

奨励賞受賞者論文

# 悪性リンパ腫における末梢血 EBV-DNA 量測定の意味

岡本晃直・柳田正光・三浦浩樹<sup>1</sup>・稲熊容子  
徳田倍将・蟹江匡治・山本幸也・富田章裕  
赤塚美樹・岡本昌隆・吉川哲史<sup>1</sup>・恵美宣彦  
(藤田保健衛生大学医学部・血液内科学教室)  
(<sup>1</sup>藤田保健衛生大学医学部・小児科学教室)

## はじめに

Epstein-Barr virus (EBV) は Burkitt リンパ腫から単離された、 $\gamma$  ヘルペスウイルス属のウイルスである。EBV はわが国では健常成人の 90% 以上が感染しているウイルスであり<sup>1,2</sup>、初期に B 細胞に感染し、潜伏感染の形態をとっている。EBV はがんウイルスとして知られているが、Burkitt リンパ腫以外にも、リンパ腫で最も多い亜型であるびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) の約 10%、移植や加齢、HIV などの免疫不全を背景とするリンパ増殖性疾患 (LPD)、Hodgkin リンパ腫、NK/T 細胞リンパ腫、一部の上咽頭がん、胃がんにおいてもその関与が指摘されている。

これら疾患への EBV の関与は、組織学的には EBV-encoded small RNA in situ hybridization (EBER-ISH) 法により診断されるが<sup>3</sup>、全てのリンパ増殖性疾患、上咽頭がん、胃がんに EBER-ISH をスクリーニングとして実施するのは困難であり、それゆえ EBV 関連疾患を正確に診断することは難しかった。また、EBER-ISH 法は半定量検査であり、陽性とする判定基準が確立していないため、陽性判定が施設あるいは病理医によって異なってしまうという問題があり、EBV 関連の LPD をより正確かつ簡便に診断する方法が必要とされてきた。

この臨床課題を克服するため、いくつかの手法が検討されてきたが、末梢血中の EBV DNA 量と EBV-LPD との関連性の検討もその一つである。われわれもここに着目し、DLBCL において治療前の血清 EBV DNA 量の測定結果と EBV 関連 DLBCL の診断および予後との関連を検討し、過去にその成果を報告した<sup>4</sup>。本稿では、末梢血の EBV DNA 量と DLBCL との関連性および、同様の研究が施行されている NK/

T 細胞リンパ腫および Hodgkin リンパ腫について解説する。

## 1. 全血中 EBV DNA と末梢血細胞遊離 EBV DNA と単核球中 EBV DNA

EBV は二本鎖 DNA を持ち、ウイルス粒子内では直鎖状、細胞内では環状 DNA の形で存在し、健常人では B リンパ球に潜伏感染している。そのため、既感染者でも末梢血中の非細胞成分である血漿/血清には EBV DNA は原則として存在せず、存在したとしても極めて低値である。そのため、血清および血漿中の EBV DNA を定量 PCR で直接測定した際に高コピー数が検出されるということは、宿主内で EBV 感染細胞が増殖し、アポトーシスを生じた結果と考えられる (図 1)。また、検出される EBV も完全体ではない事が示されている。

最近 Kanakry らは、2,583 例の EBV の関与が疑われた患者の血漿中および単核球中の EBV DNA を検討している<sup>7</sup>。このうち 2,146 例で臨床データが使用可能であり、535 例 (25%) が血漿中もしくは単核球に

