

Immunohistochemical Study of Various Tissues Derived from Nasopharynx

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/2297/8165

各種上咽頭由来組織の免疫組織学的研究

金沢大学医学部耳鼻咽喉科学講座 (主任：梅田良三教授)

山 本 憲

(平成2年1月11日受付)

上咽頭粘膜は、外界からの様々な刺激に対する免疫反応や炎症反応に関して多彩な所見を示している。本研究では、上咽頭に認められる正常リンパ組織と上咽頭癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 組織のリンパ球組成の相違、Epstein-Barr ウイルス (EBV) レセプターや生体における細胞性免疫に関与する T 細胞の抗原認識細胞の一つであるヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen, HLA)-DR 発現細胞を免疫組織学的に同定し、NPC や特定の疾患の発症に関与している可能性について検討した。また、上咽頭組織で抗 EBV 抗体価や病理組織所見に加えて、切片上ハイブリッド形成 (in situ hybridization) 法を併用することが、NPC や NPC 以外の疾患の病態や本質解明に役立つか検討した。上咽頭組織として、NPC、アデノイド、上咽頭疾患の病理組織学的診断のために生検された組織を用い、モノクローナル抗体 (CD3, 4, 8, HLA-DR, CD21) による免疫抗体法でリンパ球組成を観察し、切片上ハイブリッド形成法で、EBV-DNA、サイトメガロウイルス (Cytomegalovirus, CMV)-DNA の検出を試みた。抗 EBV 抗体価では NPC 患者のウイルスカプシド抗原 (viral capsid antigen, VCA)-IgG、IgA が他の耳鼻咽喉科疾患より陽性率が高かった。免疫能は NPC 患者では健康者よりインデューサー/ヘルパー T4 陽性細胞の頻度が低く、T4/T8 比の低下が認められた。NPC 組織に浸潤するリンパ球は T 細胞優勢で EBV 感染レセプター (CR2) は観察できなかった。HLA-DR 発現細胞は正常上咽頭組織では認められず NPC 組織で種々の頻度で認められた。また HLA-DR 発現細胞高度陽性者は抗 EBV 抗体価の VCA-IgA が高値であり、両者陽性頻度に関連性が示唆された。これらの結果は、HLA-DR の陽性化は一つに NPC における主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex, MHC) 拘束性 T4 細胞の抗原認識に関係すると同時に NPC 組織の CR2 陰性から NPC プログレッション過程における EBV 重感染からの回避に関与すると考えられた。鼻腔及び上咽頭から発生する悪性リンパ腫として、B 細胞性リンパ腫、T 細胞性リンパ腫などが存在し、これらの疾患で EBV-DNA、EBV 核内抗原 (EBV-associated nuclear antigen, EBNA) が検出されるものもあり、発症に EBV が関連している可能性が考えられる。今後、この可能性を検討するために、各疾患において疾患の病態像把握と本体解明に有用である免疫組織学的及び切片上ハイブリッド形成の手法などを用いた詳細な検討が必要となるであろう。

Key words nasopharyngeal tissue, nasopharyngeal carcinoma, immunohistochemical study, in situ hybridization, human leukocyte antigen

Abbreviations: ABC, avidin-biotin peroxidase complex; CD, cluster of differentiation; CMV, Cytomegalovirus; CTL, cytotoxic T-cell lymphocyte; DAB, 3, 3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride; EA, early antigen; EBNA, EBV-associated nuclear antigen; EBV, Epstein-Barr virus; FITC, fluorescein isothiocyanate; HE, Hematoxylin-Eosin; HLA,

上咽頭は解剖学的に鼻腔の後端に位置し、天蓋は蝶形骨洞の底部で境され、それより後下方は軟口蓋挙上位までの後上壁と、耳管隆起部、耳管咽頭口が存在する両側の側壁と、軟口蓋上面を底とする下壁に囲まれた腔で、軟口蓋の高さで中咽頭腔に接続する。その粘膜上皮は、呼吸器としての多列線毛円柱上皮と上部消化管としての扁平上皮で構成されており、上咽頭は両者の境界部であると同時に両者が混在する場所でもあり、組織学的に非常に特徴的である¹⁾。しかも線毛円柱上皮にはしばしば扁平上皮化生が生じ、組織学的に非常に不安定な粘膜といえる。さらに上気道の入口部に近接する関係上、外界からの直接刺激を受け易い条件でもある。このことは生後直ちに侵入してくる外来抗原に対して、最初に反応する場として免疫学的意義は大きいと思われる。ことに耳管隆起後方に存在する咽頭陥凹 (fossa of Rosenmüller) は、細菌、ウイルス、化学物質などを含む外界からの異物が停留しやすく、慢性的刺激を受け易い構造と環境にあるといえる。この意味で上咽頭粘膜間質に存在する豊富なリンパ組織は局所免疫応答の立場からは実に合目的であるが、逆にその機能の低下や亢進などの破綻はいろいろな疾患発生に密接に関連してくることが推測される。

ところで上咽頭癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 発癌に Epstein-Barr ウイルス (Epstein-Barr virus, EBV) が密接な関係にあることが臨床家のみならず、病理学者、ウイルス学者、分子生物学者など多方面から指摘されている²⁹⁾。EBV の腫瘍ウイルスとしての性格は、臨床的にはアフリカ Burkitt リンパ腫³⁾をはじめとして、免疫不全や高度な抑制状態で発生する多クローン性 B 細胞リンパ腫⁴⁾や、EBV 特異的キラー細胞の欠損やインターフェロン及びナチュラル・キラー (natural killer, NK) 活性の低下に由来する慢性活動性 EBV 感染症に発症する T 細胞性リンパ腫⁵⁾など多くの EBV 関連腫瘍が存在することや、実験的にマーマセットにおける悪性リンパ腫⁶⁾の発生や、ヒトリンパ球に容易に感染し不死化させ⁷⁾、多クローン性のリンパ芽球系細胞株を樹立する⁸⁾ことなどからも明らかである。しかし、EBV 感染を受け入れる上皮系細胞が存在せず、上咽頭粘膜上皮における EBV 感染の機序については未だ不明なところも多く、

EBV 感染をめぐる局所免疫反応の応答については全く不明である。NPC 患者における免疫能の異常¹⁰⁾も報告されているが、それが NPC 発症の原因とどのような関係にあるのか、あるいは単なる結果なのか不明である。したがって上咽頭癌発癌に密接な関与が指摘されている EBV 感染と生体の免疫応答機構を解明することは重要な課題と思われる。

生体における細胞性免疫に関与する T 細胞の抗原認識様式は、常に自己の主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex, MHC) の産物 (ヒトの場合にはヒト白血球抗原 human leukocyte antigen, HLA) と同時に認識するところに特徴がある¹⁰⁾。この現象は T 細胞の抗原認識における主要組織適合遺伝子複合体拘束性と呼ばれ、自己主要組織適合遺伝子複合体産物に対する特異性及び抗原に対する特異性は、T 細胞レセプターによって行われている。これにはヘルパー/インデューサー細胞を主体とした cluster of differentiation (CD) 4 抗原陽性細胞 (T4) によるクラス II 主要組織適合遺伝子複合体産物 (ヒトでは HLA-DR, -DQ, -DP 抗原) 拘束性のものと、サブレッサー/細胞障害性細胞を主体とした CD8 抗原陽性細胞 (T8) によるクラス I 主要組織適合遺伝子複合体産物 (HLA-A, -B, -C 抗原) 拘束性の反応に大別される。前者のクラス II 拘束性である HLA-D 領域はその遺伝子産物の組織内分布は限られており、その発現は宿主免疫応答性に強い影響をもたらすことが予想されるところから、自己免疫疾患や特定の疾患の発症になんらかの形で関与していることが疑われている。したがって HLA-D 領域の発現様式を解明することは、それら疾患の病因を解明する上で重要な手がかりを与えるものと思われる。そこで正常上咽頭粘膜と NPC 組織におけるリンパ球組成の相違や HLA-DR 発現細胞を免疫組織学的に同定し、その比較から EBV 感染による免疫学的局所反応を推測し、NPC 発癌において EBV がどのように関与するかを明らかにすることを目的とした。また上咽頭組織での切片上ハイブリット形成法の併用が、NPC 以外の疾患の病態や本質解明にいかに関与するかを証明するために、EBV-DNA プローブのみならず、サイトメガロウイルス (Cytomegalovirus, CMV)-DNA プローブを用いて切片上ハイ

human leukocyte antigen; LYDMA, lymphocyte determined membrane antigen; MHC, major histocompatibility complex; NK, natural killer; NPC, nasopharyngeal carcinoma; PBS, phosphate buffered saline; PR, polymorphic reticulosis; SSC, standard saline citrate; VCA, viral capsid antigen

ブリット形成を行った。

材料および方法

I. 上咽頭組織

上咽頭組織の中で NPC 組織としては昭和60~64年まで当教室及び関連病院で病理組織学的に扁平上皮癌、リンパ上皮腫、移行上皮癌と診断された上咽頭癌患者の生検材料を用いた。さらに対照としては、手術で摘出されたアデノイド組織及び上咽頭疾患の病理組織学的診断のために生検された組織を用いた。上咽頭癌の病理組織学的分類は WHO 分類¹⁵⁾に従った。すなわちタイプ I は角化型、II は非角化型、III は低分化型扁平上皮癌であり、上咽頭に発生する癌腫として特徴的なリンパ上皮腫、移行上皮癌はタイプ III に含めた。生検は一侧の前鼻孔からファイバースコープを挿入し他側の鼻腔から鉗子を挿入し明視下に行った。切除組織は、採取後、24時間以内に凍結切片用の大きさ(5×5×5mm)に細切し、OCT-compound で包埋した後、-80°Cのドライアイス・アセトン中で急速凍結保存した。使用時に凍結保存標本を厚さ4~6μmに薄切したのを室温で30分間風乾し、アセトンにて室温で10分間固定して標本を作成した。残りの標本は、ヘマトキシリン-エオジン(Hematoxylin-Eosin, HE)染色用とした。

