

## EPSTEIN-BARR VIRUS AND BACTERIAL ANALYSES IN TONSIL —USING NEWLY DEvised POLYMERASE CHAIN REACTION AND SEROLOGICAL ANALYSIS.—

Masaru Kunimoto, Shinji Tamura, Takaaki Kimura, Toshihide Tabata

Department of Otolaryngology, Wakayama medical College

The present studies reported that the immunoserological findings pointed out the reactivation of Epstein-Barr virus (EBV) in the focus tonsil with PPP, though bacterial species showed similar distribution to tonsil with chronic inflammation. An additional experiment was determination of the types of EBV in the palatine tonsil with PPP, devised procedure of PCR.

A polymerase chain reaction (PCR) method was developed that permits the detection of 2 types of Epstein-Barr virus using a single pair of primers that were complementary to both EBNA-2A and EBNA-2B sequence. The amplified length of these sequence are different. The use of

this pair of primers in PCR enabled the detection of the type A and type B of EBV by the Polyacrylamide gel electrophoresis and ethidium bromide stain.

These amplified products was confirmed and analyzed by Southern blot hybridization with the oligonucleotides probe that were complementary to both EBNA-2A and EBNA-2B sequence.

By using this method for the tonsillar DNA, A type of EBV was detected in one cases of 15 cases of palmoplantar pustulosis and 9 cases of chronic tonsillitis.

Another investigation should be performed in order to reveal the real mechanism on the occurrence of tonsillar focal infection related to EBV.

## 扁桃のウイルス・細菌感染について —ことにPCRによるEBVの型決定—

國本 優 田村 真司 木村 貴昭 田端 敏秀

和歌山県立医科大学耳鼻咽喉科学教室

### I. 緒 言

扁桃を原病巣とし遠隔臓器に疾患を引き起こす掌蹠膿疱症 (PPP) をはじめとする扁桃病巣感染症は現在までの研究で扁桃と遠隔臓

器間の共通抗原に対する自己免疫ではないかと考えられているが<sup>1-3)</sup>, 扁桃側でその抗原と提示原因については明らかにされていない。

Epstein-Barr virus (EBV)は世界中に蔓

延しているヘルペス ウイルスで、伝染性単核症の原因として、あるいは、Undifferentiated Nasopharyngeal Carcinoma, Endemic Burkitt's lymphoma, Oral Hairy Leukoplakia等に強く関連した疾患として知られている<sup>4)</sup>。また、EBVは初感染の後、口腔咽頭領域に常在し宿主の免疫状態により再活性化し、ときとして関連疾患を引き起こすと考えられる。

PPPをはじめとする扁桃病巣感染症では血清学的検索よりEBVの再活性化が報告されてきた。<sup>5-7)</sup>今回、我々は症例を増やしこの結果を再検討した。また、EBVの再活性化の原因について、細菌分布の変化と扁桃でのEBV-DNAの点より調査した。扁桃のEBV-DNAについては、新しいEBVの検出・タイピング法をPolymerase Chain Reaction (PCR)をもちいて開発しPPPにおけるEBV検出頻度、亜型分布の検討を行った。

PCRの検査系はEBVのA型とB型ではEBNA 2領域に欠損を伴うかなり大きな変異がある<sup>8)</sup>ことに着目し、A型とB型でよく保存されており、しかもA型では間にかかなり大きな欠損をはさむ部位を選び、5'側及び3'側のプライマーを合成したものである。これによりA、B両型を一組のプライマーで増幅することができ、しかも増幅されたバンドの長さの違いより両型を区別して検出することができるようになった。

我々の方法は既に報告されているSixbeyの方法<sup>9)</sup>のような型別の検出方法を必要としないため、検出・タイピングがより簡単で経済的となった。扁桃より抽出したDNAに応用した<sup>9)</sup>。

## II. 対象および方法

材料：PPP99例、Age Matchした慢性扁桃炎36症例より血清を採取した。PPP90例、慢性扁桃炎32例について扁桃陰窩より細菌を採取した。

EBV-DNAの調査は当科にて扁桃摘出術をおこなったPPP15症例、ならびにAge Matchした慢性扁桃炎9例とした。採取した扁桃は-80°Cにて保存後、約5mm<sup>3</sup>をPCRによる検索のためDNA抽出をおこなった。

