

Epstein Barr virus 陽性胃癌に関する免疫系反応の検討

坂井 康明 大野 博之
三坂 亮一 川口 実

東京医科大学内科学第四講座
(指導：斎藤利彦主任教授)

【要旨】 EB virus (EBV) 関連胃癌が注目され、臨床病理学的特徴も明らかにされている。また、gastric carcinoma with lymphoid stroma (GCLS) における EBV の高検出率が報告されており両者の関連性も注目されている。一方 GCLS における増殖リンパ球は T 細胞系であり、腫大増殖しているリンパ濾胞も通常の慢性胃炎と異なるものである。EBV 関連胃癌と T 細胞系免疫反応の関係を明らかにするため、EBV 陽性群と陰性群に大別し浸潤リンパ球の程度や免疫学的特徴について検討した。1989 年から 1998 年の間に当院で切除され、病理組織学的検索にて粘膜下層 (submucosal layer: SM) 以深に浸潤する胃癌で、病巣部にリンパ球集簇とリンパ濾胞形成を認める GCLS24 症例と軽度リンパ球浸潤の 78 症例計 102 症例を対象とした。GCLS 群 24 症例中 15 症例 (62.5%) が EBV 陽性、軽度リンパ球浸潤群 78 症例中 7 症例 (9.0%) が EBV 陽性であった。次にリンパ球カウント可能な EBV 陽性胃癌 21 症例についてリンパ球サブセットを検索した。EBV 陽性例では陰性例に比べて癌巣内で T 細胞系では CD8 及び B 細胞系では CD79a が有意に高値であった。また、癌巣周囲では CD8 のみが高かった。EBV 陽性胃癌では B リンパ球の宿主の過剰反応が認められ、細胞障害性 T 細胞が癌巣内、癌巣周囲に深く関係していると考えられた。

はじめに

Epstein Barr virus (EBV) はヒト腫瘍ウイルスとしては最初のもので、1964 年に Burkitt リンパ腫の培養細胞から分離されている¹⁾。その後、胃癌細胞にも EBV が検出され²⁾、さらに高感度検出法の開発にともない gastric carcinoma with lymphoid stroma (GCLS) における EBV の高検出率が報告³⁻⁵⁾ されるようになってきている。これまでの諸家の検討^{6,7)} により胃癌と EBV の臨床病理学的特徴についてはほぼ明らかにされ、さらに胃癌発生への関与についても研究されてきている⁸⁾。EBV の感染経路については口腔粘膜上皮から B リンパ球に感染した後、B リンパ球内で潜在感染状態となり、その一部が各種臓器局所で存在し続けることが推測されている⁹⁾。

しかし、胃粘膜上皮細胞への EBV 再感染やその際の EBV 再活性の機序、あるいは免疫反応の関与については不明な点が多い。

目 的

今回、EBV 関連胃癌について、臨床病理学的特徴を再検討するとともに、EBV 再感染が局所免疫とどのような関係にあり、発癌にどのような役割を果たしているかを知るために、胃癌局所の浸潤リンパ球サブセットを検索し、部位別、リンパ球浸潤程度別に EBV 陽性胃癌と陰性胃癌を検討した。

対 象

1. EBV 検出については、東京医科大学病院において 1989 年から 1998 年までに外科的切除された、

1999 年 12 月 17 日受付, 2000 年 1 月 19 日受理

キーワード: EB ウイルス, 胃癌, In situ hybridization (ISH), Polymerase chain reaction (PCR).

(別刷請求先: 〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学内科学第四講座 坂井康明)

癌巣及び周囲のリンパ球浸潤が比較的観察しやすく、連続切片で対比可能である、一切片内に腫瘍がおさまる長径4 cmまでの深達度SM以深の胃癌102症例を対象とした。ただし術前に、化学療法、放射線療法、ホルモン療法などが行われていない症例を用いた。平均年齢60.6才、男女比4:1である。

2. 前述したEBV検出対象と同症例(102症例)を、EBV陽性胃癌と陰性胃癌に分けて臨床病理学的に比較検討した。

3. 局所免疫反応(リンパ球サブセット)の検討は2.で検討した症例のうちリンパ球浸潤を認めたものを対象とし、EBV陽性胃癌と陰性胃癌における局所炎症反応の検討を行った。

方 法

1. EBV 検出

1) In situ hybridization (ISH) 法による検出

手術材料をホルマリン固定後、パラフィン切片を作成し、最大割面部の切片についてEBER ISH法を用いEBVを検索した。約90%以上の癌細胞の核が褐色に染色されるものをEBV陽性胃癌と判定した。なおISH法の概略をTable 1に示す。

2) Polymerase chain reaction (PCR) 法による検出

ISH法の精度を裏づけるために、ISH法施行例のうち15症例についてPCR法をおこなった。

①DNAの抽出：切除された胃癌の癌細胞、正常粘膜、リンパ節の凍結細胞から、フェノール、クロロホルム、イソアミルアルコールによりDNAを抽出した。primerは、BamHI-W領域を増幅する目的にてTC60(ビオチン標識5'-GTT CGC GTT GCT

AGG CCA CC-3'), TC61(ビオチン標識5'-AGG ACCA CTT TAT ACC AGG G-3')を使用し、Positive controlはBurkittリンパ腫由来培養細胞株(RAJI TCRB9012)¹⁰⁾を用い以下の手順で行った。

②10+PCR反応緩衝液(pH 8.0) buffer中、各2.5 mM dNTP, Taq, DNA polymerase (5U), 0.2 mM Primer, Template 50 ngに調節した。

③サーマルサイクラーにて、Denature time 94°C 1分, Annealing time 54°C 1分, Extension time 72°C 1分, 30 Cycle, 72°C 5分で増幅を行った。

④それらにetidium bromide添加、3%アガロースゲル(Nusive GTG; Sekam GTG=3:1)にて電気泳動、後トランスイルミネーターにて観察した。

2. 臨床病理学的検討

手術標本はホルマリン固定後、4~5 mm幅に連続切片を作成した。胃癌取り扱い規約¹¹⁾に従い、肉眼型、組織型を分類するとともに、占拠部位、癌巣内および周囲のリンパ球浸潤の有無と程度などについて、EBV陽性胃癌とEBV陰性胃癌に分け比較検討した。また、リンパ球浸潤の程度については粘膜固有層および粘膜下層を鏡検し、A群はリンパ濾胞の腫大やリンパ球の浸潤増殖が著しく、癌巣を完全に取り囲んでいる、いわゆるGCLS症例とした。B群はリンパ濾胞がほとんどなく、リンパ球浸潤は明らかであるが、癌巣周囲に部分的に認められる軽度リンパ球浸潤症例である。C群は浸潤が目立たない症例、の3群に分けてEBV陽性率を比較検討した。

