cancer Res. 2014 Nov 1;74(21):6129-38.
 16. Epstein-Barr Virus (EBV)-positive Sporadic Burkitt Lymphoma: An Age-related Lymphoproliferative Disorder? Satou A, Asano N, Nakazawa A, Osumi T, Tsurusawa M, Ishiguro A, Elsayed A, Nakamura N, Ohshima K, Kinoshita T, Nakamura S. Am J Surg Pathol. 2015 Feb;39(2):227-35.
2. 学会発表
なし
- H. 知的所有権の取得状況**
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）
分担研究報告書

種痘様水疱症・蚊刺過敏症の診療ガイドライン作成に向けたコホート調査

研究分担者 岩月啓氏 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

研究要旨 慢性活動性 EB ウイルス感染症および類縁疾患である蚊刺過敏症や種痘様水疱症の生命予後の調査を行った。50例のコホート調査から、病型分類として古典的種痘様水疱症（cHV）、全身性種痘様水疱症（sHV）、蚊刺過敏症（HMB）と蚊刺過敏症に種痘様水疱症合併例（HV+HMB）に分類することは予後を予測するうえで妥当であると考えられた。コホート調査期間中にはcHVの死亡例はなかったが、cHVに対して、sHV（ $p=0.016$ ）とHMB（ $P=0.015$ ）は有意に生命予後が不良であった。重症例および予後不良を示す分子マーカーとしてEBウイルス再活性化シグナルのBZLF-1mRNAを見出した。これらの病型分類と生命予後に関する根拠をもとに、診断基準と重症度基準を作成した。診療ガイドラインの準備中である。

研究協力者

三宅智子 岡山大学病院皮膚科医員
山本剛伸 川崎医科大学皮膚科講師
平井陽至 ミュンヘン大学医学部研究員

A. 研究目的

慢性活動性 EB ウイルス感染症の類縁疾患である種痘様水疱症と蚊刺過敏症の生命予後と、重症化および予後不良因子の解析を行い、診断基準と診療ガイドライン作成の科学的根拠とする。

- 1) 皮膚 EB ウイルス関連 T/NK リンパ球増殖症である蚊刺過敏症・種痘様水疱症のコホート調査を行う。
- 2) 同時に生体試料の保管を行う。
- 3) 重症化や予後不良を予見できる臨床検査データや分子マーカーを検証する。以上の研究は、倫理委員会承認を得て実施する。
- 4) 得られたデータから種痘様水疱症、蚊刺過敏症の診断基準と診療ガイドラインを作成する。

B. 研究方法

- 1) 蚊刺過敏症・種痘様水疱症のコホート調査

当院を受診あるいは検査を実施した50症例について予後調査を実施した。

（倫理委員会：岡山大学 No. 419, 2011）

2) 生体試料の保管

診断に用いた生体試料は、患者・家族の同意のもとで院内において保管している。新たな研究に試料を用いる場合には、再度、倫理委員会承認を得る。

3) 重症化や予後不良因子

われわれが独自に開発した「ウイルス潜伏感染の検査方法および検査用キット」（特許 4182227 号、PCT/JP2006/317851）を用いて診断的検査と同時に再活性化マーカーの解析を行う。（倫理委員会：岡山大学 No. 287, 2014）

4) 種痘様水疱症、蚊刺過敏症の診断基準と診療ガイドラインの作成

班員の討議をもとに診断基準を作成し、ガイドライン作成手順にしたがって診療ガイドライン作成準備を行う。

C. 研究結果

1) 蚊刺過敏症・種痘様水疱症のコホート調査

50例のコホート調査から、病型分類として古典的種痘様水疱症（cHV）、全身性種痘様水疱症（sHV）、蚊刺過敏症（HMB）と蚊刺過敏症に種痘様水疱症合

併例 (HV+HMB) に分類できた (添付資料 1)。この病型分類から、cHV に対して、sHV ($p=0.016$) と HMB ($P=0.015$) は有意に予後不良であった (論文発表 1)。

細胞学的には、HMB は EB ウイルス感染 NK 細胞の増殖が特徴であった。小児 cHV は末梢血に EB ウイルス感染 γ δ T 細胞が増加しており、sHV のとくに成人例では α β T 細胞が増加する例が見られた。

生命予後を決める因子の一つは、発症年齢であり、9 歳以上の発症例は予後不良であった ($p<0.01$)。予後のよい cHV を除いても、やはり 9 歳以上の発症は予後不良であった ($p<0.01$)。

