

臍胸後リンパ腫とEBウイルスの関連
およびその遷延蛋白質発現の解析

指導教官 森 茂郎 教授
東京大学大学院医学系研究科
平成3年4月入学
第3期博士課程
第3 臨床医学専攻 17334

佐島 ゆう子

①

膿胸後リンパ腫とEBウイルスの関連 およびその遷延蛋白質発現の解析

指導教官 森 茂郎 教授
東京大学大学院医学系研究科
平成3年4月入学
第3種博士課程
第3基礎医学専攻 17334

笹 島 ゆ う 子

序 論

結核性の陳旧性胸膜炎や陳旧性膿胸などをもつ患者に非ホジキンリンパ腫が合併することが、1970年塩原らによって記載されて以来¹⁾、次々に症例が報告され、我が国に独自の疾患として注目を集めている。このようなリンパ腫は膿胸後リンパ腫 (pyothorax-associated lymphoma, PAL) と呼ばれている^{2),3)}。

膿胸後リンパ腫は、「結核性胸膜炎や人工気胸術後の慢性結核性膿胸罹患後、その病変部に長期間を経て発生する悪性リンパ腫である」と定義される。この疾患の報告はすべて日本国内からのものであり、欧米には見あたらない。都立駒込病院の井深らの統計によれば、膿胸後リンパ腫は同病院で検索された節外性リンパ腫の5%、非ホジキンリンパ腫の1.5%を占めている⁴⁾。また井内らによれば、本リンパ腫は膿胸患者の2.2%に発生する²⁾、下山らは膿胸患者におけるリンパ腫の発生率は、一般人にリンパ腫が発生する頻度の25~33倍であると述べている⁵⁾。井内らが1989年に本疾患37例について調べた統計によれば、患者平均年齢は63才と高齢であり、また男女比は5.2:1である。膿胸発症より平均33年で本リンパ腫が発生している。臨床症状の面では、膿胸後リンパ腫の初発症状として最も特徴的なものは胸痛であるとされ、その他胸部腫瘍の出現、呼吸困難等で発症する場合もある。この腫瘍の進展は速く、患者の平均余命は8カ月である³⁾。

膿胸後リンパ腫の病理組織像は、ほとんどの例で diffuse large cell type (Working Formulation分類による⁶⁾)の形態を示す³⁾。免疫染色によれば、腫瘍細胞はB細胞由来であることが多いが、T細胞性^{3),7),8)}、Null細胞性⁹⁾のものもいくつか報告がある。病因について、青笹らは膿胸後リンパ腫を慢性炎症を基盤に発生する悪性リンパ腫の一種としてとらえる一方¹⁰⁾、人工気胸術が強い危険因子であるとの報告¹¹⁾もしている。しかし、これらはいずれも推論であり、真の発生機序は解明されていない状況にあった。

一方、Epstein-Barr (EB) ウイルスは、ヒトがんウイルスとしては最初に、1964年 Epstein, Achong, Barrによってアフリカ型バーキットリンパ腫中に見いだされた¹²⁾。本ウイルスはヘルペスウイルス科に属しており、172Kbの二重鎖線状DNAを含む二十面体のキャプシドをもつ、エンペロープに覆われたウイルスである¹³⁾。伝染性単核球症の原因ウイルスとして知られているほか、リンパ球系および一部の上皮性腫瘍発生と関連が深いことが知られている¹⁴⁾。EBウイルスの関与する腫瘍は、バーキットリンパ腫、上咽頭癌、免疫不全患者に発生するリンパ腫が代表的なものであるが、近年では、胸腺癌¹⁵⁾、唾液腺癌¹⁶⁾、胃癌¹⁷⁾、鼻咽頭のNKまたはT細胞リンパ腫¹⁸⁾、NK白血球¹⁹⁾、ATL (adult T cell leukemia)²⁰⁾等のさまざまな疾患への関与も注目されている。

これらの腫瘍では、潜伏感染したEBウイルスが産生する腫瘍関連遷延蛋白質EBNA (EB virus nuclear antigen) 1~6及びLMP (latent membrane protein) 1~2により、宿主細胞が不死化して無限の分裂増殖を開始し、そののちいくつかの段階を経て腫瘍が発生してくると考えられている。遷延蛋白質のうちEBNA1は全てのEBウイルス関連腫瘍に発現しているが、EBNA1以外の蛋白質は宿主の細胞傷害性T細胞の標的となる²⁰ため、宿主の状態によって発現様式が異なる。すなわち、パーキットリンパ腫では宿主は免疫学的健常人であるから、EBNA1以外は陰性、免疫不全合併リンパ腫ではEBNA1以外の遷延蛋白質も強陽性である。Roweらはこれらの腫瘍関連EBウイルスを遷延蛋白質発現様式によって3型に分類し (Roweの分類)、前者をLatency I、後者をLatency IIIとした²²。なお上皮性腫瘍である上咽頭癌ではEBNA1のほかLMP1が陽性 (60%) というLatency IとLatency IIIの中間的な発現様式を示すので、Latency IIとして分類されている。

最近我々は、臍胸後リンパ腫より得た細胞株を検索する過程でこの腫瘍細胞にEBウイルスのRNAや蛋白質が強発現していることを発見した。そこでこのリンパ腫の発生にはそもそもEBウイルスがかかわっているのではないかという仮説をたてて検索を行った。その結果EBウイルスは臍胸後リンパ腫の全例に陽性であることを知り、またこのリンパ腫におけるウイルス蛋白質の発現パターンが従来知られてきた他のヒトリンパ腫における発現形式と異なったものであることを知ったので、ここに報告する。

実 験 方 法

1. 実験材料

1) 手術および剖検材料

4例の膿胸後リンパ腫の未固定凍結検体を用いた。これらの症例の性、年齢、膿胸発症後経過年数は、表1に示すとおりである。このうち症例3は剖検で得られた材料であり、症例1、2、4は手術的に切除された検体である。組織像は図1に示すように、びまん性大細胞型ないし免疫芽球型であった。なお症例1~3は、京都大学山邊博彦助教授、天理よろづ相談所病院小橋陽一郎博士より、症例4は東京警察病院野中泰延博士より供与を受けた。

また対照として、東京大学医科学研究所病理学研究部に多施設から供与されたリンパ腫のうちB細胞性リンパ腫50例を用いた。

2) SCIDマウスに移植継代したリンパ腫細胞株

上記4例の膿胸後リンパ腫のうち症例4の新鮮検体をSCID (severe combined immunodeficiency) マウスに移植継代し、株化した。また1990~1993年の間に東京大学医科学研究所病理学研究部に他の施設から供与された新鮮リンパ腫組織をSCIDマウスに移植継代したものうち、EBウイルス陰性のもの(以下、EBウイルス陰性SCID腫瘍とする)数例を対照症例として用いた。さらに免疫不全者に発生するリンパ腫のモデルとして、SCIDマウスに発生したEBウイルスによるB細胞性腫瘍(以下、EBウイルス陽性SCID腫瘍とする)数例も使用した。このEBウイルス陽性SCID腫瘍は、EBウイルスに感染したヒトリンパ球をSCIDマウスに移植することによって得た。この手技については既報した²³⁾。この腫瘍はさきに述べたRoweの分類のLatency IIIに相当する。

3) 哺乳動物細胞株

もちいた哺乳動物細胞株および入手先は下に示すとおりである。

P3HR1 (ポリクローナルEBウイルス感染株)

B95-8 (マーモセット由来EBウイルス産生細胞株)

以上は東京医科歯科大学、平井莞二教授より供与を受けた。

Raji (モノクローナルEBウイルス感染株)

TARL (ラットT細胞由来HTLV-I感染EBウイルス非感染株)

Jurkat (ヒトT細胞由来EBウイルス非感染株)

Molt-4 (ヒトT細胞由来EBウイルス非感染株)

以上は東京大学医科学研究所病理学研究部で維持しているものを用いた。

以上の細胞株は、37℃、5%CO₂存在下で、10% (B95-8は20%) 牛胎児血清 (FCN, UK) を含むRPMI1640培地 (GIBCO, USA.) を用いて培養した。

2) 実験方法

1) 免疫組織染色

a. 検体の包埋と凍結保存

外科的に切除された検体もしくは剖検で得られた検体を、すばやく5mm角に細切し、コンパウンド (TISSUE-TEK O.C.T.COMPOUND, Miles, USA) に包埋した。その後、ドライアイス-アセトンで冷やした n-ヘキサン中で急速に凍結し、-80℃に保存した。

b. 凍結組織の薄切と固定

凍結保存しておいた検体を、庫内温度 -18℃のクリオスタットにて厚さ4μm に薄切し、0.025%のポリ-L-リジン (SIGMA, USA.) を薄く塗布したスライドグラスに密着させた。スライドグラスに貼布した切片は室温で風乾させ、PLP 固定液²⁴⁾にて10分間固定した。

c. 免疫染色 (3ステップ avidin-biotin-peroxidase 法²⁵⁾)