3. 局所免疫反応(リンパ球サブセット)の検討

EBV陽性胃癌と、EBV陰性胃癌について連続切片を作成し、リンパ球サブセットを酵素抗体法(LSAB法)により検討した。モノクローナル抗体は、CD3(DAKO社)、CD4(NOVOCASTRA社)、CD8(DAKO社)、CD57(DAKO社)、CD79a(DAKO社)を用いた。癌巣内および癌巣周囲にわけ、各々浸潤するリンパ球を各染色標本上の同一部位で100個ずつ2ヶ所、計200個について観察した。Fig. 1~5のように褐色に染色された細胞を陽性と判定し、陽性細胞の百分率をもとめた。リンパ球浸潤の程度については、前述のA群(GCLS症例)とB群(軽度リンパ球浸潤症例)の2群に分け、各群の陽性細胞百分率の平均値を求め、EBV陽性胃癌と陰性胃癌を比較した。

統計学的検討はt検定及び χ^2 検定を用い、危険率5%未満を有意差ありとした。

Table 1 In situ hybridization (ISH 法)

脱パラフィン, 脱水
↓
プロテナーゼK消化
↓
FITC 標識
EBER 領域へ EB ウイルス EBER RNA プローブを添加,
55°C で 1 時間 30 分 ハイブリダイズ
↓
TBS で 洗 浄
↓
抗 FITC で アルカリ フォスファターゼ で 30 分 間 発 色
↓
EBV 陽性, 陰性 判 定

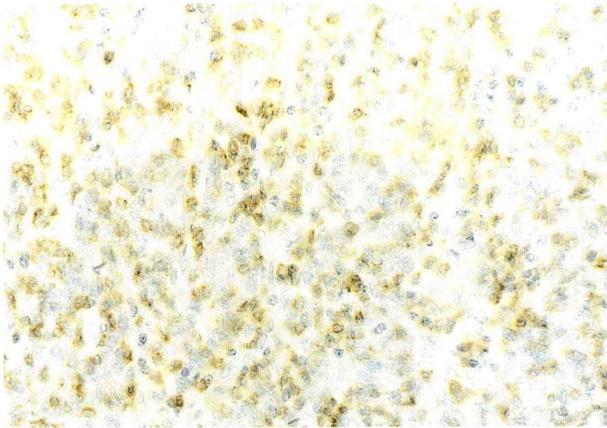


Fig. 1 High-power view of a CD3 immunofluorescence stained lesion of an EBV-positive gastric carcinoma. Mature T cells are stained in brown. (×200)

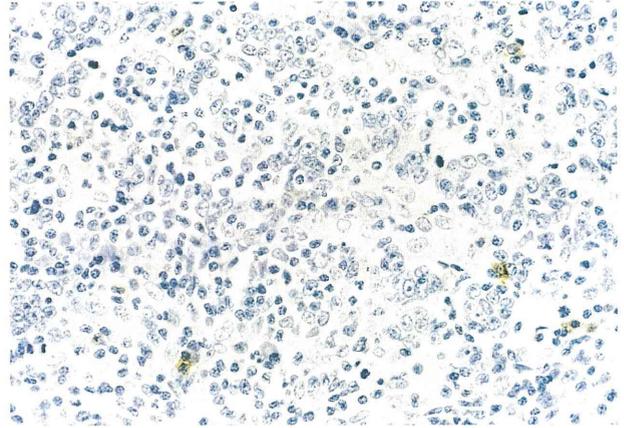


Fig. 4 High-power view of a CD57 immunofluorescence stained lesion of an EBV-positive gastric carcinoma. Natural killer cells are stained in brown. (×200)

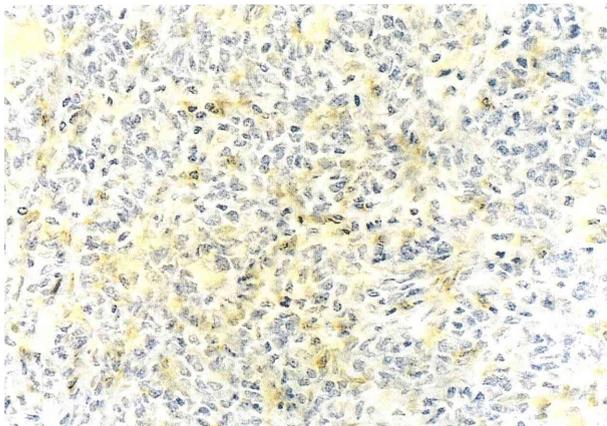


Fig. 2 High-power view of a CD4 immunofluorescence stained lesion of an EBV-positive gastric carcinoma. Helper T cells are stained in brown. (×200)

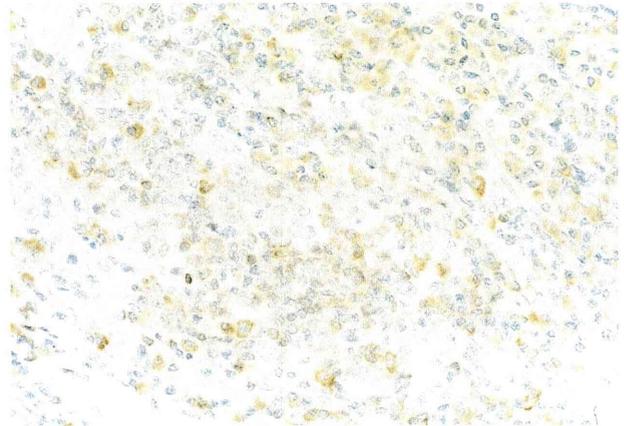


Fig. 5 High-power view of a CD79a immunofluorescence stained lesion of an EBV-positive gastric carcinoma. B cells are stained in brown. (×200)



Fig. 3 High-power view of a CD8 immunofluorescence stained lesion of an EBV-positive gastric carcinoma. Suppressor T cells are stained in brown. (×200)

