



# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號: NSC-89-2314-B-002-103

執行期限: 88年8月1日至89年7月31日

主持人: 田蕙芬 台大醫學院內科

共同主持人: 黃立民 台大醫學院小兒科

計畫參與人員: 黃聖懿 台大醫學院內科

## 一、中文摘要

多發性骨髓瘤是一種人類的漿細胞腫瘤，其發生的病因至今不明。人類皰疹病毒第八型(以下簡稱 HHV-8)，是一個新發現的人類皰疹病毒，並曾被報告存在於部分骨髓瘤病患的骨髓間質細胞中，由於 HHV-8 的部分病毒蛋白被證實可以刺激人類骨髓瘤細胞的生長，因此被推測與人類骨髓瘤的形成可能有關。但是到目前為止，所有發表的相關研究卻仍有很大的爭議。這些爭議可能是因為偵測 HHV-8 所使用的方法及其敏感度不同，或是 HHV-8 在人類的感染有地區性的差異所致。因此，我們利用最敏感的血清學和多聚合酶鏈反應(PCR)來檢驗本國骨髓瘤病人感染 HHV-8 的情況和探討其在骨髓瘤所可能扮演的角色。血清學是用間接免疫螢光法(indirect immunofluorescence assay)來偵測病人血清中 HHV-8 的抗體；多聚合酶鏈反應(PCR)則是在病人的周邊血液單核細胞(peripheral blood mononuclear cells)中偵測病毒基因的存在。綜合這兩種方法的結果，以下三種狀況可視為 HHV-8 陽性。第一是血清中 HHV-8 的抗體為高效價陽性( $\geq 1:160$ )，而 PCR 為陰性；第二是血清雖為低效價陽性( $1:160 > \&\geq 1:10$ )，但 PCR 陽性；第三是血清陰性，但兩次以上的 PCR 皆為陽性。自 1998 年 4 月到 2000 年 10 月止，我們共收集了 104 位骨髓瘤患者的周邊血液標本來做研究。另外，同時期也收集了 45 位其它非骨髓瘤的血液疾病和 65 位正常捐血者的血液檢體做為對照組。結果在這 104 位骨髓瘤病患中，40 位病患為陽性，比例為 38.5%；而非骨髓瘤病患及正常捐血者則分別只有 13.3% 和 13.8% 為 HHV-8 陽性。就骨髓瘤的病患而言，HHV-8 陽性與否在臨床和血液學的特徵上並沒有差別。但若是比較其對傳統化學治療的反應，則 HHV-8 陽性的病人要遠比 HHV-8 陰性的病人差，反應時間(response period)也比較短，分別只有  $13.0 \pm 2.7$  和  $29.0 \pm 2.5$  月 ( $p < 0.001$ )。就存活時間(survival time)來看，HHV-8 陽性的病人也要遠比 HHV-8 陰性的病人短，分別是  $27.0 \pm 4.7$  和  $65.0 \pm 21.4$  月 ( $p = 0.001$ )。因此，本研究的結論顯示本國骨髓瘤病患中有 38.5% 感染 HHV-8，其比例超過其它血液疾病和健康捐血者。而且骨髓瘤病患若有感染 HHV-8，則對傳統化學治療較為無效，且存活時間較短。這個結果也提供我們合理的證據去從事進一步相關於 HHV-8 和骨髓瘤的研究。