II. EBV-DNA 及び CMV-DNA の検出

生検材料や、手術による摘出材料の凍結切片標本を用い、切片上ハイブリッド形成法で組織内 EBV-DNA や CMV-DNA の検出を試みた。DNAプローブはビオチン標識 BamHI-W EBV-DNA 断片(Enzo社, New York, U. S.), CMV-DNA プローブ(Enzo社)を用いた。

ハイブリッド形成は Brigati ら¹⁶⁾の方法に準じて行った。まず、アセトン固定標本に DNA プローブ液を加え、85±2°Cに調節したホットプレート上で5分間加熱して変性後、20分間室温に静置し、ハイブリッド形成を遂行した。その後、2x standard saline citrate (SSC, 0.3M 塩化ナトリウム, 0.03M クエン酸ナトリウム)で溶解した50% formamide 液を加え10分間反応後、2x SSC 液で洗浄した。余剰水分を除去した後、ビオチン検出キット DETEK I-hrp (Enzo社)を用いて発色した。発色法は avidin-biotin peroxidase complex (ABC) を20分間反応させ、洗浄液で洗浄後、3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) で約10分発色させ再度リンスした。標本の永久保存にはクリスタルマウント(コスモバイオ社, 東京)を添加し、50~60°Cのホットプレート上で5~10分間加熱し永久

標本を作成した。

III. モノクローナル抗体

T リンパ球サブセット (T3, 4, 8) 及び HLA-DR 陽性細胞の同定にはそれぞれ細胞特異的のマーカに対するモノクローナル抗体にビオチン標識したもの(コスモバイオ社)を一次抗体として用いた。また今回は一次抗体の染色の強さを増感し特異性を増すために三段階染色法(three-stage technique)を用いた。すなわち一次抗体として抗 HLA-DR 抗体(IOT2a-0261), 抗 CD3 抗体(IOT3-0262), 抗 CD4 抗体(10T-0263), 抗 CD8 抗体(IOT-0264), 二次抗体としては、P-260 (Peroxidase-conjugated rabbit immunoglobulins to mouse immunoglobulin, Dakopatts 社, Denmark), 三次抗体として、P-216 (Peroxidase-conjugated swine immunoglobulins to rabbit immunoglobulin, Dakopatts 社)を用いた。B リンパ球検出用には EBV 感染レセプターである B 細胞の補体レセプター, C3d に対する抗体である抗 CD21 抗体(IOB1-0111, コスモバイオ社)を用いた。

IV. 酵素抗体法

HLA-DR 及びリンパ球の T 細胞 (T3, 4, 8) 検出は免疫組織学的に、ABC 法による酵素抗体法を使用した¹⁸⁾。リン酸緩衝食塩水(phosphate buffered saline, PBS)で1:40希釈した一次抗体50μlを標本に滴下し、37°Cの湿室中で30分間反応させ PBS で洗浄した。次に二次抗体(1:20 希釈)を50μl滴下し、同じように30分間反応させ PBS で洗浄し、三次抗体(1:50 希釈)も同様に滴下し反応させた。この後、3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) にて発色を行った。DAB による発色時間は約10分とした。標本はアルコールで脱水し、キシレンで透徹を行った後、バルサムで封入した。また、コントロールには、PBS を一次抗体として用い、同様な操作を行った。

V. 蛍光抗体法

1. B 細胞の検出

B 細胞は EBV 感染レセプター検出用一次抗体である抗 CD21 抗体(PBS で1:20希釈)を37°C, 45分反応させ、PBS で洗浄後、二次抗体として fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗マウス IgG1 抗体(1:10 希釈)を37°C, 60分反応させ、再度 PBS で洗浄後、蛍光顕微鏡下に観察した。

2. EBV 核内抗原 (EBV-associated nuclear antigen, EBNA) の検出

室温にてアセトン固定した標本を56°C, 30分間非働化した抗 EBNA 抗体価陽性の健康正常人血清と抗 EBV 抗体陰性補体用血清を1:9で混合したものを

一次血清とし、Reedman ら¹⁹⁾の方法に準じて蛍光抗体補体法を行った。

観察は任意の4~5カ所を鏡し、陽性細胞出現の程度を- (陰性), + (軽度, 0~20%), ++ (中等度, 20~50%), +++ (高度, 50%以上) に分類して肉眼的判定を行った。

VI. 末梢血リンパ球サブセット

NPC 患者新鮮例6例 (33歳~67歳, 平均年齢51歳) の担癌群と健康正常者10人の対照群 (34歳~65歳, 平均年齢51.7歳) における末梢血リンパ球サブセットを

単クローン抗体を用いて検索した。(T3, 4, 8, OKIa-1 と Leu11). 細胞解析は、フローサイトメトリー測定装置, SpectrumIII (Ortho 社) を用いた。

成 績

I. NPC 患者の抗 EBV 抗体価について

昭和45~64年までに当教室で保存された NPC 患者 (扁平上皮癌のみ) 血清59例のウイルスカプシド抗原 (viral capsid antigen, VCA)-IgG 抗体価の分布を正常者50例と比較検討した (図1). タイプII, IIIでは53

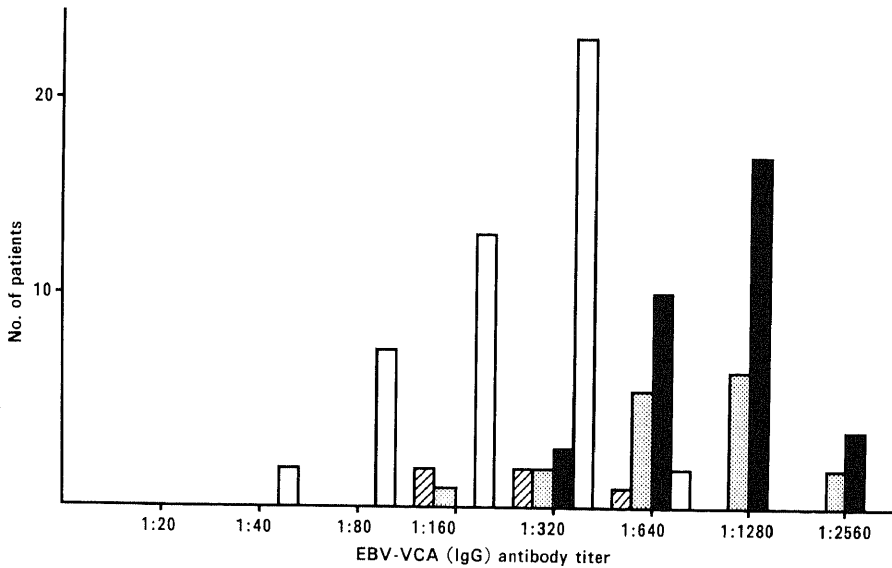


Fig. 1. Distribution of patients in relation to EBV-VCA (IgG) antibody titer and WHO histopathologic type of NPC. (▨, type I; ▤, type II; ■, type III; □, normal healthy person).

Table 1. Positive rate (%) of anti-EBV antibody titers in a variety of serum donor groups

serum doner group	number of patients	positive antibody titers	
		VCA-IgG ≥ 640	VCA-IgA ≥ 10
nasopharyngeal carcinoma	59	81.4 (48)	86.4 (51)
type I	5	20.0 (1)	0 (0)
type II	18	83.3 (15)	100 (18)
type III	36	88.9 (32)	91.7 (33)
other head and neck cancer	50	16.0 (8)	10.0 (5)
benign head and neck lesions	50	14.0 (7)	8.0 (4)
healthy donors	50	4.0 (2)	2.0 (1)

The value of parentheses represent the number with positive antibody titers.

例 (90%) において 1:640 以上の高値を示した. タイプ I の NPC 患者では 5 例中の 1 例のみが 1:640 を示し, 他の 4 例は 1:640 以下であった. 以上の結果からカットオフ値を 1:640 とし, 耳鼻科領域疾患での EBV 抗体価陽性率を VCA-IgG, IgA の両方から検討した. NPC 患者群ではそれぞれ 81.4, 86.4% であり他の頭頸部悪性腫瘍及び良性腫瘍患者の VCA-IgG, IgA に比較して有意に上昇していた (表 1).

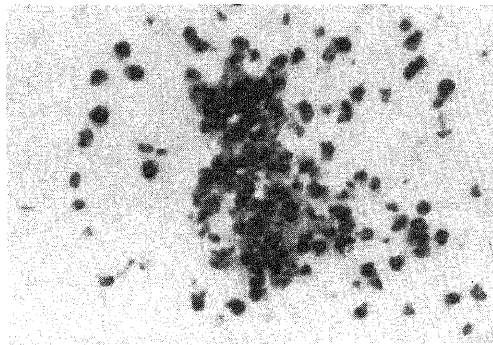


Fig. 2. EBV-DNA-positive cells in NPC tissue by in situ hybridization technique using an immunoperoxidase method. ($\times 200$).

II. NPC 患者の免疫能に関する検討

NPC 患者新鮮例の担癌群と健康正常者の対照群における末梢血リンパ球サブセット (T3, 4, 8, OK1a-1, Leu11) を比較検討した. NPC 担癌群はヘルパー/インデューサー T リンパ球と考えられる OKT4 陽性細胞 (T4) の頻度が健康正常者群よりも低く, サプレッサー/細胞障害性 T リンパ球と考えられる OKT8 陽性細胞 (T8) の頻度には差が認められなかった. その

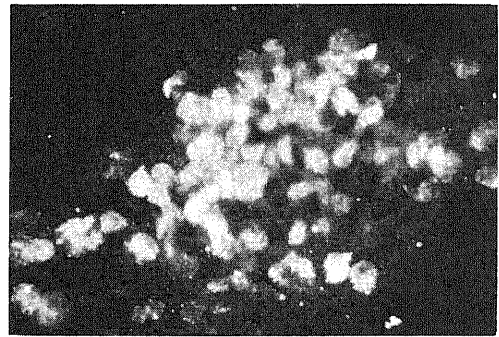


Fig. 3. EBNA-positive cells in NPC tissue by anticomplement immunofluorescent test. ($\times 200$).