結 果

1. EBV 検出

EBER-ISH 法による EBV 陽性率は 102 症例中 22 症例 21.6% であり、80 症例 78.4% が EBV 陰性であった。平均年齢は EBV 陽性 57.8 歳、陰性 61.4 歳、男女比は EBV 陽性 22 : 1、陰性 3.9 : 1 であった。代表的な EBV 陽性症例 (深達度 SM の IIc 型早期癌) を示す。HE 染色ルーペ像 (Fig. 6) では、粘膜下層は充実性に増殖する中分化型管状腺癌と周囲の著明なリンパ球浸潤により肥厚し、癌巣は軽度隆起している。ISH 法ルーペ像では癌細胞のほとんどで EBV 陽性の染色性を示している (Fig. 7)。同症例の粘膜下層における浸潤部の強拡大像では、腫瘍内

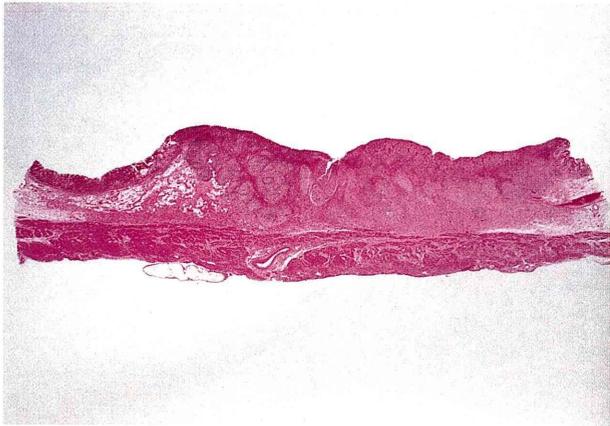


Fig. 6 EBV-positive gastric carcinoma. Magnified view of carcinoma tissue stained with hematoxylin and eosin. An adenocarcinoma is grown in the medulla and partially invades the submucosal layer. The lesion is massively infiltrated by lymphocytes.

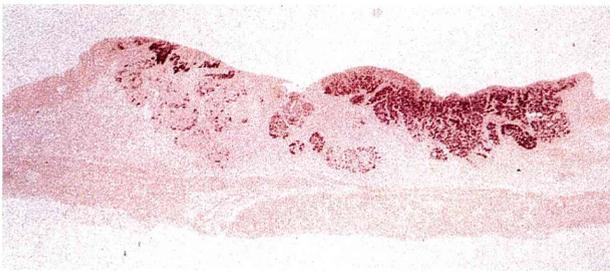


Fig. 7 Magnified view of in situ hybridization (ISH) of the same lesion as shown in Figure. 6. The epithelial cells of the carcinoma are positive for EBV.

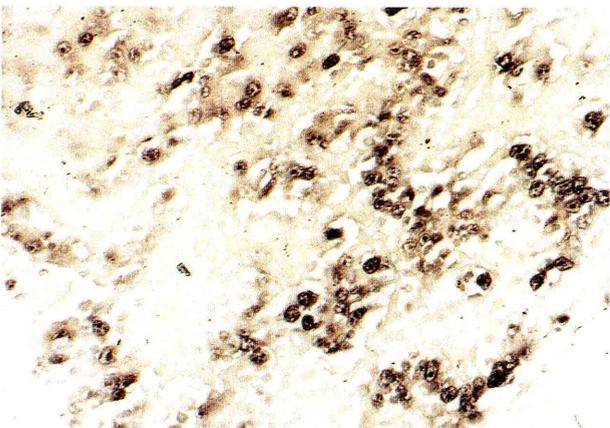


Fig. 8 High-power view of a lesion of an EBV-positive gastric carcinoma obtained by the ISH method. Nuclei of the carcinoma epithelial cells are specifically positive for argentaffin granules. (×200)

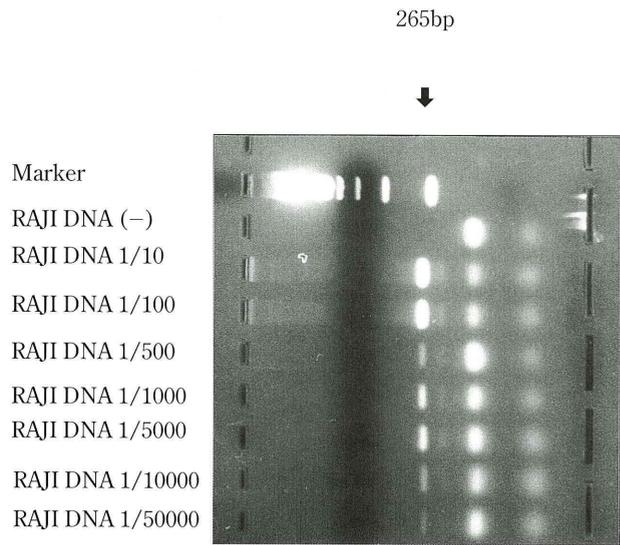


Fig. 9 Results of agarose electrophoresis. The DNA bands of EBV from Raji cells detected by PCR even at a ratio of 1/50000.

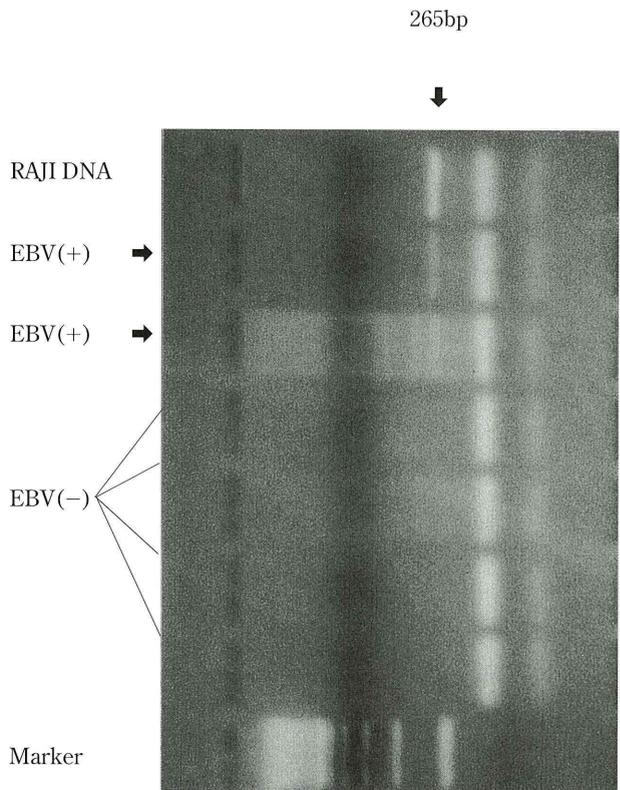


Fig. 10 Result of agarose electrophoresis. Note the positive DNA bands of EBV indicated by the arrow. DNA samples were obtained from gastric carcinoma tissue, surrounding region and lymph node and were amplified by PCR.

