

AKIRU MUNICIPAL MEDICAL CENTER

公立阿伎留医療センター

感染細胞同定解析の重要性と概略



感染細胞同定解析の重要性

- EBウイルス感染症の慢性活動性EBウイルス病(CAEBV)、EBウイルス関連血球貪食性リンパ組織球症(EBV-HLH)、重症蚊刺アレルギー(SMBA)、種痘様水疱症リンパ増殖異常症HV-LPD)、移植後リンパ増殖症(PTLD)などではEBウイルスが感染している細胞を同定することは治療の決定に重要であり、必須の検査と言える。

『慢性活動性EBウイルス病とその類縁疾患診療ガイドライン2023』

- 現在、多くの症例を実施可能な施設はほとんどない状況であるため、公立阿伎留医療センターでの実施を開始し、全ての依頼に対応できるよう目指す。

感染細胞がB細胞 → Rituximabの使用が治療の選択肢に入る。

感染細胞がT細胞
感染細胞がNK細胞 → Rituximabの使用はなく、免疫化学療法、多剤併用化学療法、造血幹細胞移植などが治療の選択肢に入る。

感染細胞同定解析法の種類

(1) Beads法

長所・少ないPBMC数で解析可能($5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ PBMC cells)

- ・1日でも解析可能
- ・安価

短所・熟練の技術者が必要

- ・一人の技官で1日2件がmax

(2) Flow-fish法

長所・一人の技官で1日10件くらい可能

- ・熟練の技術者不要

短所・高価

- ・2日かかる
- ・多くのPBMC数が必要($2 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ PBMC cells)>幼児は厳しいか！？
- ・結果の評価が難しい

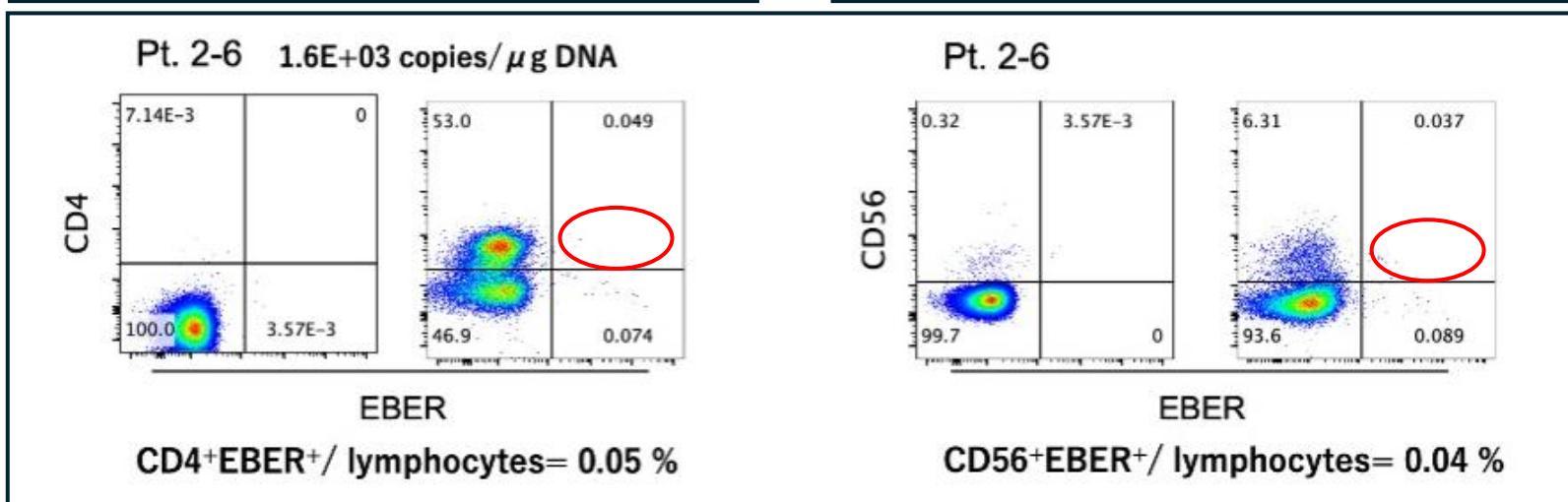
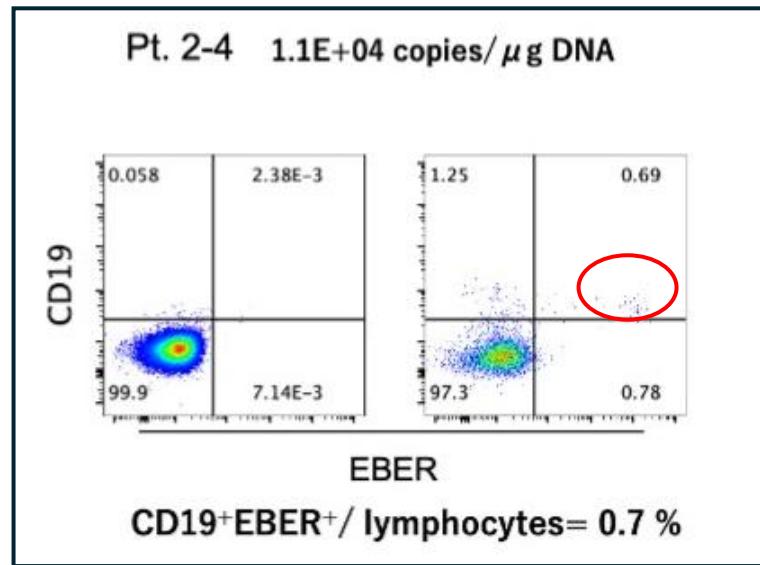
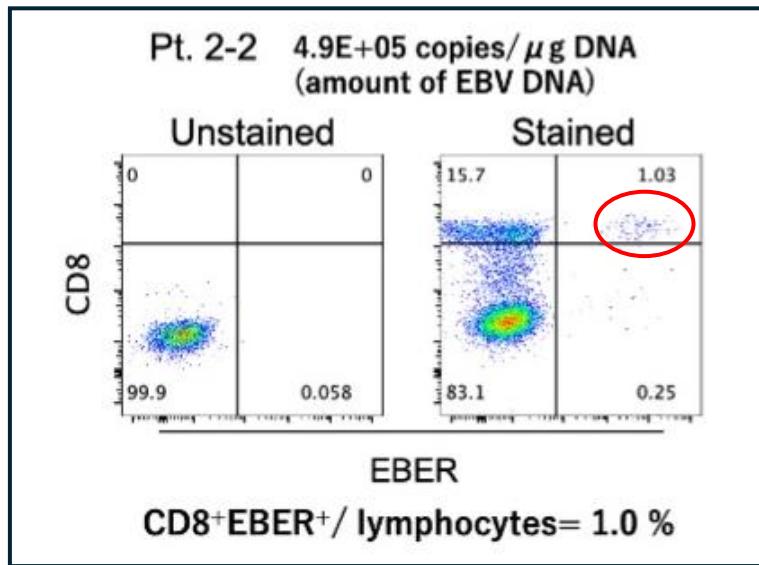
(3) 病理組織染色法

