

## 婦人の不定愁訴とヒト常在性 EB ウイルスの活性化

東京医科大学産科婦人科学 (指導: 高山雅臣教授)

中 谷 仁

### Activation of the Epstein-Barr Virus in Gynecological Cases of Equivocal Symptoms

Hitoshi NAKAYA

Department of Obstetrics and Gynecology, Tokyo Medical College  
(Director: Prof. Masaomi TAKAYAMA)

Underlying conditions involved in gynecological cases of equivocal symptoms include immunological, hormonal and endocrinological abnormalities. Under such conditions of physiological irregularity, reactivation of latent Epstein-Barr virus (EBV) can further complicate the situation and it is possible that it gives rise to the development of equivocal symptoms. We examined this possibility by studying the EBV antibodies of gynecological cases of equivocal symptoms. All patients with equivocal symptoms were positive for the EBV antibody. The rate of positivity for EA-IgG antibody, which is one of the indices of the activation of EBV, was 88.9% in these patients, which was much higher than the 34.0% of healthy controls. In the patients, the mean EBV antibody value for VCA-IgG was 680 times, that for EA-IgG was 54.5 times, as opposed to 499 times and 35.4 times, respectively. This indicates that all the cases of equivocal symptoms were already infected with EBV and that in the majority of them the EBV virus can bring about the complicated appearance of equivocal symptoms.

#### 緒 言

Epstein-Barr ウイルス (EBV) は、1964 年アフリカ小児に多発するバーキットリンパ腫 (Burkitt's lymphoma; BL) に見いだされた<sup>1)2)</sup>。BL の他、中国南部に多い上咽頭癌<sup>3)</sup>、免疫不全を基盤とする日和見リンパ腫 (opportunistic lymphoma)<sup>4)</sup>、胃癌<sup>5)6)</sup>との関連が示唆されている。また、初感染に伝染性単核症 (infectious mononucleosis; IM)<sup>7)</sup>を、再活性化に伴い慢性活動性 EBV 感染症 (chronic active EBV infection)<sup>8)9)</sup>を引き起こすこと、また慢性疲労性症候群<sup>10)11)</sup>への関与など多種の関連疾患が示唆

されている。

EBV は人類間に広範に分布し、かつ感染ヒト体内に終生持続することを特徴としている。通常ヒトと平衡関係を維持しながら、容易に持続感染を起こす、いわばヒト常在性ウイルスである。しかし、ときとして平衡関係の破綻を契機にいったん感染、潜在した EBV 感染の活性化がもたらされ、その過程で EBV 関連疾患の多くが惹起される。

一方、社会環境の複雑化等を背景に、現在の医学的検査方法では異常が認められない身体のだるさ、疲れ易さ等の漠然とした身体的愁訴、すなわち不定愁訴を訴える患者が増加している。不定愁訴とは「漠

(1994 年 3 月 2 日受付, 1994 年 3 月 10 日受理)

**Key words:** エプスタインバーウイルス (epstein-barr virus), 不定愁訴 (equivocal symptoms), 再活性化 (reactivation)

然とした身体的愁訴で、しかもこれに見合うだけの器質的な裏付けのない愁訴」と一般的に定義づけられている。

従来、不定愁訴へのアプローチとしてホルモンに関する検索があった<sup>12)13)</sup>。最近、炎症による自律神経失調、とりわけ弱毒病原体による日和見感染のように病原体と宿主とのバランスの崩壊によって発現する、いわゆる慢性型の感染症が自律神経失調をはじめとする不定愁訴を呈するのではないかとも言われている<sup>14)~16)</sup>。

このように、不定愁訴の背景にはしばしば免疫や内分泌、生体の生理活性因子の変調があり、これらは生体の恒常性に多大の影響を与える因子である。このことは同時に、潜在 EBV 感染の活性化をもたらす可能性を意味しており、その結果、疾病を複雑に修飾し、不定愁訴という多彩な疾病像を形成している可能性がある。