検査データおよび EB ウイルス関連分子マーカーでは、再活性化を示す BZLF-1 mRNA の発現があるグループでは全身症状が強く、予後不良であった。

2) 生体試料の保管

われわれが独自に開発した「ウイルス潜伏感染の検査方法および検査用キット」は、皮膚病変の痂皮や壊死組織を非観血的な方法で採取して、RNA 抽出と cDNA 作成を行う低侵襲検査である。材料は、乾燥状態で移送が可能である。検査に用いた試料 (50 検体以上) を当科で保管している。

3) 重症化や予後不良因子

検査データおよび EB ウイルス関連分子マーカーでは、再活性化を示す BZLF-1 mRNA の発現があるグループでは全身症状が強く、予後不良であった。

4) 種痘様水疱症、蚊刺過敏症の診断基準。

皮膚 EB ウイルス関連 T/NK リンパ球増殖症を、4 型に分類することは生命予後や重症化の観点から妥当と考えられた (添付資料 2)。

D. 考察

慢性活動性 EB ウイルス感染症や皮膚 EB ウイルス関連 T/NK リンパ球増殖症は、病態や予後が異なる。本研究では、cHV, sHV, HMB, HV+HMB の 4 型に分類することで、予後を予測することが可能になった。また、発症年齢が 9 歳未満の場合には比較的予後は良好だが、9 歳以降の発症例では予後が悪いことが分かった。さ

らに分子マーカーとして、BZLF-1 mRNA が予後不良を示すマーカーであると考えられた。

E. 結論

種痘様水疱症と蚊刺過敏症は、慢性活動性 EB ウイルス感染症の類縁疾患であるが、その診断には皮膚臨床所見、病理所見、免疫病理所見に加えて、EB ウイルス感染リンパ球サブセットの解析が必須である。また重症化および生命予後の予見には BZLF-1 mRNA のような再活性化マーカーのモニターが必要である。

標準的施設で用いる第一段階の診断基準に加えて、病態把握には拠点施設での専門的検査が、治療介入や予後を予見するために必要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表 (平成 26 年度)

論文発表

1. O Miyake T, Yamamoto T, Hirai Y, Otsuka M, Hamada T, Tsuji K, Morizane S, Suzuki D, Aoyama Y, **Iwatsuki K**. Survival rates and prognostic factors of Epstein-Barr virus-associated hydroa vacciniforme and hypersensitivity to mosquito bites. Br J Dermatol. 2014; e-pubahead of print.
2. O **Iwatsuki K**, Hamada T, Japan Skin Cancer Society-Lymphoma Study Group. Current therapy of choice for cutaneous lymphomas: complementary to the JDA/JSCS guidelines. J Dermatol, 2014; 41: 43-49
3. O Hamada T, Nakamura S, Ko YH, Yoshino T, Ohshima K, Matsuzawa T, Miura K, Takahashi T, Nomura H, Hoshino T, Suzuki D, Shimada S, **Iwatsuki K**. Epstein-Barr virus-associated T/natural killer-cell lymphomas in the elderly: The first consensus meeting in Kofu 2013. J Dermatol 2014; 41: 40-42.
4. Sugaya M, Tokura Y, Hamada T, Tsuboi R, Moroi Y, Nakahara T, Amano M, Ishida S, Watanabe D, Tani M, Ihn H, Aoi J, **Iwatsuki K**. Phase II study of i.v. interferon-gamma in Japanese patients with mycosis fungoides. J Dermatol

2014; 41: 50-56.

5. Tsukasaki K, Imaizumi Y, Tokura Y, Ohshima K, Kawai K, Utsunomiya A, Amano M, Watanabe T, Nakamura S, **Iwatsuki K**, Kamihira S, Yamaguchi K, Shimoyama M. Meeting report on the possible proposal of an extranodal primary cutaneous variant in the lymphoma type of adult T-cell leukemia-lymphoma. J Dermatol 2014; 41: 26-28.
6. Hamada T, Iwatsuki K. Cutaneous lymphoma in Japan: A nationwide study of 1733 patients. J Dermatol. 2014; 41: 3-10

