唾液腺腫瘍内 Epstein-Barr ウィルスゲノムの検出

日本医科大学耳鼻咽喉科学教室（主任：奥田 稔教授）

平 良 晋 一，奥 田 稔

北海道大学医学部附属癌研究施設ウイルス部門

大 里 外 譽 郎

東京医科大学微生物学教室

水 野 文 雄

DETECTION OF EPSTEIN-BARR VIRUS DNA IN SALIVARY GLAND TUMORS

SHINICHI TAIRA, M.D. and MINORU OKUDA, M.D.

Department of Otorhinolaryngology, Nippon Medical School, Tokyo

TOYORO OSATO, M.D.

Department of Virology, Cancer Institute, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo

FUMIO MIZUNO, M.D.

Department of Microbiology, Tokyo Medical College, Tokyo

To evaluate the relations between salivary gland tumors and Epstein-Barr virus (EBV), the levels of EBV-related antibodies were examined, and detection of EBV nuclear antigen (EBNA) and EBVDNA in tumor tissue was attempted by the anti-complement immunofluorescence technique and polymerase chain reaction, respectively.

The mean VCA-IgG antibody level was increased to 925 (80-2560) in Warthin's tumor, 496 (40-2560) in mucoepidermoid tumor, and 206 (40-640) in pleomorphic adenoma. The positive rate of EA-IgG was high in Warthin's and mucoepidermoid tumors. VCA-IgA antibody was positive in 2 of the 7 cases of Warthin's tumor. EA-IgA antibody was negative in all cases.

EBVDNA was detected in 7 of the 7 cases of Warthin's tumor, 3 of the 5 cases of mucoepidermoid tumor, and 2 of the 26 cases of pleomorphic adenoma. A relationship between Warthin's tumor and EBV was suggested by the 100% detection rate of the viral DNA.

Key words: 唾液腺腫瘍, EB ウィルス, Polymerase Chain ReactionA 95—0860—43290

I 緒 言

Epstein-Barr ウィルス (EBV) は1964年に Epstein と Barr によってパーキットリンバ腫培養細胞中に発

見されたヘルペスウィルス科に属するウィルス¹⁾である。当初、伝染性単核症との関係は明らかではなかったが、EBV を取り扱っていた技師が伝染性単核症に罹

患したことがきっかけとなって、EBVが伝染性単核症の病原体であることが明らかとなった²⁾。それ以前から伝染性単核症は接吻によって伝染することが疫学的検索から分かっていたが、伝染性単核症の患者の唾液中にEBVが高率に検出される³⁾⁴⁾ばかりでなくEBV抗体陽性の健康人の唾液中にもかなりの率でEBVが排出される⁵⁾⁶⁾⁷⁾ことが明らかとなり、さらに伝染性単核症患者の咽頭上皮⁸⁾⁹⁾やEBV抗体陽性の健康人の耳下腺導管上皮細胞¹⁰⁾¹¹⁾にEBVDNAが検出され、咽頭口腔領域なかでも唾液腺がその持続感染の器官であると考えられている。

また、血清疫学的調査から世界中のほとんどのひとが成人になるまでに感染を受け抗体を保有していることが明らかとなっている。

他方、パーキットリンパ腫、上咽頭癌患者のEBV関連抗体価が著しく高いこと¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾また腫瘍細胞中にEBV特異的核内抗原(EBNA)¹⁵⁾¹⁶⁾およびEBVDNAが存在する¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾ことが明らかとなり、これら腫瘍との関連が強く示唆され²⁰⁾²¹⁾、ヒトの有力な腫瘍ウイルスと考えられている。

EBV感染の特徴は腫瘍原性を有するウイルスが広く世界に浸淫しておりほぼ100%の人が感染を受け感染後は生涯体内、Bリンパ球や唾液腺、に潜伏することである²²⁾。

EBVは唾液腺に持続感染し増殖しているだけでなく疾患も引き起こしていると考えられ、シェーグレン症候群との関与が強く示唆されている²³⁾²⁴⁾。今回、EBVが腫瘍ウイルスであることに着目し唾液腺腫瘍とEBVとの関連を唾液腺腫瘍患者血清中EBV関連抗体価の測定、蛍光抗体補体法による腫瘍組織中EBNAの検出およびPCR法による腫瘍組織からのEBVゲノムの検出にて検討した。