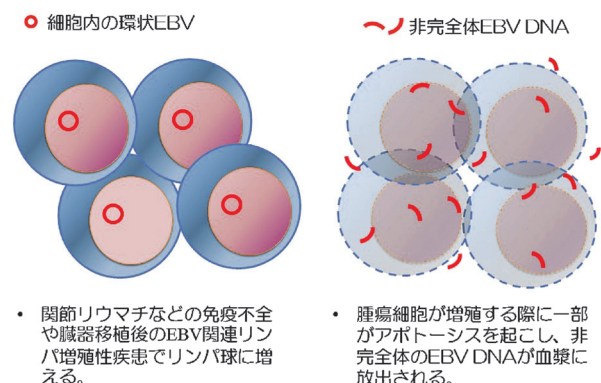


図1 細胞内 EBV DNA と血漿/血清中の細胞遊離 EBV DNA の模式図

EBV DNA が同定され、このうち組織学的に EBV 関連ではないとされた 402 例においても検出されている。このうち単核球中のみで同定された患者は 278 例 (69%) で、血漿のみで同定された患者は 40 例 (10%)、血漿と単核球両方で 84 例 (21%) であったが、この検討では 402 例中移植後の患者が 179 例 (45%)、HIV 患者が 82 例 (20%)、免疫抑制剤使用患者が 40 例 (10%) と多くが何らかの免疫抑制状態の患者で構成されていた。EBV 関連の全身性疾患の患者では、99% が血漿中の EBV DNA が増加している一方、単核球では 54% のみであった。これらの結果からは、EBV 関連疾患の患者では、血漿中の EBV DNA の増加は単核球中の増加よりも EBV 関連疾患をより高感度に診断できる可能性がある一方、単核球中の増加は患者の免疫抑制状態と関連している可能性が示唆される。

血漿/血清中の EBV DNA が腫瘍由来であるか否かを証明することは極めて困難であるが、血漿/血清は本来 EBV が存在しない場所であり、かつ EBV DNA が完全体では無いことを考えると、血漿/血清中の EBV DNA は腫瘍などアポトーシスが盛んな EBV 陽性細胞に由来する可能性が高いと思われ、血漿/血清中の EBV DNA を予後指標として検討した研究が多い理由ではないかと推察される<sup>4,8-10</sup>。また、血漿/血清と単核球とを分離せずに全血を用いて EBV DNA と EBV 関連リンパ腫との予後を検討した研究では、全血の EBV DNA も予後因子であると報告している<sup>11-15</sup>。しかし、全血は細胞成分と血漿成分の両者を含むので、EBV DNA の増加が、背景の免疫不全により反応性に単核球中に増加しているのか、腫瘍細胞からの溶出を反映しているのかの判断は困難である。Kanakry らの報告からは、末梢血細胞遊離 EBV DNA である血漿/血清を検討する方が病態を正確に検討できる可能性が高いと考えられるが、科学的に証明するためには、末梢血の血清/血漿と単核球、全血、腫瘍組織の 4 検体相互の検討が必要であるであろう。

## 2. びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫と末梢血 EBV

EBV 陽性の DLBCL の報告はアジア人に多く、DLBCL の約 10% 程度であり、発症年齢が一般的な DLBCL より高齢であるという特徴がある<sup>16-23</sup>。背景に特定の免疫不全が存在せず 50 歳より高齢である群に対しては、WHO 分類第 4 版では EBV-positive DLBCL of the elderly として独立した亜型として分類されてきたが<sup>24</sup>、2016 年改定予定の新 WHO 分類では年齢には規定せず、EBV-positive DLBCL, NOS と分類される予定である<sup>25</sup>。西洋諸国からの報告においては、陽性の場合でも陰性群に比べて予後は変わらないとの報告もあるが<sup>26,27</sup>、アジア圏においては重要な予後不良因子で

あるとの報告が多い<sup>16-23</sup>。

EBV 陽性 DLBCL が予後不良である理由は腫瘍の生物学的な要因と、宿主側の要因が相互に影響していると考えられるが、EBV-positive DLBCL of the elderly は Bcl2 陰性、CD10 陰性、MUM-1 陽性の Activated B cell 由来 (ABC type) の DLBCL に多く<sup>24</sup>、また CD30 が陽性で、PD-L1 が高発現していることが報告されている<sup>28</sup>。

