

한국인의 비강인후암에 발현된 Epstein-Barr 바이러스의 특성

연세대학교 의과대학 미생물학교실 및 병리학교실*, 영남대학교 의과대학 미생물학교실**

이재면 · 이태윤** · 박전한 · 김세중
임 현 이* · 박 찬 일* · 김 호 근*

= Abstract =

Characteristics of Epstein-Barr Virus Expressed in the Nasopharyngeal Carcinomas of Korean Patients

Jae Myun Lee, M.D., Tae Yoon Lee, M.D., Jeon Han Park, M.D., Se Jong Kim, M.D.
Hyunee Yim, M.D., Chanil Park, M.D. and Hoguen Kim, M.D.

*Department of Microbiology and Pathology, Yonsei University,
College of Medicine, Seoul, Korea*
*Department of Microbiology, Yeungnam University,
College of Medicine, Taegu, Korea*

Epstein-Barr virus (EBV) is frequently associated with nasopharyngeal lymphoepitheliomas and certain types of lymphoma, and rare lymphoepithelioma-like carcinomas occurring in various of organs such as stomach, parotid gland, thymus and lung. We have investigated the possibility that EBV may be present not only in the rare type of nasopharyngeal carcinoma, but also in the typical nasopharyngeal carcinoma (NPC) of squamous cell type. Polymerase chain reaction (PCR) for the W fragment of EBV was performed for the detection of EBV DNA, and in situ hybridization was performed for the detection of latent EBV infection in formalin-fixed paraffin embedded surgical specimens with EBER probe. PCR for the variable number of tandem repeat (VNTR) region of the latent membrane protein-1 gene was also performed for the differentiation of the infected EBV subtype in the different tumors. Positive reactions of the EBV was shown in 18 (86 %) of 21 cases of NPC. These reactions were detected by all of the above cases only in the carcinoma tissue specimens. The frequency of EBV gene expression at the NPC was related to the histologic differentiation of the tumors: All of the 9 cases of the lymphoepitheliomas and 3 cases of poorly differentiated squamous cell carcinomas were positive for EBV, 5 out of 7 squamous cell carcinomas of moderate differentiation were positive for EBV, and 2 cases of the well differentiated squamous cell carcinomas were negative for EBV. The EBV found in the NPC has three different number of VNTR in the latent membrane protein gene-1. These results suggest that variable subtypes of EBVs are associated with the NPC and the association of EBV with NPC is late event in the nasopharyngeal carcinoma progression as evidenced by negative association in the preneoplastic lesion and frequent association in the more poor differentiated tumors.

Key Words: Epstein-Barr virus, Nasopharyngeal carcinoma, LMP-1, VNTR

본 연구는 1995년도 연세대학교 의과대학 교수 연구비로 이루어 졌음.

서 론

암발생에 있어 바이러스 감염이 어떤 역할을 할 것이라는 가설은 꾸준히 제기되어 왔으나 아직까지 직접 또는 간접으로 암발생과 관련이 있는 것으로 알려진 바이러스는 많지 않다. 전염성 단핵구증의 원인 바이러스인 Epstein-Barr 바이러스(EBV)는 Burkitt's 림프종¹⁾ 및 미분화 비강인후암²⁾과 높은 연관이 있는 것으로 알려져 있다. 또한 EBV는 *in vitro*에서 사람 B림프구를 lymphoblastoid 세포주로 형질전환시킬 수 있으며³⁾, 최근의 연구에 의하면 호지킨 림프종⁴⁾ 및 비호지킨 림프종⁵⁾, 미분화된 위암^{6,7)}의 일부에서도 EBV와의 관계가 보고 되었다.

