

病理材料における Epstein-Barr virus-encoded RNA in situ hybridization (EBER-ISH) 法を用いた EB ウイルスの検出とその病理学的意義

定平 吉都, 岩知道伸久*, 真鍋 俊明, 調 輝 男**

Epstein-Barr (EB) ウイルス感染が, Burkitt リンパ腫や鼻咽頭癌のみならず, 免疫抑制状態における日和見 B 細胞リンパ腫, 末梢性 T 細胞リンパ腫あるいは胃癌など多数の疾患と関連していることが知られてきている. 今回私たちは, 各種悪性リンパ腫を含む病理材料40例における EB ウイルス感染の有無を, EB virus-encoded RNA に対するアンチセンスプローブを用いた in situ hybridization (EBER-ISH) 法によって検索した. EBER-ISH は固定液を選ばず, 脱灰した剖検骨髄標本においても応用可能で, 組織学的にも陽性細胞の同定が容易である. 今回の検索では, 脳原発 B 細胞リンパ腫, ホジキン病, 橋本病を基盤として発生した甲状腺原発 B 細胞リンパ腫, 蚊アレルギーに続発した T 細胞リンパ腫, 腎移植後に肝臓に発生した平滑筋肉腫で腫瘍細胞が強陽性となり, これら疾患の発生における EB ウイルス感染の関与が疑われた. (平成7年7月6日採用)

Detection of EB Virus in Pathology Specimens Using EB Virus-Encoded RNA in Situ Hybridization and Its Pathological Significance

Yoshito SADAHIRA, Nobuhisa IWACHIDO*, Toshiaki MANABE and Teruo SHIRABE**

Latent Epstein-Barr (EB) virus infection has been known to be associated not only with Burkitt lymphoma and nasopharyngeal carcinoma but also with a variety of malignancies, including lymphoproliferative disorders after organ transplantation, peripheral T-cell lymphoma, and gastric carcinoma. To detect the presence of EB virus infection in 40 pathology specimens, we used a method of in situ hybridization with oligonucleotides complementary to the EB virus-encoded RNA-1 (EBER-1) gene. This technique was applicable to the tissues fixed in virtually any conventional fixative and to decalcified bone marrow samples. Characterization of the cells with positive EBER-1 signals was possible even in cases with complex histology. EB virus was detected in primary brain B-cell lymphoma, Hodgkin's disease, thyroid B-

川崎医科大学 病理
〒701-01 倉敷市松島577
* 同 附属病院病理部
** 同 神経病理

Department of Pathology, Kawasaki Medical School : 577
Matsushima, Kurashiki, Okayama, 701-01 Japan
Department of Pathology, Kawasaki Medical School
Hospital
Department of Neuropathology

cell lymphoma associated with Hashimoto's disease, T-cell lymphoma in a mosquito hypersensitivity patient, and a hepatic smooth muscle cell tumor occurring after renal transplantation. These results suggest that EB virus plays some role in the development of these malignancies. (Accepted on July 6, 1995) *Kawasaki Igakkaishi* 21(2): 81-87, 1995

Key Words ① **In situ hybridization** ② **EB virus**
③ **Malignant lymphoma**

はじめに

Epstein-Barr (EB) ウイルスはアフリカ発生の Burkitt リンパ腫の培養細胞株に見いだされたウイルスで、Burkitt リンパ腫、伝染性単核球症、X-linked lymphoproliferative syndrome、上咽頭癌の病因ウイルスとして知られてきた¹⁾。さらに近年の分子生物学的診断法の発達により、このウイルスが臓器移植後や AIDS 感染者にみられる日和見リンパ腫・ホジキン病・胃癌・顆粒リンパ球増多症・膿胸関連胸膜リンパ腫などの発生と深い関連を持つことが明らかになってきている^{1),2)}。

現在 EB ウイルス感染の組織学的診断法のうち最も有用と考えられているのは、EB ウイルス感染細胞に存在する EB virus-encoded RNA (EBER) を in situ hybridization 法 (ISH) で検出する方法である³⁾。EBER は感染細胞あたり 10^6 コピーも発現しており、これを利用したパラフィン切片上の EBER-ISH は非常に高感度で、脱灰した組織でも検出されるなど安定性にも優れている⁴⁾。また、この方法は、polymerase chain reaction (PCR) 法などにはない、組織学的な感染細胞の同定を可能にするという利点を有している。

