

Expression of Epstein-Barr Virus-encoded Small Nuclear RNA in Salivary Glands of Patients with Sjögren's Syndrome

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/2297/8494

シェーグレン症候群患者唾液腺組織における Epstein-Barr ウイルス由来核内小 RNA の発現

金沢大学医学部内科学第二講座 (主任: 竹田亮祐教授)

野村 英 樹

1 次性シェーグレン症候群 (primary Sjögren's syndrome, 1°SjS) 患者血清中に特異的に存在するシェーグレン症候群 B (Sjögren's syndrome B, SSB) / 抗 La 抗体の対応自己抗原である SSB/La 抗原と, Epstein-Barr ウィルス (Epstein-Barr virus, EBV) にコードされる核内小 RNA (EBV-encoded small nuclear RNAs, EBERs) とは安定した結合活性を示すことが知られている。このことから 1°SjS の病態に EBV が関与している可能性が示唆され, これまでに多くの研究者により血清学的に, 免疫組織化学的あるいは分子生物学的に両者の関連が研究されてきたが, 未だに結論は得られていない。そこで, 両者の関係を明らかにするために, 1°SjS 患者唾液腺 (salivary gland, SG) 組織 18 検体を対象に, 2 種存在する EBERs のうち EBER-1 に対する生体内局所ハイブリダイゼーションを行い健常者と比較検討した。その結果, 1°SjS 患者 SG のうち 9 検体で導管上皮細胞に, 4 検体で腺房上皮細胞にハイブリダイゼーション陽性の所見を認めた。健常者では 8 検体中 3 検体に, 導管上皮細胞にのみハイブリダイゼーション陽性所見を認めた。さらに, 導管上皮細胞にハイブリダイゼーション陽性の所見を認めた 9 検体の 1°SjS 患者 SG のうち 8 検体では, 浸潤している単核細胞 (mononuclear cells, MNC) にも陽性所見が認められた。そこで, ハイブリダイゼーション陽性の浸潤 MNC の特徴を明らかにするため, 隣接切片を用いて免疫組織化学的検討を行なった。抗体には, T リンパ球上の CD45RO 抗原と特異的に結合する単クローン抗体 (UCHL-1) を用いた。その結果, ハイブリダイゼーション陽性の浸潤 MNC の少なくとも一部は, T リンパ球と考えられた。以上の結果より, 1°SjS 患者の少なくとも一部では EBER-1 が大量に発現された状態にあり, 通常はほとんど認められない腺房上皮細胞に認める例もあること, また浸潤しているリンパ球にも EBV が感染していることが明らかとなった。このことから, EBV が EBERs の発現を通して SSB/La 抗体をはじめとする 1°SjS の病態に関与していることが示唆されるとともに, リンパ球, 特に T リンパ球の機能異常にも関わっている可能性が示された。

Key words Sjögren's syndrome, Epstein-Barr virus, Epstein-Barr virus-encoded small nuclear RNAs

シェーグレン症候群は, 唾液腺や涙腺などの外分泌腺への単核細胞 (mononuclear cell, MNC) 浸潤による破壊に, 膠原病の合併を認めた病態として当初報告されたが¹⁾, その後他の膠原病の合併を認めないいわゆる一次性シェーグレン症候群 (primary Sjögren's syndrome, 1°SjS) が存在することが知られるようになった²⁾。1°SjS では, シェーグレン症候群 B (Sjögren's syndrome B, SSB) / 抗 La 抗体がその約 50% に出現すること知られているが, この抗体は 1°SjS に特異的であると考えられている³⁾。従って, 1°SjS と他の膠原病との合併を認める二次性シェーグレン症候群 (secondary Sjögren's syndrome, 2°SjS) とは, 病因および病態論的に区別して論ずるべき独立した症候群であると考えられる。

一方, Epstein-Barr ウィルス (Epstein-Barr virus, EBV) は, ほとんどの成熟したヒトに持続感染の形で存在するヒトヘルペスウィルスであるが, 一部では悪性リンパ増殖性疾患^{4)~29)} や固

形癌³⁰⁾ への関与が考えられている。特に後天性免疫不全症候群患者^{4)~7)} や臓器移植における免疫抑制剤投与患者^{8)~11)} において高率に出現する悪性リンパ腫やリンパ増殖性疾患では, 増殖したリンパ球内に高率に EBV の DNA あるいは RNA が同定されている。1°SjS においても, 悪性リンパ腫の合併が高頻度であることが知られており³¹⁾, 同様に EBV DNA が検出されることがあることが報告されている¹²⁾。SSB/La 抗体の対応自己抗原である SSB/La 抗原と, EBV 由来核内小 RNA (Epstein-Barr virus-encoded small nuclear RNA, EBERs) とは安定した結合を示す^{32,33)}。また, EBV は持続感染の状態では, 1°SjS の主な標的臓器である唾液腺に潜伏している³⁴⁾。さらに, EBV の初感染状態である伝染性単核球症の後に 1°SjS を発症した症例が過去に 2 例報告されており^{35,36)} 1°SjS の病態に EBV が関与している可能性が考えられている。1°SjS に限らず自己免疫疾患の発症には, 遺伝的要因のみならず環境要因が重要であることが, 一

平成 5 年 11 月 4 日受付, 平成 5 年 12 月 14 日受理

Abbreviation: 1°SjS, primary Sjögren's syndrome; 2°SjS, secondary Sjögren's syndrome; CR2, complement receptor 2; EA, early antigen; EBERs, Epstein-Barr virus-encoded small nuclear RNAs; EBNA, Epstein-Barr virus nuclear antigen; EBV, Epstein-Barr virus; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt; HLA, human lymphocyte antigen; IgA, immunoglobulin A; IgG, immunoglobulin G; IgM, immunoglobulin M; IL-2,

卵性双生児を対象とした検討で指摘されている³⁷⁾。環境要因としての第一の候補は微生物感染、特にウィルス感染である。このため 1°SjS においても、多くの研究者により血清学的に^{38)~41)}、免疫組織化学的に^{42)~45)}あるいは分子生物学的に、すなわちポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction, PCR)^{46)~50)}あるいは生体内局所ハイブリダイゼーション (*in situ* hybridization, ISH)⁴¹⁾⁴³⁾⁴⁴⁾⁴⁷⁾⁴⁹⁾を用いて EBV の関与が検討されてきたが、未だに結論は得られていない。

SSB/La 抗原と安定した結合活性を示す EBERs³²⁾³³⁾は、EBV に持続感染した細胞内では大量に発現されており、その細胞 1 個あたりのコピー数は 10^7 にも及ぶ⁵¹⁾ことが知られているが、複製感染の際にはほとんど発現していないものと考えられている⁵²⁾⁵³⁾。また核内で⁵⁴⁾蛋白と結合して存在する³²⁾³³⁾⁵⁵⁾ことから安定して保存されているものと考えられ、この性質を利用して EBV の ISH の標的として近年多くの研究者により用いられるようになった^{4)~7)10)13)~20)30)}。特に、長時間経過したホルマリン固定パラフィンブロックからの切片で、非アイソトープ標識したプローブを用いて十分同定可能である^{4)~7)10)13)~20)30)}。そこで本研究では、非アイソトープ標識プローブを用いて 1°SjS 患者唾液腺 (salivary gland, SG) 組織中の 2 種存在する EBERs のうち EBER-1 の発現を同定することにより、1°SjS の病因、病態における EBV の関与について検討した。

対象および方法

I. 対象

1982年から1993年の間に当科において口唇小唾液腺または舌下腺の生検を施行し、1°SjS (確実例) と診断した患者18例の生検組織を対象としたが、うち16検体は口唇小唾液腺組織、2検体は舌下腺組織であった。診断の確定には、厚生省特定疾患シェーグレン病調査研究班による診断基準⁵⁶⁾を用いたが、生検組織への MNC 浸潤所見は必須とした。性別は男性1例、女性17例で、平均年齢は54.9±12.0歳であった。

対照群としては、口唇小唾液腺膿胞などに対する口腔外科的手術の際、隣接する正常な小唾液腺を切除したもの8検体を用いた。対照群の平均年齢は43.8±30.1歳であり、1°SjS 群と比較して有意な相違は認めなかった。

II. 非アイソトープ標識プローブの作成

1. オリゴヌクレオチドの合成および精製

Rosa ら⁵¹⁾により報告された EBER-1 の一次塩基配列のうち、3'末端の30塩基に相補的なオリゴヌクレオチドを、DNA 合成機 Cyclone (MilliGen, Bedford, USA) で合成した。同部位に相同性を有し、作製したオリゴヌクレオチドに交差反応する可能性を持った既知の配列が報告されていないことの確認は、塩基配列解析ソフト DNASIS (日立 SK, 横浜) を用いて行った。

作製したオリゴヌクレオチドは以下の方法により精製およびトリチル基の除去を行った。脱気乾燥したオリゴヌクレオチドを 0.1M トリエチルアンモニウム酢酸 (triethylammonium acetate, TEAA) (和光, 大阪) (pH7.0) に溶解し、メタノール (和光) および TEAA で活性化した核酸精製カートリッジ (Dupont, Boston, USA) に添加した。このカートリッジをアセ

トニトリル (和光)/TEAA (10:90) で洗浄し、次に 0.5% トリフルオロ酢酸 (和光) でトリチル基を加水分解して除いた。最後にオリゴヌクレオチドを 35% メタノールで溶出し、脱気乾燥した。

2. オリゴヌクレオチドの標識

精製したオリゴヌクレオチドは以下の方法によりその 5'末端をジゴキシングエンで標識した。脱気乾燥したオリゴヌクレオチドを 20 μ M の濃度になるように滅菌蒸留水に溶解し、その 5 μ l に、5 \times 末端標識緩衝液 (Boehringer, Mannheim, Germany) 4 μ l, 25mM 塩化コバルト溶液 (Boehringer) 4 μ l, 1mM ジゴキシングエン標識デオキシウリジン 5'-三リン酸 (deoxyuridine 5'-triphosphate, dUTP) 溶液 (Boehringer) 1 μ l, 10mM デオキシアデニン 5'-三リン酸 (deoxyadenine 5'-triphosphate, dATP) 溶液 (Boehringer) 1 μ l, 50単位/ μ l ターミナルトランスフェラーゼ (Boehringer) 1 μ l を加え、滅菌蒸留水で総容量 20 μ l として 37 $^{\circ}$ C, 15分反応させた。その後直ちに氷上に移し、20mg/ml グリコーゲン溶液 1 μ l および 0.2M エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, EDTA) (和光) 溶液 (pH8.0) 200 μ l を加えて反応を停止させた。末端標識されたオリゴヌクレオチドは、4M の塩化リチウム (和光) 溶液 2.5 μ l と 75 μ l の -20 $^{\circ}$ C エタノール (和光) を加えて -70 $^{\circ}$ C に 30分放置することにより沈殿させた。これを 12,000 \times g 遠心し、ペレットをさらにもう一度 -20 $^{\circ}$ C の 70% エタノールで洗浄後脱気乾燥した。

3. ポリアクリルアミド電気泳動

得られた標識オリゴヌクレオチドをポリアクリルアミド電気泳動で解析することにより、未標識のオリゴヌクレオチドの混入が認められないことを確認した。ゲルは 20% アクリルアミド (和光), 0.05% 過硫酸アンモニウム (和光), 1 \times トリスほう酸緩衝液 (pH8.3) (Tris-borate-EDTA buffer, TBE) (100mM Tris, 83mM ほう酸, 1mM EDTA) に N, N, N', N'-四メチルエチレンジアミン (N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine, TEMED) を加えて重合させ用いた。10V/cm の定電圧で泳動し、終了後 0.5 μ g/ml のエチジウムブロマイド (Sigma, St. Louis, USA) によって染色し、水洗後紫外線照射器を用いて観察した。

