

Detection of the Epstein-Barr Virus-associated Primary Gastric Lymphoma by EBER in situ Hybridization

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/2297/9305

胃原発非ホジキンリンパ腫におけるEBウイルスの 関与に関する臨床病理学的研究

金沢大学医学部内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

服 部 憲 尚

各種悪性腫瘍の発症にEBウイルス (Epstein-Barr virus, EBV) の関与が注目されているが、本研究では胃原発非ホジキンリンパ腫 (non-Hodgkin's lymphoma, NHL) にどの程度EBVが関わっているかをEBVがコードする核内小RNA (EBV-encoded small RNA, EBER) に対する生体内局所ハイブリダイゼーション (in situ hybridization, ISH) および免疫組織化学染色を用いて検討した。対象は金沢大学医学部附属病院第三内科および関連病院における胃原発NHL66例で、生検あるいは摘出標本のパラフィン切片を脱パラフィン後EBERにてISHを行い潜伏感染の有無を検索した。同時にリンパ腫発症との関係を知る目的で、潜在EBV関連遺伝子産物である膜蛋白 (latent membrane protein-1, LMP-1) およびEBV関連核抗原 (EBV-associated nuclear antigen-2, EBNA-2), p53蛋白についてそのモノクローナル抗体 (monoclonal antibody, MoAb) を用いて免疫染色を行い検討した。さらに陽性例についてはbcl-2蛋白をそのMoAbを用いて検索した。対照として同様の検討を節性B細胞性NHL54例でも行い比較した。その結果、EBERは胃原発NHL6例 (9.1%) で陽性となった。そのうち2例は粘膜関連リンパ組織型 (mucosa-associated lymphoid tissue, MALT) リンパ腫であった。EBER陽性6例中4例でLMP-1は陽性であったが、EBNA-2は全例で陰性であった。p53蛋白は高悪性度MALTリンパ腫の1例で陽性であったが、低悪性度MALTリンパ腫ではEBER検出の有無にかかわらず全例陰性であった。bcl-2蛋白は6例中3例で陽性であった。対照の節性B細胞性NHLでは全例EBERは陰性であった。EBER陽性胃原発NHLは高齢者に多く、いずれも巨大腫瘍または巨大潰瘍を形成していたにもかかわらず、全例寛解、生存中であり予後は比較的良好であると考えられた。したがって胃原発NHLにおけるEBVの関与は、新たな予後予測因子の一つとなる可能性があるものと考えられた。

Key words Epstein-Barr virus, Epstein-Barr virus-encoded small RNA, primary gastric lymphoma, *in situ* hybridization

EBウイルス (Epstein-Barr virus, EBV) はアフリカのパーキットリンパ腫¹⁾患者から発見されたヘルペス属のDNAウイルス²⁾で、Bリンパ球に感染し、感染したBリンパ球を不死化することが知られている。通常は唾液を介して口腔粘膜上皮やBリンパ球に感染し、その一部が免疫監視機構を逃れ潜伏感染細胞として存在し続ける^{3,4)}。

近年の分子生物学的手法の進歩により、種々の良性あるいは悪性疾患でEBVの関与が明らかとなってきており、悪性リンパ増殖性疾患や固形腫瘍の一部でも関連が報告されている^{5)~8)}。特に後天性免疫不全症候群や臓器移植における免疫抑制剤投与の患者に合併した悪性リンパ腫を含むリンパ増殖性疾患では、増殖したリンパ球内にEBVがコードする核内小RNA (EBV-encoded small RNA, EBER) が高頻度に検出される⁹⁾¹⁰⁾。これらのことやEBVがBリンパ球を不死化する¹¹⁾ことなどから、EBVがリンパ腫発症の重要な原因の一つであると考えられ

ている。また、EBERによる生体内局所ハイブリダイゼーション (*in situ* hybridization, ISH) 法の開発により容易にEBV感染の有無が観察できるようになったために、これまでEBVとの関連が想定されていなかった上皮性あるいは非上皮性腫瘍でも検索がなされるようになった。特に胃癌でEBVの存在を証明したとの報告が相次ぎ、日本人では胃癌症例の8.6%に癌組織でのEBVの感染が証明されている¹²⁾。組織型ではリンパ上皮腫類似胃癌に高頻度にEBVの潜伏感染が認められている。胃粘膜への感染経路については、リンパ球を介する経路や唾液中のEBV粒子の嚥下を介する経路などが想定¹³⁾¹⁴⁾されている。

このような背景から本研究では、胃原発非ホジキンリンパ腫 (non-Hodgkin's lymphoma, NHL) におけるEBVの関与を検討した。なお、対照として節性B細胞性NHLを選び比較した。検索方法としてはEBERによるISH (EBER-ISH) 法¹⁵⁾¹⁶⁾を用いた。EBERはEBVに持続感染した細胞内では大量に発現しており、

平成10年1月13日受付, 平成10年4月21日受理

Abbreviations: DEPC, diethylpyrocarbonate; EBV, Epstein-Barr virus; EBER, EBV-encoded small RNA; EBNA, Epstein-Barr virus-associated nuclear antigen; FITC, fluorescein isothiocyanate; ISH, *in situ* hybridization; LMP, latent membrane protein; MALT, mucosa-associated lymphoid tissue; MoAb, monoclonal antibody; NHL, non-Hodgkin's lymphoma; TBS, tris buffered saline

その細胞1個当りのコピー数は 10^7 個にも及ぶために、EBER-ISHは現在用いられているEBV検出法のなかで最も感度が高い。本法は、通常のパラフィン標本での検出が可能で、しかも組織の形態保持が良いことからEBV感染細胞の種類を同定でき、また、形質発現を保持した状態でISHによる観察ができるという利点がある。