長所・どの病院でも病理検査室はある

短所・EBV遺伝子のEBERと細胞表面マーカーの二重染色が難しい
・組織検体が必要

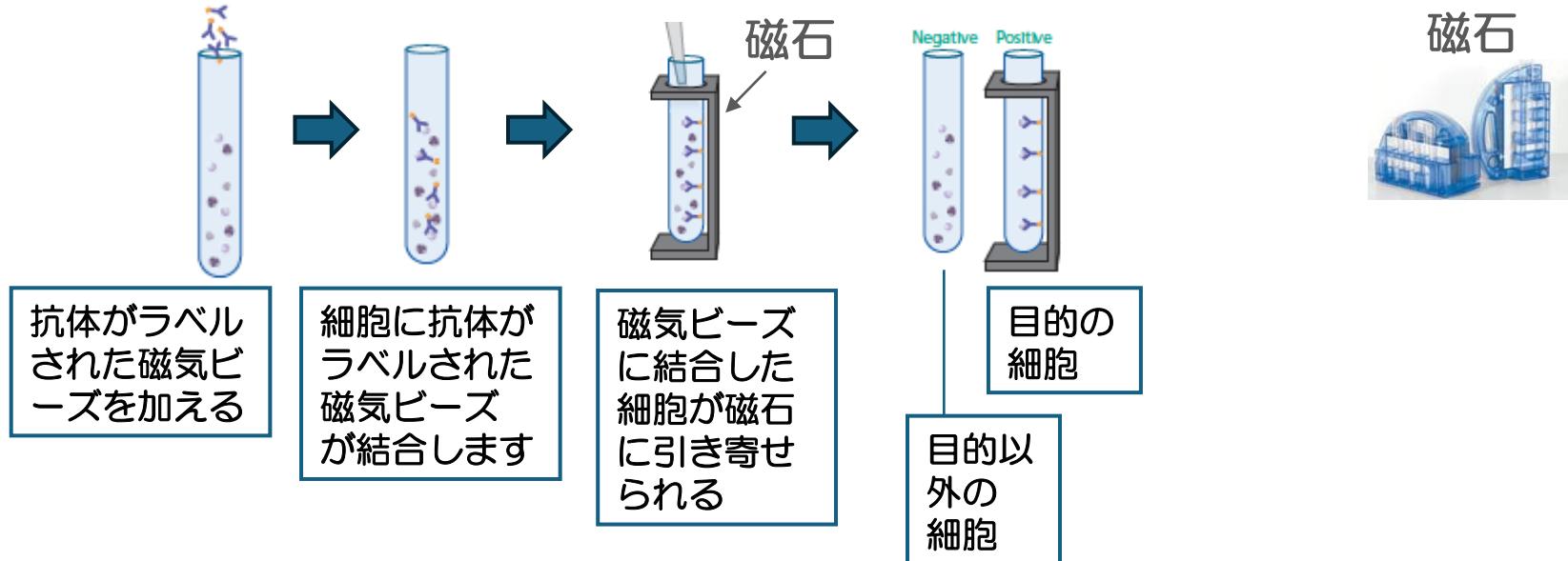
Flow-FISHを用いた感染細胞同定法

- PBMCがビーズ法よりも多く必要
- 2日間かかる



感染細胞同定解析の細胞分離法

直列法(阿伎留医療センター法)による
精度と感度の向上



EBV感染細胞同定解析法（並列法）

PBMCが多く必要！

1 x 10⁶ cells 1 x 10⁶ cells

PBMC

PBMC

PBMC

PBMC

PBMC

PBMC

CD19⁺

CD4⁺

CD8⁺

CD56⁺

CD14⁺

γδ-

それぞれの分画からDNAを抽出



EBVゲノム定量解析（リアルタイムPCR）

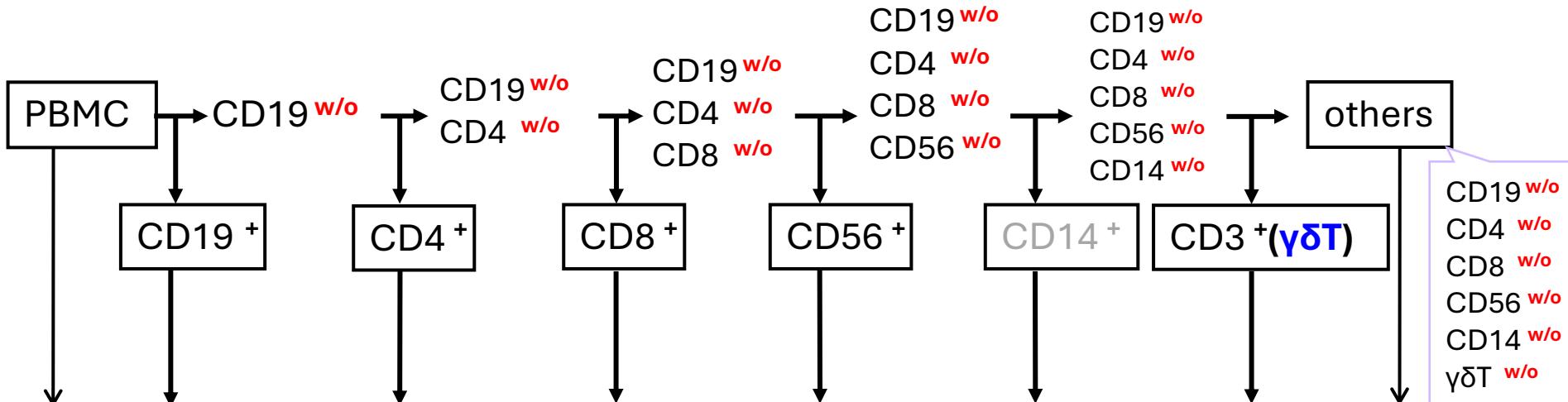


感染細胞同定

感染細胞のメインは
CD8陽性T細胞だが他の
分画にもいる可能性あり

(例) PBMC(All) : 2.1 x 10⁴ copies/μgDNA
CD19⁺(B cells) : 1.6 x 10³ copies/μgDNA
CD4⁺ (T cells) : 4.2 x 10² copies/μgDNA
CD8⁺ (T cells) : 7.5 x 10⁶ copies/μgDNA
CD56⁺(NK cells): 5.3 x 10⁴ copies/μgDNA
CD14⁺(Mono) : 2.4 x 10³ copies/μgDNA
CD3⁺(γδ-T cells) : 7.1 x 10³ copies/μgDNA

