

DETECTION AND GENE ANALYSIS OF EPSTEIN-BARR VIRUS IN MALIGNANT LYMPHOMA TISSUES

Shinji Tamura, Masaru Kunimoto and Toshihide Tabata

Department of Otolaryngology, Wakayama Medical College

We studied the association of Epstein-Barr virus (EBV) with eighteen cases of malignant lymphomas (MLs) in head and neck regions. Histologically, sixteen cases were non-Hodgkin's lymphomas and two cases were Hodgkin's diseases.

The summarized results were as follows;

1) VCA-IgG in 1 case, VCA-IgA in 3 cases and EA-IgG in 10 cases were positive in the serum anti-EBV antibody titers of malignant lymphoma patients.

2) EBV genome was detected in 4 cases by Southern blot analysis. EBNA was expressed in 2 cases and LMP was expressed in one of these cases.

3) All EBV positive cases were non-Hodgkin's lymphomas, and one of these cases

showed positive Ki-1 antigen.

4) EBV *Bam*HI-H fragment which contains reiterated sequence showed the restriction fragment length polymorphism, and that only one band was detected in each specimen, suggested that the EBV contained in each ML tissue was clonal in origin.

5) In the analysis of EBV terminal structure, as a single band of fused termini was detected in all ML cases, suggested that each ML specimen contained clonal episomal-formed EBV genome. Only in one ML case, small sized ladder bands which indicated the heterogenous termini were detected. It is therefore suggested that linear virion EBV DNA was produced in this case.

悪性リンパ腫における Epstein-Barr Virus の検出、およびその遺伝子分析

田村 真司 國本 優 田端 敏秀

和歌山県立医科大学耳鼻咽喉科学教室

はじめに

Epstein-Barr virus (EBV) は、バーキットリンパ腫や上咽頭癌と関係があり、更に免疫不全状態での日和見B細胞性リンパ腫^{1),2)}、鼻腔原発T細胞性リンパ腫³⁾、ホジキン病^{4),5)}

やその他のリンパ系腫瘍⁶⁾との関連も報告されている。今回我々は、免疫不全のない患者の悪性リンパ腫組織についてEBV 特異的抗原とDNAの検出を行うとともに、検出されたEBV DNAの分析を行った。

対象と方法

対象は和歌山県立医科大学耳鼻咽喉科を受診し、組織を得られた頭頸部領域の悪性リンパ腫18例とした。EBV 特異的血清抗体価は治療前に測定した。組織は治療前に採取し、3つに分割し、1つはホルマリン固定後HE染色にて病理組織学的検索を行った。1つはOCT compound に包埋、瞬間凍結し、-80℃に保存後、凍結切片を作製した。残りの1つは-80℃に保存後常法にて高分子DNA を抽出した。

組織におけるEBV 特異的抗原の発現は凍結切片を用い、EBV 核内抗原(EBNA)は蛍光抗体補体法にて、LMP (latent membrane protein)は抗LMP単クローン抗体(S12)⁷⁾を一次抗体として酵素抗体法にて検出した。

EBV ゲノムの検出はEBV BamHI-W断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーション法にて検出した。また、EBV DNA の検出

された症例については更に、EBV BamHI-H、-Nhet断片をプローブとしてRFLP (restriction fragment length polymorphism) および末端構造の解析を行った。

結 果

Table 1 に今回検索した18例の結果をまとめて示した。内分けは非ホジキンリンパ腫(NHL) 16例、ホジキン病(HD) 2例であった。EBV 特異的抗体価では、VCA-IgG 640倍以上はHDの1例のみであり、VCA-IgAは3例で、またEA-IgGは10例で陽性であった。抗EBNA抗体価は全例160倍以下であった。EBV ゲノムはNHLの4例で検出された。4例中2例の腫瘍細胞にEBNAが、内1例にLMPが検出された。EBNA、LMP両方の発現が認められた症例12の所見をFig. 1に示したが、この症例はdiffuse, anaplastic large cell type, Ki-1抗原(CD30)陽性のいわゆるKi-1リンパ腫であった。VCA-IgA陽性の

