

上咽頭癌におけるEpstein-Barrウイルス遺伝子産物 およびp53蛋白,bcl-2蛋白の発現に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9196

上咽頭癌における Epstein-Barr ウイルス遺伝子産物および p53 蛋白, bcl-2 蛋白の発現に関する研究

金沢大学医学部医学科耳鼻咽喉科学講座 (主任: 古川 俊教授)
室 野 重 之

上咽頭癌における Epstein-Barr ウイルス (Epstein-Barr virus, EBV) の関与を, 病理組織学的に EBV 遺伝子産物を検出することにより検討した. また, 癌抑制遺伝子産物 p53 蛋白, 癌遺伝子産物 bcl-2 蛋白の検出も試み, これらの上咽頭癌への関与および EBV との関連を検討した. EBV がコードする核内小 RNA (EBV encoded small RNAs, EBERs) および初期遺伝子 BHLF に対するオリゴヌクレオチドプローブを用いて生体内局所ハイブリダイゼーション (*in situ hybridization*) を行った. また, 潜伏感染遺伝子にコードされる潜伏膜蛋白 1 (latent membrane protein1, LMP1), EBV 関連核抗原 2 (EBV-associated nuclear antigen2, EBNA2), 増殖サイクルの前初期遺伝子にコードされる BZLF1 蛋白, p53 蛋白および bcl-2 蛋白に対するモノクローナル抗体を用いて免疫組織化学染色を行った. 上咽頭癌56症例中, EBERs 陽性は46例 (82%), BHLF 陽性は6例 (11%), LMP1 陽性は17例 (30%), BZLF1 蛋白陽性は18例 (32%) であった. EBNA2 は全例で陰性であった. 世界保健機構の上咽頭癌病理組織分類別には, 分化型非角化癌では32例中30例 (94%), 未分化癌では17例中16例 (94%) において EBERs が陽性であったが, 扁平上皮癌5例および腺癌2例では EBERs は陰性であった. 上咽頭癌組織から PCR 法を用いて EBV-DNA を増幅したところ, 分化型非角化癌24例中22例 (92%), 未分化癌13例全例で EBV-DNA の検出がみられたが, 扁平上皮癌3例および腺癌2例からは検出されなかった. これらの結果から分化型非角化癌と未分化癌において EBV の密接な関与が証明され, EBV の潜伏感染遺伝子の発現様式による分類では, II 型であることが示された. bcl-2 蛋白陽性は50例 (89%) であったが, その発現は LMP1 の発現に依存していなかった. 潜伏感染から増殖サイクルへのスイッチ機能を有する BZLF1 蛋白は主に細胞質に発現しており, BHLF の発現がわずかに散在するのみであることより, BZLF1 蛋白の発現があっても増殖サイクルには移行しておらず, 細胞質に発現した BZLF1 蛋白はスイッチ機能を有さないと考えられた. p53 蛋白陽性は31例 (55%) であったが, その発現は BZLF1 蛋白の発現と相関しており ($p < 0.001$), 両者の相互作用が BZLF1 蛋白および p53 蛋白の機能低下をもたらし, 発癌の一因になりうる事が病理組織学的に示された.

Key words nasopharyngeal carcinoma, Epstein-Barr virus, p53, bcl-2, histopathological study

Epstein-Barr ウイルス (Epstein-Barr virus, EBV) は, 1964年に Epstein と共同研究者である Barr らによりバーキットリンパ腫培養細胞中に発見されたヘルペスウイルス科に属するウイルスである¹⁾. 他のヘルペスウイルス同様潜伏感染を特徴としており, EBV 抗体保有率は2~3歳で70~80%に達し, 成人ではほぼ100%である. ヒトの病因ウイルスとして, 思春期に初感染すると伝染性単核症を起こすことが知られている. このようにヒトへの普遍性を持つ一方で, EBV を正常ヒトBリンパ球に試験管内 (*in vitro*) で感染させると芽球化し無限増殖を起こすことから, 造腫瘍性とも関連づけられている. 現在のところバーキットリンパ腫をはじめとするリンパ球増殖性疾患やある種の固形癌への関与が考えられている. 固形癌においては, 上咽頭癌との関連が, 血清抗 EBV 抗体価の上昇などの血清免疫学的手法²⁾, サザンブロット法による腫瘍組織における EBV-DNA の証明³⁾ などの分子生物学的方法, 潜伏膜蛋白 (latent membrane protein, LMP) や EBV 関連核抗原 (EBV-

associated nuclear antigen, EBNA) など EBV 関連蛋白に対する免疫ブロット法⁴⁾, EBV-DNA に対する生体内局所ハイブリダイゼーション (*in situ hybridization*, ISH) 法⁵⁾ 等により明らかになった. さらに, 上咽頭癌は粘膜下に浸潤し上咽頭原発巣が早期に発見されることが少ないうえに, 組織学的に低分化型扁平上皮癌や未分化癌が多く, 原発部位不明のまま頸部リンパ節に転移をきたすことも多い. 中川⁶⁾ は, 上咽頭癌と EBV の密接な関連を原発部位不明頸部リンパ節転移癌の診断に応用し, 報告した.

p53 遺伝子は, DNA 腫瘍ウイルスであるシミアンウイルス (simian virus, SV) 40の遺伝子によりトランスフォームさせたマウスの癌細胞でSV40 ラージT (largeT) 抗原と複合体を形成する細胞側の蛋白質の遺伝子として単離された⁷⁾. 現在では, p53 遺伝子は癌抑制遺伝子として認識されており, 大腸癌⁸⁾, 胃癌⁹⁾, 肺癌¹⁰⁾, 乳癌¹¹⁾ をはじめとする多くの悪性腫瘍において, 高い頻度でその変異が報告されている. 変異型 p53 遺伝子産物

平成7年12月14日受付, 平成8年1月24日受理

Abbreviations: bp, base pair; CTL, cytotoxic T lymphocyte; EA, early antigen; EBER, EBV encoded small RNA; EBNA, EBV-associated nuclear antigen; EBV, Epstein-Barr virus; FITC, fluorescein isothiocyanate; HIV, human immunodeficiency virus; ISH, *in situ hybridization*; LCL, lymphoblastoid cell

である変異型 p53 蛋白は、核内に蓄積されるため免疫組織学的に同定することができ、パラフィン包埋標本を用いたレトロスペクティブな追跡が可能である。その一方で、野生型 p53 蛋白は、DNA 損傷時に誘導されて細胞を G1 で停止させ、DNA 合成前に修復させるとともに、修復できなかつた細胞はアポトーシス (apoptosis) を起こさせて除去する作用も持つ¹²⁾。bcl-2 遺伝子は濾胞性 B 細胞リンパ腫に高率に認められる染色体転座 t(14; 18)(q32; q21) の解析によって発見された癌遺伝子である¹³⁾。bcl-2 遺伝子は、この染色体異常によって免疫グロブリン H 鎖 (IgH) 遺伝子と融合し、IgH ローカスに存在するエンハンサーによって活性化され癌化に関与していると考えられている。

近年、EBV 潜伏感染に発現される既知の遺伝子産物に加え、EBV がコードする核内の小 RNA (EBV encoded small RNAs, EBERs) が発見された。上咽頭癌における EBV の関与について、EBV 遺伝子産物に対するプローブおよびモノクローナル抗体を用いて EBV 遺伝子の発現状態を解明するべく本研究を行った。また、上咽頭癌における p53 蛋白の過剰発現の有無および bcl-2 蛋白の過剰発現の有無を免疫組織学的に検討し、これらの上咽頭癌への関与についても検討した。なお、本論文では、EBV の蛋白をコードしうる読みとり枠 (open reading frame, ORF) の命名法は通例に従い、例えば BamHI-Z 断片内の左向き 1 番目の ORF は BZLF1 と表している。

材料および方法

1. 使用材料

昭和50年から平成7年の間に金沢大学附属病院耳鼻咽喉科において、および昭和62年から平成6年の間に国立金沢病院耳鼻咽喉科において治療した上咽頭癌症例の上咽頭および頸部リンパ節の生検もしくは摘出組織で、組織学的に腫瘍細胞の認められるものを用いた。上咽頭組織の検索しえたものは56例で、男性が42例、女性が14例であった。年齢は16歳から85歳でその平均は52.4歳であった。頸部リンパ節組織の検索しえたものは18

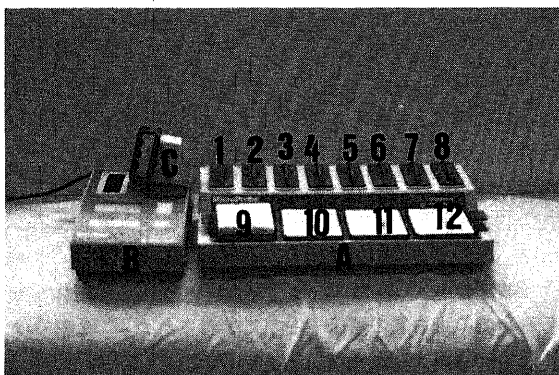


Fig. 1. The MicroProbe™ system. The apparatus consists of a slide stainer unit (A), variable temperature incubator (B) and a slide holder (C). A slide stainer unit contains enough volume (100 ml) reagent wells (1-8), an absorbent pad (9) and small volume (150 μ l) reagent isolators (10-12).

例で、うち16例は上咽頭原発巣も検索しえた。組織はいずれも10%ホルマリン溶液で固定し、パラフィンにて包埋したものを用いた。病理組織像は世界保健機構 (World Health Organization, WHO) の上咽頭癌分類¹⁴⁾にて行い、臨床病期分類はUICCのTNM分類¹⁵⁾に従った。臨床背景因子を検討する際、臨床病期のT因子を腫瘍が上咽頭内にとどまるか否かによりT1とT2およびT3とT4にわけこれをT因子A分類とした。一方、腫瘍の頭蓋底浸潤が予後不良因子の一つである¹⁶⁾ことから、頭蓋底浸潤のないT1とT2とT3および頭蓋底浸潤のあるT4にわけこれをT因子B分類とした。

II. 病理組織学的検討

1. マイクロプローブシステムの使用

ISH, 免疫組織化学染色とも Park ら¹⁷⁾, Reed ら¹⁸⁾ および Iezzoni ら¹⁹⁾ の方法に準じてマイクロプローブシステム (MicroProbe™ system) (Fisher Scientific, Pittsburgh, USA) を用いて行った (図1)。スライドガラスとしてプローブオンプラス (ProbeOn Plus™) (Fisher Scientific) を用い、組織面を向かい合わせるようにして対にすることにより 150 μ m の間隙を形成し、毛细管現象を利用して同部において後述する条件によって反応を進めた (図2)。パラフィン包埋組織から 3 μ m 厚の切片を作成した。

2. 生体内局所ハイブリダイゼーション

キシレン (和光純薬, 大阪) とヘモデ (Hemo De) (藤沢薬品, 大阪) を 1 : 3 に混合した溶液に 100°C 2分, 4回反応させて脱パラフィンを行った後100%エタノールにて6回洗浄した。ついでペプシン (Biomedica, Foster City, USA) にて100°C 2分30秒反応させた。プローブにはフルオレスセイン イソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識 EBV (EBER) オリゴヌクレオチド (DAKO, Glostrup, Denmark) を25倍に希釈して、また FITC 標識 EBV (BHLF) オリゴヌクレオチド (DAKO) を25倍に希釈して使用し、100°Cで4分, 80°Cで6分, 65°Cで12分ハイブリダイゼーションを行った。アルカリフォスファターゼ標識抗 FITC 抗体 (50倍希釈, DAKO) を45°Cで10分反応させた後、発色基質としてナフトール AS-MX リン酸 (naphthol AS MX phosphate) とファーストレッド TR 色素 (fast red TR salt) を 1 : 1 で混合した NASFRTR (Research

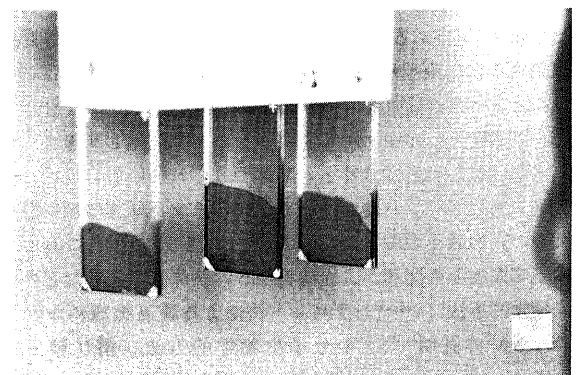


Fig. 2. Capillary-action. Two ProbeOn™ glass slides form a 150 μ m-wide capillary channel. Capillary-action channels are filled with the appropriate reagents.

