

平成 23 年 3 月 31 日現在

機関番号：80106

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591292

研究課題名（和文）慢性活動性 EB ウイルス感染症の病態解明とその展開

研究課題名（英文）Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection and its Pathogenetic Roles

研究代表者

岡野 素彦（OKANO MOTOHIKO）

北海道立衛生研究所・感染症センター・センター長

研究者番号：50261300

研究成果の概要（和文）：慢性活動性 EB ウイルス感染症（chronic active EBV infection: CAEBV）において、ウイルス学的、免疫学的、病理学的検討を中心に、その発症機序に関して研究を行った。その結果、EBV の著しい活性化と異質性のある免疫不全、そして主に T 細胞あるいは NK 細胞における EBV 感染を認めた。なお、樹立細胞株での各種薬剤感受性では一定の結果は得られなかった。本研究成果は、今後の CAEBV の病態解明と対処に関してひとつの礎となると思われる。

研究成果の概要（英文）：The pathogenetic roles for chronic active Epstein-Barr virus infection (CAEBV) were studied mainly by virological, immunological and pathological approaches. An extreme activation of EBV and heterogeneous immunodeficiency were demonstrated. Major target cells of EBV were shown to be either T or NK cells. Furthermore, sensitivities of infected cells to various therapeutic agents were variable. These results appeared to be beneficial to further recognizing the disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：慢性活動性 EB ウイルス感染症、リンパ増殖性疾患/リンパ腫、診断、治療

1. 研究開始当初の背景

EB ウイルス（EBV）は、現在 8 種類が同定されているヒトヘルペスウイルス科ウイルスに属し、ヒトに普遍的に存在する（Okano M: Epstein-Barr virus infection and its

pathogenetic roles for human diseases. Current Pediatric Reviews 5: 192-197, 2009）。一般に、幼少時期における EBV の感染は、不顕性であるが、主に思春期以降では、時にその初感染が発熱・リンパ節腫脹・肝脾

腫などを一過性に呈する伝染性単核症 (infectious mononucleosis: IM) となる。また、EBV は、従来、ヒト悪性腫瘍発生における原因的関与が示唆されてきた。それらには、EBV の最初の発見につながったアフリカなどで多くみられる Burkitt リンパ腫、中国南部から東南アジアで発症頻度の高い上咽頭癌などがあげられる。また、臓器移植や自己免疫疾患などにおける免疫抑制剤投与例、後天性免疫不全症候群あるいは原発性免疫不全症候群などで発症をみる主に B 細胞由来のリンパ増殖性疾患/リンパ腫が問題となっている。

加えて、近年、分子生物学の発展と共に、EBV の同定法が進展し、従来原因が不明であった数々の疾患においてもその関与が明らかにされてきた。さらに、本来の感染標的細胞とされた B 細胞と上皮細胞に加え、ヒト T 細胞、NK 細胞、単球/マクロファージ、平滑筋細胞や内皮細胞など多種多様の細胞への感染が実際に報告され、それらが関連する疾患発症における根本的な関わりが示唆されている。

発熱・リンパ節腫脹・肝脾腫など IM 様症状を繰り返しあるいは持続的に呈し、経過中リンパ増殖性疾患/リンパ腫などをしばしば発症し、予後不良の疾患である慢性活動性 EBV 感染症 (Chronic active EBV infection: CAEBV) は、その最重症型である severe CAEBV syndrome (SCAEBV) を含め、全世界で報告をみる (Okano M, Matsumoto S, Osato T, Sakiyama Y, Thiele GM, Purtilo DT: Severe chronic active Epstein-Barr virus infection syndrome. Clin Microbiol Rev 4: 129-135, 1991)。本症は、その診断、治療の難しさと、予後不良例の多いことから、早急の対策が求められてきた (Okano M: Overview and problematic standpoints of severe chronic active Epstein-Barr virus infection. Critical Reviews of Oncology/Hematology 44: 273-282, 2002)。