4. プローブの直接発色

プローブを直接紫外線照射でナイロン膜に固定し、Boehringer 社のキットを用いて発色させることにより標識を確認した。まず、ナイロン膜 (Amersham, Amersham, UK) を 100mM Tris-HCl (pH7.5), 150mM 塩化ナトリウム (和光) (以下緩衝液 1) で 1 分間洗浄後、1% ブロッキング試薬 (Boehringer)/緩衝液 1 に 30分浸し、抗体の非特異的結合をブロックした。次に再び緩衝液 1 で 1 分間洗浄後、5000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシングエン抗体 (Boehringer) と 30分間インキュベートした。再び緩衝液 1 で 15分、2 回洗浄し、次に 100mM Tris-HCl (pH9.5), 100mM 塩化ナトリウム, 50mM 塩化マグネシウム (和光) (以下緩衝液 2 とする) に 2 分間浸して置換した。発色試薬は、10ml の緩衝液 2 に 45 μ l のニトロブルーテトラゾリウム (nitro blue tetrazolium, NBT)

interleukin 2; ISH, *in situ* hybridization; MNC, mononuclear cell; PBS, phosphate-buffered saline; PCR, polymerase chain reaction; SG, salivary gland; SSB antibody, Sjögren's syndrome B antibody; SSC, standard saline citrate; TEAA, triethylammonium acetate; VCA, virus capsid antigen

(Boehringer) と 35 μ l の 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸 (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, X-phosphate) (Boehringer) を加えて用時作製し、ナイロン膜とともにプラスチックバッグに封入し、遮光下で発色させた。反応を停止する際には、10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA (以下 TE 緩衝液とする) で発色試薬を置換した。

Ⅲ. ノーザンハイブリダイゼーション

1. EBV 持続感染細胞の培養

EBV 持続感染細胞株であるヒト Burkitt リンパ腫由来細胞株 Raji 細胞²⁷⁾ を、10% ウン胎児血清 (GIBCO, New York, USA) 添加 RPMI 1640 培地 (日水, 東京) 中で培養した。

2. 全 RNA の抽出

10⁶ 個の細胞を、0.1M リン酸緩衝食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) (pH7.2) で 2 回洗浄し、以下の方法で全 RNA を分離抽出した。はじめに 4 M グアニジンチオシアネート (和光), 25mM クエン酸ナトリウム (和光), 0.5% N-ラウロイルサルコシン (和光), 0.1M 2-メルカプトエタノール (和光) (以下 D 溶液とする) を加えてホモジナイズした。次に 1/10 量の 2 M 酢酸ナトリウム (和光) (pH4.0), 同量の Tris-HCl 緩衝フェノール (和光) (pH7.0), 1/5 量のクロロホルム (和光) を加えて攪拌後氷上に 15 分間放置, 3000 \times g, 20 分, 4 $^{\circ}$ C で遠心し上層を回収し、再度 1/2 量のフェノールと 1/2 量のクロロホルムを加え攪拌後遠心した。上層を回収し、同量のイソプロピルアルコール (和光) をくわえて -20 $^{\circ}$ C に 2 時間放置して RNA を沈殿させ、3000 \times g, 30 分, 4 $^{\circ}$ C で遠心した。この RNA をさらに 2ml の D 溶液に溶解し、同量のイソプロピルアルコールをくわえて -20 $^{\circ}$ C に 1 時間放置後、遠心して得たペレットを 70% アルコールで洗い乾燥した。得られた全 RNA はリン酸緩衝液に溶解してノーザンハイブリダイゼーションに供した。

3. ノーザンハイブリダイゼーション

ノーザンハイブリダイゼーション用のゲルには、1.2% アガロースゲルを用いた。ゲルおよびサンプルの調整と泳動用緩衝液には、3-N-モルフォリノプロパンスルホン酸 (3-[N-morpholino] propanesulfonic acid, MOPS) (和光) と 1.1% ホルムアルデヒド (和光) を用い、またサンプルは 50% ホルムアミド (和光) とともに泳動した。10V/cm の定電圧で電気泳動後のゲルは蒸留水で数回洗浄後、10 \times 標準クエン酸食塩水 (standard saline citrate, SSC) で 45 分間洗浄した。このゲルに、あらかじめ蒸留水で 1 分, 20 \times SSC で 5 分間前処置したナイロン膜を載せ、20 \times SSC でトランスファーを行った。トランスファーの終了したナイロン膜には紫外線照射を行い、RNA を固定した。ジゴキゲン標識プローブの発色は、直接発色の際と同様に Boehringer 社のキットを用いて行った。ハイブリダイゼーション溶液として、5 \times SSC, 1% ブロッキング試薬, 0.1% N-ラウロイルサルコシン, 0.02% ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecylsulfate, SDS) (和光), 50% ホルムアミドを用いた。トランスファーの終了したナイロン膜を、42 $^{\circ}$ C のハイブリダイゼーション溶液中で 2 時間プレハイブリダイゼーションを行った。次に、ナイロン膜を 100ng/ml のプローブを含むハイブリダイゼーション溶液とともにプラスチックバッグに封入し、42 $^{\circ}$ C で一晩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終了後、0.1% N-ラウロイルサルコシンを含む 2 \times SSC 中で 5 分間, 2 回洗浄, 次に 0.1% N-ラウロイルサルコシンを含む 1 \times SSC で 42 $^{\circ}$ C で 15 分間, 2 回洗浄した。

ハイブリダイズしたプローブの発色は以下の方法で行った。

まず、ナイロン膜を緩衝液 1 で 1 分間洗浄後、1% ブロッキング試薬/緩衝液 1 に 30 分浸し、抗体の非特異的結合をブロックした。次に再び緩衝液 1 で 1 分間洗浄後、5000 倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキゲン抗体と 30 分間インキュベートした。再び緩衝液 1 で 15 分, 2 回洗浄し、次に緩衝液 2 に 2 分間浸して置換した。続いて発色試薬をナイロン膜とともにプラスチックバッグに封入し、遮光下で発色させた。反応を停止する際には、TE 緩衝液を用いて発色試薬を置換した。

Ⅳ. 陽性対照スライドの作製

1. EBV 持続感染細胞の培養

EBV 持続感染細胞株である上咽頭癌由来細胞株 NPC-KT²⁸⁾ を、ポリ-L-リジン (和光) であらかじめ処理しておいたスライドガラス上に播き、10% ウン胎児血清添加ダルベッコ変法イーグル培地 (日水) 中で一昼夜培養した。

2. 細胞の前処置

このスライドガラスを PBS で 10 分間洗浄した後、4% パラホルムアルデヒド/PBS に 15 分間浸して固定した。スライドガラスを再び PBS で 10 分間洗浄し、次に非特異的の反応を防ぐ目的で -20 $^{\circ}$ C のエタノール/無水酢酸 (和光) (95:5) で 5 分間処理した。風乾後スライドガラスは液体窒素で急速冷凍し、使用までの間 -70 $^{\circ}$ C で保存した。使用時にはスライドガラスはエタノール系列を通した後、PBS に 10 分間 2 回浸してから使用した。

Ⅴ. 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より、マイクロームを用いて厚さ 3 μ m の切片を作成した。スライドガラスには、シランコーティングスライド (Dako, Glostrup, Denmark) を用いた。切片はキシレン (和光) でパラフィンを除去し、次にアルコール系列を通して用いた。プロテアーゼ K (Boehringer) 処理は、1 μ g/ml の濃度で 15 分間, 37 $^{\circ}$ C で処理を行った。この際の緩衝液には、50mM EDTA, 100mM Tris-HCl (pH7.5), 2mM 塩化カルシウム (和光) を用いた。続いて滅菌蒸留水で 5 分間洗浄後、0.2% グリシン (和光)/PBS で 10 分間処理を行った。次に 1 \times Denhardt 溶液 (ヤトロン, 東京) を含む 4 \times SSC を試料に載せ、60 分間プレハイブリダイゼーションを行った。その後スライドガラスを再びアルコール系列を通して脱水した。ハイブリダイゼーションには、市販のハイブリダイゼーション緩衝液 (ヤトロン) に、ジチオスレイトール (ヤトロン) を 2% 加え、ジゴキゲン標識プローブを 10ng/ μ l の濃度になるように加えたものを用いた。この上に注意深くシリコン (Sigma) 処理したカバーガラスをかけ、37 $^{\circ}$ C で一晩、湿箱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、まず 2 \times SSC 中でカバーガラスをはずした後、同じ液で常温で 10 分, 2 回洗い、次に 0.1% N-ラウロイルサルコシンを含む 1 \times SSC で 42 $^{\circ}$ C の条件で 45 分, 3 回行った。

ハイブリダイズしたプローブの発色は、基本的にはノーザンハイブリダイゼーションの際と同様に行った。すなわち、スライドガラスを緩衝液 1 で 1 分間洗浄後、0.5% ブロッキング試薬を含む緩衝液 1 に 30 分浸し、再び緩衝液 1 で 1 分間洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキゲン抗体を 30 分間インキュベートした。次の緩衝液 1 による洗浄は 15 分, 3 回洗い、緩衝液 2 に 2 分間浸した。発色試薬も同様のものを用い、

スライドガラスとプラスチックバッグに封入し、遮光下で発色させた。発色終了後 TE 緩衝液で発色試薬を置換した。封入にはグリセリン (Merck, Darmstadt, Germany)を用いた。

VI. 免疫組織化学

ホルマリン固定パラフィン切片は、ISH の際と同様にシラン

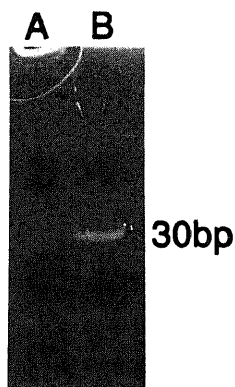


Fig. 1. Polyacrylamide gel electrophoresis of digoxigenin-labeled oligonucleotide probe. Unlabeled oligonucleotide visualized by ethidium bromide presents a single 30 bp band (lane B). In contrast, labeled oligonucleotide does not show any band, probably because of gel mobility shift into smear (lane A). Polyacrylamide gel is 20% in concentration.

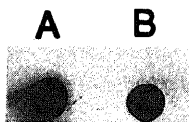


Fig. 2. Direct detection of digoxigenin-labeled oligonucleotide probe. Labeled probe (A) and the kit insert digoxigenin-dUTP labeled control oligonucleotide tailed under the same condition (B) are detected equally intensely.

