口腔毛状白板症における Epstein-Barr ウイルスの電子顕微鏡学的検出

——Airfuge® を用いたネガティブ染色法の応用——

杉原一正・山下佐英・Peter A Reichart*

Electron microscopic detection of Epstein-Barr virus in oral hairy leukoplakia

——Application of negative staining with Airfuge®——

Kazumasa SUGIHARA・Sukehide YAMASHITA・Peter A. REICHART*

Abstract: Oral hairy leukoplakia (HL) is a newly recognized virus-associated lesion of the oral mucosa that occurs in persons infected with human immunodeficiency virus (HIV). Recent studies have demonstrated Epstein-Barr virus in the epithelial cells of HL.

The authors examined 69 HIV-positive patients and 4 HIV-negative patients by a negative staining method using a transmission electron microscopy (TEM). For negative staining, swab specimens were taken from the lateral border of the tongue in each patient. 146 specimens were examined with TEM after Airfuge ultracentrifugation, and 24 specimens were examined without Airfuge ultracentrifugation.

Ultracentrifugation with Airfuge produced an approximately 3-fold increase in the detection of Epstein-Barr virus particles by TEM. Negative staining with Airfuge ultracentrifugation has advantages of simplicity and speediness for the clinical diagnosis of HL.

Key words: oral hairy leukoplakia (口腔毛状白板症), Epstein-Barr virus (エプシュタイン-バー
ル・ウイルス), negative staining (ネガティブ染色)

緒 言

ヒト免疫不全ウイルス (以下 HIV) 感染症患者の舌側縁に発生する毛状の白色病変は、口腔毛状白板症 (oral hairy leukoplakia, 以下 HL) と呼ばれ HIV 感染症の早期診断とその予後判定にとって非常に重要な病変である^{1~4)}。

1985年 Greenspan ら¹⁾は、HL を電子顕微鏡 (以下電顕) 学的に検索した結果、上皮細胞内および上皮細胞の間に Epstein-Barr ウイルス (以下 EB ウイルス) 粒子を観察し、HL の発症原因は EB ウイルスであると報告している。

今回、われわれは、HIV 感染症患者の HL 舌病変部および舌非病変部より擦過標本を採取し、圧縮空気による超遠心分離法を用いたネガティブ染色により EB ウイルスの電顕的検出を試みたので、その概要を報告する。

材 料 と 方 法

ベルリン自由大学歯学部口腔外科外来を受診した HIV 感染症患者69名と HIV 非感染症患者4名の計73名について、左右舌側縁の毛状白色病変部および非病変部より各1個、計146個の擦過標本を採取し、そのうち24個はただちに通常のネガティブ染色 (1%酢酸ウラン水溶液による) を行った後、EB ウイルスの電顕的検出

鹿児島大学歯学部第1口腔外科学教室

(主任: 山下佐英教授)

* Abteilung für Oralchirurgie-Nord-Freie Universität Berlin, BRD
(Leiter: Prof. Peter A. Reichart)

First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Kagoshima University Dental School
(Chief: Prof. Sukehide Yamashita)

* Department of Oral Surgery, Free University of Berlin, West Germany (Chief: Prof. Peter A. Reichart)

受付日: 平成2年3月12日

を行い、他の122個は、Airfuge® を用いて圧縮空気による超遠心分離を行った後にネガティブ染色を行い、EB ウイルスの電顕的検索を行い、臨床的に毛状の白色を呈する病変部からの EB ウイルスの検出率を算定した(図1)。

今回、われわれが実験に用いた超遠心分離機 Airfuge® は、Beckman 社製で圧縮空気を用いて超遠心分離を行うもので、最大回転数95,000回転、最大遠心力178,000 gであり、微量試料からのウイルス分離などの研究に最適とされている。今回の実験では、供給空気圧10 psig、回転数60,000回転で20分間、検体の超遠心分離を行った(写真1)。

また、一部の HL 病変については生検を行い 通法の

写真1 今回使用した Airfuge®

図1 材料と方法

ごとく光顕用と透過型電顕用試料を作製して観察した。さらに、今回のネガティブ染色で電顕的に検出されたウイルスが EB ウイルスであることを確認するために EB ウイルスの viral capsid antigen (以下 VCA) に 5 nm の金粒子を標識した抗体を用いたネガティブ染色による免疫電顕法も行った。