方法：抗EBV抗体価の検討；

測定した抗EBV抗体は、EB virus associated nuclear antigen (EBNA), Viral capsid antigen (VCA), Early antigen-DR (EA-DR)に対するものであり、抗EBNA抗体は間接蛍光補体法で、抗VCA抗体、抗EA抗体は間接蛍光法を用いて測定した。使用する蛍光抗体によってはIgG, IgM, IgA抗体の分別が可能であった。

感染細菌の検討；

細菌の採取は耳鼻科用キャリメイトにより扁桃陰窩より採取・培養検討した。

PCRによる検討<sup>10,11)</sup>；

検体DNAの抽出及びPCR標準検体の作製法はすでに報告したフェノール・クロロホルム法によった<sup>10,11)</sup>。プライマーとプローブはEBNA 2のA、B両型に共通の遺伝子配列をもつ領域に相補的配列で作成した。増幅する遺伝子部にA型では欠損をもつため電気泳動後の、エチジウムブロマイド染色、オリゴヌークレオチドプローブによるSouthern blot hybridization (SBH)の確認をした。

## III. 結 果

PPP99症例において抗EBV抗体価の検討をおこなった。抗EBNA抗体価より全症例ともEBV既感染者であった。EBV-VCA-IgG抗体価、及び、EA抗体価よりEBV再活性化について検討した。PPPの症例では慢性扁桃炎に比較してF検定で5%の有意水準で再活性化率が高いという結論が得られた (Fig. 1, Table 1)。

PPP90例、慢性扁桃炎32例において細菌分布の調査を行った。両者間で細菌分布の差はなく、また、PPPのEBV再活性化群と非再活

性化群との間に細菌分布に差はみられなかった (Fig. 2).

PCRを用いてEBVの検出・タイピング系を確立した. 確立した検査系は, 樹立細胞より抽出したDNAより確認された (Fig. 3).

PPP15症例, および, 慢性扁桃炎9症例の扁桃組織においてPCRを施行した. 施行した24例においてPPPでA型が1例 (Case 6) S BHで確認された (Fig. 4).

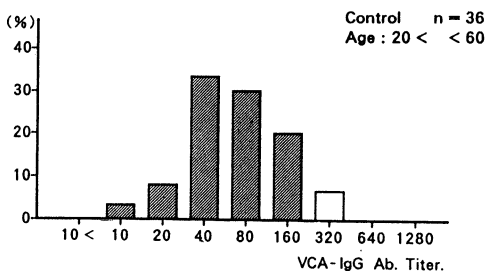
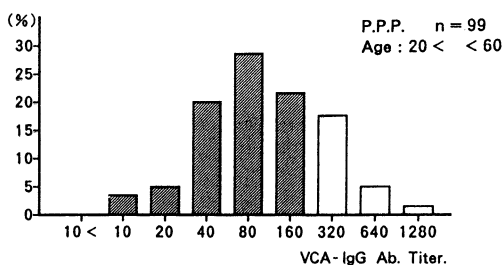


Figure 1: Graphical representation of antibody-titers of VCA-IgG and percent frequencies of PPP and control.

PPP: palmoplantar pustulosis

Control: age matched chronic tonsillitis

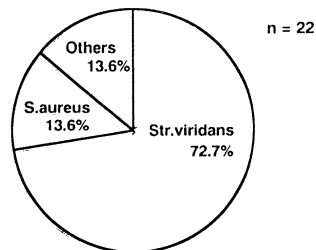
	Total	VCA-IgG $\geq 320$	EBV-EA(IgG) $\geq 10$	EBV reactivation
P.P.P	99	21	7	26 (26.3%)
Control	36	3	1	3 (8.3%)

Table1: A summarised results of anti VCA-IgG antibody and anti EA antibody in the sera from PPP and control.

Control: Chronic tonsillitis of same age group

Active Group of EBV in P.P.P.

(VCA-IgG Ab.  $\geq 320$ , or EA-IgG Ab.  $\geq 10$ )  
(Age : 20 < < 60)



Silent Group of EBV in P.P.P.