Phosphate buffer saline (以下PBS) にて希釈した各一次抗体 (表2に示した) にて湿潤箱内37℃2時間反応させた。次に二次抗体 (biotin-conjugated anti-mouse IgGおよびbiotin-conjugated anti-rabbit IgG, Dakopatts, Denmark, 各x400) を湿潤箱内37℃45分間反応させた。その後三次反応液 (peroxidase-conjugated streptavidin, Dakopatts, Denmark, 各x400) を湿潤箱内 37℃45分間反応させ、発色剤 (0.05% ジアミノベンジジン-四塩酸塩:SIGMA, 0.003%過酸化水素水をふくむ PBS) にて発色し、透徹、封入した。なお固定後および各反応間の洗浄にはPBSをもちいた。

2) フローサイトメトリー

新鮮な細胞をbuffered formol acetone (45% acetone, 10% formalin液 in PBS) にて10秒間固定し、PBSにて希釈した一次抗体を4℃にて1時間反応させた。用いた抗体はCS1-4 (EBウイルス蛋白質LMP1に対する抗体, Dakopatts, Denmark, x25) で、mouse IgG1 kappa (SIGMA, USA, 5mg/ml) を対照に用いた。次に蛍光をラベルした二次抗体 (anti-mouse IgG&IgM-fluorescein conjugated, TAGO, USA, x50) を4℃で1時間反応させた。また、固定後および各反応間の洗浄にはPBSをもちいた。細胞の蛍光強度をFACScan (Becton & Dickinson) にて解析した。

3) Western blot

a. Sodium dodecyl sulfate-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE はLaemmliの方法²⁶⁾にしたがって行った。

細胞および組織はRIPA buffer (20mM Tris:SIGMA-HCl pH7.4, 150mM NaCl, 1% TritonX-100:Bio Rad, 10% glycerol) にて可溶化した。これを50 μ g蛋白質量とり、濃縮ゲル5%、分離ゲル10%のスラブゲルを用いて100Vの定電圧にて泳動した。泳動には、Laemmliのバッファー (25mM Tris-HCl pH8.3, 192mM glycine, 1% SDS) を用いた。

b. プロットティングおよび免疫染色

検体蛋白質をSDS-PAGE にて分離した後、トランスファーバッファー (25mM Tris-HCl pH8.3, 192mM glycine, 1% SDS, 20% methanol) に浸し、セミドライプロットティング装置 (バイオクラフト) を用いてPVDF (polyvinylidene difluoride) メンブランフィルター (ImmobilonTM, MILLIPORE, USA) 上に移した。移した後、メンブランをブロックエースTM (雪印乳業) 溶液に浸し、4 $^{\circ}$ Cで一晩ブロッキングした。翌日TBS (0.2M Tris-HCl pH7.5, 0.5M NaCl) にて1000倍に希釈した一次抗体 (前出抗LMP1抗体、CS1-4) と室温で1時間反応させたのち、二次抗体として3000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ結合抗マウスIgG (Promega, USA) を室温にて1時間反応させた。各反応間の洗浄には0.05% Tween20を含むTBSをもちいた。最後にNBTおよびBCIP (Promega, USA) にて発色した。

4) in situ hybridization

a. 組織切片の前処理

凍結保存しておいた検体を、庫内温度 -18 $^{\circ}$ Cのクリオスタットにて厚さ4 μ mに薄切し、シラン処理法²⁷⁾にて処理したスライドガラスに密着させた後、4%ホルマリン液を含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.2) で10分間固定した。つぎに0.2N塩酸にて内因性アルカリフォスファターゼを失活させ、さらにエタノール系列で脱水し、乾燥した。

b. ハイブリダイゼーション

プローブとしてEBER (EB virus encoded small RNAsに対するアンチセンス、alkalinphosphatase-conjugated、ヤトロン) を用いた。前処理済の組織切片にハイブリダイゼーション緩衝液 (ヤトロン) で希釈したプローブ溶液をかけて、湿潤箱内37 $^{\circ}$ Cにて一晩反応させた。翌日4xSSC (0.6M NaCl, 0.06M 酢酸ナトリウム)、1xSSCにて洗浄した後、NTB、BCIP (ヤトロン) にて発色し、透徹、封入した。

5) Southern Blot Hybridization

a. 検体よりDNAの抽出

凍結保存された検体の薄切切片、もしくは培養細胞を0.1% SDS、80 μ g/ml proteinase K (Merk, Germany) をふくむSTE (Saline-Tris-EDTA: 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) 緩衝液に浮遊し、37 $^{\circ}$ Cで一晩反応させて蛋白質を分解した。翌日のごとくフェノール-クロロホルム抽出にて蛋白質を除去した後、エタノールを加えて沈澱したDNAを回収した²⁸⁾。

b. 制限酵素によるDNAの切断

検体より抽出したDNAを10 μ gとり、制限酵素10~20Uを含む反応液 (TAKARA universal buffer H またはK) 中で、37 $^{\circ}$ Cにて一晩インキュベートして消化した。用いた制限酵素は、*Bam*H I、*Mlu* I、*Ban* II、*Bgl* II (いずれも TAKARA) である。

c. 電気泳動とプロットティング

制限酵素で消化したDNAを0.7%または1%アガロースゲル (SEA-KEM[®] ME agarose、FMC、USA) に電気泳動した。十分にDNAを展開したのち、ゲルを0.25N 塩酸に10分間浸し、次に1.5N 塩化ナトリウムを含む0.5N 水酸化ナトリウムに45分間浸してDNAを変性させた。その後、1.5N 塩化ナトリウムを含む1M Tris-HCl (pH7.4)にてゲルを中和し、20xSSCにて毛細管現象を利用してナイロンメンブレンフィルター (BIODYNE[™]、POLL、USA) 上に移した。その後フィルターに紫外線 (120000 μ J) を照射して移したDNAを固定した。

d. プロープの標識 (マルチプライム法)

"Ready-to-Go" DNA ラベリングキット (Pharmacia、USA) を用いて行った。鋳型となるプロープDNAを50ngとり、95 $^{\circ}$ C5分ボイルしたのち急冷して変性させた。これを"Ready-to-Go"リアクションミックスと混合し、³²P- α -dCTPを加えて37 $^{\circ}$ Cにて15分間インキュベートした。用いたプロープは、*Eco* I (EB ウイルス*Eco*R I断片I領域、山口大学高田賢蔵教授より供与された)、およびLMP1 (東京医科歯科大学平井莞二教授より供与された) である (図2)。標識したプロープはSephadex G50 カラム (Pharmacia、USA) を通して精製した。

e. ハイブリダイゼーションおよびフィルムへの露光

メンブレンをハイブリダイゼーションバッファー (0.2M NaPO₄ pH7.2, 1mM EDTA, 7% SDS) に65 $^{\circ}$ Cで2時間あらかじめ浸しておき、標識したプロープを65 $^{\circ}$ Cで一晩ハイブリダイズした。翌日0.2xSSC/0.1% SDSにて洗浄後、フィルムに感光させた。

6) Northern Blot Hybridization

a. 検体よりRNAの抽出

凍結保存した組織もしくは新鮮組織をISOGEN (ニッポンジーン) 溶液存在下でホ

モゲナイズし、クロロホルムを加えて遠心分離し水層をとった。これにイソプロパノールを加えRNAを沈澱させ回収した。さらに最終濃度2Mとなるように塩化リチウムを加えて一晩置き、より純度の高いRNAを回収した。

b. 電気泳動およびプロットティング

抽出したRNAを15 μ gとり、脱イオン化ホルムアミドを加えてボイルし、変性させてから、17.5%ホルマリン、1xMOPS buffer (20mM MOPS:SIGMA, 8mM 酢酸ナトリウム, 1mM EDTA) を加えて、1%ホルマリン及び1xMOPS bufferを含む1%アガロースゲルに電気泳動した。泳動には、0.5%ホルマリン液を含む1xMOPS bufferを用いた。泳動後、10xSSCにて毛細管現象を利用してナイロンメンブレンフィルター (BIODYNE™, POLL, USA) 上に移した。その後フィルターを紫外線照射 (100000 μ J) することにより移したRNAを固定した。

c. プローブの標識

用いたプローブはLMP1 (図2、東京医科歯科大学平井莞二教授より供与された) およびribosomal RNA (東京大学医科学研究所病理学研究部帯刀誠先生より供与された) である。前述の 5) dと同様³²P- α -dCTPにて標識した。

d. ハイブリダイゼーションおよびフィルムへの露光

RNAを固定したメンブレンをハイブリダイゼーションバッファー (0.2M NaPO4 pH7.2, 1mM EDTA, 7% SDS) に60°Cで2時間あらかじめ浸しておき、標識したプローブ (最初にLMP1) を60°Cで一晩ハイブリダイズした。翌日0.2xSSC / 0.1% SDSにて洗浄後フィルムに感光させた。ついで、ボイルした0.1% SDSにてプローブを除去し、同じように標識したプローブ (ribosomal RNA) をハイブリダイズした。

7) polymerase chain reaction (PCR)