本研究は、特異的 EBV 抗体を指標として、婦人の不定愁訴と EBV の再活性化との関連について検討を試みた。EBV 抗体は抗ウイルスカプシド抗原 (viral capsid antigen; VCA)<sup>2)</sup> 抗体、抗早期抗原 (early antigen; EA)<sup>17)</sup> 抗体、抗 EBV 核内抗原 (EBV nuclear antigen; EBNA)<sup>18)</sup> 抗体を測定した。抗 VCA 抗体は EBV 感染後から生涯持続して陽性である。抗 EA 抗体は EBV 初感染において出現し、その後消失する。ときに再活性化において陽性になる。抗 EBNA 抗体は抗 VCA 抗体に遅れて出現し、同じく生涯陽性である。これらの抗体像により EBV 感染の状態を知ることができる。

## 材料と方法

### 1) 被験血清

1991年2月から1993年4月までに、東京医科大学病院産婦人科 (A 病院) と栃木県上都賀病院産婦人科 (B 病院) を受診した不定愁訴 (更年期障害、器質的な裏付けのない愁訴) を有する婦人患者 63 人の血清を EBV 抗体測定に供した。対照として健康婦人 104 人の血清を測定した。

被験血清を 56°C で 30 分間非働化した後、リン酸緩衝食塩水 (PBS) を用いて 10 倍からの 2 倍段階希釈法により抗体価測定を行った。

### 2) 細胞

EBNA 陽性細胞として BL 由来 EBV 非産生培養株 Raji 細胞<sup>19)</sup> を用いた。37°C、5%CO<sub>2</sub>-Air、3 日

間培養の生存率 90%以上の培養細胞を使用した。VCA 陽性細胞として BL 由来 EBV 産生系培養株 P 3 HR-1 細胞<sup>20)</sup> を用い、細胞は 33°C 培養のものを使用した。EA 提示細胞として P 3 HR-1 EBV 株を重感染させた Raji 細胞を用いた。P 3 HR-1 EBV 株を Raji 細胞に吸着、洗浄後、Ara-C (20 μg/ml) 存在下で 18 時間培養した後、VCA 抗原の発現のないことを確認して使用した。培養はいずれの細胞もペニシリン G カリウム 100 U/ml、硫酸ストレプトマイシン 100 μg/ml、10% 牛胎児血清 (GIBCO 社製) を含んだ RPMI 1640 培地 (GIBCO 社製) で行った。

### 3) 抗体価測定スライドの作製

それぞれの抗原保有細胞をスライドガラス上に 8 スポットずつ塗抹、室温にて 1~2 時間乾燥後、EBNA 抗原保有細胞は 4°C、アセトン-メタノール (1:1) 混液中で 5 分間、VCA および EA 抗原保有細胞は室温にてアセトン中で 10 分間それぞれ固定した。使用時まで -70°C に保存した。

### 4) EBV 関連抗体価の測定

#### i) 抗 EBNA 抗体価の測定

抗 EBNA 抗体価は蛍光抗体補体を用いて測定した。Raji 細胞固定スライドの各抗原スポットに 2 倍段階希釈した血清を順次載せ、モイストチャンバー内で 37°C、30 分反応させた後、PBS にて血清をよく洗い流し、室温で軽く風乾した。次に補体源として抗 EBV 抗体陰性新鮮ヒト血清の Ca<sup>2+</sup>・Mg<sup>2+</sup> 加 PBS 10 倍希釈液を 37°C、15 分反応させた後、PBS で洗浄、風乾し、次いで FITC 標識抗ヒト C 3c ウサギ抗体 (DACO 社製) を 37°C、30 分反応させた後、PBS で洗浄し、軽く風乾させた。封入液 (50% グリセリン/PBS 溶液) を載せ、カバーガラスを掛けて蛍光顕微鏡下で観察した。陽性蛍光反応が極端に低下する直前の血清希釈倍数をもって抗体値とした。

#### ii) 抗 VCA および抗 EA 抗体値の測定

抗 VCA および抗 EA の抗体値は共に間接蛍光抗体法を用いて測定した。抗 VCA 抗体価測定は P 3 HR-1 細胞固定スライドを、そして抗 EA 抗体価測定は EA 抗原発現重感染 Raji 細胞固定スライドをそれぞれ使用して、各抗原スポットに 2 倍段階希釈した血清を順次載せ、モイストチャンバー内で 37°C、40 分反応させた後、PBS で洗浄、風乾した。次に FITC 標識抗ヒト IgG ウサギ抗体 (DACO 社製) または FITC 標識抗ヒト IgA ウサギ抗体 (DACO