關鍵詞: 卡波西肉瘤相關病毒/人類皰疹病毒第八型、多發性骨髓瘤、漿細胞惡質病

## Abstract

Multiple myeloma (MM) is a well-characterized human plasma cell neoplasm, yet its pathogenesis awaits to be elucidated. For human herpesvirus type 8 (HHV-8), a new member of gammaherpesvirus family, has been detected in the bone marrow stroma cells of some MM patients, and several proteins derived from the virus were able to enhance the growth of human myeloma cells in vitro, it was suggested that HHV-8 may play a role in MM. However, the relevant studies published so far revealed controversial results on such issues. Those conflicting data might be a result of different assays used for detecting HHV-8 or a true geographic difference of HHV-8 infection worldwide. Therefore, by using both sensitive serological and PCR-based assays, we conducted a study to define the incidence of HHV-8 infection in MM in this area and to evaluate the possible role of the virus in MM if any. From April 1998 to November 2000, plasma and peripheral blood mononuclear cells were obtained from 104 MM patients for detection of HHV-8 specific antibodies and DNA respectively. 58 (55.8%) patients were newly diagnosed since the beginning of the study, 46 (44.2%) patients were diagnosed before the study. 62 (59.6%) were male and 42 (40.4%) were female. The mean age at diagnosis was  $61.8 \pm 13.8$  years with ranges of 22 to 88 years. The same blood samples obtained from another 45 patients with other non-MM hematological diseases and 65 healthy blood donors were as control groups. An mouse antibody enhanced-indirect immunofluorescence assay (MIFA), against either lytic or latent antigens of the virus, was used to determine the HHV-8 antibody titers. A nested PCR to amplify the ORF26 of HHV-8, which has a detection limit of less than five viral copies in 150,000 cells, were applied. Both Southern blot and sequence analysis would confirm the specificity of PCR results. Based on the results from MIFA and PCR assays, three criteria were considered to have true HHV-8 infection. The criteria I was high MIFA titer alone ( $\geq 1:160$ ), the criteria II was coexistence of positive MIFA titer ( $\geq 1:10$ ) and PCR result, the criteria III was negative MIFA titer ( $< 1:10$ ) but positive PCR results on two consecutive samplings. Among the 104 MM patients, 40 (38.5%) patients have HHV-8 infection, and in the 40 patients, 6, 29 and 5 patients fulfilled the criteria I, II and III respectively. On the contrary, only 6 (13.3%) of 45 patients with other non-MM hematological diseases and 9 (13.8%) of 65 healthy blood donors have HHV-8 infection. There were no substantial differences on clinical or biochemical characters between the MM patients who have HHV-8 infection and who did not. 80 (76.9%) of the 104 MM patients had received conventional chemotherapy and were able to be evaluated for treatment response. In the 80 patients, 31 patients were HHV-8 positive and the other 49 patients were HHV-8 negative. In the HHV-8 positive patients, 14 (45.2%) patients had no response to chemotherapy or progressive diseases, and 17 (54.8%) patients responded to treatment, including of 8 patients with minimal response, 8 with partial response and 1 with complete response. In the HHV-8 negative patients, only 4 (8.2%) patients had no response or progressive diseases, and 45 (91.8%) patients responded to treatment, including of 9

patients with minimal response, 28 with partial response and 8 with complete response. There was great difference on such response to conventional chemotherapy between the two groups (HHV-8 positive vs HHV-8 negative,  $p < 0.001$ ). Till the end of this study, 12 (70.6%) of the 17 patients with HHV-8 infection and 24 of the 45 (53.3%) patients without HHV-8 infection relapsed ( $p = 0.219$ ). The median response period (RP), defined by the period from the time reached minimal response till relapse of disease, were  $13.0 \pm 2.7$  and  $29.0 \pm 2.5$  months respectively ( $p < 0.001$ ). The median overall survival time, defined by the period from the date of diagnosis to the date of death for any reasons, for MM patients with HHV-8 infection and those who did not were  $27.0 \pm 4.7$  and  $65.0 \pm 21.4$  months respectively ( $p = 0.001$ ). Our data clearly showed the association between HHV-8 and MM that more than one third of MM patients in this area had HHV-8 infection, and the incidence was higher than that in other non-MM hematological diseases and healthy blood donors. Especially the MM patients with HHV-8 infection would have poor response to conventional chemotherapy and shorter survival than those who without HHV-8 infection. This result also provided a strong rationale to conduct the further study to elucidate the role played by HHV-8 in the pathophysiology of MM.