研究代表者らは、本邦諸施設の研究者と協力して、さらに疾患概念を整理し、いわゆる CAEBV の診断指針の作製とともに、本邦における本疾患の実態を中心に検討してきた (Okano M, Kawa K, Kimura H, Yachie A, Wakiguchi H, Maeda A, Imai S, Ohga S, Kanegane H, Tsuchiya S, Morio T, Mori M, Yokota S, Imashuku S: Proposed guidelines for diagnosing chronic active Epstein-Barr virus infection. American Journal of Hematology 80: 64-69, 2005)。相前後して、EBV の感染細胞が、主に T 細胞と NK 細胞に分かれること。小児期に大部分が発症するが成人例もあること。予後は、一般に不良で、経過中血球貪食性リンパ組織球症、蚊刺過敏症、T 細胞リンパ増殖性疾患/

リンパ腫、NK 細胞リンパ増殖性疾患/リンパ腫などを発症する例のあることなどがみいだされた。

CAEBV の主な発症機序として、EBV の T 細胞、NK 細胞などへの感染を含む特異な活性化感染と、何らかの免疫異常が想定されたが、確実に共通するもので、実証されたものは少なく、従来の研究に加え、本研究によりその背景をさらに明らかにすることが期待された。加えて、本症における EBV 増殖機構の解明は、前述した種々の顕性 EBV 感染症や普遍的ウイルス感染を基盤とする他の難治性ウイルス感染における病態の理解と治療法の改善にも貢献すると考えられた。

2. 研究の目的

CAEBV の発症機序をウイルス学的、免疫学的検討を中心にさらに明らかにし、大部分の症例が予後不良である本症の病態を把握することを主な目的とした。EBV 関連顕性感染症の代表的な疾患である CAEBV の病態を明らかにすることは、以前から行ってきた感染標的細胞の相違、宿主の免疫状態、遺伝素因や他の感染因子との相互関係などの解明を主題とした研究成果とも有機的に結びつく。このことは、機序が不明な潜在感染から増殖感染をもたらす現在までに十分な解明をみないその他の難治性ウイルス感染症に対する新たな研究にも寄与する。本邦における本症の詳細をより明らかにし、得られる成果から今後の診断法、治療法の改善に少しでも役立つことをめざした。

3. 研究の方法

(1) CAEBV の診断は、研究代表者らが作製した以下の診断指針を用いた (Okano M, Kawa K, Kimura H, Yachie A, Wakiguchi H, Maeda A, Imai S, Ohga S, Kanegane H, Tsuchiya S, Morio T, Mori M, Yokota S, Imashuku S: Proposed guidelines for diagnosing chronic active Epstein-Barr virus infection. American Journal of Hematology. 80: 64-69, 2005)。以下に指針を示す。

CAEBV 診断指針

- 1 持続的あるいは再発する IM 様症状
 - 2 Viral capsid antigen (VCA)、early antigen (EA) 抗体価高値をとともなう異常な EBV 抗体反応または病変組織 (含末梢血) における EBV ゲノム量の増加
 - 3 慢性に経過し、既知の疾患とは異なること
(以上の3項目をみたまこと。)
- なお、経過中しばしば EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症、主に T 細胞・NK 細胞リンパ増殖性疾患/リンパ腫などの発症をみる。一部

は蚊刺過敏症などの皮膚病変をとまなう。

-補足条項-

1 IM 様症状とは、一般に発熱・リンパ節腫脹・肝脾腫などをさす。加えて、IM に従来おもに報告される血液、消化器、神経、呼吸器、腎臓、眼、皮膚あるいは心血管合併症状・病変（含動脈瘤・弁疾患）などを呈する場合も含む。

2 VCA、EA 抗体価高値とは一般に VCA-IgG 抗体価 640 倍以上、EA-IgG 抗体価 160 倍以上が一つの目安となる。

3 診断の確定、病型の把握のために以下の臨床検査の施行が望まれる。

i) 病変組織（含末梢血）の EBV-DNA、RNA、関連抗原およびクロナリテの検索

i-1) Polymerase-chain reaction (PCR) 法（定量、定性）：末梢血における定量を行った場合、一般に $10^{2.5}$ コピー/ μg DNA 以上が一つの目安となる。定性の場合、健常者でも陽性となる場合がある。

i-2) *in situ* hybridization 法（EBV-encoded small RNA: EBER などの同定）

i-3) 蛍光抗体法など（EBV-determined nuclear antigen [EBNA]、Latent membrane protein [LMP] などの同定）

i-4) サザンプロット法（含 EBV クロナリテの検索）

i-5) EBV 感染標的細胞の同定：蛍光抗体法、免疫組織染色またはマグネットビーズ法などによる各種マーカー陽性細胞（B 細胞、T 細胞、NK 細胞、単球/マクロファージ/組織球などを標識）と EBNA、EBER あるいは EBV-DNA 検出などを組み合わせて行う。

