3. 細胞性免疫からみた Epstein-Barr virus 感染症

葛 島 清 隆

はじめに

Epstein-Barr virus (以下 EBV) は, Burkitt リンパ腫, 上咽頭癌の発症と深くかかわりがあり, Hodgkin 病, 胃癌などとの関連が注目されている. また, 先天性免疫不全, AIDS 患者や臓器移植後などで問題になっている lymphoproliferative disorders (LPD) の主な原因ウイルスとして重要である¹²⁾.

ほとんどの人は小児期から青年期にかけて EBV の感染を受ける. その症状の多くは非特異的な感冒症状か, あるいは無症候性と推測されるが, 一部の人では伝染性単核球症 (Infectious mononucleosis: 以下 IM) として顕性発症するため初感染像として捕らえることができる. 初感染時, およびその後の潜伏感染時いずれにおいても EBV 感染細胞の活動を制御しているおもな免疫担当細胞は, CD8⁺ 細胞障害性 T リンパ球 (cytotoxic T lymphocyte: 以下 CTL) と考えられている¹³⁾.

しかしながら種々の EBV 感染症において, このような CTL の働きが明瞭に意識化されることはこれまで少なかったと思われる. その大きな理由としてはウイルス特異的 CTL の存在や働きを, わかりやすく, 定量的にしめす方法論がなかったことがあげられる. われわれは, T 細胞が特異抗原に出会った時に産生する interferon- γ (以下 IFN- γ) を指標にした迅速かつ高感度の EBV 特異的 CD8⁺T 細胞測定法を樹立した. 結果は Flow cytometry (FC) によって可視化, 定量化されるため, CTL の存在を明瞭に示すことができる. 本稿では, まず EBV 特異的 CD8⁺T 細胞を定量解析する意義についてまとめ, 次に FC を応用した EBV 特異的 CD8⁺T 細胞の解析法の概要を述べる. 続いて種々の EBV 関連疾患における EBV 特異的 CD8⁺T リンパ球の動態につき, 本法を用いた結果を述べ, その臨

床ウイルス学的な位置付けについて記載する.

EBV 特異的 CD8⁺T 細胞を定量解析する意義について

EBV に特異的に反応する CD8⁺T 細胞を定量的に解析することには以下の意義があると思われる.

1) EBV 感染自然歴における T 細胞応答の解析

初感染である IM 患者, あるいは EBV 既感染健康成人の末梢血リンパ球 (peripheral blood lymphocyte; 以下 PBL) 中の EBV 特異的 CD8⁺T 細胞の頻度解析などがこれに相当する. 正常な免疫システムがどのように EBV に反応するのか解析することは, 感染免疫学的な興味にとどまらず, 後に述べる EBV を標的とした癌, リンパ腫に対する免疫治療において有効な戦略を構築する上でも重要である.

2) 感染病態における T 細胞応答の解析

Burkitt リンパ腫, 上咽頭癌, Hodgkin 病, 胃癌などで EBV 陽性のものについては, EBV がコードする蛋白などを標的として免疫応答が起きている可能性がある⁶⁾. この実体を詳しく解析することが, EBV 陽性癌に対する細胞性免疫療法の基礎として必要である. また長期間にわたり EBV の増殖を許容する慢性 EBV 感染症において, EBV 特異的 CD8⁺T 細胞がどの程度あり, どのように機能しているかについての十分な検索はなされていない. 今後の大きな課題と思われる.

3) 免疫細胞療法の適応と効果の判定

骨髄移植後に発症する EBV 関連 LPD では, 現在のところ細胞治療が主体となっている. ドナーリンパ球⁴⁾, ドナー由来の EBV 特異的 CTL^{14, 15)}がこの目的で用いられるが, その効果判定には EBV 特異的細胞性免疫の変化を(できれば)定量的に示すことが必要である. また後に述べる様に, 骨髄移植後に発症する LPD の一部の症例では, 内因性の EBV 特異的 CTL が効率よく誘導され, LPD の診断が下されても上記の細胞治療が不要な症例が存在する⁴⁾. 我々の樹立した FC を応用した EBV 特異的 CD8⁺T 細胞測定法は, 迅速に結果を得ることができるので免疫細

愛知県がんセンター研究所腫瘍ウイルス学部 (〒464-8681 名古屋市中千種区鹿子殿 1-1)

Behavior of antigen-specific CD8⁺T cells in Epstein-Barr virus-related disease

Kiyotaka Kuzushima M. D.