さらに本研究では、潜在EBV関連遺伝子産物として膜蛋白(latent membrane protein-1, LMP-1¹⁷⁾、EBV関連核抗原(EBV-associated nuclear antigen-2, EBNA-2¹⁸⁾)についても検討した。また、これらによって発現に影響を受けると考えられているがん抑制遺伝子産物であるp53蛋白¹⁹⁾²⁰⁾、がん遺伝子産物であるbcl-2蛋白²¹⁾の発現についても免疫組織化学染色を用いて検討した。

対象および方法

I. 対象

表1に示すように、対象は1985年から1996年までの12年間に金沢大学医学部附属病院第三内科および関連病院において胃原発NHLと診断された66例で、内訳は外科的切除標本46例、内視鏡下生検標本20例である。性別は男性39例、女性27例で、年齢の中央値は59歳であった。なお、胃原発と診断した根拠はDawsonら²²⁾の診断基準に従った。対照群として節性B細胞性NHL54例を用いた。性別は男性34例、女性20例で、年齢の中央値は55歳であり、胃原発NHL群と比較して大きな偏りは認めなかった。病理組織学的分類は、ワーキングフォーミュレーション(Working Formulation)分類に従った。但し、MALTリンパ腫については、この分類とは別に示した。

II. 方法

1. 生体内局所ハイブリダイゼーション

ホルマリン固定後、パラフィン包埋され常温で保存されてい

たブロック標本よりミトクロームを用いて切片を作製した。スライドガラスには切片の剥離を防止するためにシランコーティングスライド(DAKO, Glostrup, Denmark)を用いた。標本はキシレンにて脱パラフィンした後、アルコール系列を通して風乾した。次にプロープの浸透性を高めるために除タンパク処理を行った。まず、0.2N塩酸に10分間浸し、つづいて0.15M NaClを含む0.05M トリス塩酸緩衝液(tris buffered saline, TBS)(pH7.6)(DAKO)で3分ずつ3回洗浄した。次にプロテアーゼK(DAKO)をTBSで $10 \mu\text{g/ml}$ の濃度に調整し、37°Cで5分間浸した。その後ジエチルピロカーボネート(diethylpyrocarbonate, DEPC)(Sigma, St Louis, USA)を蒸留水で0.1%に調整し、一昼夜室温放置しオートクレーブにかけた。この0.1% DEPC溶液を用いて3分ずつ3回洗浄し、再びアルコール系列を通して風乾した。続いてハイブリダイズするプロープが非特異的に結合しないように、0.25%無水酢酸を含む0.1M トリエタノールアミン(和光純薬工業, 大阪)溶液に切片を浸してアセチル化し、0.1% DEPC溶液で3分ずつ3回洗浄した後、アルコール系列を通して脱水、風乾した。

次にフルオレッセインイソチオシアネート(fluorescein isothiocyanate, FITC)標識EBERオリゴヌクレオチドプロープ(DAKO)を用いてハイブリダイゼーションを行った²³⁾。切片に約 $20 \mu\text{l}$ のプロープを滴下し、リボヌクレアーゼによるプロープの分解を防止するためにシリコン処理したカバーガラス(Sigma)をのせて、37°Cで2時間湿潤箱の中でハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後の洗浄は、TBSの中でカバーガラスをはずした後、同じ液で5分ずつ3回行い、次に標準クエン酸食塩水(standard saline citrate)(DAKO)に37°Cで30分間浸した。ハイブリダイゼーションしたプロープの発色は、以下のように行った。標本をTBSで5分間1回洗浄後、濾紙で切片周囲の余分な水分を除去し、アル

Table 1. Clinicopathological findings in primary gastric lymphoma cases and nodal B-cell lymphoma cases

Clinicopathological findings	No. of cases	
	Primary gastric lymphoma	Nodal B-cell lymphoma
No. of cases examined	66	54
Sex		
Male	39	34
Female	27	20
Age (years)		
Range	21-86	14-82
Median	59	55
Pathology		
F small cleaved	0	15
F mixed	0	3
F large	0	5
D small cleaved	15	11
D mixed	3	3
D large	35	17
MALT type	13	0
Immunophenotype		
B	66	54
T	0	0

F, follicular; D, diffuse; MALT, mucosa-associated lymphoid tissue; B, B-cell; T, T-cell.

カリフォスファターゼ標識抗FITCウサギポリクローナル抗体 (DAKO) と20分間反応させた後TBSで3分ずつ2回洗浄した。

次に発色基質 (5-bromo-4-chloro-3-indoxyl phosphate/nitro blue tetrazolium chloride) (DAKO) を用いて暗所で1時間反応させた²⁴⁾。その後流水で洗浄し、0.1%メチルグリーン (Sigma) 溶液で後染色を行い、グリセロールゲル (DAKO) にて封入した。陽性コントロールとして既知のEBER陽性ホジキン病リンパ節組織パラフィン包埋薄切標本 (DAKOより供与) を、陰性コントロールとして既知のEBER陰性ホジキン病リンパ節組織パラフィン包埋薄切標本 (DAKOより供与) を用いた。腫瘍細胞の核が50%以上染まるものをEBER陽性とした²⁵⁾。

2. 免疫組織化学染色法

抗EBV LMP-1マウスモノクローナル抗体 (monoclonal antibody, MoAb) (DAKO)²⁶⁾、抗EBV EBNA-2マウスMoAb

(DAKO)¹⁰⁾、抗ヒト p53がん抑制遺伝子産物マウスMoAb (DAKO)²⁷⁾および抗ヒト bcl-2がん遺伝子産物マウスMoAb (DAKO)²⁸⁾を用いて免疫染色を行った。ISHと同様に、作製した薄切標本を脱パラフィンした後アルコール系列を通して風乾し、次に10mMクエン酸緩衝液 (pH6.0) に浸して5分間マイクロウェーブで処理した。なお、10mMクエン酸緩衝液はクエン酸一水和物2.1gを900mlの蒸留水に溶解し2M NaOHでpH6.0に調整したものをを用いた。

