

原田病患者 B リンパ球の Epstein-Barr ウイルス増殖に対する高許容性

箕田 宏¹⁾, 坂井 潤一¹⁾, 杉浦 亮²⁾, 今井 章介²⁾, 大里外誉郎³⁾, 臼井 正彦¹⁾

¹⁾東京医科大学眼科学教室, ²⁾北海道大学医学部附属癌研究施設ウイルス部門

³⁾北海道医療大学看護福祉学部医療福祉学科

要 約

目 的 : Vogt-小柳-原田病(以下, 原田病)の病因における Epstein-Barr ウイルス(EBV)再活性化の関与を検討した。

対象と方法 : 原田病患者 8 例, 対照として原田病以外のぶどう膜炎患者 10 例の末梢血 B リンパ球に同一の EBV 株を感染させ EBV トランスフォーム B リンパ芽球株(LCL)を樹立, 各 LCL における EBV 活性化状態を通常培養下, および各種刺激後で比較した。EBV 活性化は 3 種のウイルス複製関連抗原の発現を指標とし, 細胞塗抹標本を用いた免疫蛍光抗体法, western blotting 法, さらに培養上清中に放出されたウイルス粒子量を polymerase chain reaction(PCR)法による EBV DNA 量

で検索した。

結 果 : 各種刺激の有無にかかわらず, 原田病患者 LCL は対照群 LCL に比し, いずれの抗原も有意に高率に発現しており, PCR 法では原田病群 LCL から多量の EBV DNA が検出された。

結 論 : 原田病患者 B リンパ球が EBV 活性化に対し高い許容性を有することが示され, 本症の発生あるいは病態形成に EBV の再活性化が関与する可能性が示唆された。(日眼会誌 103 : 289—296, 1999)

キーワード : 原田病, ぶどう膜炎, EB ウイルス, LCL, 再活性化

High Inducibility of Epstein-Barr Virus Replication in B Lymphocytes in Vogt-Koyanagi-Harada Disease

Hiroshi Minoda¹⁾, Jun-ichi Sakai¹⁾, Makoto Sugiura²⁾, Shosuke Imai²⁾
Toyoro Osato³⁾ and Masahiko Usui¹⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Tokyo Medical University

²⁾Department of Virology, Cancer Institute, Hokkaido University School of Medicine

³⁾Department of Fundamental Health Science, School of Nursing and Services, Health Science University of Hokkaido

Abstract

Purpose : The role of Epstein-Barr virus (EBV) reactivation in the pathogenesis of Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) disease was examined.

Material and Methods : Using B lymphocytes obtained from 8 patients with VKH disease and 10 patients with other types of uveitis, immortalized lymphoblast lines were established and infected with EBV. The degree of EBV activation in each lymphoblast line, in the presence and absence of various stimuli, was assessed by measuring the expression of 3 different antigens involved in replication by immunofluorescent staining and western blot analysis. Quantification of EBV DNA in cell culture supernatants was done by polymerase chain reaction.

Result : Cell lines established from VKH patients expressed more viral antigens than those established from patients with other types of uveitis. There were greater amounts of EBV DNA in the VKH cell lines.

Conclusion : B lymphocytes from VKH patients may be more susceptible to EBV activation, and the reactivation of EBV may be involved in the pathogenesis of VKH. (J Jpn Ophthalmol Soc 103 : 289—296, 1999)

Key words : Vogt-Koyanagi-Harada disease, Uveitis, EB virus, Lymphoblastoid cell line, Re-activation

別刷請求先 : 160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学眼科学教室 箕田 宏
(平成 10 年 10 月 8 日受付, 平成 10 年 10 月 27 日改訂受理)

Reprint requests to: Hiroshi Minoda, M.D. Department of Ophthalmology, Tokyo Medical University, 6-7-1 Nishishinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0023, Japan

(Received October 8, 1998 and accepted in revised form October 27, 1998)

I 緒 言

Vogt-小柳-原田病(原田病)は汎ぶどう膜炎と無菌性髄膜炎を必発とし,全身のメラノサイトが障害される自己免疫性疾患と考えられている.その発症誘因,病態については様々な仮説があり,特に本症の発症機序にウイルスが関与することが従来から推測されている¹⁾.