(VCA-IgG Ab. < 320, and EA-IgG Ab. < 10)  
(Age : 20 < < 60)

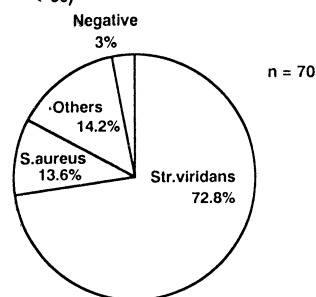


Figure 2: A comparison of bacterial species in tonsil of active and silent EBV groups

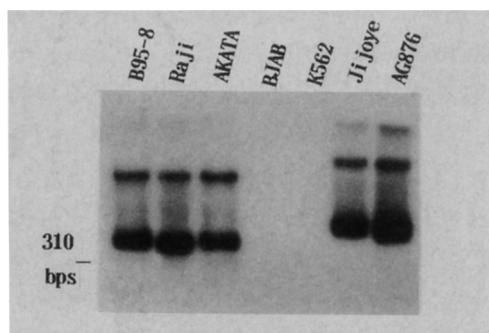


Figure 3: Southern blot hybridization of DNAs from EBV type A-positive cell lines of B95-8, Raji, EBV type B-positive cell lines of AG876, Jijoye, EBV positive cell line of AKATA and negative cell lines K562, BJAB, after amplified by PCR using the universal primers, 1/10 volume of the reaction mixture was electrophoresed on a 6% Polyacrylamide gel (PAGE), and then amplified products were transferred onto a nylon filter and probed with a radiolabeled oligonucleotide specific for the sequence of the EBNA-2A and -B.

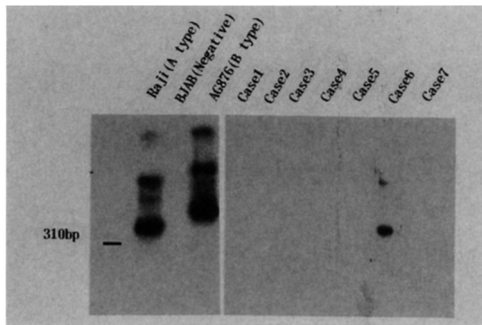


Figure 4: Southern blots hybridization after PCR of DNAs from 7 cases of tonsil with PPP. Only case 6 was indicated the positive band of type A

#### IV. 考 察

PPPをはじめとする扁桃病巣感染症は現在までの研究で扁桃と遠隔病巣の共通抗原に対する免疫異常ではないかと考えられている<sup>2-4)</sup>。しかし、扁桃において、持続した異常抗原が提示される原因については未だ調査が殆どなされていない。

我々は、以前より扁桃病巣感染症において血清学的にEBVの再活性化がみられることを報告してきた<sup>5,7)</sup>。今回、さらに症例を増やしてこのことを確認した。この原因については、1、PPPにおける各種液性免疫の亢進、2、PPPにおける特定細菌により抗EBV抗体産生B細胞に対するアジュバント作用、3、PPPの原因あるいは過程によるEBVの再活性化、4、EBVによるPPPの発症等が考えられる。このうち、1については抗体価の上昇がEBVに特異的であることより否定的である。また、2については通常の方法では細菌の分布に差はなかったことより否定的である。ただし、PPPでは特殊な細菌の分離、抗体価の上昇も報告されているため、それら細菌の関与についても今後検討されねばならないと考えられる<sup>12,13)</sup>。

PCRを用いてのEBVの検出・タイピング系を確立した検査系による検討では、施行した

24例においてPPPでA型が1例SBHで確認された。このことは、PCRで検討したDNA中のEBVは検出限界以下のものが多かったことを示している。p1040 (pBamHI WWYHF)による検出限界の検討では100 Copy前後までの検出が可能であることより、理論値では扁桃におけるEBVの感染率はほとんどの症例で1細胞当たり約 $10^{-3}$ 以下との結果になる。PCRにおける遺伝子検出は現在ある分子生物学的検出系の中で最も高感度のものである。したがって、この結果は扁桃組織の細胞にEBVは、ほとんど感染していないか、もしくは、PCRのプライマー領域に変異もつ株であることが考えられる。しかしまた、EBVの感染細胞が扁桃の特定の部位に局在する場合は扁桃組織採取時に含まれていない可能性も考えられる。