次に内因性ペルオキシダーゼを阻害するために3%過酸化水素水 (DAKO) に5分間浸した。さらに非特異的反応を防ぐためにウシ血清アルブミン (DAKO) に5分間浸した。ウシ血清アルブミンをTBSで100倍に希釈した抗体希釈液 (DAKO) を用いて、それぞれ25倍、30倍、50倍、50倍に希釈した抗EBV LMP-1マウスMoAb、抗EBV EBNA-2マウスMoAb、抗ヒト

Table 2. The prevalence of EBV-associated gene products and p53 in primary gastric lymphoma and nodal B-cell lymphoma

Origin	Pathology	No. of cases examined	No. of expression-positive cases			
			EBER	LMP-1	EBNA-2	p53
Gastric lymphoma	Total	66	6*	4	0	20
	D small cleaved	15	1	0	0	5
	D mixed	3	1	1	0	2
	D large	35	2	2	0	12
	MALT type high-grade	1	1	0	0	1
	low-grade	12	1	1	0	0
Nodal lymphoma	Total	54	0	0	ND	ND
	F small cleaved	13	0	0	ND	ND
	F mixed	1	0	0	ND	ND
	F large	5	0	0	ND	ND
	D small cleaved	11	0	0	ND	ND
	D mixed	7	0	0	ND	ND
	D large	17	0	0	ND	ND

D, diffuse; F, follicular; MALT, mucosa-associated lymphoid tissue; ND, not done.

* p<0.05 compared with the prevalence of EBER in nodal B-cell lymphoma by Fisher's exact test.

Table 3. Cases of EBER-positive primary gastric lymphoma

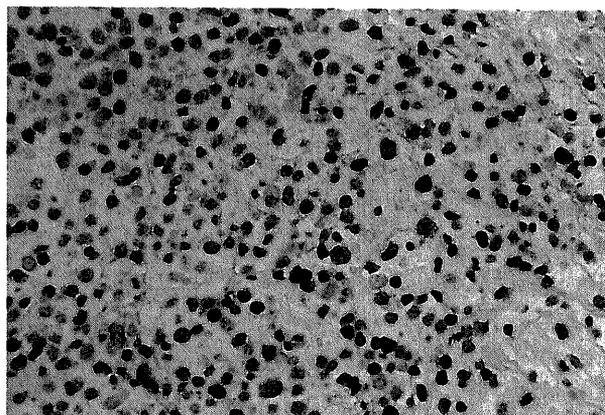
Case no.	Sex	Age (years)	Pathology	Expression			
				LMP-1	EBNA-2	p53	bcl-2
1	M	67	D small cleaved, B	-	-	+	-
2	M	59	D mixed, B	+	-	-	+
3	M	63	D large, B	+	-	+	+
4	F	86	D large, B	+	-	+	-
5	M	60	MALT type, B (low-grade)	+	-	-	+
6	F	74	MALT type, B (high-grade)	-	-	+	-

M, male; F, female; D, diffuse; MALT, mucosa-associated lymphoid tissue; B, B-cell; +, positive; -, negative.

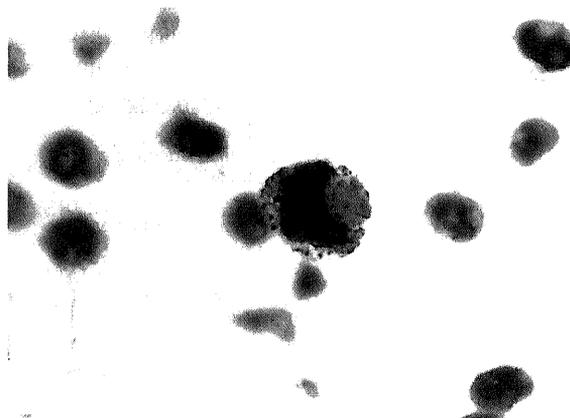
p53がん抑制遺伝子産物マウスMoAbおよび抗ヒトbcl-2がん遺伝子産物マウスMoAbを一次抗体として20分間反応させた後TBSで5分間ずつ3回洗浄した。次にビオチン化二次抗体(DAKO)と20分間反応させ、さらにペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(DAKO)と10分間反応させた後、緩衝液で5分間ずつ3回洗浄した。最後にペルオキシダーゼ発色基質溶液と10分間反応させた後蒸留水に浸し反応を停止させた。カラッチヘマトキシリン(Sigma)で後染色を行いグリセロールゲルにて封入した。陽性コントロールとしてLMP-1には既知のLMP-1陽性ホジキン病リンパ節組織パラフィン包埋薄切標本(DAKOより供与)を、EBNA-2には既知のEBNA-2陽性日和見リンパ腫の小腸粘膜組織パラフィン包埋薄切標本(DAKOより供与)を、p53蛋白には既知のp53蛋白陽性肺癌組織パラフィン包埋薄切標本(DAKOより供与)を、bcl-2蛋白には既知のbcl-2蛋白陽性濾胞性リンパ腫のリンパ節組織パラフィン包埋薄切標本(DAKOより供与)を用いた。陰性コントロールとしてサブクラスIgG1マウスMoAb(DAKO)を一次抗体として用いた。腫瘍細胞が10%以上染まるものを陽性とした²⁹⁾。