Epstein-Barr ウイルス(EBV)はヒトヘルペスウイルスの一つであり,ヒトにとって極めて普遍的なウイルスである.すなわち,大部分のヒトは幼児期に不顕性の初感染を経験し(本邦では4歳までに約80%)²⁾,その後成人に達するまでにはほぼ100%近くのヒトがEBV既感染者となり,多くの場合,既感染者の体内に終生にわたって不顕性に感染が持続する.

EBVは試験管内で正常Bリンパ球を容易に無限増殖能力を持つBリンパ芽球株(lymphoblastoid cell line, LCL)へと形質転換(トランスフォーム)する.このような本来EBVが内蔵する腫瘍原性は通常,生体側の強力な免疫機構(主にEBV特異的キラーT細胞)により抑制されている.しかし,免疫抑制状態のような場合にしばしばEBVの再活性化が生じ,それに伴ってEBVが本来有する腫瘍原性が顕在化し,時に重篤なEBV陽性細胞増殖症へと進展する.

いくつかの自己免疫疾患で同様にEBVの再活性化が生じ,何らかの機序で自己組織が傷害されるという図式が考えられている³⁾.原田病とEBVの関連を示唆するこれまでの研究として,急性期原田病患者の髄液中から蛍光抗体法,polymerase chain reaction(PCR)法でEBV特異抗体とEBV DNAがそれぞれ検出されている⁴⁾.また,正常網膜の網膜色素上皮層から抽出したDNA中に,やはりPCR法でEBVゲノムが検出され⁵⁾,さらに,正常網膜色素上皮層にEBVレセプター(CD21)分子が発現されていることが報告⁶⁾され,原田病の発症契機に,EBV感染がかかわっている可能性が推測されている.

今回,EBV感染と原田病の関連を検討する目的で,原田病患者から樹立したLCLを用いて本症患者のEBV増殖に対する許容性(EBV再活性化の生じやすさ)を解析し,他のぶどう膜炎患者由来のLCLでの結果と比較した.

II 実験方法

1. 対 象

対照は,1993年6月から1994年10月までに東京医大眼科を受診した原田病急性期7例,遷延例1例の計8例(症例1~8),対照として原田病以外の各種ぶどう膜炎10例(症例9~18)である(表1).

平均年齢は,原田病患者が41.8±8.8(平均値±標準偏差)歳,対照が34.7±9.1歳で,両者の間には有意差はなかった.症例はすべてEBV既感染者[血清のウイルスカ

プシド抗原viral capsid antigen(VCA)に対するIgG抗体価 $\geq 5 \times$]であり,明らかな免疫不全者は含まれていない.対照のぶどう膜炎患者と原田病遷延例の1例を除くすべての症例で,発症直後の未治療期もしくは治療開始早期に末梢血を採取した.なお末梢血は常温で保存し,採取後12時間以内に処理した.

2. LCLの樹立

症例の末梢血からFicoll-Conrey液を用いる比重遠心法を用いて単核球を分離し,Bリンパ球トランスフォーム能を有するB95-8株EBVをmultiplicity of infection(ウイルス数/細胞数,MOI) ≥ 1 の感染価で37°C,1時間接種し,洗浄後,10%ウシ胎仔血清加RPMI 1640培養液にサイクロスポリンA(Sandoz社)を0.1 $\mu\text{g/ml}$ で添加することによりLCLを樹立した.

3. 潜在EBVの活性化

1) P3HR-1株EBV重感染

各症例から樹立したLCLを 1×10^6 個に調整した後,培養液中に非トランスフォームEBVであるP3HR-1株EBVをMOI=3.5の条件でLCLに37°Cで1時間重感染させ,LCL中のEBVを活性化させた⁷⁾.

2) 化学物質による刺激

各症例からのLCLを3群(それぞれ 1×10^6 個)に分け,腫瘍プロモーターでありEBVを活性化することが知られている,12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate(TPA)を20 ng/ml⁸⁾,teleocidine B4を 10^{-7}M ⁹⁾,4-deoxyphorbol ester(4 DPE)を40 ng/ml¹⁰⁾の濃度で培養液中に添加し,さらに,n-butyrateを3 mMの濃度ですべての培養液に加えた.