Table 2 ISH and PCR

	EBV 陽性	EBV 陰性	全体
ISH	4(26.7)	11(73.3)	15(100)
PCR	4(26.7)	11(73.3)	15(100)

陽性症例，陰性症例は共に同症例。

()%

Table 3 Location

	EBV 陽性	EBV 陰性	全体
穹隆部	4(18.2)	4(5.0)	8(7.8)
噴門部	2(9.2)	9(11.2)	11(10.8)
体上部	9(40.9)*	16(20.0)	25(24.5)
体中部	4(18.2)	15(18.7)	19(18.6)
体下部	1(4.5)*	17(21.3)	18(17.6)
胃角部	1(4.5)	8(10.0)	9(8.8)
前庭部	1(4.5)	11(13.8)	12(11.8)
合計	22(100)	80(100)	102(100)

*p<0.05
()%

Table 4 Macroscopic type

	EBV 陽性			EBV 陰性			全体		
進行癌	9	(29.0)	[41.0]	22	(71.0)	[27.5]	30	(100)	[30.4]
Type 1	0	(0)	[0]	1	(1.2)	[1.2]	1	(100)	[1.0]
Type 2	2	(12.5)	[9.1]	14	(87.5)	[17.6]	16	(100)	[15.7]
Type 3	5	(45.5)	[22.7]*	6	(54.5)	[7.5]	11	(100)	[10.8]
Type 4	2	(66.7)	[9.1]	1	(1.2)	[1.2]	3	(100)	[2.9]
早期癌	13	(18.3)	[59.0]	58	(81.7)	[72.5]	71	(100)	[69.6]
0 I	0	(0)	[0]	4	(100)	[5.0]	4	(100)	[3.9]
0 II a	2	(33.3)	[9.1]	4	(66.7)	[5.0]	6	(100)	[5.9]
0 II c	9	(17.0)	[40.9]	44	(83.0)	[55.0]	53	(100)	[52.0]
0 II a+II c	2	(25.9)	[9.1]	6	(75.0)	[7.5]	8	(100)	[7.8]
合計	22	(21.6)	[100]	80	(78.4)	[100]	102	(100)	[100]

*p<0.05

() %タイプ別EBV 陽性，陰性率
[] % EBV 陽性，陰性例における肉眼型別頻度

に著明なリンパ球浸潤を認めるとともに，多数の癌細胞の核に一致して EBER シグナル陽性を認める (Fig. 8).

PCR の positive control としておこなわれたプライマー Burkitt リンパ腫 (Raji DNA) による PCR では DNA は 1/50000 の希釈にても EBV 陽性 (265 bp) が確認できた (Fig. 9).

PCR 法での EBV 陽性例では 265 bp で陽性が認められ，陰性例では認められなかった (Fig. 10).

PCR 法では EBV 検出対象 102 症例から無作為に抽出した 15 症例中 4 症例 (26.7%) が EBV 陽性であり，これらは ISH 法でも EBV 陽性を示していた。

また，陰性 11 症例は ISH 法でも EBV は検出されず，ISH 法の妥当性が示された (Table 2).

2. EBV 陽性胃癌の臨床病理学的検討

1) 占拠部位 (Table 3)

EBV 陽性胃癌では EBV 陰性胃癌に比べて，胃体上部 (40.9%) が有意に多く ($p < 0.05$)，穹隆部 (18.2%) でも多い傾向を認めた。一方胃体下部 (4.5%) では有意に少なく ($p < 0.05$)，胃角部 (4.5%)，胃前庭部 (4.5%) で少ない傾向を認めた。

2) 深達度と肉眼型 (Table 4)

進行胃癌の EBV 陽性率を比較すると 29.0% (9/31) と早期胃癌 18.3% (13/71) よりも高い傾

Table 5 Histological type

	EBV 陽性	EBV 陰性	全 体
tub 1	0 (0)	19 (23.8)	19 (18.6)
tub 2	12 (54.5)	35 (43.8)	47 (46.1)
por	12 (45.5)*	16 (20.0)	26 (25.5)
sig	0 (0)	9 (11.2)	9 (8.8)
pap + muc	0 (0)	1 (1.2)	1 (1.0)
合 計	22 (100)	80 (100)	102 (100)

*p<0.05
(%)

Table 6 Ratio of lymphocyte in filtration and EBV infection in gastric carinome.

	EBV 陽性	EBV 陽性	全 体
A 群 (GCLS)	15(62.5)**	9(37.5)	24(23.5)
B 群 (リンパ球浸潤(+))	6(10.9)*	49(89.1)	55(53.9)
C 群 (リンパ球浸潤(-))	1(4.3)*	22(95.7)	23(22.6)
合 計	22(21.6)	80(78.4)	102(100)