結 果

HL の臨床病態像は、HIV 抗体陽性患者の舌側縁の両側に発症し、皺襞状の白色病変として認められ、擦過により完全に剝離できなかった(写真2)。HL の光顕所見は、錯角化ないし過角化を伴った上皮の過形成、上皮の表面への毛状突起、バルーン状に腫大した細胞 (Koilocyte) を伴った棘細胞層の肥厚が特徴であり、上皮下結合織の炎症性細胞浸潤はわずかであった(写真3)。

HL の透過型電顕所見は、棘細胞層上部から角化層にかけて核内には EB ウイルスのヌクレオ・カプシドが認められ(写真4)、細胞質内や細胞間隙には成熟した EB ウイルスが多数観察された(写真5)。

EB ウイルスに対する VCA に 5 nm の金粒子を標

写真2 HL の臨床病態像

写真3 HL の病理組織像 (H-E 染色, ×250)

写真 4 HL の透過型電顕像

核内にみられた EB ウイルスのヌクレオ・カプシド (×10,000).

写真 6 VCA 抗体に金粒子 (5 nm) を標識した免疫電顕法によるネガティブ染色像 (×40,000).

写真 5 HL の透過型電顕像

細胞間隙にエンベロープをもった EB ウイルスが認められる (×20,000).

写真 7 Airfuge®による超遠心分離を行わなかったネガティブ染色像 (×40,000).

識した抗体を用いたネガティブ染色による免疫電顕法では、ウイルス粒子の周囲に 5 nm の金粒子の集積が認められ、本ウイルス粒子が EB ウイルスであることが確認された (写真 6)。また、Airfuge® による超遠心分離を行わなかった通常のネガティブ染色法による EB ウイルスの電顕的検索の陽性所見では、直径 100 nm の円形のヌクレオ・カプシドとその周囲のエンベロープを有する EB ウイルスが 1 視野に 1 個のみ観察された (写真 7)。一方、Airfuge® による超遠心分離を行った後にネガティブ染色を施行した症例の陽性標本では、直径 100 nm の円形のヌクレオ・カプシドとその周囲にエンベロープを有する EB ウイルスが 1 視野に多数観察された (写真 8)。

ネガティブ染色を施行した全症例について EB ウイルスの電顕的検索結果をまとめると、Airfuge®による超遠心分離を行わないで通常のネガティブ染色を施行した A 群の 24 例については、臨床的に HL 16 例を含み、そ

写真 8 Airfuge®による超遠心分離を行ったネガティブ染色像 (×40,000).

のうち EB ウイルスは 4 例 (25%) にのみ電顕的に検出され、正診率 (すなわち、臨床的に HL で電顕的にも EB ウイルスを検出できた症例と臨床的に HL を認

表 1 検索結果のまとめ

A 群: Airfuge®による超遠心分離を行わずにネガティブ染色を施行した症例

毛状白板症 (臨床的)	Epstein-Barr Virus (電顕的)	数
+	+	4
+	—	12
—	+	1
—	—	7
計		24
Epstein-Barr Virus の検出率		4/16=25.0%
正診率		11/24=45.8%

B 群: Airfuge®による超遠心分離を行ってからネガティブ染色を施行した症例

毛状白板症 (臨床的)	Epstein-Barr Virus (電顕的)	数
+	+	35
+	—	6
—	+	19
—	—	62
計		122
Epstein-Barr Virus の検出率		35/41=85.4%
正診率		97/122=79.5%

めず電顕的にも EB ウイルスを検出できなかった症例の合計数が総検査数に対して占める割合)は、45.8%であった。これに対して、Airfuge®による超遠心分離を行った後にネガティブ染色を施行した B 群の 122 例については、HL の臨床病態像を呈した 41 例を含み、そのうち EB ウイルスは 35 例 (85.4%) に電顕的に検出され、正診率は 79.5%であった (表 1)。