**Keywords:** Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/Human herpesvirus type 8, multiple myeloma, plasma cell dyscrasia

## 十八、研究計畫之背景及目的：

請詳述本研究計畫之背景、目的、重要性以及國內外有關本計畫之研究情況，重要參考文獻等。本計畫如為整合型計畫之子計畫，請就以上各點分別述明與其他子計畫之相關性。

多發性骨髓瘤(Multiple myeloma, 簡稱 MM)是 B 淋巴球分化至後期的細胞同源性增生所造成的惡性病。異常的漿細胞(plasma cells)群聚於病人的骨髓，並分泌單源性球蛋白，造成臨床上各式各樣的症狀。目前認為 MM 的發生及進行，是經過許多轉化(transformation)過程而產生(Hallek et al, 1998)，但真正的發病原因仍不清楚。MM 在西方的發生率較東方高(Wingo et al, 1998)；在台灣，根據衛生署提供給我們的資料，在 1979 年，MM 佔所有 cancer 之 1.7%，佔十萬人口之 0.016；1996 年分別增加至 7.6%及 0.06。在我們臨床觀察中，也發現這種病人逐漸增多，原因還有待查明。

最近卡波西肉瘤(Kaposi's sarcoma; 簡稱 KS)被發現可能跟一種濾過性病毒，卡波西肉瘤相關疱疹病毒(Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus; KSHV)感染有關，後因其類似人類疱疹病毒，而建議改名為人類疱疹病毒第八型(Human herpesvirus type 8; HHV8)(Moore et al, 1997)。近來研究知道此種病毒會潛藏在淋巴系統中，尤其是 B 淋巴球內(Bigoni et al, 1996)；而且藉由對其基因遺傳物質的瞭解，發現部分病毒基因所製造出的病毒蛋白和人類蛋白具有類似的功能(Ganem et al, 1997)，如病毒介白質-6 (viral Interleukin-6; vIL6)和病毒 bcl-2(vbcl-2)等，前者已證實可使人類 B 淋巴細胞株增生，後者則具有抑制細胞制約死亡(apoptosis)的功能；這些已知的病毒蛋白暗示著 KSHV 可能具有促進腫瘤(tumorigenesis)的能力(Moore et al, 1996 & 1998)。這隻病毒除了在 KS 中被發現外，亦有在其它特殊 B 淋巴細胞腫瘤被發現，如原發性漿液淋巴瘤(primary effusion lymphoma; PEL)、Castleman's 疾病等(Cesarman et al, 1995 & 1996; Said et al, 1996 & 1997)。1997 年 Rettig 等人更是在多發性骨髓瘤病人的間質細胞(可能是樹狀突細胞, dendritic cell)中發現到 HHV8 感染的證據(Rettig et al, 1997)，以及 vIL6 RNA 的存在(Parravicini et al, 1997a & 1997b)，並受到後續其它實驗室研究的證實(Brousset et al, 1997; Said et al, 1997)。由於一般成信骨髓瘤細胞和間質細胞所分泌的 IL6 有密不可分的關係(Bataille et al, 1997; Klein et al, 1989; Teoh et al, 1997)，這便不免讓人聯想到可能是 KSHV 感染到骨髓間質細胞，再由其分泌出 vIL6，或許加上其它未知的因子來促進漿細胞(plasma cell)增生(proliferation)，甚至變性(transformation)。一些實驗室的研究已證實 vIL6 和人類的 IL6 有很高的相似度，並且可以促進人類骨髓瘤細胞株的增生(Burger et al, 1998)。臨床上也發現有感染 KS 病毒的骨髓瘤患者似乎病程進展較快(Gao et al, 1998; Sjak-Shie et al, 1998)。這些發現至少透露出兩點重要的訊息：一、腫瘤的形成或惡化或許可藉由周圍支持細胞(supporting cells)感染特殊病毒而得，並不需腫瘤本體受到感染；二、若 HHV8 的感染日後證實與 MM 的發生有關，則發展抗病毒藥物或許會改善 MM 的治療成績，甚至可以開發相關疫苗，防範疾病於未然。近一年多來歐美及日本陸續有關於 HHV8