비강인후암은 중국 남부지방과 아프리카에서 많이 발생하나, 다른 지역에서의 발생은 드문 것으로 보고 되고 있다. 미분화 비강인후암과 EBV와의 관계는 전 세계적으로 확인된 바 있다. 그러나 아직까지 구강인후상피암중 편평상피세포암과 EBV와의 관계는 보고 자마다 다른 결과를 보여 편평상피세포암과 EBV와의 관계는 아직 확실히 밝혀져 있지 않다^{8,9)}. EBV가 전염성 단핵구증 환자나 정상인의 타액에서 발견되고¹⁰⁾, 인후상피세포에 EBV의 기능적 수용체가 존재한다는 보고¹¹⁾와, EBV가 이하선과 구강인후상피세포에서 증식할 수 있다는 보고^{12,13)}는 EBV가 비강인후상피암 발생과정에서 중요한 역할을 할 것이라는 것을 시사한다. 하지만 EBV가 암발생이나 암의 진행과정 중 어느 시기에 어떤 역할을 하는지는 밝혀져 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 한국인에서 발생한 비강인후상피암을 조직유형별로 분류한 후, EBV 감염을 *in situ* hybridization (ISH) 등을 통하여 분석함으로써, 비강인후암의 조직유형에 따른 EBV와의 연관성을 밝히고자 하였으며, 암조직에서 EBV가 양성인 환자의 주변 정상조직 및 전암병변에서 EBV유전자의 발현여부를 조사하여 EBV 감염과 비강인후암사이에 조직유형에 따른 특이성을 규명하고자 하였다. 비강인후암과 연관된 EBV에는 어떤 특이한 아형이 관련되는지를 알기위해서 latent membrane protein-1 (LMP-1)을 encoding하는 EBV 유전자 구조중 바 이러스마다 다양한 수의 33 base pair의 tandem repeat(various number of tandem repeat;

VNTR)를 구성하는 부위를 비강인후암조직에서 중합효소연쇄반응으로 검출하여 암조직에 존재하는 EBV를 비교함으로써 비강인후암에서 발현되는 EBV가 특정 아형에 특이성이 있는지를 조사하고자 하였으며 암조직 뿐만 아니라 주변조직에서도 EBV 아형을 조사하여 비강인후암의 발생과정상 EBV가 어느 시기에 어떤 경로로 감염되었는지를 간접적으로 밝히고자 하였다.

연구대상 및 방법

1) 연구 대상

연구대상으로는 1986년부터 1992년까지 연세대학교 의과대학 부속 세브란스병원에서 생검된 21예의 비강인후암의 파라핀 포매조직을 대상으로 하였다. 종양의 조직학적 분류는 WHO 분류¹⁴⁾에 따라, 편평상피세포암과 미분화암으로 분류하였으며, 편평상피세포암은 조직학적 분파도에 따라 고분화형, 중분화형, 저분화형으로 세분하였다.

2) 연구 방법

(1) *In situ* hybridization: 조직내 EBV 발현을 조사하기 위하여 *in situ* hybridization (ISH) 방법을 사용 하였다. 사용한 probe로는 EBV 검출에 민감하고 특이적이라고 알려진 EBERs¹⁵⁾을 사용하였다. 조직을 6 μ m씩 sialine을 피복시킨 슬라이드에 박절하여 56°C에서 30분간 방치한 후 xylene에 3분씩 2차례 담궈 파라핀을 제거하였다. 이후 99% 및 95% 에틸알코올에 3분씩 각각 2차례 담근 후 증류수에 방치하여 함수시켰다. 이후 0.001 mg%의 proteinase K(Sigma, St. Louis, MO, U.S.A)에 37°C에서 10분간 작용시킨 후 증류수로 세척하고, 공기에 20분간 노출시켜 조직을 완전히 건조시켰다. 건조된 조직위에 FITC로 label된 EBER probe (DAKO, Denmark)를 40~100 μ l씩 떨어뜨린 후 37°C에서 2시간 반응시켰다. 이후 0.1M Tris buffered saline (TBS)에 5분간 담근 후 0.1% Triton X-100가 함유된 TBS에 5분간 3회 세척하였다. 세척한 슬라이드에 anti-FITC (DAKO, Denmark)를 100 μ l씩 떨어뜨린 후 30분간 실온에서 반응시켰다. 다시 TBS에 세척한 후 alkaline phosphatase가 결합된 anti-

mouse Ig에 30분간 반응시킨 후 BCIP/NBT로 발색하였다.