私たちは EBER-ISH による病理診断が、EB ウイルスが関与する各種疾患の理解と有効な予防法の確立のための重要な手段となると考え、今回当院における悪性リンパ腫等の40例につき、この方法を用いて、EB ウイルス感染の有無を検討したので報告する。

材料と方法

症例：材料は当院病理部に外科病理診断のために提出された40例を用いた。各症例の病理診断および臨床情報はそれぞれ **Table 1, 2, 3** に記載した。このうち悪性リンパ腫については International Working Formulation の診断基準⁵⁾に基づいて分類した。

In situ hybridization：EBER-1の一部に相補的な30塩基から成る FITC 標識オリゴヌクレオチドを DAKO 社 (Glostrup, Denmark) から購入し、従来の方法²⁾を多少改良して in situ hybridization を施行した。すなわち、ホルマリン固定、パラフィン包埋された組織の薄切切片をシラン塗布スライドグラスにはりつけ、脱パラ後、0.2規定の塩酸、次いでプロテナーゼ K (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で除蛋白処理を行った。ハイブリダイゼーションは37°Cで1晩、湿潤箱内で行い、次いでアルカリフォスファターゼ標識抗 FITC ウサギ抗体 (DAKO 社) を室温で30分間反応させた。陽性反応物の指標となるアルカリフォスファターゼ活性を、ニューフクシン (赤色) を発色剤に用いた難波らの方法⁶⁾で検出した後、ヘマトキシリンで核染、透徹保存した。陽性コントロールは上咽頭癌を用いた。

免疫組織化学：Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) 法⁷⁾を用いた。使用した一次抗体 (いずれもマウスモノクローナル抗体) は以下のとおりで、ABC は Vectastain Elite Kit (Vector Laboratory) を用いた。すなわち、①パラフィン包埋切片用：Leukocyte Common Antigen (CD45, DAKO), L26 (CD20,

Table 1. Results of EBER in situ hybridization in 40 cases examined in the present study

C a s e	Number	Results	
		positive	weakly positive
Primary central nervous system lymphoma	16	1	0
Hodgkin's disease	6	3	1
Peripheral T-cell Lymphoma	3	0	1
Multilobated B-cell Lymphoma	4	0	0
Ki-1 Lymphoma	2	0	2
Castleman's disease	2	0	1
Orbital lymphoma	1	0	0
Thyroid lymphoma	1	1	0
B-cell lymphoma in a patient with dermatomyositis	1	0	0
T-cell lymphoma in a patient with mosquito hypersensitivity	1	1	0
Multiple myeloma in a patient with chronic myelogenous leukemia	1	0	0
Hepatic leiomyosarcoma occurring after renal transplantation	1	1	0
Nasopharyngeal carcinoma	1	1	0
T o t a l	40	8	5

DAKO), UCHL-1(CD45RO, DAKO), Leu-M₁ (CD15, Becton Dickinson), LN1 (ICN社), LN2 (ICN), LN3 (ICN), Latency Membrane Protein-1 (DAKO), BerH₂ (CD 30, DAKO). ②凍結切片用: Leu-12 (CD19, Becton Dickinson), Leu-4 (CD3, Becton Dickinson), Leu-3a+Leu-3b (CD4, Becton Dickinson), Leu-7 (Becton Dickinson), OKT8 (CD8, Ortho Diagnostic Systems) である. いずれもパーオキシダーゼ活性は diaminobenzidine を発色剤として用い検出した.

In situ hybridization と免疫組織化学の二重染色: まずEBER-ISHを施行し, アルカリフォスファターゼ活性をニューフクシンで発色させた後, マウスモノクローナル抗体を反応させた. 続いて ABC 法を行い, パーオキシダーゼ活性を diaminobenzidine で発色させた. ホジキン病の Reed-Sternberg 細胞では EBER は核に赤色反応物として, Leu M₁ は細胞膜あるいは胞体の一部に茶褐色の反応物としてみられた.