1 μ M プライマー、1mM dNTP、1U *Taq* polymerase (Ampli *Taq*[®], PERKIN ELMER) を含むPCR buffer (10mM Tris-HCl, pH8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% gelatin : PERKIN ELMER) 25 μ lに250ngの鋳型DNAを加えて反応させた。なお、用いたプライマーおよびPCRプログラムは下記のとおりである。

プライマー：免疫グロブリン重鎖遺伝子V領域とJ領域に設定し、様々な長さの再構成重鎖遺伝子断片が70~140bpの範囲のPCR産物で検出できるようにしたもの²⁹⁾

5'> GTG ACC AGG GT(AGCT) CCT TGG CCC CAG <3'

5'> ACA CGG C(CT)(GC) TGT ATT ACT GT <3'

PCRプログラム：95°C 2分、55°C 2分、72°C 2分；1サイクル
95°C 1分、55°C 2分、72°C 2分；35サイクル
95°C 1分、55°C 2分、72°C 5分；1サイクル

結 果

1. 膿胸後リンパ腫にEBウイルスが存在していることの証明

まず、用いた4例の膿胸後リンパ腫すべてにおいてEBウイルスが存在していることを証明した。

1) 免疫組織染色によるウイルス蛋白質の検出

膿胸後リンパ腫4例、膿胸とは関係のないびまん性B細胞性リンパ腫50例、EBウイルス陽性SCID腫瘍5例について、EBウイルス蛋白質EBNA2およびLMP1に対する抗体を用いて免疫組織染色をおこなった。膿胸後リンパ腫の全例およびEBウイルス陽性SCID腫瘍全例においては、多くの腫瘍細胞の核にEBNA2がつよく発現していたが、膿胸とは関係のないリンパ腫においては、すべてEBNA2陰性であった(図3)。一方、LMP1については、EBウイルス陽性SCID腫瘍では多くの細胞の細胞質～細胞膜に強陽性であったが、膿胸後リンパ腫の4例では陰性～弱陽性(ボーダーライン)であった。膿胸とは関係のないリンパ腫では全例陰性であった(図4)。

2) in situ hybridization によるウイルスRNAの検出

膿胸後リンパ腫4例について、EBウイルスが産生するRNA (EBERs: EB virus encoded small RNAs) を腫瘍細胞内に in situ で同定するため、in situ hybridization を行った。この結果4例の膿胸後リンパ腫すべてにおいて大部分の腫瘍細胞内に強いシグナルが認められた(図5)。

以上1)2)より、膿胸後リンパ腫の全例にEBウイルスが強く感染していることが示された。

3) Southern blot hybridizationによるEBウイルスのクローナリティの検索(膿胸後リンパ腫腫瘍細胞へのEBウイルス感染時期の検討)

次に膿胸後リンパ腫に存在するEBウイルスのクローナリティを調べた。

EBウイルスは、細胞に感染し増殖するときには線状形態をとるが、細胞内に潜伏する際に、ランダムな数のウイルス遺伝子末端繰返し部分 (terminal repeat) を切り落として環状DNAとなる。そして宿主細胞周期にあわせて複製する状態においては環状形態を保ち、terminal repeatの数を変えない。したがって、ある細胞集団において感染しているウイルスのterminal repeatを調べたとき、その数が単一(モノクローナル)であればその細胞集団は、EBウイルスが過去に感染していたひとつの細胞が複製したものである、すなわち増殖を開始する前にEBウイルスが感染していたということが言える。と同時に、その細胞集団の増殖にEBウイルスが関与したという可

能性も高くなる。

用いた膿胸後リンパ腫各例に感染したEBウイルスのterminal repeatのクローナリティを、EBウイルスゲノム陽性細胞株（Raji: モノクローナルEBウイルス感染株、P3HR1: ポリクローナルEBウイルス感染株）、EBウイルスゲノム陰性株（TARL）を対照として検討した。図2に示すように環状EBウイルスゲノムのterminal repeatの両端に認識部位があるような制限酵素（BamH I）で処理したのち、プローブEco IまたはLMP1をハイブリダイズすると、terminal repeatの数に対応した電気泳動度のバンドが検出されるようにした。ウイルスが単一の場合には1本のバンドとして検出され、すなわち存在するウイルスはモノクローナルであり、1個のウイルス株から複製されてきたものであるといえる³⁰⁾。

この結果、各々サイズは異なるが、各症例で単一のバンドを検出した（Eco Iをハイブリダイズした結果を図6に示した）。膿胸後リンパ腫に存在するEBウイルスは、terminal repeatの数が症例ごとには異なるがそれぞれ単一であることが示唆された。このことから、膿胸後リンパ腫腫瘍細胞内に存在するウイルスはクローナルであり、腫瘍細胞が増殖した後に感染したのではなく、EBウイルスが感染し潜在化した細胞が始祖となり腫瘍化したという可能性が強いことが判明した。

以上の検索で膿胸後リンパ腫腫瘍細胞にはEBウイルスが存在し、かつそのウイルスは細胞が腫瘍として増殖する前に感染していたということが強く推察された。

2. 膿胸後リンパ腫におけるLMP1の発現についての検索

つぎに我々は、免疫染色の結果がEBNA2が強陽性にもかかわらず、LMP1が陰性ないし弱陽性であることに注目した。なぜならば、この蛋白質発現パターンは前述したRoweの分類のどれにもあてはまらないからである。そして、このLMP1陰性ないし弱陽性という現象を別な方法で検証することにした。

以降の検索には多量の新鮮組織を必要とし、特にフローサイトメトリーには新鮮な生存細胞が必要であるため、手術、剖検材料では行い得なかった。そのかわり、症例4をSCIDマウスに移植し株化したもの（YF株とした）を用いた。

(1) 膿胸後リンパ腫症例4の手術検体腫瘍細胞とSCIDマウス移植継代株が同一であることの証明

まずYF株が、患者から得られた生検組織中の腫瘍細胞と同一であるという証明をした。膿胸後リンパ腫症例4およびYF株の凍結組織について免疫染色を行い、表3に示すようにリンパ球マーカー12項目について完全に一致した結果を得た。また、前出のEBウイルス蛋白質EBNA2、LMP1についても結果は一致し、さらに、すべての

EBウイルス関連腫瘍に発現しているとされるEBNA1についても検索をおこなったが、症例4、YF株両者とも陽性であった。また、PCR法を用いて、双方に同じサイズの重鎖免疫グロブリンの再構成遺伝子を検出した(図7)。

(2) YF株におけるLMP1蛋白質の発現についての検索

免疫染色で症例4がLMP1に対して陰性ないし弱陽性と判断されたことを裏付けるためYF株におけるLMP1の発現を他の方法で検出することをこころみた。

1) Western blot

YF株におけるLMP1の発現を免疫化学的にとらえるために、EBウイルス産生細胞株B95-8、EBウイルス陽性SCID腫瘍、EBウイルス陰性SCID腫瘍を対照に用いてWestern blotを行った。抗LMP1抗体を反応させたところ、EBウイルス陽性SCID腫瘍ではLMP1の強い発現が認められたにもかかわらず、YF株ではLMP1によるシグナルは検出されなかった(図8)。

2) フローサイトメトリー

YF株新鮮細胞について、免疫組織染色やWestern blotでは検出し得ない弱い反応をとらえるために、EBウイルス陽性SCID腫瘍、EBウイルス陰性SCID腫瘍を対照に用いてフローサイトメトリーを行った。EBウイルス陰性SCID腫瘍では、抗LMP1抗体を反応させても正常マウスIgGに比べて蛍光度ヒストグラムをまったく偏移しないが、EBウイルス陽性SCID腫瘍では大きく陽性に偏移する。YF株ではわずかながら偏移がみられた(図9)。

以上1)2)の結果より、YF株において、LMP1は微量に発現しているが他のEBウイルス陽性SCID腫瘍にくらべ発現量が著しく少ないと判定された。なおこの結果は、症例4の生検組織の免疫染色の結果(LMP1 陰性~弱陽性)と基本的に合致するものである。

(3) YF株におけるLMP1のゲノムおよび転写レベルでの解析

つぎに、YF株のLMP1蛋白質の発現が弱いという現象が、LMP1ゲノムやRNAの異常によるものであるのかどうかを調べた。

1) Northern blot hybridization によるLMP-mRNAの検出

YF株におけるLMP1のmRNAレベルでの発現をしらべるため、EBウイルス産生細胞株B95-8、EBウイルス陽性SCID腫瘍、EBウイルス非感染細胞株を対照に用いてNorthern blot hybridizationを行った。結果として、YF株においてLMP1-mRNAはB95-8および他のEBウイルス陽性SCID腫瘍と較べて、サイズは同じであったが、シグナルの強さ(転写量)はきわめて低レベルであった(図10)。

