Sjögren 症候群 (SjS) における Epstein-Barr ウイルス (EBV) の関与

—SjS における EBV 関連血清抗体価, 口腔内 EBV 排出
及び末梢血由来自律増殖 B 細胞株の EBV 産生に関する検討—

山岡 國士・宮坂 信之*・佐藤 和人*
西岡 久寿樹*・奥田 正治・山本 興太郎**

Jpn. J. Clin. Immun., 10 (3) : 254~260, 1987.

Relationship Between Sjögren's Syndrome (SS) and Epstein-Barr Virus (EBV)

Antibody to EBV, EBV Excretion from the Oropharynx and EBV Secretion
from the Spontaneously Established SS B Cell Lines

Kunio Yamaoka, Nobuyuki Miyasaka*, Kazuto Sato*,
Kusuki Nishioka*, Masaharu Okuda and Koutaro Yamamoto**

First Department of Medicine, Tokyo Medical and Dental University

** Division of Clinical Immunology, Institute of Rheumatology,
Tokyo Women's Medical College*

*** Department of Cytogenetics, Institute of Medical Science,
Tokyo Medical and Dental University*

【Summary】

Sjögren's syndrome (SS), an autoimmune exocrinopathy, is characterized by polyclonal B cell activation and association of monoclonal B cell lymphoma. We therefore studied possible involvement of EBV in the pathogenesis of SS. EBV is known to be a polyclonal B cell activator and an oncogenic virus. The titer of serum antibody of IgG class against viral capsid antigen (VCA) was significantly elevated in SS sera. Serum anti-VCA antibody of IgM class was also significantly increased in titer in SS. Ten out of 37 SS sera had titers of both IgG and IgM anti-VCA antibodies suggesting reactivation of EBV *in vivo*. These cases had significantly enhanced level of serum IgG compared to SS patients without reactivation. Excretion of EBV from the oropharynx was frequently observed in SS (86%) compared to normal controls (33%). SS patients with increased anti-VCA antibody in the sera tended to be EBV excretors. Furthermore, we have successfully established B cell lines from the

東京医科歯科大学第1内科 * 東京女子医科大学リウマチ痛風センター臨床免疫部門

** 東京医科歯科大学難治疾患研究所細胞遺伝部門 (62・4・24 受付)

peripheral blood of SS patients but not from normal controls, when peripheral blood mononuclear cells were cultured without stimulation. These cell lines not only expressed EBV nuclear antigen (EBNA) but also excreted large amount of EBV in the culture.

These data might suggest possible involvement of EBV in the pathogenesis of SS.

Key words : Sjögren's syndrome,
Epstein-Barr virus,
EBV-related antibody,
oropharynx excretion,
tumorigenicity

I. はじめに

自己免疫疾患である Sjögren 症候群 (SjS) は乾燥症状及び反復性唾液腺腫脹を主徴とする。血清免疫学的にはポリクローナルな B 細胞の活性化に伴い、高ガンマグロブリン血症や豊富な自己抗体の産生が認められる。また本症では正常人の約 40 倍の頻度で悪性腫瘍、ことに B 細胞リンパ腫を発症することも知られている。

Epstein-Barr ウイルス (EBV) はヒトの咽頭粘膜及び唾液腺に常在するウイルスであり、その感染率は日本人成人ではほぼ 100% に達するといわれる。また EBV は B 細胞に選択的に感染してポリクローナルな活性化を起こす、いわゆる polyclonal B cell activator として知られる。さらに EBV は腫瘍原性を有しており、日和見リンパ腫 (opportunistic lymphoma) の中には EB ウイルスゲノム陽性のものが多数みられる。

我々は SjS におけるポリクローナルな B 細胞活性化機構を解析する目的で、同一症例において EBV 関連血清抗体価及び口腔内 EBV 排出を検討すると共に、末梢血リンパ球から spontaneous に樹立された B 細胞株の EBV 産生についても検討を行なった。

II. 対象と方法

1. 対象

厚生省 SjS 診断基準を満たす SjS 37 例、うち primary SjS 20 例、secondary SjS 17 例を対象とした。primary SjS については glandular form 16 例、extraglandular form 4 例の population であった。secondary SjS については MCTD 合併 5 例、SLE 合併 5 例、PSS 合併 4 例、PM/DM 合併 2 例、RA 合併 1 例、の内訳であった。

SjS 症例は全例女性、平均年齢は 45 歳であり、ステロイド剤を 10 mg/day 以上服用しているものは対象から除外した。なお対照は、SjS を認めない idiopathic hypergammaglobulinemia 6 例、及び建常成人 15 例を用