学会発表

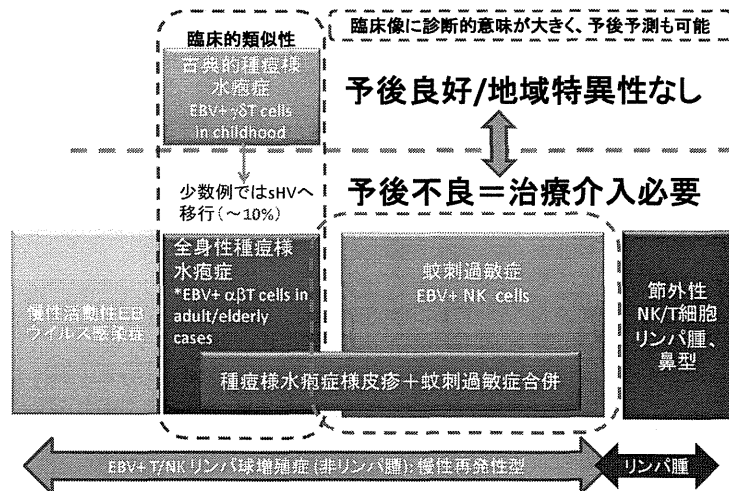
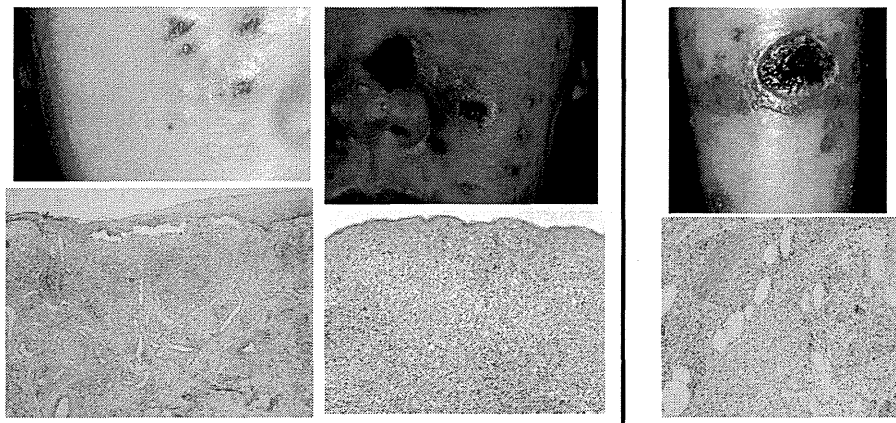
1. 三宅智子、**岩月啓氏**他：痂皮と水疱蓋を用いた種痘様水疱症と蚊刺過敏症の低侵襲診断的検査の鋭敏度と特異度に関する研究
(第 114 回日本皮膚科学会総会 2015 年 5 月 28-31 日において発表予定：抄録採択済み、アブストラクト賞を受賞)

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

「ウイルス潜伏感染の検査方法および検査用キット」（特許 4182227 号、PCT/JP2006/317851）：本研究の基盤となった検査法

Tentative criteria for cHV, sHV and HMB

In addition to **clinical features**,
 1) **systemic symptoms** (high-grade fever, lymphadenopathy or hepatosplenomegaly) and/or
 2) **abnormalities in "routine" blood tests*** *gdT cell subset or molecular markers, not included



厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患等政策研究事業 (難治性疾患政策研究事業))
分担研究報告書

慢性活動性 EB ウイルス感染症におけるワクチン過敏症の研究

研究分担者 浅田秀夫 奈良県立医科大学皮膚科 教授

研究要旨

インフルエンザワクチン接種の度に接種部位の発赤腫脹、発熱、全身倦怠感を生じた CD8⁺T 細胞型慢性活動性 EB ウイルス感染症患者について研究した結果、インフルエンザワクチンに特異的に反応するリンパ球と EB ウイルス陽性 CD8⁺T リンパ球の相互作用が病態形成に深く関わっているものと考えられた。また、局所の EB ウイルス感染細胞においてウイルス由来発がん蛋白 LMP1 ならびに細胞増殖マーカー Ki-67 の発現亢進を認めたことから、本症ではワクチン刺激が、蚊刺過敏症における蚊唾液腺抗原刺激と同様に発がんに影響を及ぼしている可能性が示唆された。

A. 研究目的

慢性活動性 EB ウイルス感染症では、しばしば蚊刺過敏症を合併することが知られている。蚊刺過敏症とは、蚊に刺された局所に発赤腫脹、壊死を伴う強い局所反応に加え、発熱、リンパ節腫脹、肝機能障害などの全身症状を呈する疾患である。慢性活動性 EB ウイルス感染症では、まれにワクチン接種によっても蚊刺過敏症と類似の症状をきたすことが知られているが、その病態の詳細は不明である。

われわれはこれまでに、蚊刺過敏症患者について免疫学的検討を行い、患者の CD4⁺T 細胞が蚊（特にヒトスジシマカ）の唾液腺抽出物の刺激により著しく活性化すること、さらに、この活性化された T 細胞が、EB ウイルスが感染している NK 細胞または T 細胞に作用して、ウイルスの再活性化や細胞の腫瘍化に関わっていることを明らかにした。本研究では、インフルエンザワクチン接種

により、繰り返し蚊刺過敏症類似の症状をきたした慢性活動性 EB ウイルス感染症患者について、その病態を研究した。

B. 研究方法

初診の 3 年前からインフルエンザワクチン接種を受ける度に、接種部位の発赤腫脹と、37～38℃の発熱、全身倦怠感を認めるようになった 75 歳の女性患者について、以下の検討を行った。