3. 同一切片におけるLMP-1とEBERの二重染色
免疫組織化学染色に示した方法に従い、先ずLMP-1の免疫組織

化学染色を行い、後染色は行わずに引き続き生体内局所ハイブリダイゼーションに示したプロテアーゼK処理に移った。以降、同様の操作にてハイブリダイゼーションを行った。

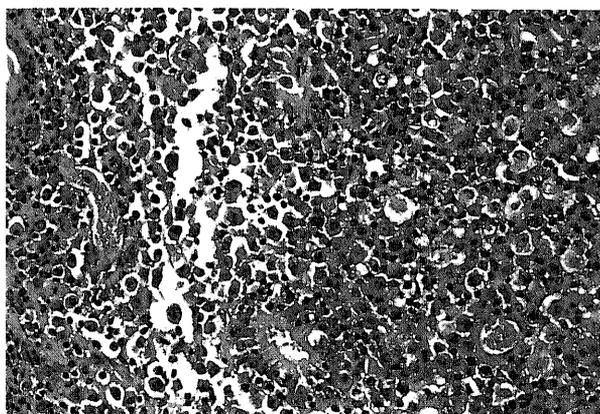


A

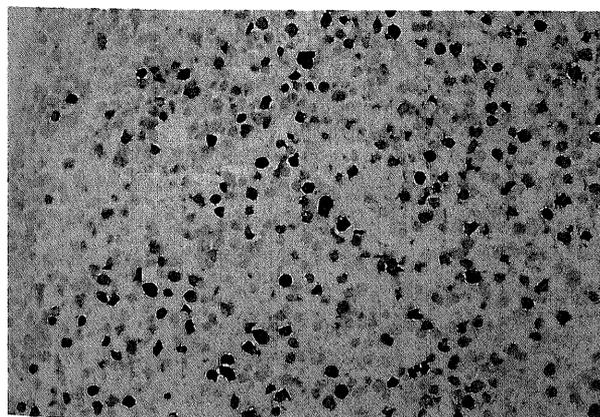


B

Fig. 2. Double immunostaining combining ISH for EBER and labelled streptavidin-biotin (LSAB) for LMP-1 (case no.3 in Table 3.). (A) Original magnification $\times 200$. (B) $\times 1,000$.



A



B

Fig. 1. An example of EBER-positive gastric lymphoma (case no.3 in Table 3.). (A) H-E stain, original magnification $\times 200$. (B) This case diagnosed as EBER-positive. The majority of lymphoma cells show positive nuclear staining using an *in situ* hybridization (ISH) technique. Original magnification $\times 200$.

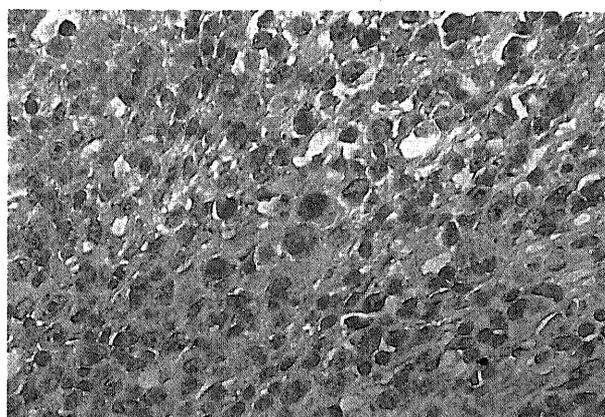


Fig. 3. A case diagnosed as p53-positive. Some lymphoma cells in high-grade lesions of MALT lymphoma show positive nuclear staining using LSAB technique. case no.6 in Table 3. Original magnification $\times 400$.

Ⅲ. 統計学的検討

対象となる両群間のEBER陽性率の有意差検定は Fisher の直接確率計算法で行った。生存率の算出は Kaplan-Meier 法で行い、その有意差検定は Mantel-Cox 法で行った。地域別 EBV 陽性頻度の有意差検定はカイ 2 乗検定で行った。

成 績

I. 胃原発および節性B細胞性NHLにおける組織型別潜在EBV関連遺伝子産物およびp53蛋白の発現頻度

胃原発NHLと節性B細胞性NHLでEBV関連遺伝子産物の発現頻度を比較した(表2)。EBERは胃原発NHL66例中6例(9.1%)で陽性であったが、節性B細胞性NHLでは全例陰性で

あり、両群間に有意な差($P<0.05$)を認めた。LMP-1については胃原発NHLではEBER陽性6例中4例(66.7%)で陽性となった。一方、節性B細胞性NHLでは全例陰性であった。胃原発NHLではEBNA-2は全例陰性、p53蛋白については高悪性度粘膜関連リンパ組織型(mucosa-associated lymphoid tissue, MALT)リンパ腫の1例のみ陽性であったが低悪性度MALTリンパ腫では全例陰性であった。なお、節性B細胞性NHLではEBNA-2およびp53蛋白については検討しなかった。

II. EBER陽性例における病理組織学的所見とEBV関連遺伝子産物ならびに癌遺伝子発現との関係

EBER陽性6例を表3に示す。6例中2例がMALTリンパ腫であったが、全体として組織型に偏りはみられなかった。図1に

Table 4. Clinical data on EBER-positive primary gastric lymphoma

Case no.	Macroscopic pathology	Clinical stage	Treatment	Outcome
1	9×8.5 cm ulcer affecting posterior wall at body	IV	Total gastrectomy Splenectomy CHOP×2 HBEP×3 CHEP×4	Alive in CR
2	4×3 cm ulcer affecting lesser curve at body 5×5 cm tumor affecting greater curve at body	III	Total gastrectomy CHOP×2	Alive in CR
3	6×6 cm tumor affecting greater curve at fundus	I	Total gastrectomy ACOP×5	Alive in CR
4	2×2 cm ulcer affecting anterior wall at body	I	CHOP×2	Alive in CR
5	5×5.5 cm tumor at prepylorus	IV	Subtotal gastrectomy Splenectomy CHOP×5	Alive in CR
6	7×5.5 cm tumor affecting lesser curve at body	I	Total gastrectomy Splenectomy	Alive in CR

Clinical stage, Ann Arbor classification; CR, complete remission; CHOP, cyclophosphamide 750 mg/m² intravenous drip infusion (day 1) doxorubicin 50 mg/m² intravenous drip infusion (day 1) vincristine 1.4 mg/m² intravenous bolus infusion (day 1) prednisolone 30 mg/m² oral administration (day 1 to 5); HBEP, doxorubicin 30 mg/m² intravenous drip infusion (day 1, 5) behenoylcytosine arabinoside 200 mg/m² intravenous drip infusion (day 1 to 7) etoposide 70 mg/m² intravenous drip infusion (day 1 to 5) prednisolone 40 mg/m² oral administration (day 1 to 7); CHEP, cyclophosphamide 750 mg/m² intravenous drip infusion (day 1) doxorubicin 50 mg/m² intravenous drip infusion (day 1) etoposide 70 mg/m² intravenous drip infusion (day 1 to 5) prednisolone 40 mg/m² oral administration (day 1 to 5); ACOP, doxorubicin 40 mg/m² intravenous drip infusion (day 1) cyclophosphamide 500 mg/m² intravenous drip infusion (day 1) vincristine 1.4 mg/m² intravenous bolus infusion (day 1) prednisolone 20 mg/m² oral administration (day 1 to 8).