社製) を 37°C, 40 分反応させた後, PBS で洗浄し, 風乾後, 前述した抗 EBNA 抗体価測定と同様にし  
て蛍光顕微鏡下で測定した。

結 果

1) 不定愁訴を有する婦人患者の EBV 抗体陽性率

本疾患を有する患者群 63 人の EBV 抗体陽性率を表 1 に示した。抗 VCA-IgG 抗体および抗 EBNA 抗体共に全患者が陽性であり, 全員が EBV に感染していることが判った。対照健康人群においても 93.3% が両抗体共陽性であり, ほとんどの人が EBV 感染者であった。さらに, それらの抗体像からその感染は初感染ではなく既感染であることが示唆された。

2) EBV 抗体陽性者における各種 EBV 抗体価の平均値

患者群および対照健康人群 EBV 抗体陽性者の抗 VCA-IgG 抗体, 抗 VCA-IgA 抗体および抗 EA-IgG 抗体におけるそれぞれの平均抗体価を表 2 に示した。患者群における抗 VCA-IgG 抗体, 抗 VCA-IgA 抗体および抗 EA-IgG 抗体の平均抗体価はそれぞれ 680, 57.7, 54.5 倍であった。両病院とも, 対照健康人群の 449, 26.6, 35.4 倍に比べて明らかに高値を示した。

3) 各種 EBV 関連抗体における抗体価分布

患者群および EBV 抗体陽性対照健康人群の抗 VCA-IgG 抗体, 抗 VCA-IgA 抗体および抗 EA-IgG

表 1 不定愁訴を有する婦人における EB ウイルス抗体陽性率(%)

		VCA-IgG 抗体	EBNA 抗体
患者	(n=63)	100.0	100.0
A 病院	(n=21)	100.0	100.0
B 病院	(n=42)	100.0	100.0
健康人対照	(n=104)	93.3	93.3

抗体における抗体価分布をそれぞれ図 1, 2, 3 に示した。どの抗体価においてもそれらは対照健康人群よりも患者群の方がより高値域に分布した。さらに抗 EA-IgG 抗体において, 患者の 10% は 160 倍以上の高値を示し, なかには 640 倍を示す患者もあった。

4) EBV 抗体陽性者における抗 EA-IgG 抗体陽性率

患者群と EBV 抗体陽性対照健康人群における EBV 活性化の指標とされる抗 EA-IgG 抗体の陽性率を表 3 に示した。対照健康人群はその 34% が陽性を示したのに対して, 患者群は 88.9% の高い陽性率を示し, その大半が EBV 活性化の状態にあることが判った。

5) 患者群と対照健康人群における EBV 抗体価高値者の比較

患者群と対照健康人群における抗 EA 抗体価を基に EBV 抗体高値者を表 4 に示した。本疾患を有する EBV 抗体高値婦人患者 9 人の中で, 抗 EA-IgG 抗体価に 160 倍以上の高値を示した者が 6 人あり, その中には 640 倍と著明に高値を示した者があった。抗 VCA-IgG 抗体価においても 9 人中 7 人が 1280 倍以上を示した。

以上のように, 本疾患を有する婦人患者は抗 VCA 抗体, 抗 EBNA 抗体で示されたように全員が EBV 既感染者であった。さらに, 患者群における各種 EBV 抗体に平均抗体価は対象健康人群と比べていずれの抗体価も高値であり, また抗 EA 抗体において大多数の患者が陽性を示し, 本疾患を有する婦人患者は EBV にすでに感染しており, その大半が活性化した状態にあるという結果が得られた。

6) 他種関連ウイルス疾患感染の検討

EBV と同じヘルペス科に属する human cytomegalovirus (HCMV), varicella-zoster virus (VZV), human herpes virus-6 (HHV-6) に対し, それぞれの抗体価の測定を間接蛍光抗体法を用いて

