

Virus og cancer

I. Epstein-Barr virus

Stephen Hamilton-Dutoit

Epstein-Barr virus (EBV) er et vidt udbredt herpesvirus der over hele verden giver anledning til hovedsageligt asymptomatiske infektioner i tidligste barndom. Såfremt individet først inficeres senere i livet, typisk i puberteten, kan EBV forårsage infektiøs mononukleose (»kysseysyge«). Når individet én gang er inficeret, er det bærer af EBV resten af livet.

Desuden er EBV arketypen på et onkogen virus, idet virus associeres med maligne tumorer, først og fremmest udgående fra lymfoidt væv og epitel. Selvom virus' præcise rolle i udvikling af cancer ikke er endeligt opklaret, er EBV alligevel for nylig blevet betegnet som et såkaldt gruppe I karcinogen af The International Agency for Research on Cancer.

I dette arbejde gives en oversigt over EBV, og vægten er specielt lagt på EBV-relaterede tilstande og læsioner der optræder i cavitas oris eller naboregioner.

Epstein-Barr virus (EBV) er et herpesvirus der forekommer ubikvitært, og som fører til en livslang og som oftest symptomløs infektion, således at mere end 90% af alle voksne i hele verden er bærere. Der er imidlertid tiltagende evidens for at EBV kan være involveret i cancerudvikling. I de sidste 10-20 år er EBV blevet påvist i celler fra en lang række maligne tumorer.

De bedst kendte er formentlig Burkitts lymfom (BL) og nasofaryngealt karcinom (NPC), men listen over EBV-relaterede tumorer er meget mere omfattende (1):

- Hodgkins lymfom (HL)
- T-celle non-Hodgkin lymfomer (NHL)
- Posttransplantations-lymfoproliferative læsioner (PTL)
- Lymfomer hos AIDS-patienter
- Spytkirtelkarcinomer og andre hoved-hals-karcinomer
- Karcinomer i ventriklen
- Tumorer udgående fra glat muskulatur hos immunkompromitterede patienter.

I en monografi fra 1997 fra The International Agency for Research on Cancer (IARC) blev EBV klassificeret som et gruppe I karcinogen (1) og således officielt betegnet som et virus der medfører risiko for cancer. Til trods for en omfattende viden om EBV og sygdom er vores kendskab til de begivenheder der fører til malign transformation af en EBV-inficeret celle, desværre meget ufuldstændigt.

EBV-infektion

EBV er et gamma-herpesvirus hvis genom består af dobbeltstregnet DNA (2,3). Størrelsen er ca. 172000 bp, og der er identificeret ~100 kodende gener. Som nævnt sker primærinfektionen ofte i den tidlige barndom, hvorefter infektionen persisterer resten af livet. Såfremt den primære infektion sker hos større børn og unge voksne, kan patienten udvikle infektiøs mononukleose (IM) (»kysseysyge«) (4). Skønt IM er en selvlimiterende lymfoproliferativ sygdom, kan den være ubehagelig og kan lejlighedsvis medføre behandlingskrævende respirationsbesvær, idet tonsillerne kan hæve betydeligt.

EBV er i stand til at inficere lymfocytter og epitelceller, men den livslange bærertilstand skyldes helt overvejende persistens af EBV i B-lymfocytter (5). Ved *in vitro*-infektion af B-lymfocytter transformeres disse og udvikler immortalitet. Det er almindeligt accepteret at sådanne transformerende egenskaber, som i øvrigt også kendes for bl.a. HPV type 16, udtrykker de biologiske begivenheder *in vitro* der *in vivo* fører til malign udvikling.

Ligesom andre herpesvirus kan EBV forårsage dels replikativ infektion, dels latent infektion. Under den replikative

infektion sker der ekstensiv transkription af det lineariserede EBV-DNA-genom, hvorved mange af de ~100 EBV-gener kommer til udtryk, og der produceres virioner der fører til lyses af inficerede celler, hvorved viruspartiklerne frigøres. Forholdene er anderledes under den latente infektion; her er genekspressionen sparsom, og der dannes ikke nye virioner. EBV persisterer som et cirkulært ekstrakromosomalt episom; integrering af viralt DNA i det humane genom synes ikke at finde sted. Disse forhold fører til den antagelse at EBV's onkogene egenskaber må skyldes et eller flere af få virale gener, der kommer til udtryk under latent infektion (Tabel 1). Af disse synes LMP1-genet at opføre sig som et klassisk onkogen og indtager en central rolle ved EBV-induceret cellulær transformation *in vitro*.

Tre grundmønstre af latent EBV-ekspression er blevet beskrevet, både *in vitro* og i forskellige EBV-associerede tumorer (latensmønster I, II og III (6)), og analyse af disse mønstre *in vivo* kan være nyttige i differentialdiagnostikken (Tabel 2).

EBV kan deles i to hovedtyper: EBV1 og EBV2, baseret på strukturelle forskelle i de gener der koder for de nukleære antigener (EBNA)(3). Der er betragtelig geografisk variation i

prævalensen af EBV1 og EBV2, men der synes ikke at være grundlag for at antage at de afviger fra hinanden mht. deres patogene egenskaber. Desuden er der beskrevet et vidt spektrum af strukturelle variationer, især omfattende det vigtige LMP1-gen, men disse variationer synes snarere at afspejle geografisk polymorfisme end tumor- eller sygdomsspecifikke variationer.

Immunitet mod EBV

Akut EBV-infektion udløser et HLA I EBV-specifikt cytotoksisk lymfocytrespons (CTL). Dette specifikke EBV-respons er ansvarligt for den efterfølgende opretholdelse af latent EBV-immunitet. Konsekvensen af nedsat eller manglende immunrespons demonstreres ved den hyppige udvikling af EBV-relaterede lymfoproliferative forandringer ved forskellige immunsupprimerede tilstande.

Påvisning af EBV-DNA i vævsprøver

Traditionelt har mulige associationer mellem en specifik sygdom og EBV været undersøgt vha. sero-epidemiologiske metoder. Påvisning af relation mellem EBV og en klinisk sygdom har imidlertid været vanskelig af flere grunde:

1. EBV findes hos 90% af voksne; det er så at sige normalt at bære på en EBV-infektion.
2. EBV forårsager ikke patognomoniske histopatologiske forandringer der kan identificeres ved lysmikroskopi.
3. Produktionen af modne viruspartikler der vil kunne ses i elektronmikroskop, er yderst begrænset i EBV-relaterede tumorer, da EBV her forekommer som latent infektion.
4. Selvom EBV kan samles fra inficeret væv og påvises ved transformation af lymfocytter *in vitro*, er teknikken res-

Tabel 1. EBV-gener der udtrykkes under latent infektion.

EBV-RNA	EBER1	EBER2	
Membran-proteiner	LMP1	LMP2A	LMP2B
Nukleære antigener	EBNA1 EBNA2	EBNA3A EBNA3B EBNA3C	Leader protein

Tabel 2. EBV-latensmønstre i nogle udvalgte EBV-relaterede tumorer.

Latensmønster	Tumor	EBERs	EBNA1	EBNA2	EBNA3 A, B, C	EBNA-LP	LMP1
I	BL	+	+	-	-	-	-
II	HL NPC (udiff.)	+	+	-	-	-	+
III	LBCL PTLS	+	+	+	+	+	+

Forkortelser: BL – Burkitts lymfom; EBER – EBV *early* RNA; EBNA – EBV nukleært antigen; HL – Hodgkins lymfom; LBCL lymfoblastoid cellelinje; LMP1 – latent membranprotein 1; LP – leader protein, NPC – udifferentieret nasofaryngealt karcinom; PTLS – posttransplantations-lymfoproliferativ læsion.