Name	Age	Sex	Histology	Stage	Site	Antibody titers to EBV antigens						EBNA	Expression		EBV DNA‡	
						VCA		EA-DR		EBNA	EBNA*		LMP†			
						IgG	IgA	IgG	IgA							
1	T.M.	55	M	NHL, DL	IV	PT	320	160	<10	<10	<10	<10	160	-	-	-
2	A.U.	58	M	NHL, DL	I	LN	160	320	<10	<10	20	<10	160	-	-	-
3	K.K.	78	F	NHL, SL	II	parotis	160	160	10	<10	40	<10	160	-	-	-
4	T.O.	52	M	NHL, ALC	II	LN	40	40	<10	<10	<10	<10	80	-	-	-
5	Y.K.	52	M	NHL, DL	I	nose	320	160	<10	<10	10	<10	40	+	-	+
6	N.O.	52	M	NHL, DL	I	E	80	80	<10	<10	<10	<10	80	-	-	-
7	K.T.	54	M	NHL, DL	I	PT	320	320	<10	<10	<10	<10	40	-	-	-
8	I.Y.	54	M	NHL(susp.)	II	PT	80	80	<10	<10	<10	<10	10	-	-	-
9	H.H.	14	M	NHL, SNC	II	E	80	40	<10	<10	20	<10	40	-	-	-
10	T.Y.	61	M	NHL, DM	II	PT	80	80	<10	<10	<10	<10	40	-	-	-
11	T.T.	70	M	NHL, ALC	II	nose	40	80	<10	<10	<10	<10	<10	-	-	-
12	K.K.	77	M	NHL, ALC	II	LT	160	160	<10	10	20	<10	80	+	+	+
13	J.M.	66	M	NHL, DM	II	PT	160	320	<10	40	160	<10	40	-	-	+
14	F.N.	70	F	NHL, DL	I	LN	320	320	<10	<10	<10	<10	80	-	-	-
15	K.M.	85	F	NHL, DL	II	PT	320	320	<10	<10	40	<10	80	-	-	-
16	H.I.	69	M	NHL, DM	II	PT	320	320	<10	20	20	<10	80	-	-	+
17	M.O.	69	F	HD, LP	II	LN	80	80	<10	<10	10	<10	80	-	-	-
18	Y.M.	66	M	HD, LP	II	LN	640	640	<10	<10	10	<10	160	-	-	-

NHL : non-Hodgkin's lymphoma, HD : Hodgkin's disease, DL : diffuse large cell, SL : small lymphocytic
 ALC : anaplastic large cell (Ki-1 lymphoma), SNC : small noncleaved cell (Burkitt's type), DM : diffuse mixed cell,
 LP : lymphocytic predominance, PT : palatine tonsil, LN : lymphnode, E : epipharynx, LT : lingual tonsil
 * : stained by anti-complement fluorescent method.
 † : stained by ABC-peroxidase method.
 ‡ : detected by Southern blot hybridization with EBV BamHI W probe.

Table 1 Profiles, serum antibody titers to EBV antigens and detection of EBV associated antigens and EBV DNA of malignant lymphoma patients.