II 材料と方法

1) 対象

日本医大付属病院で手術を行った唾液腺腫瘍ならびに同時に切除した正常部位唾液腺、他の頭頸部領域の腫瘍手術時に切除した正常耳下腺およびシェーグレン症候群の生検唾液腺で、多形腺腫26例、ワルチン腫瘍7例、粘表皮腫瘍5例、腺様嚢胞癌2例、腺癌1例、シェーグレン症候群4例、正常唾液腺20例の合計65例であった。試料は採取後直ちに -80°C で凍結保存した。血清は手術前に採血し 56°C 30分で非働化し抗体を測定するまで凍結保存した。

2) 血清中EBV関連抗体価の測定

非働化血清をリン酸緩衝食塩水(PBS)で5倍から2倍階段連続希釈にて2560倍まで10段階に希釈し、VCA(Viral capsid antigen)-IgG、IgA抗体価およびEA(Early antigen)-IgG、IgA抗体価は蛍光抗体間接法で、EBNA抗体価は蛍光抗体補体法で測定した²⁵⁾。VCA抗体はP3HR-1細胞(アセトンで室温10分間固定)を、EA抗体はP3HR-1EBV導感染Raji細胞(Ara-C $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 存在下で24時間培養によりEAを20-30%発現、アセトンで室温10分間固定)を標的細胞としスライドガラス上に10カ所塗抹、段階希釈した被験血清とモイストチェンバー内で 37°C 、40分間反応させ、PBSで血清を洗い流した後、風乾し二次抗体としてFITC標識抗ヒトIgG、IgAウサギ抗体(DAKO社)をPBSで40倍希釈して 37°C 、40分間反応させた。EBNA抗体はRaji細胞(アセトン:メタノール=1:1で 4°C 5分間固定)を標的細胞として一次反応後、補体源として -80°C に保存しておいたEBV抗体陰性新鮮ヒト血清を Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 加PBSにて10倍希釈して 37°C 、15分間反応させ、PBSで洗浄、風乾後二次抗体としてFITC標識抗ヒトC3cウサギ抗体(DAKO社)をPBSで40倍希釈して 37°C 、40分間反応させた。二次反応後PBSで洗浄風乾し50%PBSグリセリン溶液で封入、蛍光顕微鏡で観察し蛍光が消失または極端に落ちる直前の血清希釈倍数をもって抗体価とした。いずれの抗体も5倍以上を陽性とした。

2) 腫瘍組織中EBNA、EA、VCAの検出

凍結保存組織から $5\mu\text{m}$ の凍結切片を作成し種々の割合のアセトン:メタノールで 4°C 5分間固定し蛍光抗体補体法で検出した²⁶⁾²⁷⁾。一次抗体として非特異蛍光の少ないEBNA抗体陽性(40倍)の新鮮ヒト血清(補体源としても使えるように採血後直ちに血清を分離し -80°C で保存)を選び Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 加PBSで5倍希釈して用いた。スライドガラスの上の標本のうえに血清を乗せモイストチェンバー内で 37°C 、40分間反応後PBSで洗浄し風乾、二次抗体にはFITC標識抗ヒトC3cウサギ抗体(DAKO社)を40倍希釈して用い 37°C 、40分間反応させた。PBSで洗浄、風乾後50%PBSグリセリン溶液で封入し特異蛍光を観察した。陰性の対照としてEBNA抗体陰性の血清を一次抗体として用いた。

また同様に蛍光抗体間接法でEA、VCAの発現をみた。 $5\mu\text{m}$ の凍結切片をアセトンで室温10分間固定し上咽頭癌患者血清(VCA-IgG抗体2560倍、EA-IgG抗体

図1 EBV DNAの構造とプライマー、プローブの塩基配列

320倍)をPBSで10倍希釈し一次抗体として用いEBNAの検出と同様の手順で行い二次抗体としてFITC標識抗ヒトIgGウサギ抗体(DAKO社)を作用させた。陰性の対照としてEA, VCA抗体陰性の血清を一次抗体として用いた。