われわれは EBV 関連 DLBCL を対象とし、EBER-ISH 法と治療前血清 EBV-DNA と治療成績・予後とを検討した。対象患者は 127 人で、123 人に EBER-ISH を施行し、EBER-ISH 陽性は 8 人であった。このうち、6 人 (75%) は治療前の血清から EBV DNA が検出された。一方、EBER-ISH 陰性 115 人では、9 人 (8%) で治療前の血清から EBV DNA が検出された。EBER-ISH 陽性の 6 例は全例で血清 EBV-DNA が  $1.0 \times 10^5$  copies/mL 以上と高値であった。血清中 EBV DNA を測定した 126 人中 EBV DNA が検出されたのは 15 人 (12%) で、この群は EBV DNA 未検出群に比べて有意に高齢で ( $p=0.005$ )、また進行期の比率が高い傾向があった ( $p=0.053$ )。血清 EBV-DNA 検出群は、非検出群に比べて 4 年無増悪生存割合 progression-free survival ; PFS は 27% vs. 82% ( $P<0.001$ ) であり、4 年全生存割合 overall survival ; OS は 51% vs. 88% ( $P<0.001$ ) と有意に予後不良であった。IPI の各因子を含めた多変量解析においても、血清 EBV DNA の検出は予後不良因子であった ( $P=0.027$ , HR : 3.06, 95%CI : 1.13-8.27)。

Liang らは、全血の EBV DNA と腫瘍組織の EBER-ISH とを検討し報告している<sup>13</sup>。この研究においても、EBER-ISH の陽性率と治療前全血 EBV DNA は 92.4% で一致し、全血 EBV DNA の増加例は OS 割合において有意に予後不良であり ( $P<0.01$ )、これらは多変量解析でも有意な予後不良因子であった。また、治療前全血 EBV DNA が増加していた 18 例では、化学療法後の EBV DNA の陰転化が治療効果判定に有用で、陰転化群では 2 年 OS も良好であったと報告している。Maria らも全血を用いた同様の研究において、EBV DNA の増加は腫瘍の EBV 関連腫瘍としての代替指標とはならないが、予後因子であったと報告している<sup>11</sup>。

## 3. Hodgkin リンパ腫と末梢血 EBV DNA

Hodgkin リンパ腫では、40 ~ 60% は EBER-ISH 法陽性であることが知られている。Kanakry らは、進行期 Hodgkin リンパ腫において治療前の血漿中 EBV DNA 量と組織像での EBER-ISH 法との関係および、血漿中の EBV DNA の予後因子としての重要

性について報告している<sup>9</sup>。116 人の患者において、EBER-ISH 法陽性患者では、60 viral copies/100mL をカットオフに用いた場合、感度は 92%、特異度は 97%であった。また、EBER-ISH 法が検討可能であった 315 例では、陽性例と陰性例との比較では、治療成功生存期間 Failure-free survival (FFS) には差がなかった ( $p=0.43$ )。一方、治療前の血漿中の EBV DNA 量の比較が可能であった 274 例における EBV DNA 上昇例と非上昇例との検討では、血漿中の EBV DNA 上昇例は陰性例に比べ FFS が有意に不良であったと報告している ( $p=0.009$ )。多変量解析でも治療前の血漿中の EBV DNA 量の上昇は有意な予後不良因子であった (HR: 2.0, 95%CI: 1.2-3.5)。また、治療終了後 6 か月時点での血漿中の EBV DNA 量の上昇例は非上昇例に比べ 3 年の FFS が有意に不良であり (48% VS 76%,  $p=0.007$ )、血漿中の EBV DNA 量は再発の予測因子としても有用であることを明らかにした。

韓国のグループからも全血中の EBV DNA 量が予後予測に有用であることと報告されている。70 例を前方視的に検討し、治療前の全血中の EBV DNA 陽性は 12 例であった。この 12 例の 3 年の EFS 割合および OS 割合は陰性例よりも有意に不良であった ( $p<0.032$  および  $p<0.01$ )<sup>12</sup>。