Table 5. The incidence of EBV-associated primary gastric lymphoma in the world

Countries (districts)	No. of cases examined	No. (%) of EBER-positive cases	Reference no.
China (Hong Kong)	61	11 (18.0)	25
South Korea	64	7 (10.9)	31
Japan (Kyushu)	49	4 (8.2)	32
Germany	55	3 (5.5)	30
Japan (Hokuriku)	66	6 (9.1)	Present study

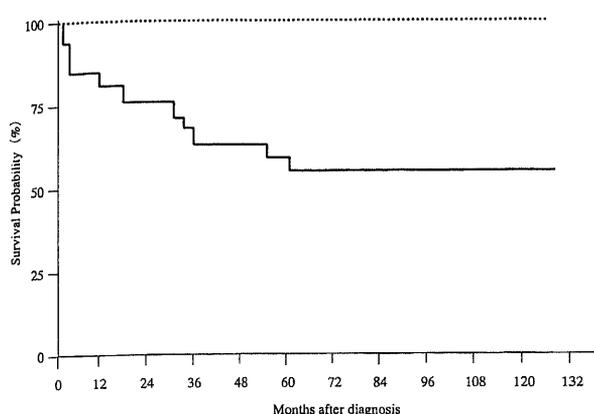


Fig. 4. Kaplan-Meier estimate of overall survival in EBER-positive primary gastric lymphoma (n=6) and EBER-negative primary gastric lymphoma (n=25). Overall survival percentages for EBER-positive and EBER-negative patients at 120 months were 100% and 54.3%, respectively ($p < 0.05$). ———, EBER-positive; ———, EBER-negative.

症例3のHE像とそれに一致する部位のEBER陽性像を示す(図1A, B)。EBER陽性6例中4例(66.7%)でLMP-1が陽性であったが、これらLMP-1陽性例についてEBERとLMP-1の二重染色を行うと、LMP-1の発現している細胞のほとんどがEBER陽性細胞であった(図2A, B)。p53蛋白はEBER陽性6例中4例(66.7%)で陽性となった。p53蛋白はMALTリンパ腫のうち高悪性度MALTリンパ腫の1例で陽性であったが、低悪性度MALTリンパ腫では全例陰性であった(表2)。症例6では、p53蛋白はMALTリンパ腫が組織学的に転換したと考えられる高悪性度MALTリンパ腫の領域では陽性であったが、低悪性度MALTリンパ腫の領域では陰性であった(図3)。bcl-2蛋白はEBER陽性6例中3例(50.0%)で陽性となった。bcl-2蛋白は生理的発現部位である非増殖性小リンパ球のみならず、EBER陽性部位における一部の腫瘍細胞でも陽性となった。

Ⅲ. EBER陽性例の臨床像

EBER陽性6例の臨床像を表4に示す。全例年齢の中央値(59歳)以上であり、高齢者に多い傾向がみられた。肉眼所見では胃体部に多くみられ、全例巨大腫瘍または巨大潰瘍を形成していたにもかかわらず、治療によく反応し、寛解、生存中である。

Ⅳ. EBER陽性例の予後

胃原発NHLのうちEBER陽性の6例と予後追跡が可能であったEBER陰性の25例の全生存率(overall survival rate)をKaplan-Meier法で比較検討した。10年生存率はEBER陽性例で100%、EBER陰性例で54.3%であり、両群間の生存率に有意な差($P < 0.05$)を認めた(図4)。

Ⅴ. 胃原発NHLにおけるEBV陽性頻度

胃原発NHLにおけるEBV陽性頻度を過去の報告と比較した(表5)。ドイツと比較すると中国、韓国などのアジア地域では陽性頻度が高いが²⁵⁾³⁰⁾³¹⁾、日本では中国よりは低い傾向³²⁾がみられた。しかし、統計学的には中国と日本の間に有意な差は認められなかった($P = 0.13$)。国内においては、九州地方での陽性頻度³²⁾と、本研究での北陸地方の陽性頻度には差は認められなかった。

考 察

近年EBVと種々の悪性腫瘍との関連についての研究が進められており、造血器腫瘍のみならず胃癌とEBVとの関連についても多数の報告がなされている。EBVは通常唾液を介して口腔粘膜上皮やBリンパ球に感染し、その一部は免疫監視機構を逃れ、終生増殖の場として存在し続ける。胃粘膜への感染経路については、リンパ球を介する経路や唾液中のEBV粒子の嚥下を介する経路などが想定されていることから、今回、胃癌と同様に胃原発NHLについてもEBVとの関連があるか否かを検討した。

なお、EBVの検出には、感受性、特異性がともに高く、パラフィン包埋切片でも検索可能なEBERに対するISH法を用いた。

今回の検討での胃原発NHLのEBER陽性率は9.1%で、対照の節性B細胞性NHLでは全例陰性であり、両群の間には有意な差が認められた。節性B細胞性NHLでEBER陽性率が4%であったとの報告³³⁾もあるが、いずれにしても胃原発NHLと比較して陽性率は低いと考えられる。日本人の胃癌組織でのEBER陽性率は8.6%であり¹²⁾、本研究での胃原発NHLにおけるEBER陽性率とはほぼ同率であったこと、またEBV関連胃癌は全組織型で認められるが、特にリンパ上皮腫類似胃癌に高頻度に認められる³⁴⁾ことは、EBVが両者に共通する発生原因の一つとなっている可能性を示唆する結果と考えられ興味深い。