いた。

2. EBV 関連血清抗体価

被検血清を PBS にて 10 倍から 2 段階希釈し指示細胞と反応させ、陽性と判定される最大希釈倍数をもって血清抗体価とした。VCA-IgG, IgM 抗体はアセトン固定 P3HR-1 細胞を指示細胞として用い、蛍光抗体間接法により測定した。抗 VCA 抗体は 10 倍以上を陽性とした。抗 EBV nuclear antigen (EBNA) 抗体の測定には Raji 細胞をアセトン：メタノール=2：1 にて固定したものを用い、蛍光抗体補体法により測定した。

3. 咽頭うがい液の採取

咽頭うがい液は 10% FCS 加 RPMI 1640 培地 10 ml にて 10 秒間行ない、700 g, 10 分間遠心後 0.45 μ m Milipore filter にて濾過除菌後 -70°C に保存した。

4. EBV の検出

EBV の検出は以下の方法によった。新鮮臍帯血より比重遠心法により分離した臍帯リンパ球 3×10^6 個に咽頭うがい液 1 ml を添加し、37°C 温浴中で 2 時間振盪接種。2 回洗浄後、20% FCS 加 RPMI 1640 培地 1 ml に再浮遊し、Falcon 2001 チューブにて 37°C, 5% CO₂ インキュベーター内で培養した。

なお、以下の系は全例 triplicate にて施行し、継時的に半量ずつ培地交換を行ないながら 10 週間観察し、芽球株の樹立及び芽球株の EBNA 陽性の有無により判定した。また 3 本のうち 1 本でも transformation のみられたものを陽性とした。陽性対照としては、B 95-8 株 EBV 10⁻⁵ 希釈液を用い、これにより transformation のみられない臍帯リンパ球による結果は破棄し、再度検索を試みた。

図 1 Measurement of serum IgG anti-body titer against viral capsid antigen

▲ : primary SS
■ : secondary SS
□ : normal control

図 2 Measurement of serum IgM anti-body titer against viral capsid antigen

▲ : primary SS
■ : secondary SS
□ : normal control

5. 末梢血単核球分画 (PBMC) からの B 細胞株の樹立

PBMC を 20% FCS 加 RPMI 1640 に再浮遊後, 5×10^4 個ずつ 96 穴組織培養プレートに分注, 適宜, 培地を一部交換することにより長期培養を行なった. なおこの間, growth factor や feeder cell は一切, 培地内に添加しなかった. 培養開始 14 日以降, 増殖してきた細胞をさらに 24 穴培養プレート, 次いで培養フラスコに移して細胞株を樹立した.

6. 長期培養 B 細胞株の EBV 産生

各種長期培養 B 細胞株 ($1 \times 10^6/\text{ml}$) を 10% FCS 加 RPMI 1640 培地にて 7 日間培養後, $1,500 \text{ g}$ 10 分間遠心し培養上清を得た.

培養上清中の EBV の検索は上記 4. の方法により行なった.

7. 統計学的処理

Wilcoxon's rank sum test を用いた.

III. 結 果

1. EBV 関連血清抗体価

VCA-IgG 抗体価 (図 1) については primary SjS では平均 560 倍 ($p < 0.01$), secondary SjS においては, 平均 1,235 倍 ($p < 0.01$), SjS 全体では平均 335 倍 ($p < 0.01$) と, それぞれ健常人平均 144 倍に比し有意な高値が認められた.

また VCA-IgM 抗体価 (図 2) についてもその傾向は同様であり, primary SjS 286 倍 ($p < 0.01$), secondary SjS 平均 135 倍 ($p < 0.01$), SjS 全体では平均 216 倍 ($p < 0.01$) 何れも健常人平均 < 10 倍に比し有意な統計学的差異を認めた.

また対象症例中, ステロイド剤投与群と非投与群間における VCA-IgG, IgM 抗体価の検討においては何ら有意差を認めなかった. なお idiopathic hypergammaglobulinemia においては, VCA-IgG 抗体価平均 120 倍, VCA-IgM 抗体価平均 < 10 倍と健常人との間には全く有意差を認め得なかった ($p > 0.05$).