4. EBV複製関連抗原の検出

上記1),2)の条件で培養したLCLならびに未処理

表1 対 象

症例	疾患	年齢・性	
1	原田病	36歳	男性
2	原田病	54歳	男性
3	原田病	44歳	女性
4	原田病	44歳	女性
5	原田病	48歳	男性
6	原田病遷延型	45歳	男性
7	原田病	25歳	女性
8	原田病	38歳	女性
9	網膜色素上皮症	44歳	女性
10	梅毒後網膜炎	41歳	男性
11	急性前部ぶどう膜炎	32歳	男性
12	急性前部ぶどう膜炎	29歳	男性
13	急性前部ぶどう膜炎	46歳	女性
14	サルコイドーシス	27歳	女性
15	急性後部多発性板状色素上皮症	43歳	女性
16	トキンカリア	21歳	女性
17	多発性消失性白点症候群	40歳	女性
18	ペーチェット病	24歳	女性

LCL から、24 および 48 時間後に細胞塗沫標本、蛋白抽出標本を作製し、また培養上清も採取し以下の実験に供した。

1) 蛍光抗体法

アセトン固定(室温, 10 分)した細胞塗沫標本を用いる EBV 複製関連抗原の検出は、潜伏感染からウイルス複製サイクルへ移行するスイッチ機能を持つ前初期抗原(BZLF 1) (DAKO 社), BZLF 1 に引き続き発現する早期抗原(early antigen, EA)¹¹⁾, ウイルス DNA 合成後に発現する VCA¹²⁾の 3 種に対して、単クローン抗体を一次抗体とした免疫蛍光染色を行った。BZLF 1 は streptavidin-biotin 法で, EA および VCA については間接法で染色し, 蛍光顕微鏡下で任意の 3 視野についてそれぞれ 1,000 個の細胞当たりの抗原陽性細胞率を肉眼的に算定し, その平均値で表した。

2) Western blotting 法

LCL を sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 2 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 2% SDS, 7% glycerol, 3% β -mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue] に $1 \times 10^4/\mu\text{l}$ となるように溶解し, 超音波粉碎後, 100°C , 5 分間熱処理することにより蛋白を抽出した。その後, SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行い, ニトロセルロース膜へ転写した。1) で用いた BZLF 1, EA, VCA のそれぞれに対する単クローン抗体を一次抗体として反応を行い, Blotting detection kit for mouse antibodies (Amersham 社) で検出した。

3) 培養上清中の EBV 粒子量の検索

上記抗原を発現する細胞が EBV 粒子産生にまで及んでいるか否か, また, EBV 粒子を産生する場合その量を検討する目的で, 培養上清を用いて EBV 1 ゲノム中に 1 copy 存在する EBV 特異核内抗原 (EBV-determined nuclear antigen, EBNA) 2 遺伝子領域中の 725 bp¹³⁾ を標的

とする PCR 法を行った。

原田病の症例 1 と対照の症例 9 LCL について未処置, P3 HR-1 株 EBV 重感染, 化学物質による刺激を与えた LCL の培養上清に対し, detergent buffer [100mM KCl, 20mM Tris HCL pH8.3, 3mM MgCl_2 , 0.2mg/ml gelatin, 0.9% NP 40, 0.12 mg/ml proteinase K] を等量混和し, 60°C 60 分, 95°C 10 分で DNA を抽出し, 各 DNA 溶液 50 μl に PCR 反応液を加え, 最終濃度として 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl_2 , 0.1% gelatin, 50 μM の各 deoxyribonucleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Takara), 0.2 μM の各プライマーとなるように調整後, 最後に 2.5 単位の Taq polymerase (GIBCO 社) を加え計 100 μl とした。熱変性 (95°C 1 分), アニーリング (55°C 2 分), DNA 合成 (72°C 2 分) を 1 サイクルとして 25, 30, 35, 40 サイクルの PCR 反応を行った。PCR 産物を 2% アガロースゲルで電気泳動後, ナイロン膜に転写し, ^{32}P 標識した内部プローブを用いた Southern blot hybridization を行った。

4) EBV レセプター (EBVR) 発現の検索

P3 HR-1 株 EBV 重感染効率が細胞表面に発現する EBVR 量の違いによって左右されるか否かを検討する目的で, EBVR/CD 21 分子中の異なるエピトープを認識する 3 種のモノクローナル抗体, B2 (Coulter 社), HB-5 (Becton-Dickinson 社), OKB 7 (Orthomune 社) を用いて染色後 flow cytometer で解析し, %陽性細胞率を比較検討した。