(2) 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)을 이용한 EBV 유전자발현 검사

① 조직으로 부터 DNA 추출; 박절한 조직절편을 현미경하에서 정상조직과 암조직으로 분리하여 microcentrifuge tube에 넣고, 1 ml xylene으로 10분간 처리하여 paraffin을 제거하였다. 원심분리하여 xylene을 제거하고, 400 μ l의 100 mM Tris-HCl, pH 8.5, 5 mM EDTA, 1% SDS, 500 μ g/ml의 proteinase K로 56°C에서 12시간 반응시켰다. 이후 200 μ l의 buffered phenol과 동량의 chloroform을 넣고 10초간 vortex한 후 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 분리한 상층액에 100 μ l의 10 M sodium acetate와 800 μ l의 알코올을 넣고 섞은 후, -70°C에서 30분간 DNA를 침전시켰다. 이후 4°C에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 버리고 DNA 침전물을 500 μ l의 70% 에틸알코올로 세척하였다. DNA 침전물을 30 μ l의 증류수에 녹인 후 자외선 분광측정기를 이용하여 DNA 농도를 구한 후 4°C에 보관하였다.

② W 절편의 PCR; EBV 유전자 W 절편¹⁶⁾의 일부인 124 bp DNA 분절을 증폭시킬 수 있는 primer (TC60; 5'-CCA GAG GTA AGT GGA CTT-3', TC61; 5'-GAC CGG TGC CTT CTT AGG-3')를 고안하여, DNA synthesizer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)로 제조하여 일상적인 방법¹⁷⁾으로 정제하였다. 최종 반응혼합물의 조성은 조직에서 분리된 DNA 2 μ l와, 각각 200 mM의 dATP, dTTP, dCTP, dGTP와 0.1 mM primer, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.01% gelatin, 0.5 Unit Taq DNA polymerase (Perkin-Elmer Cetus Corporation, Emeryville, CA, U.S.A)를 혼합하여 총 20 μ l의 용량으로 하였다. 중합효소연쇄반응은 thermal cycler (Perkin-Elmer Cetus Corporation)를 이용하여 35회의 반응을 실시하였다. 각 cycle은 94°C에서 30 초간의 denaturation, 50°C에서 1분간의 annealing, 72°C에서 1분간의 primer extension으로 구성되었다. 마지막으로 72°C에서 5분간 연장 처리하고 4°C로 냉각하여 반응을 끝

내었다. 중합효소연쇄반응이 완료된 결과산물에서 10 μ l를 취하여 2 μ l의 gel loading buffer (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 15% Ficoll in water)와 혼합하여 2% agarose gel로 전기영동하고, 0.5 μ g/ml ethidium bromide (Sigma, St Louis, Mo, USA)로 30분간 염색하여 자외선투시로 증폭된 DNA band를 관찰하였다.

