

学位論文題名

慢性関節リウマチ患者滑膜組織における
EB ウイルスの存在に関する検討

学位論文内容の要旨

I. 背景

慢性関節リウマチ(以下 RA)は、関節を病変の主座とする原因不明の慢性炎症性疾患であり、遺伝的素因のあるものに微生物感染や内分泌異常などの様々な要因が加わって発症すると考えられている。中でも微生物と RA の関連は以前より指摘されており、微生物が RA の病態に関与する機序として①.微生物抗原と滑膜成分との交差抗原性、②. 関節内での微生物抗原に対する免疫反応の惹起、③. 微生物由来のスーパー抗原による T 細胞の活性化、④.微生物感染細胞によるサイトカイン産生、⑤.微生物感染細胞による自己抗体産生、⑥. 免疫複合体の産生、⑦. 微生物感染による滑膜細胞の増殖誘導などがあげられている。

微生物感染の中でも EB ウイルス(以下 EBV)は以前から RA との関連が強く疑われているウイルスである。EBV と RA の関連についてはこれまで、EBV 抗原に対する免疫反応が自己滑膜成分に交差反応することで組織障害を惹起することや、伝染性単核症で血中に様々な自己抗体が出現することから EBV が B リンパ球の活性化を通して自己免疫疾患の発症に関与するとする可能性が疑われていた。また、RA 患者において EBV の活性化や EBV 特異的 T 細胞の機能低下も報告されているが、EBV の RA 患者滑膜組織における存在については明らかな見解が得られていなかった。

最近になって RA 患者滑膜組織から 100 % EBV 陽性の滑膜細胞 (DSEK 細胞) が樹立されこれらが溶解感染を生じていること、RA 患者滑膜浸潤 T 細胞が EBV 溶解感染時に発現される特異的抗原である BZLF-1 や BMLF-1 を認識していることも示されるなど、RA 患者滑膜組織における EBV の存在を強く示唆する所見が次々と報告されている。そこで、今回 RA 患者滑膜組織におけるウイルス量やウイルスの局在および感染様式について検討した。

II. 対象と方法

滑膜切除術又は、人工関節置換術時に得られた 1987 年の American College of Rheumatology の分類基準を満たす RA 患者 32 例 32 関節および変形性関節症 (以下 OA) 患者 30 例 30 関節の滑膜組織の一部をパラフィン包埋すると同時に-80℃で凍結保存し以下の検討を行った。

①.冷凍組織から DNA を抽出し、そのうち 1 μ g の DNA を用いて、EBV BamHI-W 領域

を増幅するプライマーを用いた PCR 法を施行した。ウイルス量の多い検体については、20 μ g の DNA を用いて同部位を probe としたサザンブロット法を行い滑膜組織内のウイルス量を決定した。

②.①でウイルス量が多かった検体についてはパラフィン包埋組織を用い EBV RNA EBER に対する *in situ hybridization* (以下 ISH) を施行、さらに EBV の BamHI-W 領域に対する RNA probe をセンスプローブとして用いた DNA ISH も施行した。

③.同様に①でウイルス量が多かった検体について、冷凍組織を用いて EBV 関連蛋白 BZLF1 および gp350/220 に対する免疫染色を行った。

④.滑膜組織採取時に同時に得た患者血清および年齢・性を一致させた 30 例の健常人血清を用いて、抗 VCA 抗体、抗 EA 抗体、抗 EBNA 抗体の検出を行った。それぞれの抗体価については幾何平均値 (Geometric mean titer : GMT) を用いて student's-t-test で、また陽性率については χ^2 -test を用いて有意差検定を行った。

Ⅲ. 結果

PCR 法では Raji 細胞を用いた検出感度は 1 コピー/5000 細胞であったが、EBV DNA は RA 32 例中 15 例 (47%) で検出された。一方 OA 30 例では 1 例も検出されず、RA 患者滑膜組織には有意に高率に ($P < 0.01$) EBV DNA が存在することが確認された。さらに、PCR 法で 1000 細胞あたり 1 コピー以上の EBV を有した検体 9 例の DNA を用いたサザンブロット法では 3 例が陽性であり、うち 2 例は 1 コピー/10 細胞以上の EBV DNA を有していた。

次に PCR 法で 1000 細胞あたり 1 コピー以上の EBV を有した 9 例のうち、検体の得られた 8 例につき組織学的検討を行ったところ、EBER に対する ISH では 5 例に、また DNA ISH では 3 例に陽性シグナルが検出された。DNA ISH では陽性コントロールとして用いた抗ヒト IgG 処理 Akata 細胞で陽性シグナルが検出されたが、Raji 細胞では検出されず、溶解感染時にのみ陽性となると判断した。従って RA 患者で検出された DNA ISH の陽性シグナルは溶解感染を示唆するものと思われた。さらに免疫組織染色で BZLF-1 は全例に、gp350/220 は 7 例に検出された。いずれの検討でも陽性シグナルはリンパ球のみならず滑膜組織の一部にもみとめられた。同時に施行した血清学的検討では、RA 患者では OA 患者と比較して抗 VCA 抗体が高値 ($P < 0.01$) であり、抗 EA 抗体も高頻度 ($P < 0.01$) かつ高力価 ($P < 0.05$) で検出された。

Ⅳ. 考案

以上の結果は RA 患者滑膜組織内で高率に EBV 感染が生じており、しかも溶解感染が存在することを示す所見である。RA 患者滑膜組織で EBV の溶解感染が存在することは、Koide らが樹立した DSEK 細胞で持続的に溶解感染が生じているのと同一の現象が *in vivo* でも生じている可能性を強く示唆する。DSEK 細胞では B リンパ球での EBV 受容体である CD21 が陰性であることから、滑膜細胞への感染様式としては cell to cell contact など CD21 以外のレセプターを介した機序が考えられる。