2. SjS における潜在 EBV の再活性化

SjS では経過中, 反復する急性の唾液腺腫脹がみられることが多く, その一因として潜在 EBV の存在が推測される. そこで潜在 EBV の再活性化の有無を検討する目的で, 各症例の VCA-IgG, IgM 抗体価について比較検討を行なった. その結果 SjS では EBV 既感染 (VCA-IgG 抗体価 10 倍以上) でありながら, VCA-IgM 抗体価が高値を示す症例が 10 例見出された (表 1). つまりこれらは *in vivo* における潜在 EBV の再活性化が示唆されるものである. またこれら 10 症例の臨床的特徴を検討してみると再活性化の疑われる群では平均血清 IgG 値 $3,047 \pm 1,329 \text{ mg/dl}$ と, 再活性化の示唆されない群 ($1,940 \pm 968 \text{ mg/dl}$) に対して有意の高値を認めた ($p < 0.05$) (図 3). さらに 1 例ではあるが, 血清学的に EBV の再活性化の認められた時期に一致して著明な唾

表 1 The profile of EBV seropositive patients showing positive anti-VCA antibody in both IgG and IgM class

CASE	anti VCA-IgG Ab	anti VCA-IgM Ab
1. SS	× 160	× 320
2. SS	80	2,560
3. SS	320	320
4. SS	160	160
5. SS	2,560	160
6. SS	640	80
7. SS	160	80
8. SS+SLE	320	640
9. SS+PSS	1,280	40
10. SS+RA	2,560	640

液腺腫脹の観察された症例を経験し、EBV の再活性化は SjS の病変局所である唾液腺内で起こっている可能性が推測された。

3. 口腔内 EBV 排出

口腔内うがい液を新鮮臍帯血リンパ球に接種した結果、SjS 29 例中 25 例の 86% の芽球化率を認めた。これに対して、調べ得た限りの健康人では 9 例中 3 例、33% の芽球化率を認めたことより、SjS において有意の口腔内 EBV 排出が推測された (図 4)。

また口腔内 EBV 排出と血清抗体価との関連性を検討したところ、VCA-IgG 抗体価の高い症例ほど高率な口腔内 EBV の排出が認められた (図 5)。また口腔内 EBV による臍帯血の transformation に要した日数も SjS では 14 日前後が圧倒的に多く、健康群での 5~6 週に比べ排出ウイルス量も多量であることが推測された。

4. SjS 末梢血リンパ球より得られた自律増殖 B 細胞株の産生する EBV について

SjS 末梢血リンパ球 (5×10^4 個) を 96 穴組織培養プレートにて培養後、樹立された自律増殖 B 細胞株は、対象症例中より 6 株が得られた。これら細胞株は EBNA 陽性で、核型は女性型正常染色体であった。しかも培養上清中には EBV を産生していることが臍帯血リンパ球を用いた感染実験により確認された。また我々の調べ得た限りでは、RA 由来自律増殖 B 細胞株、EBV にて形質転換された正常人由来 B 細胞株の何れにおいても EBV 産生の認められた細胞株は見出されなかった。

IV. 考 案

SjS は、臨床的には外分泌腺臓器の慢性炎症をもたら

図 3 Comparison of serum IgG level between patients with or without reactivation

し、血清免疫学的には polyclonal な B 細胞活性化に伴う豊富な自己抗体の産生が認められる。我々の現在までの検討からは、SjS 末梢血 B 細胞は *in vitro* において抗イムノグロブリン (Ig) 抗体などの刺激を必要とせず、B 細胞刺激因子 (BSF) 単独刺激により有意かつ過剰な IgG 産生を認めている¹⁾。このことより、SjS B 細胞は *in vivo* においてすでに何らかの刺激を受けて活性化されており、分化準備状態にあることが推測される。さらに我々の EBV 特異的 suppressor T (Ts) 細胞機能の検討からは、EBV により誘導される B 細胞コロニー形成に対する Ts 細胞の抑制能は明らかに低下していた²⁾。以上より、SjS におけるポリクローナルな B 細胞活性化は、EBV 排除能の低下及び BSF 過剰反応性が関連していることが推測される。しかも今回の我々の検討からは、SjS における有意な EBV 関連血清抗体価の上昇、*in vivo* における潜在 EBV の再活性化、高率な口腔内 EBV 排出頻度の検出などの所見が得られたのみならず、SjS 末梢血リンパ球は、無刺激下にもかかわらず高率な自律増殖能を有しており³⁾、樹立された B 細胞株からは培養上清中に多量の EBV が産生されていた。以上の結果は、SjS における B 細胞の活性化に EBV が深く関与していることを示唆するものであると思われる。