Litteratur

1. Proceedings of the IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Epstein-Barr virus and Kaposi's sarcoma herpesvirus/human herpesvirus 8. Lyon, France, 17-24 June 1997. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 1997; 70: 1-492.
2. Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr virus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. Fields virology. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996.
3. Kieff E. Epstein-Barr virus and its replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors., Fields virology. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996.
4. Niederman JC, McCollum RW, Henle G, Henle W. Infectious mononucleosis. Clinical manifestations in relation to EB virus antibodies. JAMA 1968; 203: 205-9.
5. Young LS. Epstein-Barr-virus infection and persistence: a B-cell marriage in sickness and in health. Lancet 1999; 354: 1141-2.
6. Rowe M, Lear AL, Croom-Carter D, Davies AH, Rickinson AB. Three pathways of Epstein-Barr virus gene activation from EBNA1-positive latency in B lymphocytes. J Virol 1992; 66: 122-31.
7. Lindeberg H. Påvisning af humant papillomvirus. Anvendt molekylær patologi. Tandlægebladet 1997; 101: 186-91.
8. Pallesen G, Hamilton-Dutoit SJ, Zhou X. The association of Epstein-Barr virus (EBV) with T cell lymphoproliferations and Hodgkin's disease: two new developments in the EBV field. Adv Cancer Res 1993; 62: 179-239.
9. Hamilton-Dutoit SJ, Pallesen G. Detection of Epstein-Barr virus small RNAs in routine paraffin sections using non-isotopic RNA/RNA in situ hybridization. Histopathology 1994; 25: 101-11.
10. Niedobitek G, Hamilton-Dutoit S, Herbst H, Finn T, Vetner M, Pallesen G, et al. Identification of Epstein-Barr virus-infected cells in tonsils of acute infectious mononucleosis by in situ hybridization. Hum Pathol 1989; 20: 796-9.
11. Pallesen G, Hamilton-Dutoit SJ, Rowe M, Young LS. Expression of Epstein-Barr virus latent gene products in tumour cells of Hodgkin's disease. Lancet 1991; 337: 320-2.
12. Magrath I, Jain V, Bhatia K. Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma. Semin Cancer Biol 1992; 3: 285-95.
13. Burkitt DP. The discovery of Burkitt's lymphoma. Cancer 1983; 51: 1777-86.
14. Hamilton-Dutoit SJ, Raphael M, Audouin J, Diebold J, Lisse I, Pedersen C, et al. In situ demonstration of Epstein-Barr virus small RNAs (EBER 1) in acquired immunodeficiency syndrome-related lymphomas: correlation with tumor morphology and primary site. Blood 1993; 82: 619-24.
15. Adatia AK. Burkitt's tumour in the jaws. Br Dent J 1966; 120: 315-26.
16. Shapira J, Peylan-Ramu N. Burkitt's lymphoma. Oral Oncol 1998; 34: 15-23.
17. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. Lancet 1964; i: 702-3.
18. Young LS, Rowe M. Epstein-Barr virus, lymphomas and Hodgkin's disease. Semin Cancer Biol 1992; 3: 273-84.
19. Tanaka J, Yoshida K, Suzuki M, Sakata Y. Hodgkin's disease of the maxillary gingiva. A case report. Int J Oral Maxillofac Surg 1992; 21: 45-6.
20. Zhou XG, Sandvej K, Li PJ, Ji XL, Yan QH, Zhang XP, et al. Epstein-Barr virus (EBV) in Chinese pediatric Hodgkin disease: Hodgkin disease in young children is an EBV-related lymphoma. Cancer 2001; 92: 1621-31.
21. Hamilton-Dutoit SJ. Hodgkin's disease in human immunodeficiency virus infected individuals. In: Jarrett RF, editor. Etiology of Hodgkin's disease. New York: Plenum Press; 1995.
22. Chadburn A, Cesarman E, Knowles DM. Molecular pathology of posttransplantation lymphoproliferative disorders. Semin Diagn Pathol 1997; 14: 15-26.
23. Raut A, Huryn J, Pollack A, Zlotolow I. Unusual gingival presentation of post-transplantation lymphoproliferative disorder: a case report and review of the literature. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2000; 90: 436-41.
24. Lattjak BV, Rosenthal P, Mudge C, Roberts JP, Renze JF, Osorio RW, et al. Posttransplant lymphoproliferative disorder presenting in the head and neck. Laryngoscope 1998; 108: 1195-8.
25. Lones MA, Mishalani S, Shintaku IP, Weiss LM, Nichols WS, Said JW. Changes in tonsils and adenoids in children with posttransplant lymphoproliferative disorder: report of three cases with early involvement of Waldeyer's ring. Hum Pathol 1995; 26: 525-30.
26. Knowles DM, Pirog EC. Pathology of AIDS-related lymphomas and other AIDS-defining neoplasms. Eur J Cancer 2001; 37: 1236-50.
27. Besson C, Goubar A, Gabarre J, Rozenbaum W, Pialoux G, Chatelet FP, et al. Changes in AIDS-related lymphoma since the era of highly active antiretroviral therapy. Blood 2001; 98: 2339-44.
28. Hansen PB, Penkowa M, Kirk O, Skinhoj P, Pedersen C, Lisse I, et al. Human immunodeficiency virus-associated malignant lymphoma in eastern Denmark diagnosed from 1990-1996: clinical features, histopathology, and association with Epstein-Barr virus and human herpesvirus-8. Eur J Haematol 2000; 64: 368-75.
29. Hamilton-Dutoit SJ, Pallesen G, Franzmann MB, Karkov J, Black F, Skinhoj P, et al. AIDS-related lymphoma. Histopathology, immunophenotype, and association with Epstein-Barr virus as demonstrated by in situ nucleic acid hybridization. Am J Pathol 1991; 138: 149-63.
30. Hamilton-Dutoit SJ, Rea D, Raphael M, Sandvej K, Delecluse HJ, Gisselbrecht C, et al. Epstein-Barr virus-latent gene expression and tumor cell phenotype in acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin's lymphoma. Correlation of lymphoma phenotype with three distinct patterns of viral latency. Am J Pathol 1993; 143: 1072-85.
31. Pedersen C, Gerstoft J, Lundgren JD, Skinhoj P, Bottzauw J, Geisler C, et al. HIV-associated lymphoma: histopathology and association with Epstein-Barr virus genome related to clinical, immunological and prognostic features. Eur J Cancer 1991; 27: 1416-23.
32. Delecluse HJ, Anagnostopoulos I, Dallenbach F, Hummel M, Marafioti T, Schneider U, et al. Plasmablastic lymphomas of the oral cavity: a new entity associated with the human immunodeficiency virus infection. Blood 1997; 89: 1413-20.
33. Hamilton-Dutoit SJ, Pallesen G. A survey of Epstein-Barr virus gene expression in sporadic non-Hodgkin's lymphomas.

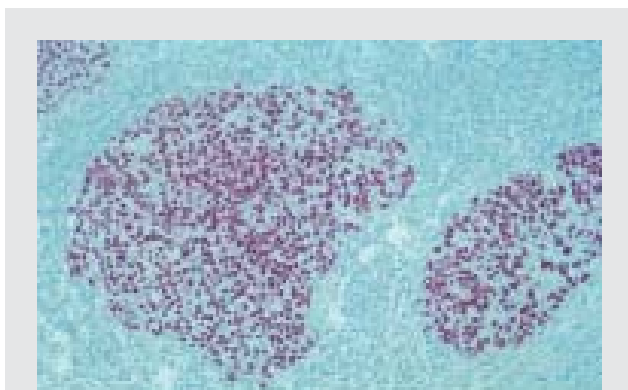


Fig. 9. Lymfoepitelialt spytkirtelkarcinom hos en 42-årig inuit. Tumorcellerne er EBER-positive, demonstreret ved RNA *in situ*-hybridisering (røde kerner).