コーティングスライド上に載せ、キシレンおよびアルコール系列を通し脱パラフィンおよび脱水後用いた。免疫組織化学には、市販のキット (Dako) を用いた。切片をまず、3%過酸化水素水 (Dako) で5分処理することにより、内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックした。PBS で5分、3回洗浄後、ウシ血清アルブミン (Dako) で5分間処理することにより抗体の非特異的反応を5分間ブロックした。再び PBS で同様の洗浄を行なった後、一次抗体として100倍希釈したマウス抗ヒト T 細胞 CD45RO 単クローン抗体 (クローン: UCHL-1) (Dako) を用いた。一次抗体の反応は60分行い、再び PBS で洗浄した。次にビオチン標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン抗体 (Dako) を二次抗体として用い、10分間インキュベートした。続いて PBS で洗浄し、酵素溶液としてペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Dako) をまず10分反応させ、PBS で洗浄後、次に基質溶液として 1.5% 3-アミノ-9-エチルカルバゾール (3-amino-9-ethyl-

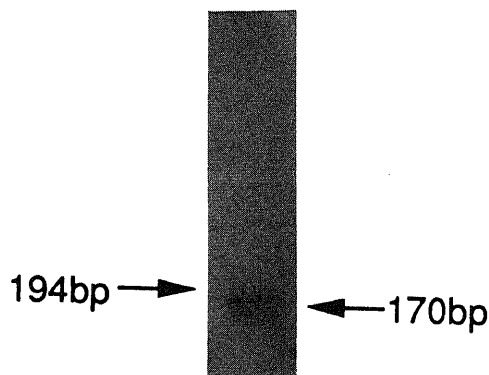


Fig. 3. Northern hybridization. A single 170 bp band in total RNA extracted from Raji cells that contain about 90 copies/cell of EBV DNA is hybridized specifically with the oligonucleotide probe. A 194 bp arrow shows a molecular weight marker.

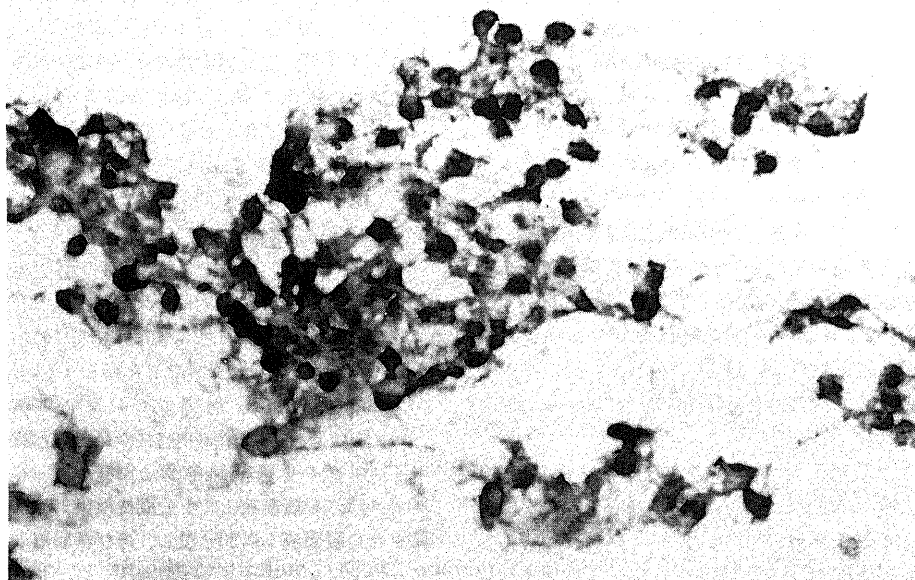


Fig. 4. *In situ* hybridization for EBER-1 with cultured NPC-KT cells. Positive hybridization is seen in all nuclei. Original magnification $\times 400$.

carbazole, AEC) (Dako), 0.05M 酢酸緩衝液 (pH5.2) (Dako) 4ml に対し, 過酸化水素水 1 滴を加えて用い, 8 分反応させた. 最後に蒸留水で洗浄し, マイヤー・ヘマトキシリン溶液 (和光) で対比染色を行った後, グリセリン封入して観察した.

Ⅶ. 臨床検査成績と統計学的解析

EBER-1 陽性 1°SjS 患者と陰性患者の間で, 浸潤巣スコア, 症状 (口腔乾燥, 眼乾燥, 唾液腺腫脹, 関節痛, レイノー現象), 各種臨床検査成績を比較検討した. 検査成績としては, リンパ球数, CD4/CD8 比 (フローサイトメトリー法), 抗核抗体 (間接抗体法), シェーグレン症候群 A/抗 Ro 抗体 (酵素免疫法), SSB/La 抗体 (酵素免疫法), リウマチ因子, 免疫グロブリン G (immunoglobulin G, IgG), 免疫グロブリン M (immunoglobulin M, IgM), 免疫グロブリン A (immunoglobulin A, IgA), 補体第 3 因子, 補体第 4 因子 (以上ネフェロメトリー法), 補体価 (Mayer の 50% 溶血法), 抗 EBV ウィルス capsid 抗原 (virus capsid antigen, VCA) IgG 抗体価, 同 IgM 抗体価, 同 IgA 抗体価, 抗 EBV 早期抗原 (early antigen, EA) IgA 抗体価, 同 IgG 抗体価, 抗 EBV 核抗原 (Epstein-Barr virus nuclear antigen, EBNA) 抗体価 (以上免疫蛍光抗体間接法) について検討した. 統計学的解析は, Fisher の直接確率検定, χ^2 検定または対応のない Wilcoxon 検定を用いて行った.

$p < 0.05$ をもって有意と判定した.

成 績

1. EBER-1 に対する相補的合成オリゴヌクレオチドの純度

1°SjS の発症と EBV との関連を調べるため, EBV より転写され SSB/La 抗原と結合することが知られている RNA の一種である EBER-1 の SG における発現を検討した. EBER-1 の一次塩基配列のうち, 3' 末端の 30 塩基に相補的なオリゴヌクレオチドを合成した. 相同性検索の結果では, 同部位に高い相同性を有する既知の配列は報告されていなかった.

合成オリゴヌクレオチドの純度はポリアクリルアミド電気泳動で調べた. 図 1 に示すように, 未標識のオリゴヌクレオチドは 30bp の位置に単一のバンドとして染色された. これに対し, 標識後エタノール沈殿を行ったオリゴヌクレオチドを泳動したレーンには同じ位置にバンドを認めなかった. この結果は, 標識オリゴヌクレオチド中には未標識のオリゴヌクレオチドはほとんど含まれていないことを示している. ジゴキシンゲンで標識されたオリゴヌクレオチドはスミアとなってゲル中に存在すると思われるが, ポリアクリルアミド自身による非特異的発色のため同定できなかった.

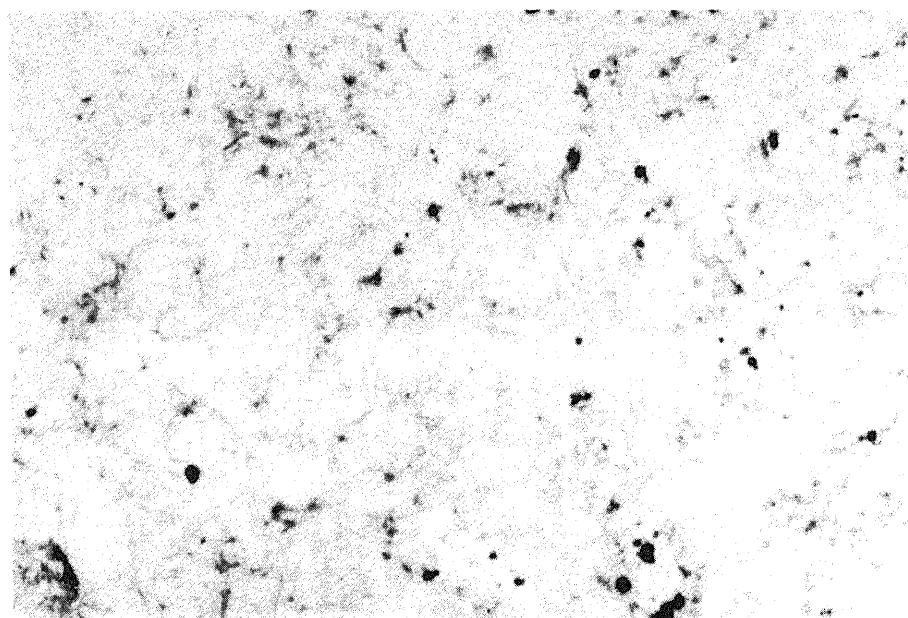


Fig. 5. *In situ* hybridization for EBER-1 with normal SGs. This photograph shows a hybridization negative case. Original magnification $\times 100$.

Table 1. Comparison of expression of EBER-1 in salivary glands between patients with primary Sjögren's syndrome and normal controls

Group ^{a)}	Number of cases examined	Number of EBER-1 -positive cases		
		Ducts	Acini	MNCs
1°SjS SGs	18	9	4	8
Normal SGs	8	3	0	— ^{b)}

a) 1°SjS SGs, salivary glands excised from patients with primary Sjögren's syndrome; Normal SGs, salivary glands excised from normal subjects.
 b) —, no mononuclear cell infiltration was observed in normal SGs.

II. EBER-1 に対する合成オリゴヌクレオチドの特異性

合成した EBER-1 に相補的なオリゴヌクレオチドには、さらに5'末端のジコキゲンによる標識を行った。このプローブをナイロン膜に直接固定して発色させたところ、陽性コントロールとほぼ同等の濃度で発色した(図2)。このことから、プローブの標識効率には問題はないものと考えられた。

次にその特異性を Raji 細胞より抽出した全 RNA を用いて調べた。その結果、用いた全 RNA 中には 170bp の位置にプローブと反応する単一のバンドを認めた(図3)。このことから、作製した非アイソトープ標識プローブが、EBER-1 に特異的にハ

イブリダイズすることが確認された。

また、明らかに陽性となるべき NPC-KT 細胞を用い、ISH による検討を行った。その結果、観察された全ての細胞の核にハイブリダイゼーション陽性の所見を認めた(図4)。核小体が陰性に抜ける像は確認できなかった。

