胃原発非ホジキンリンパ腫におけるEBウィルスの関与に関する臨床病理学的研究

金沢大学十全医学会雑誌　第107巻　第2号　174－182（1998）

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，いずれも巨大腫瘤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) はアフリカのバーキットリンパ腫[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-1[17]), EBV関連核抗原 (EBV-associated nuclear antigen-2, EBNA-2[18]) 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．スライドグ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．次にプローブ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 μg/mlの濃度に調整し，37℃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ブ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ブ (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 μlのプローブを滴下し，リボヌクレアーゼによるプローブの分解を防止するためにシリコン処理したカバーグラス (Sigma) をのせて，37℃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の中でカバーグラスをはずした後，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℃で30分間浸した．ハイブリダイゼーションしたプローブの発色は，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 primaly 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

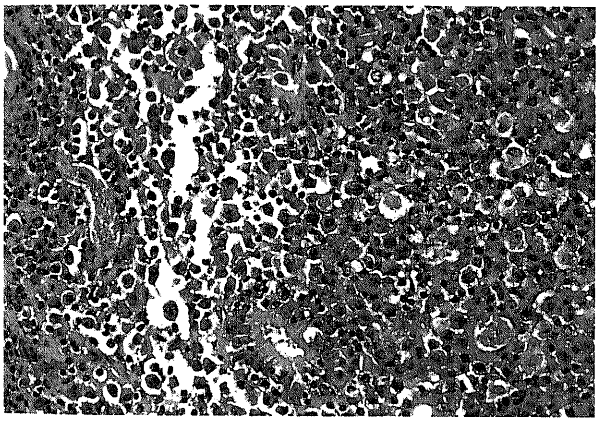
Case no.	Sex	Age (years)	Pathology	Expression			
				LMP-1	EBNA-2	p53	bcl-2
1	M	67	D small cleaved, B	−	−	+	−
2	M	59	D mixed, B	+	−	−	+
3	M	63	D large, B	+	−	+	+
4	F	86	D large, B	+	−	+	−
5	M	60	MALT type, B (low-grade)	+	−	−	+
6	F	74	MALT type, B (high-grade)	−	−	+	−

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

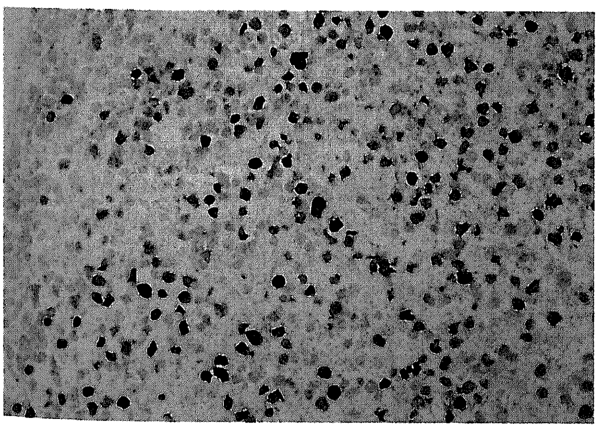
p53がん抑制遺伝子産物マウスMoAbおよび抗ヒトbcl-2がん遺伝子産物マウスMoAbを一次抗体として20分間反応させた後TBSで5分間ずつ3回洗浄した．次にビオチン化二次抗体(DAKO)と20分間反応させ，さらにペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(DAKO)と10分間反応させた後，緩衝液で5分間ずつ3回洗浄した．最後にペルオキシダーゼ発色基質溶液と10分間反応させた後蒸留水に浸し反応を停止させた．カラッチヘマトキシリン(Sigma)で後染色を行いグリセロールゲルにて封入した．陽性コントロールとしてLMP-1には既知のLMP-1陽性ホジキン病リンパ節組織パラフィン包埋薄切標本(DAKOより供与)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．

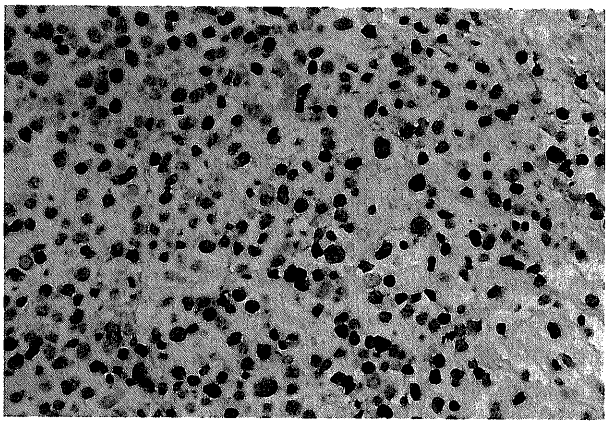


A

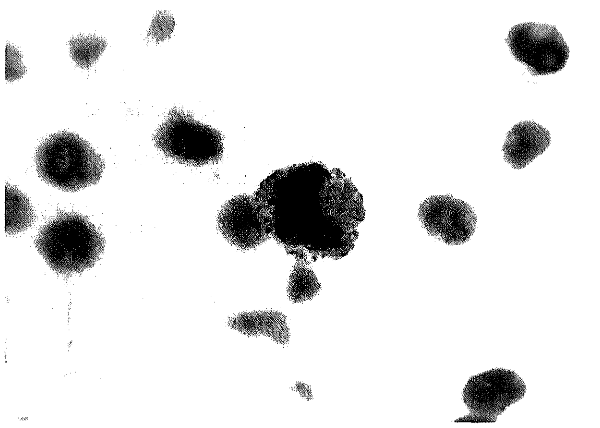


B

Fig. 1. An example of EBER-positive gastric lymphoma (case no.3 in Table 3.). (A) H-E stain, original magnification × 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 × 200.