Division of Virology Aichi Cancer Center Research Institute

1-1 Kanokoden, Chikusa-ku Nagoya 464-8681

胞療法の適応の判定に有用である⁸⁾。

EBV 特異的 CD8⁺T 細胞頻度の測定方法

EBV 特異的 CD8⁺T 細胞を定量的に測定する方法は大きくわけて以下の3項に分類される。

1) 限界希釈法; limiting dilution assay for cytotoxicity⁶⁾

従来から繁用されている方法である。検体の PBL を、96 穴プレートを用いて段階的に希釈し、さらに γ 線照射した自己の EBV 感染 B リンパ芽球細胞 (Lymphoblastoid cell line; 以下 LCL) で10-14日間刺激する。刺激後、各ウェル内で増殖したリンパ球の障害性を、⁵¹Cr でラベルした LCL を標的とした試験で測定し、得られたデータを統計学的処理を行うことで CTL の precursor 頻度を測定する方法である。操作が煩雑であり、結果を得るのに2週間近くを要する。

2) 抗原に反応した CD8⁺T 細胞が産生する IFN- γ を捕らえる方法

抗原に反応した T 細胞が、早期に産生する IFN- γ などのサイトカインを個々の細胞レベルで捕らえることにより、抗原特異的な T 細胞頻度を測定する方法である。

a) Enzyme-linked immunospot assay⁶⁾

抗 IFN- γ 抗体を固相化したニトロセルロース膜を底に持つ96穴プレート内で、一定数の LCL と CD8⁺T 細胞を約24時間混合培養する。この間に EBV 特異的 T 細胞から分泌された IFN- γ は、細胞周辺の固相化抗 IFN- γ 抗体にて捕獲される。反応終了後、細胞をすべて洗浄除去し、捕獲された IFN- γ を、2次抗体、酵素標識3次抗体さらに発色剤を用いて可視化する。水に難溶性の色素を用いることで、色素をニトロセルロース膜に付着させ、IFN- γ をスポットとして認識できる。1個のスポットは1個の抗原特異的 T 細胞由来と考えられるため、先に投入した細胞数と、総スポット数から抗原特異的 T 細胞頻度を算出する。

b) Intracellular IFN- γ detection assay by flow cytometry⁷⁾

測定の手順について図1に示した。一定数の自己の LCL と PBL をチューブ内で5-6時間混合培養する。この際に細胞内蛋白輸送阻止剤である Brefeldin A を添加しておく、抗原に反応した T 細胞で産生された IFN- γ は分泌されることなく当該細胞内に蓄積する。反応終了後、細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、サポニン等で膜透化処理を行うことで、細胞内の IFN- γ の染色を可能にする。それぞれ異なる色素標識した抗 CD8、抗 CD69そして抗 IFN- γ 抗体と反応させた後、FC にて解析を行う。解析では、まず CD8 gating して、解析の対象を CD8 陽性 T 細胞に絞り込む。さらに CD69と IFN- γ を2次元で解析することで判定を容易にする。これは、抗原に反応した T 細胞は早期活性化マーカーである CD69陽性分画に集積する

図1 Flow cytometry を用いた EBV 特異的 CD8⁺T 細胞頻度の測定。
文献⁷⁾を基に作図した。

ことを利用したものである。その測定結果については後述する。

3) 抗原特異的 CD8⁺T 細胞を直接染色する方法

Tetrameric HLA-peptide complex staining といわれる方法である。T 細胞抗原受容体は標的細胞表面の HLA クラス1蛋白、 β 2ミクログロブリンそして抗原ペプチドの3者複合体に結合するための立体構造をとっている。この3者複合体を合成、標識し、4量体とした後 T 細胞と反応させ、結合した細胞頻度を FC で測定する。詳細については参考文献^{2,16)}を参照されたい。

Flow cytometry による EBV 特異的 CD8⁺T 細胞頻度の測定の実際

最近、我々は上記2)のb)項で述べた細胞内 IFN- γ 染色を基にした高感度かつ迅速な EBV 特異的 CD8⁺T 細胞頻度測定法を樹立した⁷⁾。この方法を用いて様々な検体を測定したので、その結果を紹介したい。

