

## 第 41 回日本小児感染症学会シンポジウム 1

## 炎症性疾患をどう理解するか — Epstein-Barr ウイルス関連血球貪食性リンパ組織球症\* —

前田 明彦\*\* 佐藤 哲也\*\* 石浦 嘉人\*\* 堂野 純孝\*\*  
久川 浩章\*\* 藤枝 幹也\*\* 脇口 宏\*\*

**要旨** 血球貪食性リンパ組織球症 (hemophagocytic lymphohistiocytosis : HLH) の本態はサイトカインストームという「免疫の暴走」である。EB ウイルス感染が引き金となる HLH において、サイトカインストームを起こす火種に焦点をしばって考える場合、3 病型に分類することが妥当である。① 家族性 HLH (FHL) など遺伝性 HLH では、キラー不全により、EBV 感染を制御できないために、免疫反応が持続し、高サイトカインとなる。② X 連鎖リンパ増殖症候群 (XLP) では、SAP 異常によるキラー不全および細胞増殖が高サイトカイン血症につながる。③ 基礎疾患が特定できない EBV-HLH (狭義) や慢性活動性 EB ウイルス感染症 (CAEBV) では、前 2 者と異なり、T 細胞あるいは NK 細胞に EBV が感染し腫瘍性増殖を示すため、サイトカイン異常産生をきたす。

### はじめに

血球貪食性リンパ組織球症 (HLH) は、種々の原因でサイトカインストームをきたした状態であり、いわば免疫の暴走である。図 1 に示すように HLH は発症年齢に特徴があり、遺伝性のある家族性 HLH (FHL など) は 2 歳以前に発症することが多く、その原因遺伝子が次々と同定されている。HLH のなかでは、本稿の主題である EB ウイルス感染が関与するケースが、わが国では最も頻度が高い。

EB ウイルス関連 HLH (広義の EBV-HLH) に

は、遺伝性のもの (FHL, X 連鎖リンパ増殖症候群など)、いわゆる EBV-AHS と呼ばれてきた原因の明らかでないもの (狭義の EBV-HLH)、NK/T 細胞腫瘍 (慢性活動性 EBV 感染症 CAEBV を含む) に関連する HLH がある。それぞれが、少しずつ異なったメカニズムで炎症を起こす。本稿では、EBV-HLH のそれぞれの病態において、いわゆる免疫の暴走を起こすメカニズムについて検討したい。

### 1. EBV-HLH の診断 (図 2)<sup>1)</sup>

臨床症状として、発熱、肝機能障害、脾腫、出

\* Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis and inflammation

**Key words** : サイトカインストーム, 慢性活動性 EB ウイルス感染症, 血球貪食症候群, 血球貪食性リンパ組織球症, X 連鎖リンパ増殖症候群

\*\* 高知大学医学部附属病院小児科 Akihiko Maeda, Tetsuya Sato, Yoshihito Ishiura, Sumitaka Dohno, Hiroaki Hisakawa, Mikiya Fujieda, Hiroshi Wakiguchi  
〔〒 783-8505 南国市岡豊町小蓮〕

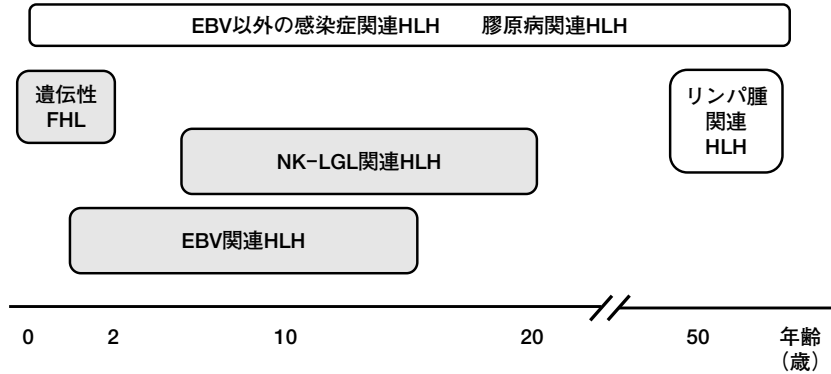
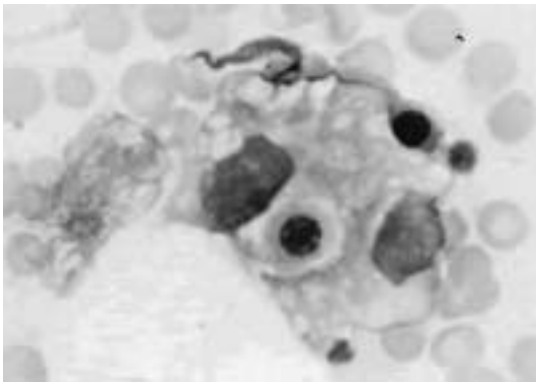


