

## ANALYSIS OF EB VIRUS REACTIVATION IN ORAL CAVITY BY USE OF PCR AND SEROLOGICAL ASSAY

Department of Otolaryngology, Wakayama medical college

Masaru Kunimoto, shinji Tamura, Toshihide Tabata

The recent studies reported that the immunoserological findings pointed out the reactivation of Epstein-Barr virus (EBV) in the some case of healthy donors and focal infection. The present studies was undertaken to examine the reactivation of EBV in the oral cavity of healthy donors and the focal infection with palmoplantar pustulosis (PPP) by the analysis of EBV particles excretion with polymerase chain reaction. Excretion of EBV particles of 100 healthy donors, 34 patients with PPP were studied using the universal PCR for detection and typing of EBV EBNA-2 sequences.

EBV particles was detected in the 21 cases out of 91 healthy donors who were serological positive and 18 cases out of 34 PPP patients. In additton, serological analysis were done at same time in 50 healthy donors and all PPP patients. High anti VCA-IgG antibody titers showed the no reflection of EBV excretion in the oral cavity, and the usual serological study may not showed the EBV reactivation on time. This result showed that the EBV reactivation in the oral cavity must be analyzed not only by the serological assay but also by the detection of virus particles.

## Epstien-Barr virus の血清学的解析と PCR を用いた遺伝子同定法の比較

國 本 優 田 村 真 司 田 端 敏 秀

和歌山県立医科大学耳鼻咽喉科

### 1. 緒 言

Epstein-Barr virus (EBV) は世界中に蔓延しているヘルペスウイルスで、現在までに、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不顕性の再活性化をおこし、口腔内に排出されたり、顕性の再活性化として各種関連疾患を起こすと推測されてきた<sup>1)</sup>。現在までEBVの顕性の再活性化は、各種関連

疾患の状態をよく反映する事が知られている抗EBV viral capsid antigen (VCA) -IgG抗体価、抗Early antigen抗体価が指標とされてきた。今回、我々は、正常人と、以前から、血清学的解析によりEBVの血清学的再活性化症例の頻度が高いと報告されている<sup>2-4)</sup>扁桃病巣感染症症例について、EBV粒子の口腔内への排出を含嗽液から、また、血清学

抗体価を併せて調査，EBV の口腔内における再活性化について検討した。

## II. 対象及び方法

臨床材料：正常人口腔内含嗽液は当大学職員，学生及び塩野義医科学研究所職員100名のボランティアより採取した。含嗽液は9 mlの生理食塩水を用いて20秒間の合嗽・口すすぎにより採取した。また，同時に血清抗体価測定のために血液を採取した。対象疾患は，掌蹠膿疱症（PPP）34例とし，口腔内含嗽液及び血清抗体価測定用の血液を採取した。採取した口腔内含嗽液は，1 mlの牛胎児血清を加えた後，低速遠心とフィルターろ過により細胞成分を除き，超高速遠心でウイルス粒子を沈澱させ，DNAを抽出した。<sup>5)</sup>

### 1. 抗EBV血清抗体価

採取した血液より血清を分離し，EBV-viral capsid antigen (VCA) 抗体価 (IgG, IgM, IgA)，EBV early antigen (EA) 抗体価 (IgG, IgM, IgA) を蛍光免疫間接法で，抗EBV nuclear antigen 抗体価を蛍光抗体補体法で測定した<sup>6)</sup>。

### 2. EBV粒子の検出

超高速遠心による沈澱物中のより抽出したDNAより含嗽液0.9 ml相当分を用いてEBV粒子排出を検討した。検討は，我々が以前に報告したuniversal PCR法を用いて行った<sup>5,7,8)</sup>。

## III. 結 果

正常人100症例についてEBV粒子の口腔内排出を検討した。血清学的にEBV未感染者9例ではEBV粒子の口腔内排出は見られなかった。血清学的既感染者91例では21例(23%)にEBV粒子の口腔内排出が検出された。検出されたEBVのタイプはA型20例，B型1例であった (Fig. 1)。