EBER陽性胃原発NHLの組織分類では6例中2例がMALTリンパ腫であった。これまで、EBV関連胃原発NHLの組織分類でMALTリンパ腫の形態を示したものは欧米、中国からの報告にはなく、日本人で2例報告されているにすぎない³²⁾。本研究でのMALTリンパ腫2例のうち1例は、MALTリンパ腫の組織の一部が高悪性度リンパ腫に転換していたが、EBERは両部分ともに陽性であった。

EBV関連遺伝子産物としてLMP-1、EBNA-2について検討したところ、LMP-1はEBER陽性6例中4例で陽性となったが、EBNA-2は全例陰性であった。EBV感染細胞の表現型は、EBV関連遺伝子産物特にLMP-1、EBNA-2の発現形式により、LMP-1陰性、EBNA-2陰性の発現形式をとるI型潜在性(Latent I)、LMP-1陽性または陰性、EBNA-2陰性の発現形式をとるII型潜在性(Latent II)、LMP-1陽性、EBNA-2陽性の発現形式をとるIII型潜在性(Latent III)の3型に分類される²¹⁾が、今回の検討では胃原発NHLはLMP-1が一部の症例で陽性となり、EBNA-2は全例陰性であったことから、ホジキン病、上咽頭癌と同様II型潜在性の範疇に属するものと考えられた。ちなみにEBV関連胃癌における表現型はパーキットリンパ腫に代表されるI型潜在性の発現型で、EBV関連胃原発NHLとは発現形式が異なる。このことから、EBV関連胃癌とEBV関連胃原発NHLとは腫瘍化に到る機序が異なると考えられる。

がん抑制遺伝子蛋白の一つであるp53蛋白は、試験管内でEBNA-2と結合してBリンパ球を不死化することが知られており、EBVによる腫瘍化と密接に関わっていると考えられている。本研究でのp53蛋白はEBER陽性胃原発NHL6例中4例で陽性であったが、EBNA-2は全例陰性であった。EBV関連NHLにおいてEBNA-2とp53蛋白の発現には明らかな関連は認められないという報告もあり¹⁹⁾²⁰⁾、今回の成績はその報告を支持する結果であり、EBNA-2を介さない腫瘍化機構の存在も考えら

れる。p53 蛋白は胃原発 NHL 全体でみると、MALT リンパ腫以外の組織型では 28.8% で陽性であったが、MALT リンパ腫では高悪性度 MALT リンパ腫の 1 例のみが陽性であった。なお、本例での p53 蛋白は低悪性度 MALT リンパ腫の領域では陰性で、組織学的に転換した高悪性度 MALT リンパ腫領域でのみ陽性であった。MALT リンパ腫では p53 蛋白は発現していないとの報告がある³⁵⁾が、最近では MALT リンパ腫を低悪性度型と高悪性度型に分類し³⁶⁾、組織学的に転換した組織を有する MALT リンパ腫、すなわち高悪性度 MALT リンパ腫では p53 蛋白は発現しているとの報告もあり³⁷⁾、今回の成績はその報告を支持する結果であった。このことから p53 蛋白の発現は MALT リンパ腫の組織学的転換に何らかの役割をなしている可能性が示唆される。これらのことは、大腸癌における腺腫の癌化において、腺腫の時期では p53 蛋白の発現は認められないが、癌化すると p53 蛋白の発現が認められるという報告³⁸⁾と類似しており、p53 蛋白と発癌との密接な関係を裏付ける結果と考える。

LMP-1 および bcl-2 蛋白については、EBER 陽性であった 6 例についてのみ検討したが、LMP-1 は 4 例に陽性となり、このうち 3 例は bcl-2 蛋白も陽性であった。また、LMP-1 陰性の 2 例は bcl-2 蛋白も陰性であった。なお、EBNA-2 は全例陰性であった。LMP-1 は試験管内では EBNA-2 により活性化され、この活性化した LMP-1 は bcl-2 蛋白を活性化し、アポトーシスを防ぐとされている²¹⁾が、本研究では、LMP-1 と bcl-2 蛋白との密接な関連性は見いだし得なかった。

EBER 陽性の MALT リンパ腫のなかで組織学的転換を有しない低悪性度 MALT リンパ腫では bcl-2 蛋白陽性、p53 蛋白陰性であったが、組織学的転換を有する高悪性度 MALT リンパ腫では bcl-2 蛋白陰性、p53 蛋白陽性であった。低悪性度 MALT リンパ腫では bcl-2 遺伝子の発現は高いが、p53 遺伝子の発現は低く、高悪性度に変化するにつれて、両遺伝子の発現は逆転するとの報告³⁹⁾もあるが、本研究でも同じ結果が得られた。このように EBER 陽性例において LMP-1、p53 蛋白、bcl-2 蛋白の発現が全例において認められるわけではないという結果から考えると、EBV の潜伏感染によってこれまで想定されていた機序とは全く別の機序で腫瘍化が起こっている可能性が考えられる。

EBER 陽性胃原発 NHL の臨床的特徴として、全例が年齢の中央値以上で、高齢者に多い傾向がみられた。また、巨大潰瘍または巨大腫瘍を形成しているにもかかわらず治療にはよく反応し、全例が寛解し、無病生存中である。EBER 陽性胃原発 NHL 例と予後追跡が可能であった EBER 陰性胃原発 NHL 例で全生存率を比較したところ、前者の予後は有意に良好であった。EBER 陽性胃癌も予後が良好であることが知られているが、この機序としてウイルス感染により免疫監視機構が活性化され、制癌的に作用している可能性が考えられている⁴⁰⁾。EBER 陽性胃原発 NHL でも胃癌と同じような機序により予後が良好であると推定される。このようなことから EBER 発現の有無は予後予測因子の一つとなる可能性もあり、今後の検討が望まれる。