- ① EB ウイルス抗体価の測定ならびに末梢血中 EB ウイルスゲノム数の定量
- ② EB ウイルス感染細胞の同定とクロナリティの検索
- ③ インフルエンザワクチンによる患者リンパ球の刺激試験
- ④ インフルエンザワクチン接種部位の皮膚の病理組織学的検討

(倫理面への配慮)

今回の研究は、すべて診療上必要な医療行為のみに限定して、患者からインフォームドコンセントを得た上で行った。

C. 研究結果

- ① 末梢血塗抹標本: 大型の顆粒リンパ球の増多を確認。
- ② 血清抗 EB ウイルス抗体価: 抗 VCA IgG が 320 倍とやや高値を示したが、それ以外の抗体価は、正常範囲内であった。
- ③ 末梢血の EB ウイルス DNA 定量: 3.0×10^2 コピー/ μg
- ④ EBV-terminal repeat の Southern blotting: 単一バンドを検出し EB ウイルス感染細胞の単クローン性増殖を確認。
- ⑤ T 細胞受容体解析: β 鎖と γ 鎖の遺伝子再構成を検出。
- ⑥ インフルエンザワクチンによる患者リンパ球の刺激試験: トリチウムサイミジンの取り込みにより測定した結果、Stimulation Index は 1324% と著明な高値をみとめた。
- ⑦ ワクチン接種部位の発赤を伴った硬結の病理組織学的検討: 脂肪織にリンパ球の著明な浸潤がみられ、血管周囲にはやや大型のリンパ球が密に浸潤していた。大型のリンパ球は、CD3, CD8, granzymeB, Ki-67, EBER, LMP1 が陽性、CD56 は陰性であった。

D. 考察

今回、CD8⁺T 細胞型慢性活動性 EB ウイルス感染症患者に生じたインフルエンザワクチン過敏症について研究した結果、患者リンパ球がインフルエンザワクチンに対して著しい反応を示したことから、ワクチン接種局所に EB ウイルス陽性 CD8⁺T 細胞が密に浸潤していたことから、インフルエンザワクチンに特異的なリンパ球と EB ウイルス陽性リンパ球の相互作用が病態形成に深く関

わっているものと推測された。また、蚊刺過敏症では、蚊唾液腺抗原刺激が CD4⁺T 細胞を介して EB ウイルス発がん蛋白 LMP1 の発現を誘発し、細胞増殖に関わるものと考えられているが、今回の症例でも EB ウイルス感染細胞において LMP1 ならびに細胞増殖マーカー Ki-67 の発現を認めたことから、本症ではワクチン刺激が、蚊刺過敏症における蚊唾液腺抗原刺激と同様に発がんに影響を及ぼしている可能性が示唆された。

E. 結論

慢性活動性 EB ウイルス感染症患者におけるインフルエンザワクチン過敏症の病態は、蚊刺過敏症と極めて類似していることが判明した。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Himuro Y, Miyagawa F, Fukumoto T, Hasegawa M, Kobayashi N, Asada H: Hypersensitivity to influenza vaccine in a case of Epstein-Barr virus-associated T lymphoproliferative disorder. Br J Dermatol. 2015 Feb 3. doi: 10.1111/bjd.13713. [Epub ahead of print]
2. 浅田秀夫: 重症薬疹とウイルス感染 (特集: 重症薬疹の診断と治療 アップデート) .アレルギー・免疫 21, 1214-9, 2014

2. 学会発表

1. 浅田秀夫: ウイルスと薬疹の接点. 第 1 回総合アレルギー講習会, 横浜, 2014 年 12 月 20 日.
2. 氷室佑季子、福本隆也、森井武志、長谷川正俊、浅田秀夫: インフルエンザワクチン接種部位の持続する発赤が契

機となり診断された EBV 関連 T 細胞
増殖症の一例. 第 113 回日本皮膚科学
会総会、京都. 2014 年 5 月 30 日

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

EB ウイルス関連血球貪食症候群の治療戦略に関する研究

研究分担者 大賀 正一 山口大学大学院医学系研究科・小児科学 教授
 下村 麻衣子 同・小児科学 助教
 市村 卓也 同・小児科学 診療助教

研究要旨：慢性活動性 Epstein-Barr ウイルス (EBV) 感染症 (CAEBV) 患者は経過中に、血球貪食症候群/血球貪食性リンパ組織球症 (HLH) を発症することがある。一方、初感染 EBV 関連 HLH (EBV-HLH) の発症に引き続いて CAEBV の診断に至る例は極めて稀である。自験例の集積と全国調査から、小児全身性 EBV 陽性 T 細胞リンパ増殖症のうち、CAEBV と EBV-HLH を異なる疾患としてとらえること、とくに①感染細胞の同定と、②早期免疫調節療法による介入が治療成績の向上に必須であることを示した。近年小児科領域では、EBV-HLH の治療成績が改善したが、思春期から若年成人における初感染 CD8 陽性 T 細胞感染型（いわゆる初感染 EBV-HLH）の重症例が増えていると思われ、この診断と治療の確立が急務である。