2) Southern blot hybridization によるLMP1ゲノム構造の解析

次に、LMP1ゲノムレベルでの異常があるかどうかを調べるために、Southern blot hybridization 法を行った。YF株細胞よりDNAを抽出し、図11に示したような制限酵素で消化した各断片の長さを、EBウイルス陽性株と比較した。プローブは、LMP1遺伝子の第1エクソンの一部および第2、第3エクソンを完全に含む断片で、東京医科大学平井莞二教授より供与された。EBウイルス産性株であるB95-8では、*Mlu* I 単独、*Mlu* Iと *Ban* II、*Mlu* Iと *Bgl* IIによる処理により図12のような位置にシグナルが検出されたが、YF株とEBウイルス陽性SCID腫瘍とは、メインのバンドの位置は、B95-8と一致したが、もうひとつのバンドは検出されなかった。このことよりYF株に感染しているEBウイルスのLMP1は、B95-8に感染しているEBウイルスのLMP1と比べて違いがあることが示唆されたが、LMP1を強く発現しているEBウイルス陽性SCID腫瘍との間には、この検索方法では差異は認められなかった。

すなわち、より詳細なゲノム構造の検索が必要であるが、転写の段階で転写量が抑制されるためにLMP1蛋白質の発現が少なくなっているという可能性が示唆された。

考 察

本研究は、膿胸後リンパ腫の発生にEBウイルスの関与があることを示した最初の研究である³¹⁾。(ほぼ同時期にFukayamaらが同じ主旨の研究発表を行った³²⁾)。その後現在までに、十数例の膿胸後リンパ腫におけるEBウイルスの存在が報告されている。なお、in situ hybridizationによるEBERの検出はパラフィン包埋検体でも検索可能であるので、より多くの膿胸後リンパ腫検体についての検索が可能と思われる。さらに本研究では、膿胸後リンパ腫におけるEBウイルス蛋白質の発現様式が、EBNA2強陽性LMP1弱陽性という点で従来知られてきた類型と異なるものであることを示した。以下にEBウイルス遷延蛋白質の発現様式を中心にして、今回の実験結果を考察する。

まず第一に、この腫瘍においてEBNA2が強く発現しているが、このことはEBウイルスによるヒト腫瘍として大変特徴的である。なぜならばEBNA2～6およびLMP1～2は宿主体内では細胞傷害性T細胞の標的となるため、免疫不全のある宿主においてのみ発現できるとされてきたからである²¹⁾。すなわち免疫学的健常人においてこれらの蛋白質が発現されれば、その細胞はMHC class I拘束性細胞傷害性T細胞によってたちまち駆除されてしまい、生体に存在しつづけることができないとされている²¹⁾。しかし膿胸後リンパ腫において患者は少なくとも見かけ上は免疫不全状態でないにもかかわらずEBNA2が強陽性であった。

このEBNA2強陽性という現象に対する解釈としていくつかの推論が可能である。その1つは、宿主がEBNA2を抗原として認識できなかったのかもしれないということである。実際に、宿主のHLAのタイプによって、細胞傷害性T細胞を誘導できるEBウイルス蛋白質が違うということが報告されている^{33),34),35)}。この報告は、B95-8からクローニングしたEBNA1～6およびLMP1～2を用いて蛋白質を合成し、それぞれを用いていろいろなタイプのHLAの細胞傷害性T細胞を刺激したときの応答をしらべた実験によるもので、例えばEBNA1で刺激した場合にはどのタイプのHLAも無応答であったという。このことは、すべてのEBウイルス関連腫瘍がEBNA1を発現しているにもかかわらず拒絶されないという事実と一致する。彼らの実験によればHLA-B44タイプの細胞傷害性T細胞はLMP1の刺激に対してのみ応答し、EBNA1～6に対しては応答できないということであった^{34),35)}。これをふまえて考えると、膿胸後リンパ腫を発症した患者のHLAは、EBNA2を認識できない、従って細胞傷害性T細胞を誘導できないタイプだったのかもしれないという考え方が成立しうる。今後膿胸後リンパ腫患者においてHLAのタイプングすることが、この推論の正当性を証明するであろう。

膿胸後リンパ腫が、EBNA2強発現の腫瘍であるのに生体に拒絶されないことについての第二の推論は、宿主のHLAが細胞傷害性T細胞を誘導できるタイプであったにもかかわらず、別の要因で感染細胞の認識ができなかった場合である。膿胸瘻痕部は炎症細胞その他の細胞が浸潤し線維化などにより周囲組織から物理的に孤立する場である。その孤立した空間にEBNA2陽性の細胞が出現して増殖し、さらに腫瘍性を獲得したとしても、腫瘍細胞がその空間にとどまっている限りその抗原性を宿主側が認知できないかもしれない。この環境下で、さまざまなプログレッションやクローンの選択が起り、最終的に腫瘍として急速に増殖し膿胸瘻痕壁を破壊する。ここで初めて宿主に認識され攻撃を受けるが、その時点では腫瘍の増殖力のほうが勝ってしまうのかもしれない。膿胸後リンパ腫の病理組織像はたしかに壊死部分が多く、宿主からの激しい攻撃を想像させる。膿胸発症からリンパ腫発症までは長期間であるのに、リンパ腫発症ののちは非常に速い経過をたどるといふ臨床経過もこの推論に一致する。すなわち、宿主からの攻撃がほとんどないという環境で、長い時間をかけて増殖性の強い悪性の細胞が発生してき、その増殖性がすでに阻止できない状態になってから姿をあらわすという筋書きである。この推論の妥当性は、腫瘍を発生していない膿胸後瘻痕組織中に、すでにEBウイルスによって不死化している細胞を同定することによって得られよう。

膿胸後リンパ腫におけるEBウイルス蛋白質発現様式の第二の特徴は、EBNA2が陽性であることが確実であるにもかかわらず、LMP1がフローサイトメトリーでのみわずかに認められる程度の弱陽性であるということである。前述したようにこれまでEBウイルスの腫瘍細胞での蛋白質発現様式は、3型すなわち、EBNA2、LMP1ともに陰性のもの（Latency I、パーキットリンパ腫等）、EBNA2陰性、LMP1陰性～弱陽性のもの（Latency II、上咽頭癌等）、ともに陽性のもの（Latency III、免疫不全合併リンパ腫）があるとされてきた²²。これら Latency I～III に共通して発現している蛋白質はEBNA1のみで、その他翻訳されないRNAであるEBER、*BamH I*断片A領域からの転写産物が発現している。Latency IIにおける腫瘍の発生に関して、ShimizuらはEBNA2、LMP1を発現していないパーキットリンパ腫細胞株をヌードマウスに移植し腫瘍ができることを確認し、EBNA2、LMP1非発現EBウイルスの腫瘍原性を報告している³⁶。これにより、EBNA1の腫瘍原性も示唆されたが、これについてはこのShimizuらの報告を含めいまだ直接的な証明はなされていない。一方Osatoらはアフリカ型パーキットリンパ腫においては、これらの蛋白質および転写産物に加えて、地域的な植物性環境因子（*Euphorbia triucali*）の作用³⁷、マラリア感染によるEBウイルス特異的細胞性免疫の低下³⁸、8番染色体を中心とする転座によるc-MYCの活性化³⁹などを重要視しており、これらの因子の組み合わせにより、腫瘍性増殖能が獲得されると主張している。Latency IIの上咽頭癌の発生には、中国東南部における食習慣（独特な方

法によって貯蔵された魚に発生するニトロソアミン⁴⁰⁾、特定のHLAとの高い相関⁴¹⁾が、EBウイルスに加わる因子として注目されている。近年報告されているEBウイルス関連のT細胞性リンパ腫⁴²⁾、Ki-1リンパ腫⁴³⁾、ホジキンリンパ腫⁴⁴⁾、また胃癌⁴⁵⁾なども、Latency II型の発現様式をとるがその腫瘍発生に関する有力な考察はいまのところなされていない。Latency IIIの免疫不全合併リンパ腫では、EBNA2、LMP1により不死化したB細胞の、モノ～オリゴクローナルな増殖がその主体であると考えられている。

膿胸後リンパ腫は、EBNA2が陽性であるにもかかわらず、LMP1は弱陽性であるから、この3型のどれにもあてはまらない。我々はLMP1がきわめて弱い発現量であるという事実を確かめるため、免疫染色以外にいくつかの方法をおこなったが、それらの結果はこの免疫染色の結果をうらづけるものであった。このことから、膿胸後リンパ腫では、細胞の腫瘍化に関わったのはLMP1以外のものであったとするのが考えやすい。EBNA1やEBNA2もしくはその他のウイルス蛋白質の作用、またはこれに加えて、我が国にしか報告がないことから地理的環境や生活習慣からの影響、膿胸という特定の疾患の後に発生するという状況から膿胸病変部における炎症性物質などが加わって発生してきた可能性も考えられるであろう。

膿胸後リンパ腫腫瘍細胞においてLMP1はmRNAレベルで発現抑制があることが示唆されたが、ゲノムレベルでの異常はいまのところ見つけることはできなかった。LMP1の発現抑制は前述したようにパーキットリンパ腫においては通常みられる現象である。これはプロモーター領域のメチル化による発現抑制であり⁴⁶⁾、パーキットリンパ腫ではEBNA2もこの機序で発現抑制されている。またパーキットリンパ腫由来EBウイルス陽性細胞株であるRajiでもLMP1蛋白質の発現が弱い、これはLMP1のトランスアクティベーターであるEBNA6の欠損によるものだという報告もある⁴⁷⁾。膿胸後リンパ腫においてこれらのような抑制機序が働いているのかどうかは今後確かめておく必要があろう。