EBV 関連胃原発 NHL の地域別陽性頻度をこれまでの報告例を基に検討したところ、わが国での発生頻度は中国よりも低く、韓国とほぼ同程度であった。なお、国内では九州地方と北陸地方での発生頻度に差は認められなかった。統計学的には中国と比較して有意な差は認められなかったが、韓国、日本より陽性頻度が高い傾向がみられた。その理由として、人種的な要因のほかに環境要因が関わっている可能性もあり、今後さらに広域

での調査が必要と考えられる。

結 論

胃原発 NHL における EBV の関与について検討するために、EBER に対する ISH 法および免疫組織化学染色を用いて検討し、以下の結論を得た。

1. EBER-ISH による検討では、胃原発 NHL 66 例中 6 例 (9.1%) で EBER 陽性であった。
2. EBER 陽性 6 例中 4 例 (66.7%) で LMP-1 陽性であった。EBER と LMP-1 の二重染色で、LMP-1 の発現している細胞のほとんどが EBER 陽性細胞であった。また、EBNA-2 は全例陰性であった。
3. EBER 陽性 6 例中 4 例 (66.7%) で p53 蛋白陽性であった。MALT リンパ腫 13 例のうち高悪性度 MALT リンパ腫 1 例で陽性例を認めたが、EBER 検出の有無にかかわらず低悪性度 MALT リンパ腫 12 例では全て陰性であった。
4. EBER 陽性 6 例中 3 例 (50.0%) で bcl-2 蛋白陽性で、生理的発現部位である非増殖性の小リンパ球だけでなく EBER 陽性部位の一部の腫瘍細胞でも陽性となった。
5. EBER 陽性胃原発 NHL 6 例は、いずれも年齢の中央値を越え高齢者であり、しかも巨大腫瘍や巨大潰瘍を形成していたにもかかわらず、全例が寛解し、無病生存中であり、予後は良好と考えられた。したがって胃原発 NHL においては EBV の関連の有無が予後予測因子の一つとなる可能性があると考えられた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御検閲を賜りました松田保教授に深甚なる謝意を表します。また、終始御指導を頂きました内科学第三講座中村忍助教授ならびに内科学第三講座の諸先生方に深謝いたします。さらに、本研究の遂行にあたり、多大なる御指導と御協力をいただきました金沢大学医学部附属病院病理部野々村昭孝助教授、砺波総合病院病理部安全有先生に感謝いたします。

なお、本論文の一部は、第 26 回国際血液学会 (1996 年、シンガポール)、第 38 回日本臨床血液学会総会 (1996 年、大宮) および第 37 回日本リンパ網内系学会総会 (1997 年、東京) において発表した。

文 献

- 1) Burkitt D. Sarcoma involving jaws in African children. Br J Surg 46: 218-225, 1958
- 2) Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. Lancet 1: 702-708, 1964
- 3) Golden HD, Chang RS, Prescott W. Leukocyte transforming agent: Prolonged excretion by patients with mononucleosis and excretion by normal individuals. J Infect Dis 127: 471-473, 1973
- 4) Lemon SM, Hutt LM, Shaw JE. Replication of EBV in epithelial cells during infectious mononucleosis. Nature 306: 480-483, 1989
- 5) Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA. Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. N Engl J Med 320: 502-506, 1989
- 6) Niedobitek G, Young LS, Sam CK. Expression of Epstein-Barr virus genes and lymphocyte activation molecules in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. Am J Pathol 140