line; LMP, latent membrane protein; LSAB, labeled streptavidin biotin; OHL, oral hairy leukoplakia; ORF, open reading frame; SV, simian virus; VCA, viral capsid antigen; WHO, World Health Organization

Genetics, Huntsville, USA) を使用して45℃で10分反応させた。核染色はヘマトキシリンにて行った。封入にはクリスタルマウント (Crystal/Mount) (Research Genetics) を使用した。判定は定性的に陽性と陰性に分類した。

3. 免疫組織化学染色

免疫染色は標識ストレプトアビジン-ビオチン (labeled streptavidin biotin, LSAB) 法にてスライドガラス上で行った。上述のキシレンとヘモデの混合液を使用して85℃3分で3回脱パラフィンを行った後、100%エタノールにて6回洗浄した。p53 蛋白および bcl-2 蛋白に対する免疫染色の際にはマイクロウェーブ処理を4分2回行った。エンド/ブロッカー (Endo/Blocker) 液 (Biomedica) をメタノールで6倍に希釈した溶液を使用して50℃で6分間内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止した後、非特異的の反応を阻止するためにプロテインブロッカー (Protein Blocker) (Research Genetics) を50℃で6分間反応させた。ついで1次抗体を50℃で15分間反応させた。1次抗体にはいずれもモノクローナル抗体として、抗 LMP1 抗体 (CS1-4, 25倍希釈, DAKO), 抗 EBNA2 抗体 (PE2, 25倍希釈, DAKO), 抗 BZLF1 蛋白抗体 (BZ. 1, 25倍希釈, DAKO), 抗 p53 蛋白抗体 (DO-7, 50倍希釈, DAKO), 抗 bcl-2 蛋白抗体 (Clone124, 40倍希釈, DAKO) を使用した。2次抗体にはユニバーサル二次抗体 (Universal Secondary Antibody) (Research Genetics) を使用して50℃で6分反応させた。ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Research Genetics) を50℃で6分反応させた後、3, 3' ジアミノベンチジン (3, 3'-diaminobenzidine, DAB) を使用して50℃で10分発色反応を行った。核染色はヘマトキシリンにて行った。封入にはクリスタルマウントを使用した。判定は定性的に陽性と陰性に分類した。p53 蛋白は腫瘍組織の一部でも染色されている場合に、同部において染色された細胞の割合により1) 5%未満, 2) 5%以上10%未満, 3) 10%以上50%未満, 4) 50%以上に分類しそれぞれを0, 1, 2, 3とスコア化した。スコア0, 1を陰性, スコア2, 3を陽性と判断した。bcl-2 蛋白は染色の濃淡により, 1) 陰性, 2) 弱陽性, 3) 中等度陽性, 4) 強陽性に分類しそれぞれを0, 1, 2, 3とスコア化した。スコア0を陰性, スコア1, 2, 3を陽性と判断した。

4. 免疫二重染色

p53 蛋白と bcl-2 蛋白の二重染色は、先述の手順でまず抗 bcl-2 蛋白抗体を使用してペルオキシダーゼ標識 LSAB 法により 3-アミノ-9-エチルカルバゾール (3-amino, 9-ethylcarbazole, AEC) にて発色させた後、0.1M グリシン塩酸緩衝液 (pH2.2) を用いて途中で緩衝液を2回交換しながら3時間ピーカー中で攪拌し、その後抗 p53 蛋白抗体を使用してアルカリホスファターゼ標識 LSAB 法により、5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルリン酸/ニトロブルーテトラゾリウム (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium, BCIP/NBT) (DAKO) にて発色させた。p53 蛋白と bcl-2 蛋白の染色性により a) bcl-2 蛋白の染色される範囲が p53 蛋白の染色される範囲を含んでいるもの, b) bcl-2 蛋白の染色される範囲と p53 蛋白の染色される範囲がほぼ等しいもの, c) p53 蛋白の染色される範囲が bcl-2 蛋白の染色される範囲を含んでいるもの, d) bcl-2 蛋白の染色される範囲と p53 蛋白の染色される範囲が全く異なるもの, e) bcl-2 蛋白の染色される範囲と p53 蛋白の染色される範囲が一部では一致するが異なるものの5つに分類した。

III. パラフィン包埋組織からの DNA の抽出

1 検体につきパラフィン包埋組織を厚さ 3 μ m に薄切した切片を、上咽頭組織は組織の大きさに応じて5~10枚、頸部リンパ節は1枚使用した。キシレン、エタノールによる脱パラフィンをし、風乾させた後、標本に氷冷した 0.1MNaCl, 1mMEDTA を含む 10mMTris-HCl 緩衝液 (pH7.5) を加えてよく混合した。ついで10% SDS を1/20容量に加え、さらに 10mg/ml のプロテイナーゼK (和光) 溶液を1/100容量に加え50℃で24時間インキュベーションを行った。フェノール、クロロホルム、イソアミルアルコールを25:24:1の割合で混合したものに3回抽出を行った後、5MNaCl を3/50容量に加え、ついで2倍量の100%エタノールを加えエタノール沈澱を行った。沈澱を70%エタノールにて洗浄した後、1mMEDTA を含む 10mMTris-HCl 緩衝液 (pH8.0) に溶解し、4℃で保存した。DNA の濃度は260nm の吸光度を測定し求めた。

IV. PCR 法

鋳型 DNA1 μ g に対して 10 \times PCR 反応緩衝液 (100mMTris-HCl, pH8.3, 500mMKCl, 15mMMgCl₂) 5 μ l, dATP, dGTP, dCTP, dTTP 各 100 μ M, TaqDNA ポリメラーゼ1.25単位, オリゴヌクレオチドプライマー各 1 μ M (プライマーを除きいずれも宝酒造, 京都) ずつに加え、滅菌蒸留水を加えて合計 50 μ l とした。蒸発防止のためミネラルオイル (Perkin Elmer, Branchburg, USA) 75 μ l を重層し、PROGRAM TEMP. CONTROL SYSTEM PD-700 (アステック, 福岡) を使用して、93℃で3分間熱変性させた後、93℃で2分間の熱変性、54℃で2分間のアニーリング、72℃で1分の DNA の伸長を1サイクルとして30サイクル行った。プライマーとして、EBV-DNA BamHI-W 領域122塩基対 (base pair, bp) を特異的に増幅するプライマー TC60, TC61 (Perkin Elmer) および β -グロビン DNA262bp を特異的に増幅するプライマー KM29, KM38 (宝酒造) を使用した。PCR 反応後、1 μ g/ml エチジウムブロマイドを含む2%アガロースゲルにて電気泳動を行い、紫外線照射にて増幅された DNA 断片を検出した。DNA サイズマーカーとしては ϕ X174/HaeIII ダイジェスト (宝酒造) を用いた。

V. 抗 EBV 抗体価の測定

抗 EBV 粒子抗原 (viral capsid antigen, VCA) 抗体価, 抗早期抗原 (early antigen, EA) 抗体価, 抗 EBNA 抗体価を測定した。結果は、森下²⁰⁾の基準に従い、抗 VCA-IgA 抗体価, 抗 EA-IgA 抗体価とも $\geq 1:10$ を陽性とした。

VI. 統計学的処理

各臨床背景因子群における EBERs, BHLF, LMP1, BZLF1 蛋白, p53 蛋白, bcl-2 蛋白の各々の発現の検定およびこれらの EBV 遺伝子産物, p53 蛋白, bcl-2 蛋白間の発現の検定にはカイ二乗 (χ^2) 検定を用いた。p53 蛋白および bcl-2 蛋白のスコアは平均値土標準偏差で示し、有意差検定には、2群間では Mann-Whitney U 検定を用い、3群間では Kruskal-Wallis 検定を用いた。いずれも $p < 0.05$ を有意差ありとした。

成 績

I. 上咽頭癌の病理組織像

上咽頭扁平上皮癌を角化の有無、さらに非角化のものを分化度により二つにわけ、1) 扁平上皮癌 (squamous cell carcinoma, WHO-1 と表記)、2) 分化型非角化癌 (differentiated non-keratinizing carcinoma, WHO-2 と表記)、3) 未分化



Fig. 3. Squamous cell carcinoma (WHO type 1) of the nasopharynx. The tumor cells show squamous differentiation with the presence of intercellular bridges and keratinization. HE staining. Scale bar indicates 50 μ m.

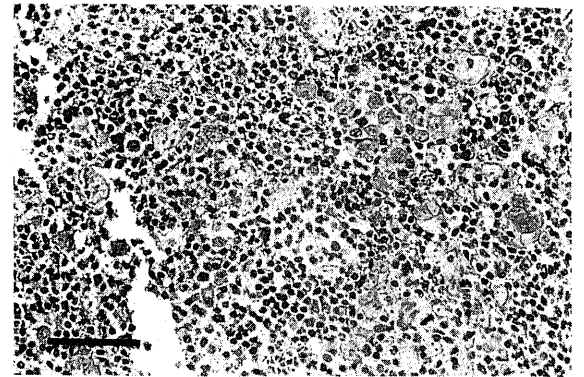


Fig. 5. Undifferentiated carcinoma (WHO type 3) of the nasopharynx. The tumor cells have oval vesicular nuclei and prominent nucleoli with indistinct cell margins. Infiltration of normal lymphocytes is obvious. HE staining. Scale bar indicates 50 μ m.

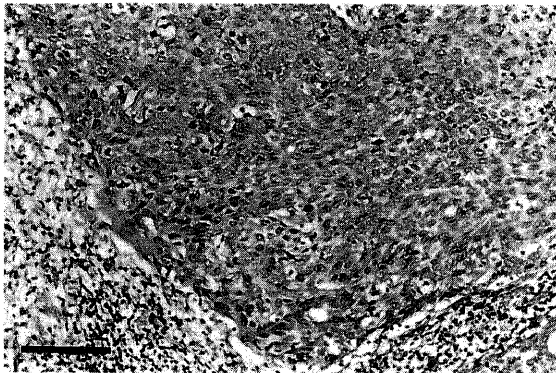


Fig. 4. Differentiated non-keratinizing carcinoma (WHO type 2) of the nasopharynx. The tumor cells have well defined cell margins and show an arrangement that is stratified or paved. The tumor grows in common plexiform pattern and lacks keratinization. HE staining. Scale bar indicates 100 μ m.

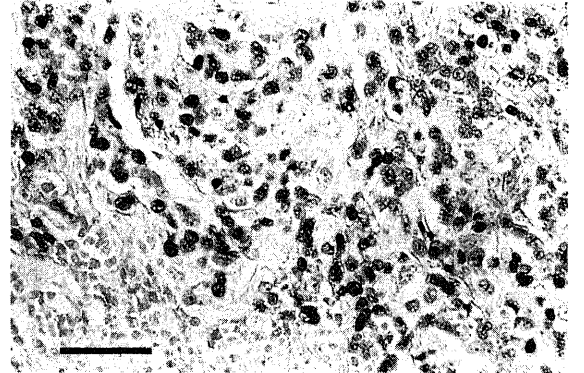


Fig. 6. Photomicrograph of *in situ* hybridization with EBERS oligonucleotides probe. Positive reaction is observed in almost all tumor cells not in lymphocytes. Counterstain is not performed. Scale bar indicates 50 μ m.