III. 唾液腺組織における生体内局所ハイブリダイゼーションおよび抗 T 細胞抗体による免疫組織化学

1. 対照群

健常者唾液腺 8 検体のうち 3 検体で、導管上皮細胞の核にハイブリダイゼーション陽性所見を認めた(表1)。核小体の陰性

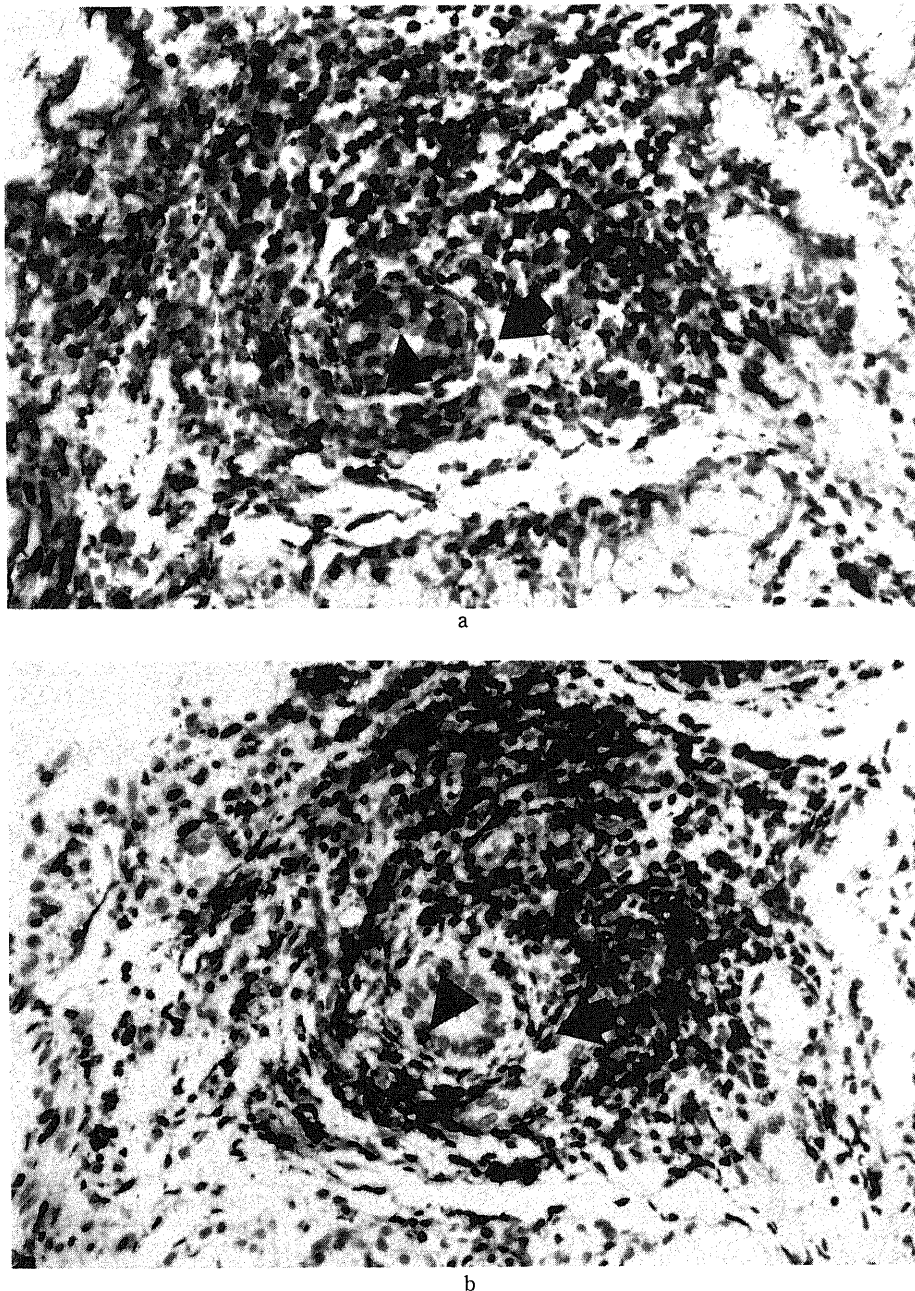


Fig. 6. *In situ* hybridization for EBER-1 and immunohistochemical staining for CD45RO with 1° SjS SGs. (a) *In situ* hybridization study. Positive hybridization is seen in ductal epithelial cells (arrowhead) and infiltrating MNCs. (b) Immunohistochemical study for CD45RO in the section adjacent to (a). A MNC infiltrating into duct is positive for CD45RO (arrowhead). Note the EBER-1 and CD45RO positive cell (arrow). (c) *In situ* hybridization study in another case of 1° SjS SG. (d) Immunohistochemical study for CD45RO in the section adjacent to (c). Original magnification $\times 200$.

像は認めなかった。腺房上皮細胞にハイブリダイゼーション陽性所見を認めたものはなかった。なお、図5にはハイブリダイゼーション陰性の例を示した。

2. 1°SjS 群

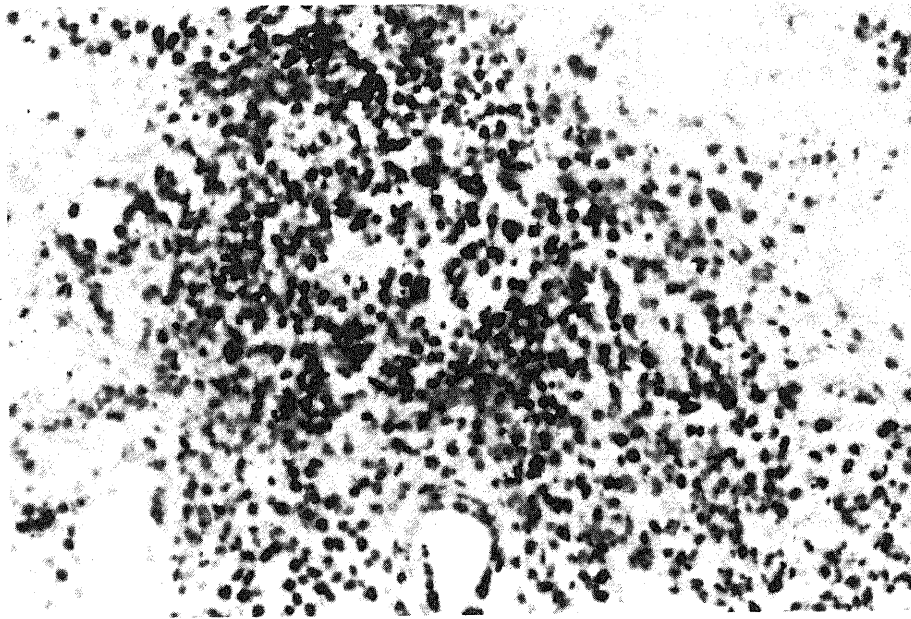
1°SjS 18検体のうち9検体では、導管上皮細胞の核にハイブリダイゼーション陽性所見を認めた(図 6a, c および表1)。この所見は、8検体では非常に強く認められ、発色強度の点は対照群と比較して明らかに強かった。また、浸潤 MNC の標的となっていると思われる導管により強く認める傾向があった。この8検体のうち4検体では、腺房上皮細胞にもハイブリダイゼーション陽性所見を認めた。さらに、8検体全例で浸潤 MNC の一部にハイブリダイゼーション陽性所見を認めた(表1)。

ISH の隣接切片を用いた UCHL-1 による免疫組織化学的検

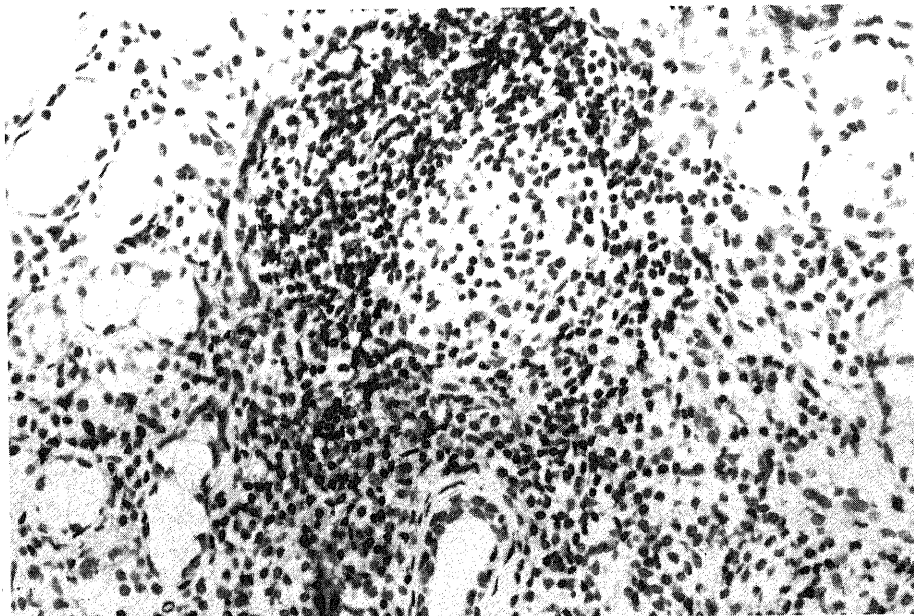
索においては、ハイブリダイゼーション陽性であった9検体全例で浸潤 MNC に陽性細胞を認めた(図 6b, d)。浸潤 MNC における陽性細胞の割合については浸潤巣ごとに異なり、また浸潤巣の大きさ、すなわち浸潤 MNC 数とは特に一定の関係は認めなかった。しかし浸潤巣の中では、より中心、すなわち標的である導管に近い部分で陽性細胞が多い傾向を認めた。このような最も陽性率の高い部分では、浸潤 MNC に占める陽性細胞の割合は90%以上に達していた。この部分を中心に、隣接切片を用いた ISH の結果と注意深く対比してみると、EBER-1 と CD45RO のいずれも陽性の細胞が存在することが明らかとなった(図 6a, c)。

IV. ISH 陽性患者と陰性患者との臨床検査成績の比較

ハイブリダイゼーション陽性であった9検体と、陰性であった9検体の間で、浸潤巣スコア、症状(口腔乾燥, 眼乾燥, 唾液



c



d

腺腫脹, 関節痛, レイノー現象), 検査成績すなわちリンパ球数, CD4/CD8 比, 抗核抗体, シェーグレン症候群 A/抗 Ro 抗体, SSB/La 抗体, リウマチ因子, IgG, IgM, IgA, 補体第 3 因子, 補体第 4 因子, 補体価, 抗 EBV VCA IgG 抗体価, 同 IgM 抗体価, 同 IgA 抗体価, 抗 EBV EA IgA 抗体価, 同 IgG 抗体価, 抗 EBNA 抗体価に統計学的有意差は認めなかった。

考 察

1°SjS の患者血清中に存在する SSB/La 抗体の対応抗原である SSB/La 抗原は, RNA^{59)~62)} および ATP⁶³⁾⁶⁴⁾ 結合部位を持ち, 全ての RNA ポリメラーゼ III により転写された RNA (5S リボソーム RNA およびトランスファー RNA) と結合する^{59)~62)}. このことから SSB/La 抗原は RNA ポリメラーゼ III による転写に必須の核蛋白と考えられている⁶⁴⁾⁶⁵⁾. SSB/La 抗原と EBERs が非常に安定した結合活性を示す³²⁾³³⁾ こと, EBV が 1°SjS の主な標的臓器である唾液腺に潜伏する³⁴⁾ こと, EBV の初感染である伝染性単核球症の後に 1°SjS を発症する症例が存在する³⁵⁾³⁶⁾ ことから, 多くの研究者により 1°SjS と EBV の関与について研究されている。

Venables ら³⁸⁾ は, EBV VCA に対する IgG 型抗体価は, 正常対照群と比較して有意な相違は存在しなかったと報告した. 次いで Origi ら³⁹⁾ は, 抗 VCA IgG 抗体価および EBV EA に対する IgG 抗体価については有意差は得られなかったものの, EBNA に対する抗体価が 1°SjS では有意に高値を示し, さらに 1°SjS を SSB/La 抗体陽性群と陰性群に分けると, 前者で EBNA 抗体価が有意に高値であったと報告した. さらに Yamaoka ら⁴⁰⁾ は, 1°SjS 患者群では抗 VCA IgG および IgM 型抗体価が対照群と比較して有意に高値であったと報告している. しかしその後 Venables ら⁴¹⁾ は合成ペプチドを用いた酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) で抗 EA および抗 EBNA-1 抗体価を, IgG, IgM および IgA 型に分けて測定した結果, いずれの抗体価も 1°SjS 群と対照群の間に有意差は認めなかったとしている。

免疫組織化学的検討を初めて報告したのは Fox ら⁴²⁾ であるが, 彼らは 1°SjS の生検小唾液腺組織 14 例中 8 例で抗 EA-D 抗体で導管上皮および腺房上皮細胞が陽性に染色され, 正常対照群では 14 例中 1 例も染色されなかったと報告した. しかしその後, EA-D, EA-R, VCA, EBNA および潜伏感染膜蛋白 (latent infection membrane protein, LMP) に対する抗体を用いた免疫組織化学で, 否定的な報告が相次いでいる^{43)~45)}.