A. 研究目的

WHO 造血器腫瘍分類 2008 における小児全身性 EBV 陽性 T 細胞リンパ増殖症には、アジア型慢性活動性 EB ウイルス感染症 (CAEBV) と血球貪食症候群/血球貪食性リンパ組織球症 (EBV-HLH) の一部が含まれる。CAEBV の類縁疾患として、EBV-HLH 例のこれまでの自験例と全国調査から、その早期診断と治療介入について検討した。

B. 研究方法

単一施設における 2000 年以降の EBV-HLH 22 名 (15 歳以上 4 名を含む) と全国調査 2003-08 年の EBV-HLH 98 名 (18 歳未満) を比較検討した。また、山口大学小児科における小児例と成人例の自験例の治療経過から、治療の最適化を検討した。感染細胞の同定は、MACS ビーズおよび Cell Sorter を用いて純化した細胞より抽出した DNA を用いて、EBV-DNA を real-time PCR 法により定量した (九州大学及び山口大学小児科、成育医療センター 今留謙一先生)。HLH2004 の診断基準を満たし、末梢血に EBV-DNA が検出され、かつ既知の免疫不全症と CAEBV を除いた例を EBV-HLH とした。欧米との疾患概念の違い (表 1) を考慮し、治療後の患者に HLH 再燃および易感染性などの基礎疾患が出現しなかったことを、治療中止後 1 年以上の観察から確認した。

(倫理面への配慮)

遺伝性 HLH の遺伝子解析は、倫理委員会の承認を受け、対象患者とその家族に同意書を取得して行い必要に応じて、遺伝カウンセリングを行った。

表 1. 三大重症血球貪食症候群の疾患概念

	欧米	日本
FHL	単一遺伝子病	単一遺伝子病
EBV-HLH	B細胞感染と FHL素因が関与	T/NK細胞への初感染重症病型
CAEBV	感染B-LPDを伴う多彩な免疫不全	感染T/NK-LPDを伴う多彩な免疫不全

FHL: familial hemophagocytic lymphohistiocytosis

C. 研究結果

1) 単一施設と全国調査の比較

単一施設における 22 名の結果を表 2A に示す。γグロブリン大量、ステロイドおよびシクロスポリンによる免疫調節療法後 48 時間以内に解熱傾向と全身状態の改善がみられない場合にエトポシド (VP16) を投与した。再燃の間隔が短くなった場合に多剤併用化学療法を、さらに再燃を繰り返す場合には同種造血細胞移植を行った。治療直前の寛解が 2 名、免疫調節療法後の寛解が 12 名、VP16 を含む化学療法による寛解が 1 名、移植後寛解が 1 名であった。死亡した 2 名はいずれも 16 歳以上で、それぞれ多剤併用化学療法後 1 名と造血細胞移植後 1 名であった。B 細胞感染の 1 名以外は全て T 細胞感染であった。解析できた T 細胞感染は全て CD8 陽性細胞であった。

全国調査の成績を表 2B に示す。93 名のうち 56 名 (60%) が HLH2004 に、それ以外の 40% が上記の免疫調節療法に反応し、84 名が寛解した。7 名 (8%) が再燃したが、再燃例は全例 2nd-line 治療もしくはは移植 (1 名のみ) 後に寛解を得た。9 名が抵抗性で 8 名死亡、うち 7 名は発症 8 週未満の死亡であった。

表2. EBV-HLHの感染細胞とclonality

A. 単一施設 (対象: 15歳以上4を含む22名)			
生存初感染	20 (91%)	; 死亡2名は15歳以上	
Clonalityあり	19 (95%)		
EBV-TR, TCR	13 (93%),	7 (64%)	
主なEBV感染			
B細胞, T細胞	1 (0.6%)	15 (94%)	
Shiraishi et al. PBC 2013			
B. 全国調査 (対象: 18歳未満98名)			
	生存 [n=90]	死亡 [n=8]	p 値
Clonality			
あり, なし	28 (69%), 13 (14%)	0 (0%), 0 (0%)	0.049
未解析	49%	8%	
主なEBV感染			
B細胞のみ	1 (3%)	0 (0%)	0.528
T/NK/B細胞	28 (97%)	4 (100%)	
未解析 (%)	60	4	
Kogawa et al. PBC 2014 [文献1]			