Table 1. Expression of EBV genes and proteins, p53 protein and bcl-2 protein in 56 primary nasopharyngeal carcinoma cases

Clinical factors	No. of cases	No. of positive cases						p53 protein ($\bar{x} \pm SD$)	No. of bcl-2 protein-positive cases	bcl-2 score ($\bar{x} \pm SD$)
		EBERs	BHLF	LMP1	EBNA2	BZLF1 protein				
Sex										
Male	42	36	5]NS*	14]NS*	0	17]NS*	23]NS*	1.55 \pm 1.19]NS*	36]NS*	1.67 \pm 1.03]NS**
Female	14	10		3]NS*	0	1]	8]NS*	1.57 \pm 1.09]NS*	14]NS*	1.79 \pm 0.80]NS**
Histology										
WHO-1	5	p<0.001*	0]	0]	0	0]	1]	1.00 \pm 1.23]	5]	1.80 \pm 0.84]
WHO-2	32		30]p<0.001*	4]NS*	9]NS*	10]NS*	19]NS*	1.59 \pm 1.19]NS***	29]	1.75 \pm 0.98]
WHO-3	17	p<0.02*	16]p<0.02*	2]	8]	8]	11]	1.82 \pm 1.02]	14]	1.65 \pm 1.06]
adenocarcinoma	2		0]	0]	0]	0]	0]	0.00 \pm 0.00]	2]	1.00 \pm 0.00]
T factor (A)										
T1+2	27	20]NS*	2]NS*	9]NS*	0	7]NS*	13]NS*	1.44 \pm 1.19]NS**	24]NS*	1.67 \pm 0.96]NS**
T3+4	29		4]NS*	8]NS*	0	11]	18]	1.66 \pm 1.14]	26]	1.72 \pm 1.00]
T factor (B)										
T1-3	38	30]NS*	2]NS*	13]NS*	0	13]NS*	23]NS*	1.66 \pm 1.15]NS**	34]NS*	1.76 \pm 0.94]NS**
T4	18	16]NS*	4]NS*	4]NS*	0	5]NS*	8]NS*	1.33 \pm 1.19]NS**	16]	1.56 \pm 1.04]
N factor										
N0	18	14]NS*	0]NS*	7]NS*	0	5]NS*	11]NS*	1.72 \pm 1.18]NS**	17]NS*	1.78 \pm 1.00]NS**
N1-3	38	32]NS*	6]NS*	10]NS*	0	13]	20]	1.47 \pm 1.16]NS**	33]	1.66 \pm 1.00]
M factor										
M0	52	42]NS*	5]NS*	17]NS*	0	17]NS*	28]NS*	1.54 \pm 1.16]NS**	47]NS*	1.71 \pm 0.96]NS**
M1	4	4]NS*	1]NS*	0]NS*	0	1]	3]NS*	1.75 \pm 1.26]NS**	3]	1.50 \pm 1.29]NS**
EBV titer										
Positive	26	26]p<0.001	4]NS*	10]NS*	0	11]NS*	15]NS*	1.50 \pm 1.11]NS**	21]NS*	1.57 \pm 1.10]NS**
Negative	9		0]NS*	0]NS*	0	0]	4]NS*	1.56 \pm 1.42]NS**	9]	2.11 \pm 0.93]NS**

Pretreatment EBV titers were measured in 35 cases.*chi-square test. **Mann-Whitney U test. ***Kruskal-Wallis test. NS, not significant. EBERs and BHLF were detected by *in situ* hybridization. LMP1, EBNA2, BZLF1 protein, p53 protein and bcl-2 protein were detected by immunohistochemistry.

癌 (undifferentiated carcinoma, WHO-3 と表記) の 3 型に分類した。WHO-1 は大小の胞巣を形成しつつ増殖する腫瘍細胞に角化傾向および細胞間橋という明瞭な扁平上皮への分化が認められるものであり、今回検討した 56 例中 5 例 (9%) であった (図 3)。WHO-2 は腫瘍細胞は勾配のある層形成や比較的大型の胞巣を形成し分化傾向は認めるものの、光顕的には扁平上皮としての分化の特徴は明らかではなく、WHO-1 に比し間質のリンパ球浸潤は強く、56 例中 32 例 (57%) であった (図 4)。WHO-3 は、個々の腫瘍細胞は円形ないし楕円形の核を有し腫瘍細胞間に複雑に存在する著明なリンパ球浸潤を伴うものである。腫瘍細胞が不規則ながらやや境界明瞭な巣状構造を形成し豊富なリンパ球性間質で境される従来のリンパ上皮腫の Regaud 型と呼ばれるものや、腫瘍細胞にほとんど相互接着傾向はなくびまん性にさらに著明なリンパ球を主体とした浸潤細胞と混在しつつ増殖する従来のリンパ上皮腫の Schmincke 型と呼ばれるもの、さらに腫瘍細胞の大部分が束状に増殖するような細胞で占められるいわゆる紡錘細胞癌 (spindle cell carcinoma) が含まれ、56 例中 17 例 (30%) であった (図 5)。上咽頭に発生する上皮性悪性腫瘍には扁平上皮癌の他に稀に腺癌も認められ、今回の検討では 56 例中 2 例 (4%) であった。

II. 各臨床背景因子との関連 (表 1)

1. 生体内局所ハイブリダイゼーション

1) EBERs

EBERs は腫瘍細胞の核に一致してみられ、ほぼすべての腫瘍細胞が陽性であったが、浸潤するリンパ球にはみられなかった (図 6)。EBERs は上咽頭原発巣 56 例中 46 例 (82%) で陽性であった。組織型別には WHO-1 は 5 例すべてが陰性であったが、WHO-2 は 32 例中 30 例 (94%) で、WHO-3 は 17 例中 16 例 (94%) で陽性であり、腺癌は 2 例とも陰性であった。WHO-1 と WHO-2 の間および WHO-1 と WHO-3 の間に有意差を認め ($p < 0.001$)、また WHO-2 と腺癌の間および WHO-3 と腺癌の間にも有意差を認めた ($p < 0.02$)。男女別には男性 42 例中 36 例 (86%)、女性 14 例中 10 例 (71%) であり、有意差はなかった。T 因子 A 分類では T3+T4 群で陽性例の多い傾向が、T 因子 B 分類では T4 群に陽性例が多い傾向があったが有意差はなかった。N 因子はリンパ節転移のない N0 群とリンパ節転移のある N1-3 群の 2 群に分けて検討した。N0 群と N1-3 群の陽性率はほぼ等しく有意差はなかった。M 因子においては、M1 群は全例 EBERs 陽性であったが有意差はなかった。血清抗 EBV 抗体価は 35 例において検索され、抗体価陽性例 26 例は全例

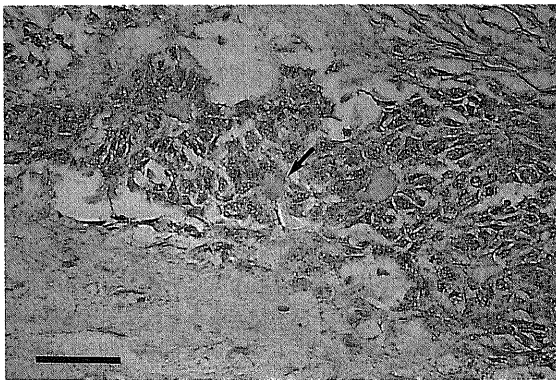


Fig. 7. Photomicrograph of *in situ* hybridization with BHLF1 oligonucleotides probe. Positive reaction is observed in only a few tumor cells (arrow). Scale bar indicates 50 μ m.

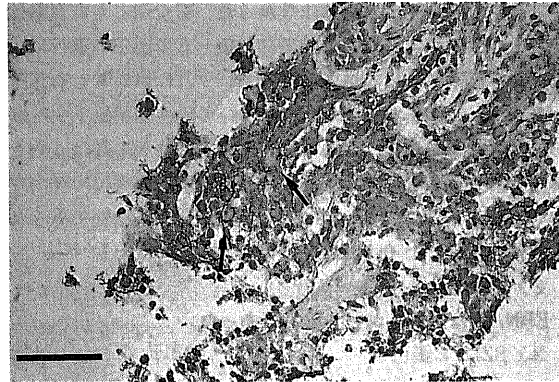


Fig. 9. Photomicrograph of immunohistochemical staining using anti-BZLF1 monoclonal antibody. Cytoplasmic staining is observed in tumor cells (arrows). Scale bar indicated 50 μ m.

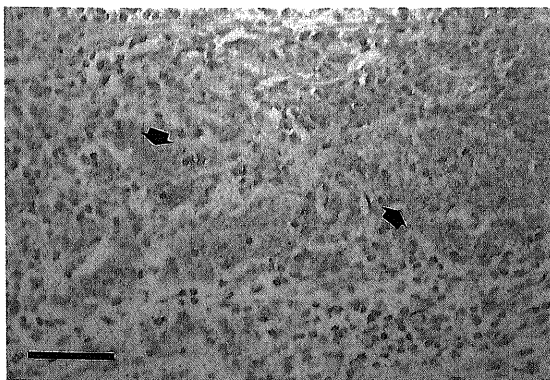


Fig. 8. Photomicrograph of immunohistochemical staining using anti-LMP1 monoclonal antibody. Cytoplasmic staining is observed in tumor cells (arrows). Scale bar indicates 50 μ m.

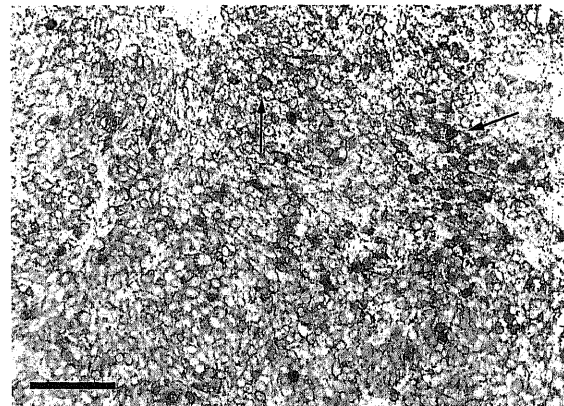


Fig. 12. Photomicrograph of double immunohistochemical staining for both p53 (purple) and bcl-2 (red). Double positive cells are observed (arrows). Scale bar indicates 100 μ m.

EBERs が陽性であったが、抗体価陰性例では 9 例中 2 例 (22%) のみが EBERs 陽性であり、EBERs の発現と抗体価の上昇に相関がみられた ($p < 0.001$).

2) BHLF

BHLF の発現は EBERs に比しきわめて弱くかつわずかに散在してみられるのみであった (図 7). 56 例中 6 例 (11%) において BHLF を陽性と判断した. 組織型別には WHO-1 では 5 例すべて陰性であり、WHO-2 では 32 例中 4 例 (13%) が、WHO-3 では 16 例中 2 例 (13%) が陽性であり、各組織型間に有意差はなかった. また抗体価陽性例 26 例中 4 例 (15%) が陽性で、抗体価陰性例は 9 例すべてが陰性であり、抗体価と BHLF の発現には相関はなかった. さらに抗体価を抗 VCA-IgA, 抗 EA-IgA とともに 40 倍以上の強陽性群とそれ以外の弱陽性群とに分けると、強陽性群では 12 例中 4 例 (33%), 弱陽性群では 14 例すべてが陰性であり、BHLF の発現はすべて強陽性群であったが有意差はなかった ($p = 0.08$).

2. 免疫組織化学染色

1) LMP1

LMP1 は一部の腫瘍細胞の細胞膜に認められた (図 8). 56 例中 17 例 (30%) が陽性であり、組織型別には WHO-1 では 5 例すべてが陰性であり、WHO-2 では 32 例中 9 例 (28%), WHO-3 では 17 例中 8 例 (47%) が陽性であり腺癌の 2 例はいずれも陰性であった. 組織型間に有意差はなかった. 男女間にも有意差はなかった. T 因子 A 分類, T 因子 B 分類とも T 因子の進行により陽性率が低下する傾向がみられたがいずれにおいても有意差はなかった. N 因子では N1-3 群において陽性率が低下する傾向がみられたが有意差はなかった. M 因子では M1 群は 4 例とも陰性であったが有意差はなかった. 抗体価陽性例では 26 例中 10 例 (38%) が陽性であり、抗体価陰性例は全例が陰性であったが有意差はなかった ($p = 0.07$).

2) EBNA2

EBNA2 は全例において陰性であった.