在大眾及 MM 病人感染率的報告，但仍有許多問題需要釐清，包括(一)、一般群眾方面，現今各地所報告的感染率相當歧異，是否代表本病毒在人類族群的分布有地區及人種上的差別，或只是檢查的差異造成，目前不可得知(David, 1998)。就現有的證據看來是非洲最高，歐洲較美洲低。而亞洲只有臨近的日本在最近報告健康成人感染率可達 80%左右(Table 1)，而我國則尚未有相關研究報告；(二)、在骨髓瘤方面，幾個具有代表性的實驗室，都發現到病毒感染的證據(Anderson et al, 1998; Berenson et al, 1998; Beksac et al, 1998; Sjak-Shie et al, 1998; Stone et al, 1998; Chauhan et al, 1998)，但一些歐洲的研究卻不支持這樣的發現(Corbellino et al, 1998; Tarte et al, 1998)(Table 1)，目前這樣互異的結果可能一部分來自種族及地區的差別，但大部分研究者認為是使用方法敏感度的不同，污染的可能性也必須排除。因此使用敏感度較高的檢查方法及嚴格的實驗室品質管制有其重要性及必要性；(三)、目前研究顯示本病毒應不感染骨髓瘤細胞本身而主要是感染到其周圍的骨髓間質細胞，但究竟是何種特定細胞則尚不確知，而且感染後的致病機轉亦不明瞭(Raje et al, 1998)，值得深入探討。

目前已有少數濾過性病毒感染，發現與腫瘤的發生有關，例如 B 型、C 型肝炎病毒之於肝癌，人類 T 淋巴細胞病毒第一型(Human T-lymphotropic virus type 1; HTLV-1)之於成人型 T 淋巴細胞白血病及淋巴瘤(Adult T-cell leukemia/lymphoma; ATLL)。我們期待能釐清一般群眾、MM 及其它漿細胞惡性病人，HHV8 的感染情形，因此提出相關研究計劃，其主要目的為：一、藉由血清篩選，研究 HHV8 在本國的盛行率；二、收集多發性骨髓瘤或相關漿細胞惡性病人的周邊血及骨髓檢體，發展較敏感的分子生物技術，偵測及定位 HHV8 的存在；三、比較 HHV8 陰性及陽性病人臨床表現的差異，觀察陽性病人在病程中 HHV8 感染的變化。如果 MM 病人 HHV8 的感染率確實很高，在以後的研究計畫中，我們可進一步與濾過性病毒的專家合作，建立 HHV8 陽性病人的細胞株，並探討 HHV8 感染與 MM 的關聯性，但這些尚不在本計畫的範圍。

## 十九、研究方法及進行步驟：

十九請詳細說明方法與進行之研究方法与原因。

2. 預計可能遭遇之困難及解決途徑。
3. 重要儀器之配合使用情形。
4. 如為整合型計畫，請就以上各點分別說明與其他子計畫之相關性。
5. 如為須赴國外或大陸地區研究，請詳述其必要性以及預期成果等。
6. 一年期以上之計畫，請分年列述。

### I、血清學檢查

1. 我們將與捐血中心合作，收集正常健康捐血者的血清，及骨髓移植 donor 的血清，由 0 歲至 80 歲每 10 歲為一年齡層，每年齡層預計採樣 100 人，共約 700 人為背景研究對象。收集多發性骨髓瘤(MM)及其它漿細胞惡質病病人的血清(包括診斷時、治療後及日後系列的追蹤)
2. 利用 indirect immunofluorescence assay (IFA) 偵測上述研究對象血清中對 HHV8 的抗體，包括 latent 抗原 (latent nuclear antigen)和 lytic 抗原(ORF65.2 protein)，以提高檢查的敏感性(Lennette et al, 1996; Simpson et al, 1996; Gao et al, 1994 & 1998; Rabkin et al, 1998)。方法簡述如下：
  - (1). 先將 TPA (20ng/ml) 加入 BCBL-1 細胞株 (含有 HHV8)培養基中 5 天，除原先表現的 latent antigens 外，部份細胞會表現出 lytic antigens
  - (2). 將細胞取出，用 cold acetone 固定於玻璃片上置入裝有 blocking solution (PBS 及 5%BSA) humidified chamber，30 分鐘
  - (3). 將病人血清用 blocking solution (5%BSA in PBS)，以 1:10 稀釋，加入 humidified chamber 中 incubate 一小時
  - (4). 使用 secondary antibody (mouse antihuman IgG<sub>123</sub>)，以 blocking solution 1:2000 稀釋，放入 humidified chamber 中 incubate 一小時
  - (5). slide 用 PBS 沖洗 3 次，而後加入 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG(用 blocking solution 1:4000 稀釋)，一小時。
  - (6). 再用 PBS 沖洗後將玻片置於螢光顯微鏡下觀察血清以四倍系列稀釋，抗體效價以最高倍的倒數定之，超過 10 以上者為陽性