ii) 病変組織の病理組織学的・分子生物学的評価

ii-1) 一般的な病理組織所見

ii-2) 免疫組織染色

ii-3) 染色体分析

ii-4) 遺伝子再構成検査（免疫グロブリン、T 細胞受容体など）

iii) 免疫学的検討

iii-1) 一般的な免疫検査（細胞性免疫[含む NK 細胞活性]・抗体・補体・食細胞機能など）

iii-2) 末梢血マーカー分析（含 HLA-DR）

iii-3) 各種サイトカイン検索

(2) 診断指針に基づきかつ参考にした上で、主に末梢血を含む組織を用いて、インフォームド・コンセントを得た症例（EBV 抗体陽性既感染健康人を対照とした）を対象とし、以下の検索を行った。

1 PCR 法を用いた EBV ゲノムの有無と程度。陽性の場合、マグネットビーズ法により B 細胞、NK 細胞、T 細胞に分画した後、EBV 陽性細胞（EBNA は蛍光抗体法を、また、EBER は

in situ hybridization 法を用いて検出する）を同定し、EBV の感染標的細胞を明らかにする。

2 それら陽性細胞における潜伏 EBV 関連抗原である EBNA-1、EBNA-2、EBNA-3s、Leader protein (LP) と LMP-1、LMP-2a、LMP-2b の発現を、蛍光抗体法および免疫プロット法を用いて検討する。なお、一次抗体は、通常それぞれのモノクローナル抗体を用いる。

3 同様に Reverse-transcription (RT)-PCR 法を用いて、潜伏 EBV 関連蛋白および遺伝子発現を検討する。

4 蛍光抗体法および免疫プロット法を用いて、EBV 増殖関連抗原である VCA および EA の発現の有無と程度を検討する。

5 RT-PCR 法を用いて、EBV 増殖関連遺伝子である BamH1-Z leftward reading frame (BZLF)-1 の発現の有無と程度を検討する。

6 キナクリン分染法を用いて染色体分析を行う、

7 末梢血単核球培養における上記潜伏関連抗原および遺伝子・増殖関連抗原および遺伝子の経時的発現の有無と変化の検討を行う。

8 Interleukin (IL)-2 添加末梢血単核球培養における上記潜伏関連抗原および遺伝子・増殖関連抗原および遺伝子の経時的発現の有無と変化の検討を行う、

9 対象における EBV 特異的細胞傷害性 T リンパ球 (EBV-specific cytotoxic T lymphocytes; EBV-CTL) 活性、NK 細胞活性の測定を行う。

10 培養細胞および上清における IL-2、IL-4、IL-10、IL-12、インターフェロン・ガンマなどの産生と遺伝子発現を RT-PCR 法および ELISA 法を用いて測定する。

11 EBV 陽性細胞株を得た場合は、各種薬剤（抗 B 細胞モノクローナル抗体、acyclovir などの抗ウイルス剤、cyclosporine A などの免疫抑制剤、インターフェロンなどの免疫賦活剤、etoposide などの抗腫瘍剤など）を用いて薬剤感受性試験を行う。

4. 研究成果

診断指針に基づいた CAEBV 症例では、持続的あるいは再発する IM 様症状に加え、末梢血を含む組織における EBV ゲノム陽性など全例で EBV の活性化を認めた。特に増殖関連抗原である EA および VCA に対する蛍光抗体法を用いた IgG 抗体価の高値が特徴的であった。EBNA 抗体価に関しては低値から高値であり、一定の結果は得られなかった。また、末梢血における EBV ゲノム量の増加をみた。主な EBV 感染細胞は、T 細胞あるいは NK 細胞であったが、B 細胞に優位に感染している症例も認められた。なお、それぞれの症例における経過・予後に関しては研究期間内では不明であった。また、明らかな免疫不全、自己免疫疾患、悪

性疾患を診断時点ではみいだせなかった。

樹立細胞株および末梢血を含む組織の潜在 EBV 関連抗原および遺伝子の発現は、EBNA1、LMP1、LMP2a、LMP-2b を発現する II 型潜伏感染型であった。それらにおける EBV 増殖関連抗原および遺伝子の発現は認めなかった。染色体分析では、共通する特異な染色体変化をみいだせなかった。