③ VNTR 합성; EBV LMP-I 유전자의 carboxyl기 쪽의 일부를 구성하는 33bp씩의 VNTR을 증폭시키는 primer (SL18; 5'-GGC GCA CCT GGA GGT GGT CC-3', SL19; 5'-TTT CCA GCA GAG TCG CTA GG-3')를 고안하였다¹⁸⁾. 최종 반응 혼합물의 조성은 조직에서 분리된 2 μ l의 DNA와, 각각 200 mM의 dATP, dTTP, dGTP와 5 mM dCTP, 1.0 μ Ci [α -³²P]dCTP (3,000 Ci/mmol), 0.1 mM primer, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.5% DMSO, 0.5 Unit Taq DNA polymerase (Perkin-Elmer Cetus Corporation)를 혼합하여 총 20 μ l의 용량으로 하여 중합효소연쇄반응을 시행하였다. 반응이 끝난 산물은 stop buffer (95% formamide, 10 mM EDTA, 0.1% bromophenol blue, 0.1% xylene cyanol FF)와 섞은 후, 95°C에서 3분간 열변성시킨 후에 8 M urea가 포함된 denaturing 6% polyacrylamide gel에 2,500 volt에서 2시간 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 후 gel을 3MM Whatman paper에 붙인 다음 plastic wrap으로 덮어 gel dryer로 말린 후 -70°C에서 X-ray film (Fuji Co., Tokyo, Japan)에 24시간 autoradiography를 시행하였다. 노출이 끝난 film을 현상하여 DNA band의 크기를 비교하여 VNTR의 수를 조사하였다.

결 과

1) 비강인후암에서의 EBV 유전자 발현

비강인후암을 병리학적으로 분류한 결과, 총 21예중 9예가 미분화암이었고, 12예가 편평상피세포암이었다. 편평상피세포암을 조직학적 등급으로 나눈 결과, 2예가 고분화암이었고, 7예가 중분화암이었으며, 3예가 저분화암이었다. 비강인후암에서 EBV 발현을 ISH법으로 검사한 결과, 편평상피세포암은 12예중 8

예에서 미분화암은 9예 전부에서 EBERs 발현이 확인되었고(Table 1), 이는 주로 핵막주변에 강하게 염색되었다(Fig. 1). 편평상피세포암에서 검출된 EBERs 발현을 조직학적 등급에 따라 비교해 본 결과, 고분화형은 2예 모두 음성하였고, 중분화형은 7예중 5예에서, 저분화형은 3예 모두 양성이었다. 비강인후암에서의 EBERs 발현은 암의 조직학적 등급이 낮을수록 그 빈도가 증가하는 경향을 보였다. 암조직 주변의 전

암병변에서는 EBERs의 발현을 확인할 수가 없었고, 주변에 침윤된 염증세포나 정상 상피 및 선조직에서도 EBERs 발현을 확인할 수 없었다.

비강인후암조직에서의 EBV 유전자의 존재여부는 전체 21예중 DNA 추출이 가능하였던 18예에서 EBV W 절편을 중합효소연쇄반응하여 알아보았다. 그 결과는 ISH법을 통한 결과와 유사하였다(Table 1). 미분화암인 경우 W 절편은 7예 모두에서 확인되었고,

Fig. 1. 비강인후암에서 *in situ hybridization*법으로 확인한 EBERs의 발현.

- a. EBV의 발현은 좌측의 암조직에만 특이하게 발현되어 우측 정상 편평상피에는 음성인 소견이다. b. EBERs는 암세포의 핵에만 선택적으로 양성반응을 보인다. c. 중분화된 편평상피 세포암에서 EBERs의 발현이 확인된다. d. 미분화암의 경우 흡어진 암세포의 핵에서만 선택적으로 EBERs의 발현이 확인된다.

Table 1. 비강인후암에서의 EBV 발현

조직유형	In Situ Hybridization (%)	중합효소연쇄반응	
		VNTR (%)	W fragment (%)
편평상피세포암			
고분화	0/2(0)	0/2(0)	0/2(0)
중분화	5/7(71)	4/6(67)	4/6(67)
저분화	3/3(100)	1/3(33)	1/3(33)
미분화암	9/9(100)	5/7(71)	7/7(100)

편평상피세포암의 경우는 11예중 5예에서 확인되었으며, 조직학적으로 고분화형의 편평상피세포암에서는 ISH의 결과와 마찬가지로 EBV W절편을 확인할 수 없었다.