図 1 血球貪食性リンパ組織球症 (HLH) の分類と発症年齢



- ・臨床症状  
5 日以上の発熱，肝機能障害，脾腫，出血傾向など
- ・検査所見  
2 系統以上の血球減少，高 LDH 血症，高フェリチン血症，高 TG 血症，低フィブリノゲン血症
- ・病理所見  
血球貪食細胞増加
- ・EBV の関与  
初感染・再活性化を示す抗体価  
末梢血中 EBV ゲノムの著増  
骨髓・リンパ節・肝脾組織中の EBER 陽性細胞証明

図 2 EBV-HLH 診断 (文献 1) より引用)

血傾向を認める。多くが EBV の初感染に伴って発症するので，頸部リンパ節腫脹や扁桃炎などの伝染性単核症としての症状を伴うことが多い。検査所見として 2 系統以上の血球減少，臓器障害を反映して高 LDH 血症，マクロファージ活性化を反映してフェリチンが著明高値となり，TG 上昇，Tchol 低下など脂質代謝の変化，播種性血管内凝

固 (DIC) を呈しフィブリノゲン低値が認められる。病理所見では骨髓，リンパ節などで血球貪食細胞が増加するが，病初期は顕著でないこともよく経験される。

EBV の関与の証明は，① 初感染・再活性化を示す抗体，すなわち EBV viral capsid antigen (VCA)-IgM と early antigen (EA) 抗体の上昇，② 末梢血中 EBV ゲノムの著増，③ *in situ* hybridization 法による骨髓・リンパ節・肝脾組織中の EBV encoded RNA (EBER) 陽性細胞の証明のうち 1 項目以上によりなされる。

## II. EBV-HLH の病態

HLH の病態は，リンパ球および組織球・マクロファージの活性化と増殖に伴う高サイトカイン血症，サイトカインストームによる造血障害と骨髓抑制である (図 3)。その結果として，好中球減少をきたすと HLH 発症早期に感染死の原因となる。凝固機能障害により DIC による重篤な出血を，臓器障害により多臓器不全をきたす。これら病態の根幹，すなわち，サイトカインストームを起こす火種について，以下の 3 者に分類すると理解しやすい。

① 遺伝性 (家族性) HLH (この場合は，HLH の引き金は EBV 感染に限らない)

② X 連鎖リンパ増殖症候群

③ 基礎疾患が特定できない狭義の EBV-HLH

現実には，EB ウイルス陽性の HLH 患者をみた際に，上記を鑑別する必要がある。NK 活性が低値

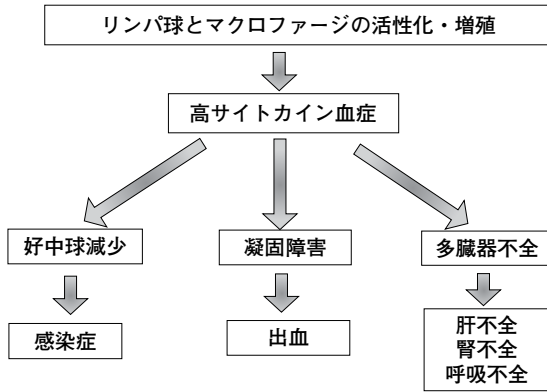


図 3 HLH の病態

表 1 EBV 初感染後の免疫応答 (左) と遺伝性 HLH (右)