膿胸後リンパ腫において、LMP1が発現抑制されている一方、EBNA2が強発現している理由および意義はいまのところ不明である。しかし膿胸後リンパ腫におけるEBNA2やLMP1その他の蛋白質の機能や発現機序を詳細に検索することによって、EBウイルスがひきおこす細胞腫瘍化の未知の経路が導かれる可能性がある。

ま と め

1. 4例の膿胸後リンパ腫について腫瘍細胞へのEBウイルス感染の有無を調べた。全例で、大部分の腫瘍細胞にEBウイルスの産生する遷延蛋白質 (EBNA2) およびRNA (EBERs) が強く発現していることを認めた。しかし、他の遷延蛋白質であるLMP1は免疫染色できわめて弱い反応しか認められなかった。
2. 4例の膿胸後リンパ腫腫瘍細胞に存在するEBウイルスは、そのterminal repeatの数が症例ごとにクローナルであることが示唆された。このことは、もともとEBウイルスが感染していた一個の細胞が母細胞となり腫瘍が増殖したことを示唆する。
3. 膿胸後リンパ腫の1例から手術的にとられた腫瘍細胞をSCIDマウスに移植することによって細胞株 (YF株) を得た。もとの腫瘍細胞とYF株は、形態、免疫学的表現型、および再構成免疫グロブリン遺伝子において一致を見、同一クローンと判断された。
4. YF株のLMP1の発現をWestern blotで検索したところ、特異的なバンドは得られなかったが、フローサイトメトリーによる検索では非常に弱い陽性反応がみられ、YF株ではごくわずかにLMP1が産生されていることが示された。
5. YF株のLMP1遺伝子を調べたところ、LMP1-mRNAはNorthern blot hybridisationでごく弱い発現を示した。一方LMP1ゲノムの制限酵素断片のパターンでは特別の異常を認めることができなかった。

謝 辞

本研究を進めるにあたり貴重なご指導を賜りました、東京大学医科学研究所病理学研究部森茂郎教授に深甚なる謝意を表します。また、EBウイルスの分子生物学的事項全般についてご指導頂きました東京医科歯科大学平井莞二教授、弘中孝史先生、症例をご提供くださいました京都大学山辺博彦助教授、天理よろづ相談所病院小橋陽一郎博士、東京警察病院野中泰延博士、プローブのご提供を頂きました山口大学高田賢蔵教授、さらに、分子生物学的手法その他多くのアドバイスをくださいました帯刀誠先生、最後の仕上げにご助力頂きました相沢繁美さんをはじめ、お世話頂きました東京大学医科学研究所病理学研究部員各氏に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) Shiobara J, Hatsukano H, Shiozawa M: Primary reticulum cell sarcoma of the lung complicating with chronic perforating tuberculous pyothorax. *Jpn J Chest Dis* 29:115-123,1970 (in Japanese)
- 2) Iuchi K, Ichimiya A, Akashi A, Mizuta T, Lee YE, Tada H, Mori T, Sawamura K, Lee YS, Furuse K, Yamamoto S, Aozasa K: Non-Hodgkin's lymphoma of the pleural cavity developing from long-standing pyothorax. *Cancer* 60:1771-1775,1987
- 3) Iuchi K, Aozasa K, Yamamoto S, Mori T, Tajima K, Minato K, Mukai K, Komatsu H, Tagaki T, Kobashi Y, Yamabe H, Shimoyama M: Non-Hodgkin's lymphoma of the pleural cavity developing from long-standing pyothorax. Summary of clinical and pathological findings in thirty-seven cases. *Jpn J Clin Oncol* 19:249-257,1989
- 4) Ibuka T, Fukayama M, Hayashi Y, Funata N, Koike M, Ikeda T, Mizutani S: Pyothorax associated pleural lymphoma -a case evolving from T cell rich lymphoid infiltration to overt B cell lymphoma in association with Epstein-Barr virus. *Cancer* 73 : 738-744,1994
- 5) 下山正徳: 免疫異常と造血器腫瘍—特に胸部原発Bリンパ腫と成人T細胞白血病の発症に及ぼす免疫異常についての考察. *Oncologia* 21 : 23-28, 1988
- 6) National Cancer Institute: The non-Hodgkin's lymphoma pathologic classification project: study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas. Summary and description of a working formulation for clinical usage. *Cancer* 49: 2112-2135, 1982
- 7) 鶴原敬三、榊徳子、小柳津直樹、森井外吉: 胸壁原発節外性悪性リンパ腫1剖検例. *癌の臨床* 33 : 1287-1293, 1987
- 8) 湊啓輔、飛内賢正、竹中武明、北原武志、近田千尋、下山正徳、向井清、渡辺昌: 胸壁/胸膜/肺原発の非ホジキンリンパ腫の6例. *臨床抄録集*: 237, 1987
- 9) 林達之、宇藤浩、野中泰延、鈴木恒道、野村武夫、笹島ゆう子、森茂郎: 結核性膿胸後、胸壁に発生した null 細胞性非ホジキンリンパ腫の1剖検例. *臨床血液* 34 : 1562-1567, 1993
- 10) 青笹克之、大沢政彦: 慢性炎症より発生するBリンパ腫—胸膜リンパ腫を中心として. *臨床血液* 31: 547-553, 1990
- 11) Aozasa K, Ohsawa M, Iuchi K, Tajima K, Komatsu H, Shimoyama M : Artificial pneumothorax as a risk factor for development of pleural lymphoma. *Jpn J Cancer Res* 84 : 55-57, 1993
- 12) Epstein MA, Achong BG, Barr YM : Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1964, i, 702-703
- 13) Kieff E, Liebowitz D: Epstein-Barr virus and its replication. *Virology*, second edition, chapter 67: Raven Press, Ltd., New York, 1990

- 14) Gaffey MJ, Weiss LM : Association of Epstein-Barr virus with human neoplasia. *Pathol Annu* 27 : 55-74, 1992
- 15) Leyvraz S, Henle W, Chahinian AP, Perlmann C, Klein G, Gordon R, Rosenblum M, Holland JF : Association of Epstein-Barr virus with thymic carcinoma. *N Engl J Med* 312:1296-1299, 1985
- 16) Lanier AP, Clift SR, Bornkamm G, Henle W, Goepfert H, Raab-Traub N : Epstein-Barr virus and malignant lymphoepithelial lesions of the salivary gland. *Arc Med Res* 50: 55-61, 1991
- 17) Shibata D, Tokunaga M, Uemura Y, Sato E, Tanaka S, Weiss LM: Association of Epstein-Barr virus with undifferentiated gastric carcinomas with intense lymphoid infiltration. *Am J Pathol* 139: 469-474, 1991
- 18) Harabuchi Y, Yamanaka N, Kataura A, Imai S, Kinoshita T, Mizuno F, Toyoro O: Epstein-Barr virus in nasal T-cell lymphomas in patients with lethal midline granuloma. *Lancet* 335:128-130, 1990
- 19) Kawa-Ha K, Ishihara S, Ninomiya T, Yumura-Yagi K, Hara J, Murayama F, Tawa A, Hirai K: CD3-negative lymphoproliferative disease of granular lymphocytes containing Epstein-Barr viral DNA. *J Clin Invest* 84:51-55, 1989
- 20) 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
- 21) Rickinson AB, Moss DJ, Allen DJ, Wallace LE, Rowe M, Epstein MA: Reactivation of Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cells by in vitro stimulation with the autologous lymphoblastoid cell line. *Int J Cancer* 27: 593-601, 1981
- 22) Rowe M, Lear AL, Croom-Carter D, Davies AH, Rickinson AB : Three pathways of Epstein-Barr virus gene activation from EBNA1-positive latency in B lymphocytes. *J Virol* 66 : 122-131, 1992
- 23) Ito T, Shiota M, Takanashi M, Hojo I, Satoh H, Matsuzawa A, Moriyama T, Watanabe T, Hirai K, Mori S: Engraftment of human non-Hodgkin's lymphoma in mice with severe combined immunodeficiency (SCID). *Cancer* 72: 2686-2694, 1993
- 24) McLean JW, Nakane PK : Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative : a new fixative for immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem* 22: 1077-1083, 1974
- 25) Hsu SM, Raine L, Fanger H: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577-580, 1981
- 26) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970