Table 2. Peripheral lymphocyte subsets in patients with a nasopharyngeal carcinoma (NPC).

	OKT 3 (%)	OKT 4 (%)	OKT 8 (%)	T4/8 rate	OK1a 1 (%)	Leu 11 (%)
NPC n=6	53.5 \pm 15.7	27.3 \pm 10.1	32.4 \pm 6.5	0.84 \pm 0.22	26.4 \pm 9.5	24.5 \pm 10.3
normal health n=10	65.0 \pm 7.4	39.7 \pm 12.1	30.6 \pm 7.4	1.46 \pm 0.67	17.1 \pm 5.5	25.3 \pm 9.8

Each value represents the mean rate of the positive cells observed the subject.

Table 3. Occurrence of the EBV-DNA and EBNA in NPC tissues

case	age (sex)	TNM (stage)	histology	EBV-DNA	EBNA
1	44 (M)	T ₄ N ₃ M ₀ (IV)	transitional cell carcinoma	+	+
2	67 (F)	T ₁ N ₁ M ₀ (III)	lymphoepithelioma	+	+
3	66 (M)	T ₁ N ₃ M ₁ (IV)	undifferentiated S.C.C.	+	+
4	41 (F)	T ₁ N ₃ M ₀ (IV)	undifferentiated S.C.C.	-	-
5	33 (M)	T ₁ N ₁ M ₀ (III)	non-keratinizing S.C.C.	+	+
6	55 (M)	T ₁ N ₃ M ₀ (IV)	transitional cell carcinoma	+	+

Symbols: - (negative), + (0~20% positive cells, mild), # (20~50% positive cells, moderate), ## (more than 50% positive cells severe).

結果, OKT4/8 比率は対照群に比較して有意に ($P < 0.05$) 低下していた (表 2).

III. NPC 組織における EBV-DNA, EBNA の検出

今回対象となった NPC 6 例は病理組織学的に 1 例がタイプ II, 他の 5 例はすべてタイプ III であった. また臨床的病期分類では, 病期 III 2 例, 病期 IV 4 例あった. 凍結切片においては EBV-DNA (図 2) 及び EBNA (図 3) はタイプ III の 1 例 (症例 4) を除く全例に観察され, その程度は軽～中等度であった. (表 3).

IV. 上咽頭組織における EBV 感染レセプター (CR2) について

正常上咽頭由来細胞として摘出アデノイド及び上咽頭腫瘍の疑いで生検された組織を用い, 凍結切片によ

る蛍光抗体法で EBV 感染レセプターを観察した. また, 同時に同一切片にて HE 染色で組織学的観察も行った. 組織学的にアデノイドの上皮はほとんどが線毛円柱細胞からなり上皮下の間質には豊富なリンパ組織が存在し, ときにはリンパ濾胞の発育も観察された. この組織における EBV 感染レセプターは線毛上皮には全く認められず, 基底上皮細胞層近くに散在する EBV 感染レセプターは間質のリンパ球由来と思わ

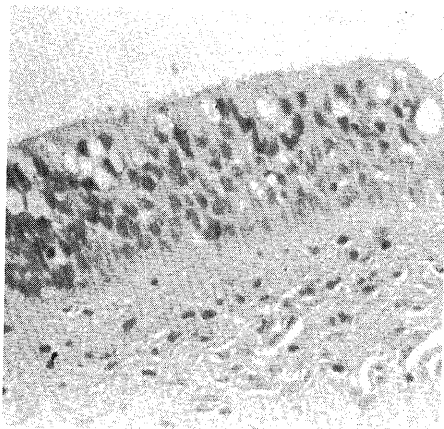
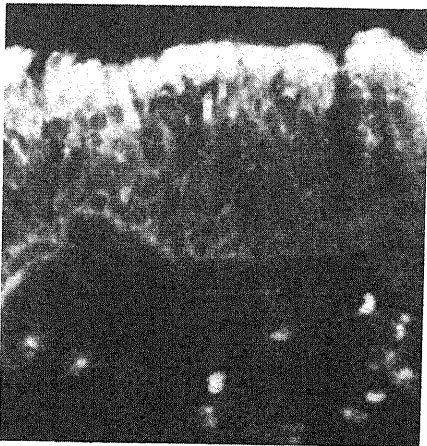


Fig. 4. The CR2-negative ciliated columnar cells. They were examined with mouse monoclonal antibody to C3d/EBV receptor molecule of B cells. A, Immunofluorescence stain; B, Hematoxylin-Eosin stain. ($\times 200$).

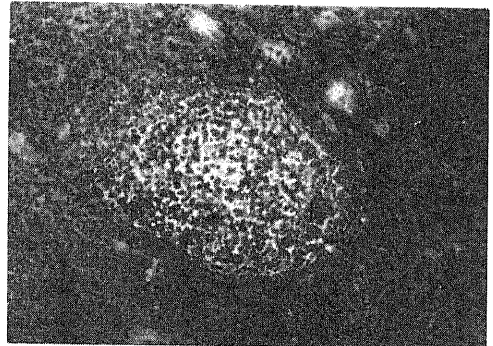


Fig. 5. The CR2-positive lymphocytes in the interstitial tissue of the nasopharynx. Immunofluorescence stain. ($\times 100$).

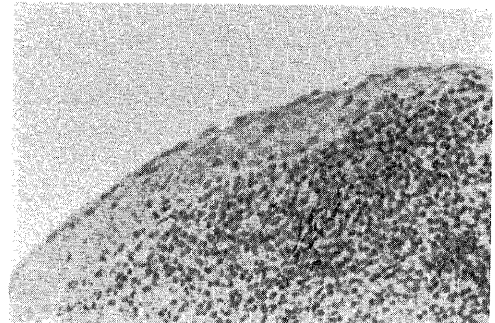
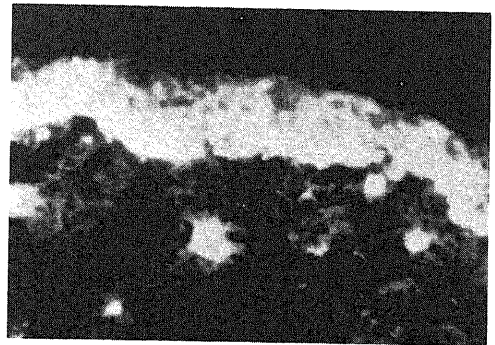


Fig. 6. The CR2-positive squamous cells at the basal layer of the nasopharynx. A, Immunofluorescence stain; B, Hematoxylin-Eosin stain. ($\times 100$).

れた(図4)。一方間質においてはリンパ濾胞内にEBV感染レセプターがびまん性に多数存在した。(図5)。これに対して重層扁平上皮細胞からなる粘膜組織においては基底細胞層から表層にかけて多数の蛍光陽性細胞が観察された。(図6)。また線毛円柱上皮と扁平上皮の移行部では前者の細胞にはEBV感染レセプターは存在せず、後者にのみ明瞭な境をもって存在した。(図7)。さらに上咽頭腫瘍が疑われて生検された成人の上咽頭組織にはしばしば扁平上皮細胞からなる過形成や異形成が観察されたが、そのような組織でも扁平上皮細胞に限局してEBV感染レセプターが存在した。(図8)。一方NPC組織を用いての同様の実験においては、検査したNPC5例全例にCR2陽性細胞は検出されなかった。

V. 正常上咽頭組織の免疫組織学的所見

正常上咽頭組織を摘出アデノイド群(全例8歳以下)と、生検組織群(18歳~47歳, 平均年齢30.3歳)に大別して比較することにした。HE染色による組織学的所見を検討すると前者の粘膜上皮は線毛円柱上皮と網状上皮がともに高度に分布し、間質には胚中心及び

暗殻を有するいわゆる二次性濾胞がしばしば観察された。(図9)。これに対して後者では線毛上皮の消失、上皮細胞の扁平化、さらには重層扁平上皮化生した部位が多く観察された。また間質では線維化が目立ち、それは生検組織群で増加し、加齢の影響が考えられた(図10)。免疫組織学的検討においては両者の間質構成の相違から、基底細胞層を中心とする粘膜上皮部と比較した。結果は両者ともに上皮内にしばしばリンパ球の侵入する像を認め、それらの細胞の表面マーカーはT細胞であり、T4細胞が主でT8細胞は認められなかった(図11)。また正常上咽頭上皮細胞にはHLA-DR抗原陽性細胞は確認されなかった。

VI. NPC組織における免疫組織学的所見

NPC組織におけるHLA-DR陽性細胞の検索において、標的細胞を癌細胞とするために、あらかじめEBNA高度陽性でT3陽性細胞が軽度もしくは陰性の標本を選別して用いた。その結果、HLA-DR陽性細胞出現の程度は、高度2例、中等度1例、軽度2例及び陰性1例が観察された(表4, 図12)。さらに、高度例はいずれも、VCA-IgA抗体価(幾何学的平均値)

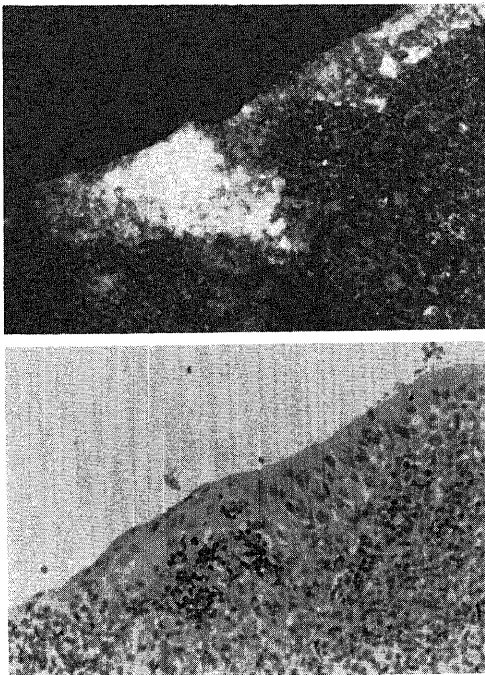


Fig. 7. The CR2-positive squamous cells in the transitional area of the nasopharynx. A, Immunofluorescence stain; B, Hematoxylin-Eosin stain. ($\times 100$).