結果と考察

Table 1 は今回検索した症例の内訳とEBER-ISHの結果をまとめたものである. これらの症例の中で陽性所見を示した症例の典型的な染色パターンを示すと **Figure 1** のようになる. **Figure 1A** はリンパ節のPCRによる検索でEBウイルスが陽性となったCastleman's diseaseの症例⁸⁾であるが, EBER-ISHでは散在性に陽性細胞が認められるのみであった. **Figure 1B** は, 橋本病を基盤として発症した甲状腺リンパ腫の症例⁹⁾で, 残存するリンパ濾胞の小型リンパ球は陰性であったが, やや大型の腫瘍細胞のほとんどの細胞核に陽性所見がみられた. このようにEBER-ISHは, その陽性細胞の割合によって弱陽性のものと強陽性のものとに大別できた.

次に重要と思われる結果に関して項目別に述べる.

1. 脳原発悪性リンパ腫における EB ウイルス感染

AIDS患者や臓器移植後において、脳を主体とする中枢神経系にB細胞リンパ腫が発生することはよく知られている。このような症例ではEBウイルスが高率に検出されており、免疫抑制状態の中枢神経B細胞リンパ腫の発生には、EBウイルスが関与している可能性が高い¹⁰⁾。一方、中枢神経系では免疫抑制の認められない症例でも、発生するリンパ腫のほとんどがB細胞リンパ腫であり、その原因は明らかでない¹¹⁾。今

回、当病理部に外科病理材料として提出された脳原発性リンパ腫16例をEBER-ISHで検索したところ、1例(6%)で陽性であった(**Table 2**)。腫瘍化に関与し、キラーT細胞の標的ともなるlatency membrane protein-1(LMP-1)¹²⁾の発現も調べたが、陰性であった。このEBER陽性患者の既往歴を調べてみても、AIDSや臓器移植あるいはステロイド等の免疫抑制剤の大量投与の既往はなかった。しかし脳リンパ腫発症

1年前に帯状疱疹による3回の入院歴があり、ある程度の免疫低下状態が存在した可能性もある。最近、ISH法を用いたイギリスからの報告では、immunocompetentな状態で発生した中枢神経原発B細胞性非ホジキンリンパ腫の4.8%(2/42)、アメリカのimmunocompetentに発生した中枢神経原発リンパ腫の4%(1/27)でEBウイルスの感染がみられたとされている^{13),14)}。したがって今回のわれわれの結果は、わが国でsporadicに発生した中枢神経リンパ腫においても、EBウイルス感染は比較的に稀であることを示唆している。

2. ホジキン病におけるEBウイルス感染

これまで、ホジキン病の10~60%にEBウイルスが見いだされているが、これがホジキン病の発生にいかに関与しているかはほとんど分かっていないのが現状である¹⁵⁾。今回検索した6症例のホジキン病では、ホジキン細胞にEBERが強陽性になったものが3例、ホジキン細胞以外の小型細胞にわずかに陽性像が得られたものが1例、陰性が2例であった。これらの臨床病理学的特徴を**Table 3**に示す。このうち強陽性症例の2例は、抗human T lymphotro-