Fig 9. A lymphoepithelial salivary gland carcinoma from a 42-year-old Inuit. The tumour cells are EBER positive as demonstrated by RNA ISH (red nuclei).

Bortset fra udifferentieret karcinom er der ikke andre spytkirteltumorer der er associeret med EBV (47,48).

Andre karcinomer

Lymfoepiteliale karcinomer i andre anatomiske regioner er blevet analyseret for EBV-association. Disse tumorer falder i tre hovedgrupper. Nogle er EBV-associerede, uafhængig af geografisk lokalisation; fx er lymfoepiteliale ventrikkelkarcinomer EBV-positive i 80% af tilfældene (49). Andre lymfoepiteliale karcinomer, fx i lunger eller thymus, er hyppigt EBV-associerede med EBV i de egne hvor NPC optræder endemisk, hvorimod tumorer i andre geografiske områder (fx Europa) synes at være EBV-negative (1). Endelig er der en stor gruppe EBV-negative lymfoepiteliale karcinomer, bl.a. karcinomer i cervix uteri, urinblære, hud og larynx (1).

Påvisningen af EBV i 80% af gastriske lymfoepiteliale karcinomer medførte at man undersøgte konventionelle gastriske adenokarcinomer, hvilket viste EBV-association i 2-16% (1,49). Der er også rapporteret association mellem visse typer brystkræft (50) og hepatocellulære karcinomer vha. *Southern blot*-hybridisering (51), men disse resultater afventer bekræftelse i andre studier.

Orale karcinomer

Orale pladeepitelcellekarcinomer er undersøgt for EBV i adskillige undersøgelser. En hel del af disse må desværre betragtes som inadækvate, enten fordi de er baseret på ganske få tilfælde, eller fordi der alene er anvendt PCR for at påvise EBV-DNA, med risiko for falsk positive resultater pga. amplificering af EBV-DNA fra inficerede lymfocytter, der som tidli-

gere nævnt findes hos næsten alle voksne, og der synes ikke at være grund til at tillægge EBV nogen patogenetisk rolle i udviklingen af orale karcinomer (52).

Der foreligger en tidlig undersøgelse, hvor EBV ved DNA-ISH blev påvist i seks af syv tonsilkarcinomer (53), men nyere forskning har ikke kunnet bekræfte dette (54).

Konklusion

EBV var det første humane virus der blev identificeret som onkogen. EBV må siges at være et virus med stor »succes«, siden det inficerer mere end 90% af verdens befolkning. Lejlighedsvis forårsager det imidlertid fatal sygdom. Introduktionen af sensitive og specifikke værktøjer for påvisning af EBV-DNA og genprodukter *in situ* har medført en voldsom ekspansion af det sygdomsspektrum der tegner sig omkring dette virus. Viden om mulig viral association med disse forskellige tilstande kan være en hjælp i den histologiske diagnostik, ikke mindst i mundhulen. I nogle tumorer synes EBV at være til stede som en tilfældig infektion uden patogenetisk relevans. For andre tumors vedkommende er der derimod akkumulerende evidens for at dette virus spiller en central og måske helt essentiel rolle i onkogenesen. En detaljeret gennemgang af de tumorer der er omtalt her, ligger dog uden for hensigten med denne artikel. Da EBV er et af de almindeligst forekommende humane virus, vil selv sjældne virale onkologiske tilfælde sammenlagt udgøre en betydelig sundhedsbelastning, set i globalt perspektiv. Disse forhold opfordrer til udvikling af virus-specifik behandling af EBV-associerede tumorer, og profylaktisk, til udvikling af en EBV-vaccine.

English summary

Virus and cancer. I. Epstein-Barr virus

The Epstein-Barr virus (EBV) is a ubiquitous herpesvirus which is found as a predominantly asymptomatic infection in all human communities. Primary infection usually occurs in childhood, and once infected, individuals become life-long virus carriers. However, in addition to being one of the most widespread human viruses, EBV is also an archetypal oncogenic virus, being associated with a number of malignant tumours in humans, predominantly originating from lymphoid and epithelial tissues. The *International Agency for Research on Cancer* has recently designated EBV as a group 1 carcinogen, although the precise role of the virus in cancer development still requires clarification. Since EBV is so common, the virus represents a substantial health burden worldwide. This paper gives a brief review of the association of EBV with cancer, with emphasis on those EBV-associated lesions that present in, or near to, the oral cavity.

vist ved elektronmikroskopi. Tilstedeværelse af den replikative EBV-infektion er senere bekræftet ved *in situ*-påvisning af store mængder EBV-produktive genprodukter og tilstedeværelsen af store mængder EBV-DNA (Fig. 5) (40).

Selvom EBNA1 og EBNA2 kan påvises i de superficielle celler, er der ikke tegn til EBV-infektion i epitelets basale lag, heller ikke ved anvendelse af detektionsteknikker med høj sensitivitet (40). Alt tyder således på at OHL skyldes gentagne direkte infektion af epitelets superficielle celler fra saliva eller fra tilstødende replikativt inficerede celler, og ikke fra en latent EBV-infektion i epitelets basale celler.

Nasofaryngealt karcinom

Nasofaryngealt karcinom (NPC) forekommer med en bemærkelsesværdig geografisk fordeling. Det er en almindelig karcinomtype i Sydøstasien, Nordafrika og i arktiske områder, hvor den højeste incidens findes blandt inuitter i Grønland. Derimod er NPC sjældne tumorer i Vesteuropa og Nordamerika (41). Ikke-keratiniseret udifferentieret NPC, associeret med et prominent lymfocyttrigt stroma, er langt den hyppigste form, mens keratiniseret NPC er mindre hyppig. Sero-epidemiologiske undersøgelser tydede på en mulig association mellem NPC og EBV. Man mente i starten at EBV var til stede i de inflammatoriske celler i tumorerne, men med udviklingen af *in situ*-teknikker til påvisning af EBV og EBNA1 blev det klart at EBV var til stede i de epiteliale tumorceller (Fig. 7) (42). Ved EBER-ISH viste det sig at *alle* NPC er EBV-positive, uanset geografisk oprindelse (41). EBV er til stede i tumorerne som et monoklonalt viralt episom, hvilket indikerer at infektionen er sket på et tidligt stadium i den

neoplastiske proces. Nasofaryngealt carcinoma *in situ* forekommer sjældent, men også disse præinvasive tumorer indeholder EBV, i modsætning til det omgivende non-neoplastiske nasofaryngeale epitel. I de fleste tilfælde udtrykker NPC LMP1, dvs. latensmønster II (Fig. 8).

Mens associationen mellem udifferentieret NPC og EBV er veldokumenteret, er relationen mellem spinocellulært NPC og EBV kontroversiel (41). En nyere undersøgelse har peget på at mens EBV er til stede i alle spinocellulære NPC fra områder med høj incidens af NPC, kan virus kun påvises i 30% af tumorerne fra områder med en lav incidens af NPC (43). Dette peger i retning af at andre faktorer (fx rygning) kan erstatte EBV i patogenesen af nogle spinocellulære nasofaryngeale karcinomer.

