悪性リンパ腫における EB ウイルスの発現

徳永 正義, 山元 紀子, 植村 芳子, 伊藤 哲彦,
濱崎 泰弘, 有川 順康

鹿児島市立病院病理研究検査室

Expression of Epstein-Barr virus in malignant lymphoma

Masayoshi Tokunaga, Noriko Yamamoto, Yoshiko Uemura, Tetsuhiko Itoh,
Yasuhiro Hamasaki, Jyunko Arikawa

Department of Pathology, Kagoshima City Hospital

In this report, we investigated 73 cases of Hodgkin's disease (HD) and 752 consecutive cases of non-Hodgkin's lymphoma (NHL) to demonstrate EBV in the tumor cells by EBER in situ hybridization. For EBV positive cases, expression of EBNA1, EBNA2, LMP1 and P53 gene products were examined immunohistochemically, EBV-serology and prognostic data were also analyzed. EBV was detected in 48 (65.8%) of Hodgkin's disease in the tumor cells. EBV-positive HD showed expression of LMP1 and episomal monoclonality in all 5 cases examined. Among NHL, EBV was detected in 44 (12.0%) of 368 cases with ATL, 36 (31.6%) of 114 cases with T-ML, 18 (6.8%) of 263 cases with B-ML and none of 7 other types ($p < 0.00001$). High prevalent expression of LMP1 (66%) and P53 gene products (80%) and low prevalent expression of EBNA1 and EBNA2 were observed in EBV-positive NHL cases with similar distribution of EBER ISH sporadic and diffuse positive cases. Episomal clonality of EBV were demonstrated in some cases examined. Elevated antibody titer particularly IgA antibodies against VCA and EA, and poor prognosis of EBV positive cases were observed.

Key words : EBER in situ hybridization, malignant lymphoma, EBV

はじめに

EB ウイルス (EBV) は種々の悪性リンパ腫と関連していることが知られている。B 細胞リンパ腫では Burkitt リンパ腫のほかに免疫不全状態を背景に発生するリンパ腫や腫瘍後リンパ腫があり、T 細胞リンパ腫では慢性活動性 EBV 感染症に続発するもの、

免疫不全状態を背景に発生するもの、鼻腔に見られる Natural Killer (NK) 型の症例の他に Angioblastic lymphadenopathy (AILD) 型のリンパ腫や血管中心性のリンパ腫、また Adult T-cell leukemia (ATL) においても腫瘍細胞内に EBV を確認したとする報告がある^{1)~6)}。

本研究は ATL 多発地域という特殊事情はある

Table 1 EBV-positive Hodgkin's disease by Subtype

Histological Type	EBV+/Total (%)
Lymphocytic Predominance	6/15 (40.0)
Mixed Cellularity	17/21 (81.0)
Lymphocytic Depletion	4/7 (57.1)
Nodular Sclerosis	12/21 (57.1)
Composite with NHL	9/9 (100.0)
Total	48/73 (65.8)

が、T細胞性リンパ腫(T-ML)の多い鹿児島県の悪性リンパ腫症例においてEBV陽性症例を明らかにし、それらの症例の特性について検討した。

対象および方法

症例はHodgkin病73例と非Hodgkinリンパ腫752例で、paraffin標本を用いEBV encoded small RNA (EBER) in situ hybridization (ISH)を施行した。陽性症例では免疫染色との2重染色で腫瘍細胞内のEBVを確認した。さらに、Latent membrane protein 1 (LMP1), EB nuclear antigen 1,2 (EBNA1,2), P53の発現を免疫染色にて検討した。また、凍結保存標本から抽出したDNAを用いsouthern blot analysisや、抗体価測定、予後調査を実施して比較検討した。