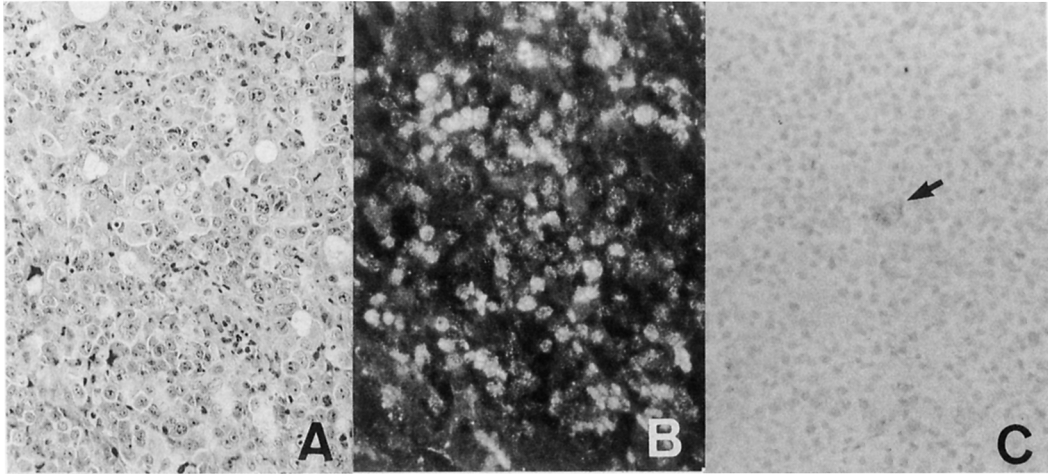


Fig 1 Histological and immunohistochemical findings of case 12 (K.K.).
 A : HE stain. The diagnosis is Ki-1 positive non-Hodgkin's lymphoma.
 B : EBNA stain. The tumor cells presents positive findings.
 C : Immunohistochemical stain by anti-LMP antibody (S12). Only anaplastic large cell shows positive finding (arrow).
 (Original magnification X66).

3例はすべてEBVゲノムが陽性であり、またEA-IgGはEBVゲノム陽性の4例全てで陽性であった。

以下では症例5, 12, 16の3例についてEBV DNAの解析を行った。症例13は含まれているEBV DNA量が非常に少なく、検出されたEBVが正常リンパ組織由来の可能性も否定できないため、これ以上の解析は行わなかった。

EBV DNAの検出された3例の組織の検索結果をTable 2に示した。Y.K.は表面マーカー、遺伝子分析でも非T非B細胞性と考えられた。K.K., H.I.ではB細胞マーカーで陽性所見が得られB細胞性であると考えられた。また、K.K.では免疫グロブリンH鎖遺伝子の再構成が検出された。EBNAの発現はY.K., K.K.の2例, LMPの発現はK.K.の1例で検出された。

EBV BamHI-H断片をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションの結果をFig. 2に

	Y.K.	K.K.	H.I.
Immunohistochemical staining*			
CD45(LCA)	+	+	+
ENA	-	-	-
CD 45 RO(UCHL1)	+	-	-
CD 2 (Leu5b)	+	+	-
CD 3 (Leu4)	-	-	-
CD 4 (Leu3a)	-	-	-
CD 8 (Leu2a)	-	-	-
CD 11 (Leu15)	-	-	-
CD 16 (Leu11b)	-	-	-
CD 56 (Leu19)	+	-	-
L26	-	-	+
CD 19 (Leu12)	-	+	+
CD 21 (CR2)	-	-	-
CD 22 (DAKO-PanB)	-	+	+
CD 23 (Leu20)	-	-	-
HLA-ABC	-	+	+
HLA-DR	+	+	+
CD 25 (Tac)	-	+	-
CD 30 (Ki-1)	-	+	-
LeuM1	-	-	-
Tf-R	-	+	+
KI-67	+	+	-
EBNA	+	+	-
LMP(S12)	-	++	-
Southern blot analysis			
Ig heavy chain	G	R	G
TCR β chain	G	G	G

* : All specimens were examined using frozen sections.
 † : Only anaplastic large cells were positive.
 G : germline configuration, R : rearranged configuration

Table 2 Summarized results of immunohistochemical staining and gene rearrangement analysis of EBV positive lymphoma tissues.

示した。BamHI-H断片はその中に反復配列を含むためRFLPを示すことが知られている⁸⁾。大きなサイズで検出されている薄いバンドはBamHI-Hと相同性のあるBamHI-B1*断片のバンドであると考えられる。各症例において1本のバンドが検出されたことはこの腫瘍組織に含まれているEBVが単一であることを示し、腫瘍が始め1個のEBV感染細胞より増殖して形成されたことを示唆すると考えられる。

次に、EBV BamHI-Nhet断片をプローブとしてEBV DNAの終末構造の検索を行った。EBVゲノムはその両端に約500bpの反復配列を持っている。EBVゲノムが直鎖状のウイルスゲノムとして増殖している場合は反復配列の数が様々であるためこの部分を含むNhet断片は梯子状の多数のバンドとして検出される。一方細胞内でエピゾームとして存在しているウイルスゲノムは両端の反復配列