### II、細胞分離以及聚合酶長鏈反應(polymerase chain reaction, PCR)

血清學適合做大規模的篩選，但敏感度不夠高，所以我們將發展分子生物學的方法，增加 HHV8 的偵測率。

#### 1. 檢體收集

對 MM 及其它漿細胞惡質病病人，在診斷時及以後系列的追蹤過程中收集以下三種檢體：

- (1)、周邊血液(peripheral blood, PB)
- (2)、骨髓(bone marrow, BM)抽取液
- (3)、骨髓切片、新鮮或是 paraffin 包埋的病理切片

## 2. 樹狀突細胞(dendritic cell, DC)的分離

雖然目前尚缺乏直接的證據，但一般研究顯示 HHV8 很可能感染 MM 病人的 DC，因此將 DC 分離純化後再進行 HHV8 的檢測，預期將可增加敏感度。我們將採用過去所發表 immunomagnetic bead separation 的方法(Tien et al, 1996)，使用 mini-magnetic cell separation system (MACS)，以 dendritic cell separation kit，先用 T 細胞(T-cell)，單核球(monocyte)，自然殺手細胞(natural killer cell, NK cell)的抗體 CD3, CD11b, CD16 做 negative selection，再用 CD4 做 positive selection，將 DC 濃縮。

## 3. 抽取 DNA

依照我們過去所發表的方法(Tien et al, 1995)，將各檢體細胞的 DNA 抽取出。檢體除包括 PB 及 BM mononuclear cells 外，也包括分離出的 DC；包埋之 BM 則經過研磨後在抽取。

## 4. 利用 PCR 放大 HHV8 genome 的片段

以 HHV8 特異的基因片斷為引子(primers)，對病人的各個檢體進行 PCR(Tien et al, 1995)。為了增加敏感度將採用 nested PCR 的方法。

Primers 的序列如下：

1<sup>st</sup> round

LM268(sense): CCT ICT AGC ITT GGC TAG IC

LM274(antisense): TCA AGC ACT CGC AGG GCA GTA

2<sup>nd</sup> round(放大 HHV8, KS330<sub>233</sub> 之一段，Chang et al, 1994)

KS1(sense): AGC CGA AAG GAT ICC ACC AT

KS2(antisense): ICC GTG TTG ICT ACG ICC AG

放大後的產物經過跑膠，再在 UV 燈下觀察是否有陽性反應。每個實驗都有 negative control 及 positive control。

## 5. Cloning 及 sequencing

為了確實 PCR 所放大出的產物是 HHV8 的一部分，且為了增加 HHV8 偵測的敏感度，我們將 cloning HHV8 KS330<sub>233</sub> 的一段做為 probe，以進行 Southern blot analysis。我們將以 BCBL-1 (body cavity based lymphoma-1) cell line(含有 HHV8 的 DNA)做為 template，以 KS1, KS2 為 primers(如前所述)，進行 PCR；經 PCR 放大的產物，用 PCRII vector 進行 cloning。最後再以 sequencing 的方法確定 DNA insert 無誤。得到的 probe，將以 random priming 的方法，以 p32-labeled, 進行 southern blotting(步驟 6)

## 6. Southern blot analysis

第四步驟得到的 PCR 產物，經過跑膠後，轉移到 Nylon membrane，再進行 Southern blot analysis (Tien et al, 1995)，probe 為步驟 5 得到者。



### III. 利用雙螢光染色法 (Price et al, 1992) 鑑別 HHV8 感染的細胞

HHV8 陽性的病人，我們將以 double fluorescence staining 的方法，同時以不同顏色的螢光染細胞表面抗原及 HHV8。可採用針對 dendritic cell 或 plasma cell 的抗體 (前者如 fascin, 後者如 CD138) 辨認細胞來源，再以 HHV8 的 probe 做 fluorescence in situ hybridization (FISH) (Chou et al, 1997)，如此可鑑定 HHV8 是存在於何種細胞內。