- 27) 黒木登志夫、谷口克、押村光雄: 実験医学別冊、細胞工学ハンドブック、第V章 細胞機能および蛋白の解析. 羊土社, 1992
- 28) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular Cloning, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 29) Brisco MJ, Tan LW, Orsborn AM, Morley AA: Development of a highly sensitive assay, based on the polymerase chain reaction, for rare B-lymphocyte clones in a polyclonal population. *Br.J.Haematol* 75: 163-167, 1990
- 30) Raab-Traub N, Flynn K: The structure of the termini of the Epstein-Barr virus as a marker of clonal cellular proliferation. *Cell* 47: 883-889, 1986
- 31) Sasajima Y, Yamabe H, Kobashi Y, Hirai K, Mori S: High expression of the Epstein-Barr virus latent protein EB nuclear antigen-2 on pyothorax-associated lymphomas. *Am J Pathol* 143: 1280-1285, 1993
- 32) Fukayama M, Ibuka T, Hayashi Y, Ooba T, Koike M, Mizutani S: Epstein-Barr virus in pyothorax-associated pleural lymphoma. *Am J Pathol* 143: 1044-1049, 1993
- 33) Gavioli R, Campos-Lima PO, Kurilla MG, Kieff E, Klein G, Masucci MG: Recognition of the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigens EBNA-4 and EBNA-6 by HLA-A11-restricted cytotoxic T-lymphocytes: implications for the down-regulation of HLA A11 in Burkitt's lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5862-5866, 1992
- 34) Khanna R, Burrows SR, Kurilla MG, Jacob CA, Misko IS, Sculley TB, Kieff E, Moss DJ: Localization of Epstein-Barr virus cytotoxic T cell epitopes using recombinant vaccinia: implications for vaccine development. *J Exp Med* 176: 169-176, 1992
- 35) Murray RJ, Kurilla MG, Brooks JM, Thomas WA, Rowe M, Kieff E, Rickinson AB: Identification of target antigens for the human cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus (EBV): Implications for the immune control of EBV positive malignancies. *J Exp Med* 176: 157-168, 1992
- 36) Shimizu N, Tanabe-Tochikura A, Kuroiwa Y, Takada K: Isolation of Epstein-Barr virus (EBV)-negative cell clones from the EBV-positive Burkitt's lymphoma (BL) line Akata: Malignant phenotypes of BL cells are dependent on EBV. *J Virol* 68: 6069-6073, 1994
- 37) Osato T, Mizuno F, Imai S, Aya T, Koizumi S, Kinoshita T, Tokuda K, Ito Y, Hirai N, Hirota M, Ohigashi H, Koshimizu K, Kofi-Tsekpo WM, Were JBO, Mugambi M: African Burkitt's lymphoma and an Epstein-Barr virus-enhancing plant *Euphorbia triucalli*. *Lancet* i:1257-1258, 1987
- 38) Moss DJ, Burrows SR, Castolino DJ, Kane RG, Pope JH, Rickinson AB, Alpers MP, Heywood PF: A comparison of Epstein-Barr virus-specific T-cell immunity in malaria-endemic Regions of Papua New Guinea. *Int J Cancer* 31: 727-732, 1983

- 39) Lombardi L, Newcomb EW, Dalla-Favera R : Pathogenesis of Burkitt's lymphoma: Expression of an activated c-myc oncogene causes the tumorigenic conversion of EBV-infected human B lymphoblasts. *Cell* 49: 161-170, 1987
- 40) Fong YY, Walsh EO'F: Carcinogen nitrosamines in Cantonese Salt-dried fish. *Lancet* ii: 1032,1971
- 41) Lu SJ, Day NE, Degos L, Lepage V, Wang PC, Chan SH, Simons M, McKnight B, Easton D, Zeng Y, de-The G: Linkage of a nasopharyngeal carcinoma susceptibility locus to the HLA region. *Nature* 346: 470-471,1990
- 42) Chen CL, Sadler RH, Walling DM, Su IJ, Hsieh HC, Raab-Traub N: Epstein-Barr virus (EBV) gene expression in EBV positive peripheral T-cell lymphomas. *J Virol* 67: 6303-6308, 1993
- 43) Herbst H, Dallenbach F, Hummel M, Niedobitek G, Finn T, Young LS, Rowe M, Muller-Lantzsch N, Stein H: Epstein-Barr virus DNA and latent gene products in Ki-1(CD30)-positive anaplastic large cell lymphomas. *Blood* 78: 2666-2673, 1991
- 44) Deason EM, Pallesen G, Niedobitek G, Crocker J, Brooks L, Rickinson AB, Young LS: Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease : transcriptional analysis of virus latency in the malignant cells. *J Exp Med* 177: 339-349, 1993
- 45) Rowlands DC, Ito M, Mangham DC, Reynolds G, Herbst H, Hallissey MT, Fielding JWL, Newbold KM, Jones EL, Young LS, Niedobitek G: Epstein-Barr virus and carcinoma: rare association of the virus with gastric adenocarcinoma. *Br J Cancer* 68: 1014-1019, 1993
- 46) Li-Fu H, Minarovits J, Shi-Long C, Contreras-Salazar B, Rymo L, Falk K, Klein G, Ernberg I : Variable expression of latent membrane protein in nasopharyngeal carcinoma can be related to methylation status of the Epstein-Barr virus BNLF-1 5'-flanking region. *J Virol* 65: 1558-1567,1991
- 47) Allday MJ, Crawford DH, Thomas JA: Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 6 induces expression of the EBV latent membrane protein and an activated phenotype in Raji cells. *J Gen Virol* 74: 361-369, 1993

表1 検索に用いた症例

症例	年齢および性	膿胸発症から リンパ腫発生までの年数	組織型	免疫学的表現形
1	61/M	35	DLNC	B (Igμ CD20+)
2	56/M	30	DLIB	B (Igμ CD20+)
3	68/F	29	DLIB	Null (CD20+)
4	59/M	42	DLIB	Null (CD20-) *

症例1～3：京都大学山邊博彦助教授、天理よろづ相談所病院小橋陽一郎博士より

症例4：東京警察病院野中泰延博士より

DLNC: Diffuse large non-cleaved

DLIB: Diffuse large immunoblastic type (Working Formulation[®])

*免疫グロブリン遺伝子の検索では再構成を認めた

表2 検索に用いた一次抗体

抗体名	抗原	感作動物	入手先	希釈倍率
Leu4	CD3	マウス	Becton-Dickinson	x100
Leu3a	CD4	〃	〃	〃
Leu2a	CD8	〃	〃	〃
MCS2	CD13	〃	Nichirei	〃
L26	CD20	〃	Dakopatts	〃
1F8	CD21	〃	〃	〃
LCA	CD45RA	〃	〃	〃
Leu19	CD56	〃	Becton-Dickinson	〃
抗IgM	IgM	家兎	Hoechst	x4000
抗IgA	IgA	〃	〃	〃
抗IgG	IgG	〃	〃	〃
抗IgD	IgD	〃	〃	x500

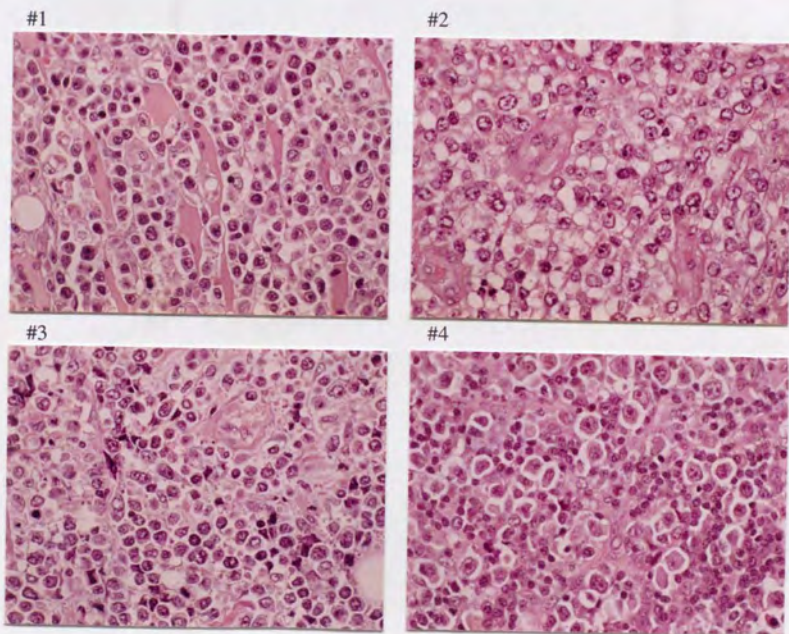
CS1-4	LMP1	マウス	Dakopatts	x100
PE2	EBNA2	〃	〃	〃
EBNA(Ab-1)	EBNA1	〃	Oncogene Science	x50

表3 症例4生検材料とYF株の表現形の比較

抗体名	抗原	おもな陽性細胞	症例4	YF株
Leu4	CD3	T細胞	-	-
Leu3a	CD4	T細胞サブセット	-	-
Leu2a	CD8	T細胞サブセット	-	-
MCS2	CD13	単球・顆粒球	-	-
L26	CD20	B細胞	-	-
1F8	CD21	〃	-	-
LCA	CD45RA	リンパ球	+	+
Leu19	CD56	NK細胞・単球	-	-
抗IgM	IgM	B細胞	-	-
抗IgA	IgA	〃	-	-
抗IgG	IgG	〃	-	-
抗IgD	IgD	〃	-	-
PE2	EBNA2	EBウイルス 感染細胞	++	++
CS1-4	LMP1	〃	-~+	-~+
EBNA(Ab-1)	EBNA1	〃	+	+