4) PCR (Polymerase Chain Reaction) 法

① 検体の調製

-80°C保存腫瘍および正常唾液腺組織片を細切しCell lysis buffer²⁸⁾ (10mM Tris HCl pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.01% gelatin, 0.45% NP40, 0.45% Tween20, 600μg/ml proteinaseK) 1ml 中に入れ, 37°Cで1晩 incubate し溶解した。次いで95°C10分加熱し酵素を失活させた後500μl ずつエッペンドルフチューブに2分し片方はその20μlを直接PCR反応にかけ(直接法)²⁹⁾, もう一方からDNAを抽出した。5M NaClで塩濃度を400mMに調整した後, 等量のフェノール(Tris HCl pH 8.3にて飽和)を加え15分間混和後, 5分間2500gで遠心し上層の水層を別のチューブにとった。数回繰り返した後, 等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール液(25:24:1)で同様に抽出を繰り返し, 次に等量のクロロホルム/イソアミルアルコール(24:1)で抽出を行った。2.5倍量のエタノールを加え混和後, -80°Cにて15分間放置, 4°C20分間16000gで遠心し上清を捨て, ペレットをエタノールで洗い風乾した後200μlの蒸留水に溶解し

た²⁹⁾³⁰⁾。OD₂₆₀を測定しDNA量を求めその1μgをPCR反応に用いた(DNA抽出法)。

今回, 陽性対照としてはパーキットリンパ腫由来のEBV陽性Raji細胞を, 陰性対照としてはパーキットリンパ腫由来のEBV陰性BJAB細胞を用いた。

② プライマーとプローブ

使用したプライマーとプローブおよび増幅目的部位は図1のごとくでEBV DNAのIR1領域BamHIW断片の125bpであった³¹⁾。

③ 反応条件

反応液系の組成は以下の通りで100μlで反応を行った。10mM Tris HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.01% gelatin, 200pmoleのグプライマー, 200μmの各dNTP, 2.5単位のTaqポリメラーゼ(宝酒造)にtemplateとして1μgのDNAないし①で前処理した試料20μlを加えた。PCR反応はCetus社製のDNA Thermal Cyclerを用い熱変性94°C1分, アニリング反応55°C2分, 伸長反応72°C2分で30サイクル行い最後の伸長反応は6分間とした。

④ 反応産物の確認

PCR産物の10μlを2.5% NuSieveGTGアガロースゲル(PMC)-1% SeakemGTGアガロースゲル(FMC)を用いて電気泳動し, エチジウムブロマイド(EtBr: 1μg/ml)で染色してポラロイド写真を撮影した。ゲルをアルカリ処理(1.5M NaCl-0.5M NaOH

表1 血清中EBウイルス関連抗体価

組 織 型	症例数	VCA-IgG 抗体価 平均±SD(分布)	VCA-IgA 陽性率%	EA-IgG 陽性率%	EA-IgA 陽性率%	EBNA 抗体価 平均(分布)
多形腺腫	26	206±186 (40～640)	0	31	0	40 (10～80)
ワルチン腫瘍	7	925±861 (80～2560)	29	43	0	55 (10～80)
粘表皮腫瘍	5	496±487 (40～2560)	0	40	0	32 (10～40)
腺様嚢胞癌	2	170 (20～320)	0	0	0	40 (40)
腺癌	1	80	0	0	0	40
シェーグレン症候群	4	1080±1103 (160～2560)	0	75	0	ND
健康人 ²⁵⁾	1086	109 (100～180)	1.4 (0～4.5)	15 (10～30)	0	47 (20～80)

健康人は文献25)からの引用、測定に用いた蛍光顕微鏡は一、健康人の()内は年齢層別平均値の分布

にて30分間) 後ナイロンフィルター (バイオダイナ B 0.2μm, PALL 社) に vacuum transfer 装置 (バイオクラフト社) でプロット (10×SSC, 15cmHg 1 時間) した。

⑤ ハイブリダイゼーション

フィルターをハイブリダイゼーションバッグにとりハイブリダイゼーションバッファー (6×SSC, 5×Denhardt's sol., 0.5% SDS, 100μl/ml ssDNA) を入れ42°C で1時間以上プレハイブリダイゼーションを行った。プレハイブリダイゼーションバッファーを捨て新しいバッファーを入れ5' 末端標識オリゴプローブ (宝酒造 5' 末端ラベリングキットを用いて作成: oligonucleotide probe (10μm) 1μl, 10×phosphorylation buffer 1μl, γ -³²P-ATP (50μCi, 6000Ci/mmol) 5μl, T4 polynucleotide kinase 1μl, dH₂O 2μl, 37°C で30分間 incubate の後70°C 10分間で酵素を不活化) を加えて42°C で一晚ハイブリダイゼーションした。