SjS は健康人の約 40 倍の頻度で悪性 B 細胞腫瘍が併発することが知られており、この点に関しても oncogenic virus として知られる EBV の反復感染が何らかの影響を及ぼしている可能性が否定出来ない。EBV は伝染性単核球症 (IM) の病因であるばかりではなく、Burkitt リンパ腫 (BL) や上咽頭癌 (NPC)、日和見リンパ腫な

図4 Positivity of EBV excretion from the oropharynx

どの悪性腫瘍との強い関連性が知られている。これらの腫瘍発生のメカニズムとしては、染色体転座により *myc* oncogene の 12, 13, 36 免疫グロブリン遺伝子近傍への juxtaposition が起こり^{11,12)}、その結果当該細胞の正常な増殖、分化機構の変調がもたらされ、腫瘍化に発展することが推測されている¹²⁾。

SjS におけるウイルスの関与については、Cytomegalovirus (CMV), Mumps virus (MV) などにおいて検討が行われてきた。Shillitoe ら⁴⁾の報告では血清 MV 抗体価についての健康人群との有意差は認められなかったものの、CMV については CMV-IgG 抗体価は健康群の 2 倍、CMV-IgM 抗体価については 3 倍の高値が観察され、その病因に果たす影響が論じられている。しかし Venables ら⁵⁾は相反する結果を報告しており、CMV に関しては SjS, 健康人との間に有意差を認めないとしている。これらの違いは対象症例の sampling の相違に基づくものと思われるが、CMV と SjS の因果関係については不明といわざるを得ない。

一方、EBV との関連性が以前より指摘されている RA においては、循環血中の EBV 感染 B 細胞が高頻度に認められることが報告されている¹⁴⁾。患者咽頭うがい液からは、高率な EBV 排出頻度が観察されているが⁶⁾、これには異論も存在する¹⁶⁾。さらにまた Alspaugh ら¹⁷⁾は RA 滑膜内には EBV ウイルスゲノムの発現はみられないとしている。最近では、RA 関節滑膜には EBNA-1 の epitope を認識するモノクローナル抗体と強く反応する抗原の存在が明らかにされたが、これもグリシン-アラニン残基部分に基づく交叉反応であることが報告されている¹⁵⁾。

これに対して、一般に免疫不全症全般においては、口腔内 EBV 排出頻度の増加することが知られている¹³⁾。そしてこれら免疫不全状態における EBV 排出機構の欠陥は、EBV 感染後に誘導される EBV 特異的 Ts 細胞機能不全に基づくものとされている。通常、seropositive な健康人では *in vitro* で EBV 再感染を起こさせると、約

図5 Relationship between anti-VCA antibody of IgG class and EBV excretion from the oropharynx

10~12 日後に Ts 細胞の活性化、誘導が起こり、それまでの polyclonal B cell activation は次第に終局化する⁷⁾。またこれらの終焉に関しては Ts 細胞のみならず NK 活性、Lymphokine activated Killer (LAK) 活性も複雑多岐に関与していることも指摘されている⁸⁾。

SjS ではすでに述べたごとく、EB 特異的 Ts 細胞の機能不全が我々の検討より明らかとなっている²⁾。また最近では suppressor-inducer 細胞と考えられる $T4^+ 2H4^+$ 細胞の量的減少を我々は明らかにしており⁹⁾、また NK 細胞数に関しては正常者と有意差がないにもかかわらず、その NK 活性は著明に低下していることも認めている¹⁰⁾。またごく最近では、SjS 患者末梢血より得られた B 細胞株は多様なリンフォカインを産生することも報告している³⁾。

最後に SjS での免疫制御機構の異常における EBV の関与を図 6 に示してみた。すなわち我々の推測では、EBV は唾液腺内に潜在しており、唾液腺の慢性炎症を引き起こす可能性が考慮される。そして EBV 特異的 Ts

図 6 Possible involvement of EBV in disordered immunoregulation in SS

細胞の機能低下により周期的に EBV は再活性化され、循環 B 細胞に感染し B 細胞の活性化が起こる。また、このような B 細胞の活性化により、B 細胞の BSF に対する反応性は亢進する。また活性化された B 細胞はさらに多様なリンフォカインを産生して異常な免疫制御機構をさらに破綻させることも考慮される。さらにこれらの過程が反復されることにより、一部の B 細胞における悪性化がスイッチされる可能性も想像される。これは現時

点では、我々の実験結果より演繹した推論であるが、今後、さらに追究を重ねることにより、SjS における EBV の関与について明らかにしたい。

謝辞：本実験遂行に関し、臍帯血を御供与いただいた聖路加国際病院産婦人科、神津 弘先生に深謝いたします。本研究の一部は厚生省自己免疫疾患調査研究費及び文部省科学研究費によった。