EBV 感染	
↓	組織球, NK 細胞, CTL の活性化
↓	感染細胞を攻撃
↓	病原体 (抗原) を制御
↓	免疫反応が終息
↓	キラー不全・感染の持続
↓	免疫系の活性化持続
↓	高サイトカイン状態の持続
↓	HLH

表 2 HLH をきたす遺伝性疾患

疾患	染色体の位置	原因とされる遺伝子	遺伝子産物の機能
FHL-1	9q21.3-22	不明	不明
FHL-2	10q21-22	<i>PFR1</i>	induction of apoptosis
FHL-3	17q25	<i>UNC13D</i>	Vesicle priming
FHL-4	6q24	<i>STX11</i>	Vesicle transport
FHL-5	19p	<i>STXBP2</i>	Vesicle transport
GS-2	15q21	<i>RAB27A</i>	Vesicle docking
CHS-1	1q42.1-42.2	<i>LYST</i>	Vesicle transport
XLP	Xq25	<i>SH2D1A</i> (SAP)	Signal transduction & activation of lymphocytes

FHLH : Familial HLH, GS : Griscelli syndrome, CHS : Chediak-Higashi syndrome, STX syntaxin, *STXBP2* : *STX* binding protein 2 (Munc18-2)

を示す場合は、遺伝性 HLH をより強く疑う根拠となる。3 者で、サイトカインストームに至る機序や治療戦略が異なる。

### III. 遺伝性 HLH

X 連鎖リンパ増殖症候群以外の遺伝性 HLH は共通のメカニズム (表 1) でサイトカインストームを生じる。この群には、家族性 HLH (FHL 1-5)、Griscelli 症候群、Chediak-Higashi 症候群が含まれる (表 2)。2009 年に FHL-5 が報告され<sup>2)</sup>、遺伝性 HLH の原因解明は今なお進行中である。

表 1 に示すように、健常者もしくは通常の EBV 初感染では、感染後、NK 細胞、次いで CTL が感染細胞を攻撃し、EBV 感染細胞を制御することにより免疫反応が終息する。一方、遺伝性 HLH

では、EBV 感染後に種々の理由でキリングがうまくいかず、感染細胞の増殖が持続する。感染細胞を制御すべく免疫活性化状態が持続し、サイトカインストームを引き起こす。

遺伝性 HLH でキラー不全となるメカニズムを図 4<sup>3)</sup>に示す。キラー活性をもち、EBV 感染 B リンパ球の制御に重要なのは NK 細胞や CD8<sup>+</sup>T 細胞である。抗原提示細胞からの刺激を受けて、キラー細胞が作動する。キラー細胞は、パーフォリンやグランザイムといった蛋白を cytotoxic granule もしくは cytotoxic vesicle と呼ばれる構造体のなかに包蓄しており、これらを放出することにより、標的細胞を攻撃する。パーフォリンは、その名の通り標的細胞に穴をあけて、細胞傷害をもたらす。パーフォリンの異常が FHL-2 であり、

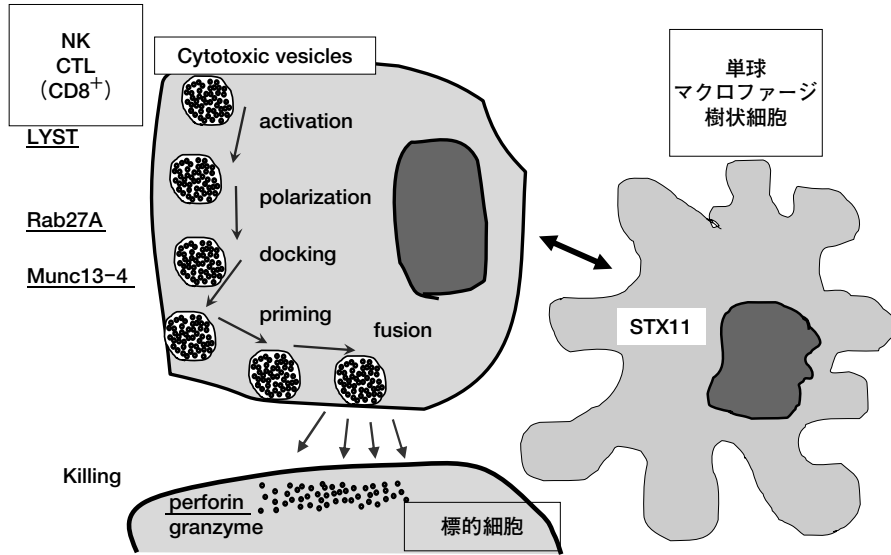


図 4 遺伝性 HLH とキラー不全のメカニズム (文献 3) より引用)