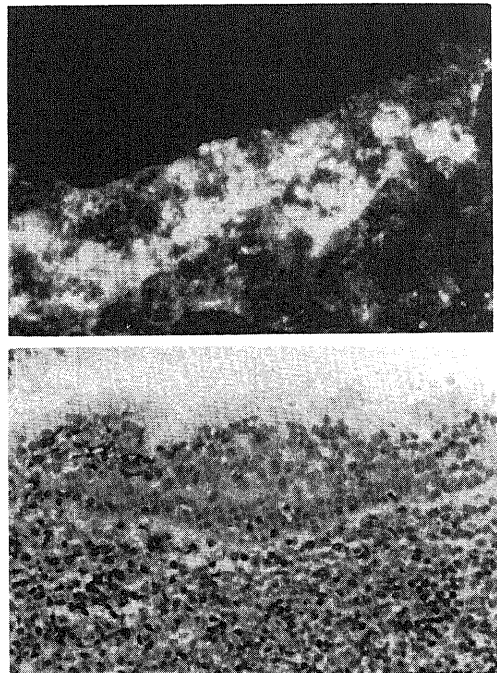


Fig. 8. The CR2-positive squamous metaplastic cells in nasopharyngeal epithelia. A, Immunofluorescence stain; B, Hematoxylin-Eosin stain. ($\times 100$).

1 : 100以上の保有者であり, HLA-DR 陽性細胞の出現率と VCA-IgA 抗体価に関連性が示唆された. 一方, NPC 組織に浸潤するリンパ球は T リンパ球が主体であり, CD21 陽性細胞は確認されなかった. リンパ球サブセットにおいては T4 陽性細胞出現率が中～

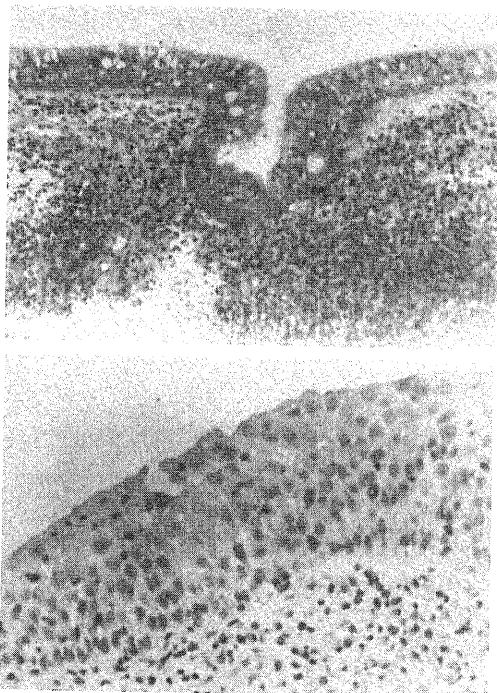


Fig.9. Histologic findings of the adenoid tissues obtained from a child of 6 years old. The ciliated columnar and reticular cells are observed in the mucous epithelia. Hematoxylin-Eosin stain. (A $\times 40$, B $\times 100$).

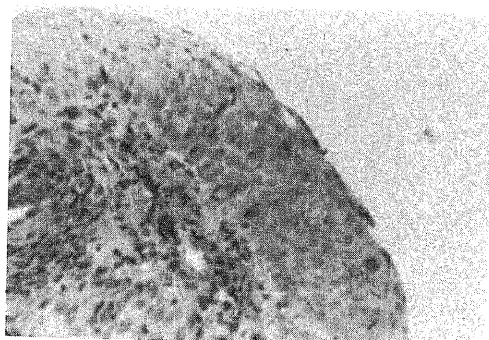


Fig.10. Histologic findings of normal nasopharyngeal tissues obtained from a person of 32 years old. The ciliated epithelia are decreased in number, and flattened squamous cells are often seen. Hematoxylin-Eosin stain. ($\times 100$).

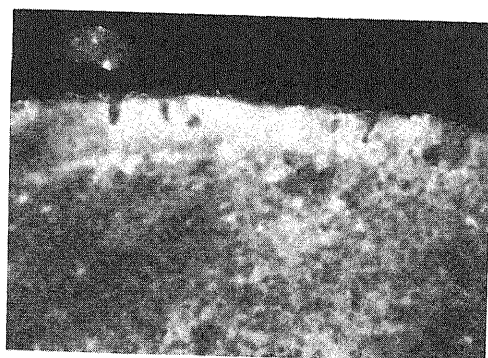


Fig.11. CD4-positive lymphocytes in the nasopharyngeal epithelial cells. Immunofluorescence stain. ($\times 100$).

Table 4. Geometric mean titers of EBV-antibody and immunohistological studies in NPC tissues

case	geometric mean titers		HLA-DR	lymphocyte subsets		
	IgA	IgG		CD 4	CD 8	CD 21
1	240 \pm 113	1472 \pm 1051	##	##	+	-
2	100 \pm 51.6	1040 \pm 480	##	##	+	-
3	66.7 \pm 23.1	533 \pm 185	++	+	+	-
4	<10	160 \pm 0	-	+	-	-
5	53.3 \pm 23.1	853 \pm 370	+	+	+	-
6	20 \pm 17.3	320 \pm 277	+	+	-	-

Symbols: - (negative), + (0~20% positive cells, mild), ++ (20~50% positive cells, moderate), ## (more than 50% positive cells, severe)

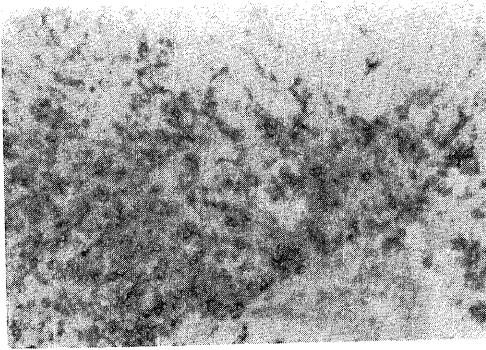


Fig.12. HLA-DR antigen-positive epithelial cells in biopsied tissues of NPC. Immunohistochemical stain. ($\times 100$).

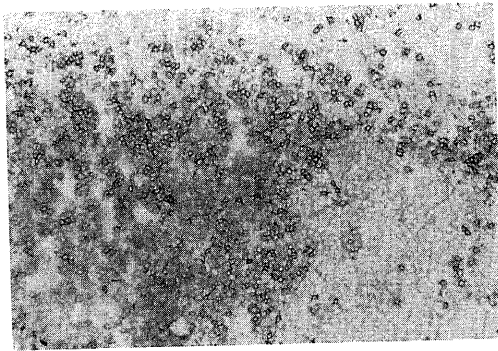


Fig.13. CD4-positive lymphocytes in biopsied tissues of NPC. Immunohistochemical stain. ($\times 100$).

高度に認められた (図13). HLA-DR 出現の程度と VCA-IgG 抗体価, および T8 陽性細胞出現率との間には明確な関係は認められなかった.

VII. その他の疾患における免疫組織学的所見

上咽頭の腫瘍性疾患を疑い生検した21例の病理組織学的, 免疫組織学的及び切片上ハイブリッド形成法による EBV-DNA, CMV-DNA の検索結果, Waldyer 咽頭輪原発の B 細胞性悪性リンパ腫 5 例, T 細胞性と考えられる非常に早期の悪性リンパ腫 1 例, さらに EBV ゲノム陽性鼻性 T 細胞性リンパ腫と考えられる 1 例を発見した (表 5).

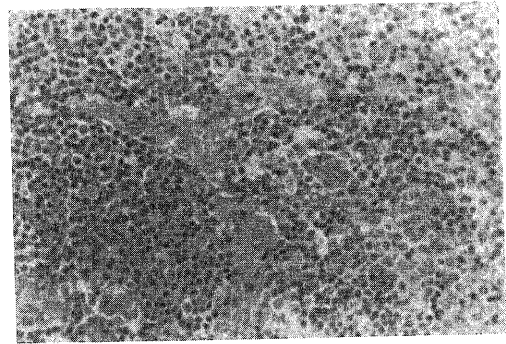


Fig.14. Microscopic features of a nasopharyngeal tumor in a patient with a probable T-cell lymphoma. Matured lymphocytes and many eosinocytes infiltrated into epithelia. Hematoxylin-Eosin stain. ($\times 100$).