III 結 果

1. EBV 複製関連抗原の発現

1) 蛍光抗体法による EBV 複製関連抗原の発現

原田病群 (症例 1~8) および対照群 (症例 9~18) の未処理ならびに抗原発現誘導刺激後の BZLF 1, EA, VCA 発

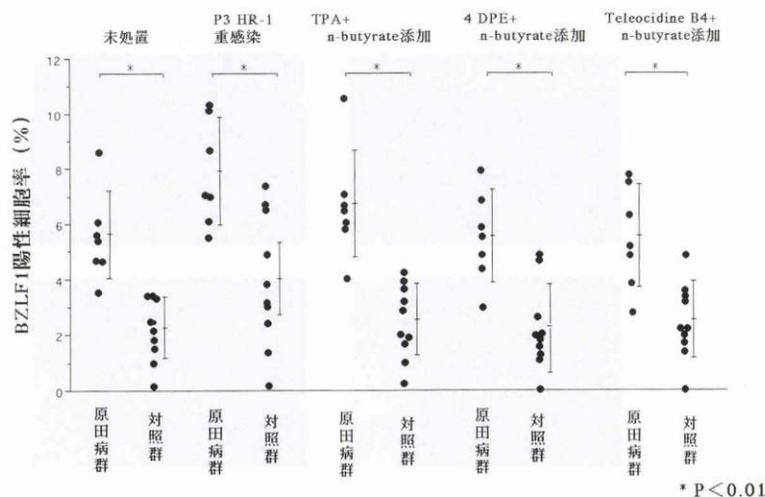


図 1 蛍光顕微鏡による (BZLF 1) 陽性細胞率。

各症例 lymphoblastoid cell line (LCL) での陽性細胞率を●で示した(図 2, 3 も同様)。原田病由来 LCL には対照由来 LCL より有意に BZLF 1 陽性細胞が存在した ($p < 0.01$)。BZLF 1: 前初期抗原。

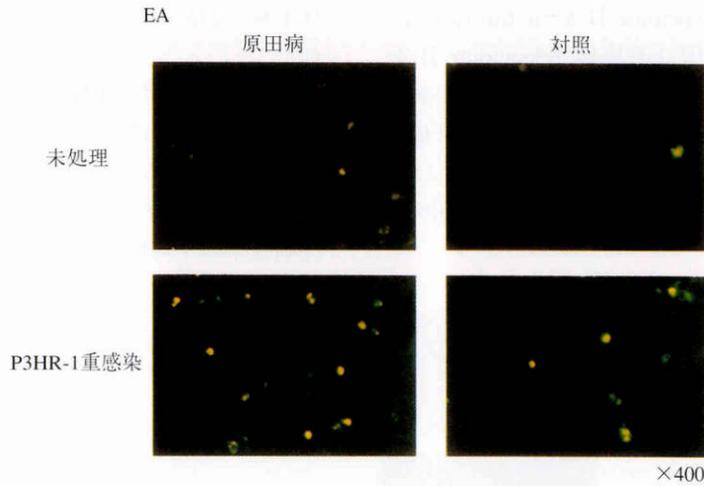


図 5 原田病 LCL と対照 LCL における EA の蛍光顕微鏡所見.

未処置および P 3 HR-1 重感染後においても原田病由来 LCL が有意に抗原陽性細胞が認められる.

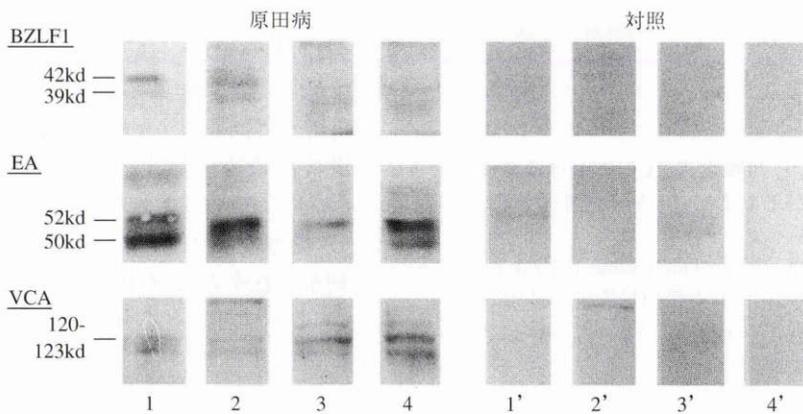


図 6 原田病群 LCL と対照群 LCL の BZLF 1, EA, ウイルスカプシド抗原 (VCA) に対する western blotting 法の結果.

BZLF 1 (42, 39 kd), EA (52, 50 kd), VCA (120-123 kd) に対し原田病群 LCL (1~4) から抽出した蛋白は対照群 LCL (9~12, 図では 1'~4' と表記) から抽出した蛋白から明らかに強いシグナルバンドを有している.