#### 4. NK/T 細胞リンパ腫と末梢血 EBV DNA

EBV は基本的には B 細胞向性であるが、T および NK 細胞にも感染することが知られている。節外性 NK/T 細胞リンパ腫、鼻型ではほとんどの症例で腫瘍細胞の EBER-ISH 法が陽性である。Ito らは 26 人の NK 細胞リンパ腫を検討し、EBER-ISH 法は全例が陽性で、EBV DNA は全血では 22 例が陽性で、血漿では 15 例が陽性であったと報告した<sup>14</sup>。全血では陽性、血漿では陰性が 8 例、全血では陰性で血漿のみ陽性であったのは 1 例であった。この研究では EBV DNA は全血中で  $10^5$ copies/mL、血漿で  $10^4$ copies/mL をカットオフ値としているが、高値の例は予後不良であった。全血では EBV DNA が陽性で血漿では陰性となる例では単核球中での増加に起因すると推測され、NK/T 細胞リンパ腫では腫瘍細胞による EBV DNA の増加だけではなく、背景にあるリンパ球での増加も予後予測因子となる可能性が示唆される。一つの研究の中で全血と血漿との両者の EBV DNA を測定し比較した研究は少なく、全血と血漿とのどちらが EBV DNA を予後因子とする際の検体として好ましいかの検討に極めて有用な研究である。また、Suzuki らは NK/T 細胞リンパ腫の 32 例における、腫瘍組織の EBER-ISH の結果と治療前の血漿および単核球の

EBV DNA コピー数と予後とを検討し報告している<sup>10</sup>。この研究でも、全例が腫瘍組織の EBER-ISH 法は陽性で、治療前に血漿の EBV DNA を測定したのが 14 例、単核球は 6 例であったが、血漿、単核球のいずれでも EBV-DNA 量が高値の例は、予後が不良であった。

さらに、Kwong らは SMILE 療法を施行した 56 例での経時的に血漿の EBV DNA 量を測定し、血漿 EBV DNA 量の上昇は予後不良因子であり治療後の血漿 EBV DNA 量の早期の減少は予後良好因子であること、また同時に単核球と血漿との EBV DNA 量を比較し、NK/T 細胞リンパ腫においては両者の測定結果の相関は極めて良好であると報告している ( $r=0.8741$ ,  $p<0.0001$ )<sup>8</sup>。

#### おわりに

EBV 関連リンパ腫と末梢血 EBV DNA との関連性について概説した。末梢血を用いた EBV DNA の定量 PCR は、検体が容易に手に入れられる上、定量検査であるために EBER-ISH 法に比べてより客観的な判断が可能である。

EBV 関連 LPD には、上述の 3 病型以外にも Human Immunosuppressive Virus 関連リンパ腫、methotrexate 関連リンパ腫、Burkitt リンパ腫、移植後リンパ増殖性疾患などがあり、また上皮性がんにおいても EBV の関与は多数知られている。それゆえ末梢血を用いた EBV の研究は、これらの病型の診断および簡便な予後因子として治療指標となる可能性があり、実臨床に有益なものと考えられる。

#### 文 献

- 1) Cohen JI : Epstein-Barr virus infection. *N. Engl. J. Med.* 2000 ; 343 : 481 - 492.
- 2) Thorley-Lawson DA and Gross A : Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 2004 ; 350 : 1328 - 1337.
- 3) Nakamura S, Jaffe ES, and Swerdlow SH : EBV positive diffuse large large B-cell lymphoma of the elderly. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 2008.
- 4) Okamoto A, Yanada M, Miura H, Inaguma Y, Tokuda M, Morishima S, Kanie T, Yamamoto Y, Mizuta S, Akatsuka Y, Yoshikawa T, Mizoguchi Y, Nakamura S, Okamoto M, and Emi N : Prognostic significance of Epstein-Barr virus DNA detection in pretreatment serum in diffuse large