Table 5. Immunohistological studies in biopsied tissues derived from various nasopharyngeal lesions

case	age (sex)	histology	HLA-DR	lymphocyte subsets		
				CD 4	CD 8	CD 21
1	65 (M)	diffuse, large,	++	-	-	##
2	58 (M)	diffuse, large,	++	-	-	++
3	55 (M)	diffuse, large	++	-	-	##
4	64 (M)	diffuse, mixed,	++	-	-	##
5	68 (F)	diffuse, large,	++	-	-	++
6	18 (F)	T-cell lymphoma	##	+	++	-
7	78 (M)	polymorphic reticulosis (nasal T-cell lymphoma)	##	##	+	-

Abbreviations: NHL (non-Hodgkin lymphoma).
 Symbols: - (negative), + (0~20% positive cells, mild), ++ (20~50% positive cells, moderate), ## (more than 50% positive cells, severe)

1. B 細胞性悪性リンパ腫

病理組織学的に悪性リンパ腫と診断されたものは5例存在し、その組織学的分類 (LSG 分類) は、びまん性大細胞型4例及び、びまん性混合細胞型1例であった。それらの免疫組織学的観察において全例にHLA-DR 陽性細胞が中等度に観察され、CD21 陽性細胞が中～高度観察された。また、T 細胞サブセットを検索したが T3, 4, 8 細胞は認められなかったことから腫瘍細胞は HLA-DR 陽性の B 細胞と考えられた。しかし EBNA 陽性細胞は全例に検出できなかった。

2. T 細胞性悪性リンパ腫

悪性リンパ腫の早期診断、ならびに確定診断に免疫組織学的観察が有用であった T 細胞性リンパ腫1例を経験した。患者は18歳女性で再三にわたる高熱と頸部リンパ節腫脹を主訴としていた。初発時に認められ

た上咽頭の黄白色腫瘍塊は一度は口腔から自然排出 (大きさ2.8×4.0cm, 組織学的には線維素塊) しているが、再度上咽頭後壁正中部に大豆大のリンパ組織様の高まりが観察され、右頸部の胸鎖乳突筋後縁に沿って小指頭大のリンパ節が触知された。病理組織所見は、上咽頭組織にはリンパ濾胞はみられず、上皮下に成熟リンパ球と好酸球の著明な浸潤があり中～大型の異型リンパ球が少数みられるのみで、血管壁浸潤像は軽度であった (図14)。リンパ節では、T 領域相当部に細血管の増殖、内皮の肥大を認め、種々の範囲に中等大、時に大型核の幼若リンパ球が増殖していた。同時に著明な好酸球浸潤、形質細胞や組織球の増殖を伴っていた。さらに類上皮細胞、巨細胞からなる小さい肉芽も存在し (図15)、この所見は T 領域リンパ腫を強く疑わせる所見であった。免疫組織学的所見では、

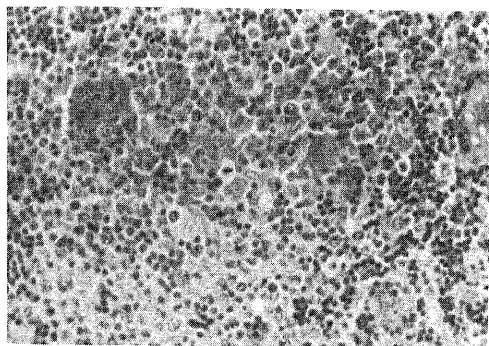


Fig.15. Microscopic features of the cervical lymphnode. There were small granuloma-like aggregation of epithelioid and multinucleated giant cells. The same case as in Fig.14. Hematoxylin-Eosin stain. (×100).

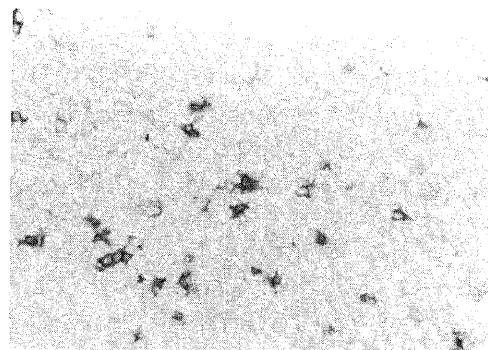


Fig.17. CD4-positive lymphocytes in a nasopharyngeal tumor of the same case as in Fig.14. Immunohistochemical stain. (×200).

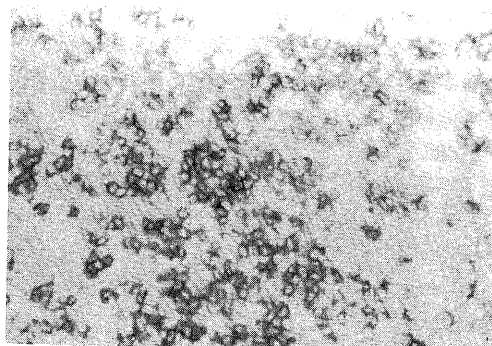


Fig.16. CD8-positive lymphocytes in a nasopharyngeal tumor of the same case as in Fig.14. Immunohistochemical stain. (×200).

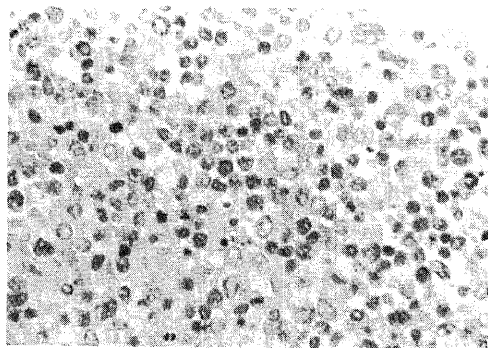


Fig.18. Microscopic features of a nasopharyngeal tumor in a patient with a lethal midline granuloma. Hematoxylin-Eosin stain. (×200).

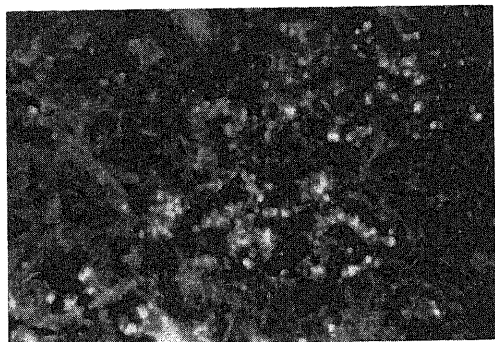


Fig.19. EBNA-positive cells by an anticomplement immunofluorescent test. ($\times 100$)

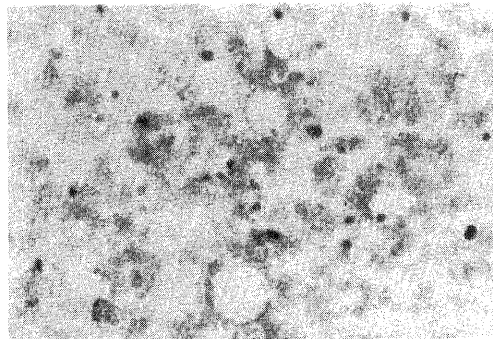


Fig.20. EBV-DNA-positive cells by in situ hybridization technique using an immunoperoxidase method. ($\times 100$).

CD21 陽性細胞は見られず、T 細胞優位で T8 細胞の高度浸潤 (図16) と T4 細胞の軽度陽性細胞が観察され (図17)、本症を T 細胞性リンパ腫と診断した。切片上ハイブリッド形成では EBV 及び CMV ゲノムは陰性であった。

3. 鼻性 T 細胞性リンパ腫

臨床的にいわゆる進行性壊疽性鼻炎、あるいは致死性正中肉芽腫症と診断した 1 例について患者の鼻腔を含む上咽頭からの生検材料を用いて、T 細胞サブセット、切片上ハイブリット形成法による EBV-DNA、CMV-DNA の検索を行い、EBV-DNA 陽性の鼻性 T 細胞性リンパ腫と診断した 1 例を経験した。病理組織学的には核異型を伴う中～大型リンパ球の他に、小リンパ球、組織球、形質細胞、好酸球など多彩な細胞浸潤が見られ、小血管への浸潤も見られ、多形性細網症 (Polymorphic Reticulosis, PR) と診断された (図18)。免疫組織学的観察において T3, 4 はともに高度で、T8 は軽度の頻度を示し、腫瘍細胞は末梢性 T 細胞型リンパ腫の表面形質を呈した。抗 EBV 抗体価は VCA-IgG (1:2560)、IgA (1:160)、早期抗原 (early antigen, EA)-IgG (1:320)、IgA (1:80)、EBNA 抗体価-IgG (1:40) を示し高度上昇を認めた。また腫瘍細胞と考えられる T 細胞に一致して EBNA (図19) 及び EBV-DNA の存在が確認された (図20)。しかしながら CD21 陽性細胞は観察できず、腫瘍細胞における EBV 感染レセプターは陰性と考えられた。

考 察

従来 HLA-DR 抗原の発現細胞としては B 細胞、活性化 T 細胞、マクロファージが有名であり、このような主要組織適合遺伝子複合体ークラス II 抗原の発現が

上皮細胞に出現する例としては、非腫瘍性病変では T 細胞の密接な関連が示唆される GVH 病 (graft-versus-host disease)²⁰。腫瘍性病変では大腸癌²¹、悪性黒色腫²²、また長期に培養された細胞株²³などで報告されている。上咽頭癌組織における HLA-DR 抗原陽性現象は、Thomas ら²⁴によって最初に報告されているが、陽性細胞の由来が上咽頭癌細胞か、それとも癌細胞に著明に浸潤する T 細胞 (活性化 T リンパ球) が問題になる。その点、Busson ら²⁵はヌードマウス継代腫瘍では継代によって間質細胞は徐々に選別され腫瘍細胞のみ残ることを利用して、ヌードマウス継代 NPC 腫瘍においても HLA-DR 陽性細胞が高頻度に観察されることから、HLA-DR 陽性細胞の由来が上皮細胞であり NPC に浸潤するリンパ球でないとしている。日本人の NPC を対象とした報告はこれが最初であるが、NPC 組織の HLA-DR 抗原観察においては、あらかじめ EBNA 陽性細胞が豊富で T3 陽性細胞が極力少ないところを選んで観察することによって、先の影響を除いた。