結 果

1. Hodgkin 病

検索したHodgkin病症例73例中48例(65.8%)でReed Sternberg (RS)細胞あるいは単核Hodgkin細胞内にEBER ISH陽性シグナルが観察された。組織亜型別に見ると混合細胞型での陽性率が81%と高い結果が得られたが、リンパ球優勢型で40%、リンパ球減少型で57.1%、結節硬化型で57.1%とすべての組織亜型で陽性率は高かった(Table 1)。これらの症例中9例ではEBV陽性のRS細胞とともに背景Tリンパ球はT細胞リンパ腫と考えられ、compositeリンパ腫と考えた。このうち1例ではEBVのmonoclonalityと共にHTLV-1のmonoclonalityおよびTCRの再構成も確認された。EBV陽性リンパ腫ではEBNA2は陰性であるが、LMP1

の発現が見られた。LMP1の発現はRS細胞および単核Hodgkin細胞にのみ観察された。また、検索した5例すべてにEBVのmonoclonal bandが観察された。

2. 非Hodgkin リンパ腫

非Hodgkinリンパ腫(NHL)752例のEBER ISHにて590例(78.5%)では全く陽性シグナルが観察されなかった。64例(8.5%)では背景の非腫瘍性リンパ球のみに陽性シグナルが観察され腫瘍細胞では陰性であった。これら2者をEBV陰性症例とした。EBV陽性症例は腫瘍細胞の一部に陽性シグナルが見られる症例(++)63例(8.4%)と50%以上多くの腫瘍細胞に見られる症例(+++)35例(4.7%)とに分けられた。

これらの結果を表現型分類別に見てみると、ATLの368例中44例(12.0%)、T-MLの114例中36例(31.6%) (Figure 1)、B細胞リンパ腫(B-ML)の263例中18例(6.8%) (Figure 2)とT細胞リンパ腫にEBV陽性症例が多く観察された(Table 2)。また、EBV+++症例のみを見ると、ATLの11/44(25.0%)、T-MLの14/36(38.9%)、B-MLの10/18(55.6%)でありB-MLでは多くの症例で50%以上の腫瘍細胞にEBVが確認された。しかしながら、EBER ISHとCD3あるいはCD20の免疫染色との2重染色による観察ではEBV陽性細胞は表現型発現の欠損あるいは減弱傾向が見られた。

初発部位別に見ると、節性リンパ腫でATLの14.7%、T-MLの38.7%、B-MLの4.0%がEBV陽性であるのに対し、節外性リンパ腫ではATLの7.6%、T-MLの23.1%、B-MLの9.4%がEBV陽性であり、T-MLでは節性、節外性ともに陽性率が高か

Figure 1 EBV-positive pleomorphic T-cell lymphoma(Double stain of EBER-1 in situ hybridization and CD3 immunohistochemistry)

Figure 2 EBV-positive large B-cell lymphoma(Double stain of EBER-1 in situ hybridization and CD20 immunohistochemistry)

った。鼻腔原発のT-ML5例ではすべての症例でEBV陽性であった。

組織型別に見ると、T-MLではAILD型やLennert型で陽性率が高く、B-MLではfollicular型では全くEBV陽性症例が見られなかった。

3. 免疫組織化学

EBV陰性症例ではEBNA1、EBNA2およびLMP1の発現は見られなかった。これらのEBV関連抗原発現をEBV++とEBV+++とで比較すると、EBNA1はEBV++で8/34(23.5%)、EBV+++で7/19(36.8%)で見られた。EBNA2はEBV++で10/39(25.6%)、EBV+++で3/

Table 2 EBV-Positive Malignant Lymphoma by Site and Phenotype

Site	ATL(%)	T-ML(%)	B-ML(%)
Lymph node	33/224 (14.7)	24/62 (38.7)	5/125 (4.0)
Skin	2/83 (2.4)	2/25 (8.0)	2/8 (25.0)
CNS	—	0/1 (0)	1/13 (7.7)
Nose	1/2 (50.0)	5/5 (100.0)	1/2 (50.0)
Waldyer Ring	4/21 (19.0)	0/4 (0)	1/21 (4.8)
Stomach	2/18 (11.1)	3/6 (50.0)	2/28 (7.1)
Intestine	1/5 (20.0)	—	2/15 (13.3)
Breast	—	0/1 (0)	0/4 (0)
Other	1/15 (6.7)	2/10 (20.0)	4/47 (8.5)
Total	44/368 (12.0)	36/114 (31.6)	18/263 (6.8)

