

フローサイトメトリー法を用いたEBER1mRNA発現の解析と臨床的意義の検討

| | |
|-------|---|
| メタデータ | 言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属: |
| URL | http://hdl.handle.net/2297/9469 |

フローサイトメトリー法を用いた EBER1 mRNA 発現の解析と臨床的意義の検討

金沢大学医学部医学科小児科学講座 (主任: 小泉晶一教授)

久藤美保

Epstein-Barr ウイルス (EBV) は成人の80%以上が感染しており、終生Bリンパ球に潜伏感染の形で持続感染している。顕性感染では初感染時の急性感染症である伝染性単核症が広く知られている。しかし近年、血球貪食リンパ組織球症 (hemophagocytic lymphohistiocytosis, HLH) のような急性重症感染症や慢性活動性EBV感染症 (chronic active EBV infection) といった慢性感染症、さらに鼻咽頭癌、Hodgkin病、一部の胃癌等の悪性疾患など様々な疾患に関与していることが明らかとなっている。現在これらの疾患の検討により、EBV感染細胞の違いや感染様式の違いにより、種々のEBV関連疾患の病態が決定されていると考えられている。EBVがコードするpoly (A) 鎖のない核内の小RNA (EBV encoded small RNA, EBER) は、あらゆるEBV感染細胞に全ての感染様式において大量に発現しているRNAであり、EBER1, EBER2の2種類が存在するがその発現調節機構は明らかではない。しかし現在、EBER1を標的とした生体内局所ハイブリダイゼーション (*in situ* hybridization, ISH) が、EBV関連疾患の診断に広く利用されている。今回の検討では、EBER1を標的としたISHにフローサイトメトリー (flow cytometry, FCM) による解析を組み合わせた解析法 (ISH/FCM) によりEBV感染細胞の定量的評価を試みた。その結果、フルオレッセン標識EBER1プローブを用いたISH/FCMによって、従来のアルカリフォスファターゼ標識EBER1プローブによるISHに比べ、より定量的な評価が可能であった。しかし、EBER1陽性細胞1%以下の感染細胞比率の低い検体での定量的評価は現時点では困難であった。また今回の検討ではEBER1発現の程度は種々の細胞株によって異なり、また同一細胞株においても蛍光輝度の分布が幅広く、個々の細胞におけるEBER1発現量が異なることが明らかとなった。このことより、EBER1発現は、宿主細胞種の違いや、個々の細胞により異なる因子によって調節されていることが示唆された。本法を用いた臨床検体の解析では、対照及び伝染性単核症では末梢血中にEBER1陽性細胞は検出されず、HLHやCAEBVでは容易に検出できた。したがってEBER1 ISH/FCMによりHLHやCAEBVにおける感染細胞や感染様式のモニターが比較的容易にできると考えられた。また本法は、他のEBV関連遺伝子や感染細胞の表面抗原との多因子解析により、さらに簡便に多くの情報をもたらすと考えられた。

Key words Epstein-Barr virus, EBER1, *in situ* hybridization, flow cytometry

Epstein-Barr ウイルス (Epstein-Barr virus, EBV) は、1964年 Epstein と Barr により、アフリカの小儿に多発するパーキットリンパ腫培養細胞株中に発見されたウイルスである¹⁾。健康人でのEBV初感染部位は咽頭粘膜上皮が主であるが、その後Bリンパ球に潜伏感染し、生涯持続感染の状態での個体内に存在する。全世界のほとんどの成人がEBV既感染者であり、その10~20%では常時唾液中にウイルス粒子が分泌されている²⁾。本邦では2~3才までに約70%が初感染を受けるが、その大部分は不顕性感染である³⁾。顕性感染として代表的なものは伝染性単核症 (infectious mononucleosis, IM) であるが、最近、血球貪食リンパ組織球症 (hemophagocytic lymphohistiocytosis, HLH) のような急性重症型や慢性活動性EBV感染症 (chronic active Epstein-Barr virus infection, CAEBV) のような慢性型な

ど、多彩な病態をとることが知られるようになった。また以前から知られているパーキットリンパ腫の他、上咽頭癌⁴⁾、ホジキン病⁵⁾、一部の胃癌⁶⁾、胸腺リンパ上皮腫⁷⁾、ナチュラルキラー (natural killer, NK) 白血病などの多くの悪性疾患においてもEBVが関与していることが明らかとなっている。これらの疾患におけるEBV感染細胞は咽頭上皮やBリンパ球のみならず、Tリンパ球⁸⁾、NK細胞⁹⁾、その他の腫瘍細胞など様々である。このようなEBV関連腫瘍性疾患におけるウイルスの感染様式は大部分が潜伏感染であるが、ウイルス遺伝子の発現はEBV関連腫瘍細胞によって異なり、潜伏感染様式I~III (latency I~III) に分類されている。近年、これらの疾患において潜伏感染細胞のみではなく、ウイルスゲノム複製状態の初期に発現する遺伝子、BZLF1を発現している細胞の存在が示さ

平成11年10月22日受付, 平成12年3月1日受理

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; CAEBV, chronic active Epstein-Barr virus infection; CTL, cytotoxic T lymphocyte; MFI, mean fluorescence intensity; DEPC, diethyl pyrocarbonate; EBER, EBV encoded small RNA; EBNA, EBV determined nuclear antigen; FCM, flow cytometry; FCS, fetal calf serum; FITC, fluorescein

れ腫瘍化に関与している可能性が示唆されている^{11)~13)}。このような感染細胞の違いや感染様式の違いが、悪性疾患を含む種々のEBV関連疾患における病態形成に深く関与していると考えられる。したがってEBV感染症の診断および病態把握には迅速かつ正確な感染細胞の同定と感染細胞比率の定量的評価が必要である。

現在EBV感染症の診断には血清中のウイルス特異的抗体価の評価の他に、直接ウイルスゲノムの存在を証明する方法としてPCRや生体内局所ハイブリダイゼーション法 (*in situ* hybridization, ISH) などがよく用いられている¹⁶⁾¹⁷⁾。ISH法はPCR法に比べ感度は劣るがEBVの細胞内局在を明らかにできる点で優れている。当初はEBV-DNAのBam HI-W断片に相補的な配列を持ちアイソトープ標識^{18)~20)}やビオチン標識²¹⁾²²⁾したプローブを用いた方法で行なわれていたが、これらの方法は操作手順が複雑で背景の非特異反応が強いなどの短所があった。その後EBV潜伏感染細胞の潜伏感染様式I~IIIすべてにおいて発現している遺伝子を標的とした、非アイソトープによる検出法が考案された。すべての潜伏感染細胞に発現している遺伝子には、RNAポリメラーゼIIIで転写されEBVがコードするpoly (A) 鎖のない核内の小RNA (EBV encoded small RNA, EBER) が2種類 (EBER1, EBER2) と、6種類のEBV特異的核内抗原 (EBV determined nuclear antigens, EBNA) のうち、EBV特異的細胞傷害性Tリンパ球の標的とならないEBNA1がある。このうち、潜伏感染細胞1個あたり $10^6 \sim 10^7$ コピーと大量に存在するEBER1に相補的な配列をもつアルカリフォスファターゼ標識DNAプローブを用いたISH法²³⁾が現在広く行なわれている。この方法により組織や血液中の感染細胞の同定が行なわれ大変有用な方法である。しかしISHシグナルの濃度は濃いものから薄いものまで変化に富んでおり、EBERのコピー数が同じ組織や細胞株において細胞ごとに異なる可能性があり、完全にEBV感染細胞を検出できていない可能性が残されている²⁴⁾。またPCR法ではEBVが潜伏持続感染をきたすウイルスであるため、健常者でも陽性になり得ることから結果の解釈には注意を要するという問題点がある。

1985年、Traskら²⁵⁾がフローサイトメトリー (flow cytometry, FCM) を用いた、特異的DNA検出法を報告し、1988年Bdumamら²⁶⁾がISHとFCMを組み合わせた、細胞内特異的mRNAの検出法を報告して以来、同様の方法による特異的DNAやRNAの検出報告がしばしば見られる²⁷⁾²⁸⁾。この方法は核酸量の客観的な定量的評価が可能であり、また手技が簡便であるため繰り返し行なうことができ、経時的評価法としても有用と考えられる。そこでこの方法を応用し、EBV感染細胞を用いてEBER1-ISHを行ない、FCMにて解析し感染細胞の検出を試みた。さらに急性EBV感染症である伝染性単核症、急性重症型である血球貪食リンパ組織球症ならびにEBV持続感染症について末梢血リンパ球のEBER1発現を検討し、本法の臨床的応用の可能性について考察する。