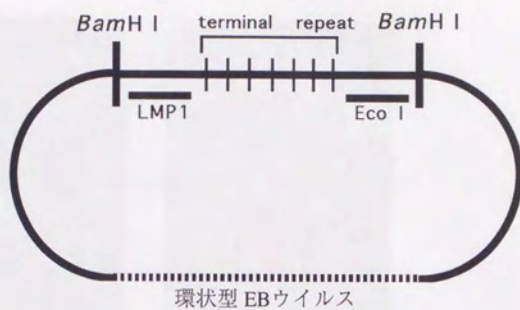
PAL症例4とYF株について免疫組織染色を行い、表現型を検討した。表のように12項目の白血球マーカーおよび3項目のEBウイルス蛋白質について、完全に一致した結果を得た。

図1 症例1~4のヘマトキシリン-エオジン染色による組織像



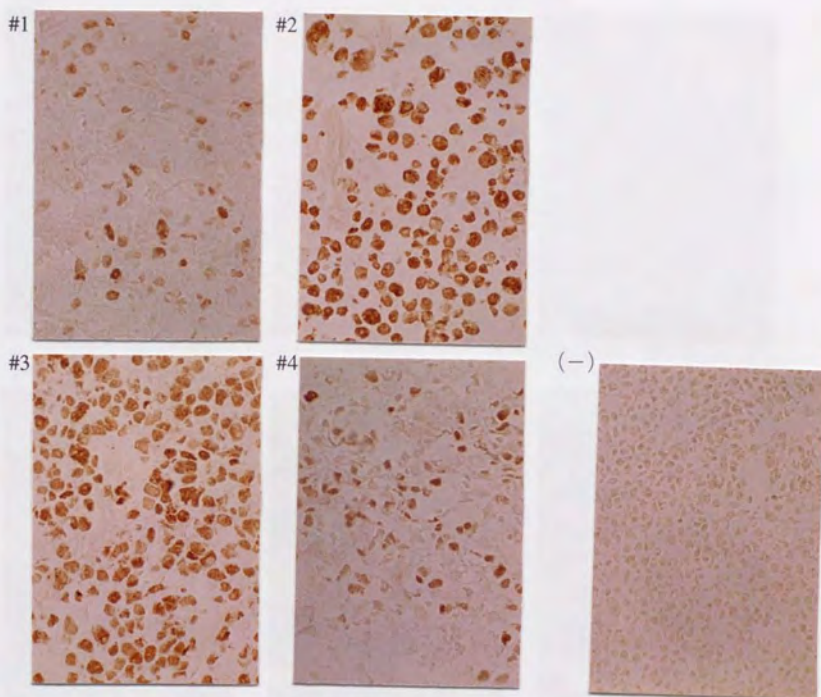
図中の番号は、表1の症例番号に対応する。

図2 EBウイルスゲノム上の
Eco I (EcoR I断片 I 領域) およびLMP1プロープの位置



Eco I (EBウイルスゲノムEcoR I断片 I 領域) : 山口大学高田賢蔵教授より
LMP1 : 東京医科歯科大学平井莞二教授より

図3 膿胸後リンパ腫におけるEBウイルス蛋白質EBNA2の発現

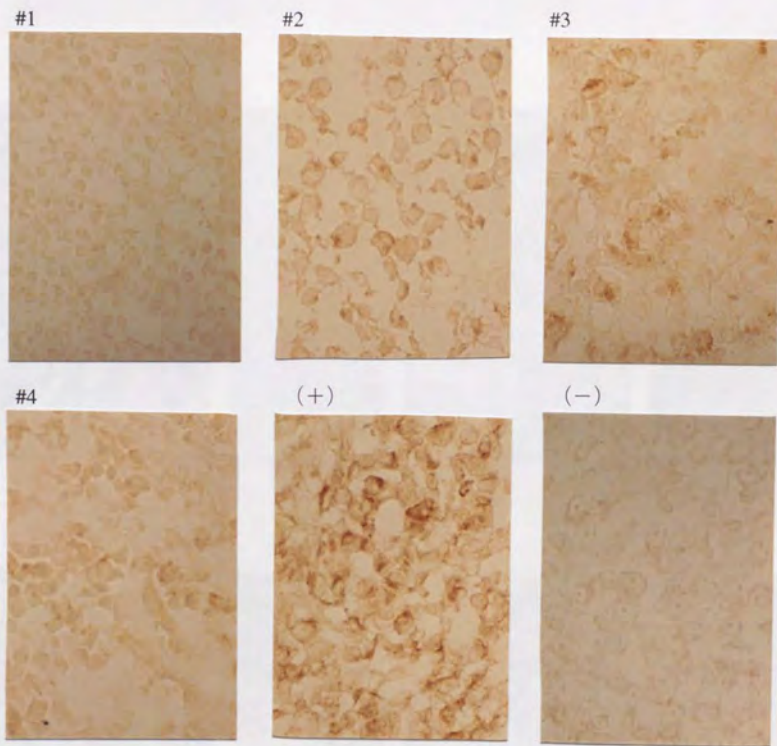


図中の番号は、表1の症例番号に対応する。

(-) は膿胸と無関係なB細胞性リンパ腫

膿胸後リンパ腫全例で多くの腫瘍細胞にEBNA2が同定されたが、
膿胸と無関係なB細胞性リンパ腫では同定されなかった。

図4 膿胸後リンパ腫におけるEBウイルス蛋白質LMP1の発現



図中の番号は、表1の症例番号に対応する。

(-) 膿胸と無関係なB細胞性リンパ腫

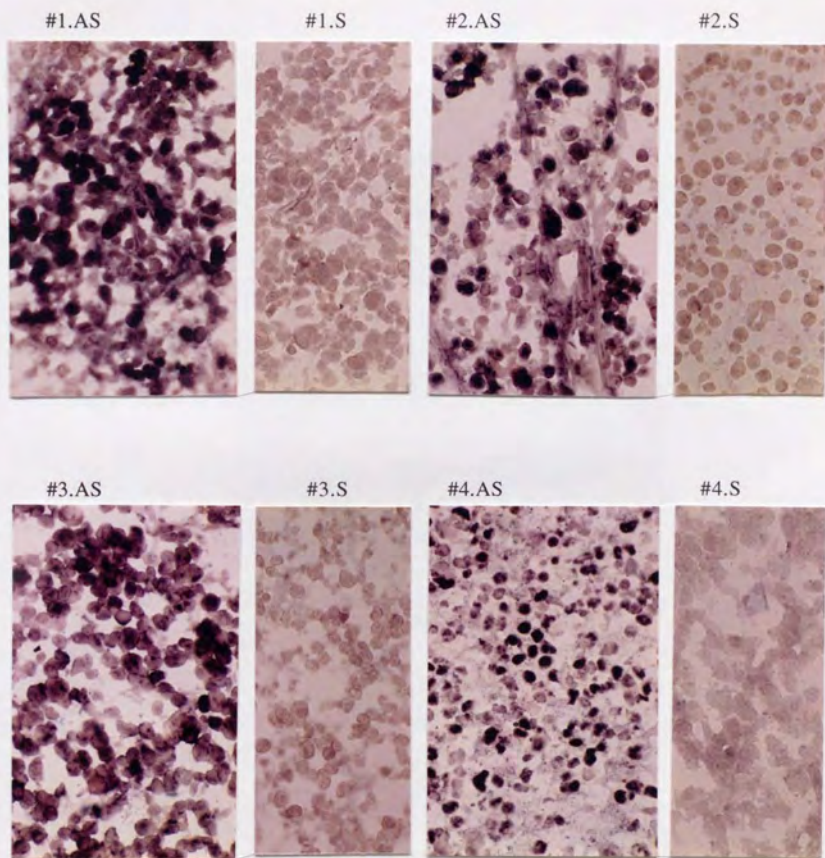
(+) EBウイルス陽性SCID腫瘍

EBウイルス陽性SCID腫瘍ではLMP1の強発現が見られたが、膿胸後リンパ腫の4例では、反応は陰性ないしごく弱い陽性(ボーダーライン)であった。

膿胸と無関係なB細胞性リンパ腫では同定されなかった。

図5 膿胸後リンパ腫における

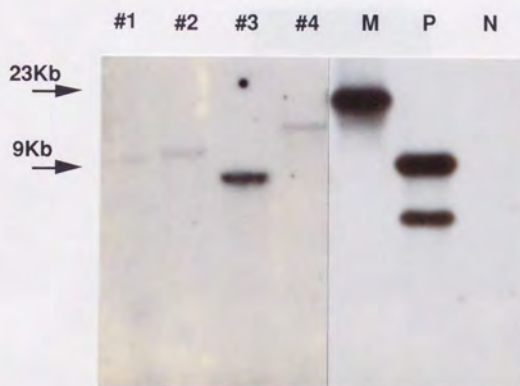
EBウイルスRNA (EBERs: EB virus encoded small RNA) の発現