NPC における HLA-DR 陽性化の意義は未だ不明であるので、局所免疫応答と EBV 感染の観点から考察を試みた。まず、アデノイドは粘液線毛機構、リゾチーム活性を有し、それを被覆する呼吸上皮内の分泌型 IgA (s-IgA) が口蓋扁桃よりも著明に高いことから²⁶、分泌型 IgA によって担われる小腸や気管に隣接するリンパ装置と同じように全身の粘膜に分布する免疫系²⁷の一つとして局所の免疫応答に重要な器官とみなされる。その中心的役割は、Karchev ら²⁸によると、電子顕微鏡的に観察される M 細胞と言われる細胞であることが知られる。したがって唾液によって伝播する EBV の抗原物質^{29,30}は、この M 細胞が取り込

み、上皮内 T リンパ球や樹状細胞に伝達することが充分考えられる。藤吉ら³⁹⁾によるとこの M 細胞は、扁平上皮化生が著しくない網状上皮に多く観察される無線毛細胞に類似し、この細胞が抗原を取り込み、その情報をヘルパー T 細胞に伝達しているとしている。したがって、加齢とともに扁平上皮化生細胞が増加し、M 細胞類似の細胞が減少することは局所免疫反応の低下につながる。NPC はそのような時期に、EBV 感染レセプターを有する扁平上皮化生細胞や扁平上皮細胞から発生する癌腫と考えられるから、NPC 細胞が HLA-DR 陽性化することは、M 細胞に変わる機能を担い、主要組織適合遺伝子複合体拘束性 T4 細胞の抗原認識に関与している可能性がある。このことは臨床的に NPC 患者の高 VCA-IgA 抗体価や上咽頭癌発癌以前の癌前状態ともいうべき時期の高 VCA-IgA 抗体価³⁹⁾保有者が存在することからも充分考えられる。次に EBV 感染の観点から HLA-DR の陽性化の意味を考えてみると、教室の古川らによると³⁹⁾、上咽頭由来組織の初代培養で得られた上皮系細胞株の初期の継代細胞は EBV 感染レセプター陽性であり、EBV の直接感染は非常に低率ながら可能であるが、それ以上継代を経ると感染が不成立になったとしている。その理由として、継代細胞株の EBV 感染レセプター陰性化と HLA-DR 陽性化を指摘している(未発表)。ところで NPC 組織は EBV の重感染により EBV を救出³⁹⁾することが知られているが、EBV 放出細胞は死滅する運命にある。したがって、もし EBV が発癌のイニシエーションに重要な因子であるとするならば、癌を発症するためには癌化した細胞がプログレッションの過程において EBV 重感染を回避する機構が必要である。正常上咽頭細胞の EBV 感染レセプター陰性化と HLA-DR 陽性化に伴う EBV 感染不成立の事実と、今回証明された NPC 細胞の EBV 感染レセプター陰性、HLA-DR 陽性所見は、EBV 重感染からの回避機構であるかもしれない。そして、そのことは、NPC のプログレッションにおける重要な因子である可能性がある。もちろん、NPC プログレッションに関与する因子として、生体の持つ EBV 特異的免疫防御機構の存在も無視できない。すなわち EBV は他のヘルペスウイルス同様、人体に潜伏感染し EBV-DNA が感染細胞に潜在する。この潜在 EBV-DNA から発現される遺伝子として、現在、EBNA1~6³⁹⁾⁻⁴⁰⁾と唯一の膜蛋白である EBV 特異的膜抗原 (lymphocyte determined membrane antigen, LYDMA)⁴¹⁾⁴²⁾が知られている。特に EBNA1,2 と LYDMA は発癌に関係する重要な遺伝子といわれて

いる。ところが実際の NPC に発現している遺伝子産物は EBNA1 と LYDMA であって、他の遺伝子の発現は証明されていない⁴³⁾。これに対して、生体における EBV 特異的細胞障害性 T 細胞 (cytotoxic T cell lymphocyte, CTL) の認識する遺伝子産物は、EBNA2 と LYDMA であり、NPC 組織は EBV 特異的免疫監視機構から一部回避されている⁴⁴⁾⁴⁵⁾。この詳細な機序については現在不明であるが、HLA-DR 陽性化と同様、発癌を左右する重要な因子と考えられる。

ところで EBV の上咽頭上皮細胞への感染に関しては、これまで EBV は B リンパ球好性であり上皮細胞への直接感染は不可能とされてきた。それは試験管内での EBV 感染上皮系細胞や NPC 組織の初代培養細胞からは EBV 遺伝子保有細胞の樹立が不可能であることのほかに、EBV の感染レセプターである CR2 が上皮系細胞には存在しないためとされてきた。しかし近年、咽頭上皮細胞への EBV 直接感染は実験的には可能であり⁴⁶⁾⁴⁷⁾、生体においても耳下腺導管細胞⁴⁸⁾や AIDS 患者の舌に発生した毛白斑 (hairly leukoplakia) の上皮にも EBV-DNA の存在が確認される⁴⁹⁾ことから、生体における EBV 感染増殖細胞は B リンパ球よりもむしろ口腔咽頭の上皮細胞であり、生体における潜伏感染持続の場として上皮細胞が注目されるようになった。今回上咽頭組織における EBV 感染レセプターの局在について組織学的に検討を加えた結果、感染レセプターは線毛円柱上皮細胞には存在せず、扁平上皮細胞にのみ存在することが判明した。先にも述べたように EBV は試験管内の実験系において B リンパ球には容易に感染し EBV 遺伝子陽性のリンパ芽球細胞を樹立する。伝染性単核球症の病態像⁵⁰⁾からも理解できるように、生体における EBV 感染も試験管内のそれと同様の感染様式が推測されるが、免疫能正常な個体においては、EBV 感染 B リンパ球に発現される EBV 特異的抗原 (この場合 LYDMA) を認識する細胞障害性 T 細胞に捕獲され死滅する。この機序は、主要組織適合遺伝子複合体のタイプ I に拘束性であることも解明されている⁵¹⁾⁵²⁾。したがって、生体における EBV の潜伏感染の場 (reservoir) としては B リンパ球は不適当と考えられる。その意味では、今回の結果は EBV 感染扁平上皮細胞が EBV の潜伏感染細胞になりうることを示すものであり、扁平上皮癌が大部分である上咽頭癌発癌における EBV の関与をさらに支持するものである。しかしながら、生体における EBV 感染様式は上皮系細胞への直接感染のみでないことも無視できない。すなわち実験的にも証明できる

ように、EBV 遺伝子陰性の上皮系細胞と EBV 遺伝子陽性のリンパ芽球細胞の細胞融合による EBV 感染⁵⁰⁾の可能性も存在する。上咽頭粘膜の基底細胞層に接して密に存在するリンパ球や、しばしば観察される上皮細胞層へのリンパ球の侵入、さらに電子顕微鏡的に観察される上皮細胞とリンパ球の融合所見⁵⁴⁾からも、その可能性は完全には否定できない。

末梢性 T 細胞性リンパ腫に関しては、しばしば慢性活動性 EBV 感染症患者において EBV-DNA 陽性 T 細胞性リンパ腫が発生することを先に述べた。これらの報告は、従来の EBV 感染性における B 細胞親和性と異なることから、EBV には T 細胞にも親和性を有するウイルス株存在の可能性も考えられる。ところで今回経験した症例の初期の抗 EBV 抗体価は VCA-IgG (1:320)、IgA (10倍以上)、IgM (10倍以下)、EBNA (1:80)、抗 CMV 抗体価 (1:8) であり、EBV 再活性化を示す所見はなく、切片上ハイブリッド形成でも EBV ゲノムは陰性であった。しかしながら、末梢血 T4/8 比は 0.47 と著しく低下し、組織の T 細胞サブセットでもサブプレッサー T8 細胞優位にもかかわらず、経過において EBV 抗体価の上昇を認めたことから (VCA-IgG 1:640, EBNA 1:160)、EBV の関与を完全には否定できない。病理組織学的には、T 領域リンパ腫が疑われたが決定的ではなく、免疫組織学的所見から T 細胞性リンパ腫と診断された。病状は最初抗生剤によく反応し、またリンパ節も自然消退している。このような臨床経過から考えて、本症は EBV の関与については不確実ながら、T 細胞性リンパ腫のごく早期症例と考えられ、診断における免疫組織学的観察の有用性が示された。患者は化学療法のみで順調に反応し、上咽頭の腫脹および頸部リンパ節腫脹は消失した。

いわゆる進行性壊疽性鼻炎は肉芽腫様病変が、主として鼻腔に始まり、ときには口蓋、咽頭に進行性に拡大し、潰瘍を形成する疾患で、長らくその本体については不明であった。病理組織学的所見の特徴は増殖リンパ球の顕著な核異型とその小血管内への浸潤像或は破壊像であるが、生検材料によっては必ずしもそのような所見がみられず、組織球や好酸球など炎症性細胞浸潤が表面化して診断に苦慮するのが常であった。しかしながら、免疫組織学的研究が行われるようになってからようやく、鼻腔の T 細胞リンパ腫を中心とする悪性リンパ腫の一種であるとの見解が示されるようになり⁵⁵⁾、疾患の究明に免疫組織学的観察がいかに重要であるかを示す最適例となった。最近ではそれに EBV ゲノムが検出されたとする報告もあり⁵⁶⁾疾患と

の関係が注目されている。しかしながら EBV 侵入経路については EBV 感染レセプター陰性であるところから NPC と同様、疑問が残る。また、細胞の形質発現と遺伝子再構成による解析結果が必ずしも一致しない例もあり、本症と EBV の関与については今後の課題と考えられる。Lin ら⁵⁷⁾によると、細胞の形質発現の解析で T 細胞性リンパ腫と考えられた症例が、遺伝子再構成による解析で B 細胞と判定された PR 患者 2 例を報告している。このように腫瘍細胞のクローン性の決定には慎重でなければならない。