初感染 EBV-HLH は CD8 陽性 T 細胞感染で、小児の半数ほどは免疫調節療法を早期に行うべきであるという単一施設の観察が全国調査でも確認された。

2) 山口大学の症例検討

HLH2004 後に再燃した小児例に CHOP-VP16 を 2 回施行し、再燃なく治癒を得た。重症 EBV-HLH が VP16 に反応後再燃したが現在寛解を得て観察中である。いずれも初感染 EBV-HLH は CD8 陽性 T 細胞感染であり、発熱、血球減少と EBV-DNA 量の変化から治療中止を決定した。単純ヘルペスウイルス全身感染の新生児も HLH 診断基準の 4 項目を満たした段階で治療介入し後遺症なく治癒した。

D. 考察

初感染 CD8 陽性 T 細胞感染 EBV-HLH の小児は、免疫調節療法の早期介入により予後良好となることが明らかとなった。患児には基礎疾患が認められないことから、EBV による重症初感染像として CAEBV と区別することが重要である。5-10%の再燃例と思春期および若年成人の重症例に対する治療が今後の課題である。

E. 結論

EBV-HLH は初感染と再感染、感染細胞を確認し CAEBV とは異なる疾患概念として正確に診断し、早期治療介入を行うことが必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kogawa K, Sato H, Asano T, Ohga S, Kudo K, Morimoto A, Ohta S, Wakiguchi H, Kanegane H, Oda M, Ishii E: Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in children: report from the Japan HLH/LCH Study Group. *Pediatr Blood Cancer* 61(7):1257-62, 2014

2) Okada S, Hasegawa S, Suzuki Y, Matsubara T, Shimomura M, Okuda M, Ichiyama T, Ohga S: Acute pericardial effusion representing the TNF- α -mediated severe inflammation but not the coronary artery outcome of Kawasaki disease. *Scand J Rheumatol* 29:1-6, 2014

3) Nanishi E, Hoshina T, Ohga S, Nishio H, Hara T: Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms during primary Epstein-Barr virus infection. *J Microbiol Immunol Infect* S1684-1182, 2014

4) Maeba S, Hasegawa S, Shimomura M, Ichimura T, Takahashi K, Motoyama M, Fukunaga S, Ito Y, Ichiyama T, Ohga S: Successful treatment of corticosteroid with antiviral therapy for a neonatal liver failure with disseminated herpes simplex virus infection. *Am J Perinatol* 2015 (in press)

6) 下村麻衣子、大賀正一. V 造血管器悪性疾患 血球貪食症候群/血球貪食性リンパ組織球症. 特集小児血液疾患—よくわかる最新知見—41. *小児科* 55 巻 11 号 1775-1781, 2014

7) 大賀正一. EB ウイルス研究史 ~感染細胞、病態と疾患の関わりから~. *ウイルス* 第 64 巻 1 号 67-74, 2014

8) 大賀正一. リンパ増殖性疾患~Epstein-Barr ウイルスの関与する遺伝性素因~. *臨床血液* 55 巻; 2221-4, 2014

9) 脇口宏之 大賀正一. VI. 感染症 36. EB ウイルス感染症. 小児疾患診療のための病態生理 1 改訂 5 版 東京医学社 2015 (印刷中)

2. 学会発表

1) 大賀正一: EB ウイルス感染症に伴う難治性疾患 第 124 回山口県小児科医会総会・山口地方会 合同特別講演 2014. 7. 13 宇部

2) 大賀正一: リンパ増殖性疾患~Epstein-Barr ウイルスの関与する遺伝性素因~第 76 回 日本血液学会学術集会 教育講演 2014. 10. 31 大阪

3) 赤峰 哲、加藤稚子、瀧本智仁、石村匡崇、保科隆之、高田英俊、大賀正一、林田 真、田口智章、原寿郎: 発症時に肝不全を呈した家族性血球貪食性リンパ組織球症 (FHL) の 2 例. 第 117 回日本小児科学会学術集会 2014. 4. 11-13 名古屋

4) 脇口宏之、平野玲史、長谷川俊史、大賀正一. 間質性肺炎とマクロファージ活性化症候群を合併した若年性皮膚筋炎患児のサイトカインプロファイル 第 24 回日本小児リウマチ学会総会 2014. 10. 3-5 仙台

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
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患等政策研究事業 (難治性疾患政策研究事業))
分担研究報告書

慢性活動性 EB ウイルス感染症とその類縁疾患に対する
治療戦略のエビデンス創造に関する研究

研究分担者 氏名：澤田明久

所属：大阪府立母子保健総合医療センター 職名：血液・腫瘍科，副部長

研究要旨

本疾患に対する治療を探索し，3ステップからなる戦略（原病の鎮静，抑制，根絶）をベースにエビデンスを創造してきた．2014年の症例4例のうち，3例は順調に治療を終え，現在も無病生存中である．しかし治療抵抗性だった1例は緊急移植が一旦は奏効したが，原病の後遺症と推定される致死的経過を辿った．現時点の知見に基づいた治療ガイドラインの策定とともに，現戦略のさらなる進化と，治療反応性の悪い例に対する新たなコントロール法の創造が求められている．