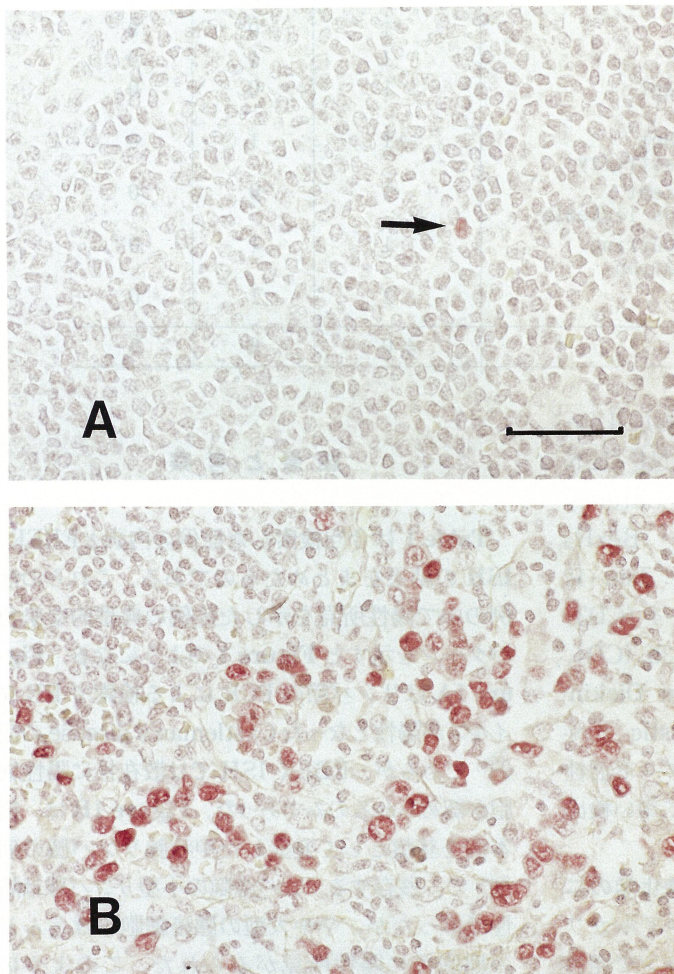


Fig. 1. In situ EBER-1 hybridization study. Bar, 54 μ m.
(A) A case of Castleman's disease. The arrow shows a positive cell.
(B) A case of thyroid B-cell lymphoma. There is strongly positive staining of nuclei in tumor cells but no staining of nuclei in small lymphocytes forming follicles.

Table 2. Results of EBER in situ hybridization of primary brain lymphomas

	Age	Sex	Location in brain	Lymphoma subtype, phenotype	EBER-ISH	Clinical diagnosis
1.	49	F	rt. posterior lobe	Large, cleaved	B neg	Meningioma
2.	72	M	rt. parietal lobe	Large, immunoblastic	B pos	Metastatic tumor
3.	66	M	rt. frontal lobe	Large, non-cleaved	B neg	Lymphoma
4.	68	M	lt. frontal lobe	Mixed	B neg	Lymphoma
5.	39	M	rt. C-P angle	Small, cleaved	B neg	Metastatic tumor
6.	60	M	lateral ventricular area	Mixed	B neg	Lymphoma
7.	74	M	lt. basal ganglia	Large, immunoblastic	B neg	Lymphoma
8.	77	M	lt. basal ganglia	Large, immunoblastic	B neg	Glioblastoma
9.	85	F	rt. putamen	Large, cleaved	B neg	Astrocytoma, grade III
10.	78	F	rt. frontal lobe	Mixed	B neg	Lymphoma
11.	74	F	lt. lateral ventricular area	Large, non-cleaved	B neg	Glioblastoma
12.	74	F	lt. temporal lobe	Large, non-cleaved	B neg	Metastatic tumor
13.	22	M	hypothalamus	Small, cleaved	B neg	Glioma
14.	47	F	lt. frontal lobe	Large, non-cleaved	B neg	Glioblastoma
15.	69	M	lt. frontal lobe	Large, immunoblastic	B neg	Lymphoma
16.	77	F	cerebrum	Small, cleaved	B neg	Metastatic tumor

phic virus type-1 (HTLV-1) 抗体価の上昇がみられた。抗 HTLV-1 抗体価の上昇がみられる患者に、Reed-Sternberg (RS) 様細胞の出現を伴うリンパ腫が発生した場合、それが成人 T 細胞リンパ腫かホジキン病か診断に苦慮する場合がしばしばある。一方、成人 T 細胞リンパ腫細胞においても、しばしば EB ウイルスが感染することが知られている¹⁶⁾。したがって、一部の成人 T 細胞リンパ腫においては、EB ウイルス感染が RS 様細胞の出現を引き起こし、ホジキン病類似の組織像を呈する可能性も否定できない。

3. 蚊アレルギー患者に発症した T 細胞リンパ腫における EB ウイルス感染

蚊アレルギーは蚊に刺されて数時間後より生じる局所の発赤・腫脹・潰瘍形成と共に発熱などの全身症状を伴う疾患である。興味深いことに、発症から 6～15年を経過した後に、悪性組織球症やそれに類似した疾患で死亡した症例が、わが国を中心に30症例近く報告されている¹⁷⁾。私たちは、蚊アレルギーを発症して17年後に、T 細胞リンパ腫で死亡した31歳男性の症例を経験し、その骨髄・リンパ節を EBER-ISH で検討したと