**p<0.01
*p<0.05
(%)

CD 3

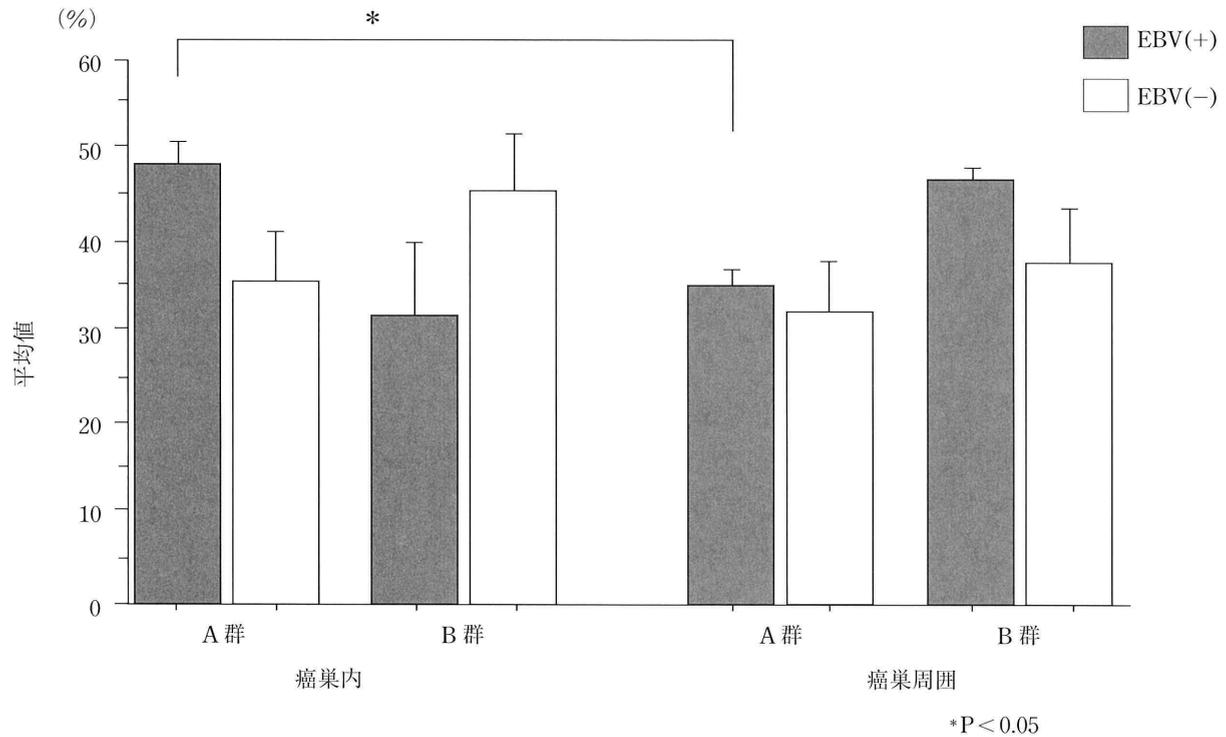


Fig. 11

向であった。EBV 陽性胃癌のうち進行癌について肉眼型を陰性胃癌と比較してみると Type 3 22.7% が最も多く (p<0.05), Type 4 でも 9.1% と多い傾向を認めた。早期胃癌では IIa が 9.1% と多い傾向を認めた。EBV 陽性の IIc は 40.9% と全 EBV 陽性胃癌中最多であったが, EBV 陰性 IIc の 55.1% にくらべると低率であった。

3) 組織型 (Table 5)

EBV 陽性胃癌では por が 45.5% と EBV 陰性 20.0% に比べて有意に多く (p<0.05), tub 2 もや

や多い傾向であった。tub 1 は EBV 陽性胃癌では認めなかった。

4) リンパ球浸潤の程度による EBV の陽性率 (Table 6)

癌巣周囲のリンパ球浸潤の程度を, 前述した A, B, C 群の 3 群に分けて, EBV 陽性率を比較検討した。A 群 (GCLS 症例) 24 症例のうち, EBV 陽性は 15 症例 62.5% と半数以上占めていた (p<0.01)。B 群 (軽度リンパ球浸潤症例) 55 症例では, EBV 陽性は 6 症例 10.9% と少なかった。C 群 (リンパ球

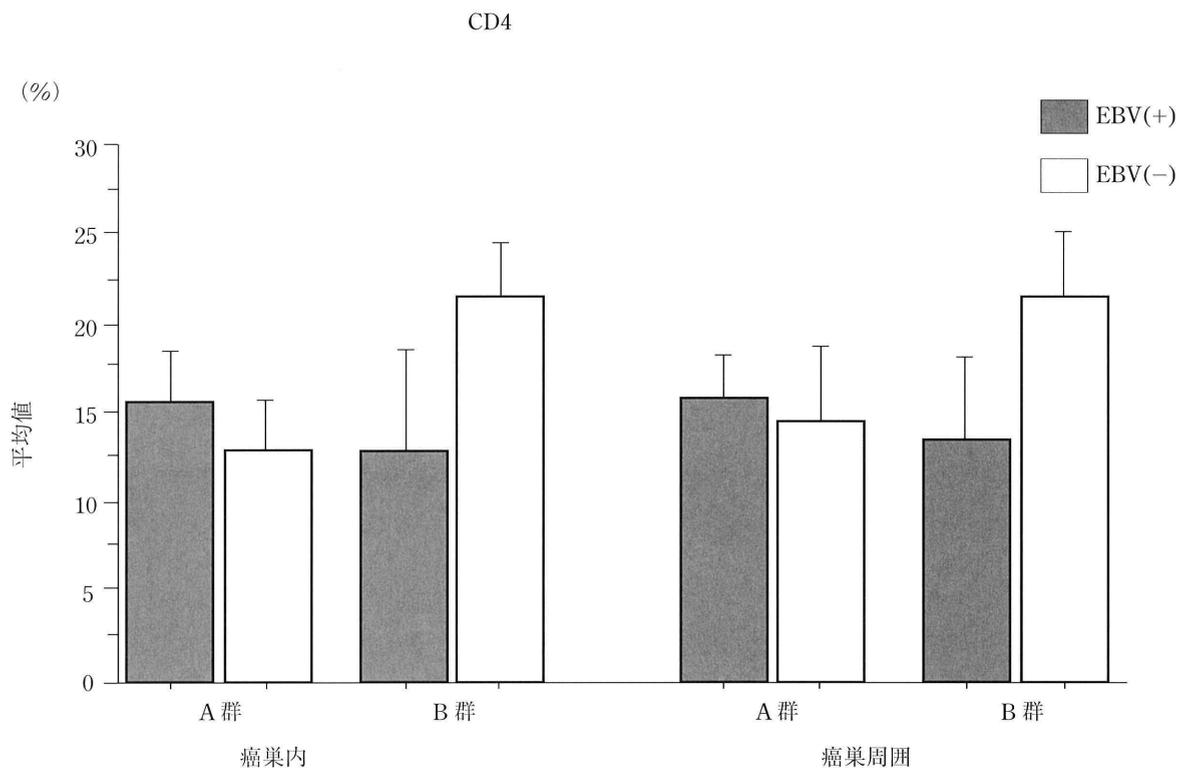
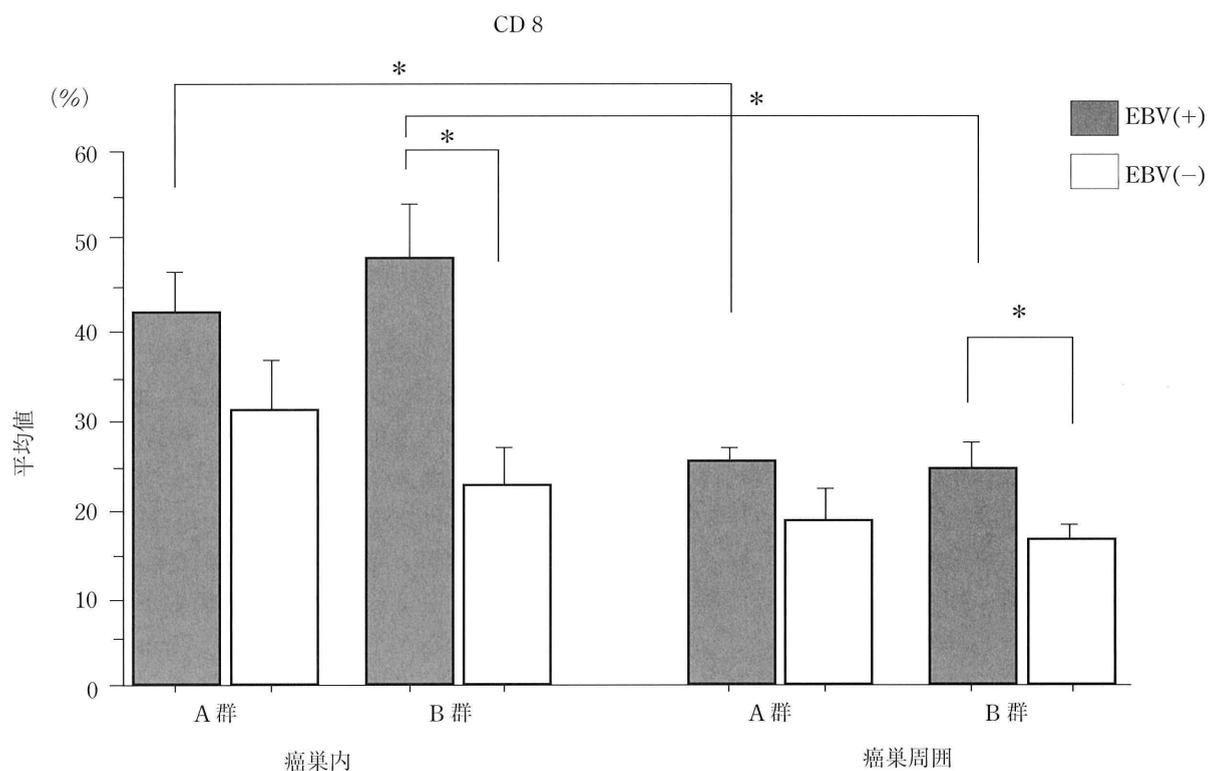