⑥ 洗浄

2×SSC, 0.5% SDS で室温 5 分間 2 回洗浄後, 2×SSC, 0.1% SDS で42°C 5 分間 1 回洗浄, 次いで 0.1×SSC, 0.1% SDS で42°C 5 分間 1 回洗浄した。

⑦ オートラジオグラフィー

フィルターを乾かした後, サランラップで覆い X 線フィルムと共に増感スクリーンではさみ-80°C で数時間オートラジオグラフィーを行った。

1. 血清中 EBV 抗体価

EBV 関連抗体価を表1に示した。VCA-IgG 抗体価はシェーグレン症候群, ワルチン腫瘍, 粘表皮腫瘍, 多形腺腫の順に高く, 唾液腺腫瘍中最も高かったワルチン腫瘍は症例数の多かった多形腺腫に比べ有意 ($P<0.01$) に高い値を示した。VCA-IgA 抗体はワルチン腫瘍 7 例中 2 例に陽性 (5 倍, 10 倍) で他は陰性であった。EA-IgG 抗体陽性率はシェーグレン症候群で75%と高かった。EA-IgA 抗体は全例陰性であった。

2. 組織中 EBNA, EA, VCA の検出

多形腺腫の 1 例に EBNA を検出したが他では検出できなかった (図2)。

EA, VCA は全例検出できなかった。

3. PCR 法による EBVDNA の検出

直接法による PCR 産物を電気泳動した結果の一部を図3に示す。125bp のサイズの位置にバンドが検出でき, EBV 関連腫瘍とされる上咽頭癌の他, ワルチン腫瘍 2 例とシェーグレン症候群 1 例を陽性と判定した。

DNA 抽出法による PCR 産物をサザンプロットし, ³²P 標識オリゴプローブで検出したオートラジオグラフを図4に示す。

多形腺腫26例中2例, ワルチン腫瘍7例中7例, 粘表皮腫瘍5例中3例, 正常唾液腺20例中5例, シェーグレン症候群4例中2例に検出されたが, ワルチン腫瘍では他に比べ強いバンドが検出された。EBNA が検出された多形腺腫の1例ではごく弱いバンドが検出さ

図2 (A)蛍光抗体法によるEBNAの検出
(B)(A)の位相差像

れた。(図4 No.14)

IV 考 察

EBVとある腫瘍との関連を述べる場合、パーキッリンバ腫や上咽頭癌の例からみると間接的証明としてはその患者の血清中抗体価が高いこと、直接的証明としては腫瘍組織中にEBV抗原ないしEBVの核酸を検出することであるが、ほとんどの成人に潜伏感染しているウイルスとある疾患を結び付けて考えるには慎重でなければならない。特にEBVは唾液腺で増殖しているとされるため、唾液腺腫瘍にEBVが検出されてもすぐにそれが直接疾患と結び付くわけではない。

VCA-IgG抗体価は一般健康人109倍(100—170)²⁵⁾にくらべ多くの唾液腺腫瘍で高い値を示したが特にワルチン腫瘍で高かった。唾液腺腫瘍内で比較すると多形腺腫と比べワルチン腫瘍は有意に高く、EBVの活性化が示された。

上咽頭癌ではVCA-IgA, EA-IgA抗体の上昇が特徴的²⁵⁾³²⁾とされるがワルチン腫瘍2例で低値ながらVCA-IgA抗体が陽性となった。一般健康人ではVCA-IgAの出現率は1%以下であるが、他疾患でも陽性となることが知られている²⁵⁾ため、ワルチン腫瘍に特異的とは言えないが分泌抗体であるIgAが出現していることはウイルスの産生場所である咽頭領域でのEBV活性化を示唆しワルチン腫瘍上皮細胞にIgAが認められる³³⁾³⁴⁾こととあいまって興味深い所見と考えられた。