Table 3. Results of EBER in situ hybridization of lymph nodes in the cases of Hodgkin's disease LD : lymphocyte depletion MC : Mixed cellularity NS : Nodular sclerosis + : positive - : negative

Case	Age	Sex	Location	Histological Subtype	EBER-ISH Staining	Clinical Diagnosis
1	75	M	Lymph nodes, Liver, Spleen, Kidney, Bone marrow, Lung (Autopsy)	LD	++ (RS cells)	Malignant lymphoma
2	50	M	Lymph nodes Liver, Spleen, Bone marrow, Kidney (Autopsy)	MC	++ (RS cells)	Adult T-cell leukemia (anti-HTLV-1 antibody +)
3	35	F	Cervical & axillar lymph nodes	NS	+ (Small lymphocytes)	Sarcoidosis
4	48	M	Cervical & axillar lymph nodes	NS [Interfollicular Hodgkin → NS]	++ [RS cells: B cell type]	Malignant lymphoma (anti-HTLV-1 antibody +)
5	68	M	Inguinal lymph nodes	MC	-	Castleman's disease
6	65	M	Cervical, axillar & inguinal lymph nodes	NS	-	Malignant lymphoma

ころ、腫瘍細胞の多数が陽性となった。この事実は、蚊アレルギー患者におけるリンパ腫発症に、EBウイルスが関与している可能性を強く示すものと考えられた。まだこのような報告はなく、この症例に関してはさらに詳細に検討して報告する予定である。

4. 腎移植後に発生した肝平滑筋肉腫におけるEBウイルス感染

ごく最近アメリカの施設から、若年の肝移植患者に発生した平滑筋肉腫にEBウイルスが高率に感染していることが報告された¹⁸⁾。また若年のAIDS患者に発生した平滑筋肉腫についても同様にEBウイルスが確認されている¹⁹⁾。私たちも慢性腎不全と診断され、6年前に母より腎移植を受けた21歳女性の肝臓に発生した平滑筋肉腫の症例²⁰⁾をEBER-ISHで検討したところ、EBウイルスの感染が明らかとなった。EBER陽性細胞は増殖する平滑筋由来の腫瘍細胞のみで、肝細胞・浸潤リンパ球・腫瘍内血管内皮細胞等は陰性であった。この患者にはアザチオプリンやステロイドなどの免疫抑制剤の使用歴があり、剖検にてもクリプトコッカス髄膜炎がみられた。したがって免疫抑制状態において稀に発生する平滑筋腫瘍の発生に、EBウイルスが関与する可能性が高いと考えられる。

以上我々の経験した症例について簡単に紹介し考察を加えた。免疫不全状態においてEBウイルス感染がその患者の病態を修飾し、複雑化していることは疑いなく、その病態解析には、EBER-ISHを用いたEBウイルス感染の検索は必須といえよう。EBウイルスがリンパ腫や平滑筋肉腫発生の原因となっているのか、あるいは患者の免疫力低下による結果としての腫瘍細胞への感染なのかは、今後問われるべき本質的な問題である。さらに、腫瘍のEBウイルス感染の有無と予後との関係や、腫瘍発生におけるEBウイルスの役割について、分子生物学的手法を駆使した詳細な研究がなされるべきと考える。

謝 辞

この研究は、川崎医科大学プロジェクト研究費(6-301)で行われた。ご協力をいただいた川崎医科大学病理学教室(広川満良先生、福屋 崇先生、清水道生先生、森谷卓也先生、三上芳喜先生、坂元和弘先生、桜井孝規先生、伊禮 功先生)および病院病理部の皆様に感謝いたします。またEBER-ISHを御指導いただきました岡山大学医学部第2病理学教室、寺本典弘先生、赤木忠厚教授に感謝いたします。