Fig. 12



*P < 0.05

Fig. 13

浸潤（－）群）23症例では、22症例95.7%がEBV陰性で、EBV陽性は1症例4.3%のみであった。

3. 局所免疫反応（リンパ球サブセット）の検討

1) CD3（成熟T細胞）

癌巣内をみると、A群のEBV陽性胃癌（47.9%）が陰性胃癌（35.6%）に比べて有意差はみとめられないが高値を示した。これに対してB群では、陰性胃癌（49.3%）が陽性胃癌（31.5%）より高い傾向を示し、A群の場合と相反していた。

癌巣周囲ではA群、B群ともにEBV陽性胃癌が高い傾向であった。

癌巣内と癌巣周囲の比較ではA群で癌巣内（47.9%）が癌巣周囲（34.9%）より有意に高値であった（ $p < 0.05$ ）。(Fig. 11)

2) CD4（ヘルパーT細胞）

癌巣内でのA群は、EBV陽性胃癌（15.5%）が陰性胃癌（13.0%）より高値で、B群では、EBV陰性胃癌（21.6%）が陽性胃癌（13.0%）よりも高値であった。この分布パターンはCD3の癌巣内のものと同じ分布パターンであった。

癌巣周囲でも、同様パターンを示し、A群ではEBV陽性胃癌（16.0%）が、陰性胃癌（13.5%）よりやや高く、B群では、陰性胃癌（21.7%）が陽性胃癌（13.5%）よりも有意差は認めないもの高い傾向をみとめた（Fig. 12）。

c) CD8（細胞障害性T細胞）

癌巣内では、A群のEBV陽性胃癌（41.1%）が陰性胃癌（30.8%）に比較し高値で、さらにB群では、陽性胃癌（47.3%）が有意に高値であった（ $p < 0.05$ ）。

癌巣周囲においても、A群、B群ともに、陰性胃癌に比べEBV陽性胃癌が高値で、B群において有意差を認めた（ $p < 0.05$ ）。一方、A群のEBV陽性胃癌について癌巣内と癌巣周囲を比べると、癌巣内に有意に増加しており（ $p < 0.05$ ）、B群も同様の結果であった（Fig. 13）。

d) CD57（NK細胞サブセット）

CD57陽性細胞は、いずれの群でも低値であった。癌巣内では、A群のEBV陽性胃癌（3.8%）が陰性胃癌（5.8%）より低値で、B群では陽性胃癌（10.8%）が陰性胃癌（9.0%）よりわずかに高値であった。癌巣内においてEBV陽性胃癌のCD57細胞数をA群とB群で比較するとB群が有意に高値であった（ $p < 0.05$ ）。癌巣周囲では、A群、B群と

ともにEBV陽性胃癌がやや高値であった（Fig. 14）。

e) CD79a（B細胞）

癌巣内では、EBV陽性胃癌が、A群で41.5%と陰性胃癌に比べ高値であり、B群（45.7%）では陰性胃癌に比べ有意差をもって高率であった（ $p < 0.05$ ）。癌巣周囲では、EBV陽性胃癌と陰性胃癌の間に差はみられなかった。しかし、A群とB群を比較すると、B群で、CD79a陽性細胞が多い傾向を認めた（Fig. 15）。