シェーグレン症候群のVCA-IgG抗体価は1080倍と高くEA-IgG抗体の陽性率は75%と非常な高値を示

図3 直接法によるPCR産物の電気泳動の結果(一部)

M: Marker; ϕ X174/Hae III digest

1: 上咽頭癌, 2, 5, 8, 11: 多形腺腫

4, 9: ワルチン腫瘍

3, 10: シェーグレン症候群唾液腺

6: 5の正常部位耳下腺, 7: 正常耳下腺

P: positive control; Raji細胞

N: negative control; BJAB細胞

した。症例数が少ないため陽性率が高いと決める訳にはいかないがシェーグレン症候群の唾液腺上皮にEA-D抗原が証明されること²³⁾からこれに対して免疫反応が起こりEA-IgG抗体の陽性率が高いと推測した。

ウイルス抗原の検出には蛍光抗体補体法が用いられるが今回は多形腺腫の1例にEBNAが検出できたのみであり多数の腫瘍でEBVDNAが検出できたPCR法の結果と矛盾する。これはEBNAが極微量しか発現されないため検出が難しい、EBNAを発現している細胞がごくわずかしかない、言い換えれば感染細胞が非常に少ない、または組織を凍結したため抗原性が失活したのいずれかあるいはそれらの複合要因によると考えられた。PCRの結果はワルチン腫瘍では強いバンドが検出されており多くの感染細胞ないし多くのゲノムをもった感染細胞の存在が示唆され、新鮮な組織ないし良好な保存状態の凍結組織を用いて抗原の検出を試みれば検出率が上昇すると思われた。

ウイルスの核酸を検出する分子生物学的な検出方法には組織からDNAを抽出して行うSouthern Blot Hybridization法(サザン法)と組織切片上で行うIn Situ Hybridization法(ISH法)があり、サザン法は感度、特異性の面で有利であり、ISH法は細胞レベルでウイルスの局在をみうる点が優れている。今回は主に感度を高める目的でPCR法で核酸を増幅してからサザン法を行った。

図4 DNA抽出法によるPCR産物のサザンプロット解析

P: Positive control; Raji細胞

N: Negative control; BJAB細胞

1-7: ワルチン腫瘍, 8-12: 粘表皮腫瘍

13-38: 多形腺腫, 39-42: シェーグレン症候群

42, 43: 腺様嚢胞癌, 45: 腺癌, 46-65: 正常耳下腺

PCR法は1985年 Saiki らによって考案された核酸増幅法³⁵⁾で1分子の遺伝子を検出できるとされるが、今回用いた実験系では2.5-5コピーのEBVDNAを検出でき³¹⁾通常のサザン法よりはるかに高感度であった。高感度であることは裏を返せばコンタミネーションの危険がつきまとう。そのため、DNA抽出法と直接法の両方で陽性のものを陽性と判定し、false positiveを除外するよう努めた。今回、直接法とDNA抽出法でPCR反応を行ったが、直接法の利点は手順が少なく簡便であること、そのためにコンタミネーションの危険が少ないことであり、DNA抽出法の利点はウイルスのコピー数を比較できる点である。

以上の方法でEBVDNAの検出を試みたところワルチン腫瘍で100% (7例中7例)、粘表皮腫瘍で60% (5例中3例)、多形腺腫8% (26例中2例)で検出できたが正常唾液腺組織でも25% (20例中5例)検出され、唾液腺でEBVが増殖しているとの報告もあり唾液腺腫瘍からEBVDNAが検出されてもすぐにそれを関連づけるわけには行かない。EBVDNAが検出できた症例のVCA-IgG抗体価は図4のワルチン腫瘍

No.1~7で各々320, 320, 1280, 2560, 640, 1280, 80倍であり抗体価の高い症例で強いバンドが検出される傾向がみられた。粘表皮腫瘍はNo.8から順に1280, 640, 320, 80, 160倍であり抗体価の高い症例に検出された。多形腺腫の2例はNo.14が320倍、No.21は80倍であり多形腺腫全体の平均抗体価206倍と比べて高いとは言えなかった。No.14はEBNAとEBVDNAが検出された唯一の症例であるが、EBNA陽性細胞は多数存在(図2)しもっと強いバンドが検出されそうである。本症例のみOCTコンパウンドに封埋した状態で凍結保存されておりPCRを阻害する物質が混入した可能性がある。以上からワルチン腫瘍および粘表皮腫瘍では抗体価とEBVDNAの検出とが密接に結びついておりなかでもワルチン腫瘍は抗体価が高く100%の症例でEBVDNAが検出されバンドも強くEBVとの関連が注目される。多形腺腫にはEBNAとEBVDNAが同時に検出された症例があるが全体としてみるとEBLDNAの検出率は低く関連は薄いと考えられた。