EBV感染細胞同定解析法（直列法）：阿伎留法



それぞれの分画からDNAを抽出

EBVゲノム定量解析（リアルタイムPCR）

B,T,NK細胞%情報との
総合判断で精度を上
げる！

感染細胞は
 • B細胞とCD4陽性T細胞
 • メインの感染細胞はCD4

(例) PBMC(All) : 2.1×10^4 copies/ μgDNA
 CD19⁺(B cells) : 1.6×10^3 copies/ μgDNA
 CD4⁺ (T cells) : 7.5×10^6 copies/ μgDNA
 CD8⁺ (T cells) : 検出感度以下
 CD56⁺(NK cells):検出感度以下
 CD14⁺(Mono) : 検出感度以下
 CD3⁺($\gamma\delta$ -T cells) : 検出感度以下
 Others : 検出感度以下

感染細胞同定



EBV感染細胞同定解析受託の流れ

検査依頼（①か②のいずれか）

- ① caebv@akiru.hospitalへ依頼メール（希望日など通知）
- ② 病院予約センターへ電話（CAEBV専門外来予約）



- ① 検査日決定（検査日に合わせ採血・検体発送）
- ② CAEBV専門外来（診察・採血）



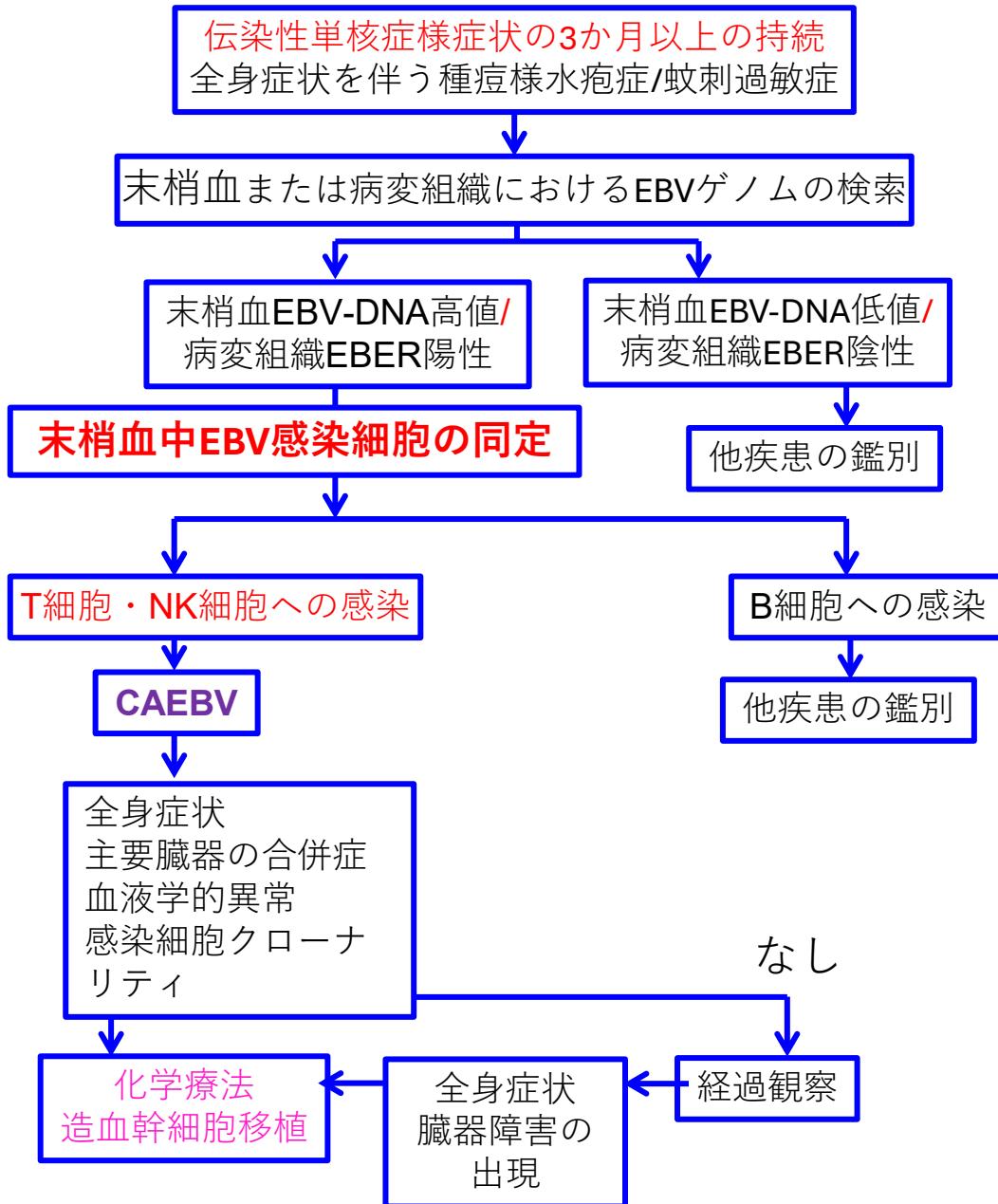
①,② 感染細胞同定解析実施



感染細胞同定解析結果報告

- ① メールによる報告書および検查明細書の通知
- ② CAEBV外来での診断結果の説明

慢性活動性EBウイルス病 (CAEBV)



Epstein Barrウイルス関連リンパ増殖性疾患 (EBV-LPD)とEBV遺伝子の発現

発症	B-cell LPD	T/NK-cell LPD
急性発症 が多い	伝染性单核症 (infectious mononucleosis:IM)	EBV関連血球貪食リンパ組織球症 (EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis:EBV-HLH) 種痘様水疱症リンパ増殖異常症 (hydroa vacciniforme lymphoproliferative disorder: HV-LPD) 慢性活動性EBV病(chronic active EBV disorders: CAEBV) 重症蚊刺アレルギー (severe mosquito bite allergy: SMBA) 節外性鼻型NK/T細胞リンパ腫 (extranodal NK/T lymphoma,nasal type: ENKL) NK細胞型顆粒リンパ球增多症 (NK type-granular lymphocyte-proliferative disorders: NK-GLPD) 種痘様水疱症様リンパ腫 (HV-like lymphoma) 侵攻性NK細胞白血病 (aggressive NK leukemia: ANKL)