Spytkirtelkarcinomer

Karcinomer der morfologisk ligner udifferentieret NPC, såkaldte lymfoepiteliale karcinomer, kan ses uden for nasopharynx. Det gælder således for spytkirtler. Disse spytkirtelkarcinomer er relativt hyppige i Grønland (44). De kan morfologisk ikke skelnes fra NPC, og de har en lignende høj association med EBV (Fig. 9). I en undersøgelse af 11 sådanne tilfælde fra Grønland var alle tumorerne positive for EBER ved *in situ*-hybridisering (45). Det er i denne forbindelse interessant at notere at ganske vist er disse tumorer overordentlig sjældne i det meste af verden, men identiske EBV-associerede spytkirtelkarcinomer kan ses i Sydøstasien og dermed i et område hvor NPC forekommer endemisk (46,47). Dette sammenfald kan måske tilskrives fælles aner for inuitter og befolkningen i Sydøstasien.

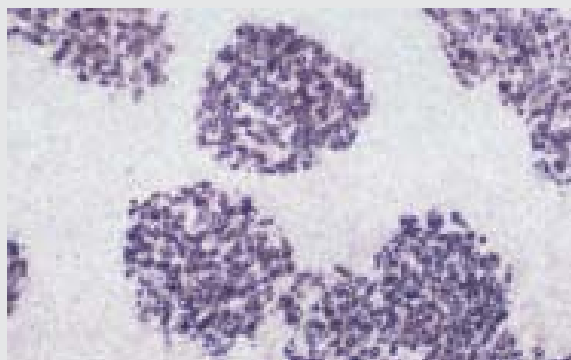


Fig. 7. Udifferentieret nasofaryngealt karcinom. Tumorcellerne er kraftigt positive for EBV-DNA (DNA-ISH med digoxigenin-mærket probe).

Fig 7. An undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. The tumour cells are strongly positive for EBV DNA (DNA ISH with digoxigenin labelled probe).

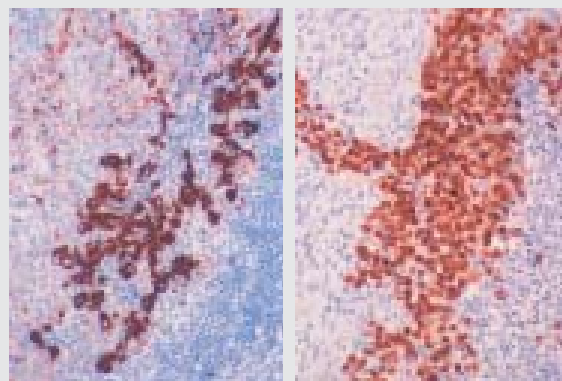
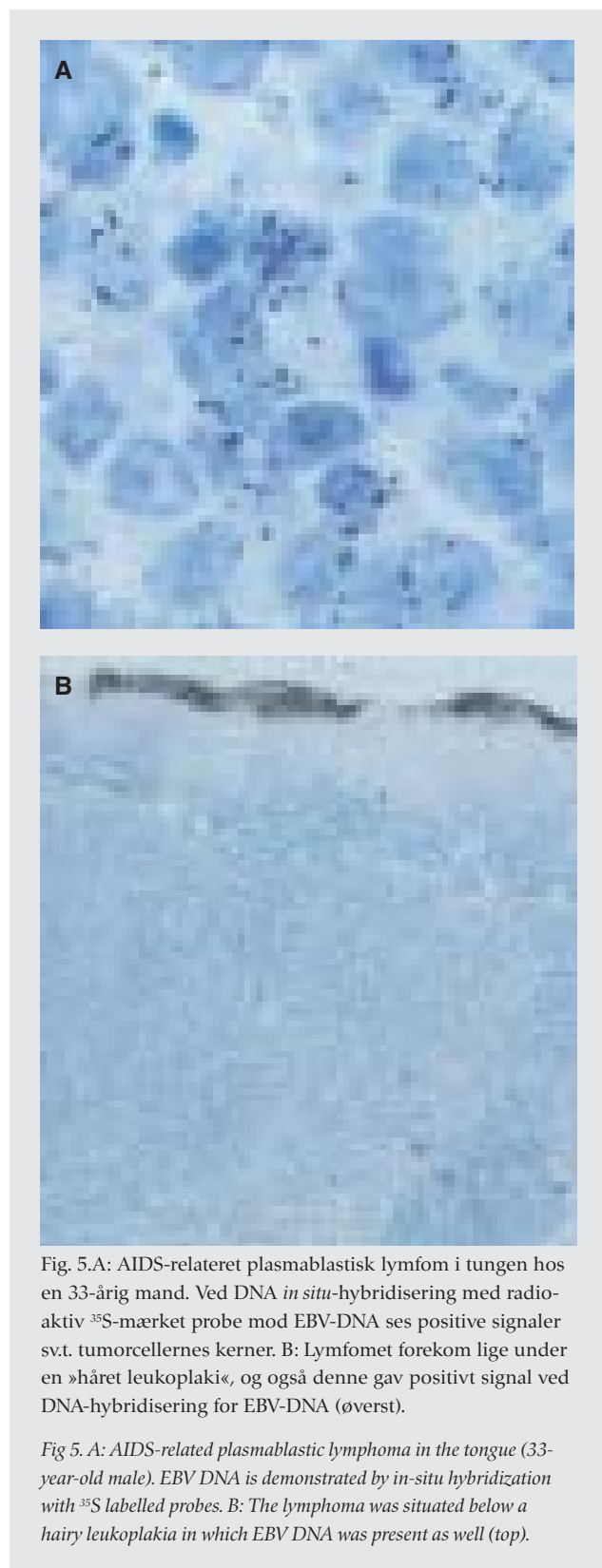


Fig. 8. Udifferentieret nasofaryngealt karcinom. Tumorcellerne er latent membranprotein-1 (LMP1) positive (til venstre) og EBER positive (til højre).

Fig. 8. An undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. The tumour cells express latent membrane protein-1 (LMP1) (left) and EBER (right).



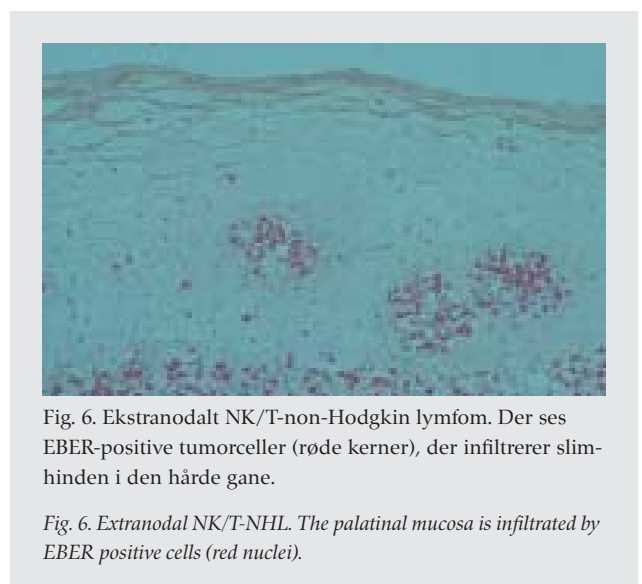
immuninkompetence, kan EBV påvises med større hyppighed i tumor end i B-celle lymfomer (1,8). Specielt findes EBV i så godt som alle sinonasale angiocentriske NHL. Dette lymfom er i den nye WHO-klassifikation betegnet som ekstranodal NK/T-celle lymfom, nasal type (34,39). Som betegnelsen indikerer drejer det sig om tumorer af både T-celle- og NK-celle fænotype, og tumorerne udtrykker ofte cytotoksiske proteiner. Disse lymfomer, der tidligere blev betegnet letale midtlinjegrnulomer, optræder klassisk i næsebihuler og gane, men kan også forekomme ekstranodalt i andre hoved-hals-områder (Fig. 6).

EBV påvises også hyppigt i andre T-celle-NHL, herunder i mundhulen og Waldeyers svælgring (34). I mange af disse tilfælde er virus imidlertid kun til stede i en mindre andel af tumorcellerne (8).