Fox ら⁴²⁾ はまた, 生検組織からスロットブロットハイブリダイゼーションを用いて, 1°SjS の 20 例中 8 例で直接 EBV の DNA を検出し, 正常対照群では全く検出されなかったと報告した. ついで同じ施設から⁴⁶⁾, PCR を用いて生検組織中の EBV の DNA を増幅したところ, 健康者群では 15 例中 2 例のみが陽性であったのに対し, 1°SjS では 9 例中 7 例が陽性であったと報告された. また, 増幅後の DNA についてサザンハイブリダイゼーションを行い, デンシトメトリーで半定量することにより, 1°SjS SG 中に存在する EBV の DNA 量は, 健康者群で認められるそれに比して多とも述べている. しかしながら, PCR 法で用いられる DNA ポリメラーゼには一定の確率で誤った増幅を行う可能性があり, PCR 法を用いて定量を行う際には, 特殊な方法を用いる必要があることが知られている⁶⁶⁾.

こと, また浸潤している MNC 内に存在する EBV をも同時に増幅するので, 唾液腺固有の細胞内に存在する EBV DNA 量のみを観ているわけではないことから, この比較には無理があると考えざるを得ない. さらに, この報告に続いていくつか PCR を用いた研究の報告がある⁴⁹⁾⁴⁷⁾⁴⁸⁾ が, これらはいずれも 1°SjS SG は, 2°SjS SG, 2°SjS を伴わない膠原病患者 SG あるいは健康対照群 SG と比較して EBV DNA の検出率が高いとは言えないというものである. 我々の検討⁵⁰⁾ でも, 例数は少ないものの, 1°SjS SG, 2°SjS およびシェーグレン症候群を伴わないほかの膠原病患者 SG のいずれにも EBV DNA が検出された. ただし涙腺を用いた Pflugfelder ら⁴⁸⁾ の検討では, 1°SjS SG 10 例中 8 例に EBV DNA が検出されたのに対し, 健康対照群 SG では 34 例中 11 例のみであったと報告されている. いずれにしても, PCR 法では EBV 感染細胞が特定できず, 唾液腺固有細胞に存在するのか, 浸潤細胞に存在するのかは他の方法で検討する必要がある。

1989 年以降, 1°SjS SG 中の EBV DNA を ISH を用いて検討した報告が相次いでなされた. Schuurman ら⁴⁴⁾ の報告では 1°SjS SG の 8 例中 4 例, 2°SjS SG の 5 例中 2 例, シェーグレン症候群を伴わない他の膠原病患者 SG の 16 例中 1 例でハイブリダイゼーション陽性所見が得られている. また, Venables ら⁴¹⁾⁴³⁾によれば, 1°SjS SG の 12 例中 2 例, 2°SjS SG の 3 例中 1 例, シェーグレン症候群を伴わない他の膠原病患者 SG の 4 例中 2 例, 健康対照群 SG の 3 例中 3 例がハイブリダイゼーション陽性であったという. 続く Syrjänen ら⁴⁷⁾ の報告でも 1°SjS SG の 9 例, シェーグレン症候群を伴わない他の膠原病患者 SG の 11 例, 健康対照群 SG の 6 例の全てがハイブリダイゼーション陰性であった. 1°SjS SG に EBV DNA の検出率が高かったとの報告は Mariette ら⁴⁹⁾ が 1°SjS SG の 8 例中 4 例, 2°SjS SG の 6 例中 6 例, シェーグレン症候群を伴わない他の膠原病患者 SG の 39 例中 3 例でハイブリダイゼーション陽性の所見を認めたと報告したもののみである. これらの報告で認められたハイブリダイゼーション陽性所見は何れも導管上皮細胞あるいは腺房上皮細胞のみであり, 浸潤 MNC に認めたとの記載は全く認められない. ただしごく最近になって Pflugfelder ら⁶⁷⁾ は涙腺中に浸潤した B リンパ球領域に陽性所見を認めたと報告している. 報告によって EBV DNA の検出率が異なるのは, 例数が少ないこと, 人種や地域, 使用している診断基準が異なることも理由として挙げられるが, これに加えて EBV DNA を標的としたアイソトープ標識プローブによる ISH が感度や安定性, さらに経済性の面で問題があることも大きな理由の一つと考えられる. さらに, EBV DNA を検出するのみでは, EBV の遺伝情報がどのような形で存在するのか, すなわち持続感染の状態が宿主の DNA 中に組み込まれているのか, あるいは顕性感染の状態が細胞質中に環状の DNA あるいはウィルス粒子として存在するのか全く不明である。

以上のように, 過去のいくつかの報告からは 1°SjS の病態への EBV の関与については肯定とも否定とも結論することはできない. それは結果が報告によって相反するからばかりでなく, それぞれの手法にも理論的な問題点が存在するからである. 本研究で用いた EBER-1 に対する非アイソトープ標識プローブを用いた ISH は, 感度や安定性, 経済性といった従来の ISH 法の問題点をある程度解決したものと考えられる. 今回プローブとして選択した部位は, 二次元構造⁵¹⁾でもパリンドロー

ムを形成する可能性はなく、また SSB/La 抗原と結合する部位にあたる⁶⁰⁾ことから、より安定に保存されているものと考えられる。EBER-1 に対する ISH では、EBERs が持続感染では大量に発現されており^{51,60)}、SSB/La 抗原などのタンパクと結合して^{32,33,65)}非常に安定に保存されることから、RNA を標的とする ISH としては例外的に試料の保存が容易で、通常のホルマリン固定パラフィン切片で十分な感度が得られている。このことは、臨床材料を対象とする ISH の場合、非常に重要な点である。標識については近年非アイソトープ標識とアイソトープ標識で感度にはほとんど差はないものと評価されている。アイソトープ標識の利点は、ハイブリダイゼーション陽性の信号である乳剤中のグレインをカウントする事によりある程度の定量が行える点にある。この点非アイソトープ標識では、染色の強度から目測で半定量を行うことができるに過ぎない。しかし非アイソトープ標識では、アイソトープ標識のグレインのようにアイソトープと乳剤の間に距離があることでエネルギー線が飛散して信号が拡大することはなく、比較的コントラストのはっきりした染色が得られる。また、標識プローブが長期保存できるので標識のむらも少ない。安価で安全に行えることも重要である。本研究でも、これまでの EBV DNA を標的としたアイソトープ標識プローブによる ISH では同定できなかった浸潤 MNC に EBER-1 が同定されたことから、感度の面で従来の方法を上回っていることが理解される。

EBERs は主に持続感染状態の細胞で最大に発現されるものと考えられている⁵¹⁾。したがって EBER-1 に対する ISH では、染色強度が強く EBER-1 のコピー数が多いことは、必ずしも EBV のコピー数が多いことを示すものではない。1°SjS の病態における EBV の関与を示唆する事実の一つとして、1°SjS に特異的に認められる SSB/La 抗体の標的抗原と EBERs の結合が挙げられていることから、EBER-1 陽性細胞の局在や陽性率、染色強度を直接観察することは非常に重要である。本研究では、1°SjS SG の半数で導管上皮細胞に EBER-1 陽性所見を認め、さらに浸潤 MNC の中心に位置する導管でその染色強度が強い傾向を認めた。1°SjS SG では、導管上皮細胞に通常は発現しない主要組織適応抗原 (major histocompatibility complex, MHC) であるヒトリンパ球抗原 (human lymphocyte antigen, HLA) のクラス II 分子、すなわち HLA-DR⁷⁰⁻⁷⁴⁾、HLA-DQ^{73,75)}、HLA-DP^{73,75)} が発現することが知られている。これらは浸潤 MNC 中の主要構成細胞である CD4 陽性 T 細胞^{37,6)} の目標となっているものと考えられるが、これらのクラス II 分子の発現に EBER-1 が関与する可能性が示唆される。従来自己免疫疾患へのウィルスの関与のしかたとして、1) 自己抗原がウィルス構造蛋白と相同性を持つ場合⁷⁷⁾、2) ウィルス抗原と自己抗原がハプテン・キャリアー抗原系を形成する場合⁷⁷⁾、3) 被覆自己抗原がウィルス感染によって露出する場合⁷⁷⁾、4) ウィルスがある特定の免疫担当細胞に感染しその機能を傷めないし活性化する場合^{77,78)}、5) ウィルスが生体成分を変化させ新たな抗原性が発現する場合⁷⁸⁾などが挙げられている。EBER-1 は蛋白に翻訳されない RNA の一種であるから、EBER-1 が関与するとすれば 1) から 3) までの機序は考えにくく、4) ないし 5) の機序ならば起こりうるものと思われる。すなわち、EBERs が SSB/La 抗原など細胞の機能に重要な蛋白質と強固に結合するため蛋白質本来の機能が損なわれる、あるいは SSB/La 抗原に EBERs が結合することにより SSB/La 抗原が新たに抗原

性を獲得するといった仮説が設定できる。1°SjS SG 中に浸潤している T リンパ球の T 細胞受容体 (T cell receptor, TcR) β 鎖のレパトアが限られており⁷⁹⁾、浸潤 T リンパ球が限られたクラス II 上のペプチド抗原を標的としていることが示唆されていることから、特に後者の仮説の場合、新たに抗原性を獲得した SSB/La 抗原がペプチドに分解されてクラス II 抗原上に提示されると考えを進めることができる。エピトープマッピングなどによる SSB/La 抗原および抗体の解析の結果でも、SSB/La 抗体は抗原により誘導されると考えられており⁸⁰⁻⁸²⁾、この仮説に矛盾しない。この仮説を証明するには、今後浸潤している CD4 陽性 T 細胞がクラス II 抗原-SSB/La 抗原の複合体によって刺激されることを示す必要がある。なお、他の少なくとも 5 種以上のウィルスでも、EBERs と高い相同性を持ち SSB/La 抗原と結合する RNA を発現することが知られており、今回も認められたような EBER-1 陰性の例では同様の機序でこのようなウィルスが関与している可能性がある^{33,51,81)}。

本研究で注目すべきもう一つの点は、浸潤 MNC に EBER-1 陽性細胞が認められた点である。EBER-1 陽性の浸潤 MNC の少なくとも一部は T リンパ球と考えられ、残りのほとんどは B リンパ球と考えられる。B リンパ球が EBV の受容体である補体受容体 2 (complement receptor 2, CR2) を有しており EBV 親和性が高く、EBV 感受性細胞であることはよく知られている。しかし一般に T リンパ球は CR2 を持たず、B リンパ球に比して EBV 親和性は非常に低く、EBV は感染できないものと考えられてきた⁸⁰⁾。しかしながら近年、T 細胞系のリンパ腫細胞の中に、EBV の DNA や RNA を有するものが数多く報告されており^{41-71,81,82-20,80)}、このウィルスが腫瘍化の前に T リンパ球に入ったとすると、T リンパ球も EBV 親和性を有するのではないかと考えられるようになった。非悪性 T リンパ球に EBV が感染していたとの報告は、川崎病類似の冠動脈病変を伴う慢性 EBV 感染患者の症例報告で、末梢血リンパ球の 72% が CD4 陽性 T リンパ球であり、その 46% が EBNA 陽性で、ソーティングにより集められた CD4 陽性 T リンパ球から抽出した DNA をサザンハイブリダイゼーションで解析したところ EBV DNA が確認されたとの報告が僅か 1 例あるのみ⁸¹⁾であったが、ごく最近に EBER-1 と T リンパ球抗原との二重染色で、伝染性単核球症患者のリンパ節に EBER-1 陽性 T リンパ球が認められた⁸²⁾との報告がなされた。本研究でも 1°SjS SG 中に EBER-1 陽性 T リンパ球が認められたことは、EBV が非悪性の T リンパ球にも感染することができることを裏付ける重要な証拠と言える。