3) BZLF1 蛋白

BZLF1 蛋白は腫瘍の胞巣に一致して細胞質に認められた (図 9). またごく一部の細胞では核にも認められた. BZLF1 蛋白は 56 例中 18 例 (32%) で陽性であり、組織型別には WHO-1 では

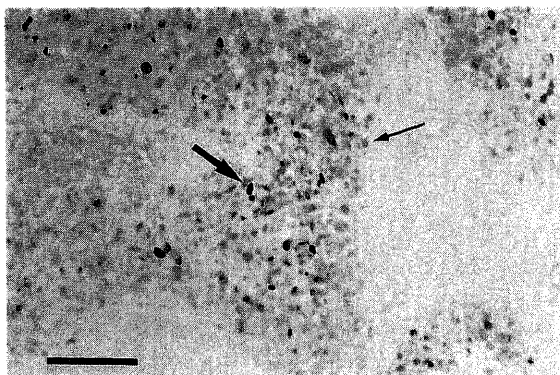


Fig. 10. Photomicrograph of immunohistochemical staining using anti-p53 monoclonal antibody. Both intensive nuclear accumulation (wide arrow) and weak nuclear accumulation (narrow arrow) are observed in tumor cells. Counterstain is not performed. Scale bar indicates 100 μm .

5 例すべてが陰性であり、WHO-2 では 32 例中 10 例 (31%), WHO-3 では 17 例中 8 例 (47%) が陽性であったが有意差はなかった. 男性では 42 例中 17 例 (40%), 女性では 14 例中 1 例 (7%) のみが陽性で有意差を認めた ($p < 0.05$). T 因子 A 分類, T 因子 B 分類いずれにおいても有意差はなかった. N 因子, M 因子においても有意差はなかった. 抗体価陽性例では 26 例中 11 例 (42%) が陽性であり、抗体価陰性例では 9 例すべてが陰性であったが有意差はなかった ($p = 0.05$).

4) p53 蛋白

p53 蛋白は核内に陽性シグナルが認められた (図 10). 胞巣全体が染色される例もあったが、胞巣内に陽性細胞が散在して、時に密集して島状に存在する例が多かった. また同一胞巣内においても濃く染色される細胞や淡く染色される細胞が存在したが、ともに陽性と判定した. p53 蛋白陽性例は 56 例中 31 例 (55%) で平均スコアは 1.55 であり、組織型別には WHO-1 では平均スコアが 1.00, 5 例中 1 例 (20%) が陽性、WHO-2 では平均スコアが 1.59, 32 例中 19 例 (59%) が陽性、WHO-3 では平均スコアが 1.82, 17 例中 11 例 (65%) が陽性であった. 腺癌の 2 例はいずれも陰性であり、扁平上皮癌で発現が減弱する傾向があったが平均スコア、陽性率とも各組織型間に有意差はなかった. 男女間に平均スコア、陽性率とも有意差はなかった. T 因子 A 分類, T 因子 B 分類とも各群間に平均スコア、陽性率とも有意差はなかった. N 因子において N0 群のスコアが高い傾向に、M 因子においては M1 群に発現が多い傾向がみられたが各群間に平均スコア、陽性率とも有意差はなかった. 抗体価陽性例の平均スコアは 1.50 で 27 例中 15 例 (58%) が陽性であり、抗体価陰性例の平均スコアは 1.56 で 9 例中 4 例 (44%) が陽性であり、平均スコア、陽性率とも有意差はなかった.

5) bcl-2 蛋白

bcl-2 蛋白は核外膜から細胞質にかけて染色された (図 11). 胞巣ごとに大きな島状に染色されることが多かった. 正常呼吸上皮の基底細胞層や浸潤リンパ球にもみられることもあった. bcl-2 蛋白の平均スコアは 1.70 で 56 例中 50 例 (89%) で陽性であった. 組織型別には WHO-1 では平均スコアが 1.80 で 5 例すべてが陽性で、WHO-2 では平均スコアが 1.75 で 32 例中 29 例 (91%) が陽性で、WHO-3 では平均スコアが 1.65 で 17 例中 14 例 (82%) が陽性であった. 腺癌は平均スコアが 1.00 で 2 例とも陽性であった. 各組織型間に平均スコア、陽性率とも有意差はな



Fig. 11. Photomicrograph of immunohistochemical staining using anti-bcl-2 monoclonal antibody. Cytoplasmic staining is observed in tumor cells (arrows). Counterstain is not performed. Scale bar indicates 100 μm .

かった。女性は14例すべてが陽性であったが、男女間に平均スコア、陽性率とも有意差はなかった。T因子A分類, T因子B分類, N因子, M因子のいずれにおいても、各群間に平均スコア、陽性率とも有意差はなかった。抗体価陽性例では平均スコアは1.57で26例中21例(81%)が陽性で、抗体価陰性例では平均スコアは2.11で9例すべてが陽性であり、抗体価陰性例でスコアが高い傾向にあったが平均スコア、陽性率とも有意差はなかった。

Ⅲ. 上咽頭原発巣と頸部転移リンパ節との比較

頸部リンパ節転移を認めたもののうち18例で検討が可能であ

り、うち16例は上咽頭原発巣もあわせて検討でき、残りの2例は頸部リンパ節のみ検討できた。そこで以下の検討はこの16例を対象とした(表2, 3)。上咽頭癌は初診時にすでに頸部リンパ節転移をきたしていることも多く、また原発巣の根治治療後に頸部リンパ節に再発することが多く、16例を両者に分類すると、未治療例9例、再発例は7例であった。組織型別にはWHO-1が1例、WHO-2が10例、WHO-3が5例であった。EBERsは16例中13例(81%)において陽性であり、WHO-1の1例は陰性であり、WHO-2は10例中9例(90%), WHO-3は5例中4例(80%)であった。また16例のうち、原発巣、頸部転移リ

Table 2. Expression of EBV genes and proteins, p53 protein and bcl-2 protein in primary nasopharyngeal carcinoma and metastatic cervical lymph nodes

Expression in		No. of cases					
Nasopharynx	Cervical LN	EBERs	BHLF	LMP1	BZLF1 protein	p53 protein	bcl-2 protein
+	+	13	0	1	1	7	11
-	+	0	1	3	1	4	2
+	-	0	1	6	3	0	3
-	-	3	14	6	11	5	0

LN, lymph nodes; +, positive; -, negative.

Table 3. Expression of EBV genes and proteins, p53 protein and bcl-2 protein in primary nasopharyngeal carcinoma and in metastatic cervical lymph nodes in untreated cases and in recurrent cases respectively

Cases	No. of cases	Location	No. of positive cases				p53 score (x̄±SD)	No. of p53 protein-positive cases	bcl-2 score (x̄±SD)	No. of bcl-2 protein-positive cases
			EBERs	BHLF	LMP1	BZLF1 protein				
Untreated	9	Cervical LN	7	0	1	0	1.56±1.33	5	2.22±0.97	8
		Nasopharynx	7]NS*	0]NS*	4]NS*	1]NS*	1.33±1.23]NS**	4]NS*	1.67±0.87]NS**	8]NS*
Recurrent	7	Cervical LN	6	1	3	2	2.43±0.79	6	1.43±1.27	5
		Nasopharynx	6]NS*	1]NS*	3]NS*	3]NS*	1.86±1.07]NS**	3]NS*	1.57±1.13]NS**	6]NS*

*chi-square test. **Mann-Whitney U test. LN, lymph nodes; NS, not significant.

Table 4. Correlation between EBV genes and proteins, p53 protein and bcl-2 protein expression in 56 primary nasopharyngeal carcinoma cases

Targets	No. of cases filling each condition					p53 score (x̄±SD)	bcl-2 score (x̄±SD)
	BHLF	LMP1	BZLF1 protein	p53 protein	bcl-2 protein		
EBERs	+	+ 6	+ 18	+ 29	+ 40	1.70±1.11	1.65±0.99
	+	- 40]NS*	- 28]NS*	- 17]NS*	- 6]NS*		
	-	+ 0	+ 0	+ 2	+ 10]NS*		
	-	- 10]NS*	- 10]NS*	- 8]NS*	- 0]NS*		
			p<0.05*	p<0.05*	p<0.05*		1.90±0.88]NS**
BHLF	+	+ 1	+ 3	+ 4	+ 4	1.67±1.37	1.00±0.89
	+	- 5]NS*	- 3]NS*	- 2]NS*	- 2]NS*		
	-	+ 16	+ 15	+ 27	+ 46]NS**		
	-	- 34]NS*	- 35]NS*	- 23]NS*	- 4]NS*		
					1.54±1.15]NS**	1.78±0.95]NS**	
LMP1	+	+ 6	+ 12	+ 16	+ 16	1.82±0.95	1.65±0.86
	+	- 11]NS*	- 5]NS*	- 1]NS*	- 1]NS*		
	-	+ 12	+ 19	+ 34	+ 46]NS**		
	-	- 27]NS*	- 20]NS*	- 5]NS*	- 5]NS*		
					1.44±1.23]NS**	1.72±1.03]NS**	
BZLF1 protein	+	+ 16	+ 16	+ 16	+ 16	2.39±0.70	2.00±1.09
	+	- 2]NS*	- 2]NS*	- 2]NS*	- 2]NS*		
	-	+ 15	+ 19	+ 34	+ 46]NS**		
	-	- 23]NS*	- 23]NS*	- 4]NS*	- 4]NS*		
			p<0.001*	p<0.001**	p<0.001**	1.55±0.89]NS**	

*chi-square test. **Mann-Whitney U test. +, positive; -, negative; NS, not significant.

リンパ節とも陽性であったものは13例、ともに陰性であったもの3例であり、原発巣と頸部リンパ節の間で異なる例はなかった。表に示すように、同一症例の上咽頭原発巣と頸部転移リンパ節での発現が、EBERs は完全に一致し、BHLF もほぼ一致したが、LMP1, BZLF1 蛋白, p53 蛋白, bcl-2 蛋白は一致しない例が各々9例, 4例, 4例, 5例みられた。これらを、未治療例と再発例にわけてみても同様の傾向であった。未治療例のLMP1 の発現および再発例での p53 蛋白の発現が原発巣と頸部転移リンパ節の間で異なる傾向にあったが有意差はなかった。

IV. EBV 遺伝子産物, p53 蛋白, および bcl-2 蛋白の発現の関連 (表4, 表5)

1. EBERs と BHLF

BHLF が陽性の6例はいずれも EBERs が陽性であった。両者の発現に相関はなかった。

2. EBERs と LMP1

LMP1 が陽性の17例はいずれも EBERs が陽性であった。わずかの差で両者の発現に相関はなかった ($p=0.05$)。

3. EBERs と BZLF1 蛋白

BZLF 蛋白1 が陽性の18例はいずれも EBERs が陽性であった。両者の発現に相関を認めた ($p<0.05$)。

4. EBERs と p53 蛋白

EBERs 陽性群の p53 蛋白平均スコアは1.70であり、陰性群は0.90であり、陽性群が有意に高かった ($p<0.05$)。定性的に検討しても両者の発現に相関を認めた ($p<0.05$)。

5. EBERs と bcl-2 蛋白

EBERs が陽性で bcl-2 蛋白も陽性の例が40例 (71%) を占め

た。EBERs 陽性群の bcl-2 平均スコアと陰性群の平均スコアに有意差はなかった。両者の発現にも相関はなかった。

6. BHLF と LMP1

両者の発現に相関はなかった。

7. BHLF と BZLF1 蛋白

両者の発現に相関はなかった。

8. BHLF と p53 蛋白

BHLF 陽性群と陰性群の p53 蛋白平均スコアに有意差はなかった。両者の発現に相関はなかった。

9. BHLF と bcl-2 蛋白

BHLF 陽性群と陰性群の bcl-2 蛋白平均スコアに有意差はなかった。両者の発現に相関はなかった。

10. LMP1 と BZLF1 蛋白

両者の発現に相関はなかった。

11. LMP1 と p53 蛋白

LMP1 陽性群と陰性群で p53 蛋白平均スコアに有意差はなかった。両者の発現にも相関はなかった。

12. LMP1 と bcl-2 蛋白

LMP1 陽性群の bcl-2 蛋白平均スコアは1.65であり、陰性群の平均スコアは1.72であり有意差はなかった。LMP1 陽性例17例中16例 (94%) が bcl-2 蛋白陽性であったが、LMP1 陰性例39例中 bcl-2 蛋白が陽性の例を34例 (87%) 認めた。両者の発現に相関はなかった。

13. BZLF1 蛋白と p53 蛋白

BZLF1 蛋白陽性群の p53 蛋白平均スコアは2.39であり、陰性群の平均スコア1.16に比べ有意に高値を示した ($p<0.001$)。両者とも陽性の例が16例 (29%)、両者とも陰性の例が23例

Table 5. Correlation between p53 protein and bcl-2 protein expression

Targets	No. of cases filling each condition		p53 score ($\bar{x} \pm SD$)	bc-2 score ($\bar{x} \pm SD$)
	p53 protein	bcl-2 protein		
p53 +		+ 28	1.60 \pm 1.14	1.84 \pm 0.97
+		- 3		
-		+ 22		
-		- 3		
				NS*
bcl-2 +	+ 28		1.17 \pm 1.33	1.52 \pm 0.96
+	- 22			
-	+ 3			
-	- 3			
				NS*

*chi-square test. **Mann-Whitney U test. +, positive; -, negative; NS, not significant.