図中の番号は、表1の症例番号に対応する。

4例ともに、多くの腫瘍細胞核内に強いシグナルが認められた。

図6 Southern blot hybridization によるEBウイルスのクローナリティの検索



図中の番号は表1の症例番号に対応する。

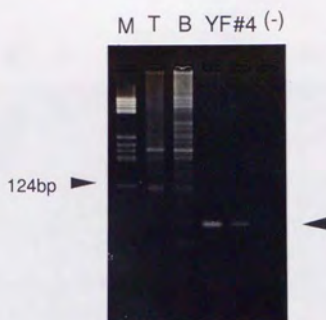
M : Raji、モノクローナルEBウイルス感染細胞株

P : P3HR1、ポリクローナルEBウイルス感染細胞株

N : TARL、ラットT細胞由来EBウイルス非感染株

膿胸後リンパ腫については全症例とも1本のバンドが検出され、ウイルスはモノクローナルであることが示唆される。

図7 PCR法による免疫グロブリン再構成遺伝子の検索



M：マーカー

T：Molt-4、ヒトT細胞由来株

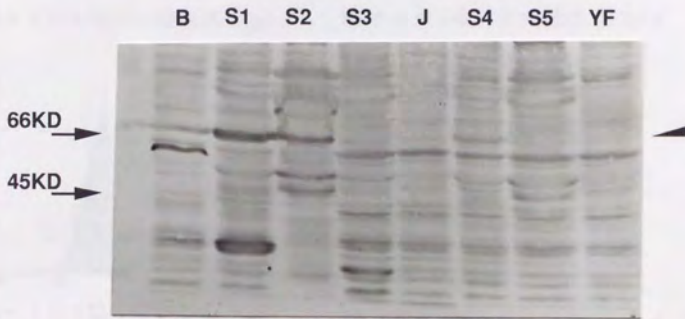
B：Raji、ヒトB細胞由来株

YF：YF株

#4：症例 4

YF株と症例 4において、同じサイズの免疫グロブリン再構成遺伝子が検出された。

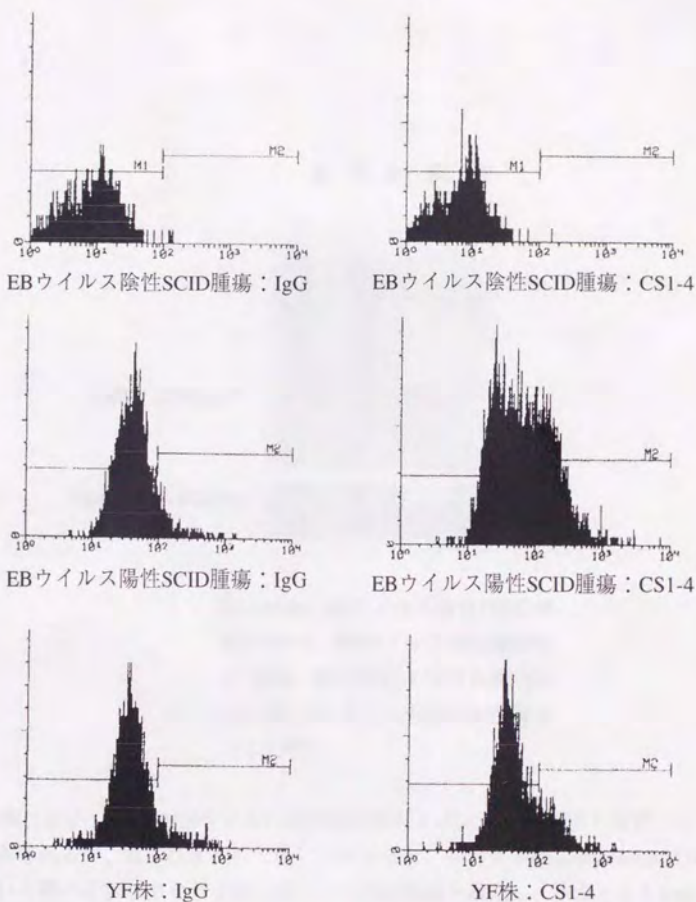
図8 YF株におけるLMP1蛋白質の発現—ウェスタンブロットによる検索



B : B95-8、EBウイルス産生細胞株
 S1～S3 : EBウイルス陽性SCID腫瘍
 J : Jurkat、EBウイルス陰性T細胞株
 S4～S5 : EBウイルス陰性SCID腫瘍
 YF : YF株

EBウイルス産生細胞株、EBウイルス陽性SCID腫瘍S1～S2で特異的シグナル（楔印）がみられ、またEBウイルス陽性SCID腫瘍S3ではその変成物と思われるバンドが検出されたが、EBウイルス陰性SCID腫瘍S4～S5およびYF株では、そのようなバンドは証明されなかった。

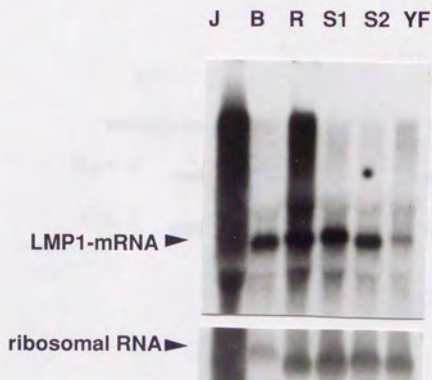
図9 YF株におけるLMP1蛋白質の発現—フローサイトメトリーによる検出



EBウイルス陽性SCID腫瘍、EBウイルス陰性SCID腫瘍およびYF株の新鮮細胞を用いてフローサイトメトリーを行った。

EBウイルス陽性SCID腫瘍では、抗LMP1抗体（CS1-4）を反応させたものは正常マウスIgGに比べて蛍光度ヒストグラムが大きく陽性に偏移し（35%）、EBウイルス陰性SCID腫瘍ではまったく偏移しなかった（0%）。YF株では偏移はわずかながらみられ（9%）、少量ではあるがLMP1が発現していることがわかる。

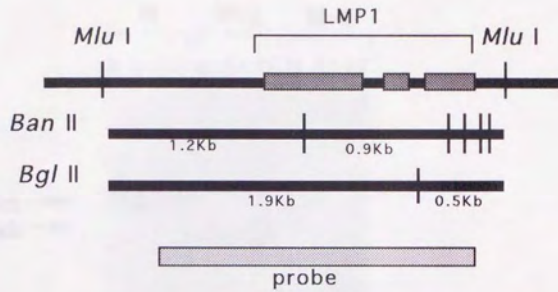
図10 Northern blot hybridizationによるLMP1-mRNAの検出



J : Jurkat、EBウイルス陰性T細胞株
B : B95-8、EBウイルス産生細胞株
R : Raji、EBウイルス陽性B細胞株
S1～S2 : EBウイルス陽性SCID腫瘍
Y : YF株

YF株において、他のEBウイルス陽性細胞株およびSCID腫瘍と同じ位置にシグナルがみられるが、強さはきわめて低レベルである。なおヒトribosomal RNAプローブを用いて再ハイブリダイズを行い各レーンのRNA量を検定し、少なくともRajiおよび他のEBウイルス陽性SCID腫瘍と同程度であることを確認した。

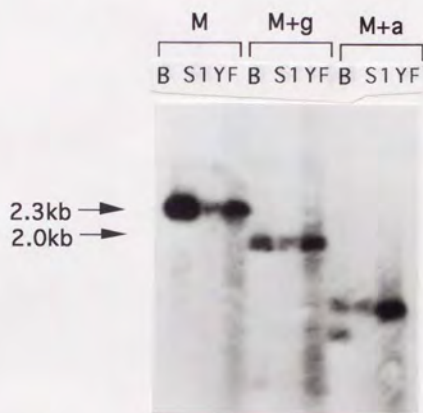
図11 LMP1遺伝子付近の構造 (B95-8)



プローブは、LMP1遺伝子の第1エクソンの一部および第2、第3エクソンを完全に含む断片（東京医科歯科大学平井莞二教授より）である。

図11 Southern blot hybridizationによるYF株LMP1遺伝子構造の解析

YF株細胞よりDNAを抽出し、適当な制限酵素で消化した各断片の長さを調べた。



B : B95-8、EBウイルス産生細胞株

S1 : EBウイルス陽性SCID腫瘍

Y : YF株

M : *Mlu* I のみで消化

M + g : *Mlu* I および *Bgl* II で消化

M + a : *Mlu* I および *Ban* II で消化

YF株のLMP1遺伝子の大きさ (*Mlu* I断片で近似した) は、EBウイルス産生細胞株、EBウイルス陽性SCID腫瘍と同じであることがわかる。YF株のLMP1遺伝子の、上記2種の制限酵素による切断パターンは、それぞれEBウイルス陽性SCID腫瘍 S1と同じであった。

しかし、B95-8とはメインの断片の大きさは同じであるにもかかわらず、他の断片が検出されなかった。