1°SjS 患者の末梢血に存在する T リンパ球には、いくつかの機能異常が存在することが指摘されている。自己混合リンパ球反応 (autologous mixed lymphocyte reaction, AMLR) は非 T リンパ球細胞表面に提示された抗原に対する T リンパ球の反応を測る方法であるが、1°SjS 患者では低下していることが知られている⁸³⁾。また、1°SjS 患者の 1/4 では末梢血リンパ球の変異抗原物質刺激後のインターロイキン 2 (interleukin 2, IL-2) 産生能が健康人末梢血リンパ球に比して著明に低下している^{84,85)}。さらに 1°SjS 患者末梢血 T リンパ球では、細胞内伝達機構に関わるカルシウム流入の減少^{86,87)}に加え、IL-2 遺伝子の上流に位置するシス因子の一つである Oct-1 への転写因子の結合が低下していることがゲルシフトアッセイで明らかとなっている⁸⁷⁾。一方では 1°SjS 患者末梢血 T リンパ球には、絶対数でも全リン

バ球数に対する相対比でも、HLA-DR や IL-2 レセプター、トランスフェリンレセプターなどの活性化マーカーを表出しているものが多いことが報告されている⁹⁹⁾。しかも、末梢血リンパ球の IL-2 産生能が低い患者群は高い患者群に比し HLA-DR 陽性リンパ球数が有意に多い⁹⁹⁾。全末梢血リンパ球と EBV を混合培養すると、Bリンパ球だけと EBV とを混合培養した時に比べて不活化されたBリンパ球の出現数は少ないが、これはTリンパ球により不活化されたBリンパ球の増殖が抑制されたためと考えられている⁹⁹⁾¹⁰⁰⁾。1°SjS 患者末梢血では、Bリンパ球の増殖を抑制することにより多くの末梢血リンパ球が必要であることが報告されている⁴⁰⁾。したがって 1°SjS に悪性リンパ腫の合併が多いことには、Tリンパ球による制御機構に異常が存在するためである可能性が考えられている。

SG に浸潤しているTリンパ球に機能異常が存在するかどうかについて直接検討した報告は少ない。Fox ら⁹⁹⁾ は、末梢血リンパ球の IL-2 産生能が低い患者群でも、浸潤リンパ球の IL-2 産生能は末梢血リンパ球の IL-2 産生能が正常の群の浸潤リンパ球、健康人の末梢リンパ球、健康人のリンパ節内リンパ球と同等であったとしている。何らかの刺激あるいは情報を受けて活性化され、組織に浸潤したリンパ球の IL-2 産生能が、無刺激の状態と考えられる健康人の末梢あるいはリンパ節内リンパ球と同等であることは、むしろ浸潤しているリンパ球の機能にも異常が存在することを表している可能性がある。

本研究では、隣接切片を用いた EBER-1 と CD45RO の発現の検討で、1°SjS SG 中に浸潤しているTリンパ球にも EBV が存在することが示された。ただしこの EBV の感染が、末梢血あるいはリンパ系中で既に起こっていたものか、あるいは SG 内で新たに起こったものかは不明である。いずれにせよ、EBV が既知あるいは未知のTリンパ球機能異常に関わり、1°SjS の病態に関与している可能性が強く示唆される。

1°SjS 患者の末梢血 MNC を無刺激で培養すると、EBV 産生性の不活化したBリンパ球が高率に樹立される⁴⁰⁾¹⁰⁰⁾¹⁰¹⁾。EBV に感染したBリンパ球は多クローンの免疫グロブリン産生を行う¹⁰²⁾ことから、1°SjS において存在するポリクローナルB細胞活性化¹⁰³⁾に、EBV が関与している可能性が示唆されている。リンパ腫の危険性が高い 1°SjS 患者の末梢血リンパ球を重度複合型免疫不全症マウスに移入したところ、多クローンのB細胞性腫瘍を生じ、腫瘍細胞中には EBV DNA が大量に存在したとも報告されている¹⁰⁴⁾。しかし PCR での検討では、1°SjS 患者末梢血 MNC に EBV DNA が同定されることは予想に反し少なく⁴⁰⁾、生体内では異常があるとはいえTリンパ球などによる制御機構が働いているためと考えられる。しかし本研究で 1°SjS SG 中に多くの EBV 感染Bリンパ球が存在したことは、局所に存在するBリンパ球が多クローンの免疫グロブリンを産生している可能性を示すものと考えられる。また、1°SjS に伴う偽性あるいは悪性リンパ腫が唾液腺あるいは涙腺に原発する例が多いことも、局所のBリンパ球が腫瘍化する場合が多いことを示しているが、この現象にも EBV が関与している可能性が示唆された。

結 論

1°SjS の病因および病態に、EBV が関与するか否かを検討するため、1°SjS SG における EBER-1 の発現を ISH 法で検討した。また、EBER-1 陽性細胞の一部を、隣接切片を用いて免疫

組織化学的に検討し、以下の結論を得た。

1. 1°SjS の18例中9例、健康対照群の8例中3例で、導管上皮細胞に EBER-1 の発現を認めた。導管上皮細胞における EBER-1 の発現は健康対照群に比して強度で、また浸潤 MNC の中心に位置する導管で強い傾向を認めた。

2. 1°SjS の18例中4例で、腺房上皮細胞に EBER-1 の発現を認めた。腺房上皮細胞に EBER-1 発現陽性の4例は、全て導管上皮細胞にも陽性所見を認めた。健康対照群ではこの所見は1例も認められなかった。

3. 1°SjS の18例中8例で、浸潤 MNC に EBER-1 の発現を認めた。浸潤 MNC に EBER-1 発現陽性の8例は、全て導管上皮細胞にも陽性所見を認めた。隣接切片を用いた免疫組織化学による CD45RO 発現の検討では、EBER-1 発現陽性浸潤 MNC の少なくとも一部は、Tリンパ球と考えられた。

4. 以上の結果は、1°SjS の一部においては、唾液腺固有細胞内で EBER-1 が大量に発現し、EBER-1 を発現した導管上皮細胞を目標に MNC が浸潤している可能性を示唆している。また、非悪性のTリンパ球にも EBV が感染しうることを証明し、EBV に感染したTおよびBリンパ球が 1°SjS の病態に関与している可能性を合わせて示している。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜った恩師金沢大学医学部第2内科竹田亮祐教授に深甚の謝意を表します。また、終始直接御指導戴いた金沢大学医学部第2内科紺井一郎助手ならびに金沢大学医学部第2内科腎臓・膠原病研究班の諸先生方に感謝いたします。さらに、ノーザンハイブリダイゼーション法につき御教示戴いた金沢大学医学部第2内科森瀬敏夫助手、生体内局所ハイブリダイゼーション法につき有益な御指導を戴きました金沢大学医学部第1解剖学教室井関尚一教授、培養細胞を御提供下さり有益な御助言を賜りました金沢大学癌研究所ウィルス部佐藤博士、健康人口唇小唾液腺組織を御提供下さいました石川県立中央病院歯科口腔外科坂下英明博士に深く感謝致します。

本論文の一部は、第N回国際シェーグレン症候群シンポジウム(1993年、東京)において発表した。

文 献

- 1) Sjögren, H. S.: Zur Kenntnis der Keratoconjunctivitis sicca (Keratitis follicularis bei hypofunktion der Tränendrüsen). Acta Ophthal. (Kbh.), 11, 1-151 (1933).
- 2) Bloch, K., Buchanan, W., Wohl, M. & Bunim, J. J.: Sjögren's syndrome. A clinical, pathological and serological study of 62 cases. Medicine, 44, 187-231 (1965).
- 3) Fox, R. I., Howell, F. V., Bone, R. C. & Michelson, P.: Primary Sjogren syndrome: Clinical and immunopathologic features. Semin. Arthritis Rheum., 14, 77-105 (1984).
- 4) MacMahon, E. M. E., Glass, J. D., Hayward, S. D., Mann, R. B., Becker, P. S., Charache, P. C., McArthur, J. C. & Ambinder, R. F.: Epstein-Barr virus in AIDS-related primary central nervous system lymphoma. Lancet, 338, 969-973 (1991).
- 5) Carbone, A., Gloghini, A., Zanette, I., Canal, B. & Volpe, R.: Demonstration of Epstein-Barr viral genomes by *in situ* hybridization in acquired immune deficiency syndrome-related high grade and anaplastic large cell CD30+ lymphomas. Am. J. Clin. Pathol., 99, 289-297 (1993).
- 6) Shibata, D., Weiss, L. M., Hernandez, A. M.,