現について検索し, それぞれの結果, および平均値ならびに標準偏差を図 1~3 に示した. 原田病患者由来 LCL は対照群 LCL に比して, 自発的ならびに各種ウイルス活性化刺激後の抗原発現細胞がいずれも高率であり, 両群間で Mann-Whitney U 検定で有意差があった. 代表例として, 原田病の症例 1 と対照の症例 9 由来の LCL における未処置および P 3 HR-1 株 EBV 重感染後の蛍光顕微鏡所見を BZLF 1 について図 4, EA について図 5 に示す. 表中には示さないが, 陽性対照として Raji 細胞を用いて同様の刺激を加えており, BZLF 1 陽性細胞は未処置で 0%, P3HR-1 重感染で 29.5%, TPA+n-butyrate で 12.9%, 4 DPE+n-butyrate で 11.5%, teleocidine B 4+n-butyrate で 23.8% であった. EA 陽性細胞は順に 0, 31.8, 11.2, 10.8, 22.2%, また VCA 陽性細胞は 0, 5, 1, 0, 0, 0% であった.

2. Western blotting 法による EBV 複製関連抗原量の定量

症例 1~4 の原田病患者由来 LCL と, 症例 9~12 までの対照群 LCL から抽出した蛋白をもとに BZLF 1, EA, VCA の自発的な発現量を, western blotting 法で検索した結果を図 6 に示す. 原田病患者由来の LCL では対照群 LCL に比してそれぞれの抗原は明らかに強いシグナルバンドとして認められ, 蛍光抗体染色の結果と一致していた.

原田病の症例 5 と対照群の症例 13 由来の LCL における未処置, P 3 HR-1 株 EBV 重感染後, teleocidine B 4+n-butyrate による刺激後の抗原発現増強の有無を western blotting 法で検索した結果を図 7 に示した. 原田病患者由来 LCL は誘導刺激によって, 対照よりも各種抗原蛋白をより多く発現していることが確認された. 以上のように, 誘導刺激による各種 EBV 関連抗原発現量の変化も蛍光抗体染色による結果と同様の傾向がみられた.

3. PCR 法による培養上清中の EBV 粒子の検索

原田病の症例 1 と対象群の症例 9 由来の LCL におけ

る12時間後の無処置, teleocidine B-4+n-butirate 添加, 24時間後の無処置, P 3 HR-1 重感染, teleocidine B-4+n-butirate 添加, 48時間後の無処置, teleocidine B-4+n-butirate 添加の培養上清を用いた35サイクルのPCR法およびSouthern blot hybridizationの結果を図8に示した. 原田病 LCL においては対照に比し, 培養上清中の

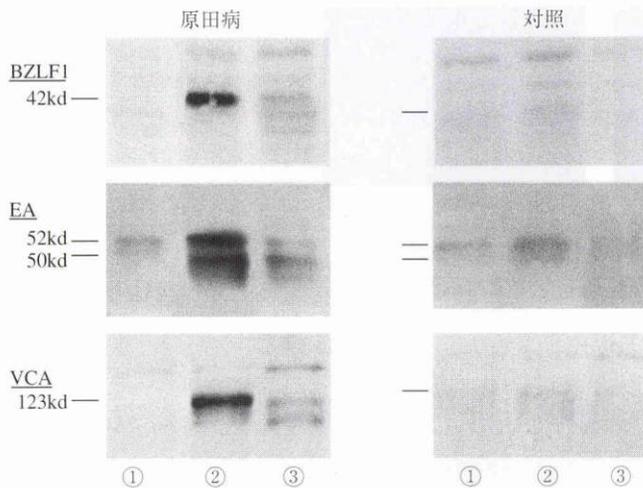


図7 原田病由来 LCL と対照由来 LCL における未処置, 各種刺激後の BZLF 1, EA, VCA に対する western blotting 法の結果.

①(未処置), ②(P 3 HR-1), ③(Teleocidine B 4+n-butirate による刺激後)のいずれも原田病由来 LCL は対照由来 LCL より明らかに BZLF 1, EA, VCA に対し強いシグナルバンドを有している.

ウイルス DNA が明らかに多く存在していることが示された.