考 察

1. EBV 検索および臨床病理学的検討

EBVは1964年パーキットリンパ腫の培養細胞から分離された、ヘルペスウイルス科に属する2本鎖DNAウイルスである¹¹⁾。研究初期にはEBV関連疾患として、非腫瘍性では伝染性単核球症（Infectious mononucleosis: IM）が、腫瘍性ではリンパ腫が代表的疾患である。その後Oldらの報告¹²⁾をはじめとして、上皮性腫瘍である上咽頭癌とEBVの関連性について詳細な研究がなされてきている。最近、これまでのウイルス学、細菌生物学、分子生物学の知見をもとに、PCR法、ISH法、免疫細胞化学等、高感度の手法を応用して、上咽頭癌（リンパ上皮腫）に類似した組織像を呈する癌を中心に、他臓器の腫瘍についてもEBVの存在が検討されるようになり、その結果、1990年Burkeら¹³⁾がEBV関連胃癌を報告するに至っている。一方、すでに1976年にWatanabeら¹⁴⁾は、低分化腺癌ながらリンパ球浸潤を伴い、予後の良い胃癌としてgastric carcinoma with lymphoid stroma (GCLS)の概念を発表している。リンパ上皮腫類似胃癌はこのGCLSに包含され、80-90%にEBV陽性であることが判明している。その後、さらに通常の組織像を示す胃癌についても検討が加えられ、EBV関連胃癌がリンパ上皮腫類似癌に限らないこと、またそれらには多少のリンパ球浸潤が伴っていることも判明している^{15, 16)}。今回、我々がEBV検出のために用いたISH-EBER法はEBV潜在感染細胞が多量に産生する低分子RNA (Epstein Barr Virus-encord small RNA: EBER) を標的にした方法で、EBV潜在感染診断に用いられる、極めて高感度な検出法^{15, 17)}である。また、本研究におけるPCR法 positive control実験で、primerであるBurkittリンパ腫によるPCRでは、DNAは1/50000の希釈にても