表 2 不定愁訴を有する婦人における EB ウイルス抗体価(平均)\*

	VCA-IgG 抗体	EA-IgG 抗体	VCA-IgA 抗体
患者	680 (n=63)	54.5 (n=55)	57.7 (n=9)
A 病院	770 (n=21)	70.5 (n=19)	120 (n=3)
B 病院	635 (n=42)	46.1 (n=36)	26.6 (n=6)
健康人対照	449 (n=97)	35.4 (n=35)	26.6 (n=11)

\*抗体陽性者における抗体価平均

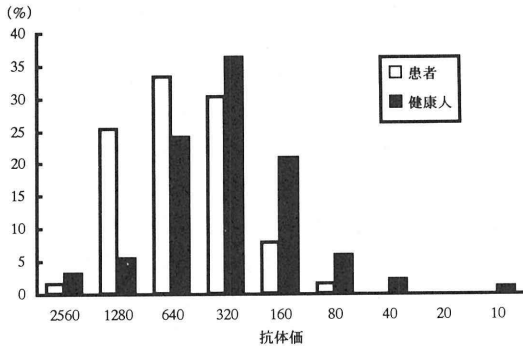


図 1 不定愁訴を有する婦人における EB ウイルス VCA-IgG 抗体価分布

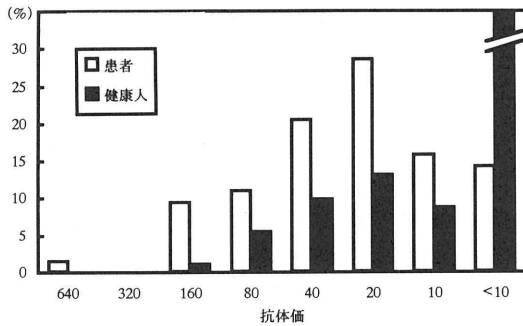


図 2 不定愁訴を有する婦人における EB ウイルス EA-IgG 抗体価分布

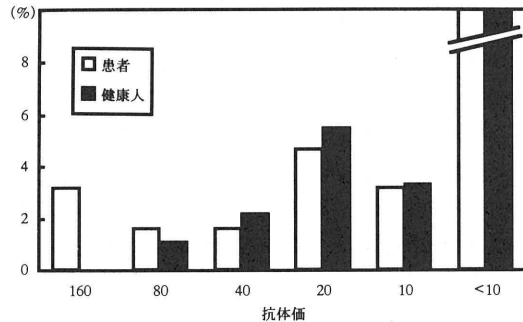


図 3 不定愁訴を有する婦人における EB ウイルス VCA-IgG 抗体価分布

行い、本疾患との関連性を検討した。その結果、患者群におけるそれらのウイルスの抗体陽性率は HCMV 90.3%, VZV 91.8%, HHV-6 100%, 平均抗体価はそれぞれ 129.5, 41.1, 52.1 であった。これに対し対照健康人群は抗体陽性率がそれぞれ 90.5%, 90.5%, 100%, 平均抗体価が 63.3, 29.5,

表 3 不定愁訴を有する婦人における EB ウイルス活性化抗体陽性率(%)

		EA-IgG*
患者	(n=63)	88.9
A 病院	(n=21)	90.5
B 病院	(n=42)	88.1
健康人対照	(n=97)	34.0

\*EBV 感染者に占める割合

表 4 EB ウイルス抗体高値者

患者	EA-IgG	VCA-IgA	VCA-IgG
P-1	640	<10	640
P-2	160	160	2560
P-3	160	160	1280
P-4	160	<10	1280
P-5	160	<10	1280
P-6	160	<10	1280
P-7	80	10	1280
P-8	80	<10	1280
P-9	80	<10	320
健康人対照			
H-1	160	<10	320
H-2	80	80	1280
H-3	80	20	1280
H-4	80	<10	640
H-5	80	<10	640
H-6	80	<10	640
H-7	40	<10	2560
H-8	40	20	1280
H-9	40	40	640

60.0 であった。抗体陽性率は患者群と対照群共高率を示し、その差はなかった。平均抗体価は対照群に比べ患者群の HCMV 抗体価と VZV 抗体価がそれぞれ 2.0 倍, 1.4 倍であった。しかしながら、患者群のこれら 2 つの平均抗体価における高値は抗体価高値者が HCMV に 3 人, VZV に 1 人, それぞれ別人であるが、存在したことによる。それらを除いた患者群と対照群との比較ではほとんど差はなく、本疾患との関連を示唆するような結果は得られなかった。