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 × 200. (B) × 1,000.

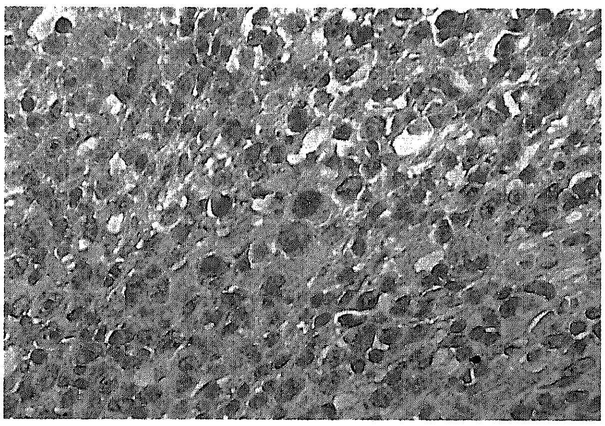


Fig. 3. A case diagnosed as p53-positive. Some lymphoma cells in high-grade lesions of MALT lymphoma show positive nuclear staining using LSAB technique. case no.6 in Table 3. Original magnification × 400.

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 prepyrolus	Ⅳ	Subtotal gastrectomy Splenectomy CHOP×5	Alive in CR
6	7×5.5 cm tumor affecting lasser curve at body	Ⅰ	Total gastrectomy Splenectomy	Alive in CR

Clinical stage, Ann Arbor classification; CR, complete remission; CHOP, cyclophosphamide 750 mg/m^2 intravenous drip infusion (day 1) doxorubicin 50 mg/m^2 intravenous drip infusion (day 1) vincristine 1.4 mg/m^2 intravenous bolus infusion (day 1) prednisolone 30 mg/m^2 oral administration (day 1 to 5); HBEP, doxorubicin 30 mg/m^2 intravenous drip infusion (day 1, 5) behenoylcytosine arabinoside 200 mg/m^2 intravenous drip infusion (day 1 to 7) etoposide 70 mg/m^2 intravenous drip infusion (day 1 to 5) prednisolone 40 mg/m^2 oral administration (day 1 to 7); CHEP, cyclophosphamide 750 mg/m^2 intravenous drip infusion (day 1) doxorubicin 50 mg/m^2 intravenous drip infusion (day 1) etoposide 70 mg/m^2 intravenous drip infusion (day 1 to 5) prednisolone 40 mg/m^2 oral administration (day 1 to 5); ACOP, doxorubicin 40 mg/m^2 intravenous drip infusion (day 1) cyclophosphamide 500 mg/m^2 intravenous drip infusion (day 1) vincristine 1.4 mg/m^2 intravenous bolus infusion (day 1) prednisolone 20 mg/m^2 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

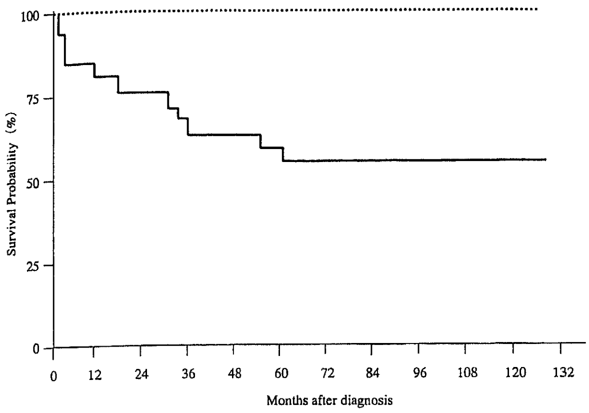


Fig. 4. Kaplan-Meier estimate of overall survival in EBER-positive primary gastric lymphoma (n=6) and EBER-negative primary gastric lymphoma (n=25). Overall survival percentages for EBER-positive and EBER-negative patients at 120 months were 100 % and 54.3 %, respectively (p<0.05). ┈┈, EBER-positive; ——, 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1 A, 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2 A, 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, 全例巨大腫瘤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に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バ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とで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瘤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NHL6例は，いずれも年齢の中央値を越え高齢者であり，しかも巨大腫瘤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わ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念有声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 undifferenciated 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. Structual analysis of EBER1 and EBER2 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, Dorfan 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. 鹿児島の悪性リンパ腫における Epstein-Barr virus 保有細胞－EBER-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, 上持明男. 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℃ 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.