- Nathwani, B. N., Bernstein, L. & Levine, A. M.: Epstein-Barr virus-associated non-Hodgkin's lymphoma in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Blood*, 81, 2102-2109 (1993).
- 7) Herndier, B. G., Sanchez, H. C., Chang, K. L., Chen, Y.-Y. & Weiss, L. M.: High prevalence of Epstein-Barr virus in the Reed-Sternberg cells of HIV-associated Hodgkin's disease. *Am. J. Pathol.*, 142, 1073-1079 (1993).
- 8) Rogers, B. B., Alpert, L. C., Hine, E. A. S. & Buffone, G. J.: Analysis of DNA in fresh and fixed tissue by the polymerase chain reaction. *Am. J. Pathol.*, 136, 541-548 (1990).
- 9) Shiong, Y. S., Lian, J. D., Lin, C. Y., Shu, K. H., Lu, Y. S. & Chou, G.: Epstein-Barr virus-associated T-cell lymphoma of the maxillary sinus in a renal transplant recipient. *Transplant. Proc.*, 24, 1929-1931 (1992).
- 10) Borisch, B., Hennig, I., Horber, F., Bürki, K. & Laissue, J.: Enteropathy-associated T-cell lymphoma in a renal transplant patient with evidence of Epstein-Barr virus involvement. *Virchows Archiv A Pathol. Anat.*, 421, 443-447 (1992).
- 11) Cen, H., Williams, P. A., McWilliams, H. P., Breinig, M. C., Ho, M. & McKnight, J. L. C.: Evidence for restricted Epstein-Barr virus latent gene expression and anti-EBNA antibody response in solid organ transplant recipients with posttransplant lymphoproliferative disorders. *Blood*, 81, 1393-1403 (1993).
- 12) Fox, R. I., Saito, I., Chan, E. K., Josephs, S., Salahuddin, S. Z., Ahlashi, D. V., Staal, F. W., Gallo, R., Pei-Ping, H. & Le, C. S.: Viral genomes in lymphomas of patients with Sjögren's syndrome. *J. Autoimmun.*, 2, 449-455 (1989).
- 13) Wu, T.-C., Mann, R. B., Charache, P., Hayward, S. D., Staal, S., Lambe, B. C. & Ambinder, R. F.: Detection of EBV gene expression in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Int. J. Cancer*, 46, 801-804 (1990).
- 14) Weiss, L. M., Chen, Y.-Y., Liu, X.-F. & Shibata, D.: Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease. A correlative *in situ* hybridization and polymerase chain reaction study. *Am. J. Pathol.*, 139, 1259-1265 (1991).
- 15) Anagnostopoulos, I., Hummel, M., Finn, T., Tiemann, M., Korbjuhn, P., Dimmler, C., Gatter, K., Dallenbach, F., Parwaresch, M. R. & Stein, H.: Heterogeneous Epstein-Barr virus infection patterns in peripheral T-cell lymphoma of angioimmunoblastic lymphadenopathy type. *Blood*, 80, 1804-1812 (1992).
- 16) Kamel, O. W., van de Rijn, M., Weiss, L. M., Zoppo, G. J. D., Hench, P. K., Robbins, B. A., Montgomery, P. G., Warnke, R. A. & Dorfman, R. F.: Reversible lymphomas associated with Epstein-Barr virus occurring during methotrexate therapy for rheumatoid arthritis and dermatomyositis. *N. Engl. J. Med.*, 328, 1317-1321 (1993).
- 17) Khan, G., Norton, A. J. & Slavin, G.: Epstein-Barr virus in Hodgkin disease. Relation to age and subtype. *Cancer*, 71, 3124-3129 (1993).
- 18) Kanavaros, P., Lescs, M.-C., Brière, J., Divine, M., Galateau, F., Joab, I., Bosq, J., Farcet, J.-P., Retes, F. & Gaulard, P.: Nasal T-cell lymphoma: A clinicopathologic entity associated with peculiar phenotype and with Epstein-Barr virus. *Blood*, 81, 2688-2695 (1993).
- 19) Khan, G., Norton, A. J. & Slavin, G.: Epstein-Barr virus in angioimmunoblastic T-cell lymphomas. *Histopathology*, 22, 145-149 (1993).
- 20) Arber, D. A., Weiss, L. M., Albújar, P. F., Chen, Y.-Y. & Jaffe, E. S.: Nasal lymphomas in Peru. High incidence of T-cell immunophenotype and Epstein-Barr virus infection. *Am. J. Surg. Pathol.*, 17, 392-399 (1993).
- 21) Jones, J. F., Shurin, S., Abramowsky, C., Tubbs, R. R., Sciotto, C. G., Wahl, R., Sands, J., Gottman, D., Katz, B. Z. & Sklar, J.: T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. *N. Engl. J. Med.*, 318, 733-741 (1988).
- 22) Su, I.-J., Lin, K.-H., Chen, C.-J., Tien, H.-F., Hsieh, H.-C., Lin, D.-T. & Chen, J.-Y.: Epstein-Barr virus-associated T-cell lymphoma of activated CD8 phenotype. *Cancer*, 66, 2557-2562 (1990).
- 23) Su, I.-J., Hsieh, H.-C., Lin, K.-H., Uen, W.-C., Kao, C.-L., Chen, C.-J., Cheng, A.-L., Kadin, M. E. & Chen, J.-Y.: Aggressive peripheral T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA: A clinicopathologic and molecular analysis. *Blood*, 77, 799-808 (1991).
- 24) Lee, S.-H., Su, I.-J., Chen, R.-L., Lin, K.-S., Lin, D.-T., Chuu, W.-M. & Lin, K.-S.: A pathologic study of childhood lymphoma in Taiwan with special reference to peripheral T-cell lymphoma and the association with Epstein-Barr viral infection. *Cancer*, 68, 1954-1962 (1991).
- 25) Ott, G., Ott, M. M., Feller, A. C., Seidl, S. & Müller-Hermelink, H. K.: Prevalence of Epstein-Barr virus DNA in different T-cell lymphoma entities in a European population. *Int. J. Cancer*, 51, 562-567 (1992).
- 26) Tsai, T.-F., Su, I.-J., Lu, Y.-C., Cheng, A.-L., Yeh, H.-P., Hsieh, H.-C., Tien, H.-F., Chen, J.-S. & Uen, W.-C.: Cutaneous angiocentric T-cell lymphoma associated with Epstein-Barr virus. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 26, 31-38 (1992).
- 27) Ohshima, K., Kikuchi, M., Eguchi, F., Masuda, Y., Sumiyoshi, Y., Mohtai, H., Takeshita, M. & Kimura, N.: Analysis of Epstein-Barr viral genomes in lymphoid malignancy using Southern blotting, polymerase chain reaction and *in situ* hybridization. *Virchows Archiv B Cell Pathol.*, 59, 383-390 (1990).
- 28) Ott, G., Ott, M. M. & Müller-Hermelink, H. K.: EBV DNA in nodal and extranodal non-Hodgkin's lymphomas: Impact of cell lineage, morphology, and site of origin. *Toxicol. Lett.*, 67, 341-351 (1993).
- 29) Strickler, J. G., Rooney, M. T., d'Amore, E. S. G., Copenhaver, C. M. & Roche, P. C.: Detection of Epstein-

- Barr virus by *in situ* hybridization with a commercially available biotinylated oligonucleotide probe. *Modern Pathology*, **6**, 208-211 (1993).
- 30) Wu, T.-C., Mann, R. B., Epstein, J. I., MacMahon, E., Lee, W. A., Charache P., Hayward, S. D., Kurman, R. J., Hayward, G. S. & Ambinder, R. F.: Abundant expression of EBER1 small nuclear RNA in nasopharyngeal carcinoma. *Am. J. Pathol.*, **138**, 1461-1469 (1991).
- 31) Kassan, S. S., Thommas, T. L., Moutsopoulos, H. M., Hoover, R., Kimberly, R. P., Budman, D. R., Costa, J., Decker, J. L. & Chused, T. M.: Increased risk of lymphoma in sicca syndrome. *Ann. Intern. Med.*, **89**, 888-892 (1978).
- 32) Lerner, M. R., Andrews, N. C., Miller, G. & Steitz, J. A.: 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) Howe, J. G. & Shu, M.-D.: Isolation and characterization of the genes for two small RNAs of herpesvirus papio and their comparison with Epstein-Barr virus-encoded EBER RNAs. *J. Virol.*, **62**, 2790-2798 (1988).
- 34) Wolf, H., Haus, M. & Wilmes, E.: Persistence of Epstein-Barr virus in the parotid gland. *J. Virol.*, **51**, 795-798 (1984).
- 35) Whittingham, S., McNeilage, J. & Mackay, I. R.: Primary Sjögren's syndrome after infectious mononucleosis. *Ann. Intern. Med.*, **102**, 490-493 (1985).
- 36) Gaston, J. S. H., Rowe, M. & Bacon, P.: Sjögren's syndrome after infection by Epstein-Barr virus. *J. Rheumatol.*, **17**, 558-561 (1990).
- 37) Utz, U., Biddison, W. E., McFarland, H. F., McFarlin, D. E., Flerlage, M. & Martin, R.: Skewed T-cell receptor repertoire in genetically identical twins correlates with multiple sclerosis. *Nature*, **364**, 243-247 (1993).
- 38) Venables, P. J. W., Ross, M. G. R., Charles, P. J., Melsom, R. D., Griffiths, P. D. & Maini, R. N.: A seroepidemiological study of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in rheumatoid arthritis and sicca syndrome. *Ann. Rheum. Dis.*, **44**, 742-746 (1985).
- 39) Origi, L., Hu, C., Bertetti, E., Asero, R., D'Agostino, P., Radelli, L. & Riboldi, P.: Antibodies to Epstein-Barr virus and cytomegalovirus in primary Sjögren's syndrome. *Boll. Ist. Sieroter. Milan.*, **67**, 265-274 (1988).
- 40) Yamaoka, K., Miyasaka, N. & Yamamoto, K.: Possible involvement of Epstein-Barr virus in polyclonal B cell activation in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.*, **31**, 1014-1021 (1988).
- 41) Venables, P. J. W., Baboonian, C., Horsfall, A. C., Haliday, D., Maini, R. N., Teo, C. G., Mageed, R. & Millman, G.: The response to Epstein-Barr virus infection in Sjögren's syndrome. *J. Autoimmun.*, **2**, 439-448 (1989).
- 42) Fox, R. I., Pearson, G. & Vaughan, J. H.: Detection of Epstein-Barr virus-associated antigens and DNA in salivary gland biopsies from patients with Sjögren's syndrome. *J. Immunol.*, **137**, 3162-3168 (1986).
- 43) Venables, P. J. W., Teo, C. G., Baboonian, C., Griffin, B. E. & Hughes, R. A.: Persistence of Epstein-Barr virus in salivary gland biopsies from healthy individuals and patients with Sjögren's syndrome. *Clin. Exp. Immunol.*, **75**, 359-364 (1989).
- 44) Schuurman, H.-J., Schemmann, H. G., de Weger, R. A., Aanstoot, H. & Hene, R.: Epstein-Barr virus in the sublabial salivary gland in Sjögren's syndrome. *Am. J. Clin. Pathol.*, **91**, 461-63 (1989).
- 45) Deacon, E. M., Matthews, J. B., Potts, A. J. C., Hamburger, J., Bevan, I. S. & Young, L. S.: Detection of Epstein-Barr virus antigens and DNA in major and minor salivary glands using immunocytochemistry and polymerase chain reaction: possible relationship with Sjögren's syndrome. *J. Pathol.*, **163**, 351-360 (1991).
- 46) Saito, I., Serenius, B., Compton, T. & Fox, R. I.: Detection of Epstein-Barr virus DNA by polymerase chain reaction in blood and tissue biopsies from patients with Sjögren's syndrome. *J. Exp. Med.*, **169**, 2191-2198 (1989).
- 47) Syrjänen, S., Kärjä, V., Chang, F., Johansson, B. & Syrjänen, K.: Epstein-Barr virus involvement in salivary gland lesions associated with Sjögren's syndrome. *ORL; J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.*, **52**, 254-259 (1990).
- 48) Pflugfelder, S. C., Crouse, C., Pereira, I. & Atherton, S.: Amplification of Epstein-Barr virus genomic sequences in blood cells, lacrimal glands, and tears from primary Sjögren's syndrome patients. *Ophthalmology*, **97**, 976-984 (1990).
- 49) Mariette, X., Gozlan, J., Clerc, D., Bisson, M. & Morinet, F.: Detection of Epstein-Barr virus DNA by *in situ* hybridization and polymerase chain reaction in salivary gland biopsy specimens from patients with Sjögren's syndrome. *Am. J. Med.*, **90**, 286-294 (1991).
- 50) 野村英樹, 川野充弘, 岩井中陽一, 中島昭勝, 紺井一郎, 東福要平, 竹田亮祐, 横井 透: シェーグレン症候群患者小唾液腺組織中 Epstein-Barr virus genome の証明. *リウマチ*, **30**, 678 (1990).
- 51) Rosa, M., Gottlieb, E., Lerner, M. R. & Steitz, J. A.: Striking similarities are exhibited by two small Epstein-Barr virus-encoded ribonucleic acids and the adenovirus-associated ribonucleic acids VAI and VAII. *Mol. Cell. Biol.*, **1**, 785-796 (1981).
- 52) Weigel, R., Fischer, D. K., 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).
- 53) Gilligan, K., Rajadurai, P., Resnick, L. & Raab-Traub, N.: Epstein-Barr virus small nuclear RNAs are not expressed in permissively infected cells in AIDS-associated leukoplakia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 8790-8794 (1990).