考 察

EBV はヒト常在性のウイルスであり、大半の人が

不顕性感染するとともに、終生潜在持続している。初感染における顕性感染であるIMを除き、EBV関連疾患の多くは潜在EBVとヒトとの平衡状態の破綻によるEBVの再活性化によって起こると考えられている。免疫、ホルモン、内分泌等の異常はその平衡状態を損なう要因になると考えられ、一方、医学的検査方法においてなら異常の認められない倦怠感、易疲労性等の漠然とした身体的症状を訴える婦人の不定愁訴もしばしばこれら生体の生理活性因子の変調を背景としている。このように、これら2つの事柄が生体の生理活性の変調を基にして共に惹起されてくることから、その関連をEBV抗体像により検討を試みた。

今回、不定愁訴を有する婦人患者の全員がEBV特異的抗VCA-IgG、抗EBNA抗体共に陽性であった。抗VCA抗体陽性および抗EBNA抗体陽性の抗体像から患者はEBVに未感染でも初感染でもなくすべて既感染者、即ち潜在持続感染者であることが判明した。

抗VCA-IgG抗体価をみると、抗体価平均において患者群は680倍、これに対して対照健康人群449倍となり、患者群が明らかに高い。次いで、抗EA-IgG抗体をみると、約90%の患者が有し、患者におけるその平均抗体価も対照健康人よりも高値を示した。抗VCA-IgG高値であること、および抗EA抗体がEBVの活性化の指標とされており、患者群において抗EA-IgG抗体陽性者が約90%と高率に認められ、その平均抗体価も対照群より高値を示したことは不定愁訴を訴える婦人患者の大半がEBVの再活性化を強く起こしているということを示唆している。また、抗EA-IgG抗体価に著高を呈する患者の存在は不定愁訴に対するEBVの何らかの関与への示唆と考えられる。EBV同様、潜在感染し再活性化により身体にさまざまな変調を引き起こすヘルペスウイルス群のうち、HCMV、VZVおよびHHV-6と本疾患との関連については、それらウイルスの抗体価を検討した。HHV-6においては患者群、対照群共に全員が既感染者であり、平均抗体価に差異が見られなかった。VZVにおいては両群共大半が既感染者であった。患者の1人が抗体高値を示したが、それを除くと両群の平均抗体価に差はなかった。HCMVにおいては両群共上記ウイルスと同様大半が既感染者であった。患者群の中に3人の抗体高値者がみられたが、その他の患者の抗体価は低値であ

った。それぞれ別人である4人のVZVまたはHCMVの抗体高値者がみられたが、それらの抗体価高値と本疾患との関連は不明であり今後の課題として検討したい。しかしながら、大半の患者は低値であり、対照群との差異はほとんど見られず、本疾患との関連性はEBVに比べ低いと考えられた。したがって、本疾患患者において潜在持続感染している上記4ウイルスの中でとくにEBVの再活性化が強く起きていることが示唆された。

本研究結果は婦人において潜在感染しているEBVが再活性化され、病原体と宿主とのバランス状態に破綻をきたし、複雑かつ多彩な病状を訴える不定愁訴なる疾患を惹起する可能性を強く示唆した。

## 結 語

免疫や内分泌等、生体の生理活性因子の変調による生体の恒常性の損失を背景に持つ不定愁訴という疾患と、同じく臍帯の恒常性の損失によって活性化されうるEBV感染との関連を不定愁訴を有する婦人患者におけるEBV抗体価によって検討を試み、以下に示す結論が得られた。

- 1) 本疾患患者はすべてEBV感染者であった。
- 2) 患者群の各種EBV抗体に対する平均抗体価は対照健康人群のそれと比較していずれも高値を示した。
- 3) さらに、EBV活性化の指標とされている抗EA抗体において患者群の約9割が陽性を示し、本疾患でのEBVの活性化が示唆された。