細胞培養における経時的関連抗原および遺伝子の発現に関しては、自然培養では、CAEBV 患者由来細胞において、前記の潜伏 EBV 関連抗原および遺伝子の発現が経時的に減少した。EBER 発現も、経過とともに低下し、細胞株は樹立されなかった。対照も同じ様な傾向をみたが、潜伏関連抗原および遺伝子の発現が増し、その後、EBV 陽性細胞株が樹立した例もあった。IL-2 添加培養では、CAEBV 患者では主に T 細胞と NK 細胞由来の細胞株が樹立し、経過と共に、EBV 潜伏関連抗原および遺伝子の発現が増加し、EBV 陽性細胞株の樹立をみた。培養上製中の各種サイトカインの検索では一定の結果は、得られなかった。対照では EBV 陽性細胞株非樹立例で、granzyme B の発現と IL-12 ならびにインターフェロンガンマの産生と発現をともなう EBV-CTL 活性を認めた。CAEBV では、granzyme B の同定や、EBV-CTL 活性の程度は、異質性を認め、一定の共通する結果は得られなかった。NK 細胞活性は、一般に活性低値の傾向がみられたが正常例も認めた。検討し得た樹立 EBV 陽性細胞株の薬剤感受性試験は、結果に一定性がなく、最終評価をし得なかった。

以上の結果は、CAEBV 症例における著しい EBV の活性化とともに、その病態は、異質性があり必ずしも単一ではないことを示唆した。ただし、潜伏 EBV 感染型が II 型であることから、何らかの特異的免疫不全の存在が示唆される (LMPs の発現があり、これらは主に EBV-CTL の標的となる。すなわち CAEBV における EBV-CTL 不全の存在が示唆される) と共に、治療として EBV-CTL 投与の可能性も考えられる (Okano M: Therapeutic approaches for severe Epstein-Barr virus infection. *Pediatric Hematology/Oncology* 14: 109-119, 1997., Okano M, Gross TG: Advanced therapeutic and prophylactic strategies for Epstein-Barr virus infection in immunocompromised patients. *Expert Reviews of Anti Infective Therapy* 5: 403-413, 2007., Okano M: Epstein-Barr virus infection and its pathogenetic roles for human diseases. *Current Pediatric Reviews* 5: 192-197, 2009)。

なお、前述したように、本症は、経過中、T 細胞、NK 細胞を中心とするリンパ増殖性疾患/リンパ腫などの発症をみる場合も多い。今後は、長期的観察とともに、主にそれらの

発症をみない EBV 感染細胞亜型の明らかな症例とリンパ増殖性疾患/リンパ腫発生例などの病態の相違を、可能な限り比較検討し、本症の発症機序の解明とさらなる対処法および治療法の進展をめざすことが求められる。そのためには、正確な診断に基づく症例の蓄積と、臨床あるいは基礎研究にたずさわる諸氏の交流を含む、研究環境の充実も大切なことの一つと思われる。

今後も、CAEBV に関する検討課題は多く、さらなる研究の発展が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1 Okano M: Features of chronic active Epstein-Barr virus infection and related human diseases. *Open Hematology Journal* 5: 1-3, 2011 (査読有)

2 岡野素彦: 慢性に経過する Epstein-Barr ウイルス関連疾患 . 臨床とウイルス 38: 213-223, 2010 (査読有)

3 Toita N, Kawamura N, Hatano N, Takezaki S, Ohkura Y, Yamada M, Okano M, Okada T, Sasaki F, Kubota KC, Itoh T, Ariga T: A five-year old boy with unicentric Castleman's disease affecting the mesentery: utility of serum IL-6 level and 18F-FDG PET for diagnosis. *Journal of Pediatric Hematology and Oncology*. 31: 693-695, 2009 (査読有)

4 Okano M: Epstein-Barr virus infection and its pathogenetic roles for human diseases. *Current Pediatric Reviews* 5: 192-197, 2009 (査読有)

[図書](計 1 件)

1 岡野素彦: EB ウイルス感染症 . 小児感染症学改訂第 2 版(岡部信彦編、診断と治療社)印刷中 (査読無)

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡野 素彦 (OKANO MOTOHIKO)

北海道立衛生研究所・感染症センター・センター長

研究者番号 : 50261300

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