2) 비강인후암에서 검출된 EBV의 VNTR에 따른 비교

EBV의 LMP-1 유전자 부위에 VNTR을 구성하는 부위를 중합효소연쇄반응을 통하여 합성 함으로써 비강인후암의 조직에 발현한 EBV의 VNTR 크기를 조사해 본 결과, 미분화암인 경우 7예중 5예에서 편평상피암의 경우 11예중 5예에서 VNTR을 확인할 수 있었다. 비강인후암에서 검출된 EBV를 VNTR의 크기를 이용하여 비교한 결과, 3개의 상이한 종류를 관찰할 수 있었으며, 이들은 각각 33 bp의 차이가 있어 VNTR의 반복이 1회 및 2회 차이가 있는 종류임을 알 수 있었다(Fig. 2). VNTR이 확인된 5예 중 2예에서는 다른 크기의 VNTR의 존재가 의심되는 경우가 있었으나 그 양은 미미하였다. 검사한 18예중 정상 조직에서는 EBV유전자 발현이 확인되지 않아 정상 및 암조직이 같은 종류의 EBV에 의해 감염되었는지는 알 수 없었다(Fig. 2).

고 찰

비강인후암과 EBV의 연관성은 잘 알려진 사실이지만 EBV가 종양형성에 관여하는 정확한 역할은 아직 확실하지 않다. 본 연구자들은 한국인에서 발생한 비강인후암에서 EBV 유전자의 높은 발현을 확인 할 수 있었고, 이는 암의 조직학적 등급이 낮을수록 EBV와

Fig. 2. 중합효소연쇄반응을 통해 비강인후암 조직에서 합성한 EBV의 LMP-1 유전자의 VNTR 부위 DNA의 소전. 전기영동상 3번, 4번, 5번, 6번 환자의 암조 직에서 합성된 DNA가 확인되며 이들은 33bp씩 차이가 나는 세종류임을 알 수 있다.

더욱 밀접한 관계가 있는 경향을 보였다. 또한 EBV 유전자의 발현은 주변 정상조직이나 전암병변에서는 확인되지 않았다. 이는 EBV가 비강인후암 진행과정 중 후기에 밀접한 관련이 있음을 시사하는 것으로 생각된다. 암조직에서 EBV LMP-1의 VNTR이 개체마다 다양한 크기로 검출 되었으며, 일부에서는 다른 크기의 VNTR을 가지는 EBV도 혼합되어 있었으나 그 양은 매우 미미하였다. 이러한 결과는 비강인후암에 연관된 EBV는 주로 한 종류의 EBV가 감염된 것이며 서로 다른 EBV가 혼합 감염된 경우는 드물다는 것을 시사한다.

비강인후암과 EBV와의 관련은 전세계적으로 광범위하게 확인된 사실이지만, 현재까지 보고된 대부분의 결과는 조직학적으로 미분화암과의 관계만을 따졌을 뿐 편평상피세포암과의 관계를 규명한 연구는 드물며 보고자에 따라 결과가 상이하다^{8,9)}. Raab-Traub등²⁰⁾은 Southern blot hybridization을 통한 실험에서 5개의 비강인후 편평상피세포암에서 적은 양의 EBV 유전자를 확인하였다고 하였으나, Niedobitek등은 DNA-DNA ISH⁹⁾ 및 EBERs을 이용한 ISH¹⁹⁾ 실

험에서 EBV의 존재를 확인하지 못하였다고 보고하였다. 본 실험에서는 ISH법을 통하여 비강인후 편평상피세포암에서도 높은 빈도로(8/12, 75%) EBV의 존재를 확인할수 있었으며 이는 중합효소연쇄반응을 이용한 EBV 유전자 검출에서도 확인되었다. 본 실험의 결과로 보아 비강인후암과 EBV의 관계는 어떤 특정 조직유형에 국한된 것이 아니라 신체의 특정부위와 밀접한 연관이 있다고 여겨지며 이러한 사실은 비강인후의 미분화암과 유사한 조직형태를 보이는 타장기의 암들에서 EBV의 발현을 확인하지 못했다는 다른 보고자들의 결과와도 일치한다^{21, 22)}.