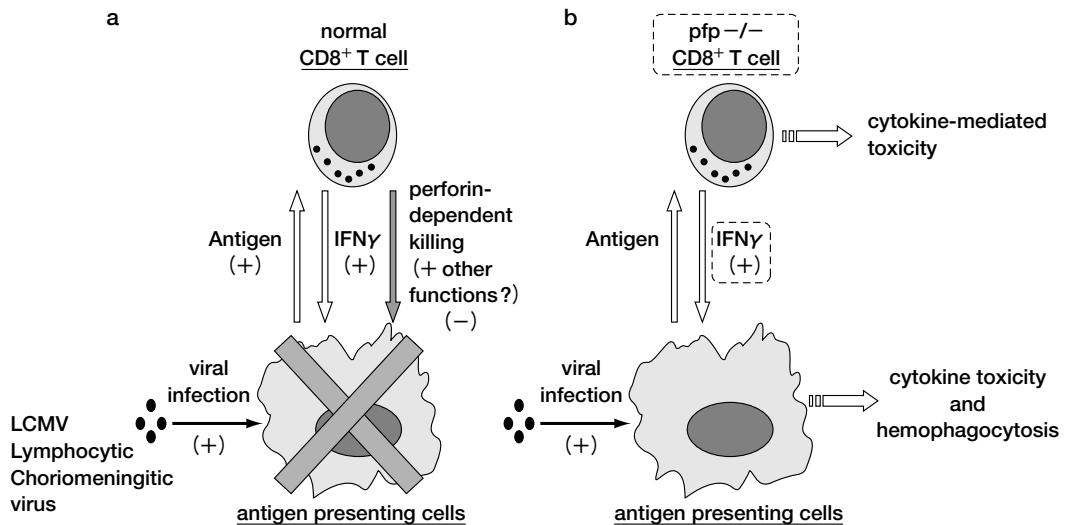


図 5 Perforin 欠損マウスと LCMV 感染：HLH モデル (文献 4) より引用)

LYST, Rab27A, Munc13-4 といった遺伝子産物異常があれば, cytotoxic vesicle の輸送, 放出に至る機能の障害の結果, キラー不全が生じ, EBV 感染細胞を許容し, 免疫反応が持続する<sup>3)</sup>.

2004 年に, ヒトにおける HLH と非常に類似性の高い, マウスモデル (図 5) が Jordan らによって発表された<sup>4)</sup>. パーフォリン遺伝子が欠損したマウスで lymphocytic choriomeningitic virus

(LCMV) 感染により HLH が惹起される系で, 臨床検査所見, 病理組織, 高サイトカイン血症ともにヒトにおけるものと酷似する. LCMV は, EBV ウイルス同様にリンパ球に感染し, 強い CTL 活性を誘導するウイルスで, 古くから細胞性免疫の解析に利用されているウイルスである. このマウス実験系で, LCH 発症には CD8<sup>+</sup>T 細胞と IFN $\gamma$  が最も重要であることが明らかとなった. すなわ