文 献

- 1) Strauss SE, Cohen JI, Tosato G, Meier J: Epstein-Barr virus infections: biology, pathogenesis, and management. *Ann Intern Med* 118: 45-58, 1993
- 2) Ambinder RF, Mann RB: Detection and characterization of Epstein-Barr virus in clinical specimens. *Am J Pathol* 145: 239-252, 1994
- 3) Chang KL, Chen YY, Shibata D, Weiss LM: Description of an in situ hybridization methodology for detection of Epstein-Barr virus RNA in paraffin-embedded tissues, with a survey of normal and neoplastic tissues. *Diagn Mol Pathol* 1: 246-255, 1992
- 4) Ambinder RF, Mann RB: Epstein-Barr-encoded RNA in situ hybridization: diagnostic applications. *Human Pathol* 25: 602-605, 1994
- 5) The non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project. National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation. *Cancer* 49: 2112-2135, 1982
- 6) 難波紘二, 青木 潤, 佐々木なおみ: アルカリフォスファターゼ標識抗体法における発色法の検討—New fuchsin 発色による高精度, 高カラーコントラスト永久標本の作成. *病理と臨床* 15: 333-339, 1987

- 7) Hsu S, Raine L, Fanger H : Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. A comparison between ABC and unlabeled antibody (PA) procedures. *J Histochem Cytochem* 29 : 577—580, 1981
- 8) 吉本静雄, 夕部憲一, 田川真也, 吉岡薄夫, 加原雅教, 白井吉郡, 林 繁樹, 定平吉都 : 腫大リンパ節より EB ウイルス DNA を認めた Multicentric Castelman's disease. *診断と治療* 83 : 572—575, 1995
- 9) Takahashi K, Kashima K, Daa T, Yokoyama S, Nakayama I, Noguchi S : Contribution of Epstein-Barr virus to development of malignant lymphoma of the thyroid. *Pathol Int* 45 : 366—374, 1995
- 10) Bashir RM, Hochberg FH, Harris NL, Purtilo D : Variable expression of Epstein-Barr virus genome as demonstrated by in situ hybridization in central nervous system lymphomas in immunocompromised patients. *Mod Pathol* 3 : 429—434, 1990
- 11) Schwachheimer K, Braus DF, Schwarzkopf G, Feller AC, Volk B, Müller-Hermelink K : Polymorphous high-grade B cell lymphoma is the predominant type of spontaneous primary cerebral malignant lymphomas. Histological and immunomorphological evaluation of computed tomography-guided stereotactic brain biopsies. *Am J Surg Pathol* 18 : 931—937, 1994
- 12) Knecht H, Brousset P, Bachmann E, Sandvej K, Odermatt BF : Latent membrane protein 1 : a key oncogene in EBV : related carcinogenesis? *Acta Haematol* 90 : 167—171, 1993
- 13) Geddes JF, Bhattacharjee MB, Savage K, Scaravilli F, McLaughlin JE : Primary cerebral lymphoma : a study of 47 cases probed for Epstein-Barr virus genome. *J Clin Pathol* 45 : 587—590, 1992
- 14) Chang KL, Flaris N, Hickey WF, Johnson RM, Reyer JS, Weiss LM : Brain Lymphomas of immunocompetent and immunocompromised patients : study of the association with Epstein-Barr virus. *Mod Pathol* 6 : 427—432, 1993
- 15) Khan G, Coates PJ : The role of Epstein-Barr virus in the pathogenesis of Hodgkin's disease. *J Pathol* 174 : 141—149, 1994
- 16) Tokunaga M, Imai S, Uemura Y, Tokudome T, Osato T, Sato E : Epstein-Barr virus in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Am J Pathol* 143 : 1263—1269, 1993
- 17) 川上理子, 檜垣祐子, 肥田野信 : 蚊アレルギー. *臨皮* 43 : 565—569, 1989
- 18) Lee ES, Locker J, Nalesnik M, Reyes J, Jaffe R, Alashari M, Nour B, Tzakis A, Dickman PS : The association of Epstein-Barr virus with smooth-muscle tumors occurring after organ transplantation. *N Engl J Med* 332 : 19—25, 1995
- 19) McClain KL, Leach CT, Jenson HB, Joshi VV, Pollock BH, Parmley RT, Dicarolo FJ, Chadwick EG, Murphy SB : Association of Epstein-Barr virus with leiomyosarcomas in young people with AIDS. *N Engl J Med* 332 : 12—18, 1995
- 20) 森谷卓也, 広川満良, 真鍋俊明, 調 輝男, 山田昌彦, 平野 宏, 大沢源吾 : 腎移植患者の肝臓に発生した平滑筋肉腫の一部検例. *米子医学雑誌* 38 : 72, 1987