- B-cell lymphoma. *Cancer Sci.* 2015 ; 106 : 1576 – 1581.
- 5) Ryan JL, Fan H, Swinnen LJ, Schichman SA, Raab-Traub N, Covington M, Elmore S, and Gully ML : Epstein-Barr Virus (EBV) DNA in plasma is not encapsidated in patients with EBV-related malignancies. *Diagn. Mol. Pathol.* 2004 ; 13 : 61 – 68.
- 6) Chan KC, Zhang J, Chan AT, Lei KI, Leung SF, Chan LY, Chow KC, and Lo YM : Molecular characterization of circulating EBV DNA in the plasma of nasopharyngeal carcinoma and lymphoma patients. *Cancer Res.* 2003 ; 63 : 2028 – 2032.
- 7) Kanakry JA, Hegde AM, Durand CM, Massie AB, Greer AE, Ambinder RF, and Valsamakis A : The clinical significance of EBV DNA in the plasma and peripheral blood mononuclear cells of patients with or without EBV diseases. *Blood.* 2016 ; 127 : 2007 – 2017.
- 8) Kwong YL, Pang AW, Leung AY, Chim CS, and Tse E : Quantification of circulating Epstein-Barr virus DNA in NK/T-cell lymphoma treated with the SMILE protocol : diagnostic and prognostic significance. *Leukemia.* 2014 ; 28 : 865 – 870.
- 9) Kanakry JA, Li H, Gellert LL, Lemas MV, Hsieh WS, Hong F, Tan KL, Gascoyne RD, Gordon LI, Fisher RI, Bartlett NL, Stiff P, Cheson BD, Advani R, Miller TP, Kahl BS, Horning SJ, and Ambinder RF : Plasma Epstein-Barr virus DNA predicts outcome in advanced Hodgkin lymphoma : correlative analysis from a large North American cooperative group trial. *Blood.* 2013 ; 121 : 3547 – 3553.
- 10) Suzuki R, Yamaguchi M, Izutsu K, Yamamoto G, Takada K, Harabuchi Y, Isobe Y, Gomyo H, Koike T, Okamoto M, Hyo R, Suzumiya J, Nakamura S, Kawa K, and Oshimi K : Prospective measurement of Epstein-Barr virus-DNA in plasma and peripheral blood mononuclear cells of extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. *Blood.* 2011 ; 118 : 6018 – 6022.
- 11) Tisi MC, Cupelli E, Santangelo R, Maiolo E, Alma E, Giachelia M, Martini M, Bellesi S, D'Alo F, Voso MT, Pompili M, Leone G, Larocca LM, and Hohaus S : Whole blood EBV-DNA predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk. Lymphoma.* 2016 ; 57 : 628 – 634.
- 12) Park JH, Yoon DH, Kim S, Park JS, Park CS, Sung H, Lee SW, Huh J, and Suh C : Pretreatment whole blood Epstein-Barr virus-DNA is a significant prognostic marker in patients with Hodgkin lymphoma. *Ann. Hematol.* 2016 ; 95 : 801 – 808.
- 13) Liang JH, Lu TX, Tian T, Wang L, Fan L, Xu J, Zhang R, Gong QX, Zhang ZH, Li JY, and Xu W : Epstein-Barr virus (EBV) DNA in whole blood as a superior prognostic and monitoring factor than EBV-encoded small RNA in situ hybridization in diffuse large B-cell lymphoma. *Clin. Microbiol. Infect.* 2015.
- 14) Ito Y, Kimura H, Maeda Y, Hashimoto C, Ishida F, Izutsu K, Fukushima N, Isobe Y, Takizawa J, Hasegawa Y, Kobayashi H, Okamura S, Kobayashi H, Yamaguchi M, Suzumiya J, Hyo R, Nakamura S, Kawa K, Oshimi K, and Suzuki R : Pretreatment EBV-DNA copy number is predictive of response and toxicities to SMILE chemotherapy for extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. *Clin. Cancer Res.* 2012 ; 18 : 4183 – 4190.
- 15) Hohaus S, Santangelo R, Giachelia M, Vannata B, Massini G, Cuccaro A, Martini M, Cesarini V, Cenci T, D'Alo F, Voso MT, Fadda G, Leone G, and Larocca LM : The viral load of Epstein-Barr virus (EBV) DNA in peripheral blood predicts for biological and clinical characteristics in Hodgkin lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 2011 ; 17 : 2885 – 2892.
- 16) Oyama T, Yamamoto K, Asano N, Oshiro A, Suzuki R, Kagami Y, Morishima Y, Takeuchi K, Izumo T, Mori S, Ohshima K, Suzumiya J, Nakamura N, Abe M, Ichimura K, Sato Y, Yoshino T, Naoe T, Shimoyama Y, Kamiya Y, Kinoshita T, and Nakamura S : Age-related EBV-associated B-cell lymphoproliferative disorders constitute a distinct clinicopathologic group : a study of 96 patients. *Clin. Cancer Res.* 2007 ; 13 : 5124 – 5132.
- 17) Park S, Lee J, Ko YH, Han A, Jun HJ, Lee SC, Hwang IG, Park YH, Ahn JS, Jung CW, Kim K, Ahn YC, Kang WK, Park K, and Kim WS : The impact of Epstein-Barr virus status on clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2007 ; 110 : 972 – 978.