ワルチン腫瘍は腺管形成を示す上皮性の腺腫の部分

とリンパ濾胞を伴う豊富なリンパ球が集合している間質の部分からなる³⁶⁾。EBVとの関連が強く示唆される上咽頭癌では豊富なリンパ球の浸潤を伴っており悪性良性の違いはあるが共通性があると思われる。上咽頭癌ではEBVゲノムは上皮性の腫瘍の部分に存在する³⁷⁾のでワルチン腫瘍に存在するEBVゲノムも上皮性の腺腫の部分にあるのかそれともリンパ球に存在するのかが問題となる。

EBVはBリンパ球に感染しそれを芽球化しEBNAを発現するが、EBV抗体陽性健康人の末梢血中のリンパ球 $10^6 \sim 10^7$ 個に1個以下の割合で感染細胞が存在するとされる³⁸⁾。一般にリンパ芽球様細胞には5~10コピーのEBVDNAが存在すると言われ、今回の実験の感度からすると感染細胞が1個混入していると陽性と判定されることになる。今回の実験に用いたDNAは $1\mu\text{g}$ でおおよそ 3×10^5 個の細胞に相当しEBVDNAがリンパ球に存在すればワルチン腫瘍のリンパ組織が正常リンパ節に比べてB細胞が優位であるとは言えEBVが活性化され感染リンパ球が相当増えていないかぎり通常は検出されないことになる。また正常リンパ節からはPCR法でも検出されなかったとの報告²⁴⁾もある。

今回の実験ではかなり濃いバンドが検出されたこと、腫瘍の発生母地である唾液腺上皮にEBVが検出されることを考慮にいと上皮部分にEBVDNAが存在する可能性が高いと思われる、上皮部分にEBVが感染しているとするとトランスフォーメーションをおこしたウイルス非産生のlatentな系なのか、それとも細胞溶解型ウイルスの感染にもとづくウイルス産生のproductiveな系なのか問題となる。productiveな系だとするとウイルスを産生している細胞には数1000コピーのEBVDNAが存在することになりサザン法のバンドはもっと濃く出るはずである。腫瘍組織からEA、VCAが検出できなかったことと合わせてlatentな系と考えられる。これまでEBVは悪性腫瘍との関係が論議されてきており、EBVが感染した細胞がトランスフォーメーションをおこしさらに何らかの作用が加わって悪性化すると考えられている。増殖の場と考えられている唾液腺においても悪性腫瘍との関連の報告³⁹⁾⁴⁰⁾はある。しかし良性腫瘍との関連の報告はなく腫瘍の発生において悪性腫瘍の場合とは異なった役割をEBVが果たしている可能性もある。ワルチン腫瘍では腫瘍上皮成分直下にT・Bリンパ球、形質細胞の浸潤があり、腺腫の部分とリンパ組織の間で何

らかの免疫反応が起こっているとの報告³⁴⁾⁴¹⁾がある。腫瘍の発現するウイルス抗原に対して、リンパ組織が反応性に増殖浸潤してきたと考えることもできる。

今後、ISH法などでウイルスゲノムの局在をみると同時にサザン法でウイルスの存在様式を調べる必要があるがEBVが上皮部分、リンパ組織のいずれに存在するにしてもワルチン腫瘍の発生に強く関与している可能性が考えられた。

V ま と め

唾液腺腫瘍45例において血清抗体価、組織中EBNA、PCR法によるEBVDNAの検出等でEBVとの関連を検討した。VCA-IgG抗体価はワルチン腫瘍、粘表皮腫瘍で高く、ワルチン腫瘍ではVCA-IgA抗体が7例中2例で陽性であった。EBVDNAはワルチン腫瘍7例中7例、多形腺腫26例中2例、粘表皮腫瘍5例中3例に検出されワルチン腫瘍の発生にEBVが関与している可能性が示された。