考 察

1984 年 Greenspan ら²⁾は、HIV に感染した男性同性愛者のグループから従来の白板症とは異なる舌側縁に発症した白色病変を初めて記載し、臨床的にも病理組織学的にも表面上皮に毛状突起が認められるので HL と命名した。

HL は、最初、男性同性愛者のみに認められたが、その後麻薬中毒患者、血友病患者、輸血患者を含む他のリスク・グループにおいても HL が発症することが報告されてきた^{3,5-8)}。

また、HL は、HIV 抗体陽性のエイズ関連病変やエイズ患者の約 30%に発症し、HIV 感染症の病期の 1 つと考えられ、HL を伴う HIV 感染症患者は、HL を伴わない患者より早期にエイズの末期症状 (カリニ肺炎や

カポシ肉腫の発現)へ移行することが判明し、リスク・グループの患者においては HL の存在がエイズの予後判定の一つの指標となりうると考えられてきた^{4,9)}。

一方、最近になって HL が、HIV 抗体陰性で白血病治療薬により免疫抑制状態にある急性骨髄性白血病患者に発症した報告⁹⁾や HIV 抗体陰性の腎移植を受け免疫抑制剤の投与を受けている患者に発症した報告¹⁰⁾が認められている。このことは、従来、HL は、HIV 感染症に特異的な病変と考えられてきたが、HIV 感染よりむしろ免疫不全状態、それ自体が EB ウイルスによる口腔粘膜の毛状白板症の発現を調節している因子であると考えられるようになってきている^{5,6)}。

HL の病理組織学的所見は、皮膚に発生する疣贅の所見と似ており、すなわち、錯角化と棘細胞層の肥厚を伴った上皮の過形成、“Koilocyte”とよばれるバルーン状に腫大した細胞の存在、核濃縮などが特徴であり、しばしば上皮細胞内にカンジダ菌が認められる¹¹⁾。

HL の透過型電顕による検索は、数多く行われており、そのほとんどの報告¹²⁻¹⁶⁾において“Koilocyte”の核内に直径 86~110 nm のヌクレオカプシドが多数認められ、細胞質内や細胞間隙には直径 110~175 nm のエンベロープをもったヘルペス・ウイルス群が観察されている。これらのヘルペス・ウイルス群は、免疫蛍光抗体法¹⁾や免疫組織化学的検索¹⁵⁾、さらに DNA hybridization による検索¹⁷⁾により EB ウイルスであることが同定された。

臨床的に HL は、舌カンジダ症との鑑別が困難であるが、HL は擦過により剝離できないこと、抗真菌剤による治療に抵抗性であること、抗ウイルス剤の投与により HL の臨床病変が改善されることなどにより鑑別されている¹⁸⁾。

HL の確定診断は、電顕のないし生化学的手法により病変の上皮細胞内に EB ウイルスを同定することによりなされる。従来のエポキシ樹脂包埋による超薄切片法を用いた透過型電顕による EB ウイルスの検出法は、試料作製過程に時間と熟練を要することなどより、臨床的検査法としては問題点が多い。その点、今回われわれが行ったネガティブ染色法による EB ウイルスの同定法は、従来のエポキシ樹脂包埋による超薄切片法に比べて手技が簡単で、しかも短時間に検査できる利点をもっている¹⁹⁾。ネガティブ染色法は、臨床ウイルス学においては確立された検査法であるが、十分量のウイルス粒子を含む試料でないと同定が困難であること、細胞破壊産物や他の細菌、ウイルスが混在するため同定は困難を有するなどの問題点を有している²⁰⁾。

これに対して、今回、われわれが用いた圧縮空気による超遠心分離法 (Airfuge®)を用いたネガティブ染色法は、超遠心分離により細胞破壊産物や他の細菌を排除でき、しかもウイルスのみを濃縮して分離できるという利

点をもっている^{21,22)}

Gelderblom ら²¹⁾は、われわれと同様の Airfuge® による超遠心分離法を培養細胞に感染させたアデノウイルスの検出に用い、従来法に比べて約 100 倍の検出率が得られたと報告している。また、Hammond ら²²⁾も臨床材料について、われわれと同様の Airfuge® を用いたネガティブ染色法によりポリオウイルス、ロタウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルスなどの検出を試み、50倍から 1,000 倍の検出率の増加が認められたと報告している。