- 18) Chuang SS, Ichinohasama R, Yang CC, Wang WC, Chou CK, Liao YL, Kuo SY, and Lin SH : Multicentric primary intestinal EBV-positive diffuse large B cell lymphoma of the elderly presenting with perforation. *Int. J. Hematol.* 2010 ; 91 : 534 – 538.
- 19) Wada N, Ikeda J, Hori Y, Fujita S, Ogawa H, Soma T, Sugiyama H, Fukuhara S, Kanamaru A, Hino M, Kanakura Y, Morii E, and Aozasa K : Epstein-barr virus in diffuse large B-Cell lymphoma in immunocompetent patients in Japan is as low as in Western Countries. *J. Med. Viro.* 2011 ; 83 : 317 – 321.
- 20) Ahn JS, Yang DH, Duk Choi Y, Jung SH, Yhim HY, Kwak JY, Sung Park H, Shin MG, Kim YK, Kim HJ, and Lee JJ : Clinical outcome of elderly patients with Epstein-Barr virus positive diffuse large B-cell lymphoma treated with a combination of rituximab and CHOP chemotherapy. *Am. J. Hematol.* 2013 ; 88 : 774 – 779.
- 21) Pan Y, Meng B, Zhang H, Cao W, Wang H, Bi C, Liu F, Sun B, Hao X, Ai WZ, and Fu K : Low incidence of Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly in Tianjin, northern China. *Leuk. Lymphoma.* 2013 ; 54 : 298 – 303.
- 22) Chang ST, Lu YH, Lu CL, Weng SF, Lin SH, Kuo SY, Chuang YT, Takeuchi K, Ohshima K, and Chuang SS : Epstein-Barr virus is rarely associated with diffuse large B cell lymphoma in Taiwan and carries a trend for a shorter median survival time. *J. Clin. Pathol.* 2014 ; 67 : 326 – 332.
- 23) Sato A, Nakamura N, Kojima M, Ohmachi K, Carreras J, Kikuti YY, Numata H, Ohgiya D, Tazume K, Amaki J, Moriuchi M, Miyamoto M, Aoyama Y, Kawai H, Ichiki A, Hara R, Kawada H, Ogawa Y, and Ando K : Clinical outcome of Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly in the rituximab era. *Cancer Sci.* 2014 ; 105 : 1170 – 1175.
- 24) Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, and Vardiman JW : WHO classification of tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 2008 ; pp.233 – 244.
- 25) Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, and Jaffe ES : The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood.* 2016 ; 127 : 2375 – 2390.
- 26) Hoeller S, Tzankov A, Pileri SA, Went P, and Dirnhofer S : Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma in elderly patients is rare in Western populations. *Hum. Pathol.* 2010 ; 41 : 352 – 357.
- 27) Michai M, Goto H, Hattori S, Vaeteewoottacharn K, Wongkham C, Wongkham S, and Okada S : Soluble CD30 : a possible serum tumor marker for primary effusion lymphoma. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2012 ; 13 : 4939 – 4941.
- 28) Chen BJ, Chapuy B, Ouyang J, Sun HH, Roemer MG, Xu ML, Yu H, Fletcher CD, Freeman GJ, Shipp MA, and Rodig SJ : PD-L1 expression is characteristic of a subset of aggressive B-cell lymphomas and virus-associated malignancies. *Clin. Cancer Res.* 2013 ; 19 : 3462 – 3473.