### IV. 追蹤病人

HHV8 感染的情況，將與病人的臨床表現、對治療的反應及病程做一對照。陽性病人，亦將觀察疾病治療及進行中，HHV8 感染的變化。

第一年，我們將以第 I 項血清的收集及檢驗為主，並開始進行第 II 項中細胞的收集和分離，及 probe 的製作。第二年，將進行第 II 項抽取 DNA，進行 PCR 及 Southern blot analysis，第三年，會繼續前兩年的研究，病人將系列的追蹤其變化，並開始對 HHV8 陽性的病人著手雙重染色的檢查。我們已與 UCLA, Dr. Berenson (第一個發現 MM 病人有 HHV8 感染者, Rettig et al, 1997) 取得聯繫，若我們有技術上的困難，他們會給予支援，他們也歡迎我們派人前往學習，因此執行此計畫應無問題。

## 二十、預期完成之工作項目及具體成果：

1. 請列述執行期限內預期完成之工作項目。
2. 對於學術研究、國家發展及其他應用方面預期之貢獻。
3. 對於參與之工作人員，預期可獲之訓練。
4. 一年期以上之計畫，請分年列述。
5. 本計畫如為整合型計畫之子計畫，請就以上各點分別說明與其他子計畫之相關性。

第一年：

我們可得知正常人及 MM 病人，血清中 HHV8 抗體的陽性率。

第二年：

藉由敏感且具特異性的方法，可以更準確的知道 MM 病人感染 HHV8 的機率。我們將比較各種檢體的檢出率。

第三年：

HHV8 陽性的病人，可以藉由 double fluorescence 的方法得知 HHV8 所感染的細胞。

我們也將收集病人臨床的資料並系列追蹤其病程，HHV8 陽性及陰性的病人將比較其臨床表現；陽性病人在治療後及疾病進行時，均將系列追蹤其 HHV8 感染的情況，以了解 HHV8 感染在疾病過程中扮演的角色。

有了這個計畫的研究成果做為基礎，以後我們可以與做濾過性病毒的學者合作，進一步探討 HHV8 在 MM 的發生上所扮演的角色，對日後治療及預防 MM 必有幫助。

Table 1. Summary of infection rate of KSHV in normal & disease populations

作者	地區	MM	MGUS	N	方法
Massood et al, 1997	美	7%	ND	8%	血清學(LNA)
Whitby et al, 1997	美	10.8%	5.5%	12.9%	血清學(LNA)
Marcelin et al, 1997	法	0%	33%	ND	血清學(LNA)
MacKenzi et al, 1997	英	2.5%	ND	5%	血清學(LNA+LyA)
Stone et al, 1998	美	36%	31%	ND	血清學(LNA+LyA)
Gao et al, 1998	美	81%	ND	6%	血清學(LyA)
Brousset et al, 1997	法	90%	ND	ND	PCR
Belec et al, 1998	中非	ND	ND	22.5%	Nested PCR
Goldschmidt et al, 1998	德	0%	ND	ND	Nested PCR
Tarte et al, 1998	法	9%	ND	ND	PCR
Yi et al, 1998	瑞典	0%	ND	0%	Nested PCR
Corbellino et al, 1998	義	0%	ND	ND	PCR
Bekac et al, 1998	土耳其	80%	ND	0%	PCR
Anderson et al, 1998	美	92%	ND	ND	Nested PCR
Raje et al, 1998	美	86.6%	ND	50%	PCR
Sjak-Shie et al, 1998	美	70%	35%	3%	PCR
Chauhan et al, 1998	美	92%	ND	0%	Nested PCR
Kikuta et al, 1997	日本	ND	ND	80%	PCR

Abbreviation: MM, multiple myeloma; MGUS, monoclonal gammopathy of undetermined significance; N, normal population; LNA, latent nuclear antigen; LyA, lytic antigen; ND, not done