このうち，口腔内含嗽液と血液採取が全く同時に行われた50症例について，血清抗体価と，EBV粒子の口腔内排出を比較検討した。

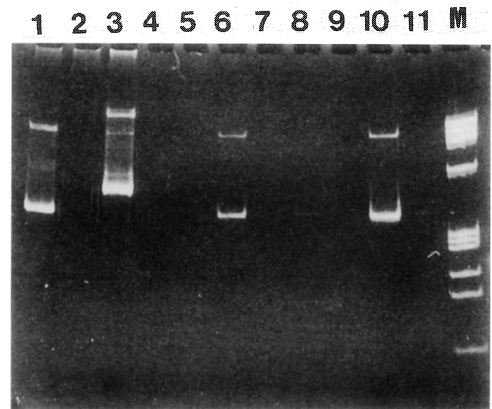


Fig 1 PCR detection and typing of EBV in mouthwashings from healthy adults. Samples were subjected to PCR amplifications using universal primers. Products were analyzed by gel electrophoresis and ethidium bromide staining. Lanes are as follows. 1: B95-8 (A type-positive), 2: BJAB (EBV-negative), 3: AG876 (B type-positive), 4-11: samples from healthy donors, M: phiX174 DNA digested with HaeIII.

検討症例においてEBV粒子の口腔内排出は，抗VCA-IgG抗体価の上昇と一致しなかった (Table, 1)。抗EA-IgG抗体価は2例で陽性であり，1例でEBV粒子の口腔内排出が見られた。扁桃病巣感染症であるPPP症例では34例中18例(53%)に，EBV粒子の排出が確認された (Table, 2)。すべての症例で，血液の採取と口腔内含嗽液の採取が同時に行われた。検討症例においてEBV粒子の口腔内排出は抗体価の抗VCA-IgG抗体価上昇と一致しなかった。抗EA-IgG抗体価は2例で陽性であり，1例でEBV粒子の口腔内排出がみられた。

VCA-IgG Ab. titer	<10	10	20	40	80	160	320	640
<b>Positive</b>				4	8	3	2	1
<b>Negative</b>	3		1	6	12	7	3	
<b>Total</b>	3		1	10	20	10	5	1
<b>Positive case(%)</b>	0		0	40	40	30	40	100

Table 1 : Comparison of EBV excretion in mouthwashings and anti VCA-IgG Antibody titers in healthy donors  
VCA : viral capsid antigen

VCA-IgG Ab. titer	<10	10	20	40	80	160	320	640
<b>Positive</b>			1	3	5	8	1	
<b>Negative</b>				4	4	4	2	2
<b>Total</b>			1	7	9	12	3	2
<b>Positive case(%)</b>			100	43	56	67	33	0

Table 2 : Comparison of EBV excretion in mouthwashings and anti VCA-IgG Antibody titers of focal infection of tonsil with Palmoplantar pustulosis  
VCA : viral capsid antigen

#### IV. 考 察

現在, EBV は宿主の免疫能の低下時に EBV associated lymphoma, Hairly leukoplakia<sup>1)</sup> などの疾患を起こすことが知られているが, 通常状態での EBV の再活性化については現在のところ VCA-IgG, EA 抗体価を中心とした解析の報告がほとんどである。しかし, 不顕性感染より顕性感染への移行, または, EBV 粒子を放出している感染ドナーの状態を詳細に知ることは EBV 関連疾患の発症とも併せて臨床的にも重要と思われる。

今回, 我々は, 不顕性の EBV の再活性化について基礎的検討するために, 血清抗体価

と PCR を用いた EBV 粒子放出について比較検討した。

一般に, 口腔内への EBV の排出経路としては唾液腺が知られている<sup>9,10)</sup>が, 近年には免疫不全状態で, EBV 関連の口腔上皮疾患などが見られる<sup>1)</sup>ことより, 扁桃を含めた口腔咽頭上皮で EBV 粒子が放出されている可能性も考えられている<sup>9,10)</sup>。従って, EBV の口腔内排出は唾液腺を中心とした口腔内全体での EBV の再活性化を反映していると考えられる。

正常人 100 症例について EBV 粒子の口腔内排出を検討した結果では, 血清学的既感染

者91例では21例(23%)にEBV粒子の口腔内排出が検出された。この結果は、他のPCRを用いたEBV口腔内排出頻度とはほぼ同様であり<sup>12)</sup>、本邦での青年期付近での排出頻度として、適当な値と考えられる。これが、直ちにEBVの初感染の危険率を反映するとは考えられないが、EBVの初感染にはある程度の暴露回数が必要である可能性が推察される。