본 실험에서는 ISH법과 중합효소연쇄반응으로 EBV 유전자 발현을 검사하였는데 본 실험에서 사용한 재료가 파라핀 포매조직이었기 때문에 중합효소연쇄반응을 통한 DNA 합성에서 다소간의 장애가 있었다. 그러나 ISH법을 통한 검사와 중합효소연쇄반응을 이용한 검사 모두 대부분의 비강인후암에서 EBV 발현이 확인 되었고 이러한 발현은 암조직에서만 국한된 것으로 나왔기 때문에, 비강인후암과 EBV의 관계는 암진행과정중 후기에 일어나는 관계로 사료된다.

본 연구의 결과로는 비강인후암에 존재하는 EBV의 아형은 개체마다 다른 것으로 나타났으며 동일 종양에서의 EBV 유전자는 단클론성이었다. 비강인후암에서 확인된 EBV 유전자에서 EBERs과 LMP가 미분화형의 경우 모든 예에서 발현되었고, 편평상피세포암 12예중 8예에서 검출되었다는 본 실험의 결과는 한국인에 발생한 비강인후암의 경우에는 EBV가 종양세포에 단순히 잠복감염되어 있는 것이 아니라 암진행과정에서 어떤 역할을 하는 것이라는 것을 암시한다. 즉 EBV가 감염된 많은 사람들중 극소수에서만 EBV와 특이한 연관을 갖는 비강인후암이 발생하고, 이러한 종류의 암의 전단계 조직에서는 EBV가 존재하지 않는다는 사실과 암의 발생 및 진행과정이 매우 긴 시간이 걸린다는 것은 EBV가 한국인의 비강인후암 진행과정중 후반기에 역할을 하는 것으로 사료된다.

결 론

저자들은 한국인의 비강인후암에서 높은 EBV 유전자 발현율과 이러한 발현은 조직학적 유형에 따라 미분화암에서는 높은 빈도로 나타나고, 편평상피세포암

에서는 저분화암에서 고분화암보다 높은 빈도로 나타나는 것을 확인하였으며, 이는 신체장기의 부위에 따른 특이한 관계이며 암진행과정중 후기에 해당하는 변화임을 밝혔다. 이러한 결과는 향후 EBV 관련 비강인후암의 예방 및 치료 뿐 아니라 암진행과정에서 EBV의 역할에 대한 생물학적 배경을 밝힐 수 있는 기초적인 자료로서 활용될 수 있다고 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Hausen H, Schulte-Holthausen H, Klein G, Henle W, Henle G, Clifford P, Santesson L: *Epstein-Barr virus DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. Nature* **228**: 1056, 1970
- 2) Klein G: *The relationship of the virus to nasopharyngeal carcinoma. In: Epstein MA, Achong BG, eds. The Epstein-Barr Virus. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag 1979: 339-350*
- 3) Kieff E, Liebowitz D: *Epstein-Barr virus and its replication. In: BN Fields, eds. Virology. 2nd ed, New York: Raven Press. 1990: 1889-1920*
- 4) Pallesen G, Hamilton-Dutoit SJ, Rowe M, Young LS: *Expression of Epstein-Barr virus latent gene products in tumor cells of Hodgkin's disease. Lancet* **337**: 320, 1991
- 5) Haarabuchi Y, Yamanaka N, Katama A: *Epstein-Barr virus in nasal T-cell lymphoma in patients with lethal midline granuloma. Lancet* **335**: 128, 1990
- 6) Shibata D, Tokunaga M, Uemura Y, Sato E, Tanaka S, Weiss LM: *Association of Epstein-Barr virus with undifferentiated gastric carcinoma with intense lymphoid infiltration. Am J Pathol* **139**: 469, 1991
- 7) Rowlands DC, Ito M, Mangham DC, Reynolds G, Herbst H, Hallissey MT, Fielding JW, Newbold KM, Jones EL, Young LS: *Epstein-Barr virus and carcinomas: rare association of the virus with gastric adenocarcinomas. Br J Cancer* **68**: 1014, 1993
- 8) Della TG, Pilotti S, Donghi R, Pasquini G, Longoni A, Grandi C, Salvatori P, Pierotti MA, Rilke F: *Epstein-Barr virus genomes in undifferentiated and squamous cell nasopharyngeal carcinomas in Italian patients. Diagn Mol Path*