## [REFERENCE]

- Anderson KC. Regulation of multiple myeloma (MM) cell growth and apoptosis. *Br J Haematol* 102: 142, 1998.
- Bataille R, Harousseau JL. Multiple myeloma. *N Engl J Med* 336:1657~1664, 1997.
- Beksac M, Ma M, DerDanielin M, et al. Frequent demonstration of human herpesvirus 8 (HHV-8) in bone marrow biopsy samples from Turkish patients with multiple myeloma (MM). *Blood* 92:96a, 1998.
- Belec L, Cancre N, Hallouin MC, et al. High prevalence in central Africa of blood donors who are potentially infectious for human herpesvirus 8. *Transfusion* 38: 771~775, 1998.
- Bellos F, Goldschmidt H, Dorner M, et al. Bone marrow derived dendritic cells as well as leukapheresis cells mobilized with chemotherapy and G-CSF of patients with multiple myeloma do not bear Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus DNA. *Blood* 92: 514a, 1998.
- Berenson JR. Oncogenesis in multiple myeloma. *Br J Haematol* 102: 142, 1998.
- Bigoni B, Dolcetti R, de Lellis L, et al. Human herpesvirus 8 is present in the lymphoid system of healthy persons and can reactivate in the courses of AIDS. *J Inf Dis* 173:542~549, 1996.
- Brousset P, Meggetto F, Attal M, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection and multiple myeloma. *Science* 278: 1972~1972, 1997. (letter)
- Burger R, Neipel F, Fleckenstein B, et al. Human herpesvirus type 8 interleukin-6 homologue is functionally active on human myeloma cells. *Blood* 91: 1858~1863, 1998.
- Cesarman E, Chang Y, Moore PS, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *N Engl J Med* 332: 1186~1191, 1995.
- Cesarman E, Nador RG, Aozasa K, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in non-AIDS-related lymphomas occurring in body cavities. *Am J Pathol* 149:53~57, 1996.
- Chauhan D, Barati A, Raje N, et al. Detection of human herpes virus-8 (HHV-8) sequence in multiple myeloma (MM) bone marrow stromal cells (BMSCs). *Blood* 92: 514a, 1998.
- Corbellino M, Pizzuto M, Nobili L, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) infection and multiple myeloma (MM) in Italy. *Blood* 92:95a, 1998.
- David S. Current assays for HHV-8 seropositivity unreliable. *Lancet* 352: 965, 1998.
- Ganem D. KSHV and Kaposi's sarcoma: The end of the beginning ? *Cell* 91:157~160, 1997.

- Gao SJ, Alsina M, Deng JH, et al. Antibodies to Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (Human herpesvirus 8) in patients with multiple myeloma. *J Inf Dis* 178: 846~849, 1998.
- Gao SJ, Kingsley L, Li M, et al. KSHV antibodies among Americans, Italians, and Ugandans with and without Kaposi's sarcoma. *Nat Med* 2:925~928, 1996.
- Hallek M et al. Multiple myelom: Increasing evidence for a multiple transformation process. *Blood* 91:3, 1998.
- Kikuta H, Itakura O, Ariga T, et al. Detection of human herpesvirus 8 DNA sequences in peripheral blood mononuclear cells of children. *J Med Virol* 53:81~84, 1997
- Klein B, Zhang XG, Jourdan M, et al. Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood* 73:517~526, 1989.
- Lennette ET, Blackbourn DJ, Levy JA. Antibodies to human herpesvirus type 8 in the general population and in Kaposi's sarcoma patients. *Lancet* 348:858~861, 1996
- Mackenzie J, Sheldon J, Morgan G, et al. HHV-8 and multiple myeloma in the UK. *Lancet* 350:1144~1145, 1997.
- Marcelin AG, Dupin N, Boscary D, et al. HHV-8 and multiple myeloma in France. *Lancet* 350:1144, 1997.
- Masood R, Zheng T, Tulpule A, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection and multiple myeloma. *Science* 278: 1970~1971, 1997.(letter)
- Miltenyi S, Muller W, Weichel W, et al. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11:231~238, 1990.
- Moore PS, Boshoff C, Weiss RA, et al. Molecular mimicry of human cytokine and cytokine response pathway genes by KSHV. *Science* 274: 1739~1744, 1996.
- Moore PS, Chang Y. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Clinical virology* (edited by Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG), Chap 24, p509~524, 1997. Churchill Livingstone Inc. New York, NY, USA.
- Moore PS, Chang Y. Antiviral activity of tumor-suppressor pathways: clues from molecular piracy by KSHV. *Trends Genet* 14:144~150, 1998.
- Parravicini C, Corbellino M, Paulli M, et al. Expression of a virus-derived cytokine, KSHV vIL-6, in HIV-seronegative Castleman's disease. *Am J Pathol* 151:1517~1522, 1997a.
- Parravicini C, Lauri E, Baldini L, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection and multiple myeloma. *Science* 278: 1969~1970, 1997b. (letter)
- Price CM, Kanfer EJ, Colman SM, et al. Simultaneous genotypic and immunophenotypic analysis of interphase cells using dual-color fluorescence: A demonstration of lineage involvement of lineage involvement in polycythemia vera. *Blood* 80:1033~1038, 1992.