Table 6. Distribution of both p53 protein and bcl-2 protein detection-positive cases in primary nasopharyngeal carcinoma and metastatic cervical lymph nodes

Histology	No. of both p53 protein and bcl-2 protein-positive cases									
	Type of expression in nasopharynx					Type of expression in cervical LN				
	a	b	c	d	e	a	b	c	d	e
WHO-1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
WHO-2	5	8	2	1	2	2	3	0	2	0
WHO-3	1	4	0	1	3	2	2	0	0	1
total	6	12	3	2	5	4	5	0	2	1

LN, lymph nodes.

(41%)であり、両者の発現に相関を認めた ($p < 0.001$).

14. BZLF1 蛋白と bcl-2 蛋白

BZLF1 蛋白陽性群と陰性群の bcl-2 蛋白平均スコアに有意差はなかった。両者の発現に相関はなかった。

15. p53 蛋白と bcl-2 蛋白

1) 両者の比較

p53 蛋白陽性群の bcl-2 蛋白平均スコアは1.84であり、陰性群の1.52に比し高い傾向があったが有意差はなかった。両者の発現に相関はなかった。一方 bcl-2 蛋白陽性群の p53 蛋白平均スコアは1.60であり陰性群の1.17より高い傾向があったが有意差はなかった。

2) 免疫二重染色 (図12)

p53 蛋白, bcl-2 蛋白とも陽性のものすなわち p53 蛋白スコアが2以上かつ bcl-2 蛋白スコアが1以上のものは上咽頭原発巣では28例, 頸部リンパ節では12例であった。先に述べた, 染色範囲による著者の分類方法に従うと, 上咽頭原発巣においては分類 a) が6例 (21%), 分類 b) が12例 (43%), 分類 c) が3例 (11%), 分類 d) が2例 (7%), 分類 e) が5例 (18%) であり, 一方頸部リンパ節においては分類 a) が4例 (33%), 分類

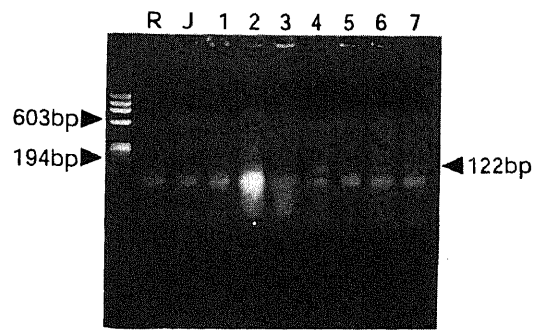


Fig.13. Analysis of EBV DNA obtained from cervical lymph node metastases of nasopharyngeal carcinoma using PCR and electrophoresis. The lanes are as follows: R, Raji cell (positive control); J, Jurkat cell (negative control); 1, WHO-1 (case No. 1 in Table 7); 2, WHO-2 (case No. 2 in Table 7); 3-5, WHO-2 (case No. 11, 4 and 5 in Table 7); 6 and 7, WHO-3 (case No. 12 and 13 in Table 7). PCR product was not detected in numbers 1-3. ϕ X174/HaeIII was used as DNA size marker. Samples were loaded on 2% agarose gel.

Table 7. Detection of β -globin and EBV-DNA in metastatic cervical lymph nodes and comparison with expression of EBERS

Cases No.	Histology	Detection of		
		β -globin	EBV-DNA	EBERS
1	WHO-1	+	-	-
2	WHO-2	+	-	-
3	WHO-2	+	+	+
4	WHO-2	+	+	+
5	WHO-2	+	+	+
6	WHO-2	+	+	+
7	WHO-2	+	+	+
8	WHO-2	+	+	+
9	WHO-2	+	+	+
10	WHO-2	+	+	+
11	WHO-2	+	-	+
12	WHO-3	+	+	+
13	WHO-3	+	+	+
14	WHO-3	+	-	+

β -globin and EBV-DNA were detected by PCR. EBERS was detected by *in situ* hybridization. +, detected; -, not detected.



Fig.14. Analysis of EBV DNA obtained from primary nasopharyngeal carcinoma using PCR and electrophoresis. The lanes are as follows: R, Raji cell (positive control); J, Jurkat cell (negative control); 1, random selected one case of WHO-1 which did not show EBERS; 2, random selected one case of WHO-2 which did not show EBERS; 3 and 4, random selected two cases of WHO-2 which showed EBERS; 5-7, random selected three cases of WHO-3 which showed EBERS; 8, random selected one case of adenocarcinoma which did not show EBERS. PCR product was not detected in numbers 1, 2 and 8. ϕ X174/HaeIII was used as DNA size marker. Samples were loaded on 2% agarose gel.

Table 8. Detection of EBV-DNA in primary nasopharyngeal carcinoma and comparison with expression of EBERS

Histology	No. of cases	No. of cases			
		EBV-DNA(+), EBERS(+)	EBV-DNA(+), EBERS(-)	EBV-DNA(-), EBERS(+)	EBV-DNA(-), EBERS(-)
WHO-1	3	0	0	0	3
WHO-2	24	21	1	1	1
WHO-3	13	13	0	0	0
Adenocarcinoma	2	0	0	0	2

β -globin positive cases are listed. EBV-DNA was detected by PCR. EBERS was detected by *in situ* hybridization. (+), positive; (-), negative

b) が5例(42%), 分類c) がなく, 分類d) が2例(17%), 分類e) が1例(8%)であった(表6). 分類a) と分類b) の両者が上咽頭原発巣では64%, 頸部リンパ節では75%と多くを占めた.

V. パラフィン包埋組織からの EBV-DNA の検出

1. 頸部リンパ節からの EBV-DNA の検出(表7)

頸部リンパ節からの DNA の抽出は14例において施行した. 組織型別には WHO-1 が1例, WHO-2 が10例, WHO-3 が3例であった. β -グロビン DNA の PCR 反応終了後の電気泳動像では, 全例において β -グロビン DNA の増幅を示す 262bp の DNA 断片が検出された. また, EBV-DNA の PCR 反応終了後の電気泳動像では WHO-1 の1例および WHO-2 の2例を除く11例において EBV-DNA の増幅を示す 122bp の DNA 断片が検出された(図13レーン4~7). PCR による EBV-DNA の検出の結果を ISH による EBERs の検出の結果と比較してみると, PCR により EBV-DNA の検出された11例はいずれも EBERs が陽性であった. PCR により EBV-DNA の検出されなかった3例のうち, WHO-2 の2例中1例は EBERs も陰性であった(図13レーン2)が他の1例は EBERs が陽性であり(図13レーン3), また WHO-1 の1例は EBERs が陰性であった(図13レーン1).

2. 上咽頭原発巣からの EBV-DNA の検出(表8)

上咽頭原発巣からの DNA の抽出は49例において施行した. β -グロビン DNA の PCR 反応終了後の電気泳動像では, WHO-1 の3例, WHO-2 の24例, WHO-3 の13例および腺癌の2例の42例において β -グロビン DNA の増幅を示す 262bp の DNA 断片が検出された. そこで以下の検討は β -グロビンを検出できた42例を対象とした. EBV-DNA の PCR 反応終了後の電気泳動像では, WHO-2 においては24例中22例に, WHO-3 は13例全例に EBV-DNA の増幅を示す 122bp の DNA 断片が検出された(図14レーン3~7). WHO-1 の3例, WHO-2 の2例および腺癌の2例においては EBV-DNA の増幅を示す 122bp の DNA 断片は検出されなかった. PCR による EBV-DNA の検出の結果を ISH による EBERs の検出の結果と比較してみると, PCR により EBV-DNA の検出された35例中, WHO-2 の1例は EBERs は陰性であった(図14レーン2)が, 他の34例は EBERs も陽性であった. PCR により EBV-DNA の検出されなかった7例のうち, WHO-1 の3例(図14レーン1), 腺癌の2例(図14レーン8)および WHO-2 の1例(図14レーン2)は EBERs も陰性であったが, WHO-2 の1例においては EBERs が陽性であった. すなわちこの42例中 EBV-DNA, EBERs とも陽性であったものは34例(81%), 陰性であったものは6例(14%)であり, EBV-DNA の検出と EBERs の発現には相関が認められた ($p < 0.001$).

考 察

上咽頭癌は本邦においては頭頸部悪性腫瘍の中で比較的頻度は少ないが, 疫学的には中国南部, シンガポールに好発する. 本邦では年間人口10万人あたり約0.2人の発症をみるのみであるが, 中国南部においては人口10万人あたり20人を超す発症がみられる. これは, ある特定の組織適合抗原(human leukocyte antigen, HLA) A2 や, 中国人の習慣的食物である塩漬け魚に含まれるニトロサミンなど人種的, 環境的因子の関与が考えられている. 組織学的に未分化なものが多く, Regaud²¹⁾と

Schmincke²²⁾ がそれぞれに, 上咽頭に発生した豊富なリンパ球浸潤を伴う未分化な腫瘍をリンパ上皮腫と記載して以来リンパ上皮腫と呼ばれていたが, 超微形態学的, 免疫組織学的研究^{23,24)}により腫瘍は上皮性であり浸潤リンパ球は反応性のものであることが判明し, 現在ではリンパ上皮腫の名称は表記されていない. EBV と上咽頭癌の関連は, 上咽頭癌患者において VCA, EA に対する IgG および IgA 抗体価の上昇を認めること^{25)~28)}より血清免疫学的に明確となった. また上咽頭癌組織内での EBV-DNA^{29,30)}や EBNA³¹⁾の検出, さらに, 上咽頭癌組織における EBV の単クローン性の証明³²⁾により, 上咽頭癌が1個の EBV 感染細胞から発生したことが明確となった. その後も分子生物学的手法の発達に伴い, PCR 法を利用してより鋭敏に上咽頭癌組織中の EBV-DNA を検出することが可能となった^{33)~35)}. 分子生物学的に証明された EBV-DNA の腫瘍細胞核内への局在は, EBV 中に7~12個繰り返して存在する BamHI-W 領域を標的とした ISH より認められており^{33,36,37)}, 病理組織学的にも EBV と上咽頭癌の関連が証明されるに至った.

EBERs は EBV がコードするポリA鎖のない短い RNA で, EBER-1 と EBER-2 の2種類あり, それぞれ166および172ヌクレオチドからなる. 両者とも潜伏感染細胞において1細胞当たり 10^7 個と大量に産生されているが, 蛋白をコードせずその機能は未だ定かではない. また, 潜伏感染細胞では核内蛋白と結合して存在しているため RNA 分解酵素の作用を受けにくく安定である. この豊富な発現と安定性ゆえ, EBERs に対するプローブを用いた ISH によりパラフィン切片においても安定して高感度に EBV を検出できる. そのため最近では, EBERs が組織中の EBV の同定のための最も鋭敏な指標としてとらえられている^{38)~42)}. このような種々の方法により, WHO-2 および WHO-3 における EBV の関与は明白となったが, WHO-1 に関しては統一した見解が得られていない. Raab-Traub ら³⁹⁾はサザンブロット法により WHO-2 や WHO-3 に比べてコピー数はきわめて低いものの WHO-1 の全例で EBV-DNA が検出されたと報告しており, PCR 法により Chang ら³⁹⁾は4例中2例, Walter ら³⁹⁾は2例中1例, Akao ら³⁹⁾は7例中5例に EBV-DNA を検出している. Wu ら³⁹⁾は ISH により1例中1例に EBERs を認めている. 一方, Niedobitek ら³⁷⁾は ISH により8例すべてが EBV-DNA が陰性であること, 別に⁴³⁾ ISH により9例すべてが EBERs が陰性であること, Dictor ら⁴⁴⁾も検討した2例がいずれも EBERs 陰性であることを報告している. 今回の研究では, ISH により WHO-1 において EBERs が検出されず, さらに PCR にても EBV-DNA を検出しなかった. 一方 WHO-2 および WHO-3 では ISH による EBERs の検出, PCR による EBV-DNA の検出はいずれもきわめて高率であった. WHO-2 と WHO-3 でのきわめて高い関連を確認したとともに, WHO-1 での EBV の関与は否定的と考えられ, WHO-1 と WHO-2 および WHO-3 の発癌原因は異なるものと考えられた. ケラチノサイト株への LMP1 遺伝子のトランスフェクションにより, 分化が抑制され⁴⁵⁾, また紡錘細胞様の形態に変化する⁴⁶⁾ことは, EBV の感染, さらにいえば LMP1 の発現が分化度の低い腫瘍の発生に関与することを示唆している. また腺癌においては2例とも EBERs, EBV-DNA は陰性であり, EBV の関与は否定的と思われた.