材料と方法

I. 使用細胞

方法の基礎的検討のため、表1に示す既存のEBV陽性及び陰

性細胞株を用いた。各細胞の由来は、B95-8はマーモセットEBV形質転換リンパ球でありEBV産生細胞株である。IM9はヒト多発性骨髄腫リンパ芽球、Daudiはヒトパーキットリンパ腫、Jiyoyeはヒトパーキットリンパ腫、Molt4はヒト急性リンパ芽球性白血病、JurkatはヒトT細胞リンパ腫、K562はヒト慢性骨髄性白血病、HL60は前骨髄性白血病、HUT102はヒト皮膚T細胞リンパ腫、KU812はヒト慢性骨髄性白血病好塩基球をそれぞれ由来とする細胞株である。B95-8は北海道大学医学部小児科 大石 勉先生より、HUT102は京都大学ウイルス研究所 (京都) 内山 卓先生より供与を受けた。またIM9, K562, HL60, KU812は日本癌研究リサーチ・リリースバンク (東京)、Daudi, Jurkatは東北大学・加齢医学研究所・癌細胞保存施設 (仙台)、Molt4は理化学研究所ジーンバンク・細胞銀行 (つくば) JiyoyeはAmerican Type Cell Collection社 (Manassas) からそれぞれ細胞を得た。またヘパリン加末梢静脈血を採取し、フィコールハイパーク (Ficoll-Hypaque) 比重遠心法にて単核球を分離、PBSにて3回洗浄した後ヒツジ赤血球Eロゼット法により分離して得たB細胞に、EBV浮遊液としてB95-8細胞株の培養上清を加え、10%非燻化ウシ胎児血清 (fetal calf serum, FCS), 25 mM HEPES, 2×10^{-5} M 2-メルカプトエタノール, 0.3 mg/ml グルタミン, 200 U/ml ペニシリンG, 10 mg/ml ゲンタマイシンを含むRPMI 1640培養液 (Gibco Laboratories, Grand Island, USA) にて、5% CO₂, 37°Cの条件下で約2週間培養し、自立して増殖する細胞株を得た。このようにして樹立したEBV形質転換B細胞株 (lymphoblastoid cell line, LCL) を3株 (LCL # 1, LCL # 2, LCL # 3とする) 用いた。さらに、金沢大学医学部附属病院小児科及び関連施設を受診した急性EBV感染症者であるIM3例、HLH 1例ならびに慢性EBV感染症であるCAEBV患者3例よりLCL作成時と同様の手技にて採取し分離した末梢血単核球および、抗CD16モノクローナル抗体 (オーソ・クリニカルダイアグノスティクス, 東京)、抗TCR- $\gamma\delta$ 抗体 (Becton Dickinson, San Jose) にて標識した後、セル・ソーターEPICS® Elite (日科機, 東京) を用いて単離した特定のリンパ球亜群を解析対象とした。

II. プローブ

EBER1に相補的な配列を持つ40塩基長のオリゴDNAプロー

Table 1. Cell lines Used

| EBV positive cell lines | EBV negative cell lines |
|-------------------------|-------------------------|
| Productive | Molt4 |
| B95-8 | Jurkat |
| Tumor | K562 |
| IM9 | HL60 |
| Daudi | HUT102 |
| Jiyoye | KU812 |
| Transformed | |
| LCL (# 1~# 3) | |

isothiocyanate; HLH, hemophagocytic lymphohistiocytosis; IM, infectious mononucleosis; ISH, *in situ* hybridization; LCL, lymphoblastoid cell line; NK, natural killer; PNA, peptide nucleic acid

Table 2. Sequence of sense and antisense probes

| | |
|-----------------------|--|
| EBER1 sense probe | 5'-TCGTCTCAGACCCTTCTGTTGGTGTCTGTGGCAGGAGTGG |
| EBER1 antisense probe | 5'-AGCAGAGTCTGGGAAGACAACCACAGACACCCGTCCTCACC |

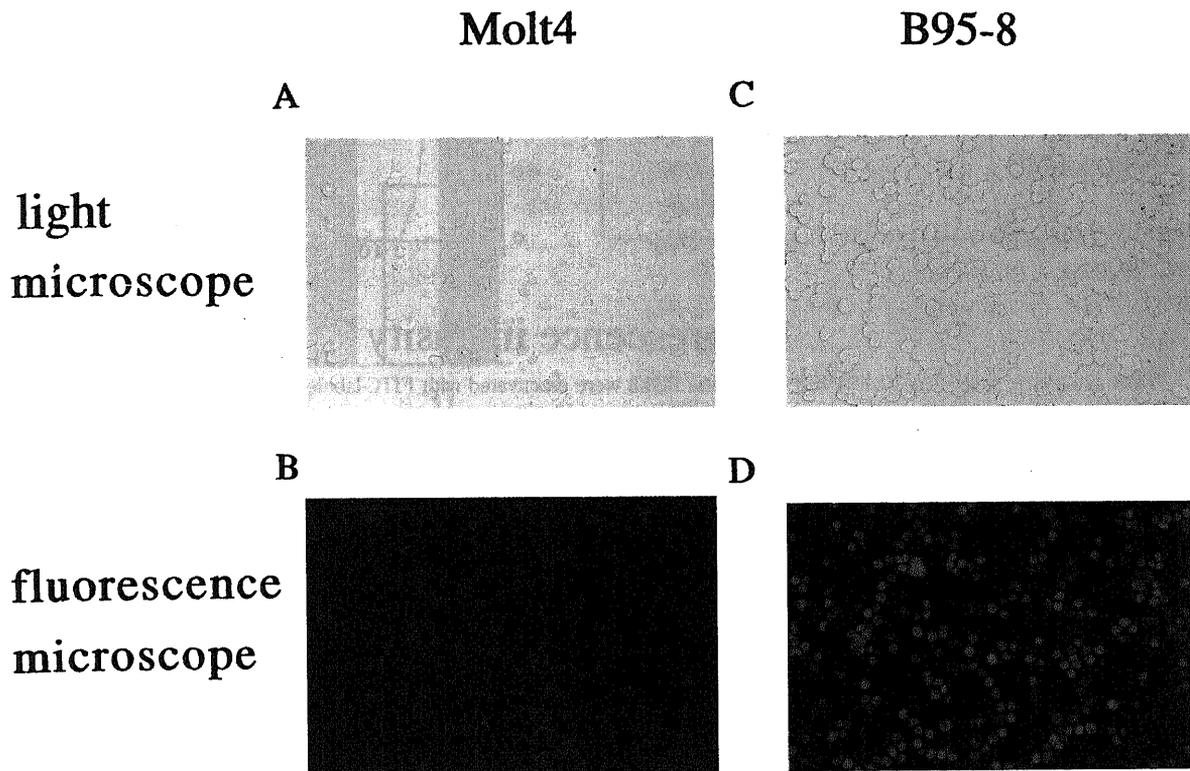


Fig. 1. EBER1 ISH of Molt4 (A and B) and B95-8 (C and D). A and C were findings by the light microscope, B and D by the fluorescence microscope ($\times 200$).

ブをアンチセンスプローブ、同じ配列を持つDNAプローブをセンスプローブとして使用した。プローブの設定はKaneganeら²⁰の論文を参考にした。各プローブの配列は表2に示す。プローブの合成及び5'末端におけるフルオレッセン・イソチオシアン酸 (fluorescein isothiocyanate, FITC) による標識はフナコシ株式会社 (東京) に委託した。

Ⅲ. 細胞の固定

10%非動物ウシ胎児血清 (fetal calf serum, FCS), 25 mM HEPES, 2×10^{-5} M 2-メルカプトエタノール, 0.3 mg/ml グルタミン, 200 U/ml ペニシリン G, 10 mg/ml ゲンタマイシンを含むRPMI 1640培養液 (Gibco Laboratories, Grand Island, USA) にて, 5% CO₂, 37°Cの条件下で培養した培養細胞は, 0.1 M PBS (pH 7.2) にて1回洗浄の後使用した。臨床検体は患者より同意のうえ, ヘパリン加末梢静脈血を採取し, 前述のごとく単核球を分離, PBSにて3回洗浄し使用した。それぞれの細胞を5 mM HEPESおよび1%ホルムアルデヒドを加えたPBSに浮遊し室温にて25分間静置した。その後細胞を1500×gにて3分間遠心し上清を捨て, 0.1% ジエチルピロカーボネート (diethyl

pyrocarbonate, DEPC) (Sigma Chemical Co., St. Louis) を加えた70%冷エタノールに浮遊し, -20°Cにて18時間以上保存した。

Ⅳ. ISH

保存検体は1500×gにて3分間遠心し, 上清を捨て, ハイブリダイゼーションマスターミックスを20 μlずつ各検体に加え混和した。ハイブリダイゼーションマスターミックスの組成は, 4×SSC (pH7.0), 5mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0), 50% 脱イオン化ホルマミド (ナカライテスク株式会社, 東京), 蒸留水, およびセンスまたはアンチセンスプローブとした。ハイブリダイゼーション反応は37°Cの孵卵器にて3時間行なった。反応終了後, 500mg/mlのウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) (Sigma Chemical Co.) を加えた1×SSCに細胞を浮遊し, フローサイトメーター Cytoron Absolute (Ortho Diagnostic System, 東京) を用いてEBER1陽性細胞の比率を解析した。個々の細胞株および検体においてセンスプローブを用いた場合の細胞集団, つまりEBER1陰性細胞集団の平均蛍光輝度 (mean fluorescence intensity, MFI) が40MFIとなるように設定し, この集団の最高蛍光輝度をこえる細胞集団をEBER1