血液と含嗽液の採取が全く同時に行われた50症例について、抗VCA-IgG抗体をはじめとする各種血清抗体価は、口腔内EBV粒子の放出結果を反映しなかった。同様の検討をPPP34症例についても施行したが、抗VCA-IgG抗体をはじめとする各種抗体価は、口腔内EBV粒子の放出結果を反映しなかった。この理由として、EBVの口腔内での再活性化の周期が短いためウイルス抗体価では捉えきれない可能性、あるいは、従来のウイルス抗体価は、腫瘍病変や良性Bリンパ球増殖症などのような大量の抗原提示部位がなければ上昇しない可能性、口腔内でのEBV再活性化が抗体価の上昇に反映されにくい可能性などが考えられる。

今回検討では、口腔内でのEBVの不顕性状態における再活性化を検討するためには、EBV抗体価の検索と共に、ウイルス粒子の検索が必要であると思われた。

## V. 結 語

正常人100例、及び、掌蹠膿疱症34例で血清抗体価とEBV粒子の口腔内排出率をPCRを用いて検討した。正常人血清学的陽性者91例における口腔内排泄率は23%であった。このことは、EBVの初感染においてはある程度の、暴露回数が必要であることが示唆された。同一時間で血清、含嗽液の採取された症例において血清抗体価の上昇と、口腔内へのEBV粒子の放出を検討した。口腔内へのEBV粒子の放出を血清抗体価は反映しなかった。

このことより、口腔内不顕性EBV再活性化の検討では血清学的解析と共にEBV粒子の検索も必要と思われた。

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

## 文 献

- 1) Greenspan, J. S., Greenspan, D., Lenette, E. T., et al: Epstein-Barr virus replicates within the epithelial cells of oral "hairly" leukoplakia, an AIDS associated lesion. *N Engl J Med*, 313: 1564-1571, 1985.
- 2) 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.
- 3) 國本 優, 林 泰弘, 岩橋大介ほか: 扁桃疾患とEpstein-Barr virusの関係について. *日扁桃誌*, 27: 78-83, 1988.
- 4) 國本 優, 田村真司, 田端敏秀: 扁桃のウイルス細菌感染について. *日本耳鼻咽喉科感染症研究会誌*, 9: 45-49, 1990.
- 5) Kunimoto M, Tamura S, Tabata T, et al: One-step detection and typing of Epstein-Barr virus by polymerase chain reaction: Predominance of type A virus in Japan. *J general Virol*: in press.
- 6) 日沼頼夫: EBウイルス抗体検索法の実際. *臨床病理* 35: 175-189, 1978.
- 7) 國本 優, 田村真司, 木村貴昭, ほか: 病巣扁桃におけるPolymerase Chain ReactionによるEpstein-Barr virusの同定について. *日扁桃誌*, 30: 56-62, 1991.
- 8) Kunimoto M., Tamura S., Yoshie O.,

- et al : Epstein-Barr virus in Waldeyer's lymphatic tissue. Adv ORL : in Press, 1992.
- 9) Sixbey J.W., Nedrud J.C., Raab-Traub N., et al : Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. N. Engl. J. Med. 310 : 1225-1230, 1984.
- 10) Wolf H., Haus M., Klein G., et al : Persistence of Epstein-Barr virus in the parotid gland. J. Virol. 51 : 795-798, 1984.
- 11) Sixbey J. W., Vesterinen E. H., Nedrud J. G., et al : Epstein-Barr virus replication in human epithelial cells infected in vitro. Nature (Lond.) , 306 : 480-483, 1983.
- 12) Sixbey J. W., Shirley P., Chesney P.J., et al : Detection of a second widespread strain of Epstein-Barr virus. Lancet. ii : 761-765, 1989.

---

#### 質 疑 応 答

**質問** 小川浩司（北里研究所病院）  
EBV virus は咽頭のどの細胞に存在しているのかお教え下さい。

**応答** 國本 優（和歌山県立医大）  
Hairly leukoplakia等をAIDS感染者が起こしてくる事などより、現在は、口腔咽頭の上皮及び、唾液腺組織中にも存在すると考えられている。