4. LCL における EBVR 発現の検索

それぞれの測定においてモノクローナル抗体処置群と対照群は二峰性の分布を示し, 染色が確実に行われたことが示された. 表2に両群間の B 2, HB-5, OKB 7 の%陽性細胞率の平均値および標準偏差を示した. 両群間におけるそれぞれの EBVR の%陽性細胞率は Mann-Whitney U 検定においていずれに対しても有意差はなく, 抗原発現の増強は EBVR の発現量の差によるものではないと考えられた.

IV 考 按

今回の実験では, すべての18検体に同じEBV株(B 95-8株)を感染させ, 同一な条件下で生じる患者Bリンパ球内EBVの活性化の程度を比較し, 個体間での遺伝的素因によるEBVに対する許容性の違いを検討した. その結果, BZLF 1, EA, VCAの発現は, 未処置および各種抗原発現誘導刺激後のLCLにおいて, いずれも原田病群の方が対照群より高値であった.

潜伏感染時における感染細胞中のEBVの存在様式は, 大きく分けて以下の3種類がある.

1) 細胞中にプラスミドの状態では二本鎖DNA全塩基配列が存在する. この状態ではS期の初期に細胞由来のDNAポリメラーゼを利用することによりDNAの複製を行い得る¹⁴⁾.

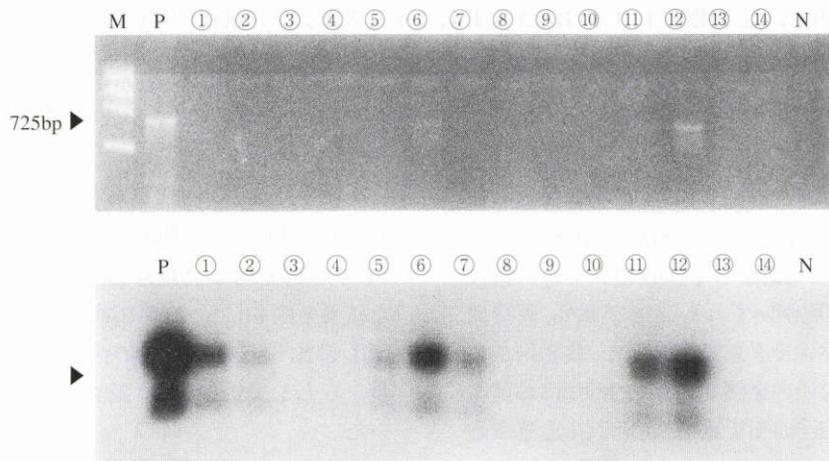


図8 原田病由来 LCL および対照由来 LCL の培養上清を用いた polymerase chain reaction (PCR) および Southern blot hybridization の結果.

M: marker, P: positive control, N: negative control

原田病由来 LCL

12時間後の①: 未処置, ②: teleocidine B 4+n-butirate 添加, 24時間の⑤: 未処置, ⑥: P 3 HR-1 重感染後, ⑦teleocidine B 4+n-butirate 添加, 48時間後の⑪: 未処置, ⑫: teleocidine B 4+n-butirate 添加

対照 LCL

12時間後の③: 未処置, ④: teleocidine B 4+n-butirate 添加, 24時間後の⑧: 未処置, ⑨: P 3 HR-1 重感染後, ⑩teleocidine B 4+n-butirate 添加, 48時間後の⑬: 未処置, ⑭: teleocidine B 4+n-butirate 添加. いずれの状態においても原田病由来 LCL の培養上清により多くのEBウイルスDNAが含まれていることが示された.

表 2 Flow cytometer による EBVR 発現

	%CD21陽性細胞		
	B2	HB5	OKB7
原田病患者	53.65±23.91	53.23±18.68	50.77±27.34
対照	45.16±18.42	40.13±22.06	45.57±20.65

EBVR: Epstein-Barr ウイルスレセプター 平均値±標準偏差

2) DNA の全塩基配列は存在せず,限られた DNA 断片のみがメチル化した状態で存在する¹⁵⁾.通常の LCL 中 90% 以上はこの状態にあり, LCL の複製に伴い, EBV DNA 断片が複製される。