一方、HL における EB ウイルスの電顕的検出にネガティブ染色法を応用した報告は、Reed²³⁾らの報告が認められるのみである。Reed ら²³⁾は、HIV 抗体陽性患者 12 名の舌生検材料について、エポキシ樹脂を用いた超薄切片法による EB ウイルスの検出法と生検組織の上皮表層部試料からのネガティブ染色法による EB ウイルスの検出法の比較検討を行い、12 例中 11 例において両方法とも EB ウイルスが検出できたとし、ネガティブ染色法の方が操作が簡単で短時間に行えることなどより HL の臨床診断の検査法としてより有用であると結論している。

今回のわれわれの方法と Reed ら²³⁾の方法との違いは、まず、試料採取法が Reed ら²³⁾は生検を行い、その生検組織の一部を検査に用いているのに対し、われわれの方法は、綿棒による擦過標本で十分であり患者に対する侵襲や苦痛が少ないことがあげられる。次に、Reed ら²³⁾は、遠沈法などによる分離操作を行わないで直接ネガティブ染色を施行しているのに対し、われわれは、圧縮空気による超遠心分離法 (Airfuge®) を用いた後にネガティブ染色を行って電顕的検索を行った点が違っている。

今回、われわれが報告した Airfuge® を用いて超遠心分離を行った後にネガティブ染色を施行し、EB ウイルスを電顕的に検出する方法は、綿棒による擦過標本で十分なため試料採取法が簡単であること、Airfuge® による超遠心分離とネガティブ染色法が比較的簡単に短時間に行えて、しかもより高率に EB ウイルスを検出できることなどの点より、HL の臨床診断にとって有用な検査法であると思われる。

結 語

ベルリン自由大学歯学部口腔外科外来を受診した HIV 感染症患者 69 名と HIV 非感染症患者 4 名の計 73 名について舌側縁より擦過標本 146 個を採取し、そのうち 24 個はただちに通常のネガティブ染色を行い、他の 122 個は Airfuge® を用いて圧縮空気による超遠心分離を行った後にネガティブ染色を行い、EB ウイルスの電顕的検出を試みた。その結果、Airfuge® を用いて超遠

心分離を行った後にネガティブ染色を施行し電顕で観察すると通常のネガティブ染色法より約 3 倍の高率に EB ウイルスを検出することができた。

以上のことより、今回、われわれが行った HL 病変部から綿棒による擦過標本を採取し、Airfuge® を用いて圧縮空気による超遠心分離を行った後にネガティブ染色を行い、EB ウイルスの電顕的検出を行う方法は、試料採取法が簡単であり、Airfuge® 法とネガティブ染色法が比較的簡単に短時間に行えて、しかも高率に EB ウイルスを検出できる点などから HL の臨床診断にとって有用な検査法であると思われる。

なお本研究は、西ドイツ、西ベルリン市のロバート・コッホ研究所ウイルス超微形態部にて行ったものであり、本研究に終始ご懇切なるご指導を賜りました Hans R. Gelderblom 教授に深く感謝いたします。また、ご教示、ご鞭撻を頂きました Hilmar Reupke 研究員をはじめロバート・コッホ研究所ウイルス超微形態部の各位に厚くお礼申し上げます。