今回対象とした症例が平均罹病期間 14 年という比較的慢性期の症例であることから、これらの現象が RA の病因に関わる初期からみられる現象なのか、病期が進んで慢性期に

入り病気そのものないしは治療によって免疫異常が生じた結果二次的に生じた現象なのかについては明らかではない。

EBV 溶解感染が RA 患者滑膜組織内で生じていることから、EBV 感染により滑膜増殖が直接的に誘導される可能性や、EBV 感染細胞から産生されるサイトカインを通じて EBV が RA の病態に関与している可能性が考えられる。その一方で溶解感染に際して発現される BZLF1 や BMLF-1 などの EBV 関連蛋白が滑膜内で持続的に抗原として提示され、それを認識する T 細胞が滑膜内に浸潤している可能性がある。このように EBV は関節腔内で炎症反応を惹起することで RA の病態に関与しているものと思われる。いずれにしても本検討で得られた結果は、EBV の RA の病態形成への関与を強く示唆する所見と考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 高 田 賢 蔵
副 査 教 授 三 浪 明 男

学 位 論 文 題 名

慢性関節リウマチ患者滑膜組織における

EB ウイルスの存在に関する検討

慢性関節リウマチ(RA)と EB ウイルス(EBV)の関連は以前から疑われていたが、EBV の RA 患者滑膜組織における存在については明らかな見解が得られていなかった。最近になって RA 患者滑膜組織から 100%EBV 陽性の滑膜線維芽細胞株(DSEK 株)が樹立され、RA 患者滑膜浸潤 T 細胞が EBV 関連抗原を認識しているとの報告もなされている。これらの事実は RA 患者滑膜組織における EBV の存在を強く示唆するものであり、本研究では RA 患者滑膜組織における EBV のウイルス量やウイルスの局在および感染様式について検討した。

検討に際しては、RA および対照として変形性関節症(OA)の患者滑膜組織を採取・2分割し、一方を凍結保存、他方をパラフィン包埋した。凍結保存組織から抽出した DNA 1 μ g を用いて DNA PCR 法で EBV の有無を半定量的にスクリーニングし、EB ウイルスが 1 コピー/1000 細胞以上認められた症例についてはサザンブロット法、パラフィン包埋組織を用いた RNA *in situ* hybridization(ISH)および DNA ISH、さらに凍結保存組織の一部を用いて免疫組織染色も施行した。滑膜組織を採取した際同時に血清も採取し、EBV 関連抗体価の測定に用いた。

DNA PCR 法では、RA 患者で EBV DNA を有する例が 15 例 47%にみられたのに対し、OA 患者では 1 例も検出されず、RA 患者において有意に高頻度に EBV DNA が検出された。RA 患者では EBV のウイルス量が 1 コピー/1000 細胞より多い症例が 9 例みとめられ、このうち 3 例では DNA 20 μ g を用いたサザンブロット法でも EBV DNA が検出された。組織学的検討は 9 例中 8 例に行い、RNA ISH では 5 例で、DNA ISH では 4 例で、免疫組織染色では BZLF1 が 8 例で、gp350/220 が 7 例で陽性シグナルが検出され、それぞれの検討において滑膜組織に浸潤するリンパ球のみならず滑膜細胞にも陽性像をみとめた。DNA ISH は陽性コントロール切片の検討により溶解感染のみを検出し得ると考えられ、免疫組織染色で EBV 溶解感染時に発現される BZLF1 および gp350/220 が発現されていることから、RA 患者滑膜組織内でリンパ球ならびに滑膜細胞で EBV の溶解感染が存在していることが示された。

EBV 関連抗体価の検討には、RA および OA の他に年齢・性を一致させた健康人の血清も用いたが、抗 VCA 抗体の抗体価、抗 EA 抗体の陽性率、抗 EA 抗体の抗体価が RA 患者で OA 患者および健康人と比較して有意に高値であり RA 患者における EB ウイルスの活性化が示唆された。

EBV 陽性 RA 患者の臨床像の特徴を検討するために DNA PCR 法で陽性であった 15 例と、陰性であった 17 例について性別、年齢、罹病期間、CRP の値、リウマトイド因子陽性率、および組織型を比較したが、EBV 陽性 RA 患者で年齢が有意に若年であった以外は、両者に臨床的差異は認めなかった。

以上の検討結果から、RA 患者滑膜組織において EBV の溶解感染が高率に生じ、ウイルス産生が亢進していることが示された。また EBV の感染の標的はリンパ球のみならず滑膜細胞であることも示された。

質疑応答においては三浪教授から半分の症例で EBV が検出されなかった理由、EBV の陽性例と陰性例で臨床像に差がない理由、滑膜細胞への EBV の感染機序についての質問があった。高田教授からは、同一症例の複数関節の検討の有無、細胞性免疫の検討の有無、ウイルス量が多い例の EBV 関連抗体価について、EBV が滑膜内で産生するサイトカインについての質問があった。小池教授からは、リウマトイド因子が B 細胞に作用し溶解感染が起きている可能性、滑膜細胞における CD21 やそのホモログの発現の検討の有無、組織所見で EBV 陽性細胞が少ないことの意味合いについて質問があり、いずれの質問に対しても、申請者は概ね適切に回答した。

本論文における検討から、EBV が様々な形で RA における滑膜炎に関与している可能性が考えられ、今後の RA の病態解明に寄与するところが大きいものとする。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。