1) 健康成人末梢血リンパ球中の EBV 特異的 CD8⁺T 細胞頻度

図2に2人の EBV 既感染成人と1人の EBV 未感染成

図2 健康成人末梢血リンパ球中のEBV特異的CD8⁺T細胞頻度

2人のEBV既感染成人と1人のEBV未感染成人の末梢血リンパ球を用いた結果を示す。数値はCD8⁺T細胞中のIFN-γ陽性細胞%である。文献⁷⁾参照。

人のPBLを用いた結果を示す。抗原刺激をしない場合は、いずれもIFN-γ産生CD8⁺T細胞は約0.02%であるが、あらかじめ樹立しておいた自己のLCLで6時間刺激をすると、EBV既感染成人ではCD8⁺T細胞の約1%がIFN-γを産生し、EBV特異的と考えられた。これに対してEBV未感染成人では刺激をしてもIFN-γ産生CD8⁺T細胞は0.05%にとどまり、この検査がEBVの感染歴を反映していることが示された。また、既感染者CD8⁺T細胞の約1%がEBV特異的という結果は予想以上に高いものであったが、これは本方法の感度が高いことを示していると思われる。

2) IM患者の末梢血リンパ球中のEBV特異的CD8⁺T細胞頻度

IMに罹患している人のPBLにはCD45RO, HLA-DRなどの活性化抗原を発現したCD8⁺T細胞が増加しているが^{10,17)}、その原因については長く議論の対象であった。サイトカインなどによって非特異的に増殖している、EBV特異的CD8⁺T細胞が実質的に増加しているなどの可能性があるが、その検証には当然、高感度に抗原特異的CD8⁺T細胞を測定する方法が必要であった。Callan他は²⁾前述のTetrameric HLA-peptide complex staining法を用い

図3 伝染性単核球症患者の末梢血リンパ球中のEBV特異的CD8⁺T細胞頻度

4名の伝染性単核球症患者の有熱期に採取した末梢血リンパ球をそれぞれ自己のLCLで6時間刺激した後、CD8⁺T細胞内に産生されたIFN-γをX軸に、活性化抗原としてCD45ROあるいはHLA-DRをY軸に表示した。数値はCD45ROあるいはHLA-DR陽性CD8⁺T細胞中のIFN-γ陽性細胞%である。文献³⁾参照。

て、HLA-B8を保有する1人のIM患者では、CD8⁺T細胞の44%が一つのEBV由来ペプチドに特異的な細胞集団であることを明らかにした。これは、IMにおいてみられるCD8⁺T細胞の増加は抗原刺激によってもたらされたものである、すなわちantigen-drivenであるという考え方を指示するデータである。しかしtetrameric HLA-peptide complex staining法は、特定のHLAと特定の抗原ペプチドに反応するT細胞に測定対象が限定されるため、彼等の示した事実があるHLAに限定され観察されたものなのか、あるいはHLA typingに関係なく認められるのかについては議論を残した。我々は、個々の患者由来のLCLを刺激細胞に用いる系を確立し、抗原特異的なT細胞の増加がHLAを限定しなくとも認められるのかどうかを検討した³⁾。

図3は、4名の有熱期のIM患者PBLをそれぞれ自己のLCLで6時間刺激した後、CD8⁺T細胞内に産生されたIFN-γをX軸に、活性化抗原としてCD45ROあるいは

HLA-DR を Y 軸に表示した結果である。CD45RO⁺/CD8⁺ T 細胞の34-60%, HLA-DR⁺/CD8⁺ T 細胞の34-54%が EBV 特異的 T 細胞であった。図 4 には、この反応が非特異的なものではなく、抗 HLA クラス I 抗体によって阻止できることを示した。Donor 3 の末梢血リンパ球を何の刺激もしないで培養した場合には、IFN- γ 産生細胞は0.47% であるが(図 4 A), 自己の LCL で刺激すると CD45RO⁺/CD8⁺ T 細胞の60%が IFN- γ を産生した(同 B)。培養時に抗 HLA クラス I 抗体を添加すると4.1%に低下し、アイソタイプ一致コントロール抗体では阻止できなかった(同 C, D)。次に、Donor 2 と 3 において10日後に 2 回目の検体が得られたので有熱期と比較して表 1 に結果をまと