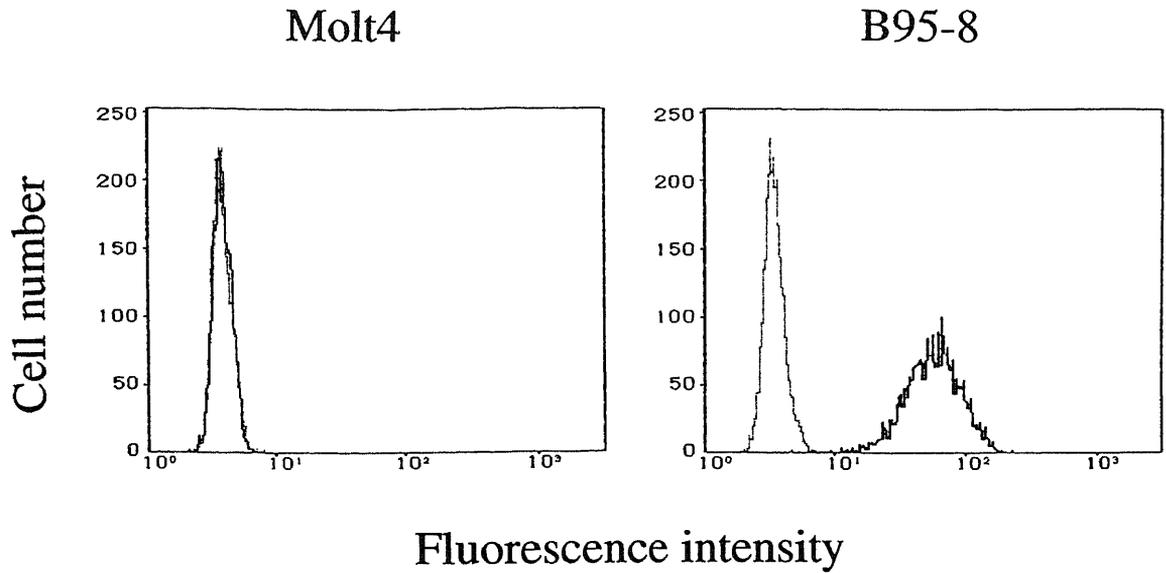


Fig. 2. Flow cytometric analysis of EBER1 ISH. Molt4 and B95-8 were reactivated with FITC-labeled sense (----), or anti-sense (—) probes.

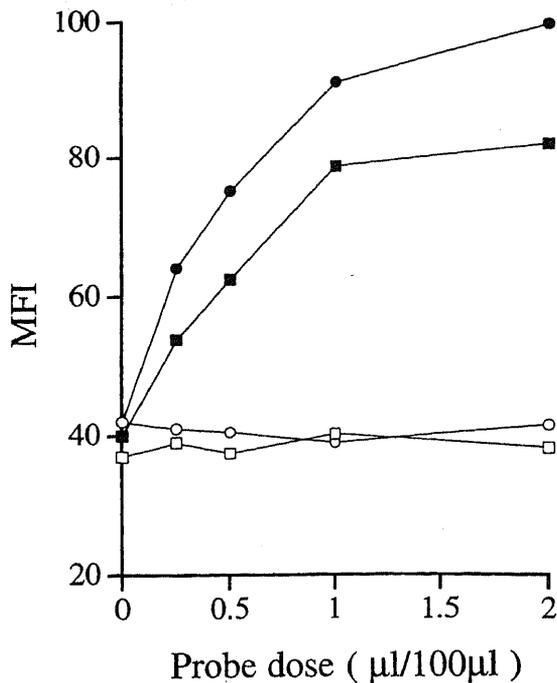


Fig. 3. Dose-dependence of FITC-labeled probe for ISH/FCM. The vertical axis indicates mean fluorescence intensity (MFI) and the horizontal axis denotes the doses of FITC-labeled probe per 100 μ l of reaction buffer. \circ , and \bullet , indicate B95-8 fluorescence obtained using sense probe or antisense probe, respectively. \square , and \blacksquare , indicate Daudi fluorescence obtained using sense probe or antisense probe, respectively.

陽性細胞と判定した。各細胞株および検体間の比較検討は、各細胞株および検体をセンスおよびアンチセンスプローブを用いて測定した場合のEBER1陽性細胞集団と陰性細胞集団の平均蛍光輝度の差 (Δ MFI) を用いて行ない、 Δ MFIが2以下の場合を感度以下とした。 Δ MFIの検定はWelchのt検定を用いて行なった。

成 績

I. 方法の検討

EBV陽性細胞株であるB95-8とEBV陰性細胞株であるMolt4を用いてISHを行ない、その細胞を遠心、洗浄し、沈渣浮遊液を作成、そのうちの1滴をスライドガラスに載せ観察した。図1に示すように、光学顕微鏡による観察ではいずれの細胞も細胞陰影が確認されたが、蛍光顕微鏡による観察では、Molt4において蛍光を発する細胞は観察されず、一方B95-8では明らかな蛍光を発する細胞が多数観察された。またB95-8では個々の細胞における蛍光輝度にばらつきがあったが、ほぼ全ての細胞が陽性であると考えられた。フローサイトメーターによる解析では、Molt4ではセンス、アンチセンスプローブを用いた場合のヒストグラムはほぼ完全に重なり、陰性ピークを示したが、B95-8では明らかに異なった陽性ピークを示した。(図2)

II. ISH/FCMの条件設定

プローブの量、反応温度、反応後の洗浄回数などのISH/FCMの至的條件について検討した。ハイブリダイゼーションマスターミックス100 μ lに対するセンスおよびアンチセンスプローブの量を0.15 μ l, 0.25 μ l, 0.33 μ l, 0.5 μ l, 1.0 μ l, 2.0 μ l, とした場合のMFIの値を縦軸に、プローブの量を横軸に取ったグラフを図3に示す。 Δ MFIは、プローブ量が増すとともに増

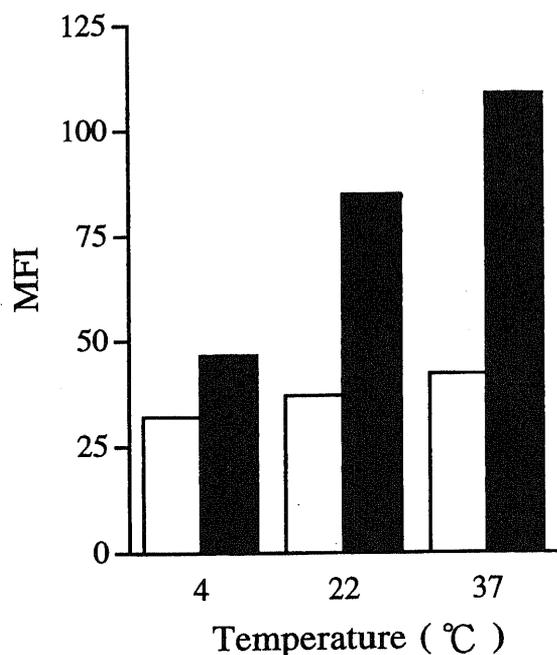


Fig. 4. Determination of optimum temperature for ISH/FCM. B95-8 were hybridized for 3 hr at 4°C, 25°C or 37°C. The vertical axis denotes MFI. □, ■ indicate MFI data obtained with sense probe or antisense probe, respectively.

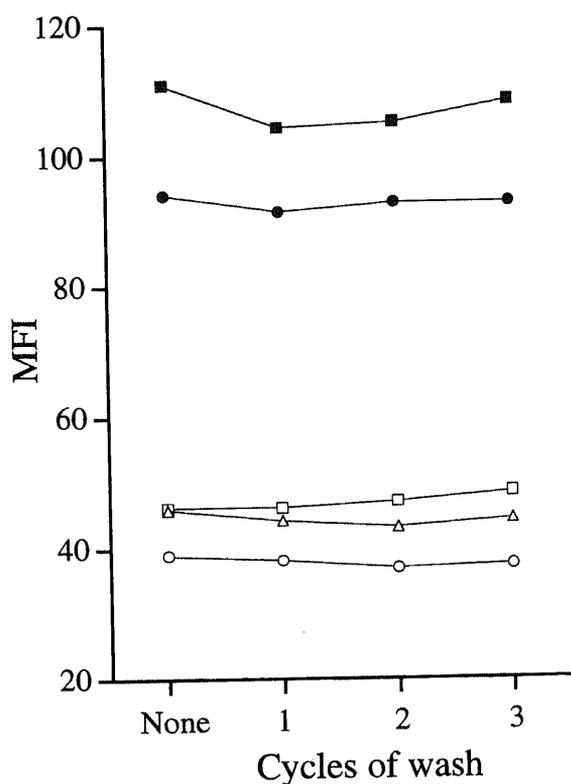


Fig. 5. Effect of cell washing after ISH reaction. Cells were washed in washing buffer for indicated number of cycles, B95-8 (■) and Daudi (●) were used as positive control cells. K562 (□), Jurkat (△) and Molt4 (○) were used as negative control cells.