3: 32, 1994

- 9) Niedobitek G, Hansmann ML, Herbst H, Young L, Dienemann D, Hartmann CA, Finn T, Pitteroff S, Welt A, Anagnostopoulos I, Friedrich R, Lobeck H, Sam CK, Araujo I, Rickinson AB, Stein H: *Epstein-Barr virus and carcinomas; undifferentiated carcinomas but not squamous cell carcinomas of the nasopharynx are regularly associated with the virus. J Pathol* **165**: 17, 1991
- 10) Yao QY, Rickinson AB, Epstein MA: *A re-examination of the Epstein-Barr virus carrier state in healthy seropositive individuals. Int J Cancer* **35**: 35, 1985
- 11) Young LS, Clark D, Sixbey JW, Rickinson AB: *Epstein-Barr virus receptors on human pharyngeal epithelia. Lancet, I*: 240, 1986
- 12) Sixbey JW, Nedrud JG, Raub-Traub N, Hanes RA, Pagano JS: *Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. N Engl J Med* **310**: 1225, 1984
- 13) Wolf H, Haus M, Wilmes E: *Persistence of Epstein-Barr virus in the parotid gland. J Virol* **51**: 795, 1984
- 14) Shanmugaratnam K, Sobin LH: *Histological typing of upper respiratory tract tumors. WHO*: 32, 1978
- 15) Ambinder RF, Mann RB: *Epstein-Barr-Encoded RNA in situ hybridization: Diagnostic applications. Hum Pathol* **25**: 602, 1994
- 16) Cheung A, Kieff E: *Long internal direct repeat in Epstein-Barr virus DNA. J Virol* **44**: 286, 1982
- 17) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Synthetic oligonucleotide probes. In: Molecular Cloning: A Lab manual. 2nd edit, NewYork: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989: 11.20-11.28*
- 18) Shibata D, Lawrence MW, Bharat NN, Russell KB, Alexander ML: *Epstein-Barr virus in benign lymph node biopsies from individuals infected with the human immunodeficiency virus is associated with concurrent or subsequent development of Non-Hodgkin's lymphoma. Blood* **77**: 1527, 1991
- 19) Niedobitek G, Agathangelou A, Barber, P, Smallman LA, Jones EL, Young L: *p53 overexpression and Epstein-Barr virus infection in undifferentiated and squamous nasopharyngeal carcinoma. J Pathol* **170**: 457, 1993
- 20) Raab-Traub N, Flynn K, Pearson G: *The differentiated form of nasopharyngeal carcinoma contains Epstein-Barr virus DNA. Int J Cancer* **39**: 25, 1987
- 21) Weiss LM, Movahed LA, Butler AE, Swanson SA, Frierson HF, Cooper PH, Colby TV, Mills SE: *Analysis of lymphoepithelioma and lymphoepithelioma-like carcinomas for Epstein-Barr virus by in situ hybridization. Am J Surg Pathol* **13**: 625, 1989
- 22) Carr KA, Bulengo S, Weiss LM, Nickoloff BJ: *Lymphoepithelioma-like carcinoma of the skin-a case report with immunophenotypic analysis and in situ hybridization for Epstein-Barr virus genome. Am J Surg Pathol* **16**: 909, 1992