謝辞 稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました東京医科大学産科婦人科学教室高山雅臣教授に深甚なる謝意を表しますとともに、本研究を遂行するにあたり、終始御教唆いただきました東京医科大学微生物学教室水野文雄教授並びに御助力いただきました東京医科大学微生物教室角田修次先生、上都賀総合病院産婦人科部長指田達郎先生、赤枝六本木診療所赤枝恒夫先生、エスアールエル・ウイルス部部长植田昌宏先生に厚く感謝の意を表します。

本論文の要旨は第11回日本産婦人科感染症研究会及び第23回日本産婦人科心身医学研究会において発表した。

## 文 献

- 1) Epstein, M.A., et al: Virus particles in cultured lymphoblastes from Burkitt's lymphoma. Lancet

- 1 : 702~703, 1969
- 2) Henle, G. and Henle, W. : Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J. Bacteriol.* **91** : 1248~1256, 1966
  - 3) Old, L.J., et al : Precipitating antibody in human serum to an antigen present in cultured Burkitt's lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **56** : 1699~1704, 1966
  - 4) Cleary, M.L., et al : Failure in immunological control of the virus infection : Post-transplant lymphomas. In "The Epstein-Barr virus advances" Ed by Epstein, M.A. and Achong, B.G. William Heinemann Medical Books, London, 1986, pp.163~181
  - 5) Pittaluga, S., et al : Clonal Epstein-Barr virus in lymphoepithelioma-like carcinoma of the stomach : Demonstration of viral genome by insitu hybridization and Southern blot analysis. *Modern Pathol.* **5** : 661~664, 1992
  - 6) Tokunaga, M., et al : Epstein-Barr virus in gastric carcinoma. *Amer. J. Pathol.* **143** : 1250~1254, 1993
  - 7) Henle, G., et al : Relation of Burkitt tumor associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **59** : 94~101, 1968
  - 8) Tobi, M., et al : Prolonged atypical illness associated with serological evidence of persistent Epstein-Barr virus infection. *Lancet* **1** : 61~64, 1982
  - 9) Jones, F.L., et al : Evidence for active Epstein-Barr virus infection in patients with persistent, unexplained illnesses : Elevated anti-early antigen antibodies. *Ann. Int. Med.* **102** : 1~7, 1985
  - 10) Woodward, C.G. and Cox, R.A. : Epstein-Barr virus serology in chronic fatigue syndrome. *J. Infect.* **24** : 133~139, 1992
  - 11) Whelton, C.L., et al : Sleep, Epstein-Barr virus infection, musculoskeletal pain, and depressive symptoms in chronic fatigue syndrome. *J. Rheumatol.* **19** : 939~943, 1992
  - 12) 岩崎寛和 : 炎症による腰痛. *産婦人科の世界* **23** : 572~577, 1971
  - 13) 奥田拓道 他 : ラットにおける自律神経機能に及ぼす炎症及び刺激物の影響. *日本産科婦人科学会雑誌* **33** : 752~756, 1981
  - 14) 赤枝日出雄 : 慢性骨盤内感染症. "産婦人科 Mook No.3 婦人の心身症" 坂本正一 他編 金原出版 1978, pp.234~242
  - 15) 赤枝日出雄 : 私の提唱する慢性骨盤内感染症の篩別法について. *日本産科婦人科学会雑誌* **34** : 507~510, 1982
  - 16) 岩崎寛和 他 : 女性内性器感染症. *産科と婦人科* **50** : 1175~1180, 1983
  - 17) Henle, W., et al : Differential reactivity of human sera with early antigens induced by Epstein-Barr virus. *Science* **169** : 188~190, 1970
  - 18) Reedman, B.M. and Klein, G.I. : Cellular localization of an Epstein-Barr virus (EBV)-associated complement-fixing antigen in producer and non-producer lymphoblastoid cell lines. *Int. J. Cancer* **11** : 599~620, 1973
  - 19) Pulvertaft, R.J.V. : A study of malignant tumours in Nigeria by short term tissue culture. *J. Clin. Pathol.* **18** : 261~273, 1965
  - 20) Hinuma, Y., et al : Immunofluorescence and herpes type virus particles in the P<sub>3</sub>HR-1 Burkitt lymphoma cell line. *J. Virol.* **1** : 1045~1051, 1967
- (別刷請求先 : 〒160 新宿区西新宿6-7-1  
東京医科大学産科婦人科学教室 中谷 仁)