Table 3 Expression of Latent Membrane Protein(LMP)
by phenotype and EBV-involvement

Phenotype	EBV++ (%)	EBV+++ (%)
ATL	19/32 (59.4)	8/11 (72.7)
T-ML	16/21 (76.2)	7/13 (53.8)
B-ML	5/8 (62.5)	7/9 (77.8)
Total	40/61 (65.6)	22/33 (66.7)

20(15.0%)で、LMP1はEBV++で40/61(65.6%), EBV+++で22/33(66.7%)で観察された(Table 3)。EBV++とEBV+++とでこれらのEBV関連抗原の発現率に差を認めなかった。EBNA1およびEBNA2の発現は弱く、また発現していても極く一部の腫瘍細胞にしか見られなかった。LMP1の発現は他2者と比べて強いが、やはりEBER ISH陽性細胞の一部の腫瘍細胞で観察されるに過ぎなかった。また、少数ではあるがEBER ISH陰性でLMP発現を示す腫瘍細胞も見られた。

P53蛋白発現はEBV陰性症例39例中18例(46.2%)で観察され(Figure 3), EBV++では61例中46例(75.4%), EBV+++では33例中29例(87.9%)で観察された(Table 4)。これらP53陽性細胞は極く一部の腫瘍細胞に観察されるものからほとんどすべての腫瘍細胞に強い陽性所見を示す症例まで多彩で

あった。

4. その他

EBV陽性症例53例の凍結標本からDNAを抽出しBam H1-W regionのsouthern blot analysisにて25例にEBV-DNAが確認された。これらの中で9例ではterminal repeatのmonoclonalityが見られた。

EBV陽性症例17例, EBV陰性症例20例, および正常control 67例の血清を用いviral capsid antigen(VCA) IgG, IgA, early antigen(EA) IgG, IgA, EB nuclear antigen(EBNA)の抗体価を測定した。EBV陰性症例では正常controlにくらべEBNA以外の抗体価の上昇が見られた。EBV陽性症例では陰性症例および正常と比較してVCA-IgG, IgA, EA-IgG, IgAの抗体価が高く、殊にIgA抗体価の上昇が著明であった。また、EBNA抗体価

Figure 3 P53 overexpression in EBV-positive T-cell lymphoma (Immunohistochemistry using DO7 monoclonal antibody)

Table 4 P53 gene products overexpression by phenotype and EBV-involvement

Phenotype	EBV-negative (%)	EBV++	EBV+++
ATL	7/13(53.8)	24/32(75.0)	11/11(100.0)
T-ML	2/5(40.0)	15/21(71.4)	10/13(76.9)
B-ML	9/21(42.9)	7/8(87.5)	8/9(88.9)
Total	18/39(46.2)	46/61(75.4)	29/33(87.9)

は著明な低下傾向が観察された。

EBV 陽性症例は陰性症例に比較して有意に予後不良の傾向が観察された。

考 察

悪性リンパ腫における EBV の関連性については、Burkitt リンパ腫をはじめとして多くの研究報告がみられる。殊に、近年の免疫組織化学や in situ hybridization の導入により病理学的研究が精力的になされている⁴⁾⁵⁾。しかしながら、EBV が腫瘍細胞内に存在することは多くの型のリンパ腫で明らかにされてきたが、それらのリンパ腫発生における EBV の役割については不明のままである。今日、可能な直接的証拠としては episomal monoclonality の証

明であるが、その他に EBV 関連の抗原発現、抗体価、EBV 特異的 NK 活性などにより EBV と腫瘍の関連性を示す証拠を明らかにしていくことが重要と考えられる。

本研究では Hodgkin 病と非 Hodgkin リンパ腫の多くの症例について、現在もっとも高感度と考えられる EBV の検出法である EBER ISH を施行し、EBV と悪性リンパ腫の関連性についての検討を実施した。その結果、免疫不全者を含まないこれらの症例では T-ML における陽性率をもっとも高く、ATL さらに B-ML と陽性率の低下が見られた。