文 献

- 1) 山岡國士・宮坂信之・佐藤和人・他2名：Sjögren 症候群患者末梢血 B 細胞の B 細胞刺激因子 (BSF) に対する反応性の検討。日臨免誌, 10 (1) : 24~30, 1986.
- 2) 村田英雄・川村順子・高木秀二・他4名：EBV に対するシェーグレン症候群患者の免疫能の検討。第34回日本アレルギー学会総会抄録集。
- 3) 山岡國士・宮坂信之・佐藤和人・他2名：Sjögren 症候群末梢血より樹立された B 細胞株に関する検討。アレルギー, 35 (7) : 481~484, 1986.
- 4) Shillitoe, E.J., Daniels, T.E., Whitcher, J.P., Strand, C.V., Talal, N., Greenspan, J.S. : Antibody to cytomegalovirus in patients with Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum., 25 (3) : 260~265, 1986.
- 5) Venables, P.J.W., Ross, M.G.R., Charles, P.J., Melsom, R.D., Griffiths, P.D., Maini, R.N. : A seroepidemiological study of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in rheumatoid arthritis and sicca syndrome. Ann. Rheum. Dis., 44 : 742~746, 1985.
- 6) Aitchison, C.T., Wilson, G.L., Ferrell, P.B., Tan, E.M. : Frequency of transforming Epstein Barr virus in oropharyngeal secretions of rheumatoid arthritis. Intervirology, 19 : 135~143, 1983.
- 7) Tosato, G., Magrath, I.T., Blaese, R.M. : T cell mediated immunoregulation of Epstein Barr virus (EBV) induced B Lymphocyte activation in EBV-seropositive and EBV seronega-

- tive individuals. *J. Immunol.*, 128 (2) : 575~579, 1982.
- 8) McChesney, M.B., Bankhurst, A.D. : Cytotoxic mechanism in vitro against Epstein Barr virus infected lymphoblastoid cell lines in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 45 : 546~552, 1986.
 - 9) 佐藤和人・宮坂信之・山岡國士・他2名 : SLE およびシェーグレン症候群における二重蛍光染色法を用いた FACS によるリンパ球表面抗原の検討. *臨床免疫*, 1986. (印刷中)
 - 10) Miyasaka, N., Seaman, W., Bakshi, A., Sauvezie, B., Strand, V., Pope, R., Talal, N. : Natural killing activity in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.*, 26 : 954~960, 1983.
 - 11) Torsteinsdottir, S., Masucci, M.G., Ehlin-Henriksson, B., Brautbar, C., Bassat, H.B., Klein, G., Klein, E. : Differentiation dependent sensitivity of human B-cell-derived lines to major histocompatibility complex-restricted T-cell cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83 : 5620~5624, 1986.
 - 12) Klein, G., Klein, E. : Myc/Ig juxtaposition by chromosomal translocations : some new insights, puzzles and paradoxes. *Immunol. Today*, 6 : 208~215, 1985.
 - 13) 中尾 享・山中 樹・高柳直己・今井章介 : 原発性免疫不全症例および単クローン性悪性リンパ腫患者よりの EBV 排泄パターン. 厚生省特定疾患免疫不全症候群調査研究班 昭和 59 年度研究報告書, pp. 134~135.
 - 14) Tosato, G., Steinberg, A.D., Yarchoan, R., Heliman, C.A., Pike, S.E., Deseau, V., Blaese, R.M. : Abnormally elevated frequency of Epstein-Barr virus infected B cells in the blood of patients with rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.*, 73 : 1789~1795, 1984.
 - 15) Fox, R., Sportsman, R., Rhodes, G., Luka, J., Pearson, G., Vaughan, J. : Rheumatoid arthritis synovial membrane contains a 62,000-molecular-weight protein that shares an antigenic epitope with Epstein-Barr virus encoded associated nuclear antigen. *J. Clin. Invest.*, 77 : 1539~1547, 1986.
 - 16) Yao, Q.Y., Rickinson, A.B., Gatson, J.S.H., Epstein, M.A. : Disturbance of the Epstein-Barr virus host balance in rheumatoid arthritis patient : a quantitative study. *Clin. exp. Immunol.*, 64 : 302~310, 1986.
 - 17) Alspaugh, M.A., Shoji, H., Nonoyama, M. : A search for rheumatoid arthritis associated nuclear antigen and Epstein-Barr virus specific antigens or genomes in tissues and cells from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 26 : 712~720, 1983.