- Rabkin CS, Schulz TF, Whitby D, et al. Interssay correlation of human herpesvirus 8 serologic tests. *J Infect Dis* 178:304~309, 1998.
- Raje N, Chauhan GD, Teoh G, et al. Bone marrow and peripheral blood (PB) dendritic cells (DCs) from patients with multiple myelom (MM) are phenotypically and functionally normal despite the detection of Kposi's sarcoma herpesvirus (KSHV) gene sequences. *Blood* 92:95a, 1998.
- Rettig MB, Ma HJ, Vescio RA, ... Berenson JR (corresponding author). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of bone marrow dendritic cells from multiple myeloma patients. *Science* 276:1851~1854, 1997.
- Said JW, Tasaka T, Takeuchi S, ... Berenson JR (corresponding author). Primary effusion lymphoma in women: report of two cases of Kaposi's sarcoma herpes virus-associated effusion-based lymphoma in human immunodeficiency virus-negative women. *Blood* 88:3124~318, 1996.
- Said JW, Chien K, Tasaka T, et al. Ultrastructural characterization of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) in Kaposi's sarcoma lesions: electron microscopy permits distinction from cytomegalovirus (CMV). *J Pathol* 182: 273~281, 1997a.
- Said JW, Rettig MR, Heppner K, et al. Localization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in bone marrow biopsy samples from patients with multiple myeloma. *Blood* 90(11): 4278~4282, 1997b.
- Simpson GR, Schulz TF, Whitby D, et al. Prevalence of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection measured by antibodies to recombinant capsid protein and latent immunofluorescence antigen. *Lancet* 1996; 349: 1133~38.
- Sjak-Shie N, Ma H, Der Dnelian M, et al. Incidence of HHV-8 infection in patients with multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 92: 97a, 1998.
- Stone S, Newman J, Burfoot A, et al. Serological prevalence of antibody to human herpesvirus type 8 (HHV-8) in patients with various monoclonal gammopathies. *Blood* 92: 514a, 1998.
- Tarte K, Olsen SJ, Lu ZY, et al. Clinical-Grade functional dendritic cells from patients with multiple myeloma are not infected with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Blood* 91: 1852~1857, 1998.
- Tien HF, Wang CW, Lin MT, et al. Correlation of cytogenetic results with immunophenotype, genotype, clinical features, and Ras mutation in acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 84:60~68, 1995
- Tien HF, Chou CC, Wang CW, et al. Putative normal counterparts of luekaemic cells from CD7-positive acute myeloid leukaemia can be demonstrated in human haemopoietic tissues. *Br J Haematol* 94:501~506, 1996.

- Teoh G, Anderson KC. Interaction of tumor and host cells with adhesion and extracellular matrix molecules in the development of multiple myeloma. *Hema/Oncol Clin Nor Am* 11:27~43, 1997.
- Wingo et al. Cancer incidence and mortality, 1973~1995. *Cancer* 82:1197, 1998.
- Whitby D, Boshoff C, Luzzi M, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection and multiple myeloma. *Science* 278: 1971~1972, 1997. (letter)
- Yi Q, Ekman M, nton D, et al. Blood dendritic cells from myeloma patients re not infected with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8). *Blood* 92: 402~404, 1998.