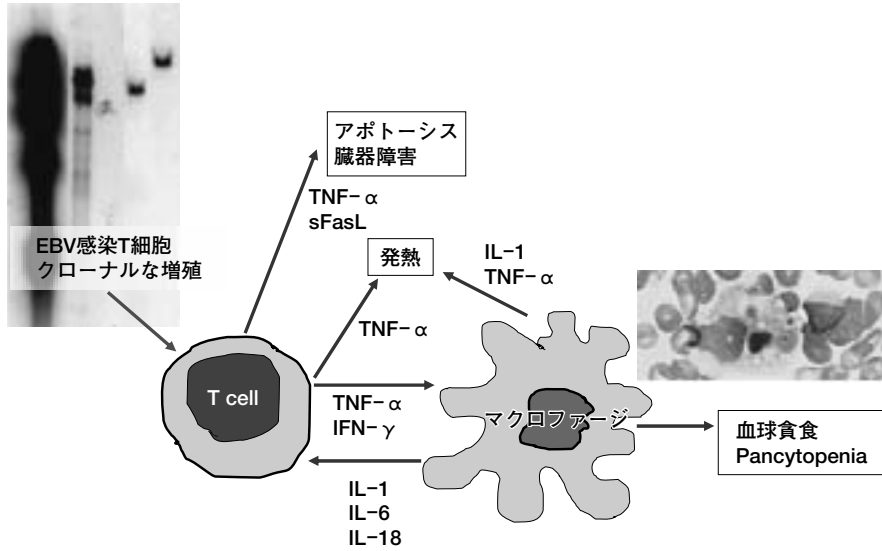


図 6 EBV-HLH

ち、正常マウスでは、LCMV 感染により抗原が提示されると、 $CD8^+$ 細胞が、 $IFN\gamma$  産生に加えて、パーフォリンを放出するなどして感染細胞を攻撃し制御する。一方、パーフォリン欠損マウスでは、キラー不全が生じ、抗原提示が持続し、 $IFN\gamma$  などサイトカイン放出が持続する結果、高サイトカイン血症を生じ、血球貪食や臓器障害を惹起する。この系では、 $CD8^+$ T 細胞の除去、もしくは、 $IFN\gamma$  の不活化によって、HLH 発症を抑制することが可能であった。EB ウイルスは種特異性が高く、感染動物モデルがないため、Jordan らの実験系は非常に有力な研究モデルと期待される。

#### IV. X 連鎖リンパ増殖症候群 (X-linked lymphoproliferative syndrome : XLP)

XLP は EBV に非常に感受性の高い疾患で、EBV 初感染時の致死率が高く、HLH を高率に起こす。EBV という病原体に特異的な免疫不全症といっても過言ではない。原因遺伝子が SAP (SH2D1A) であることが 1998 年に相次いで 3 研究グループから報告された<sup>5~7)</sup>。SAP の機能が EB ウイルス制御の鍵であることは明白であり、SAP 蛋白の機能が熱心に解析されている。SAP は NK 細胞と T 細胞のキラー活性に関与すると報告された。さらに、SAP はアポトーシスに関与

していること、SAP 異常により、EBV をコントロールすべく発動された T 細胞が過剰に増殖・活性化し、免疫反応を惹起する、あるいはリンパ腫発症に関与する可能性が示されている<sup>8)</sup>。

#### V. 基礎疾患が特定できない EBV-HLH (狭義)

基礎疾患が特定できない、狭義の EBV-HLH は、日本で最もよく遭遇するタイプである。経過中に HLH を高率 (20%台) に合併する慢性活動性 EB ウイルス感染症 (CAEBV) もこの範疇に属する。この場合は、図 6 に示すように、EB ウイルスが本来親和性の高い B 細胞ではなく、T 細胞や NK 細胞に感染することが証明されている。しかも感染ウイルスがモノクローナルな増殖を示し、腫瘍性の性格を有している。このため、EBV 感染 T 細胞もしくは NK 細胞の活性化持続の結果、過剰なサイトカイン産生をきたす。TNF $\alpha$  と  $IFN\gamma$  は、マクロファージ系の細胞を活性化して血球貪食を起こし、IL-1, IL-6, IL-18 の分泌を促進することで、T 細胞をさらに活性化する。加えて TNF $\alpha$  が発熱、アポトーシスの機序で臓器障害を惹起する<sup>9)</sup>と報告されている。