正常ヒトBリンパ球に試験管内で EBV を感染させると, そ

の細胞は永久増殖化しリンパ芽球株 (lymphoblastoid cell line, LCL) が樹立される。LCL で発現が認められるものとしては EBERs の他に 6 種類の EBNA と 3 種類の LMP が同定されている。EBNA1 は他の EBNA と異なり、HLA-I 拘束性 EBV 特異的細胞障害性 T リンパ球 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) の標的抗原にはならず、潜伏 EBV ゲノムの維持に必要な蛋白である。EBNA2 は試験管内での B リンパ球の永久増殖化に最も中心的な役割を果たす蛋白であり、他の潜伏 EBV 遺伝子である LMP1, LMP2A, LMP2B などの遺伝子を活性化する。EBNA3 群の EBNA3A, -3B, -3C のうち EBNA3A, -3C は B リンパ球の永久増殖化に必要とされている。EBNA-LP (leader protein) も B リンパ球の永久増殖化に必要な蛋白で EBNA2 とともに EBV の B リンパ球への感染後最初に発現する。LMP1 は膜蛋白で、LMP1 遺伝子単独でラットの培養線維芽細胞株に腫瘍原性トランスフォーメーションを起こすことができる⁴⁶⁾。また、LMP1 が *bcl-2* 遺伝子をリンパ球内で活性化し、アポトーシスによる細胞死を抑制する⁴⁷⁾ことが知られており、B 細胞の腫瘍化に重要な意義を有している。LMP2A, LMP2B のうち LMP2A は EBV 潜伏感染の維持に重要であると考えられている。これら EBERs と 9 種類の EBV 特異的蛋白は種々の EBV 関連腫瘍細胞によって発現が異なっており、EBV 特異的 CTL の標的とならない EBERs と EBNA1 のみがいずれの腫瘍細胞でも発現している。EBV 関連腫瘍は EBNA と膜蛋白の発現様式により 3 つのクラス (I 型, II 型, III 型と表記) に分類される。I 型はバーキットリンパ腫に代表され、EBERs と EBNA1 のみが検出される。III 型は LCL や宿主の免疫不全により発症する日和見リンパ腫にみられすべての潜伏遺伝子を発現している。上咽頭癌はホジキン病や皮膚・鼻腔の末梢性 T リンパ腫と同様に II 型であることが知られており⁴⁸⁾、EBERs と EBNA1 の他に LMP1 や LMP2A, LMP2B が検出される。本研究において病理組織学的に潜伏感染に関与する EBV 遺伝子産物の発現と増殖サイクルの遺伝子産物の発現を調べたところ、LMP1 は約 1/3 の例で陽性であったが、EBNA2 は全例で陰性であり、II 型であることが確認された。潜伏感染からウイルス増殖サイクルへのスイッチは BZLF1 蛋白が担っている。BZLF1 蛋白は増殖サイクルの前初期遺伝子産物であり、びまん型早期抗原 (diffuse early antigen, EA-D) をコードする BHLF1 や限局型早期抗原 (restricted early antigen, EA-R) をコードする BHRF1 などの初期遺伝子、さらに VCA をコードする BcLF1 や EBV の主要エンベロープである糖蛋白 350/220 をコードする BLLF1 などの後期遺伝子を活性化する作用を持つ。本研究では BHLF1 の発現が BZLF1 蛋白に依存していないこと、BHLF1 を発現する細胞が EBERs を発現する細胞に比しきわめて少数であることから、増殖サイクルにある細胞はほとんどなく、スイッチ蛋白が発現されてもその後の初期遺伝子の活性化が生じないこと、すなわち BZLF1 蛋白の不活性化が示唆された。しかし血清学的には、増殖サイクルの遺伝子産物である VCA や EA に対する抗体価が上昇おり、散在してみられた BHLF1 陽性細胞に由来するものと思われた。しかしながら Brousset ら⁴⁹⁾は BHLF1 を検出しておらず、検出限界以下のレベルで BHLF1 などの初期・後期遺伝子が発現している可能性が考えられる。Niedobitek ら⁵⁰⁾、Sam⁴²⁾は BZLF1 蛋白は検出されないと報告しているが、抗 BZLF1 蛋白抗体価の上昇を認める別の報告⁵¹⁾が BZLF1 蛋白の発現を示唆しており、

VCA 抗体価や EA 抗体価の上昇をもたらす増殖サイクルの細胞に由来すると説明されている。しかし本研究で示唆されるように BZLF1 蛋白を発現する増殖サイクルには移行しない細胞由来であることも別の可能性として考えられる。ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus; HIV) 感染患者に生ずる舌の毛髪状白斑症 (oral hairy leukoplakia; OHL) では EBV-DNA の複製と BZLF1 mRNA が検出されており、LMP1 mRNA も検出される一方 EBERs は検出されておらず、生体内 (*in vivo*) において増殖サイクルでは EBERs は必発ではない⁵²⁾。Becker らは⁵³⁾OHL では、舌粘膜の有棘層上層においては BZLF1 蛋白を核内に認め、さらに前初期遺伝子産物 BRLF1, 初期遺伝子産物 BHRF1, BMLF1, 後期遺伝子産物 BcLF1 も核内に認められるが、基底層においては BZLF1 蛋白が細胞質に認められたこと、HIV 未感染者の舌では基底層において BZLF1 蛋白を細胞質に認めるが BRLF1, BMLF1, BcLF1 は認めないことを報告している。彼らは、BZLF1 蛋白の活性化には核での局在が必須であり、そのためには細胞側の蛋白が必要とされる可能性、細胞質から核に移行して活性化される可能性を示唆している。また Cochet ら⁵⁴⁾は BZLF1 遺伝子の転写の過程で完全にスプライシングされたもの、スプライシングが不完全なもの、スプライシングを受けていないものが存在することを示し、不完全なものの中には核内局在や DNA 結合などの主たる機能を有さないものがある可能性も示唆している。本研究では BZLF1 蛋白の発現はわずかな細胞では核内にみられたものの大部分は細胞質に認められ、核内への移動の不可能な、不完全なスプライシングによる蛋白を同定している可能性を示唆している。Zhang ら⁵⁵⁾は、BZLF1 蛋白と p53 蛋白が複合体形成により試験管内でも生体内でも直接的に相互作用することを示し、野生型 p53 蛋白の発現は BZLF1 蛋白による EBV 潜伏感染から増殖サイクルへの移行を抑制すること、BZLF1 蛋白が p53 蛋白依存性の転写活性化を抑制することを示している。この直接的相互作用が、潜伏感染から増殖サイクルへの移行の調節に大きく関与していることを示唆している。

細胞が発癌に至るには、癌関連遺伝子の変異を伴うとされており、これには癌遺伝子の活性化と癌抑制遺伝子の不活性化が考えられている。p53 遺伝子は 17 番染色体短腕上にある癌抑制遺伝子で、種々の悪性腫瘍においてその変異が認められており、また変異遺伝子産物 (変異型 p53 蛋白) が正常遺伝子産物 (野生型 p53 蛋白) に比べて安定していることを利用して免疫組織学的にこれを同定する試みが数多くされてきた⁵⁶⁾。p53 蛋白の不活性化をもたらすのは変異型 p53 蛋白のみではなく、SV40 ラージ T 抗原、アデノウイルス E1B 蛋白やヒト乳頭腫ウイルス (human papilloma virus) E6 蛋白などのある種のウイルス蛋白あるいは細胞蛋白である MDM2 遺伝子産物と複合体を形成した野生型 p53 蛋白も不活性化されている⁵⁷⁾。ウイルス蛋白でも SV40 ラージ T 抗原、E1B 蛋白は複合体形成による安定化が p53 蛋白の機能を低下させるが、E6 蛋白は p53 蛋白の崩壊を進めて機能を低下させる⁵⁸⁾。本研究での病理組織学的検討では、上咽頭癌における p53 蛋白の発現は 55% であり、Niedobitek ら⁴⁹⁾、Porter ら⁵⁹⁾とはほぼ同様の結果であった。一方上咽頭癌生検組織における p53 遺伝子の変異については、Effert ら⁶⁰⁾は原発部位 18 例では全てみられず頸部転移リンパ節 15 例中 2 例でエクソン 5 もしくはエクソン 6 でのミスセンス変異を、Spruck III ら⁶¹⁾は 15 例全てにみられず、Sun ら⁶²⁾は 22 例中 1 例でエクソン

8でのミスセンス変異を, Nasrin ら⁶³⁾は25例中1例でエクソン7でのミスセンス変異を認めているが, いずれも上咽頭癌における *p53* 遺伝子の変異の頻度はきわめて低いと結論している. このように上咽頭癌における *p53* 遺伝子の変異がきわめて稀であることを考慮すると, 本研究でみられた *p53* 蛋白の発現は, 野生型 *p53* 蛋白が不活化して発現されていると考えることができる. Niedobitek ら⁶⁴⁾は EBV と *p53* 蛋白の発現には相関はないとしているのに対し, 今回の研究では, EBERs の発現と *p53* 蛋白の発現に相関がみられたこと, EBERs 陽性群の *p53* 蛋白スコアが EBERs 陰性群のスコアよりも高値を示したことから, *p53* 蛋白の発現は EBV の存在に関連していること, すなわち, 上咽頭癌における *p53* 蛋白の発現は *p53* 遺伝子変異によるものではなく, EBV 感染による野生型 *p53* 蛋白の不活化によるものと推測できる. 更には *p53* 蛋白と BZLF1 蛋白の発現に強い相関がみられたこと, BZLF1 蛋白陽性群の *p53* スコアが BZLF1 蛋白陰性群に比し著明な高値を示したことは, BZLF1 蛋白が野生型 *p53* 蛋白の不活化に関与している可能性を示唆する. これは Zhang らが示したような *p53* 蛋白と BZLF1 蛋白の相互作用を裏付けるものであるが, 先に述べたように, *p53* 蛋白は核内に発現がみられたが, BZLF1 蛋白の発現は核内ではわずかの細胞のみで多くは細胞質にみられたことは, Zhang らが示した直接的な作用のほか間接的な相互作用の存在を示唆するものである. レチン酸受容体⁶⁵⁾や核因子 κ B⁶⁶⁾が BZLF1 蛋白との相互作用により BZLF1 蛋白の機能を低下させるとの報告もあり, このような細胞蛋白や, あるいは機能が未知の EBV 由来のウイルス蛋白に, *p53* 蛋白と BZLF1 蛋白の間接的相互作用の補助因子としての可能性が考えられる.