Karcinomer

Oral »håret leukoplaki«

Selvom oral »håret leukoplaki« (OHL) ikke er en neoplastisk proces, skal den alligevel omtales her, fordi denne forandring (der til trods for navnet hverken er håret eller er en leukoplaki) er et vigtigt eksempel på *in vivo*-EBV epitelial infektion. Selvom EBV kan påvises i trakealsekret fra seropositive patienter, er OHL den eneste tilstand hvor resultatet af fuld virusreplikation kan iagttages *in vivo*. OHL er en benign epitelial tungeforandring der kun optræder hos immuninkompetente patienter, fortrinsvis HIV-inficerede. Histologisk karakteriseres OHL af ballonerede celler og dannelse af inklusionslignende strukturer i keratinocyterne i epitelets superficielle lag. Tilstedeværelsen af en produktiv virusinfektion blev først



logisk betydning for udviklingen af HL (8), ikke mindst fordi man efter indførelsen af molekylærbiologiske teknikker har været i stand til at påvise EBV-nukleinsyre i HL. Således findes EBV i HRS-celler i 20-50% af HL-tilfælde i den vestlige verden, men i op mod 100% i andre dele af verden (8). Især synes EBV-associeret HL at forekomme hos mindre børn (20) og blandt HIV-positive (21). Den virale infektion af HRS-cellerne synes at ske meget tidligt, før den klonale proliferation sætter ind. Virus er transkriptionelt aktivt, idet man i HRS-celler finder ekspression af EBER1 og -2, EBNA1 og LMP1, dvs. latensmønster II (8) (Tabel 2).

Lymfomer associeret med immunsuppression

Patienter med medfødt eller erhvervet immundefekt har en øget risiko for at udvikle lymfoproliferative sygdomme. Primære immundefekter er sjældne og vil ikke blive omtalt her. De hyppigste årsager til erhvervet immunsuppression er organtransplantation og HIV-infektion.

Posttransplantationsbetinget lymfoproliferativ sygdom

Der er tale om tilstande der skyldes iatrogen immunsuppression, hvor der med baggrund i nedsat T-celle overlevelse opstår B-celle lymfoproliferationer med indhold af EBV. Disse tilfælde omfatter et bredt spektrum fra polymorfe polyklonale læsioner til maligne monomorfe og monoklonale lymfomer, der rent morfologisk ikke lader sig adskille fra lymfomer hos ikke-immunkompromitterede patienter (22). Ubehandlet PTLS har ofte et fatalt forløb, men udviser somme tider en dramatisk respons på simple terapeutiske tiltag som en reduktion i niveauet af immunsuppression. PTLS-læsioner viser sædvanligvis et type III latensmønster (Tabel 2), der svarer til det latensmønster der ses i lymfoblastcellelinjer *in vitro*, herunder ekspression af LMP1 og EBNA2. PTLS-læsioner ses ofte ekstranodalt, tit i selve de transplanterede organer. Primær lokalisering i mundhulen er meget usædvanlig (23), men kan ses i Waldeyers svælgring, især hos patienter der var EBV-seronegative forud for organtransplantation, og Waldeyers svælgring er en hyppig lokalisering for PTLS hos børn (24). EBV-undersøgelse af adenoide vegetationer og tonsiller er af værdi i den tidlige behandling af disse potentielt livstruende tilstande hos børn (25).

AIDS-relateret lymfom

NHL er den næsthøypigste maligne tumor (efter Kaposis sarkom) der ses hos HIV-inficerede, og incidensen af malignt lymfom hos HIV-inficerede er op til 200 gange over den forventede, idet op til 10% af AIDS-patienter udvikler sygdommen (26). Det er dog muligt at udviklingen af bedre antiretroviral behandling har en positiv indflydelse på lymfomfre-

kvensen hos disse patienter (27). AIDS-relateret lymfom (ARL) har mange lighedspunkter med PTLS, og langt de fleste forekommer ekstranodalt; i Danmark gælder det for 80% (28). Størsteparten (20-60%) af disse tumorer er CNS-lymfomer, men ARL forekommer dog også i mundhulen (1,28,29). Morfologisk er primære CNS ARL diffuse B-celle lymfomer, hvoraf langt de fleste udtrykker LMP1 og EBNA2, dvs. latensmønster III (14,30) (Tabel 2). Systemisk AIDS-relateret NHL forekommer i to typer: diffuse storcellede B-celle NHL og BL (29,30). Op mod 80% af de storcellede lymfomer er EBV-positive (Fig. 5) og udviser latensmønster II eller III (Tabel 2) (14,30). Disse tumorer optræder fortrinsvis hos patienter med svært kompromitteret immunapparat og stærkt nedsat T-celle funktion og ligner PTLS i deres opførsel (30,31). Derimod optræder AIDS-relateret BL især hos patienter med moderat nedsat immunkapacitet. Frekvensen af EBV-association er nede på 30% i denne gruppe (14), hvilket er i god overensstemmelse med forholdene omkring sporadisk forekommende BL. AIDS-associeret BL optræder lejlighedsvis i hoved-hals-regionen og kan involvere ansigtsknogler, inklusive kæberne.

AIDS-relateret oralt lymfom

I de fleste tilfælde er orale ARL storcellede B-lymfomer med plasmoblastlignende karakteristika, både morfologisk og immunofænotypisk, med svag eller ingen positivitet over for CD45 og CD20, men med positiv reaktion med B-cellemarkøren CD79A (29,32). Størsteparten af disse tumorer er EBV-associerede (Fig. 5). Næsten alle opstår hos homoseksuelle mænd.

Oralt B-celle NHL hos andre patienter

Ekstraorale B-celle-lymfomer (bortset fra BL) er kun sjældent associeret med EBV (33), og dette gælder også for B-celle lymfomer lokaliseret til Waldeyers svælgring (34). Adskillige forskere har undersøgt orale B-celle lymfomer fra immunkompetente patienter, men mange af disse studier kan ikke tolkes, fordi der alene er anvendt PCR til detektion af EBV. Da EBV udskilles i saliva og findes som »passagerer« i nogle af B-cellerne i alt lymfoidt væv, er risikoen for »falsk« positivitet til stede når PCR anvendes som eneste metode til påvisning af EBV i DNA, ekstraheret fra væv fra mundhulen, såvel som fra andre anatomiske lokaliseringer. Der foreligger mere pålidelige data fra forskere der har anvendt højsensitive *in situ*-teknikker som EBER-ISH, og disse resultater tyder ikke på at EBV skulle være specielt associeret med orale B-cellelymfomer (35-37).

T-celle non-Hodgkin lymfom

Når disse lymfomer forekommer hos patienter uden kendt

trykker EBNA2 (11), dvs. et såkaldt latensmønster type II. Dette har betydning, idet både IM og HL begge typisk rammer unge patienter og let kan forveksles. Omvendt optræder B-celle NHL i tonsiller i ældre aldersgrupper, og disse lymfomer er kun sjældent EBV-positive, og risiko for forveksling med IM er ringe. Og når EBV-positive NHL optræder i denne region, er det næsten udelukkende hos patienter med kompromitteret immunforsvar, fx HIV-inficerede eller patienter i immunsuppression efter transplantation.

Det skal kort nævnes at ved IM kan man se lymfocytær proliferation også andre steder i regionen, bl.a. i de øvrige områder af Waldeyers svælgring, i store og små spytkitler samt i den hårde og bløde gane.