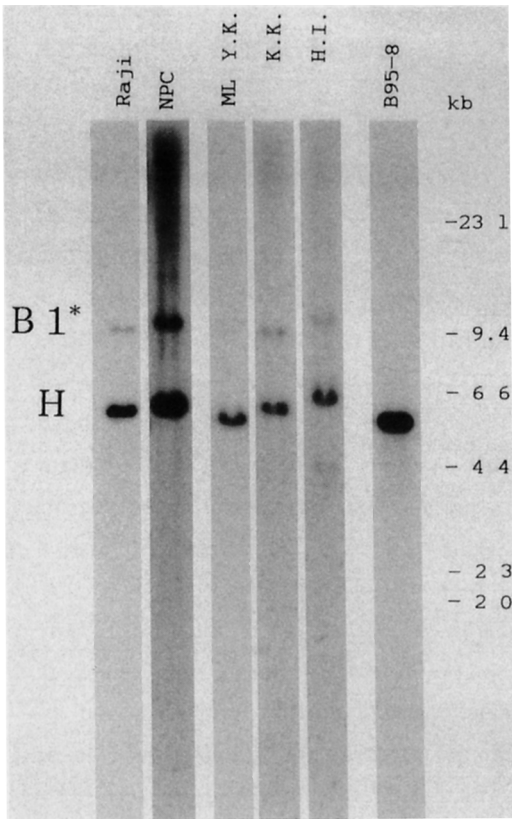


Fig 2 Detection of EBV DNA by Southern blot hybridization. The DNAs are digested by BamHI restriction enzyme and probed with EBV BamHI-H fragment. Raji, B95-8: EBV positive cell lines, NPC: nasopharyngeal carcinoma, ML: malignant lymphoma.

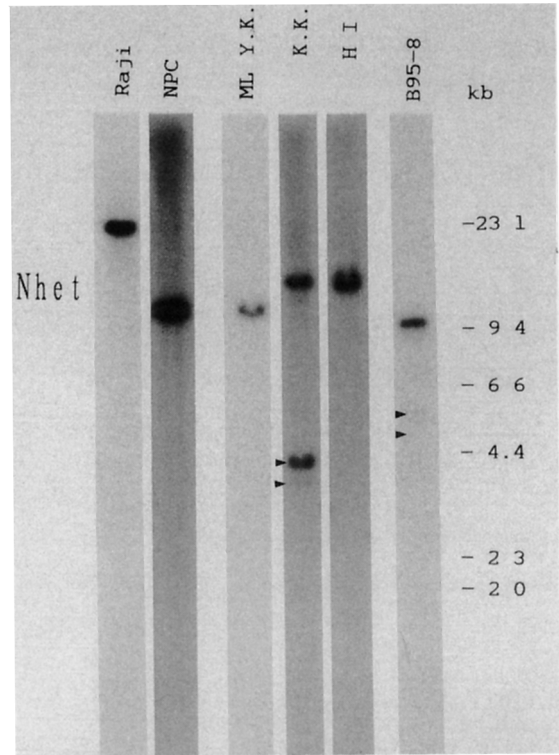


Fig 3 Analysis of EBV DNA termini by Southern blot hybridization. The DNAs are digested by BamHI restriction enzyme and probed with EBV BamHI-Nhet fragment. Arrow head shows the ladder which indicated the heterogenous termini. Raji, B95-8: EBV positive cell lines, NPC: nasopharyngeal carcinoma, ML: malignant lymphoma.