めた。Donor 2, 3 いずれにおいても、CD8⁺ T 細胞のうちの EBV 特異的、CD45RO⁺そして HLA-DR⁺細胞分画が平行して推移していることがわかる。この間、EBV 特異的 CD8⁺ T 細胞は、Donor 2 では有熱期の7.9%に、Donor 3 では5.1%に減数した。さらに、この 2 人の PBL 中の EBV-DNA コピー数を Taq-Man システム real time PCR 法にて定量的に測定した^{3,5)}。結果と EBV 特異的 CD8⁺ T 細胞数を共に図 5 に示す。EBV-DNA コピー数と EBV 特異的 CD8⁺ T 細胞数は平行して推移していた。これらの結果より；1) 特定の HLA を保有している人に限らず、IM 急性期における活性化 CD8⁺ T 細胞の多くが EBV 特異的である、2) EBV 特異的 CD8⁺ T 細胞は EBV の消退に伴い急速に減数していることが明らかとなった。このダイナミズムは、生体の homeostasis の乱れを最小にしつつ、抗原特異的な細胞性免疫応答がウイルス感染を有効に制御していることを示している。抗原特異的 T 細胞の急激な減数には、tumor necrosis factor や Fas-Fas ligand 反応を介したアポトーシスが関与していると考えられており^{1,18)}、activation-induced cell death と称される現象である。

骨髓移植後の EBV 関連 LPD 寛解時における EBV 特異的 CD8⁺ T 細胞の動態

臓器移植後などの強い免疫抑制状態では、ウイルス特異的細胞性免疫が減弱するため、EBV 関連リンパ増殖症(EBV-LPD)が発症し得る。EBV-LPD の一部の症例では、タイミング良く免疫抑制剤を減量することで、自然寛解にいたる症例がある⁴⁾。このような症例において、EBV 特異的 CD8⁺ T 細胞が重要な働きをしていることが推測されるが、その反応の程度および経時的な変化については未だ明らかにされていない。内因性の EBV 特異的 CD8⁺ T 細胞の実体を解析することは、EBV-LPD に対する理解と適切な対応に貴重な情報を提供すると思われる。骨髓移植後に発症した EBV-LPD 寛解時の EBV 特異的 CD8⁺ T 細胞を定量、経時的に観察した結果を述べる⁸⁾。図 6 は原発

図 4 抗 HLA クラス I 抗体による IFN- γ 産生の阻止。
Donor 3 の末梢血リンパ球を検体とした。A, 刺激してない CD8⁺ T 細胞；B, LCL で刺激した CD8⁺ T 細胞；C, 抗 HLA クラス I 抗体の存在下に LCL で刺激；D, コントロール抗体の存在下に LCL で刺激。文献³⁾参照。

表 1 伝染性単核球症患者末梢血リンパ球 CD8⁺ T 細胞とその分画の推移

		CD8 ⁺ T cells			
		Total	EBV-specific	HLA-DR	CD 45 RO
Donor 2	有熱期	15,300	8,200	13,100	14,150
	10日後	2,250	650	810	1,710
Donor 3	有熱期	6,040	3,120	4,320	5,390
	10日後	880	160	250	450

図5 Donor 2 (A) と 3 (B) において有熱期 (1st) と 10 日後 (2nd) の末梢血リンパ球中の EBV-DNA コピー数 (○) と EBV 特異的 CD8⁺ T 細胞 (棒グラフ). 文献³⁾ 参照.

図6 骨髄移植後に発症した EBV 関連 LPD 患者における末梢血リンパ球表面抗原と末梢血単核球中の EBV-DNA 定量値 (■) の変化. 矢印は病理診断のためのリンパ節生検が行われた日を示す. 文献⁸⁾ 参照.

図7 骨髄移植後49日目における末梢血 CD8⁺ T 細胞中の EBV 特異的細胞頻度. A, 刺激していない CD8⁺ T 細胞; B, LCL で刺激した CD8⁺ T 細胞; C, 抗 HLA クラス I 抗体の存在下に LCL で刺激; D, コントロール抗体の存在下に LCL で刺激. 文献⁸⁾ 参照.

す。患児は EBV 関連 LPD の high risk 群と考えられたので Taq-Man system を用いたリアルタイム定量的 PCR にて移植後定期的に PBL 中の EBV-DNA がモニターされていた。移植41日に有意の EBV-DNA を検出した。46日には発熱、リンパ節腫脹が出現し、生検にて polyclonal B cell hyperplasia の所見あり、EBV-LPD と診断された。しかしながら、CD 8 優位の T 細胞増多が同時に認められ、mini-satellite locus と Y-染色体特異的 PCR 法を用いたキメリズム検索でこの時点の患者 PBMC はほぼ100%ドナータイプであった。移植49日目の CD8⁺ T リンパ球中の EBV 特異的頻度を測定したところ、図 7B に示すように患者 CD 8⁺ T 細胞の約40%はドナー由来の LCL で刺激することで IFN- γ を産生し、EBV 特異的 T 細胞と考えられた。この反応は抗 HLA class-I 抗体によって特異的に阻止された (図 7C)。⁵¹Cr 放出法を用いた細胞障害性試験ではドナー由来の LCL を直接障害した。次に同方法を用いて EBV 特異的 CD8⁺ T 細胞数を経時的測定した結果を図 8 に示す。EBV 特異的 CD8⁺ T 細胞は EBV-DNA コピー数の上昇に伴い増加し、消退に伴い急速に減数していることが明らかとなった。これらの検査結果をもとに本患者においては投与中の tacrolimus を 25%減量しながら経過を慎重に観察し、EBV 関連 LPD の寛解を得ることができた。