加し、1.0 μ l以上ではほぼ一定となった。したがって、以後の検討はハイブリダイゼーションマスターミックス100 μ lに対しプローブ量1.0 μ lで行なった。ISH反応温度は、文献的には37°Cが一般的であるためB95-8について4°C, 25°C, 37°Cについて検討した。各温度におけるMFIの値をグラフに現すと37°Cで最も Δ MFIが高く良好な結果を得られた。(図4)

ハイブリダイゼーション反応終了後、500 μ l/ml BSAを含む1 \times SSCにて1回、2回、3回の洗浄を行なった場合と洗浄を行わない場合のMFIを比較し、洗浄の必要性及び方法について検討した。検討した細胞すべてにおいて、洗浄回数がいずれの場合も Δ MFIはほぼ同様の値となり、充分量の1 \times SSCに浮遊し解析することにより洗浄は不要であった。(図5)

Ⅲ. 特異性の検定

EBER1-ISH反応の特異性を検定するため各種培養細胞株について検討した。表1に示す既存のEBV産生細胞株(B95-8)、EBV陽性腫瘍細胞株(IM9, Daudi, Jiyoye)、およびEBV陰性細胞株(Molt4, Jurkat, K562, HL60, KU812, HUT102)、さらに独自で樹立化したLCLの3株(LCL#1, LCL#2, LCL#3)についてISHを行なった。この結果、 Δ MFIは感染EBV産生細胞株であるB95-8では55.5と最も高値、既存のEBV陽性腫瘍細胞株

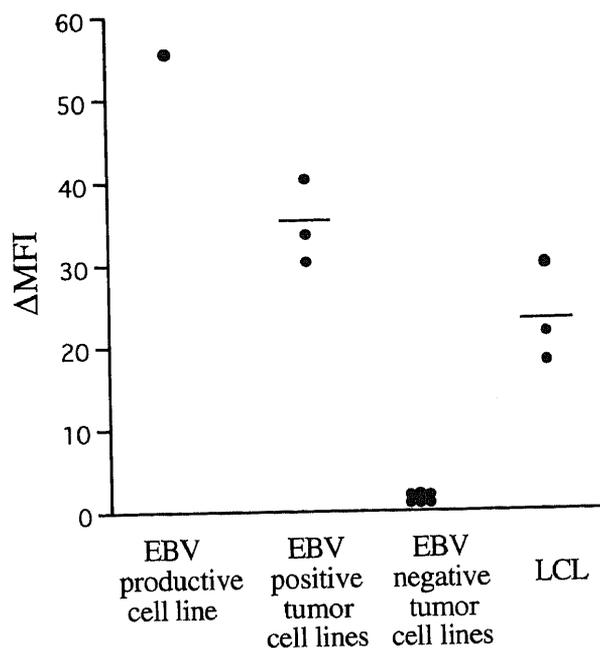


Fig. 6. Expression of EBER1 in variable cell lines. The expression of EBER1 in EBV negative cell lines (Molt4, Jurkat, K562, HL60, HUT102 and KU812. Δ MFI were less than 2), EBV productive cell line (B95-8. Δ MFI was 55.5), EBV positive tumor cell lines (IM9, Daudi and Jiyoye. Δ MFI were 40.3, 33.6, and 30.3) and 3 LCL (LCL#1, LCL#2 and LCL#3. Δ MFI were 29.8, 21.5 and 18.0) was analyzed by ISH/FCM and the Δ MFI values were compared.

では 34.73 ± 5.09 (平均値 \pm 標準偏差)と、EBV陰性細胞株と比較して有意に高かった ($P < 0.01$)。また独自に樹立化したLCL 3株も、全てがEBER1陽性となりその蛍光輝度は 23.1 ± 6.06 と、EBV陰性細胞株と比較して優位に高値であった ($P < 0.01$)。既存のEBV陽性腫瘍細胞株は独自に樹立化したLCLに比べて Δ MFIは高値となる傾向はあったが、有意差はなかった。EBV陰性細胞株では、すべての細胞株で感度以下であった。(図6)

IV. 感受性の検定

本方法の感受性を検定するため、EBV陽性細胞株であるB95-8とEBV陰性細胞株であるMolt4を種々の割合で混合した細胞浮遊液を調整し、前述のごとく固定、ISHを行ない、フローサイトメーターにて解析した。図7に示すようにヒストグラムでは、混合されているB95-8の割合とはほぼ同じ割合のEBER1

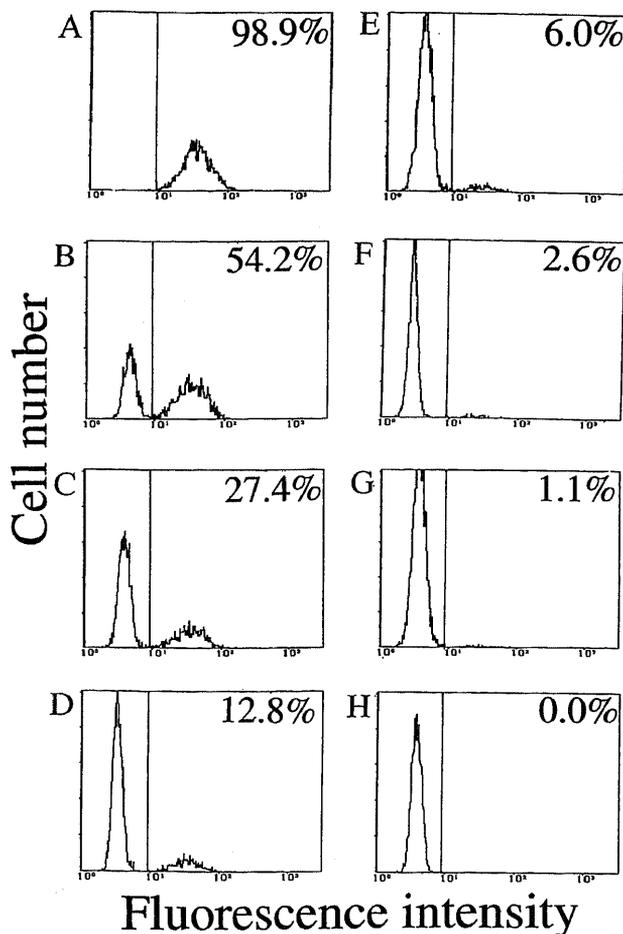


Fig. 7. Detection of EBER1-positive cells by ISH/FCM. B95-8 and Molt4 mixed at variable ratios were hybridized for 3 hours at 37°C and the signal intensity for EBER1 expression was analysed by flow cytometry. (A), B95-8 100%, (B), B95-8 50% and Molt4 50%, (C), B95-8 25% and Molt4 75%, (D), B95-8 12.5% and Molt4 87.5%, (E), B95-8 6.2% and Molt4 93.8%, (F), B95-8 3.2% and Molt4 96.8%, (G), B95-8 1.6% and Molt4 98.4%, (H), Molt4 100%. The percentage of EBER1-positive cells with fluorescence intensity larger than 10^4 is shown for each histogram.

陽性細胞が検出できた。さらに各混合比の細胞浮遊液を用いた場合のEBER1陽性細胞比率を縦軸に、実際のB95-8混合比率を横軸にとったグラフではほぼ比例関係を示した。今回の検討では陽性細胞混合比率1.6%まではほぼ正確にフローサイトメーターによる陽性細胞比率の検出が可能であったが、それ以下の混合比率ではフローサイトメーターで検出できず、本方法での検出限界は1.6%と考えられた。(図8)

V. アルカリフォスファターゼ標識EBER1-ISH法との比較

図9, 10にEBV産生細胞株であるB95-8, EBV腫瘍細胞株であるDaudi, 独自に樹立化したLCLの1株, およびEBV陰性細胞株であるMolt4について、それぞれ本方法および従来のアルカリフォスファターゼ標識EBER1-ISH法にて検討した結果を示す。いずれの細胞においてもEBV陽性細胞率は本方法においてやや高値となった。アルカリフォスファターゼ標識プローブを用いたEBER1-ISH法では各細胞株において染色濃度の強度に差があり、同一細胞株においても個々の細胞により濃度の差が観察された。ISH/FCMではこのような差は平均蛍光輝度の差、ならびにヒストグラムにおける蛍光輝度分布の違いとして表現された。

VI. 臨床検体の解析

正常対照として健康成人10例、急性EBV感染症であるIM 3例、EBV感染によるHLH 1例、EBV持続感染症3例 (CAEBV #1, #2, #3) について本方法により末梢血単核球の解析を行なった。さらにCAEBV #2についてはリンパ球亜群において有意に増加のみられたCD16陽性細胞を、またCAEBV #3に

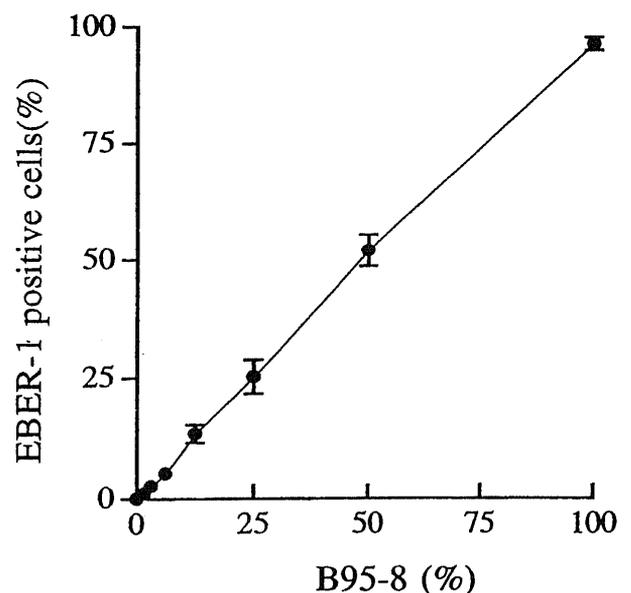


Fig. 8. Correlation between the actual percentage of EBV-positive cells and the EBER1 positive ratio obtained by flow cytometry. The vertical axis is the percentage of EBER1 positive cells. The horizontal axis is the percentage of B95-8 in the cell mixtures.