CAEBV 症例では XLP の原因遺伝子である SAP 異常が認められない<sup>10)</sup>。

このように、EBV-HLH では T 細胞または NK

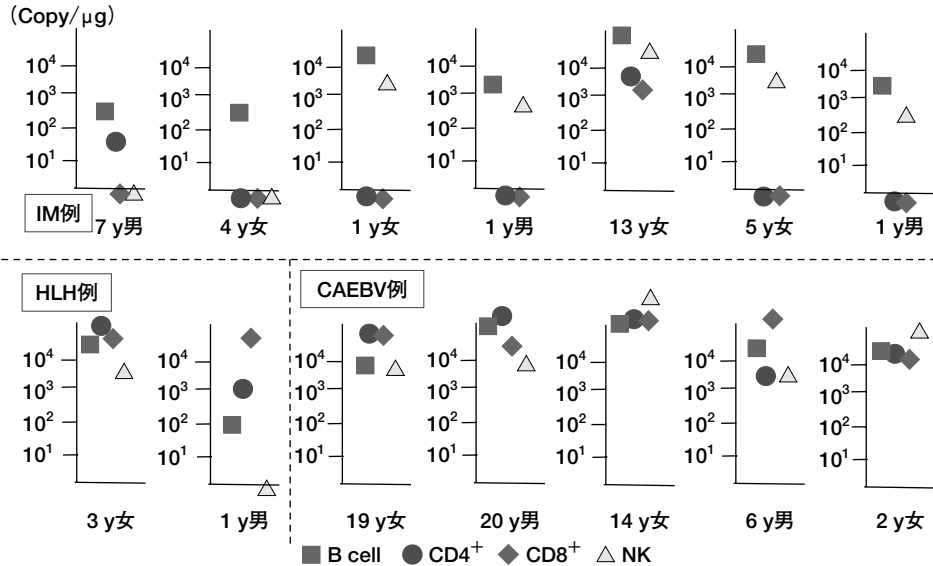


図 7 各疾患における EBV 感染細胞

細胞に EBV の持続感染が成立することがサイトカインストームの火種となる。したがって感染細胞の同定は病態を明らかにするために重要である。筆者らは HLH や、経過中 HLH を高率に合併する CAEBV の症例で EBV 感染細胞の同定を行っている。方法は、末梢血液からリンパ球を単離後、モノクローナル抗体 (CD19, CD4, CD8, CD56) 標識磁気ビーズを用いて各分画を精製 (purity 約 90%) し、各分画から DNA を抽出した後、これをテンプレートとして、リアルタイム PCR 法で EBV ゲノム量を定量し、Copy/μg DNA で表示する。EBV コピー数が最も多い分画を感染細胞の首座とみなすことができる。

解析結果の一部を図 7 に示す。それぞれの細胞分画の EB ウイルスコピー数を縦軸に示した。伝染性単核症 (IM) の例ではウイルス感染細胞は B 細胞が優位であり、B 細胞以外への感染はあったとしても多くない。他の研究グループから指摘があるように IM でも T 細胞や NK 細胞に感染が成立しているかどうかについては、各細胞分画の purity が 100% でなく、EBV 陽性細胞の紛れ込みの可能性が否定できないため、われわれの結果からは断言できない。慢性活動性 EBV 感染症では CD4<sup>+</sup>細胞が優位な例、CD8<sup>+</sup>が優位な例、NK

細胞が優位な例、CD4<sup>+</sup>と CD8<sup>+</sup>が同程度の例など多様であった。ウイルスゲノム量が、CAEBV 例は IM 例の 10~100 倍の高値であったが、反復検査で慢性的に持続することが特徴<sup>11)</sup>であった。一方、HLH は CD8<sup>+</sup>細胞、CD4<sup>+</sup>細胞が感染の首座であった。適切な治療がなされれば、ウイルス量は経時的に減少することが確認される。Kasahara ら<sup>12)</sup>によると CAEBV では CD4<sup>+</sup>T 細胞に感染が確認されることが多いのに対し、EB ウイルス関連 HLH では CD8<sup>+</sup>T 細胞優位に感染がみられるが、一律ではない。これら感染 T 細胞および NK 細胞がサイトカインストームの火種となる。