本論文の要旨の一部は、第 34 回日本口腔外科学会総会 (1989 年 10 月 28 日、郡山市) において口演発表した。

引 用 文 献

- 1) Greenspan, J.S., Greenspan, D., et al.: Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral "hairy" leukoplakia, an AIDS-associated lesion. *N Engl J Med* 313: 1564-1571 1985.
- 2) Greenspan, D., Greenspan, J.S., et al.: Oral "hairy" leukoplakia in male homosexuals: evidence of association with both papillomavirus and a herpesgroup virus. *Lancet* 2: 831-834 1984.
- 3) Greenspan, D., Hollander, H., et al.: Oral hairy leukoplakia in two women, a hemophiliac, and a transfusion recipient. *Lancet* 2: 978-979 1986.
- 4) Greenspan, D., Greenspan, J.S., et al.: Replication of oral hairy leukoplakia to infection with the human immunodeficiency virus and risk of developing AIDS. *J Infect Dis* 155: 475-481 1987.
- 5) Schødt, M. and Pindborg, J.J.: AIDS and the oral cavity. Epidemiology and clinical oral manifestation of human immune deficiency virus infection: a review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 16: 1-14 1987.
- 6) 池田憲昭, 河合 幹, 他: 後天性免疫不全症候群 (AIDS) の口腔, 顔面, 頸部症状. *日口外誌* 32: 1074-1083 1986.
- 7) Reichart, P. A., Langford A., et al.: Oral hairy

- leukoplakia: observation in 95 cases and review of literature. *J Oral Pathol Med* 18: 410-415 1989.
- 8) Samaranayake, L. and Pindborg, J.J.: Hairly leukoplakia. Three quarters of patients develop AIDS in two to three years. *Br Med J* 298: 270-271 1989.
- 9) Syrjänen, S., Laine, P., et al.: Oral hairy leukoplakia is not a specific sign of HIV-infection but related to immunosuppression in general. *J Oral Pathol Med* 18: 28-31 1989.
- 10) Greenspan, D., Greenspan, J.S., et al.: Oral hairy leukoplakia in an HIV-negative renal transplant recipient. *J Oral Pathol Med* 18: 32-34 1989.
- 11) Kanas, R.J., Abrams, A.M., et al.: Oral hairy leukoplakia: A light microscopic and immunohistochemical study. *OS OM OP* 66: 334-340 1988.
- 12) Belton, C.M. and Eversole: Oral hairy leukoplakia: Ultrastructural features. *J Oral Pathol* 15: 493-499 1986.
- 13) Gross, G., Wiegand, H., et al.: Epstein-Barr-Virus-Nachweis in oraler Haariger Leukoplakie bei AIDS-Patienten, in Leukoplakien und unauffälligen Zungenepithelien HIV-1-negativer Patienten. *Z Hautkr* 63: 44-48 1988.
- 14) Kanas, R.J., Abrams, A.M., et al.: Oral hairy leukoplakia: Ultrastructural observations. *OS OM OP* 65: 333-338 1988.
- 15) Zhang, X., Langford, A., et al.: Ultrastructural and immunohistochemical findings in oral hairy leukoplakia. *Virchows Arch A* 412: 533-542 1988.
- 16) Ficarra, G., Barone, R., et al.: Oral hairy leukoplakia among HIV-positive intravenous drug abusers: A clinicopathologic and ultrastructural study. *OS OM OP* 65: 421-426 1988.
- 17) Eversole, L.R., Stone, C.E., et al.: Detection of EBV and HPV DNA sequences in oral "hairy" leukoplakia by in situ hybridization. *J Med Virol* 26: 271-277 1988.
- 18) 杉原一正, Reichart, P.A.: ヒト免疫不全ウイルス感染症患者の口腔所見について—ベルリン自由大学歯学部(北)口腔外科における373名の臨床的観察—, *口科誌* 38: 663-670 1988.
- 19) Rice, S.J. and Phillips, A.D.: Rapid preparation of faecal specimen for detection of viral particles by electron microscopy. *Med Lab Sci* 37: 371-372 1980.
- 20) Sharp, D.G.: Enumeration of virus particles by electron microscopy. *Proc Soc Exp Biol Med* 70: 54-59 1949.
- 21) Gelderblom, H.R., Reupke, H., et al.: Über den Einsatz der Airfuge in der elektronenmikroskopischen Virusdiagnostik. *GIT Fach Lab* 22: 17-19 1978.
- 22) Hammond, G.W., Hazelton, P.R., et al.: Improved detection of virus by electron microscopy after direct ultracentrifuge preparation of specimens. *J Clin Microbiol* 14: 210-221 1981.
- 23) Reed, K.D., Fowler, C.B., et al.: Ultrastructural detection of herpes-type virions by negative staining in oral hairy leukoplakia. *Am J Clin Pathol* 90: 305-308 1988.