3) 種々の刺激によってウイルスゲノムが活性化した状態での存在. 潜伏感染からウイルス複製サイクルに移行しつつある。

このような潜伏感染の状態にあった感染細胞中の EBV DNA は種々の内的・外的要因によって, 潜伏感染時には通常みられない BZLF 1 遺伝子の転写物を発現する. BZLF 1 は潜伏感染からウイルス複製サイクルに移行するスイッチ機能を持つとされており^{16)~18)}, これに引き続き EBV 早期抗原(EA)が発現される. BZLF 1 および EA は EBV の構造蛋白ではないが¹⁹⁾, ウイルス複製サイクルに移行した際に合成される. EBV DNA が合成され, 最終的にウイルス粒子となる際に VCA が発現する. このように, BZLF 1, EA, VCA 発現の順に, より活性化した状態を示すことが知られている。

今回の検索結果から, 原田病患者の末梢血 B リンパ球は EBV に対して高い許容性を有し, 各刺激に対してその傾向がさらに顕著になり, PCR 法の結果からウイルス複製サイクルにまで進み得ると考えられた。

原田病患者において, 体内で活性化した EBV がその発症にどのように関与しているかについて 2 つの仮説を立てた. 1 つはウイルス産生サイクルに至った EBV 感染 B 細胞から産生された EBV 粒子がメラノサイトに感染し(この場合は潜伏感染も含む), 自己複製活動が起こり直接的に障害, または EBV 感染メラノサイトが非自己と認識され, 自己免疫反応の標的となり原田病が発症する可能性である. 同様なことがシェーグレン症候群において報告されており, 当疾患では EBV が唾液腺に存在することが確認され, その再活性化が免疫反応の標的になっている可能性がある²⁰⁾. もう 1 つは, EBV と原田病患者メラノサイトに分子生物学的同一性(molecular mimicry)があり, 体内で活性化した EBV 特異的キラー T 細胞が自己のメラノサイトを特異的に攻撃し, 自己免疫状態を引き起こす可能性である。

Molecular mimicry とは自己免疫発症機序として Oldstone²¹⁾が提唱した概念で, 宿主の抗原と免疫学的に交差反応を有するような微生物抗原の存在によって宿主抗原に対する免疫反応が発現するものである. その代表例と

して挙げられるのが, 強直性脊椎炎やライター症候群などのリウマチ性疾患と Klebsiella, Shigella, Salmonella などの微生物との関連性である. これらの疾患は human leukocyte antigen (HLA) B 27 と極めて強い相関があり, また, HLA B 27 抗原と上記微生物抗原との間に相同性があることにより交差反応が生じ, その結果, 疾患発症に寄与するという仮説で, 実験的にも交差反応が生じることが既に報告^{22)~24)}されている。

同様な関連性が原田病患者にも想定され, 事実本症に高頻度にみられる HLA DR 4 と EBV ゲノムのアミノ酸配列の一部に相同性が存在していることが知られており²⁵⁾, これが本症の発症に関与している可能性も考えられる。

今回の検討により原田病患者の B リンパ球は対照のそれに比し, EBV の感染を受けると無刺激, 各種刺激後にかかわらず, より強い活性化を示し容易にウイルス産生サイクルに至りやすいことが示された. したがって, 原田病患者では個人的(遺伝的)素因により, 体内でも EBV が活性化しやすく, 新たに産生されたウイルスが本症の発症に関与している可能性が推測された. しかし, 原田病と EBV との関連性をより明確にするには原田病発症眼球を用いた直接的な検索が必要と思われる. 今後, この方面での検討が望まれる。

文 献

- 1) 杉浦清治: わが国の葡萄膜炎について. 日眼会誌 80: 1285—1326, 1976.
- 2) 大里外誉郎, 岩永未知代, 安保 亘: EB ウイルス感染の問題点. 臨床とウイルス 10: 206—209, 1982.
- 3) 原田孝之, 長崎真琴: 自己免疫疾患と EB ウイルス. 最新医学 41: 2097—2105, 1986.
- 4) 薄井紀夫, 今井章介, 水野文雄, 大里外誉郎, 坂井潤一, 臼井正彦, 他: PCR 法を用いた原田病患者髄液よりの EB ウイルス DNA の検出. 眼臨 85: 882—887, 1991.
- 5) 薄井紀夫: 眼内組織におけるヘルペス群ウイルス DNA の検出. 日眼会誌 98: 443—448, 1994.
- 6) 薄井紀夫, 坂井潤一, 臼井正彦, 今井章介, 大里外誉郎: 正常眼内組織における Epstein-Barr (EBV) レセプターの発現. あたらしい眼科 10: 435—440, 1993.
- 7) Fresen K, Cho M, Gissman L, Zur H: Recovery of transforming EBV from non-producer cells after superinfection with non-transforming P 3 HR-1 EBV. Intervirology 12: 303—310, 1979.
- 8) Yamamoto N, zur Hausen H: Tumour promoter TPA enhances transformation of human leukocytes by Epstein-Barr virus. Nature 280: 244—245, 1979.
- 9) Yamamoto N, Katsuki T, Hinuma Y, Miwa M, Fujiki H, Sugiura T: Induction of Epstein-Barr virus by a new tumor promoter, teleocidin, com-