bcl-2 蛋白はミトコンドリア内膜蛋白でアポトーシスを抑制することにより, B細胞の生存に有利に働く作用を持つ⁶⁷⁾. *bcl-2* 蛋白は当初 t (14; 18) 転座のある濾胞性悪性リンパ腫に特異的に発現するといわれていた⁶⁸⁾が, その後転座のないものでの発現やびまん性悪性リンパ腫での発現が報告され^{69,70)}, 現在ではリンパ球系腫瘍に限らず, 大腸癌⁷¹⁾, 肺癌⁷²⁾, 皮膚癌⁷³⁾などでもその発現が報告されている. 試験管内においては, LMP1 遺伝子が *bcl-2* 遺伝子の発現を高めアポトーシスを回避する⁴⁶⁾ことが知られており, EBV 関連腫瘍における *bcl-2* 蛋白の関与が注目されている. 病理組織学的には潜伏感染Ⅱ型を示すリンパ球増殖性疾患であるホジキン病での報告が多い. Armstrong ら⁷⁴⁾, Khan ら⁷⁵⁾, Jiwa ら⁷⁶⁾はいずれも, ホジキン病における *bcl-2* 蛋白の発現は LMP の発現に依存しないと結論している. 上咽頭癌においては, Lu ら⁷⁷⁾が *bcl-2* 蛋白の発現が未分化癌の原発巣22例中18例, 頸部転移リンパ節で23例中18例でみられると報告している. さらにこれら45例のなかで EBV-DNA が陽性のもの37例中30例, 陰性のもの8例中6例で *bcl-2* 蛋白の発現がみられ, また LMP を評価しえた29例のなかで LMP 陽性例9例中6例, 陰性例20例中17例に *bcl-2* 蛋白の発現がみられることから, *bcl-2* 蛋白の発現は LMP に依存しないとされている. 本研究でも, *bcl-2* 蛋白は WHO の組織型を問わず, また腺癌にも発現がみられ, その発現率は89%ときわめて高いとはいえ, LMP1 の発現との相関はなく, 平均スコアも LMP1 陽性群と陰性群ではほぼ同値であり, *bcl-2* 蛋白の発現は LMP に依存しないことが判明した.

bcl-2 蛋白はアポトーシスを抑制する働きをもち, 野生型

p53 蛋白はアポトーシスを誘導する働きをもつ. 前者は癌遺伝子産物, 後者は癌抑制遺伝子産物として考えられており, ともに発癌に関して重要な意義をもつ. Wang ら⁷⁸⁾は, T細胞リンパ腫細胞株に温度感受性 *p53* 遺伝子をトランスフェクションし野生型を発現させてアポトーシスを誘発する際に, *bcl-2* 遺伝子も同時にトランスフェクションするとアポトーシスが抑制されることを報告した. 免疫組織化学的には, 神経膠腫では *bcl-2* 蛋白の発現は変異型 *p53* 蛋白を発現したものよりも野生型 *p53* 蛋白を発現したもののほうが有意に高い⁷⁹⁾ことが示されており, このように *bcl-2* 蛋白と不活化した野生型 *p53* 蛋白の関連が示唆される. 本研究では, *p53* 蛋白と *bcl-2* 蛋白の発現に相関はみられず直接の相互作用のないことが示唆されたが, 両者とも陽性であった症例は50%であり, 不活化した野生型 *p53* 蛋白と *bcl-2* 蛋白を同時に発現しているものと思われた. さらに, 免疫二重染色の結果は, 上咽頭原発巣では64%, 頸部転移リンパ節の75%が著者の分類の a 型もしくは b 型に相当し, また染色される細胞の割合も *bcl-2* 蛋白陽性のものが圧倒的に多く, 癌の多段階発癌モデルとして捉えるなら, *bcl-2* 蛋白の過剰発現がおり, EBV の感染等による野生型 *p53* 蛋白の不活性化をはじめとする細胞側の異常が生じるものと予想される.

本研究では病理組織学的に, EBV 遺伝子産物, 試験管内で EBV と関連のある癌遺伝子産物 *bcl-2* 蛋白, ヒトの種々の癌で変異・不活性化が示されている癌抑制遺伝子産物 *p53* 蛋白の発現と相互関係について検討した. 発癌のメカニズムはこのよう数種のもので規定しえない複雑なものであるが, これら数種のものの上咽頭癌への関与について提示した. 上咽頭癌と EBV の関連が示唆されて約30年経過したが, 上咽頭癌は試験管内モデルの作成が難しく, EBV がどのように発癌に関与しているか未だ十分な結果は得られていない. 当教室で樹立した EBV ゲノム保有上皮細胞株 NPC-KT を用いて, 本研究での病理組織学的検討の結果を分子生物学的に解明していく必要がある.

結 論

上咽頭癌症例の原発巣56例, 頸部転移リンパ節18例において, 免疫組織化学的に EBV 遺伝子産物, *p53* 蛋白, *bcl-2* 蛋白の検出を行い, また PCR 法により EBV-DNA の検出を行い, 以下の結論を得た.

- EBERs 陽性例は, 56例中46例 (82%) に認めた. 組織別には WHO 分類の 2 型 (分化型非角化癌) では32例中30例 (94%), 3 型 (未分化癌) では17例中16例 (94%) に陽性であったが, 1 型 (扁平上皮癌) では5例すべてが陰性であり, 1 型における EBV の関与は否定的と考えられた.
- EBV-DNA は, 検討した42例中35例 (83%) で検出された. EBERs と同様に WHO 分類 1 型の 3 例では検出されなかった. EBERs の検出と, EBV-DNA の検出はともに EBV を同定するための鋭敏な指標であることが示唆された.
- EBV は潜伏感染状態にあり, LMP1 の発現が56例中17例 (30%), EBNA2 の発現がみられないことから潜伏感染様式Ⅱ型であることが示された. BZLF1 蛋白陽性例は55例中18例 (32%) に認めたが, BHLF の発現は56例中6例 (11%) で散在してみられるのみであった. BHLF の発現が検出感度以下の可能性もあるが, BZLF1 蛋白の潜伏感染から増殖サイクルへのス

イッチ機能が不活化し、増殖サイクルには移行していないことが示唆された。

4. p53 蛋白陽性例は56例中31例 (55%) に認めたが EBERs の発現と相関しており ($p < 0.05$), p53 蛋白の発現における EBV の関与が示唆された。特に, BZLF1 蛋白の発現との間に強い相関を認め ($p < 0.001$), 相互作用によって, BZLF1 蛋白による野生型 p53 蛋白の不活性化, p53 蛋白による BZLF1 蛋白の不活性化が生じているものと推測された。

5. bcl-2 蛋白陽性例は56例中50例 (89%) に認めたが, bcl-2 蛋白の発現は EBERs の発現および LMP1 との発現と相関がなく, EBV 感染に依存するものではないと考えられた。

6. 臨床背景因子として, EBV 抗体価と EBERs の発現に強い相関をみた ($p < 0.001$). EBERs の検出が EBV 同定のきわめて鋭敏な方法であることから, EBV 抗体価の測定は臨床的にスクリーニングへの利用など有意義であると思われた。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を賜りました恩師古川 侃教授に深甚なる謝意を表するとともに, 終始, 直接御指導, 御協力を賜りました耳鼻咽喉科学助手吉崎智一博士に深謝いたします。また, 貴重な御助言, 御協力を賜りました全南大学校医科大学 (韓国) 病理学教室 Chang-Soo Park 博士に感謝いたします。最後に本研究の遂行に際し御協力を頂きました耳鼻咽喉科学教室の皆様にも厚く御礼申し上げます。

本論文の一部は第96回日本耳鼻咽喉科学会総会 (1995, 千葉) において発表した。

文 献

- 1) Epstein, M. A., Achong, B. G. & Barr, Y. M.: Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet*, 1, 702-703 (1964).
- 2) Old, L. J., Boyse, E. A., Oettgen, H. F., de Harven, E., Geering, G., Williamson, B. & Clifford, P.: Precipitating antibody in human serum to an antigen present in cultured Burkitt's lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 56, 1699-1704 (1966).
- 3) Raab-Traub, N., Flynn, K., Pearson, G., Huang, A., Levine, P., Lanier, A. & Pagano, J.: The differentiated form of nasopharyngeal carcinoma contains Epstein-Barr virus DNA. *Int. J. Cancer*, 39, 25-29 (1987).
- 4) Fahraeus, R., Fu, H. L., Ernberg, I., Finke, J., Rowe, M., Klein, G., Falk, K., Nilsson, E., Yadav, M., Busson, P., Tursz, T. & Kallin, B.: Expression of Epstein-Barr virus-encoded proteins in nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Cancer*, 42, 329-338 (1988).
- 5) Lung, M. L., Chan, K. H., Lam, W. P., Kou, S. K., Choy, D., Chan, C. W. & Ng, M. H.: In situ detection of Epstein-Barr virus markers in nasopharyngeal carcinoma patients. *Oncology*, 46, 310-317 (1989).
- 6) 中川士郎: 上咽頭癌頸部転移リンパ節の分子生物学的診断法に関する研究. 十全医会誌, 103, 265-275 (1994).
- 7) Lane, D. P. & Crawford, L. V.: T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, 278, 261-263 (1979).
- 8) Baker, S. J., Fearon, E. R., Nigro, J. M., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., van Tuinen, P.,

Ledbetter, D. H., Barker, D. F., Nakamura, Y., White, R. & Vogelstein, B.: Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*, 244, 217-221 (1989).

9) Tamura, G., Kihana, T., Nomura, K., Terada, M., Sugimura, T. & Hirohashi, S.: Detection of frequent p53 gene mutations in primary gastric cancer by cell sorting and polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism analysis. *Cancer Res.*, 51, 3056-3058 (1991).

10) Takahashi, T., Nau, M. M., Chiba, I., Birrer, M. J., Rosenberg, R. K., Vinocour, M., Levitt, M., Pass, H., Gazdar, A. F. & Minna, J. D.: p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science*, 246, 491-494 (1989).

11) Prosser, J., Thompson, A. M., Cranston, G. & Evans, H. J.: Evidence that p53 behaves as a tumour suppressor gene in sporadic breast tumours. *Oncogene*, 5, 1573-1579 (1990).

12) Lane, D. P.: p53, guardian of the genome. *Nature*, 358, 15-16 (1992).

13) Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E. & Croce, C. M.: Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*, 228, 1440-1443 (1985).

14) Shanmugaratnam, K.: *Histological Typing of Tumours of the Upper Respiratory Tract and Ear*, 2nd ed., p32-34, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest, 1991.

15) UICC: Pharynx. In P. Hermanek & L. H. Sobin (eds.), *TNM Classification of Malignant Tumours*, 4th ed., p19-22, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, 1987.

16) 角田玲子, 竹生田勝次, 西嶌 渡, 寺田寿美子, 砂倉瑞良, 加藤真吾: 上咽頭癌の治療成績と予後因子. 耳鼻頭頸, 67, 305-309 (1995).

17) Park, C. S., Manahan, L. J. & Brigati, D. J.: Automated molecular pathology: One hour in situ DNA hybridization. *J. Histotechnol.*, 16, 219-229 (1991).

18) Reed, J. A., Manahan, L. J., Park, C. S. & Brigati, D. J.: Complete one-hour immunocytochemistry based on capillary action. *Biotechniques*, 13, 434-443 (1992).

19) Iezzoni, J. C., Manahan, L. J., Park, C. S. & Brigati, D. J.: Recent advances in automated immunocytochemistry. *J. Histotechnol.*, 16, 39-50 (1993).

20) 森下和男: 上咽頭癌と Epstein-Barr virus (EBV) との病因論的関連性について. 耳鼻臨床, 74, 2783-2805 (1981).

21) Regaud, C. & Rreverchon, L.: Sur un cas d'epithelioma epidermoide developpe dans les massif maxillaire superieur. *Rev. Laryngol. Otol. Rhinol. (Bord)*, 42, 369-378 (1921).

22) Schmincke, A.: Uber lympho-epitheliale geschwulste. *Beitr. Pathol. Anat. Allg. Pathol.*, 68, 161-170 (1921).

23) Madri, J. A. & Barwick, K. W.: An immunohistochemical study of nasopharyngeal neoplasms using keratin antibodies. *Am. J. Surg. Pathol.*, 6, 143-149 (1982).