結 論

最初に NPC 患者における EBV の関与を血清抗体価、EBV-DNA の立場から検討を加え、次いで各種上咽頭組織の免疫組織学的検索から NPC 発癌における EBV の関与を考察して以下の結論を得た。

1. NPC 患者 59 例の抗 EBV 抗体価 (VCA-IgG, IgA) 陽性率は (81.4, 86.4%) で、他の耳鼻咽喉科悪性腫瘍患者 (16.0, 10.0%) や、健康正常者 (4.0, 2.0%) と比較して上昇していた。NPC においては VCA-IgG よりも VCA-IgA の陽性率の方がやや高く、臨床的に NPC における腫瘍マーカーとして VCA-IgA 抗体価測定が疾患のスクリーニングや予後診断法として応用可能であると考えられた。

2. リンパ球サブセットの検討において、NPC では OKT4 $27.3 \pm 10.1\%$ 、OKT8 $32.4 \pm 6.5\%$ 、T4/8 比 0.84 ± 0.22 、健康正常者では OKT4 $39.7 \pm 12.1\%$ 、OKT8 $30.6 \pm 7.4\%$ 、T4/8 比 1.46 ± 0.67 で、NPC 患者の 6 例の T4/8 比は健康正常人に比較して有意に低下していた。

3. NPC 組織 6 検体中、5 例に切片上ハイブリッド形成法、蛍光抗体補体法でそれぞれ EBV-DNA、EBNA が検出され、NPC 発癌における EBV の密接な関係が確認された。

4. EBV 感染レセプター (CR2) は上咽頭粘膜上皮における扁平上皮細胞のみに観察され、NPC 組織には観察できなかった。

5. NPC 組織に浸潤するリンパ球は T 細胞優勢であった (中～高度の出現頻度)。また HLA-DR の発現は正常上咽頭上皮細胞には認められず、NPC 組織に種々の頻度で認められた。HLA-DR 高度陽性者は高 VCA-IgA 抗体価 (幾何学的平均値 1:100 以上) 保有者であり、両者の陽性頻度に関連性が示唆された。その結果 HLA-DR の陽性化は一つに、NPC における主要組織適合遺伝子複合体拘束性 T4 細胞の抗原認識に関係すると同時に、NPC 組織の EBV 感染レセプ

ター陰性所見から、NPC プログレッション過程における、EBV 重感染からの回避に関与すると考えられた。

6. 上咽頭の腫瘍性疾患を疑い生検した21例の免疫組織学的観察で、Waldyer 咽頭輪原発の B 細胞性悪性リンパ腫 5 例、T 細胞性悪性リンパ腫 1 例が発見された。また臨床的にいわゆる進行性壊疽性鼻炎患者の同様検索において鼻性 T 細胞性リンパ腫と診断された 1 例を発見した。本例には EBV-DNA、EBNA も検出され、本症の発症に EBV が関与していることが示唆された。このことから上咽頭部の病変における免疫組織学的及び切片上ハイブリッド形成法による情報は疾患の病態像把握と本体の解明に非常に有用であることが示された。

謝 辞

擧筆するに当り終始懇篤な御指導、御校閲を賜った恩師梅田良三教授に深謝致します。本研究の遂行にあたり貴重な御助言ならびに御協力をいただいた耳鼻咽喉科学講師古川仞博士に深謝致します。

文 献

- 1) Ali, M. Y.: Histology of the human nasopharyngeal mucosa. *J. Anat.*, **99**, 657-672 (1965).
- 2) zur Hausen, H., Shulte-Holthausen, H., Klein, G., Henle, W., Clifford, P. & Samtessen, L.: EBV DNA in biopsies of Burkitt tumors and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature*, **228**, 1056-1058 (1970).
- 3) 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).
- 4) Epstein, M. A., Achong, B. G. & Barr, Y. M.: Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet*, **1**, 702-703 (1964).
- 5) Hanto, D. D., Frizzera, G., Gajl-Peczlska, K. J., Sakamoto, K., Purtilo, D. T., Balfour, H. H. JR., Simmons, R. L. & Najarian, J. S.: Epstein-Barr virus-induced B-cell lymphoma after renal transplantation. Acyclovir therapy and transition from polyclonal to monoclonal B-cell proliferation. *N. Engl. J. Med.*, **306**, 913-918 (1982).
- 6) Jones, J. F., Shurin, S., Abramowsky, C., Tubbs, R. R., Sciotto, C. G. Wahl, R., Sands, J., Gottman, D., Katz, B. Z. & Skalar, J.: T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. *N. Engl. J. Med.*, **318**, 733-741 (1988).
- 7) Ishihara, S., Tawa, A., Yumura-Yagi, K., Murata, M., Hara, J., Yabuuchi, H., Hirai, K. & Kawa-Ha, K.: Clonal T-cell lymphoproliferation containing Epstein-Barr (EB) virus DNA in a patient with chronic active EB virus infection. *Jpn. J. Cancer Res.*, **80**, 99-101 (1989).
- 8) Shope, T., Dechairo, D. & Miller, G.: Malignant lymphoma in cottontop marmosets after inoculation with Epstein-Barr virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 2487-2491 (1973).
- 9) Epstein, M. A. & Achong, B. G.: Various forms of Epstein-Barr virus infection in man: Established facts and a general concept. *Lancet*, **2**, 836-839 (1973).
- 10) Kieff, E., Dambaugh, T., Hummel, M. & Heller, M.: Epstein-Barr virus transformation and replication. In G. Klein (ed.), *Advances in Viral Oncology*, Vol. 3, 1st ed., p133-182, Raven Press, New York, 1983.
- 11) Moss, D. J., Chan, S. H., Burrows, S. R., Chaw, T. S., Kane, R. G., Staples, J. A. & Kunaratnam, N.: Epstein-Barr virus specific T-cell response in nasopharyngeal carcinoma patients. *Int. J. Cancer*, **32**, 301-305 (1983).
- 12) 佃 守, 玉虫 昇, 持松いづみ, 御手洗佳代子, 澤木修二: 上咽頭癌患者の細胞性免疫能. *日耳鼻*, **89**, 7-13 (1986).
- 13) 宮崎純一: MHC 抗原と T 細胞レセプター相互作用の分子機構. *日本臨床*, **45**, 2858-2863 (1987).
- 14) 八木田秀雄: リンパ球機能分子と移植免疫. *臨床医*, **13**, 356-362 (1987).
- 15) Shanmugaratnam, K. & Sabin, L.: Histological typing of upper respiratory tract tumors. *Int. Histol. Classif. Tumors*, vol. 19, 32. Geneva, WHO, 1978.
- 16) Brigati, D. J., Myerson, D., Leary, J. J., Spalholz, B., Travis, S. Z., Fong, C. K. Y., Hsiung, G. D. & Ward D. C.: Detection of viral genomes and cultured cells and paraffin-embedded tissue sections using biotin-labeled hybridization probes. *Methods Virol.*, **7**, 189-226 (1984).
- 17) Fingerroth, J. D., Weiss, J. J., Tedder, R.

- F., Strominger, J. L., Biro, P. A. & Fearon, D. T.: Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4510-4514 (1984).
- 18) 渡辺慶一, 中根一穂 編集: 酵素抗体法, 改訂版, 37-121頁, 学際企画社, 東京, 1988.
- 19) Reedman, B. M. and G. Klein: Cellular localization of an Epstein-Barr virus (EBV)-associated complement-fixed antigen in producer and nonproducerlymphoblastoid cell lines. *Int. J. Cancer*, **11**, 499-520 (1973).
- 20) Volc-Platzter, B., Majdic, O., Knapp, W., Wolff, K., Hinterberger, W., Lechner, K. & Stingl, G.: Evidence of HLA-DR antigen biosynthesis by human keratinocytes in disease. *J. Exp. Med.*, **159**, 1784-1789 (1984).
- 21) Darr, A. S., Fuggle, S. V., Ting, A. & Fabre, J. W.: Anomalous expression of HLA-DR antigens on human colorectal cancer cells. *J. Immunol.*, **129**, 447-449 (1982).
- 22) Wilson, B. S., Indiveri, F., Pellegrino, M. A. & Ferrone, S.: DR (Ia-like) antigens on human melanoma cells: serological detection and immunochemical characterization. *J. Exp. Med.*, **149**, 658-668 (1979).
- 23) Pellegrino, M. A., Weaver, J. F., Nelson Rees, W. A. & Ferrone, S.: Ia-like and HLA-A, B antigens on tumour cells in long-term culture. *Transplant. Proc.*, **13**, 1935-1938 (1981).
- 24) Thomas, J. A., Iliescu, V., Crawford, D. H., Ellouz, R., Cammoun M. & De-The, G.: Expression of HLA-DR antigens in nasopharyngeal carcinoma: An immunohistological analysis of the tumour cells and infiltrating lymphocytes. *Int. J. Cancer*, **33**, 813-819 (1984).
- 25) Busson, P., Ganem, G., Flores, P., Mugneret, F., Clause, B., Caillou, B., Braham, K., Wakasugi, H., Lipinski, M. & Trrsz, T.: Establishment and characterization of three transplantable EBV-containing nasopharyngeal carcinomas. *Int. J. Cancer*, **42**, 599-606 (1988).
- 26) Mogi, G.: IgA Immunocytes in tonsils. *Acta Otolaryngol. (Stockh)*, **83**, 505-513 (1977).
- 27) Bienenstock, J. & Befus, A. D.: Mucosal immunology, *Immunology*, **41**, 249-270 (1980).
- 28) Gerber, P., Nonoyama, M., Lucas, S., Perlin, E. & Goldstein, L. I.: Oral excretion of Epstein-Barr virus by healthy subjects and patients with infectious mononucleosis. *Lancet*, **2**, 988-989 (1972).
- 29) Lemon, S. M., Hutt, L. M., Shaw, J. E., Ji, J-L. H. & Pagano, J. S.: Replication of EBV in epithelial cells during infectious mononucleosis. *Nature*, **268**, 268-270 (1977).
- 30) Karchev, T. & Kabakchiev, P.: M-cells in the epithelium of the nasopharyngeal tonsil. *Rhinology*, **22**, 201-210 (1984).
- 31) 藤吉達也, 渡辺哲生, 一宮一成, 佐藤春生, 堀文彦, 黒野祐一, 茂木五郎: 咽頭扁桃の組織構築. *日扁桃誌*, **27**, 223-231 (1988).
- 32) Ho, H. C., Kwan, H. C., Ng, M. H. & De-The, G.: Serum IgA antibodies to Epstein-Barr virus capsid antigen preceding symptoms of nasopharyngeal carcinoma. *Lancet*, **1**, 436 (1978).
- 33) Lanier, A. P., Henle, W., Bender, T. R., Henle, G. & Talbot, M.: Epstein-Barr virus specific antibody titers in seven Alaskan natives before and after diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Cancer*, **26**, 133-137 (1980).
- 34) 古川 隼, 大尾嘉宏巳, 池田千維子, 西村俊郎, 梅田良三: アデノイド組織由来上皮細胞への Epstein-Barr ウイルスの感染成立. *日耳鼻*, **91**, 20-26 (1988).
- 35) Glaser, R., De-The, G., Lenoir, G. & Ho, J. H. C.: Superinfection of epithelial nasopharyngeal carcinoma cells with Epstein-Barr virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 960-963 (1976).
- 36) Hennessy, K. & E. Kieff: One of two Epstein-Barr virus nuclear antigens contains a glycine alanine copolymer domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5665-5669 (1983).
- 37) Dambaugh, T., Hennessy, K., Chamnankit, L. & Kieff, E.: U2 region of Epstein-Barr virus DNA may encode Epstein-Barr nuclear antigen 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7632-7636 (1984).
- 38) Hennessy, K., Fennewald, S & Kieff, E.: A third nuclear protein in lymphoblasts immortalized by Epstein-Barr virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 5944-5948 (1985).
- 39) Rickstein, A., Kallin, B., Alexander, H., Lerner, R., Dillner, J. Fahraeus, R., Klein, G. & Rymo, L.: BamHI E region of the Epstein-Barr