については同様に有意な増加のみられた TCR- $\gamma\delta$ 陽性細胞をそれぞれセル・ソーターにて単離した細胞を用いて解析した。各疾患における末梢血単核球を用いた解析結果を図 11 に示す。正常対照及びIM例では、EBER1 陽性細胞は感度以下であった。これに対して、EBV 感染症でも急性重症型であるHLH例では16.2%がEBER1 陽性細胞であり、ヒストグラムにおいて蛍光

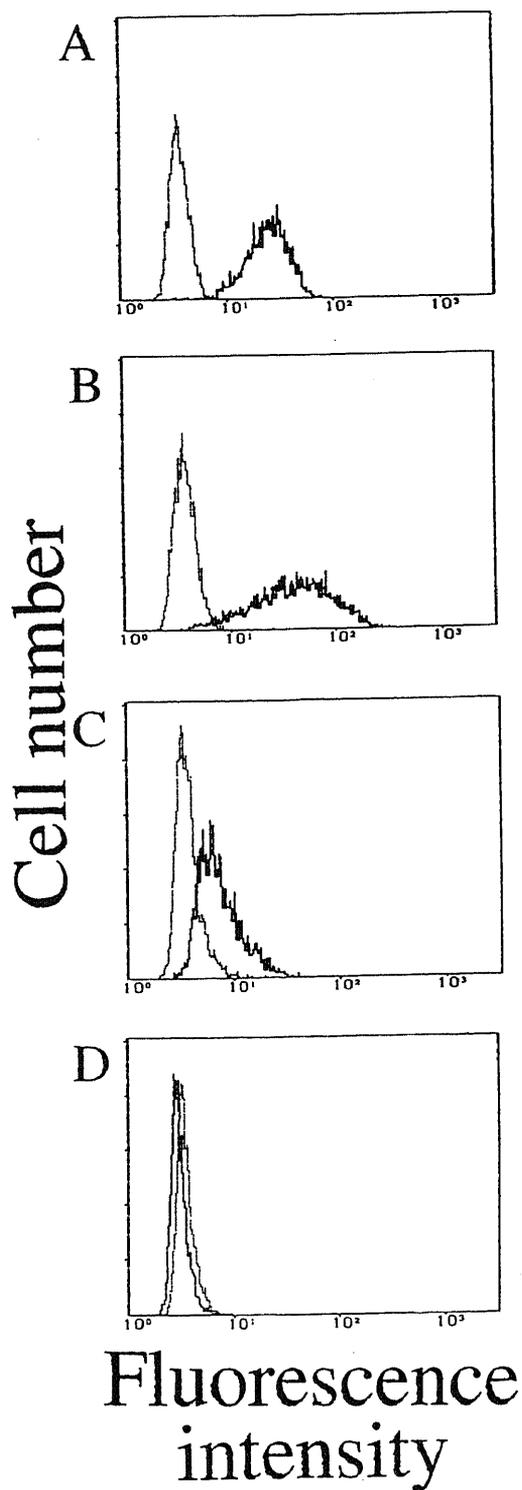


Fig. 9. Expression of EBER1 in various cell types as detected by ISH/FCM. Flow cytometric analysis was performed after hybridization with sense probe (----) or with antisense probe (—) for 3hr at 37°C. (A), B95-8, (B), Daudi, (C), LCL, (D), Molt4.

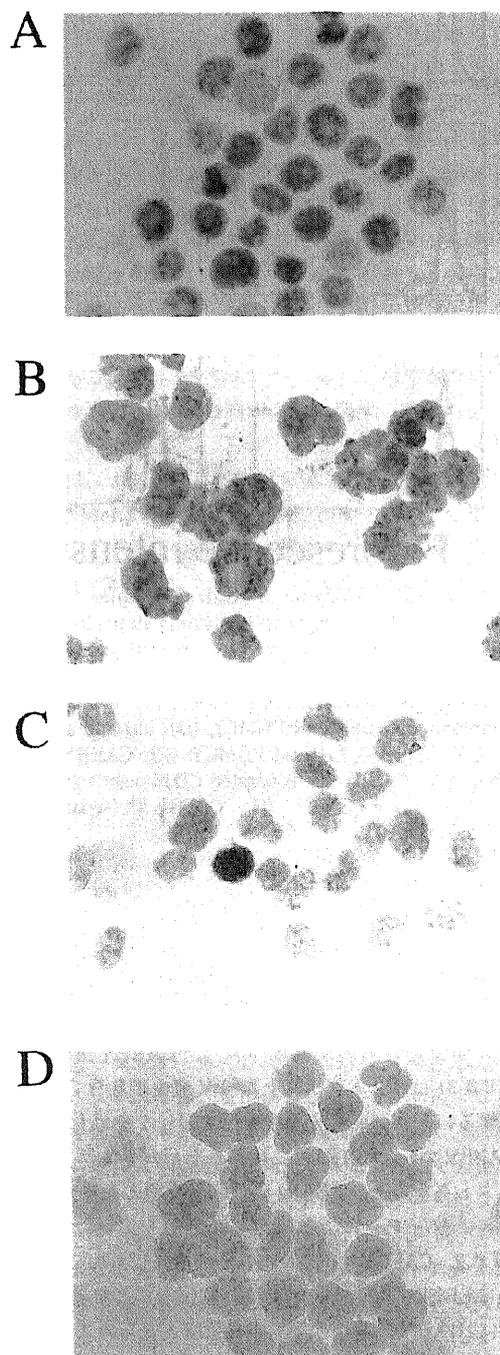


Fig. 10. Expression of EBER1 in various cell types as detected by ISH with alkaline phosphatase for cytosin specimens. Cytosin specimens were hybridized for 16 hr at 37°C. (A), B95-8, (B), Daudi, (C), LCL, (D), Molt4. ($\times 1000$)

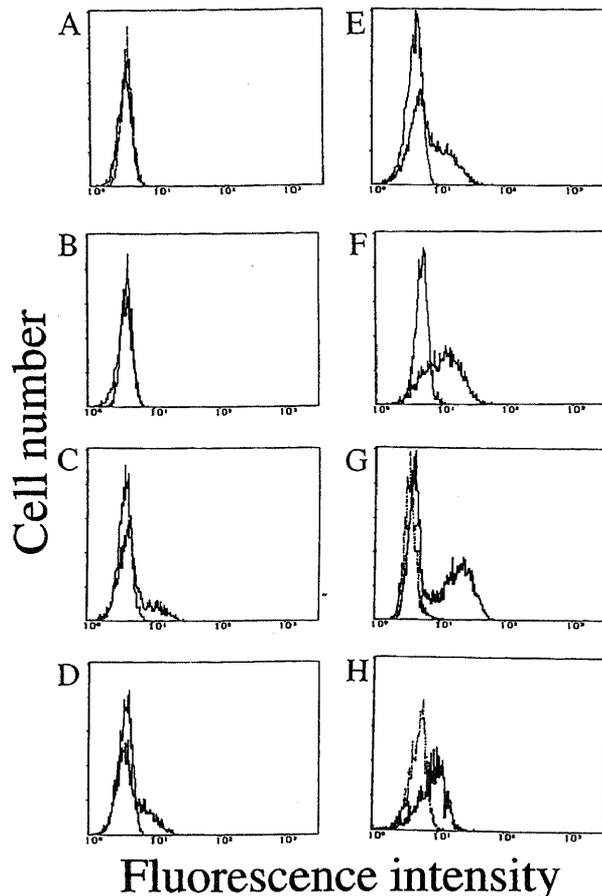


Fig. 11. ISH/FCM analysis of clinical samples for EBV1 expression. Flow cytometric analysis was performed after hybridization with sense probe (---) or with antisense probe (—) for 3hr at 37°C. (A), normal control (total PBMC), (B), infectious mononucleosis (total PBMC), (C), hemophagocytic lymphohistiocytosis (total PBMC), (D), chronic active EBV infection (CAEBV) #1 (total PBMC), (E), CAEBV #2 (total PBMC), (F), CAEBV #2 (separated CD16 positive cells), (G), CAEBV #3 (total PBMC), (H), CAEBV #3 (separated TCR- $\gamma\delta$ positive cells).