本 EBV-LPD 症例において、患者の EBV 特異的 CD8⁺ T 細胞定量値はベッドサイドにリアルタイムで報告され、治療選択に必要な情報を提供することができた。これは細

性免疫不全のひとつである Wiskott-Aldrich 症候群の 1 才 6 ヶ月男性患者において、HLA 1-locus mismatch の非血縁者からの骨髄移植後に発症した EBV 関連 LPD 発症時の PBL 中の EBV-DNA 定量値とリンパ球分画の変化を示

図8 骨髄移植後に発症したEBV関連LPD患者における末梢血CD8⁺T細胞総数(棒グラフ全体)およびEBV特異的CD8⁺T細胞数(棒グラフの斜線部位)と末梢血単核球中のEBV-DNA定量値(■)の変化。

EBV特異的CD8⁺T細胞数は末梢血CD8⁺T細胞数にEBV特異的CD8⁺T細胞頻度を乗じて算出した。矢印は病理診断のためのリンパ節生検が行われた日を示す。文献⁸⁾参照。

胞性免疫の評価が、病態を把握し治療方針を決定する上での基礎データとして欠くことができないことを示した一例と考えられる。また骨髄移植後EBV-LPDにおいてEBV-DNAと特異的CD8⁺T細胞を定量的、経時的に解析し、寛解時のダイナミクスが明らかになった私達の知る限り最初の例である。このダイナミクスは、EBV初感染時にみられたものと同様に、生体のhomeostasisの乱れを最小にしつつ、抗原特異的な細胞性免疫応答がウイルス感染を有効に制御していることを示していると思われる³⁾。

おわりに

近年の移植医療の進歩に伴い、免疫低下時におけるEBV、サイトメガロウイルスなどのヘルペスウイルス感染症のコントロールは緊急の課題となっている。これらのウイルスについては現在のところウイルス抗原量や、ゲノムコピー測定によるモニタリングが主流である。しかしながら、感染症制御に重要な内因性のCD8⁺特異的T細胞を定量的にリアルタイムでモニターできるならば、これらのウイルス感染症をさらに合理的に管理、治療することが可能になると思われる⁹⁾。上記のLPD症例の経過はまさにそれを示している。本稿で紹介したEBV特異的CD8⁺T細胞頻度の測定方法は、結果が即日得られる、感度が高いなどの他の測定方法にはない特徴を有しており、骨髄移植後などの免疫抑制状態で発症するEBV関連LPDの病態把握、細胞治療法の適応と効果判定に有用と考えている。