参 考 文 献

- 1) Epstein MA, Achong BG, Barr YM: Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1: 702-703, 1964.
- 2) Henle G, Henle W: The virus as the etiologic agent of infectious mononucleosis. in Epstein MA et al (ed) *The Epstein-Barr*. Springer-Verlag, Berlin, 1979, pp 297-320.
- 3) Niederman JC, Miller G, Pearson HA et al: Infectious mononucleosis, Epstein-Barr virus shedding in saliva and oropharynx. *N Engl J Med* 294: 1355-1359, 1976.
- 4) Miller G, Niederman JC, Andrews LL: Prolonged oropharyngeal excretion of Epstein-Barr virus after infectious mononucleosis. *N Engl J Med* 288: 229-232, 1973.
- 5) Gerber P, Nonoyama M, Lucas S et al: Oral excretion of Epstein-Barr virus by healthy subjects and patients with infectious mononucleosis. *Lancet* 2: 988-89, 1972.
- 6) Morgan DG, Niederman JC, Miller G et al: Site of Epstein-Barr virus replication in the oropharynx. *Lancet* 1: 1154-1157, 1979.
- 7) 今井章介, 水野文雄, 大里外誉郎, 山中 樹, 中尾 亨 他: 健康人におけるEBウイルス口腔内排泄の長期観察. 第33回ウイルス学会抄録: 162, 1985.

- 8) Lemon SM, Hutt LM, Shaw JE et al: Replication of EBV in epithelial cells during infectious mononucleosis. *Nature* 268: 268-270, 1977.
- 9) Sixbery JW, Nedrud JG, Raab-Traub N et al: Epstein-Barr virus replications in oropharyngeal epithelial cells. *New Engl J Med* 310: 1225-1230, 1984.
- 10) Wolf H, Haus M, Wilmes E: Persistence of Epstein-Barr virus in the parotid gland. *J Virol* 51: 795-798, 1984.
- 11) Venables PJW, Teo CG, Baboonian C et al: Persistence of Epstein-Barr virus in salivary gland biopsies from healthy individuals and patients with Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 75: 359-364, 1989.
- 12) Henle G, Henle W, Clifford P et al: Antibodies to Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and control groups. *J Natl Cancer Inst* 43: 1147-1157, 1969.
- 13) Gunven P, Klein G, Henle G et al: Antibodies to EBV associated membrane and viral capsid antigens in Burkitt lymphoma patients. *Nature* 228: 1053-1056, 1970.
- 14) Henle W, Henle G, Ho HC et al: Antibodies to Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma, other head and neck neoplasms, and control groups. *J Natl Cancer Inst* 44: 225-231, 1970.
- 15) Hang DP, Ho JHC, Henle G: Demonstration of Epstein-Barr virus-associated nuclear antigen in nasopharyngeal carcinoma cells from fresh biopsies. *Int J Cancer* 14: 580-588, 1974.
- 16) Lindahl T, Klein G, Reedman BM et al: Relationship between Epstein-Barr virus (EBV) DNA and the EBV-determined nuclear antigen (EBNA) in Burkitt lymphoma biopsies and other lymphoproliferative malignancies. *Int J Cancer* 13: 764-772, 1974.
- 17) Zur Hausen H, Schulte-Holthausen H: Presence of EB virus nucleic acid homology in a "virus-free" line of Burkitt tumor cells. *Nature* 227: 245-248, 1970.
- 18) Zur Hausen H, Schulte-Holthausen H, Klein G et al: EBV DNA in biopsies of Burkitt tumors and anaplastic carcinoma of the nasopharynx. *Nature* 228: 1056-1058, 1970.
- 19) Nonoyama M, Huang CH, Pagano JS: DNA of Epstein-Barr virus detected in tissue of Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. *Proc Nat Acad Sci USA*, 70: 3265-3268, 1973.
- 20) Epstein MA, Achong BG: The relationship of the virus to Burkitt's lymphoma, in Epstein MA et al (ed) *The Epstein-Barrvirus*. Springer-Verlag, Berlin, 1979, pp 321-337.
- 21) Klein G: The relationship of the virus to nasopharyngeal carcinoma, in Epstein MA et al (ed) *The Epstein-Barr virus*. Springer-Verlag, Berlin, 1979, pp 339-350.
- 22) 小泉茂樹, 大里外替郎: EBウイルスとその感染症. *臨床と微生物* 12: 417-423, 1987.
- 23) Fox RI, Pearson G, Vaughan JH: Detection of Epstein-Barr virus-associated antigens and DNA in salivary gland biopsies from patients with Sjogren's syndrome. *J Immuno* 137: 3162-3168, 1986.
- 24) Saito I, Serenius B, Compton T et al: Detection of Epstein-Barr virus DNA by polymerase chain reaction in blood and tissue biopsies from patients with Sjogren's syndrome. *J Eep Med* 169: 2191-2198, 1989.
- 25) 今井章介, 大里外替郎: EBウイルス感染症とその診断. *臨床と微生物* 14: 19-26, 1987.
- 26) 今井章介: EBウイルス感染症の診断. *小児内科* 21: 343-348, 1989.
- 27) 水野文雄: 特集ヘルペスウイルス群感染症 EBウイルス (EBV). *日本臨床* 47: 367-371, 1989.
- 28) Higuchi R: サンプルの簡単迅速な調整法, Erlich HA 編: *PCR テクノロジー*, 宝酒造, 京都, 1990, 45-54頁.
- 29) 林 伸信: ウイルスの生検ならびに病理標本を使用しての検出. *実験医学* 8: 1063-1071, 1990.
- 30) 宇原 久, 向井 清, 佐藤雄一 他: ホルマリン固定組織からのウイルスの検出. *実験医学* 8: 1059-1062, 1990.
- 31) 薄井紀夫, 今井章介, 水野文雄, 大里外替郎, 坂井潤一 他: PCR法を用いた原田病患者髄液よりのEBウイルスDNAの検出. *眼科臨床医報* 85 3号増: 882-887, 1991.
- 32) Hadar T, Rahima M, Kahn E et al: Significance of specific Epstein-Barr virus IgA and elevated IgG antibodies to viral capsid antigens in nasopharyngeal carcinoma patients. *J Med Virology* 20: 329-339, 1986.
- 33) Korsrud FR, Brandtzaeg P: Immunohistochemical characterization of cellular immunoglobulins and epithelial marker antigens in Warthin's tumor. *Human Pathol* 77: 362-367, 1984.