- pared to induction by TPA. *Int J Cancer* 28 : 125—129, 1981.
- 10) **Osato T, Mizuno F, Imai S, Aya T, Koizumi S, Kinoshita T, et al** : African Burkitt's lymphoma and an Epstein-Barr virus-enhancing plant *Euphorbia tirucalli*. *Lancet* 1 : 1257—1258, 1987.
 - 11) **Pearson G, Vroman B, Chase B, Sculley T, Hummel M, Kieff E** : Identification of polypeptide components of the Epstein-Barr virus early antigen complex with monoclonal antibodies. *J Virol* 47 : 193—201, 1983.
 - 12) **Takada K, Fujiwara S, Yano S, Osato T** : Monoclonal antibody specific for capsid antigen of Epstein-Barr virus. *Med Microbiol Immunol* 171 : 225—231, 1983.
 - 13) **Imai S, Sugiura M, Koizumi M, Kimura H, Chiba S, Osato T, et al** : Epstein-Barr Virus (EBV)-carrying and-expressing T-cell lines established from severe chronic active EBV infection. *Blood* 7 : 1446—1457, 1996.
 - 14) **Adams A** : Replication of latent Epstein-Barr virus genomes in Raji cells. *J Virol* 61 : 1743—1746, 1987.
 - 15) **Kinter C, Sugden B** : Conservation and progressive methylation of Epstein-Barr viral DNA sequences in transformed cells. *J Virol* 38 : 305—316, 1981.
 - 16) **Chevallier-Greco A, Manet E, Chavrier P, Mosnier C, Dallie J, Sergeant A** : Both Epstein-Barr virus (EBV)-encoded transacting factors, EB 1 and EB 2, are required to active transcription from an EBV early promoter. *European Molecular Biology Organization J* 5 : 3243—3249, 1986.
 - 17) **Contryman J, Miller G** : Activation of expression of latent Epstein-Barr herpesvirus after gene transfer with a small cloned subfragment of heterogeneous viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 : 4085—4089, 1985.
 - 18) **Takada K, Shimizu N, Sakuma S, Ono Y** : Trans-activation of the latent Epstein-Barr virus (EBV) genome after transfection of the EBV DNA fragment. *J Virol* 57 : 1016—1022, 1986.
 - 19) **Henle W, Henle G, Zajic BA, Pearson G, Waubke R, Scriba M** : Differential reactivity of human serums with early antigens induced by Epstein-Barr virus. *Science* 169 : 188—190, 1970.
 - 20) **Saito I, Serenius B, Compton T, Fox RI** : Detection of Epstein-Barr virus DNA by polymerase chain reaction in blood and tissue biopsies from patients with Sjogren's syndrome. *J Exp Med* 169 : 2191—2198, 1989.
 - 21) **Oldstone MB** : Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* 50 : 819—820, 1987.
 - 22) **Schwimbeck PL, Yu DTY, Oldstone** : Autoantibodies to HLA-B 27 in the sera of HLA-B 27 patients with ankylosing spondylitis and Reiter's syndrome. Molecular mimicry with *Klebsiella pneumoniae* as potential mechanism of autoimmune disease. *J Exp Med* 166 : 173—181, 1987.
 - 23) **Ewing C, Ebringer R, Tribbick G, Geysen HM** : Antibody activity in ankylosing spondylitis sera to two sites on HLA-B 27. 1at the MHC groove region (within sequence 65—68), and to a *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase reductase peptide (within sequence 181—199). *J Exp Med* 171 : 1635—1647, 1990.
 - 24) **Geczy AF, Alexander K, Bashir HV, Edmonds J** : A factor (s) *Klebsiella* culture filtrates specifically modifies an HLA B-27 associated cell-surface component. *Nature* 283 : 782—784, 1980.
 - 25) **Roudier J, Rhodes G, Peterson J, Vaughan JH, Carson DA** : The Epstein-Barr virus glycoprotein gp 110, a molecular link between HLA DR 4, HLA DR 1, and rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 27 : 367—371, 1988.
-