輝度は EBV 腫瘍細胞株よりも低いものの、LCL に匹敵するような明らかな陽性細胞が観察された。CAEBV 例では、1 例 (CAEBV # 3) はヒストグラム上、EBV 産生細胞株である B95-8 に匹敵するほどの強い蛍光輝度を示すピークを示した。他の 2 例 (CAEBV # 1, # 2) では、明らかなピークは示さないものの、ヒストグラム上に EBV1 陽性細胞集団の存在が示唆された。セル・ソーターにより単離した細胞を用いた検討では、CAEBV # 2, CAEBV # 3 においてそれぞれ CD16, TCR- $\gamma\delta$ 陽性細胞に EBV1 陽性細胞が集積していることを確認できた。各疾患における陽性細胞の平均蛍光強度とセンスプローブを用いた場合の平均蛍光強度の差 (Δ MFI) を比較すると、正常対照および IM ではほぼゼロであったが、HLH 及び CAEBV では EBV 腫瘍細胞株よりは低い LCL とほぼ同様の値が得られた。(図 12)

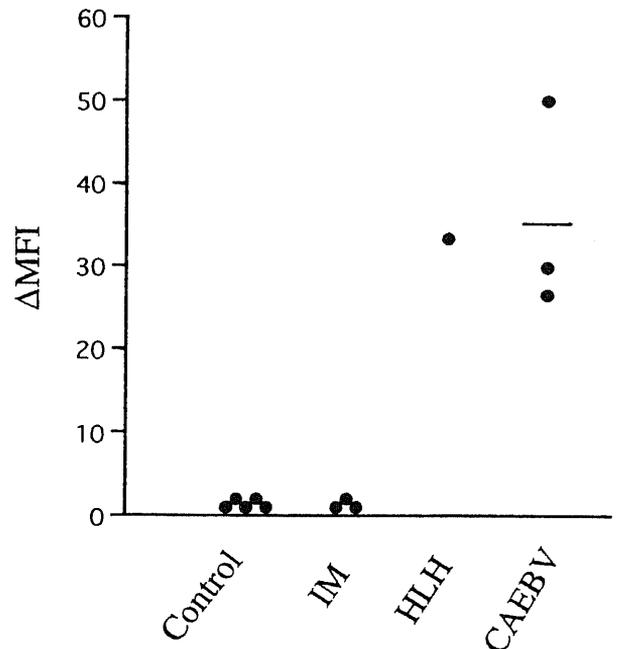


Fig. 12. Comparison of EBV1 expression in clinical samples. The expression of EBV1 in various EBV-related patients and normal healthy volunteers was analyzed by ISH/FCM and the Δ MFI values were compared. IM, infectious mononucleosis; HLH, hemophagocytic lymphohistiocytosis; CAEBV, chronic active EBV infection.

考 察

EBV 持続感染細胞では細胞株により感染ウイルスゲノム数が異なっていることが以前から知られている。Brandsna 等³⁰⁾は核酸スポットハイブリダイゼーションにより、B95-8 や Raji その他のバーキットリンパ腫由来 EBV 持続感染細胞株、および臍帯血由来の LCL の感染ウイルスゲノム数を検討した。その結果、B95-8 では細胞 1 個あたり約 200 のウイルスゲノムが感染しており、Raji では約 100、LCL では約 1 であった。別の報告では、B95-8 における感染ウイルスゲノム数は 1 細胞あたり約 400 としている³¹⁾。さらに Lerner 等³²⁾は、Raji 細胞 1 個における EBV1 発現が 10^7 コピーであるのに対して、LCL では、EBV1 発現がわずかであることから、EBV1 発現量は感染ウイルスゲノム数を反映している可能性を示唆した。その後 EBV1 発現に関する検討が数多くの研究者の手によってなされ、167 塩基からなる蛋白をコードしない RNA であり³³⁾、La 蛋白と結合して核に局限して存在¹⁸⁾し、EBV 潜伏感染状態での発現量は大量だが、増殖サイクルではウイルスゲノム数は増加しても EBV1 発現量は変わらないか、もしくは低下すると報告されている³⁴⁾。現在ではその二次構造や La 蛋白結合部位も明らかとなっているが³⁵⁾、転写調節機構³⁶⁾や機能的意義は明らかではない。しかし大量に発現していることから ISH 法に利用されている。

本法でも EBV1 を標的とした ISH 法を行なうことにより、その大量のコピー数のため以前の報告に見られるような PCR による増幅を組み合わせる必要なく、簡単な手技で EBV 感染細胞の検出が可能であった。また本法では、従来のアルカリフ

アスファターゼ標識プローブを用いた方法で確認されていた、各細胞株および個々の細胞の染色性の違いが蛍光輝度の差として数値で表わされ、EBER1陽性細胞数およびEBER1発現量の差をより客観的に評価できると考えられた。細胞株間の差異では、B95-8で最も平均蛍光輝度が高く、EBV腫瘍細胞株では中等度、LCLでは低い傾向を示したが、この結果は過去の報告の感染ウイルスゲノム数の違いと相関性があり、潜伏感染細胞ではEBER1発現量はウイルスゲノム数を反映する可能性が強く示唆される。

本法のようなISH/FCMを用いたEBER1陽性細胞の検出方法は、1997年にCrouchら³⁹⁾によって培養細胞株を用いた検討が、初めて報告された。さらに同年、Justら³⁸⁾は、DNAプローブではなく、ペプチド核酸 (peptide nucleic acid, PNA) プローブを用いた、本方法と類似のEBV感染細胞検出方法を報告している。PNAは構造がDNAに類似しており、配列特異的にDNAまたはRNAに核酸以上の高い親和性を持って結合する。さらにEBER1単独ではなくEBER2に対するプローブを混合することにより、培養細胞株での検出感度を0.5%と報告している。彼らの方法はCrouchら³⁹⁾の方法に比べ、陽性細胞の検出率は高いが陰性細胞の疑陽性率がやや高い。また培養細胞株のみを用いた検討であるため、このような高い検出頻度をEBER1発現の低い臨床検体の評価においてどの程度保てるか疑問である。

今回の研究では、当科および関連施設にて経験したCAEBV 3例、HLH 1例、IM 3例について末梢血リンパ球における感染細胞の評価を行なった。EBV感染症にはさまざまな病態があるがCAEBVやEBV感染によるHLHが、近年、予後不良の疾患として注目されている。CAEBVは、1986年Rickinson³⁹⁾がCAEBV、慢性症候性EBV感染症として診断基準を提唱し、広く知られるようになった疾患である。しかしこの診断基準には重症度が反映されず、また罹病期間が1年あるいはそれ以上必要であることから病初期から重症となる症例の早期診断ができないという欠点があった。そこで現在では確定診断にはウイルスゲノムの証明が必須であり病歴も数カ月でよいとの意見もある⁴⁰⁾。またHLHは1991年Henterら⁴¹⁾によって診断のガイドラインが提唱され、1997年Imashukuら⁴²⁾が本邦の乳児及び小児例82例について検討し予後不良の疾患と報告している。Imashukuら⁴²⁾の検討では82例中13例がEBVの初感染または再活性化であり、一部のHLHにEBVが深く関与していることを示した。これらの疾患は現在のところ確立した治療法はなく宿主側の免疫異常も示唆されていることから、ステロイド、エトポシドなどを主体とした免疫化学療法⁴³⁾や骨髄移植も検討されている。いずれにしても、これらの疾患の早期診断および厳重な経過観察が現時点では大変重要である。今回検討したCAEBV 3例はいずれも症状軽快時の検体を用いて検討したが、すべての症例でEBER1陽性細胞が明らかに検出された。フローサイトメトリーによるmRNA検出方法は簡便で特異性が高く、末梢血リンパ球数が極端に低値でなければ大量の採血を必要としないため、慢性に経過する患者の経過観察に適した方法と考えられた。またEBV急性感染症において、一般に治療反応性がよく予後の良好なIMでは検出感度以下であるのに対し、予後不良なHLHではEBER1陽性細胞が検出されることから重症例の鑑別ができると考えられる。また今回の検討ではCAEBV3例の内、症例#1、#2が解析時ほぼ無症状であったのに対し症例#3は軽度ながら明らかな症状が持続していた。したがっ

て症例#1、#2に比べ症例#3のEBER1陽性細胞における蛍光強度が明らかに高かった事実は、このような病勢の違いを反映している可能性が示唆された。今後、個々の症例における経時変化や種々の異なる病態におけるEBER1陽性細胞率や蛍光輝度のデータ集積により、EBER1発現量の差が病態や病勢に及ぼす影響が明らかになると考えられる。