発症 様式は さまざま	移植後LPD (post-transplant EBV-associated LPD: PTLD) エイズ関連リンパ腫 (AIDS-related lymphoma) 加齢性LPD (senile LPD) 膿胸関連リンパ腫 (pyothorax-associated lymphoma:PAL)	
EBV遺伝子 発現パターン	<p>Latency III</p> <p>LMP1 LMP2A LMP2B</p> <p>EBNA1 EBNA2 EBNA3A EBNA3B EBNA3C EBNA-LP EBERS miRNAs BARTs</p> <p>潜伏感染 遺伝子全てを発現</p>	<p>Latency II</p> <p>LMP1 LMP2A LMP2B</p> <p>EBNA1 EBERS miRNAs BARTs</p>
		<p>(参考)</p> <p>健常人既感染者</p> <p>± EBERS ± miRNAs ± BARTs</p> <p>Latency 0</p>

感染細胞同定解析の重要性と応用

★ 病理診断が難しい血液細胞や胸水・腹水・髄液の
感染細胞やがん細胞の特定が可能 (Lineage解析)



的確な治療方針の決定の迅速化

⇒ Rituximab、キムリア、etc.

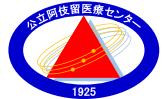
EBV関連リンパ増殖性疾患診断

はじめの一歩

- | | |
|--------------------------------|---|
| ① EBVゲノム量定量解析
(血球成分中、血漿成分中) | 単位 : copy/ μ gDNA or IU/ml
(全血、血球成分中)
copy/ml or IU/ml(血漿成分中) |
| ② 感染細胞の増殖・活性化程度 | FCM解析での追跡 |
| 3. クロナリティー解析 | Southern blotting (EBV-TR) |
| 4. 感染細胞同定解析 | B, CD4 ⁺ T, CD8 ⁺ T, $\gamma\delta$ -T, NK細胞 |
| 5. 感染細胞株の樹立 | |

重要事項

1. と 2. の項目を定期的にモニタリングすることによって
感染細胞の把握を十分行う！



AKIRU MUNICIPAL MEDICAL CENTER

公立阿伎留医療センター

〒197-0834 東京都あきる野市引田78番地1
電話：042-558-0321（代） FAX：042-559-5734

【問い合わせ先】 caebv@akiru.hospital



すべての人の笑顔と未来のために