感染 T 細胞では膜蛋白である latent membrane protein (LMP) 1 と呼ばれるウイルス構造蛋白を発現することが示されており、この LMP1 が NFκB のパスウェイを介して、SAP 発現を抑制し、XLP 類似のメカニズムが起きる可能性が示唆<sup>13)</sup>されている。また、LMP1 は T 細胞において、TNFα 産生を促進し、他の臓器細胞にはアポトーシスを惹起し臓器障害を起こす (図 8)。一方で、TNFα が Autocrine にアポトーシスを抑制し、細胞を survival の方向に導くメカニズムが示されており<sup>14)</sup>、腫瘍原性の形成に関与していると考えられている。

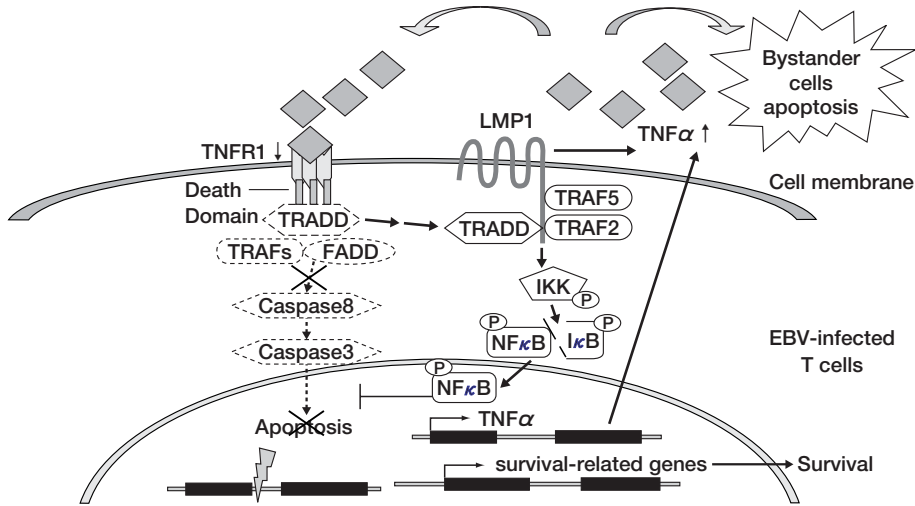


図 8 HLH から EBV 関連 T 細胞リンパ腫への進展 (文献 14) より引用)

## VI. EBV-HLH (狭義) で T 細胞に EBV が感染する機序

いまだによくわかっていない課題は、HLH において、EB ウイルスが T 細胞へ持続感染するメカニズムである。T 細胞に感染することが阻止できれば HLH も CAEBV も、発症阻止が可能かもしれない。In vivo では HLH では T 細胞 (主に CD8<sup>+</sup>) への感染が観察されるが、in vitro では一過性の感染が観察されるのみである。

われわれは、多数の T 細胞株、NK 細胞株を用いて、EB ウイルス感染実験を試みた。B 細胞などの細胞株では感染した細胞 (convertant) を容易に得ることができたが、T 細胞、NK 細胞では決して永続的な EB ウイルス感染細胞株樹立に成功せず<sup>15)</sup>、また、健康人末梢血から単離した T 細胞、NK 細胞でも同様の結果であった。In vivo で観察される現象が、in vitro で再現できないのはどのようなトリックが隠されているのであろうか。他ウイルスとの重複感染、活性化など T 細胞の変容、幹細胞レベルでの感染、単にごくまれなイベントである、などさまざまな仮説が想定される。そのメカニズムを考察するうえで興味深い症例を経験したので紹介する。

## VII. EBV-HLH (狭義) と重複感染

突発性発疹の原因ウイルスである HHV6 は急性感染では CD4<sup>+</sup>細胞に感染し、同じ細胞親和性を有する HIV と重複感染することが示され、ウイルス相互作用のあることが示唆されている。しかし、EBV と HHV6 との相互作用に関する報告は少ない。われわれはそれを想起させる症例を経験し、以前に発表した<sup>16)</sup>。2 症例とも EBV-HLH と診断した例で、HHV6 と EBV ゲノムを同時に末梢血から検出した。治療経過とともに、EBV ゲノム量が減少し、HHV6 ゲノムも陰性化した。特に一方の症例では HLH 発症と同時に、血清学的に HHV6 の初感染が証明され、ウイルス相互作用と発症との関連が疑われた例であった。EBV のターミナルリピートのサザン解析で、ウイルスはモノクローナルであり、腫瘍性の増殖が示唆された。感染細胞同定の結果、EBV、HHV6 とともに感染の首座は CD4<sup>+</sup>T 細胞と判明した。これらの例は、EBV が T 細胞に感染する理由を考えるうえで、示唆に富む症例であり、今後の検討が待たれる。