本法により種々の細胞の検討を行なっていく過程で、以前から示唆されていた同一細胞株における個々の細胞の染色性の違いがヒストグラムにおけるEBER1陽性細胞の幅広い分布によって明らかに示された。過去の報告では、同一細胞株由来の異なるクローンにおける感染ウイルスゲノム数にはかなりの差があり、この点からはウイルスゲノム数の違いを反映している可能性が推察され、我々の検討でも核酸ドットプロットハイブリダイゼーションで得られたウイルスゲノム量とEBER1発現量が比例関係にあることを示唆するデータが得られている。しかし今回の解析で使用したような短期間の経代培養細胞で潜伏感染細胞における感染ウイルスゲノム数が変化すると考えにくく、またEBER1発現に関し、ウイルス増幅サイクルに入った細胞での発現増加は見られないとの報告はあるものの、潜伏感染状態での調節機構が明らかにされていない現在では、ウイルスゲノム数が一定であっても個々の細胞におけるEBER1発現量に差がある可能性を完全に否定することはできない。今後も、この点を含めたEBER1発現調節に関する基礎的検討が必要である。

現時点では、本法における検出可能なEBV陽性細胞比率は、B95-8およびMolt4の混合細胞浮遊液を用いた感度検定では1.6%であった。しかしこの結果は、個々の細胞の蛍光輝度の高いB95-8を用いた場合の結果であり、LCLや臨床検体などの陽性細胞比率が低く、かつ個々の細胞の蛍光輝度の低い検体では検出率が悪いと考えられる。この点に関しては、特に臨床応用においては欠点となるが、プローブの標識をFITCからビオチン (biotin) またはジゴキシゲニン (digoxigenin) とすることにより、EBER1のシグナルを増幅することで解決できると考えられる。また本方法で用いた固定細胞は、2年間保存後の解析でも固定直後の解析結果と同様の結果が得られ長期保存が可能であるため、本方法は臨床検体の評価法として有用である。

さらにCrouchら³⁹⁾は、培養細胞を用いた検討で、EBER1の発現とともにEBVの増殖サイクル初期に発現する遺伝子BHLF-1をISHし、フローサイトメトリーにて2カラー法で解析しており、これにより潜伏感染細胞とウイルス粒子複製細胞を鑑別できる可能性を示している。今後さらに他のウイルス遺伝子との複数パラメーター解析を行なうことにより、その細胞におけるウイルスの感染様式を容易に知ることが可能となると期待される。それとともにウイルス感染細胞の表面抗原との2カラー法により簡便に感染細胞を同定できる可能性をも秘めている。現在CAEBVの病因として、患者側のEBV特異的な細胞傷害性Tリンパ球 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) の機能異常の存在が示唆されている^{44,45)}。しかし、患者にHLA一致の正常EBV既感染者由来のEBV特異的CTLを輸注し、患者末梢血中のEBV感染細胞数を減少させても病状に著変は見られなかったという報告^{46,47)}があり、ウイルス感染細胞の詳細な解析が今後も必要であると考えられる。このような背景の中で、本法は手技が簡便で、解析結果が明確であり、将来的に他の遺伝子や細胞マーカーの解析と組合わせて解析できる可能性を持ち、優れた

基礎的研究及び臨床評価手技となると考えられた。

結 論

ISH/FCM を用いた EBER1 mRNA 発現の解析により EBV 感染細胞の検出を試み、以下のような結果を得た。

1. 培養細胞株を用いた検討では、高い特異性を持って EBV 感染細胞が検出された。

2. 過去に報告された同様の検出法に比べ感受性の点ではやや劣るが、プローブが直接蛍光標識されているため手技が簡便であった。

3. 陽性細胞比率の低い検体の評価は、現在の方法のままでは限界がありプローブの工夫や増幅法の検討が必要と思われた。

4. 過去の報告はいずれも培養細胞株を用いた検討のみであり、今回初めて臨床検体を用いて検討した。

5. EBV 感染細胞比率の高い患者では本法により十分に評価可能であり、このような患者では経過観察にも適した方法と考えられた。

6. 以前より示唆されていた同一細胞株の個々の細胞における染色性の違いが、明らかに存在し、細胞の経代培養中に変化することが示された。

以上、本法は EBV 感染細胞の検出及び、EBER1 発現量の検討に有用な手技であると考えられた。

本法は、今後、EBER1 と他のウイルス遺伝子や感染細胞の表面抗原とのマルチパラメーター解析の開発により、簡便に感染ウイルスの状態や感染細胞の同定が可能となる可能性があり、強力な診断、評価手段となると考えられる。さらに、本法を駆使して、EBER1 発現調節機構や EBER1 発現量の変化の臨床的意義を明らかにすることによりその有用性は広がると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました小泉晶一教授に深く謝意を表するとともに、始終直接の御指導と御協力を賜りました、金沢大学医学部保健学科谷内江昭宏教授に深謝いたします。また、本研究に対し貴重な情報及び検体を提供くださいました富山医科薬科大学小児科、金兼弘和博士に深く感謝いたします。最後に本研究の遂行にあたり御協力を頂きました小児科学教室の諸先生方に厚く御礼申し上げます。なお、本研究は文部省平成9年度科学研究費補助金にて遂行し、本論文の一部は第27回日本免疫学会学術総会(1997 札幌)にて発表した。

文 献

- 1) Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet*: 702-703, 1964
- 2) Straus SE, Cohen JI, Tosato G, Meier J. Epstein-Barr virus Infections: Biology, pathogenesis, and management. *Ann Intern Med* 118: 45-58, 1993
- 3) Kanegane H, Kanegane C, Yachie A, Miyawaki T, Tosato G. Infectious mononucleosis as a disease of early childhood in Japan caused by primary Epstein-Barr virus infection. *Acta Paediatr Jpn* 39: 166-171, 1997
- 4) Tugwood JD, Lau W-H, O S-K, Tsao S-Y, Martin WMC, Shiu W, Desgranges C, Jones PH, Arrand JR. Epstein-Barr Virus-specific transcription in normal and malignant nasopharyngeal biopsies and in lymphocytes from healthy donors and infectious

mononucleosis patients. *J Gen Virol* 68: 1081-1091, 1987

- 5) Weiss LM, Movahed LA, Warenke RA, Sklar J. Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 320: 502-506, 1989
- 6) 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
- 7) Takahashi K, Kashima K, Daa T, Yakoyama S, Nakayama I, Noguchi S. Contribution of Epstein-Barr virus to development of malignant lymphoma of the thyroid. *Pathol Int* 45: 366-374, 1995
- 8) Leyvraz S, Henle W, Chahinian AP, Perlmann C, Klein G, Gordon RE, Rosenblum M, Holland JF. Association of Epstein-Barr virus with thymic carcinoma. *N Engl J Med* 312: 1296-1299, 1985
- 9) Harabuchi Y, Yamanaka N, Kataura A, Imai S, Kinoshita T, Mizuno F, Osato T. Epstein-Barr virus in nasal T-cell lymphomas in patients with lethal midline granuloma. *Lancet* 335: 128-130, 1990
- 10) Kanegane K, Yachie A, Miyawaki T, Tosato G. EBV-NK cells interactions and lymphoproliferative disorders. *Leuk Lymphoma* 29: 491-498, 1998
- 11) Cochet C, Renoir DM, Grunewald V, Bosq J, Cochet G, Schwaab G, Bernaudin JF, Joab I. Expression of the Epstein-Barr virus immediate early gene, BZLF1, in nasopharyngeal carcinoma tumor cells. *Virology* 197: 358-365, 1993
- 12) Yip TTC, Ngan RKC, Lau WH, Poon YF, Joab I, Cochet C, Cheng AKP. A possible prognostic role of immunoglobulin-G antibody against recombinant Epstein-Barr virus BZLF-1 transactivator protein ZEBRA in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 74: 2414-2424, 1994
- 13) Zhang Q, Gutsch D, Kenny S. Functional and physical interaction between p53 and BZLF1: implications for Epstein-Barr virus latency. *Mol Cell Biol* 14: 1929-1938, 1994
- 14) Sista ND, Pagano JS, Liao W, Kenney S. Retinoic acid is a negative regulator of the Epstein-Barr virus protein (BZLF1) that mediates disruption of latent infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3894-3898, 1993
- 15) Gutsch DE, Holley-Guthrie EA, Zhang Q, Stein B, Blonar MA, Baldwin AS, Kenney SC. The bZIP transactivator of Epstein-Barr virus, BZLF1, functionally and physically interacts with the p65 subunit of NF-kB. *Mol Cell Biol* 14: 1939-1948, 1994
- 16) 永里弘子, 徳永正義, 小山田誠朋, 山下勝江, 藤崎人美, 久保清博, 有森美夏, 鶴田みどり, 竹内まさ子, 金田ゆかり, 徳留隆博, 植村芳子. 病理組織標本における Epstein-Barr Virus (EBV) の証明法. *病理と臨床* 10: 951-955, 1992
- 17) 大石 勉, 荒井 孝, 関 孝, 石川美香, 鍵本聖一, 山本英明, 城 宏輔. 再活性化抗 Epstein-Barr ウイルス抗体反応を呈する患児における末梢血中 Epstein-Barr ウイルス感染細胞の定量的検出. *日小会誌* 99: 622-629, 1995
- 18) Howe JG, Steitz JA. Localization of Epstein-Barr virus-encoded small RNAs by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 9006-9010, 1986
- 19) Butler AE, Colby TV, Weiss L, Lombard C.