- 54) Howe, J. G. & Steitz, J. A.: Localization of Epstein-Barr virus-encoded small RNAs by *in situ* hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 9006-9010 (1986).
- 55) Toczyski, D. P. W. & Steitz, J. A.: EAP, a highly conserved cellular protein associated with Epstein-Barr virus small RNAs (EBERs). EMBO J., 10, 459-466 (1991).
- 56) 大藤 眞: 昭和52年度研究業績報告総括. 厚生省特定疾患シェーグレン病調査研究班昭和52年度研究業績, 3-6 頁, 1977.
- 57) Brandsma, J. & Miller, G.: Nucleic acid spot hybridization: rapid quantitative screening of lymphoid cell lines for Epstein-Barr viral DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77, 6851-6855 (1980).
- 58) Takimoto, T., Ogura, H., Sato, H., Umeda, R. & Hatano, M.: Isolation of transforming and early antigen-inducing Epstein-Barr virus from nasopharyngeal carcinoma hybrid cells (NPC-KT). J. Natl. Cancer Inst., 74, 57-60 (1985).
- 59) Rinke, J. & Steitz, J. A.: Precursor molecules of both human 5S ribosomal RNA and transfer RNAs are bound by a cellular protein reactive with anti-La lupus antibodies. Cell, 29, 149-159 (1982).
- 60) Stefano, J. E.: Purified lupus antigen La recognizes an oligouridylylate stretch common to the 3' termini of RNA polymerase III transcripts. Cell, 36, 145-154 (1984).
- 61) Keene, J. D., Deutscher, S. L., Kenan, D. & Kelekar, A.: Nature of the La and Ro RNPs. Mol. Biol. Rep., 12, 235-238 (1987).
- 62) Chan, E. K. L., Sullivan, K. F. & Tan, E. M.: Ribonucleoprotein SS-B/La belongs to a protein family with consensus sequences for RNA-binding. Nucl. Acid. Res., 17, 2233-2244 (1989).
- 63) Bachmann, M., Pfeifer, K., Schröder, H.-C. & Müller, E. G.: Characterization of the autoantigen La as a nucleic acid-dependent ATPase/dATPase with melting properties. Cell, 60, 85-93 (1990).
- 64) Topfer, F., Gordon, T. & McCluskey, J.: Characterization of the mouse autoantigen La (SS-B). Identification of conserved RNA-binding motifs, a putative ATP binding site and reactivity of recombinant protein with poly(U) and human autoantibodies. J. Immunol., 150, 3091-3100 (1993).
- 65) Gottlieb, E. & Steitz, J. A.: Function of the mammalian La protein: evidence for its action in transcription termination by RNA polymerase III. EMBO J., 8, 851-861 (1989).
- 66) Wang, A. M. & Mark, D. F.: Quantitative PCR. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White (eds.), PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, 1st ed., p70-75, Academic Press, San Diego, 1990.
- 67) Pflugfelder, S. C., Crouse, C. A., Monroy, D., Yen, M., Row, M. & Atherton, S. S.: Epstein-Barr virus and the lacrimal gland pathology of Sjögren's syndrome. Am. J. Pathol., 143, 49-64 (1993).
- 68) Glickman, J. N., Howe, J. G. & Steitz, J. A.: Structural analysis of EBER1 and EBER2 ribonucleoprotein particles present in Epstein-Barr virus-infected cells. J. Virol., 62, 902-911 (1988).
- 69) Howe, J. G. & Shu, M.-D.: Epstein-Barr virus small RNA (EBER) genes: Unique transcription units that combine RNA polymerase II and III promoter elements. Cell, 57, 825-834 (1989).
- 70) Lindahl, G., Hedfors, E., Klareskog, L. & Forsum, U.: Epithelial HLA-DR expression and T lymphocyte subsets in salivary glands in Sjögren's syndrome. Clin. Exp. Immunol., 61, 475-482 (1985).
- 71) Fox, R. I., Bumol, T., Fantozzi, R., Bone, R. & Schreiber, R.: Expression of histocompatibility antigen HLA-DR by salivary gland epithelial cells in Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum., 29, 1105-1111 (1986).
- 72) Moutsopoulos, H. M., Hooks, J. J., Chan, C. C., Dalavanga, Y. A., Skopouli, F. N. & Detrick, B.: HLA-DR expression by labial minor salivary gland tissues in Sjögren's syndrome. Ann. Rheum. Dis., 45, 677-683 (1986).
- 73) Jonsson, R., Klareskog, L., Backman, K. & Tarkowski, A.: Expression of HLA-D locus (DP, DQ, DR) coded antigens, beta2-microglobulin, and the interleukin 2 receptor in Sjögren's syndrome. Clin. Immunol. Immunopathol., 45, 235-243 (1987).
- 74) Franco, A., Valesini, G., Barnaba, V., Silvagni, C., Tiberti, A. & Balsano, F.: Class II MHC antigen expression on epithelial cells of salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. Clin. Exp. Rheumatol., 5, 199-203 (1987).
- 75) Thrane, P. S., Halstensen, T. S., Haanaes, H. R. & Brandtzaeg, P.: Increased epithelial expression of HLA-DQ and HLA-DP molecules in salivary glands from patients with Sjögren's syndrome compared with obstructive sialadenitis. Clin. Exp. Immunol., 92, 256-262 (1993).
- 76) Adamson, T. C., Fox, R. I., Frisman, D. M. & Howell, F. V.: Immunohistologic analysis of lymphoid infiltrates in primary Sjögren's syndrome using monoclonal antibodies. J. Immunol., 130, 203-208 (1983).
- 77) 石倉 浩, 吉木 敬: 自己免疫疾患発症における微生物の関与—概説. 臨床免疫, 22, 50-58 (1990).
- 78) 宮坂信之, 檜垣 恵, 山本興太郎, 立石睦人: Sjögren 症候群とウィルス. 内科, 65, 835-839 (1990).
- 79) Sumida, T., Yonaha, F., Tanabe, E., Koike, T., Tomioka, H. & Yoshida, S.: T cell receptor repertoire of infiltrating T cells in lips of Sjögren's syndrome patients. J. Clin. Invest., 89, 681-685 (1992).
- 80) Chambers, J. C., Kenan, D., Martin, B. J. & Keene, J. D.: Genomic structure and amino acid sequence domains of the human La autoantigen. J. Biol. Chem., 263 18043-18051 (1988).
- 81) Sturgess, A. D., Peterson, M. G., McNeilage, L. J., Whittingham, S. & Coppel, R. L.: Characteristics and epitope mapping of a cloned human autoantigen La. J. Immunol., 140, 3212-3218 (1988).
- 82) St. Clair, E. W., Pisetsky, D. S., Reich, C. F. & Keene, J. D.: Analysis of autoantibody binding to different

regions of the human La antigen expressed in recombinant fusion proteins. *J. Immunol.*, 141, 4173-4180 (1988).

83) Rauh, A. J. G., Hornig, H. & Lührmann, R.: At least three distinct B cell epitopes reside in the C-terminal half of La protein, as determined by a recombinant DNA approach. *Eur. J. Immunol.*, 18, 2049-2057 (1988).

84) Kohsaka, H., Yamamoto, K., Fujii, H., Miura, H., Miyasaka, N., Nishioka, K. & Miyamoto, T.: Fine epitope mapping of the human SS-B/La protein. *J. Clin. Invest.*, 85, 1566-1574 (1990).

85) McNeilage, L. J., Macmillan, E. M. & Whittingham, S. F.: Mapping of epitopes on the La (SS-B) autoantigen of primary Sjögren's syndrome: identification of a cross-reactive epitope. *J. Immunol.*, 145, 3829-335 (1990).

86) Bini, P., Chu, J.-L., Okolo, C. & Elkon, K.: Analysis of autoantibodies to recombinant La (SS-B) peptides in systemic lupus erythematosus and primary Sjögren's syndrome. *J. Clin. Invest.*, 85, 325-333 (1990).

87) St. Clair, E. W., Burch, J. A., Ward, M. M., Keene, J. D. & Pisetsky, D. S.: Temporal correlation of antibody responses to different epitopes of the human La autoantigen. *J. Clin. Invest.*, 85, 515-521 (1990).

88) McNeilage, L. J., Umaphysivam, K., Macmillan, E., Guidolin, A., Whittingham, S. & Gordon, T.: Definition of a discontinuous immunodominant epitope at the NH₂ terminus of the La/SS-B ribonucleoprotein autoantigen. *J. Clin. Invest.*, 89, 1652-1656 (1992).

89) Weng, Y. M., McNeilage, J., Topfer, F., McCluskey, J., & Gordon, T.: Identification of an human-specific epitope in a conserved region of the La/SS-B autoantigen. *J. Clin. Invest.*, 92, 1104-1108 (1993).

90) Sauvageau, G., Stocco, R., Kasparian, S. & Menezes, J.: Epstein-Barr virus receptor expression on human CD8⁺ (cytotoxic/suppressor) T lymphocytes. *J. Gen. Virol.*, 71, 379-386 (1990).

91) Kikuta, H., Taguchi, Y., Tomizawa, K., Kojima, K., Kawamura, N., Ishizaka, A., Sakiyama, Y., Matsumoto, S., Imai, S., Kinoshita, T., Koizumi, S., Osato, T., Kobayashi, I., Hamada, I. & Hirai, K.: Epstein-Barr virus genome-positive T lymphocytes in a boy with chronic active EBV infection associated with Kawasaki-like disease. *Nature*, 333, 455-457 (1988).

92) Tokunaga, M., Uemura, Y., Tokudome, T. & Sato, E.: Epstein-Barr virus-infected T cells in infectious mononucleosis. *Acta Pathol. Jpn.*, 43, 146-147 (1993).

93) Miyasaka, N., Sauvezie, B., Pierce, D. A., Daniels, T. E. & Talal, N.: Decreased autologous mixed lymphocyte reaction in Sjögren's syndrome. *J. Clin. Invest.*, 66, 928-933

(1980).

94) Miyasaka, N., Nakamura, T., Russel, I. J. & Talal, N.: Interleukin 2 deficiencies in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 31, 109-117 (1984).

95) Fox, R. I., Theofilopoulos, A. N. & Altman, A.: Production of interleukin 2 (IL 2) by salivary gland lymphocytes in Sjögren's syndrome. Detection of reactive cells by using antibody directed to synthetic peptides of IL 2. *J. Immunol.*, 135, 3109-3115 (1985).

96) Flescher, E., Dauphinee, M. J., Fossum, D., Ledbetter, J. & Talal, N.: Signal transduction in Sjögren's syndrome T cells. Abnormalities associated with a newly described human A-type retrovirus. *Arthritis Rheum.*, 35, 1068-1074 (1992).

97) Flescher, E., Vela-Roch, N., Escalante, A. & Talal, N.: T lymphocyte transcription factors in Sjögren's syndrome. Proceedings of 14th international symposium of Sjögren's syndrome. Kugler publications, Amsterdam, in press.

98) Youinou, P., Pennec, Y. L., Blaschek, M. A., Gentric, A., Jouquan, J., Lamour, A. & Angelidis, P.: Activation of peripheral blood lymphocytes in patients with primary Sjögren's syndrome. *Rheumatol. Int.*, 8, 125-130 (1988).

99) Thorley-Lawson, D. A., Chess, L. & Strominger, J. L.: Suppression of in vitro Epstein-Barr virus infection. A new role for adult human T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 146, 495-508 (1977).

100) Frugoni, P., Pike, S. E. & Tosato, G.: A mechanism of T cell regulation of Epstein-Barr virus latency. *Cell. Immunol.*, 147, 256-266 (1993).

101) Tateishi, M., Saito, I., Yamamoto, K. & Miyasaka, N.: Spontaneous production of Epstein-Barr virus by B lymphoblastoid cell lines obtained from patients with Sjögren's syndrome. Possible involvement of a novel strain of Epstein-Barr virus in disease pathogenesis. *Arthritis Rheum.*, 36, 827-835 (1993).

102) Kirschner, H., Tosato, G., Blaese, R. M., Broder, S. & Magrath, I. T.: Polyclonal immunoglobulin secretion by human B lymphocytes exposed to Epstein-Barr virus in vitro. *J. Immunol.*, 122, 1310-1313 (1979).

103) Alspaugh, M. A. & Tan, E. M.: Antibodies to cellular antigens in Sjögren's syndrome. *J. Clin. Invest.*, 55, 1067-1073 (1975).

104) Fox, R. I., Pisa, P., Pisa, E. K. & Kang, H.-I.: Lymphoproliferative disease in SCID mice reconstituted with human Sjögren's syndrome lymphocytes. *J. Clin. Lab. Anal.*, 7, 46-56 (1993).