- 24) Taxy, J. B., Hidvegi, D. F. & Battifora, H.: Nasopharyngeal carcinoma: Antikeratin immunohistochemistry and electron microscopy. *Am. J. Clin. Pathol.*, **83**, 320-325 (1985).
- 25) Henle, W., Henle, G., Ho, J. H. C., Burtin, P., Cachin, Y., Clifford, P., de Schryver, A., de-The, G., Diehl, V. & Klein, G.: Antibodies to Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma, other head and neck neoplasms and control groups. *J. Nat. Cancer Inst.*, **44**, 225-231 (1970).
- 26) Henle, W., Henle, G., Zajac, B. A., Pearson, G., Waubke, R. & Scriba, M.: Differential reactivity of human serums with early antigens induced by Epstein-Barr virus. *Science*, **169**, 188-190 (1970).
- 27) Wara, W. M., Wara, D. W., Phillips, T. L. & Ammann, A. J.: Elevated IgA in carcinoma of the nasopharynx. *Cancer*, **35**, 1313-1315 (1975).
- 28) Henle, G. & Henle, W.: Epstein-Barr virus-specific IgA serum antibodies as an outstanding feature of nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Cancer*, **17**, 1-7 (1976).
- 29) zur Hausen, H., Schulte-Holthausen, H., Klein, G., Henle, W., Henle, G., Clifford, P. & Santesson, L.: EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature*, **228**, 1056-1058 (1970).
- 30) Nonoyama, M., Huang, C. H., Pagano, J. S., Klein, G. & Singh, S.: DNA of Epstein-Barr virus detected in tissue of Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 3265-3268 (1973).
- 31) Huang, D. P., Ho, J. H.C., Henle, W. & Henle, G.: Demonstration of Epstein-Barr virus-associated nuclear antigen in nasopharyngeal carcinoma cells from fresh biopsies. *Int. J. Cancer*, **14**, 580-588 (1974).
- 32) Raab-Traub, N. & Flynn, K.: The structure of the termini of the Epstein-Barr virus as a marker of clonal cellular proliferation. *Cell*, **47**, 883-889 (1986).
- 33) Chang, Y. S., Tyan, Y. S., Liu, S. T., Tsai, M. S. & Pao, C. C.: Detection of Epstein-Barr virus DNA sequences in nasopharyngeal carcinoma cells by enzymatic DNA amplification. *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 2398-2402 (1990).
- 34) Akao, I., Sato, Y., Mukai, K., Uhara, H., Furuya, S., Hoshikawa, T., Shimosato, Y. & Takeyama, I.: Detection of Epstein-Barr virus DNA in formalin-fixed paraffin-embedded tissue of nasopharyngeal carcinoma using polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Laryngoscope*, **101**, 279-283 (1991).
- 35) Walter, M. A., Menarguez-Palanca, J. & Peiper, S. C.: Epstein-Barr virus detection in neck metastases by polymerase chain reaction. *Laryngoscope*, **102**, 481-485 (1992).
- 36) Weiss, L. M., Movahed, L. A., Butler, A. E., Swanson, S. A., Frierson Jr, H. F., Cooper, P. H., Colby, T. V. & Mills, S. E.: Analysis of lymphoepithelioma and lymphoepithelioma-like carcinomas for Epstein-Barr viral genomes by in situ hybridization. *Am. J. Surg. Pathol.*, **13**, 625-631 (1989).
- 37) Niedobitek, G., Hansmann, M. L., Herbst, H., Young, L. S., Dienemann, D., Hartmann, C. A., Finn, T., Pitteroff, S., Welt, A., Anagnostopoulos, I., Friedrich, R., Lobeck, H., Sam, C. K., Araujo, I., Rickinson, A. B. & 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**, 17-24 (1991).
- 38) Howe, J. G. & Steitz, J. A.: Localization of Epstein-Barr virus-encoded small RNAs by in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 9006-9010 (1986).
- 39) Wu, T. C., Mann, R. B., Epstein, J. I., MacMahon, E., Lee, W. A., Charache, P., Hayward, S. D., Kurman, R. J., Hayward, G. S. & Ambinder, R. F.: Abundant expression of EBV1 small nuclear RNA in nasopharyngeal carcinoma. *Am. J. Pathol.*, **138**, 1461-1469 (1991).
- 40) Khan, G., Coates, P. J., Kangro, H. O. & Slavin, G.: Epstein Barr virus (EBV) encoded small RNAs: Targets for detection by in situ hybridisation with oligonucleotide probes. *J. Clin. Pathol.*, **45**, 616-620 (1992).
- 41) Dictor, M., Siven, M., Tennvall, J. & Rambeck, E.: Determination of nonendemic nasopharyngeal carcinoma by in situ hybridization for Epstein-Barr virus EBV1 RNA: Sensitivity and specificity in cervical node metastases. *Laryngoscope*, **105**, 407-412 (1995).
- 42) Sam, C. K., Brooks, L. A., Niedobitek, G., Young, L. S., Prasad, U. & Rickinson, A. B.: Analysis of Epstein-Barr virus infection in nasopharyngeal biopsies from a group at high risk of nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Cancer*, **53**, 957-962 (1993).
- 43) Niedobitek, G., Agathangelou, A., Barber, P., Smallman, L. A., Jones, E. L. & Young, L. S.: p53 overexpression and Epstein-Barr virus infection in undifferentiated and squamous cell nasopharyngeal carcinomas. *J. Pathol.*, **170**, 457-461 (1993).
- 44) Dawson, C. W., Rickinson, A. B. & Young, L. S.: Epstein-Barr virus latent membrane protein inhibits human epithelial cell differentiation. *Nature*, **344**, 777-780 (1990).
- 45) Fahraeus, R., Rymo, L., Rhim, J. S. & Klein, G.: Morphological transformation of human keratinocytes expressing the LMP gene of Epstein-Barr virus. *Nature*, **345**, 447-449 (1990).
- 46) Wang, D., Liebowitz, D. & Kieff, E.: An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell*, **43**, 831-840 (1985).
- 47) Henderson, S., Rowe, M., Gregory, C., Croom-Carter, D., Wang, F., Longnecker, R., Kieff, E. & Rickinson, A.: Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell*, **65**, 1107-1115 (1991).
- 48) Young, L. S., Dawson, C. W., Clark, D., Rupani, H., Busson, P., Tursz, T., Johnson, A. & Rickinson, A. B.: Epstein-Barr virus gene expression in nasopharyngeal carcinoma. *J. gen. Virol.*, **69**, 1051-1065 (1988).

- 49) Brousset, P., Butet, V., Chittal, S., Selves, J. & Delsol, G.: Comparison of in situ hybridization using different nonisotopic probes for detection of Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma and immunohistochemical correlation with anti-latent membrane protein antibody. *Lab. Invest.*, **67**, 457-464 (1992).
- 50) Niedobitek, G., Young, L. S., Sam, C. K., Brooks, L., Prasad, U. & Rickinson, A. B.: Expression of Epstein-Barr virus genes and of lymphocyte activation molecules in undifferentiated nasopharyngeal carcinomas. *Am. J. Pathol.*, **140**, 879-887 (1992).
- 51) Joab, I., Nicolas, J. C., Schwaab, G., de-The, G., Clause, B., Perricaudet, M. & Zeng, Y.: Detection of anti-Epstein-Barr-virus transactivator (ZEBRA) antibodies in sera from patients with nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Cancer*, **48**, 647-649 (1991).
- 52) Gilligan, K., Rajadurai, P., Resnick, L. & Raab-Traub, N.: Epstein-Barr virus small nuclear RNAs are not expressed in permissively infected cells in AIDS-associated leukoplakia. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87**, 8790-8794 (1990).
- 53) Becker, J., Leser, U., Marschall, M., Langford, A., Jilg, W., Gelderblom, H., Reichart, P. & Wolf, H.: Expression of proteins encoded by Epstein-Barr virus trans-activator genes depends on the differentiation of epithelial cells in oral hairy leukoplakia. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **88**, 8332-8336 (1991).
- 54) Cochet, C., Martel-Renoir, D., Grunewald, V., Bosq, J., Cochet, G., Schwaab, G., Bernaudin, J. F. & Joab, I.: Expression of the Epstein-Barr virus immediate early gene, BZLF1, in nasopharyngeal carcinoma tumor cells. *Virology*, **197**, 358-365 (1993).
- 55) Zhang, Q., Gutsch, D. & Kenney, S.: Functional and physical interaction between p53 and BZLF1: Implications for Epstein-Barr virus latency. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 1929-1938 (1994).
- 56) Porter, P. L., Gown, A. M., Kramp, S. G. & Coltrera, M. D.: Widespread p53 overexpression in human malignant tumors. *Am. J. Pathol.*, **140**, 145-153 (1992).
- 57) Chang, F., Syrjanen, S., Tervahauta, A. & Syrjanen, K.: Tumorigenesis associated with the p53 tumour suppressor gene. *Br. J. Cancer*, **68**, 653-661 (1993).
- 58) Werness, B. A., Levine, A. J. & Howley, P. M.: Association of human papilloma virus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*, **248**, 76-79 (1990).
- 59) Porter, M. J., Field, J. K., Lee, J. C. K., Leung, S. F., Lo, D. & van Hasselt, C. A.: Detection of the tumour suppressor gene p53 in nasopharyngeal carcinoma in Hong Kong Chinese. *Anticancer Res.*, **14**, 1357-1360 (1994).
- 60) Effert, P., McCoy, R., Abdel-Hamid, M., Flynn, K., Zhang, Q., Busson, P., Tursz, T., Liu, E. & Raab-Traub, N.: Alterations of the p53 gene in nasopharyngeal carcinoma. *J. Virol.*, **66**, 3768-3775 (1992).
- 61) Spruck II, C. H., Tsai, Y. C., Huang, D. P., Yang, A. S., Rideout III, W. M., Gonzalez-Zulueta, M., Choi, P., Lo, K. W., Yu, M. C. & Jones, P. A.: Absence of p53 gene mutations in primary nasopharyngeal carcinomas. *Cancer Res.*, **52**, 4787-4790 (1992).
- 62) Sun, Y., Hegamyer, G., Cheng, Y. J., Hildesheim, A., Chen, J. Y., Chen, I. H., Cao, Y., Yao, K. T. & Colburn, N. H.: An infrequent point mutation of the p53 gene in human nasopharyngeal carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 6516-6520 (1992).
- 63) Nasrin, N., Taiba, K., Hannan, N., Hannan, M. & Al-Sedairy, S.: A molecular study of EBV DNA and p53 mutations in nasopharyngeal carcinoma of Saudi Arab patients. *Cancer Lett.*, **82**, 189-198 (1994).
- 64) Sista, N. D., Pagano, J. S., Liao, W. & Kenney, S.: Retinoic acid is a negative regulator of the Epstein-Barr virus protein (BZLF1) that mediates disruption of latent infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 3894-3898 (1993).
- 65) Gutsch, D. E., Holley-Guthrie, E. A., Zhang, Q., Stein, B., Blonar, M. A., Baldwin, A. S. & Kenney, S. C.: The bZIP transactivator of Epstein-Barr virus, BZLF1, functionally and physically interacts with the p65 subunit of NF- κ B. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 1939-1948 (1994).
- 66) Hockenbery, D., Nunez, G., Millman, C., Schreiber, R. D. & Korsmeyer, S. J.: Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, **348**, 334-336 (1990).
- 67) Ngan, B. Y., Chen-Levy, Z., Weiss, L. M., Warnke, R. A. & Cleary, M. L.: Expression in non-Hodgkin's lymphoma of the bcl-2 protein associated with the t(14;18) chromosomal translocation. *N. Engl. J. Med.*, **318**, 1638-1644 (1988).
- 68) Pezzella, F., Tse, A. G. D., Cordell, J. L., Pulford, K. A. F., Gatter, K. C. & Mason, D. Y.: Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14;18 chromosomal translocation. *Am. J. Pathol.*, **137**, 225-232 (1990).
- 69) Kondo, E., Nakamura, S., Onoue, H., Matsuo, Y., Yoshino, T., Aoki, H., Hayashi, K., Takahashi, K., Minowada, J., Nomura, S. & Akagi, T.: Detection of bcl-2 protein and bcl-2 messenger RNA in normal and neoplastic lymphoid tissues by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Blood*, **80**, 2044-2051 (1992).
- 70) Hague, A., Moorghen, M., Hicks, D., Chapman, M. & Paraskeva, C.: Bcl-2 expression in human colorectal adenomas and carcinomas. *Oncogene*, **9**, 3367-3370 (1994).
- 71) Ikegaki, N., Katsumata, M., Minna, J. & Tsujimoto, Y.: Expression of bcl-2 in small cell lung carcinoma cells. *Cancer Res.*, **54**, 6-8 (1994).
- 72) Nakagawa, K., Yamamura, K., Maeda, S. & Ichihashi, M.: bcl-2 expression in epidermal keratinocytic diseases. *Cancer*, **74**, 1720-1724 (1994).
- 73) Armstrong, A. A., Gallagher, A., Karajewski, A. S., Jones, D. B., Wilkins, B. S., Onions, D. E. & Jarrett, R. F.: The expression of the EBV latent membrane protein (LMP-1) is independent of CD23 and bcl-2 in Reed-Sternberg