今後、In situ Hybridization等による検討も必要と考えている。

#### V. 結 語

PPP99症例、および、慢性扁桃炎36症例において抗EBV抗体価により再活性化症例の調査を行った。PPPでは慢性扁桃炎に比較してEBVの再活性化症例が有意に見られた。PPP90症例、慢性扁桃炎32症例において細菌学的検討を行った。両者間では差は見られずまた、PPPのEBV再活性化群と非再活性化群との間にも差は見られなかった。

PCRを用いてEBVの検出・タイピング系を確立した。確立した検査系は、樹立細胞より抽出したDNAより確認された。

PPP15症例、および、慢性扁桃炎9症例の扁桃組織においてPCRを施行した。施行した24例においてPPPでA型が1例SBHで確認された。現在のデータではEBVの再活性化は扁桃以外で起こっている可能性が高いが今後In situ Hybridization等による検討も必要と考えられる。

稿を終えるにあたり、研究を御指導頂きま

した塩野義製薬医科学研究所日沼頼夫先生、  
義江修 両先生ならびに塩野義製薬株式会社に感謝致します。

### 参 考 文 献

- 1) 林 泰弘, 田端敏秀: 掌蹠膿疱症における扁桃内ケラチンおよび抗ケラチン抗体価について, 日扁桃誌, 26: 58-62, 1987.
- 2) 九鬼清典, 田端敏秀: 掌蹠膿疱症患者扁桃上皮に対する単クローン抗体作製の試み, 日扁桃誌 26: 58-62, 1987.
- 3) 木村貴明, 田端敏秀, 寒川高男 他: 扁桃上皮の抗原性について, 日扁桃誌, 28: 268-277, 1989.
- 4) Epstein, MA and Achong, BG(editors). The Epstein-Barr Virus: Recent Advances. London: Heinemann, 1986.
- 5) 國本 優, 林 泰弘, 岩橋大介 他: 扁桃疾患とEpstein-Barr virusの関係について. 日扁桃誌, 27: 78-83, 1988.
- 6) 原淵保明, 山中 昇, 形浦昭克: 扁桃病巣感染症におけるEpstein-Barr ウイルス(EBV)の再活性化とEBV-トランスフォーム扁桃リンパ球の自己抗体産生. 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー研究会誌, 5: 34-41, 1987.
- 7) 木村貴明, 國本 優, 田端敏秀: 腎疾患とEBV抗体価の関係, 耳鼻免疫アレルギー, 6: 88-89, 1988.
- 8) Dambaugh, T., Hennesy, K., Chamnan-Kit, L., et al: U2 region of Epstein-Barr virus DNA may encode Epstein-Barr nuclear antigen 2. Proc Natn Acad Sci USA, 81: 7632-7636, 1984.
- 9) Sixbey, JW., Shirley, P., Chesney, P.J., et al: Detection of a second widespread strain of Epstein-Barr virus. Lancet, 761-765, 1989.
- 10) 國本 優, 田村真司, 木村貴明 他: 口腔咽頭疾患とEpstein-Barr virus-Polymerase chain reaction (PCR)による唾液中EBVの検出, 口腔・咽頭科: 投稿中
- 11) 國本 優, 田村真司, 木村貴明 他: 扁桃扁桃におけるPolymerase chain reactionによるEpstein-Barr virusの同定について, 日扁桃誌: 投稿中
- 12) 久々湊靖, 浜本 誠, 志藤文明 他: 掌蹠膿疱症患者扁桃陰窩内細菌叢の定量的検討, 日扁桃誌, 29, 79-87, 1990.
- 13) 竹沢裕之, 河内範夫, 山中 昇 他: 掌蹠膿疱症患者血清における溶連菌菌体抗原に対する抗体価の検討, 日扁桃誌, 27: 270-276, 1988.

### 質 疑 応 答

**追加** 雲井健雄 (兵庫医大)

PPP15例でA Typeは1例であったそうですが, 開発されたPCR法によって, 更に多くの症例で検討して頂きたいと考えます。

**応答** 國本 優 (和歌山医大)

Typeのみについていえば(扁桃抽出リンパ球より)PPP5例中3例でA Typeをみている。

陽性が1例のみの原因は, EBVの増殖している症例が少ない為と考える。今後, 組織上でも, 検討予定である。