EBV-associerede tumorer

I. Lymfomer

Burkitts lymfom

Burkitts lymfom (BL) er et højmalignt B-celle non-Hodgkin lymfom, karakteriseret ved én ud af flere specifikke kromosomale translokationer {t(8; 14), t(8; 2) eller t(8; 22)}, der placerer c-myc onkogenet under kontrol af et immunoglobulin-gen, hvilket medfører dysregulering (12). Man skelner mellem endemisk BL og sporadisk BL («*African type*» og «*Western type*»).

Endemisk BL forekommer i de ækvatoriale områder af Afrika, Brasilien og Papua New Guinea, hvor BL er den hyppigste børnecancer (13). En morfologisk identisk sporadisk form af BL forekommer i resten af verden, sædvanligvis hos større børn og unge voksne. Endelig kan BL forekomme som komplikation til HIV-infektion (14).

Klinisk er BL karakteriseret ved en hyppig ekstranodal lokalisation. Den endemiske form optræder meget hyppigt i hoved-hals-området, og ofte som hurtigt voksende tumorer i kæberne. Således er BL lokaliseret til kæberne i næsten 100% af de afrikanske patienter, hvor sygdommen i øvrigt er hyppigst omkring treårsalderen (15). Den sporadiske form af BL, der ses i den vestlige verden, viser sig hovedsagelig ved abdominale tumorer, omend 20% af patienterne har hovedhals-lymfomer (16).

EBV blev opdaget i 1964, hvor *Epstein et al.* fandt viruspartikler i dyrkede celler fra et afrikansk BL (17). Således er BL den første kendte maligne tumor der er associeret med EBV, og det er værd at bemærke at det foregik længe før at EBV blev identificeret som årsagen til IM. Virus er til stede i tumorceller i mere end 95% af endemiske BL-tilfælde (Fig. 4), men i færre end 25% af de sporadiske tilfælde. Desuden er EBV til stede i ~30% af HIV-associerede BL-tilfælde (12,14). EBV synes således ikke at være absolut nødvendigt for udvikling af BL. I EBV-associeret BL er det virale genom til ste-

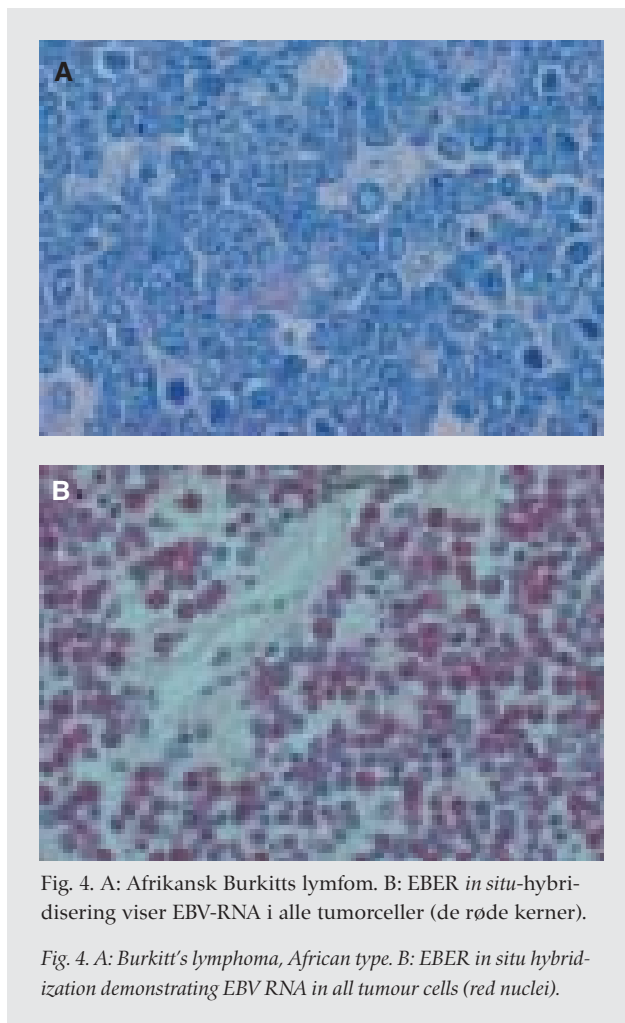


Fig. 4. A: Afrikansk Burkitts lymfom. B: EBER *in situ*-hybridisering viser EBV-RNA i alle tumorceller (de røde kerner).

Fig. 4. A: Burkitt's lymphoma, African type. B: EBER *in situ* hybridization demonstrating EBV RNA in all tumour cells (red nuclei).

de som et episom, og af de latente virale gener udtrykkes kun EBER1 og -2 og EBNA1, dvs. latensmønster I (6,18).

Hodgkins lymfom

Hodgkins lymfom (HL) er en vigtig tumor i den vestlige verden, hvor tumor fortrinsvis rammer unge voksne, i modsætning til de øvrige lymfomtyper. Histologisk karakteriseres HL ved tilstedeværelsen af Hodgkin og Reed-Sternberg celler (HRS), der ses spredt mellem talrige lymfocytter og andre reaktive celler. Tumor præsenterer sig hyppigst lokaliseret til lymfeknuder, oftest på halsen, mens ekstranodal forekomst er usædvanlig, og kun i få tilfælde er HL beskrevet i mundhulen (19). HL kan en sjælden gang findes som en primær tumor i Waldeyers svælgring (Fig. 3), inklusive tonsiller, eller i de lymfeknuder der findes i relation til gl. parotidea. HL i mundhulen og dens naboområder afviger imidlertid ikke fra HL i andre regioner.

Der er flere faktorer der tyder på at EBV kan være af ætio-

Immunhistologisk påvisning af EBV

Adskillige specifikke antistoffer mod latente EBV-genprodukter findes kommercielt tilgængelige og kan anvendes til at påvise viral gen-ekspression (og latensmønstre) på histologiske snit. De mest anvendte antistoffer påviser LMP1 og EBNA2 (Fig. 1) (8). Det er imidlertid et problem at antigenerne ikke udtrykkes i alle tilfælde af EBV-latent infektion; således er EBV-associerede Burkitts lymfomer (BL) negative for både LMP1 og EBNA2.

In situ-hybridisering

Både EBV-DNA og -RNA kan påvises ved *in situ*-hybridisering på paraffinsnit. De korte ikke-translaterede RNA-sekvenser EBER1 og EBER2 produceres i store mængder i alle kendte former for EBV-infektion og udgør således ideelle mål til dette formål (9). For hver EBV-kopi i en celle vil der findes op til 10^6 transcripts. Dette betyder at selv et ringe antal virale genomer kan detekteres i celler med latent EBV-infektion, også ved anvendelse af prober mærket med non-radioaktive teknikker og under anvendelse på rutineparaffinsnit (Fig. 2). Således kombinerer EBER-ISH fordelene ved *in situ*-påvisning af EBV og en sensitivitet der nærmer sig hvad man kan opnå ved PCR, hvilket gør metoden til den foretrukne ved påvisning af latent EBV-infektion i vævsprøver.

Infektøs mononukleose

I de tilfælde hvor primærinfektion med EBV ikke sker i tidligste barndom, men i puberteten eller senere, kan der ud-

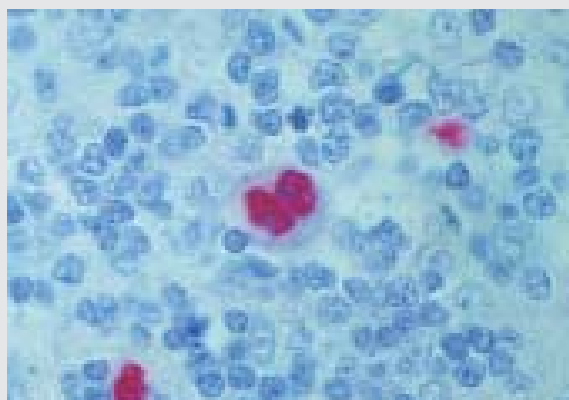


Fig. 2. Hodgkins lymfom hos en 35-årig mand. Billedet viser resultatet efter *in situ*-hybridisering på paraffinsnit. Den røde reaktion i Reed-Sternberg cellernes kerner demonstrerer EBER-positivitet.