鼻咽頭癌や胃癌における EBV は腫瘍細胞のすべてに存在するが、悪性リンパ腫の場合腫瘍細胞の一部のみに存在する EBV 陽性症例があることがまた

問題を複雑にしている。本研究では腫瘍細胞の一部にのみ EBV が存在する症例と50%以上の腫瘍細胞に存在する症例とを比較検討したが、EBNA1, EBNA2, LMP, P53の陽性率および抗体価に両者間の差異を見いだせなかった。即ち、腫瘍細胞の一部にのみ EBV が存在する症例でも、EBV 陰性症例には見られない EBV 関連抗原の発現が見られる。このことは、EBV が一部の腫瘍細胞にしか見られない症例でも EBV がかならずしも腫瘍細胞に2次的に感染したとは限らない可能性もある⁴⁾。

EBV 陽性リンパ腫では著明な抗体価の上昇、殊に、VCA および EA の IgA 抗体価の上昇が見られたこと、および EBV 陽性リンパ腫は陰性症例と比較して予後不良であることは注目すべき所見と考えられる。

結 語

本研究により、我々は73例の Hodgkin 病(HD)と752例の非 Hodgkin リンパ腫(NHL)における EBV の存在を EBER in situ hybridization により検討

した。EBV 陽性リンパ腫においては EBNA1, EBNA2, LMP1および P53遺伝子産物の発現を免疫組織科学的に検討した。さらに、EBV 抗体価および予後の解析を実施した。

EBV は HD の48例(65.8%)の腫瘍細胞に確認された。EBV 陽性 HD では LMP1の発現が見られ、検索した5例では episomal monoclonality が証明された。

NHL では、EBV は ATL368例中44例(12.0%), T-ML では114例中36例(31.6%), B-ML では263例中18例(6.8%)に確認された。EBV 陽性 NHL では、LMP1(66%), P53(80%)と高率、EBNA1と EBNA2では低率に陽性所見が得られ、EBV が一部の腫瘍細胞にのみ限局している症例とびまん性に陽性細胞を認める症例とでは同様の結果であった。検索した症例の中では episomal monoclonality も見られ、抗体価特に VCA と EA の IgA 抗体価の上昇、さらに EBV 陽性症例では予後不良の結果が得られた。

文 献

- 1) MackMahon EME, Glass JD, Hayward SD, Mann RB, Becker PS, Charache P, McArthur JC, Ambinder RF: Epstein-Barr virus in AIDS-related primary central nervous system lymphoma. *Lancet* 1991; 338: 969-73
- 2) Jones JF, Shurin S, Abramowsky C, Tubbs RR, Scitto CG, Wahl R, Sands J, Gottman D, Katz BZ, Sklar J: T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. *N Engl J Med* 1988; 318: 733-41
- 3) Su I-J, Hsieh H-C, Lin K-H, Uen W-C, Kao C-L, Chen C-J, Cheng A-L, Kadin ME, Chen J-Y: Aggressive peripheral T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA: A clinicopathologic and molecular analysis. *Blood* 1991; 77: 799-808
- 4) Korbjuhn P, Anagnostopoulos I, Hummel M, Tieman M, Dallenbach F, Parwaresch MR, Stein H: Frequent latent Epstein-Barr virus infection of neoplastic T-cells and bystander B cells in human immunodeficiency virus-negative European peripheral pleomorphic T-cell lymphomas. *Blood* 1993; 82: 217-23
- 5) Hardarson S, Anderson ME, Lutz CT: Presence of Epstein-Barr virus in many types of benign and malignant lymphoid lesions: Detection by polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Diagn Mol Pathol* 1994; 3: 22-31
- 6) Tokunaga M, Imai S, Uemura Y, Tokudome T, Osato T, Sato E: Epstein-Barr virus in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Am J Pathol* 1993; 143: 1263-9