謝 辞

本研究は木村宏先生、星野洋先生、小島勢二先生、堀部敬三先生、吉見礼美先生、柘植郁哉先生(名古屋大学大学院医学研究科小児科学/成長発達医学)、森島恒雄先生(同

医学部保健学科)、西川和夫先生(名古屋掖済会病院)および鶴見達也先生(愛知県がんセンター研究所腫瘍ウイルス学部)との共同で行われた。

文 献

- 1) Alderson, M. R., Tough, T. W., Davis-Smith, T., Braddy, S., Falk, B., Schooley, K. A., Goodwin, R. G., Smith, C. A., Ramsdell, F., and Lynch, D. H. (1995) Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **181**, 71-77.
- 2) Callan, M. F., Tan, L., Annels, N., Ogg, G. S., Wilson, J. D., O'Callaghan, C. A., Steven, N., McMichael, A. J., and Rickinson, A. B. (1998) Direct visualization of antigen-specific CD8⁺T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus *in vivo*. *J. Exp. Med.* **187**, 1395-1402.
- 3) Hoshino, Y., Morishima, T., Kimura, H., Nishikawa, K., Tsurumi, T., and Kuzushima, K. (1999) Antigen-driven expansion and contraction of CD8⁺ activated T cells in primary EBV infection. *J. Immunol.* **163**, 5735-5740.
- 4) Hoshino, Y., Kimura, H., Kuzushima, K., Tsurumi, T., Nemoto, K., Kikuta, A., Nishiyama, Y., Kojima, S., Matsuyama, T., and Morishima, T. (2000) Early intervention in post-transplant lymphoproliferative disorders based on Epstein-Barr viral load. *Bone Marrow Transplant.* **26**, 199-201.
- 5) Kimura, H., Morita, M., Yabuta, Y., Kuzushima, K., Kato, K., Kojima, S., Matsuyama, T., and Morishima, T. (1999) Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 132-136.
- 6) Kuzushima, K., Nakamura, S., Nakamura, T., Yamamura, Y., Yokoyama, N., Fujita, M., Kiyono, T., and Tsurumi, T. (1999) Increased frequency of antigen-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes infiltrating an EBV-associated gastric carcinoma. *J. Clin. Invest.* **104**, 163-171.
- 7) Kuzushima, K., Hoshino, Y., Fujii, K., Yokoyama, N., Fujita, M., Kiyono, T., Kimura, H., Morishima, T., Morishima, Y., and Tsurumi, T. (1999) Rapid determination of Epstein-Barr virus-specific CD8⁺ T cell frequencies by flow cytometry. *Blood.* **94**, 3094-3100.
- 8) Kuzushima, K., Kimura, H., Hoshino, Y., Yoshimi, A., Tsuge, I., Horibe, K., Morishima, T., Tsurumi, T., and Kojima, S. (2000) Longitudinal dynamics of Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes during the posttransplant lymphoproliferative disorder. *J. Infect Dis.* **182**, 937-940.
- 9) Kern, F., Faulhaber, N., Khatamzas, E., Froemmeler, C., Ewert, R., Proesch, S., Volk, H.-D., and Reinke, P. (1999) Measurement of anti-human cytomegalovirus T cell reactivity in transplant recipients and its potential clinical use: a mini-review. *Intervirology.* **42**, 322-324.
- 10) Miyawaki, T., Y. Kasahara, H. Kanegane, K., Ohta, K., Yokoi, T., Yachie, A., and Taniguchi, N. (1991) Expression of CD45R0 (UCHL1) by CD4⁺ and CD8⁺ T cells

- as a sign of *in vivo* activation in infectious mononucleosis. *Clin. Exp. Immunol.* **83**, 447–451.
- 11) Papadopoulos, E. B., Ladanyi, M., Emanuel, D., Mackinnon, S., Boulad, F., Carabasi, M. H., Castro-Malaspina, H., Childs, B. H., Gillio, A. P., Small, T. N., Young, J. W., Kernan, N. A., and O'Reilly, R. J. (1994) Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.* **330**, 1185–1191.
 - 12) Rickinson, A. B., and Kieff, E. (1996) Epstein-Barr virus. In *Fields Virology*. 3rd ed. (edited by Fields, B. N., Knipe, D. M. & Howley, P. M.), Lippincott-Raven Press, Philadelphia, Vol. 1, 2397–2446.
 - 13) Rickinson, A. B., and Moss, D. J. (1997) Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 405–431.
 - 14) Rooney, C. M., Smith, C. A., Ng, C. Y. C., Loftin, S. K., Li, C., Krance R. A., Brenner, M. K., and Heslop, H. E. (1995) Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr virus-related lymphoproliferation. *Lancet.* **345**, 9–13.
 - 15) Rooney, C. M., Smith, C. A., Ng, C. Y. C., Loftin, S. K., Sixbey, J. W., Gan, Y., Strivastave, Deo-Kumar, Bowman, L. C., Krance R. A., Brenner, M. K., and Heslop, H. E. (1998) Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood.* **92**, 1549–1555.
 - 16) Tan, L. C., Gudgeon, N., Annels, N. E., Hansasuta, P., O'Callaghan, C. A., Rowland-Jones, S., McMichael, A. J., Rickinson, A. B., and Callan, M. F. (1999) A Re-evaluation of the frequency of CD8⁺T cells specific for EBV in healthy virus carriers. *J. Immunol.* **162**, 1827–1835.
 - 17) Uehara, T., T. Miyawaki, K. Ohta, Y., Tamaru, Y., Yokoi, T., Nakamura, S., and Taniguchi, N. (1992) Apoptotic cell death of primed CD45RO⁺T lymphocytes in Epstein-Barr virus-induced infectious mononucleosis. *Blood* **80**, 452–458.
 - 18) Zheng, L., Fisher, G., Miller, R. E., Peschon, J., Lynch, D. H., and Lenardo, M. J. (1995) Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* **377**, 348–351.