A. 研究目的

本疾患に確立された治療法は無い．治療法の確立のため当センターでは一貫した戦略に基づいて治療しており，その細部における最適化を探索する．

B. 研究方法

治療として3ステップ法からなる戦略をプラットフォームとしている．すなわちステップ1：免疫化学療法による原病の鎮静，ステップ2：多剤併用化学療法により原病の抑制，ステップ3：同種造血幹細胞移植による原病の根絶と造血・免疫能の再構築である．各ステップの効果判定や適正化について検証と改善を行っている．

(倫理面への配慮：研究試料の採取，および造血幹細胞移植の施行にあたっては，文書による同意を得ている．)

C. 研究結果

2014年の症例は4例．うち3例は治療初

期より当センターでエントリーし，残る1例は化学療法に抵抗性で血球貪食症候群（HPS）のフレアを発症しての転入であった．前者の3例では化学療法と併行して移植ドナー検索が可能で，計画的な移植が可能であった．後者の1例は緊急移植が一旦は奏効したが，原病の後遺症と推定される致死的経過を辿った．

D. 考察

前者の3例では，化学療法は1st line, 2nd lineともEBV量の減少は1/10に至らず有効とは判定されなかったが，原病はnon-activeにコントロールされ，移植を迎えることができ，全例が無病生存中である．後者の1例はHPSのフレアがコントロールされないままの緊急移植であり，新たなコントロール法の必要性が感じられた．

E. 結論

1st line 化学療法の効果判定法, 2nd line

化学療法の標準化, 移植のタイミングなど, エビデンスが創造されつつあり, 現時点の知見に基づいた治療ガイドラインの策定とともに, 現戦略のさらなる進化と, 治療反応性の悪い例に対する新たなコントロール法の創造が求められている.

F. 健康危険情報

なし.

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 澤田明久, 井上雅美. 慢性活動性 EB ウイルス感染症の病態と治療. 日本造血細胞移植学会誌 3: 1-11, 2014.

2. Sawada A, Inoue M, Koyama-Sato M, Kondo O, Yamada K, Shimizu M, Isaka K, Kimoto T, Kikuchi H, Tokimasa S, Yasui M, Kawa K. Umbilical cord blood as an alternative source of reduced-intensity hematopoietic stem cell transplantation for chronic Epstein-Barr virus-associated T or natural killer cell lymphoproliferative diseases. Biol Blood Marrow Transplant 20: 214-221, 2014.

2. 学会発表

1. 澤田明久, 井上雅美, 佐藤真穂, 近藤 統, 眞弓あずさ, 井坂華奈子, 樋口紘平, 清水真理子, 安井昌博, 河 敬世. 慢性活動性 EB ウイルス感染症: 成人および小児における同種造血幹細胞移植成績の比較. 第36回日本造血細胞移植学会. 沖縄. 2014年3月7-9日.

2. Azusa Mayumi, Akihisa Sawada, Maho Sato, Mariko Shimizu, Aya Ioi, Kohei Higuchi, Osamu Kondo, Masahiro Yasui, Keisei Kawa, Masami Inoue. Favorable impact of intensified conditioning regimen on the engraftment of cord blood transplantation for chronic Epstein-Barr virus-associated T or Natural Killer cell lymphoproliferative diseases. The 19th congress of the Asia-Pacific Blood and Marrow Transplantation. Hangzhou, China. 16th-19th/Oct/2014.

H. 知的所有権の取得状況

なし.

EBV-positive T/NK lymphoproliferative diseases の病態解明と新規治療法の開発

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)

研究要旨

Epstein-Barr virus (EBV) は B 細胞のみならず、T 細胞や NK 細胞腫瘍にもそのゲノムを認め、腫瘍発症に関与すると考えられるが、その分子機序は明らかになっていない。私たちは EBV 陽性 T/NK リンパ増殖症 (いわゆる慢性活動性 EB ウイルス感染症、EBV-positive T/NK lymphoproliferative diseases; EBV-T/NK-LPDs) 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。