- 34) 丸山 毅：耳下腺 adenolymphoma の病理組織学的研究。日耳鼻 89：66-80, 1986.
- 35) Saiki RK, Scharf S, Faloona F et al: Enzymatic amplification of β -globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 1350-1354, 1985.
- 36) 長尾孝一：耳下腺腫瘍の病理。奥田 稔, 金子敏郎編：耳下腺腫瘍 その基礎と臨床。文光堂, 東京, 1987, 8-47頁。
- 37) Wolf H, zur Hausen H, Becker V: EB viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. Nature 244: 245-247, 1973.
- 38) Rocchi G, DeFelici A, Ragona G et al: Quantitative evaluation of Epstein-Barr virus-infected mononuclear peripheral blood leukocytes in infectious mononucleosis. N Engl J Med 296: 132-134, 1977.
- 39) Saemundsen AK, Albeck H, Hansen JPH et al: Epstein-Barr Virus in nasopharyngeal and salivary gland carcinomas of Greenland eskimoos. Br J Cancer 46: 721-728, 1982.
- 40) Haug DP, Ng HK, Ho YH et al: Epstein-Barr virus (EBV)—associated undifferentiated carcinoma of the parotid gland. Histopathology 13: 509-517, 1988.
- 41) Allerga SR: Warthin's tumor. A hypersensitivity disease? Human Pathol 2: 403-420, 1971.
-
- 稿を終わるにあたり, 直接研究にご協力, ご指導いただきました北海道大学医学部附属癌研究施設ウイルス部門今井章介先生, 薄井紀夫先生に深く感謝いたします。また, 試料を提供いただきました都立駒込病院内科猪熊茂子先生にお礼申し上げます。
- 本論文の要旨は, 第34回日本唾液腺学会, 第15回日本頭頸部腫瘍学会において発表した。
-
- (1991年11月5日受稿 1992年1月7日受理)
- 別刷請求先 〒422 静岡市小鹿1-1-1
静岡済生会病院耳鼻咽喉科 平良 晋一