:879-887, 1992

- 7) Butler AE, Colby TV, Weiss L. Lymphoepithelioma like carcinoma of the lung. *Am J Surg Pathol* 13: 632-639, 1989
- 8) Dimery IW, Lee JS, Blick M. Association of the Epstein-Barr virus with lymphoepithelioma of the thymus. *Cancer* 61: 2475-2480, 1988
- 9) 駒野 淳, 高田腎蔵. ヒトウイルスと発癌. *Mol Med* 33: 308-320, 1996
- 10) Young L. Expression of Epstein-Barr virus transformation-associated genes in tissues of patients with EBV lymphoproliferative disease. *N Engl J Med* 321: 1080-1085, 1989
- 11) 大里外誉郎. EBVと悪性腫瘍. *最新医学* 49: 1914-1916, 1994
- 12) Tokunaga M, Uemura Y. Epstein-Barr virus related gastric cancer in Japan: a molecular patho-epidemiological study. *Acta Pathol Jpn* 43: 574-581, 1993
- 13) Bayliss GJ, Wolf H. Epstein-Barr virus-induced cell fusion. *Nature* 287: 164-165, 1980
- 14) Sixbey JW, Yao QY. Immunoglobulin A-induced shift of Epstein-Barr virus tissue tropism. *Science* 255: 1578-1580, 1992
- 15) 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
- 16) Kahn G. Epstein-Barr virus encoded small RNAs; targets for detection by *in situ* hybridization with oligonucleosides probes. *J Clin Pathol* 45: 616-620, 1992
- 17) Kaye KM, Izumi KM, Kieff E. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9150-9154, 1993
- 18) Cohen JI. A region of herpes simplex virus VP-16 can substitute for a transforming domain of Epstein-Barr virus nuclear protein 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8030-8034, 1992
- 19) Farrell PJ, Allan GJ, Shanahan F. p53 is frequently mutated in Burkitt's lymphoma cell lines. *EMBO J* 10: 2879-2887, 1991
- 20) Edwards RH, Raab-Traub N. Alterations of the p53 gene in Epstein-Barr virus-associated immunodeficiency-related lymphomas. *J Virol* 68: 1309-1315, 1994
- 21) 平井莞二. EBウイルス (EBV) 遺伝子発現によるEBV関連腫瘍細胞の分類. *病理と臨床* 11: 493-503, 1993
- 22) Dawson IMP, Cornes JS, Morson BC. Primary malignant lymphoid tumors of the intestinal tract. *Br J Surg* 49: 80-89, 1961
- 23) Glickman JN, Howe JG, Steitz JA. Structural analysis of EBV1 and EBV2 ribonucleoprotein particles present in Epstein-Barr virus-infected cells. *J Virol* 62: 902-911, 1988
- 24) Burns J. Sensitive system for visualizing fluorescein-labelled DNA probes hybridized *in situ*: rapid sex determination of intact cells. *J Clin Pathol* 38: 1085-1090, 1985
- 25) Pak K Hui, Tokunaga M. Epstein-Barr virus-associated gastric lymphoma in Hong-Kong Chinese. *Hum Pathol* 25: 947-952, 1994
- 26) Murray PG, Young LS, Rowe M, Crocker J. Immunohistochemical demonstration of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein in paraffin sections of Hodgkin's disease. *J Pathol* 166: 1-5, 1992
- 27) Van den Berg FM, Baas IO, Polak MM, Offerhaus JGA. Detection of p53 overexpression in routinely paraffin-embedded tissue of human carcinomas using a novel target unmasking fluid. *Am J Pathol* 168: 381-385, 1993
- 28) LeBrun DP, Kamel OW, Cleary ML, Dorfman RF, Warnke RA. Follicular lymphomas of the gastrointestinal tract. Pathologic features in 31 cases and bcl-2 oncogenic protein expression. *Am J Pathol* 140: 1327-1335, 1992
- 29) Tao Q, Srivastava G, Loke S L, Ho F C S. Lack of correlation between expression of Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein and bcl-2 oncoprotein *in vivo*. *J Clin Pathol* 47: 589-591, 1994
- 30) Ott G, Kirchner Th, Seidl S. Primary gastric lymphoma is rarely associated with Epstein-Barr virus. *Virchows Archiv B Cell Pathology* 64: 287-291, 1993
- 31) Lee SS, Jang JJ, Cho KJ, Khang SK, Kim CW. Epstein-Barr virus-associated primary gastrointestinal lymphoma in non-immunocompromised patients in Korea. *Histopathology* 30: 234-242, 1997
- 32) Liu Q, Ohshima K, Kikuchi M. Detection of the Epstein-Barr virus in primary gastric lymphoma by *in situ* hybridization. *Pathol Int* 45: 131-136, 1995
- 33) 藤崎人美, 徳永正義. 鹿児島県の悪性リンパ腫における Epstein-Barr virus 保有細胞 - EBV-1 *in situ* hybridization による検討. *病理と臨床* 12: 839-843, 1994
- 34) 田代幸恵, 徳永正義. EBV関連胃癌. *医学のあゆみ* 176: 123-126, 1996
- 35) 小林 安, 小武内 優. 胃原発悪性リンパ腫と reactive lymphoid hyperplasia における増殖細胞核抗原と p53 蛋白質の発現. *厚生年金病院年報* 20: 283-294, 1993
- 36) Chan JKC, Ng CS, Isaacson PG. Relationship between high-grade lymphoma and low-grade B-cell mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma (MALToma) of the stomach. *Am J Pathol*, 136: 1153-1164, 1990
- 37) Du M, Peng H, Singh N, Isaacson PG. The accumulation of p53 is associated with progression of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Blood*, 86: 4587-4593, 1995
- 38) 池田 聡, 木村 博, 深沢徳行, 井坂信之. 大腸腫瘍における p53 蛋白質の発現形式と細胞増殖能についての検討. *医学検査* 44: 1688-1691, 1995
- 39) Nakamura S, Akazawa K, Kinukawa N, Yao T, Tsuneyoshi M. Inverse correlation between the bcl-2 and p53 proteins in primary gastric lymphoma. *Hum Pathol* 27: 225-233, 1996
- 40) 浜崎泰弘, 有川順康, 土持明男. EBV関連胃癌の臨床. *最新医学* 49: 65-72, 1994

Detection of the Epstein-Barr Virus-associated Primary Gastric Lymphoma by EBER *in situ* Hybridization.
Noritaka Hattori, Department of Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen
Med Soc., **107**, 174 — 182 (1998)

Key words Epstein-Barr virus, EBV-encoded small RNA, primary gastric lymphoma, *in situ* hybridization

Abstract

Recently, the association of Epstein-Barr virus (EBV) with adenocarcinoma of the stomach has been highlighted by the carcinogenicity of this virus. In this study, we examined the prevalence of the EBV-associated primary gastric lymphoma using EBV-encoded small RNA (EBER) *in situ* hybridization (ISH). Paraffin-embedded sections obtained from 66 cases with primary gastric lymphoma were studied. To determine the localization of the EBV histologically, ISH were carried out using EBER sequences as a target. A commercially available fluorescein-conjugated oligomer sequence was used. Deparaffinized sections were rehydrated, and then treated with proteinase K. After dehydration, the sections were air-dried. Hybridization was performed for 2 hr at 37 °C in a moist chamber. After washing, detection was accomplished using a mouse anti-FITC antibody, an AP-conjugated rabbit anti-mouse antibody, BCIP/NBT development and methyl green counterstaining. As a positive control, EBV-positive lymph node sections obtained from a patient with Hodgkin's disease were processed. Simultaneously, we also examined immunohistochemically the expressions of EBV-latent membrane protein-1 (LMP-1), nuclear antigen-2 (EBNA-2), and oncoproteins bcl-2 and p53 using a labelled streptavidin-biotin method to evaluate whether there is any correlation between the prevalence of EBER and the expressions of those substances. All of the 66 cases were B-cell type, and 6 (9.1 %) of those cases were EBER-positive. Two of those 6 cases were diagnosed as primary low grade gastric lymphoma of MALT type. Four of those 6 cases were positive for LMP-1, all of those negative for EBNA-2, 3 positive for bcl-2 and 4 positive for p53. In low-grade MALT lymphomas, p53 was negative regardless of positivity of EBER. However in one case of high-grade MALT lymphoma, p53 was positive. The endoscopic findings of EBER-positive primary gastric lymphoma showed large ulcers and/or bulky tumors. However, all of those 6 cases achieved complete remission and are still alive. This result suggests that EBV-associated primary gastric lymphoma is prognostically favorable.