- virus genome encodes three transformation-associated nuclear proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 995-999 (1988).
- 40) **Dillner, J., Kallin, B., Alexander, H., Ernberg, I., Uno, M., Ono, Y., Klein, G. & Lerner, R.** : An Epstein-Barr virus (EBV)-determined nuclear antigen (EBNA5) partly encoded by the transformation-associated Bam WYH region of EBV DNA: preferential expression in lymphoblastoid cell lines. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 6641-6645 (1986).
- 41) **Hennessy, K., Fennewald, S., Hummel, M., Cole, T. & Kieff, E.** : A membrane protein encoded by Epstein-Barr virus in latent growth-transforming infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 7207-7211 (1984).
- 42) **Fennewald, S., Van Santen, V. & Kieff, E.** : Nucleotide sequence of an mRNA transcribed in latent growth-transforming virus infection indicates that it may encode a membrane protein. J. Virol., 51, 411-419 (1984).
- 43) **Fahraeus, R., Hu, L. F., Ernberg I., Finke, J., Rowe, M., Klein, G., Falk, K., Nilsson, E., Yadov, M., Busson, P., Trusz, T. & Kallin, B.** : Expression of Epstein-Barr virus-encoded proteins in nasopharyngeal carcinoma. Int. J. Cancer, 42, 329-338 (1988).
- 44) **Moss, D. J., Misko, I. S., Burrows, S. R., Burmann, K., McCarthy, R. & Sculley, T. B.** : Cytotoxic T-cell clones discriminate between A- and B-type Epstein-Barr virus transformants. Nature, 331, 719-721 (1988).
- 45) **Thorley-Lawson, D. A. & Israesohn, E. S.** : Generation of specific cytotoxic T cells with a fragment of the Epstein-Barr virus-encoded p63/latent membrane protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 5384-5388 (1987).
- 46) **Sixbey, J. W., Vesterinen, E. H., Nedrud, J. G., Raab-Traub, N., Walton, L. A. & Pagano, J. S.** : Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected in vitro. Nature, 306, 480-483 (1983).
- 47) **Sixbey, J. W., Nedrud, J. G., Raab-Traub, N., Hanes, R. A. & Pagano, J. S.** : Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. N. Engl. J. Med., 310, 1225-1230 (1983).
- 48) **Wolf, H., Haus, M. & Wilmes, E.** : Persistence of Epstein-Barr virus in the parotid gland. J. Virol., 51, 795-798 (1984).
- 49) **Greenspan, J. S., Greenspan, D., Lennette, E. T., Abrams, D. I., Conant, M. A., Peterson, V. & Freese, U. K.** : Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral "Hairy" leukoplakia, an AIDS-associated lesion. N. Engl. J. Med., 313, 1564-1571 (1985).
- 50) 古川 俊, 上出文博, 三輪高喜, 作本 真, 梅田良三: 伝染性単核症における T リンパ球の動態. 耳鼻臨床, 82, 599-603 (1989).
- 51) **Misko, I., Moss, D. J. & Pope, J. H.** : HLA antigen-related restriction of T lymphocyte cytotoxicity to Epstein Barr virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4247-4250 (1980).
- 52) **Rikinon, A. B., Wallace, L. E. & Epstein, M. A.** : HLA-restricted T cell recognition of Epstein-Barr virus-infected B cells. Nature, 283, 865-867 (1980).
- 53) **Furukawa, M., Kamide, M., Miwa, T., Sakumoto, M. & Umeda, R.** : Epstein-Barr virus (EBV) infection by cocultivation of fibroblast-dominant cell line and EBV-transformed lymphocytes. ORL, 51, 69-76 (1989).
- 54) **Gazzolo, L., De-The, G., Vuillaume, M. & Ho, H. C.** : Nasopharyngeal carcinoma. II. Ultrastructure of normal mucosa, tumor biopsies, and subsequent epithelial growth in vitro. J. Natl. Cancer Inst., 48, 73-86 (1972).
- 55) **Lippman, S. M., Grogan, T. M., Spier, C. M., Koopmann, C. F., Gall E. P., Shimm, D. S. & Durie, B. G. M.** : Lethal midline granuloma with a novel T-cell phenotype as found in peripheral T-cell lymphoma. Cancer, 59, 936-939 (1987).
- 56) **Vilde, J. L., Perronne, C., Huchon, A., Lepout, C., Gehanno, P. & Marche, C.** : Association of Epstein-Barr virus with lethal midline granuloma. N. Engl. J. Med., 313, 1161 (1985).
- 57) **Lin, C. Z., Shu, C. H., Lin, S. H., Yeh, H. M., Chen, M. S., Liu, S. M., Chang, P. & Chen, P. M.** : Polymorphic reticulosis: A malignant lymphoma of B-cell lineage. Laryngoscope, 99, 307-310 (1989).

Immunohistochemical Study of Various Tissues Derived from Nasopharynx
Ken Yamamoto, Department of Otorhinolaryngology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920—J. Jusen Med. Soc., 99, 14—30 (1990)

Key words nasopharyngeal tissue, nasopharyngeal carcinoma, immunohistochemical study, in situ hybridization, human leukocyte antigen

Abstract

Nasopharyngeal mucosa shows immunological and pathological reactions against various stimuli from the outside. In this study, we investigated the difference in lymphocyte composition between normal lymphoid tissue and nasopharyngeal carcinoma (NPC) tissue, and immunohistologically identified the cells expressing human leukocyte antigen (HLA)-DR, which is one of the antigen-recognizing T-cells in the cell-mediated immune system of the host. We also examined the possibility that the HLA-DR positive cell is associated with progression of NPC and other specific diseases. Furthermore, we examined whether anti-Epstein-Barr virus (EBV)-titers and pathological observations, in combination with the in situ hybridization method, are useful for clarifying the pathogenesis and the intrinsic nature of NPC and other diseases. We observed the lymphocyte composition in the nasopharyngeal tissue obtained by biopsy for the pathological investigation of NPC and adenoid, by the immunological method, and tried to detect EBV-desoxyribonucleic acid (DNA) and Cytomegalovirus (CMV)-DNA by the in situ hybridization method. The positive ratio of the anti-EBV titer was greater in NPC-patients than that of other patients with otorhinolaryngological diseases. Immunologically, a low frequency of inducer/helper T4 positive cells and a reduced ratio of T4/T8 were observed in the NPC patients compared to those in normal subjects. Of the lymphocyte population which had permeated into the NPC tissue, T-cells were predominant and no EBV-receptor (CR2)-positive cell was observed. HLA-DR positive cells were not observed in the normal nasopharyngeal tissue but frequently observed in the NPC tissue. The patients with epithelial cells highly positive for the HLA-DR antigen, showed a high value of VCA-IgA of the anti-EBV titer, suggesting a correlation between both positive frequencies. These findings revealed that expression of HLA-DR on NPC may be related with the antigen-recognition of the major histocompatibility complex (MHC) commitment T4 cells in the NPC, and may take part in the avoidance of super-infection of EBV, in the process from CR2 negative state to NPC progression. Since EBV-DNA and EBNA are sometimes detected in B-cell and T-cell lymphoma in the nasal cavity and the nasopharynx, there is the possibility that EBV are associated with the onset of the disease. This aspect remains to be clarified.