は連結しており、それぞれのウイルス株で特有の反復配列の数を持つため、それぞれに特異的な長さのバンドとして検出される。また、ウイルスによりその反復の数が違うためクローン性の判定に利用できる⁹⁾。すなわち1種類のEBVの感染では1本のバンドのみが検出されるが、2つ以上では、反復の数が異なるため数本のバンドが検出される。

Fig. 3に示すごとく、各症例でそれぞれに特有の大きな1本のバンドが検出され、EBVは単一株がエピソードとして存在していることが示された。また、症例K.K.ではエピソードのバンドの他に梯子状のバンドが認められ、増殖性のウイルス複製が起こっていることが示唆された。

考 察

今回、特に免疫不全を認めない頭頸部領域の悪性リンパ腫18例についてEBVとの関連性を調べ、3例でEBVの存在を検出した。そのうち2例はB細胞起源、1例は非T非B細胞起源と考えられた。3例中2例で抗VCA-IgA抗体価が陽性であり、上咽頭癌と同様にEBV関与の良い指標となると思われた。

EBVが検出された3例について更にEBVのクローン性を反復配列を含むEBV *Bam*HI-H断片のRFLPで検討した。その結果、各症例に特有のRFLPが認められ、EBV保有腫瘍細胞がクローン由来であることが確認された。

EBVの末端構造の解析では、各症例で単一株性のエピソードDNAが検出された。また症例12(K.K.)で直鎖状のウイルスDNA複製を意味する梯子状のバンドが検出され、ウイルス増殖が起こっていることが示唆された。同様のことはRaab-Traubら⁹⁾により上咽頭癌の症例で報告されている。

ま と め

頭頸部領域の悪性リンパ腫18例(NHL16例、HD2例)においてEBVとの関連を検索し以

下の結果を得た。

1. 治療前血清抗EBV抗体価では、VCA-IgGはHDの1例、VCA-IgAは3例で、またEA-IgGは10例で陽性であった。

2. サザンハイブリダイゼーション法により4例でEBVゲノムが検出され、そのうちEBNAは2例、LMPは1例で発現が認められた。

3. EBV陽性の症例は全例非ホジキンリンパ腫であり、1例はKi-1抗原陽性であった。

4. くり返し配列を含むEBV *Bam*HI-H領域はRFLPを示し、それぞれの症例で1本のバンドが検出されたことより、EBVは単一株であり、腫瘍がEBV感染単細胞由来であると考えられた。

5. EBVの末端構造の解析では、全例で1本の特有のバンドが検出され、それぞれEBVの単一株がエピソードとして存在することが示された。また、Ki-1抗原陽性の1例でエピソードのバンドのほか梯子状の数本のバンドが検出され、増殖性のウイルス複製が起こっていることが示唆された。

文 献

- 1) Ciobanu, N., Wiernik, P.H. : Malignant lymphomas, AIDS, and the pathogenic role of Epstein-Barr virus. Mt Sinai J Med 53 : 627-638, 1986.
- 2) Ho, M., Miller, G., et al : Epstein-Barr virus infections and DNA studies in posttransplantation lymphoma and lymphoproliferative lesions: The role of primary infection. J. Infect. Dis. 152 : 876-886, 1985.
- 3) Harabuchi, Y., Yamanaka, M., et al : Epstein-Barr virus in nasal T-cell lymphomas in patients with lethal midline granuloma. Lancet 335 : 128-130, 1990.
- 4) Weiss, L. M., Strickler, J. G., et al : Epstein-Barr virus DNA in Tissues of

- Hodgkin's Disease. *Am. J. Pathol.* 129 : 86-91, 1987.
- 5) Weiss, L. M., Movahed, L. A., et al :
Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N. Engl. J. Med.* 320 : 502-506, 1989.
- 6) Wutzler, P., Färber, I., et al : Detection of Epstein-Barr virus in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Oncology* 43 : 224-229, 1986.
- 7) Mann, K. P., Staunton, D., Thorley-Lawson, D.A. : Epstein-Barr virus-encoded protein found in plasma membranes of transformed cells. *J. Virol.* 55 : 710-720, 1985.
- 8) Shimakage, M., Chatani, M., et al : Rearranged Epstein-Barr virus genomes and clonal origin in nasopharyngeal carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.* 80 : 612-616, 1989.
- 9) Raab-Traub, N., Flynn, K. : The Structure of the Termini of the Epstein-Barr Virus As a Marker of Clonal Cellular Population. *Cell* 47 : 883-889, 1986.