本論文の要旨は、2009 年 11 月に福井で開催された、第 41 回日本小児感染症学会のシンポジウム 1 「炎症性疾患をどう理解するか」で発表した。

謝辞：リンパ球分離などを担当していただいた高知大学医学部小児思春期医学の内多愛氏，竹本佐智氏に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Imashuku S, Tabata Y, Teramura T, et al : Treatment strategies for Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis (EBV-HLH). *Leuk Lymphoma* 39 (1-2) : 37-49, 2000
- 2) zur Stadt U, Rohr J, Seifert W, et al : Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 (FHL-5) is caused by mutations in Munc18-2 and impaired binding to syntaxin 11. *Am J Hum Genet* 85 (4) : 482-492, 2009
- 3) Janka GE : Hemophagocytic syndrome. *Blood Rev* 21 (5) : 245-253, 2007
- 4) Jordan MB, Hildeman D, Kappler J, et al : An animal model of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) : CD8+T cells and interferon gamma are essential for the disorder. *Blood* 104 (3) : 735-743, 2004
- 5) Sayos J, Wu C, Morra M, et al : The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* 395 : 462-469, 1998
- 6) Coffey AJ, Brooksbank RA, Brandau O, et al : Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease from mutations in an SH2-domain encoding gene. *Nature Genet* 20 : 129-135, 1998
- 7) Nichols KE, Harkin DP, Levitz S, et al : Inactivating mutations in SH2-encoding gene in X-linked lymphoproliferative syndrome. *Proc Natl Acad Sci* 95 : 13765-13770, 1998
- 8) Nagy N, Matskova L, Kis LL, et al : The proapoptotic function of SAP provides a clue to the clinical picture of X-linked lymphoproliferative disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 106 (29) : 11966-11971, 2009
- 9) Kawada J, Kimura H, Shibata Y, et al : Evaluation of apoptosis in Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Med Virol* 78 (3) : 400-407, 2006
- 10) Sumegi J, Huang D, Lanyi A, et al : Correlation of mutations of the SH2D1A gene and Epstein-Barr virus infection with clinical phenotype and outcome in X-linked lymphoproliferative disease. *Blood* 96 : 3118-3125, 2000
- 11) Maeda A, Wakiguchi H, Yokoyama W, et al : Persistently high Epstein-Barr virus (EBV) loads in peripheral blood lymphocytes from patients with chronic active EBV infection. *J Infect Dis* 179 : 1012-10115, 1999
- 12) Kasahara Y, Yachie A, Takei K, et al : Differential cellular targets of Epstein-Barr virus (EBV) infection between acute EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis and chronic active EBV infection. *Blood* 98 : 1882-1888, 2001
- 13) Chuang HC, Wang JM, Hsieh WC, et al : Up-regulation of activating transcription factor-5 suppresses SAP expression to activate T cells in hemophagocytic syndrome associated with Epstein-Barr virus infection and immune disorders. *Am J Pathol* 173 (5) : 1397-1405, 2008
- 14) Chuang HC, Lay JD, Chuang SE, et al : Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein-1 down-regulates tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptor-1 and confers resistance to TNF-alpha-induced apoptosis in T cells : implication for the progression to T-cell lymphoma in EBV-associated hemophagocytic syndrome. *Am J Pathol* 170 (5) : 1607-1617, 2007
- 15) Maeda A, Kiss C, Chen F, et al : EBNA promoter usage in EBV-negative Burkitt lymphoma cell lines converted with a neomycin-resistant EBV strain. *Int J Cancer* 93 : 714-719, 2001
- 16) 堂野純孝, 佐藤哲也, 大石 拓, 他 : 末梢血からEBV と HHV-6 のゲノムを同時に検出した血球貪食症候群の2例, 第48回日本小児血液学会, 大阪, 2006