Fig. 2. A Hodgkin's lymphoma from a 35-year-old male. EBV-positivity in the Reed-Sternberg cells is demonstrated by *in situ* hybridization on this paraffin section.

vikles infektøs mononukleose (IM). Der er tale om en generaliseret infektion med miltforstørrelse og leverpåvirkning samt betydelig almenpåvirkning. Typisk findes desuden hævede lymfeknuder på halsen og stærkt forstørrede tonsiller. Ved histologisk undersøgelse af tonsiller fra patienter med IM findes paracortex præget af et infiltrat bestående af lymfocytter, både EBV-inficerede aktiverede B-immunoblaster (Fig. 1A) (10), og prolifererende cytotoxiske T-celler. Desuden ses ofte celler der ligner Reed-Sternberg celler ved HL, og ved den morfologiske undersøgelse er der netop risiko for forveksling med HL (Fig. 1A). Ved at undersøge for EBV-ekspressionsmønster kan man imidlertid skelne, idet IM viser et latensmønstertype III, med ekspression af LMP1- og EBNA2-antigener (Fig. 1B og C), mens Reed-Sternberg tumorceller kan være LMP1-positive (Fig. 3), men aldrig ud-

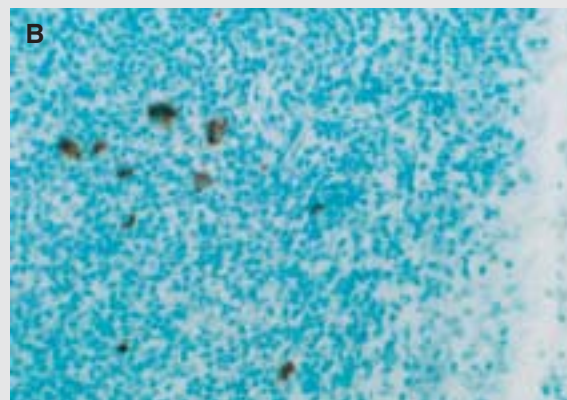
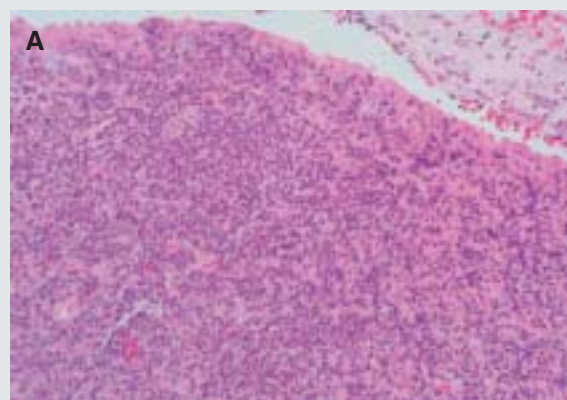


Fig. 3. Biopsi fra nasopharynx fra 44-årig mand. A: Der ses et infiltrerende Hodgkins lymfom. B: Reed-Sternberg cellerne udtrykker latensmønster type I ved immunhistokemi (anti-latent membranprotein-1).

Fig. 3. A nasopharyngeal biopsy from a 44-year-old male. A: An infiltrating Hodgkin's lymphoma is present. B: The Reed-Sternberg cells express latency pattern type I (anti-latent membrane protein-1).

sourcekrævende. Desuden kræver metoden frisk væv, der kun sjældent er tilgængeligt.

5. Traditionelle metoder til at påvise EBV i materiale ekstraheret fra tumorer (fx *Southern blotting*) kræver relativt store mængder frisk væv.

Situationen er imidlertid ændret i de senere år med introduktionen af flere nye vigtige metoder til EBV-påvisning i kliniske prøver. Anvendelsen af disse metoder, specielt på fikseret og paraffinindstøbt væv fra vævsbanker på de patologiske institutter, har i betydelig grad øget antallet af kendte EBV-relaterede tilstande.

Polymerase chain reaction

Polymerase chain reaction (PCR) er en amplifikations-teknik der kan anvendes til detektion af specifikke DNA-molekyler, selv hvor kun meget små mængder af materiale er tilgængeligt (7). Ved at udvælge passende primere kan denne teknik anvendes til påvisning af EBV-DNA og EBV-RNA i ekstrakt fra både

friskt væv og vævsblokke, indstøbt i paraffin. Muligheden for at undersøge fikseret materiale er et meget stort fremskridt, idet man nu kan undersøge forekomst af EBV i selv sjældne tumorer, hvorfra frisk materiale kun sjældent er tilgængeligt.

In-situ påvisning af EBV

PCR er en praktisk og følsom metode til at screene for EBV, men tolkning af resultaterne kan give problemer. Det skyldes at EBV er til stede hos praktisk taget alle voksne som en harmløs, livslang infektion, og samtidig er PCR så sensitiv en metode at selv meget små mængder af EBV i en prøve vil give et positivt resultat. Man kan således ikke vide om et positivt resultat skyldes den almindelige forekomst af EBV, eller om EBV deltager i sygdomsprocessen. Påvisning af EBV-DNA eller EBV-RNA i en aktuel celletype (fx i tumorceller og ikke kun i normale lymfocytter) vil således underbygge at EBV deltager i den aktuelle sygdomsproces. Der findes flere teknikker til dette formål, og immunhistologi og *in situ*-hybridisering skal kort omtales.