- Lymphoepithelioma-like carcinoma of the lung. *Am J Surg Pathol* 13: 8; 632-639, 1989
- 20) Hamilton-dutoit SJ, Therkildsen MH, Nielsen NH, Jensen H, Hansen JPH, Pallesen G. Undifferentiated carcinoma of the salivary gland in Greenlandic Eskimos. *Hum Pathol* 22: 811-815, 1991
- 21) Gal AA, Unger ER, Koss MN, Yen TSB. Detection of Epstein-Barr virus in lymphoepithelioma-like carcinoma of the lung. *Modern Pathol* 4: 2; 264-268, 1991
- 22) Bashir RM, Hochberg FH, Harris NL, Purtilo D. Variable expression of Epstein-Barr virus genome as demonstrated by in situ hybridization in central nervous system lymphomas in immunocompromised patients. *Mod Pathol* 3: 4; 429-434, 1990
- 23) Hironaka T, Nagasaki M, Morikawa S, Hirai K. Detection of Epstein-Barr virus transcripts in chemically or immunologically-activated cells and in a null cell-line (HLN-STL-C) by in situ hybridization with alkaline phosphatase-linked oligonucleotide probes. *J Virol Methods* 4: 141-154, 1993
- 24) 水柿雄三, 篠崎文彦. Sjögren 症候群の唾液腺組織における EB ウイルスの存在. *Molecular Medicine* 34: 11; 1400-1405, 1997
- 25) Trask B, Engh GVD, Landegent J, Wal NJID, Ploeg MVD. Detection of DNA sequences in nuclei in suspension by in situ hybridization and dual beam cytometry. *Science* 230: 1401-1403, 1985
- 26) Bauman JGJ, Bentvelzen P. Flow cytometric detection of ribosomal RNA in suspended cells by fluorescent in situ hybridization. *Cytometry* 9: 517-524, 1988
- 27) Yu H, Ernst L, Wagner M, Waggoner A. Sensitive detection of RNAs in single cell by flow cytometry. *Nucl Acids Research* 20: 1; 83-88, 1991
- 28) Arkesteijn GJA, Erpelinck SLA, Martens ACM, HAgenbeek A. Chromosome specific DNA hybridization in suspension for flow cytometric detection of chimerism in bone marrow transplantation and leukemia. *Cytometry* 19: 353-360, 1995
- 29) Kanegane H, Wada T, Nunogami K, Seki H, Taniguti N, Tosato J. Chronic persistent Epstein-Barr virus infection of natural killer cells and B cells associated with granular lymphocytes expansion. *Br J Haematol* 95: 116-122, 1996
- 30) Brandsna J, Miller G. Nucleic acid spot hybridization: Rapid quantitative screening of lymphoid cell lines for Epstein-Barr viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 6851-6855, 1980
- 31) Sugden B, Phelps M, Domoradzki J. Epstein-Barr virus DNA is amplified in transformed lymphocytes. *J Virol* 31: 590-595, 1979
- 32) Lerner MR, Andrews NC, Miller G, Steitz JA. Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with protein are precipitated by antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 805-809, 1981
- 33) Arrand JR, Rymo L. Characterization of the major Epstein-Barr Virus-specific RNA in Burkitt lymphoma-derived cell. *J Virol* 41: 376-389, 1982
- 34) Weigel R, Fischer DK, Heston L, Miller G. Constitutive expression of Epstein-Barr virus-encoded RNAs and nuclear antigen during latency and after induction of Epstein-Barr virus replication. *J Virol* 53: 254-259, 1985
- 35) Glickman JN, Howe JG, Steitz JA. Structural analyses of EBER1 and EBER2 ribonucleoprotein particles present in Epstein-Barr virus-infected cells. *J Virol* 62: 902-911, 1988
- 36) Howe JG, Shu MD. Epstein-Barr Virus Small RNA (EBER) gene: unique transcription units that combine RNA polymerase II and III promoter elements. *Cell* 57: 825-834, 1989
- 37) Crouch J, Leitenberg D, Smith BR, Howe JG. Epstein-Barr virus suspension cell assay using in situ hybridization and flow cytometry. *Cytometry* 29: 50-57, 1997
- 38) Just T, Burgwald H, Broe MK. Flow cytometric detection of EBV (EBER snRNA) using peptide nucleic acid probes. *J Virol Meth* 73: 163-174, 1998
- 39) Rickinson AB. Chronic symptomatic Epstein-Barr virus infections. *Immunol Today* 7: 1; 13-14, 1986
- 40) 河 敬世, 石原重彦. 慢性活動性 EB ウイルス感染症. *病理と臨床* 13: 8; 1091-1097, 1995
- 41) Henter JI, Elinder G, Ost A FHL Study group of the histiocyte society. diagnostic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Semin Oncol* 18: 1; 29-33, 1991
- 42) Imashuku S, Hibi S, Todo S. Hemophagocytic lymphohistiocytosis in infancy and childhood. *J Pediatr* 130: 352-357, 1997
- 43) Imashuku S, Hibi S, Ohara T, Iwai A, Sako M, Kato M, Arakawa H, Sotomitsu M, Kataoka S, Asami K, Hasegawa D, Kosaka Y, Sano K, Igarashi N, Maruhashi K, Ichimi R, Kawasaki H, Maeda N, Tanizawa A, Arai K, Abe T, Hisakawa H, Miyashita H, and Jan-Inge Henter for the Histiocyte Society. Effective control of Epstein-Barr virus-related hemophagocytic lymphohistiocytosis with immunochemotherapy. *Blood* 93: 6; 1869-1874, 1999
- 44) 木村 宏, 拓植郁也, 山本光章, 安藤嘉浩, 工藤豊一郎, 三輪田博介, 森島恒雄, 今井章介, 大里外登郎. 慢性活動性 Epstein-Barr ウイルス感染症におけるウイルス学的解析. *日小会誌* 99: 641-646, 1995
- 45) Ohshima K, Suzumiya J, Ohga S, Ohgami A, Kikuchi M. Integrated Epstein-Barr virus (EBV) and chromosomal abnormality in chronic active EBV infection. *Int J Cancer* 71: 943-947, 1997
- 46) Kimura H, Tsuge I, Imai S, Yamamoto M, Kuzushima K, Osato T, Morishima T. Intact antigen presentation for Epstein-Barr virus (EBV)-specific CTL by a lymphoblastoid cell line established from a patient with severe chronic active EBV infection. *Med Microbiol Immunol* 184: 63-68, 1995
- 47) 葛島清隆, 森島恒雄. EB ウイルス特異的 CTL を用いた養子免疫療法. *日本臨床* 55: 2; 203-208, 1997

Flowcytometric Analysis of EBER1 mRNA Expression and Evaluation of Its Clinical Significance Miho Kudo,
Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **109**, 87 — 98
(2000)

Key words Epstein-Barr virus, EBER1, *in situ* hybridization, flow cytometry

Abstract

Epstein-Barr virus (EBV) is prevalent among the adult population and it persists within the B lymphocytes in latent forms throughout life, with infectious mononucleosis being a well recognized, self-limited EBV-related acute infection. However, increasing numbers of other illnesses are now known to be associated with this particular herpes virus, such as hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH), chronic active EBV infection (CAEBV) and various malignant neoplasms, including nasopharyngeal carcinoma, Hodgkin's disease and gastric carcinoma. Study of these diseases suggests that the cellular targets of viral infection and the modes of the latency of viruses greatly modify the pathogenesis of EBV-related illnesses. EBV-encoded small RNA-1 (EBER1) is expressed in abundance in virtually every cell infected with EBV, regardless of the mode of latency and therefore its expression is often used as a sensitive indicator of EBV association with certain illnesses. In this study, the clinical relevance of *in situ* hybridization flowcytometric analysis (ISH/FCM) of EBER1 expression was evaluated to identify EBV-infected cells quantitatively. Preliminary experiments showed that ISH/FCM using a fluorescence-labeled probe for EBER1 mRNA enabled a more quantitative evaluation of the fraction of infected cells within a sample population than standard ISH using an alkaline phosphatase-labeled probe. However, the former was less sensitive when the fraction of infected cells was smaller than 1 percent. Levels of EBER1 expression varied among different cell lines and the distribution of fluorescence intensity within a single cell population was relatively wide, indicating that EBER1 expression is controlled by multiple mechanisms. Importantly, the virus-infected cells were easily detectable within peripheral lymphocytes from patients with HLH and CAEBV, but not from normal controls or patients with acute infectious mononucleosis. EBER1 ISH/FCM may serve as a useful tool for relatively easy monitoring of the target cells and the modes of infection in these patients. Further information is expected to be derived from a multiparameter analysis of EBER1 expression versus expressions of the different EBV-related genes and the surface antigens of infected cells.