- ① **EBV-T/NK-LPDs と P-glycoprotein (P-gp)発現** : EBV-T/NK-LPDs の EBV 感染腫瘍細胞では薬剤耐性に関与する分子 P-gp が強く発現し、薬剤排出機能を示すことを見出した。さらに P-gp の阻害剤 Cyclosporin A 処理により Etoposide による apoptosis 誘導は亢進することが示された。以上から P-gp は EBV-T/NK-LPDs の化学療法耐性の原因のひとつであることが示された。
- ② **EBV-T/NK-LPDs 成人例に対する L-asparaginase (L-asp) 単剤療法の検討** : 至適治療法開発のため、5 人の EBV-T/NK-LPDs 成人例に対し、L-asp の効果を検討する前向き探索的研究を施行した。末梢血中 EBV 量は 1 例で 0.08 倍の減少を見たが、1 例で 22 倍に増加、2 例は不変であった。1 例は投与中鼻粘膜病変が増悪したため途中で中止した。ウイルス量の低下を見た症例では、発症から治療開始までの期間は 8 か月と他の患者より短かった。EBV 感染腫瘍細胞の Asparagine synthetase (AS) の発現は治療効果と関連しなかった。以上から EBV-T/NK-LPDs は早期に治療を導入することが良い治療反応性につながる可能性が示唆された。

A. 研究目的

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

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

本研究では、それらの問題点を解析、解決するために、以下の 2 つの解析を行った。

- ① EBV-T/NK-LPDs と MDR1 発現 : EBV-T/NK-LPDs V の化学療法抵抗性の原因について、薬剤耐性に関与する分子のひとつ、P-glycoprotein (P-gp)に注目し、その発現量、機能を患者の細胞を用いて解析した。
- ② EBV-T/NK-LPDs 成人例に対する L-asparaginase (L-asp) 単剤療法の検討 : EBV-T/NK-LPDs 治療法確立のため L-asp 単剤の有効性を前向きに検討した。L-asp は EBV-T/NK-LPDs 同様 EBV 陽性 T/NK 腫瘍である extranodal NK/T-cell lymphoma nasal type (ENKL) 治療の中心的薬剤であり、同疾患に対しても単剤で有効であるとの報告がある。よって効果が期待された。

B. 研究方法

- ①解析には EBV 陽性 T/NK リンパ増殖症細胞株 (SNT8,15,16, SNK6: 清水則夫博士より供与)、および EBV-T/NK-LPDs 患者の末梢血から磁気ビーズを用いて分離した EBV 感染細胞を用いた。対照には EBV 陰性 T および NK 細胞腫瘍株を用いた。
- それらにおける P-gp の発現を RNA(RT-PCR) および蛋白 (Western blotting) レベルで確認した。また P-gp の薬剤排出機能を Rhodamine efflux assay で検討した。対照には、EBV 陽性 B 細胞リンパ腫細胞株、EBV 陰性 T および NK 細胞腫瘍株を用いた。また、これらの細胞に対し P-gp 阻害剤 Cyclosporin A (CsA) を用いて Etoposide に対する apoptosis の変化を検討した。
- ②治療法開発のため EBV 感染症研究会診断指針に基づいて診断され、十分な肝腎機能を持つ患者に対し L-asp を一日一回、6000U/m² を隔日で 7 回投与した。主評価項目は一ヵ月後の末梢血 EBV-DNA 量の減少率、副評価項

目は有害事象発現率とした。また、EBV 感染腫瘍細胞の Asparagine synthetase(AS)の発現を RT-PCR 法で解析し、L-asp の効果との関連を検討した。

(倫理面への配慮)

以上の研究は東京医科歯科大学倫理委員会で承認され(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。②は UMIN-CTR へ登録し、施行した(UMIN 試験 ID : UMIN000003498)。

C. 研究結果

- ①EBV 陽性 T/NK 細胞株および 12 例の EBV-T/NK-LPDs 患者細胞で P-gp が強く発現し、薬剤排出機能を示すことを見出した。以上はコントロール細胞では認められなかった。さらに P-gp の阻害因子 CsA によりこれらの細胞で Etoposide による apoptosis 誘導は亢進することが示された。以上から P-gp は EBV-T/NK-LPDs の化学療法耐性に寄与することが示された。
- ②対象患者は女性 5 名。年齢は 20~62 歳の成人。感染細胞は CD8 陽性 T 細胞 1 例、CD4 陽性細胞 2 例、CD56 陽性細胞 2 例であった。治療開始後一ヵ月後の末梢血中 EBV 量は、1 例で治療前の 0.08 倍へ減少を見たが、1 例で 22 倍に増加、2 例は不変であった。1 例は投与中鼻粘膜病変が増悪したため途中で投与を中止した。有害事象として、全例でフィブリノゲン、ATⅢの低下を認め、新鮮凍結血漿および ATⅢ製剤の投与を必要とした。Grade3 の肝障害を 1 例に、同 2 を 2 例に認めた。Grade3 の好中球減少を 1 例に認めた。ウイルス量の低下を見た症例では、発症から治療開始までの期間は 8 か月と他の患者より短かった。EBV 感染腫瘍細胞における AS