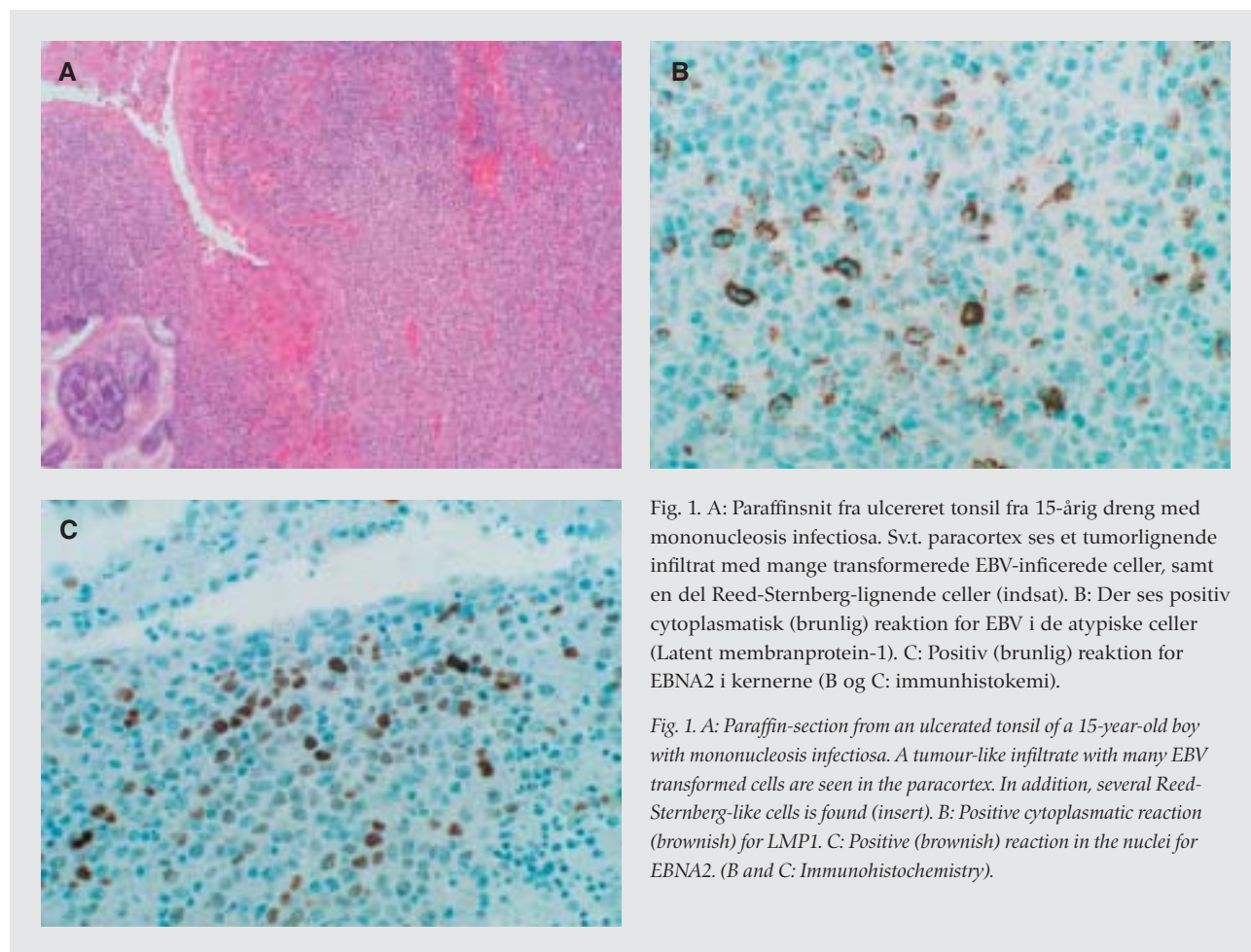


Fig. 1. A: Paraffinsnit fra ulcereret tonsil fra 15-årig dreng med mononucleosis infectiosa. Sv.t. paracortex ses et tumorlignende infiltrat med mange transformerede EBV-inficerede celler, samt en del Reed-Sternberg-lignende celler (indsat). B: Der ses positiv cytoplasmatisk (brunlig) reaktion for EBV i de atypiske celler (Latent membranprotein-1). C: Positiv (brunlig) reaktion for EBNA2 i kernerne (B og C: immunhistokemi).

Fig. 1. A: Paraffin-section from an ulcerated tonsil of a 15-year-old boy with mononucleosis infectiosa. A tumour-like infiltrate with many EBV transformed cells are seen in the paracortex. In addition, several Reed-Sternberg-like cells is found (insert). B: Positive cytoplasmatic reaction (brownish) for LMP1. C: Positive (brownish) reaction in the nuclei for EBNA2. (B and C: Immunohistochemistry).

- Detection of Epstein-Barr virus in a subset of peripheral T-cell lymphomas. *Am J Pathol* 1992; 140: 1315-25.
34. Kanavaros P, Briere J, Lescs MC, Gaulard P. Epstein-Barr virus in non-Hodgkin's lymphomas of the upper respiratory tract: association with sinonasal localization and expression of NK and/or T-cell antigens by tumour cells. *J Pathol* 1996; 178: 297-302.
35. Gulley ML, Sargeant KP, Grider DJ, Eagan PA, Davey DD, Damm DD, et al. Lymphomas of the oral soft tissues are not preferentially associated with latent or replicative Epstein-Barr virus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995; 80: 425-31.
36. Wolvius EB, Jiwa NM, van der Valk, Horstman A, van der Waal I. Adenolymphoma and non-Hodgkin's lymphoma of the salivary glands and oral cavity in immunocompetent patients are not associated with latent Epstein-Barr virus. *Oral Oncol* 1997; 33: 119-23.
37. Leong IT, Fernandes BJ, Mock D. Epstein-Barr virus detection in non-Hodgkin's lymphoma of the oral cavity: An immunocytochemical and in situ hybridization study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 92: 184-93.
38. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press; 2001.
39. Zhou XG, Hamilton-Dutoit SJ, Yan QH, Pallesen G. High frequency of Epstein-Barr virus in Chinese peripheral T-cell lymphoma. *Histopathology* 1994; 24: 115-22.
40. Sandvej K, Krenacs L, Hamilton-Dutoit SJ, Rindum JL, Pindborg JJ, Pallesen G. Epstein-Barr virus latent and replicative gene expression in oral hairy leukoplakia. *Histopathology* 1992; 20: 387-95.
41. Niedobitek G. Epstein-Barr virus infection in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma. *Mol Pathol* 2000; 53: 248-54.
42. Wolf H, Hausen HZ, Becker V. EB viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. *Nat New Biol* 1973; 244: 245-7.
43. Nicholls JM, Agathangelou A, Fung K, Zeng X, Niedobitek G. The association of squamous cell carcinomas of the nasopharynx with Epstein-Barr virus shows geographical variation reminiscent of Burkitt's lymphoma. *J Pathol* 1997; 183: 164-8.
44. Nielsen NH, Mikkelsen F, Hansen JP. Incidence of salivary gland neoplasms in Greenland with special reference to an anaplastic carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand [A]* 1978; 86: 185-93.
45. Hamilton-Dutoit SJ, Therkildsen MH, Neilsen NH, Jensen H, Hansen JP, Pallesen G. Undifferentiated carcinoma of the salivary gland in Greenlandic Eskimos: demonstration of Epstein-Barr virus DNA by in situ nucleic acid hybridization. *Hum Pathol* 1991; 22: 811-5.
46. Leung SY, Chung LP, Yuen ST, Ho CM, Wong MP, Chan SY. Lymphoepithelial carcinoma of the salivary gland: in situ detection of Epstein-Barr virus. *J Clin Pathol* 1995; 48: 1022-7.
47. Tsai CC, Chen CL, Hsu HC. Expression of Epstein-Barr virus in carcinomas of major salivary glands: a strong association with lymphoepithelioma-like carcinoma. *Hum Pathol* 1996; 27: 258-62.
48. Karja V, Syrjanen K, Syrjanen S. No Epstein Barr and cytomegalovirus DNA found in salivary gland tumours. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1997; 59: 97-9.
49. Osato T, Imai S. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Semin Cancer Biol* 1996; 7: 175-82.
50. Labrecque LG, Barnes DM, Fentiman IS, Griffin BE. Epstein-Barr virus in epithelial cell tumors: a breast cancer study. *Cancer Res* 1995; 55: 39-45.
51. Sugawara Y, Mizugaki Y, Uchida T, Torii T, Imai S, Makuuchi M, et al. Detection of Epstein-Barr virus (EBV) in hepatocellular carcinoma tissue: a novel EBV latency characterized by the absence of EBV-encoded small RNA expression. *Virology* 1999; 256: 196-202.
52. Cruz I, van den Brule AJ, Brink AA, Snijders PJ, Walboomers JM, van der Waal I, et al. No direct role for Epstein-Barr virus in oral carcinogenesis: a study at the DNA, RNA and protein levels. *Int J Cancer* 2000; 86: 356-61.
53. Brichacek B, Hirsch I, Sibl O, Vilikusova E, Vonka V. Presence of Epstein-Barr virus DNA in carcinomas of the palatine tonsil. *J Natl Cancer Inst* 1984; 72: 809-15.
54. Khabie N, Savva A, Kasperbauer JL, McGovern R, Gostout B, Strome SE. Epstein-Barr virus DNA is not increased in tonsillar carcinoma. *Laryngoscope* 2001; 111: 811-4.

Forfatter

Stephen Hamilton-Dutoit, professor, overlæge, FRCPATH
Patologisk-anatomisk Institut, Århus Universitetshospital