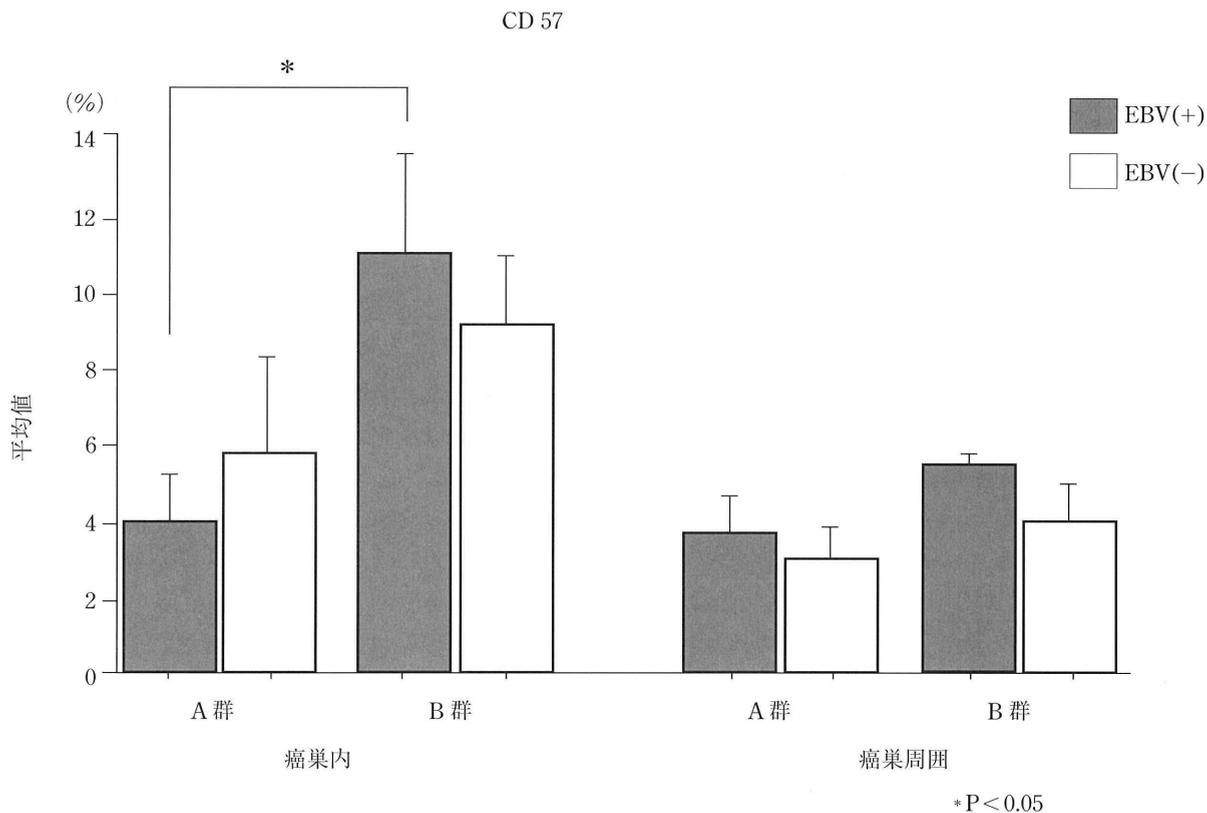


Fig. 14

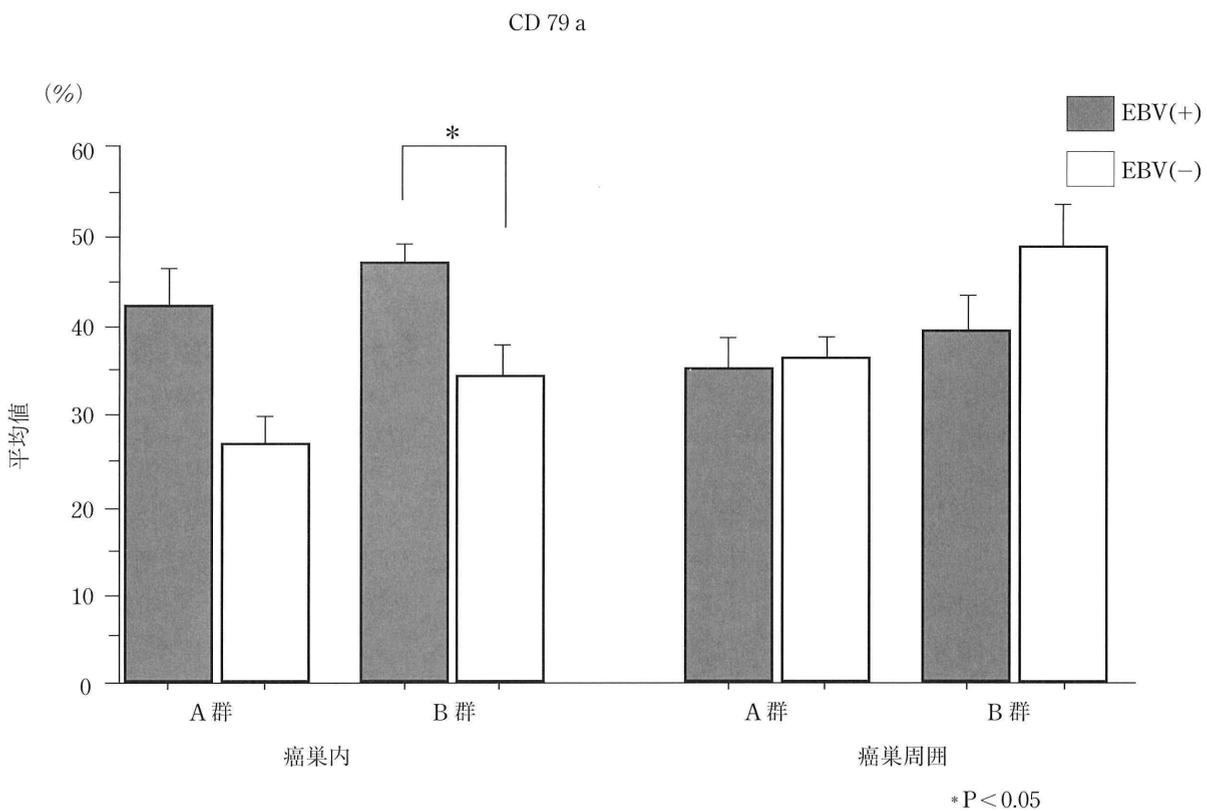


Fig. 15

EBV陽性が確認された。すなわちEBVのDNAについては細胞単位で確実に検出できる精度を示していた。

ここで、ISH-EBER法を用いたEBV関連胃癌の報告について、臨床病理学的特徴をまとめると、

1. 腫瘍内のほとんどの細胞に陽性像が認められる。2. 早期胃癌、進行胃癌における頻度に有意差はない。3. 癌占拠部位としては穹隆部、噴門部、胃体上部に集中している。4. 肉眼的には陥凹主体の病巣（IIc, 3型など）が多く、これらはリンパ球浸潤により、多少なりとも隆起を呈している。5. リンパ上皮腫類似胃癌に高頻度に認められる。6. 組織型は低分化腺癌あるいは未分化癌が主体をなしている。7. 男性に有意に多い。

などを挙げるができる。1. については、本研究でも同様にEBV陽性胃癌において腫瘍内のほぼ全ての細胞に陽性シグナルを確認できた。また、2. の頻度は本研究では進行胃癌のEBV陽性率が29.0% (9/31) と早期胃癌18.3% (13/71) に比べてやや高く、諸家の報告と若干異なっていた。3. の占拠部位もほぼ同様に、穹隆部 (18.2%)、胃体上部 (40.9%) が多いという結果であった。4. の肉眼的については肉眼型は、Type 3 (22.7%) とIIa (9.1%) が多い傾向にあった。5. のリンパ上皮腫類似胃癌について、リンパ上皮腫類似胃癌の典型例をGCLSとすると、GCLS24症例中EBV陽性は15症例、62.5%と半数以上を占めていたが、諸家の報告^{2, 16)} 80-90%よりは低率であった。B群としたリンパ球軽度浸潤EBV陽性症例は検討胃癌102症例中6症例で5.9%であり、諸家の報告6.2²⁾-9.5¹⁷⁾%と同程度であった。また、リンパ球浸潤を認めないEBV陽性胃癌1症例 (約1.0%) を認めた。6. の組織型では、EBV陽性胃癌はpor, tub2のみで、高分化型管状腺癌 (tub1) は認められなかった。

7. の男女比は、EBV陽性症例では21:1、EBV陰性症例では4:1であり、EBV陽性胃癌では男性に有意に多かった。以上より、以前からいわれている結果とほぼ同様であることが再確認できた。

2. EBV陽性胃癌における局所免疫反応の特徴

1) T細胞系サブセット

Watanabeら¹⁴⁾のGCLSはその後、EBV encoded RNA (EBER)を用いた多数の報告によりEBV関連胃癌として位置づけられている。本邦胃癌の約7%がEBV関連胃癌であり、GCLSの80-90%が

EBV陽性である。これらはEBV陽性の低分化腺癌とその周囲を取り囲む多数のTリンパ球により形成されており、周囲のTリンパ球はCD8陽性で細胞障害性Tリンパ球であることが明らかとなっている¹⁸⁾。我々の検討でも、EBV陽性胃癌の癌巣内において、CD8はEBV陽性の方が陰性胃癌よりも高率に認められ、特にリンパ球軽度浸潤群では有意差を認めた。また、癌巣周囲でも同様に、CD8はEBV感染胃癌に高率で、リンパ球軽度浸潤群で有意差を認めた。他疾患の局所免疫についてみると、伝染性単核球症では、末梢血に認められる多数の異型リンパ球は、細胞障害性Tリンパ球であり、また、上咽頭癌でみられる浸潤リンパ球も細胞障害性Tリンパ球であることが、報告されている^{3, 19)}。これらは腫瘍細胞やウイルスに対する反応¹⁴⁾と考えられ、特にリンパ球軽度浸潤症例で有意にCD8の高値を認めたことは、注目すべきことであった。またCD8陽性細胞の浸潤は癌巣内において癌巣周囲に比べ、有意に高率であり、このことは、癌細胞自身が産生するIL1などのサイトカインによって細胞障害性Tリンパ球が浸潤するという考え^{20, 21)}を支持する結果と思われる。

リンパ球浸潤程度により2群に分けてEBVの陽性率をみると、A群 (GCLS) では62.5%と高率にEBV陽性を認めたが、B群 (リンパ球の軽度浸潤例) では10.9%と低かった。この2群間に免疫学的差が存在するかを検討してみると、癌巣周囲では、CD4, CD8でA群 (GCLS)の方がやや高く、CD3, CD57はやや低い傾向を認めたが、有意差は認められなかった。癌巣内においてはCD3, CD4はA群 (GCLS)が高く、CD8, CD57はB群 (軽度浸潤例)が高いという結果で、特にCD57では有意にB群 (軽度浸潤例)が高かった。すなわち、周囲のリンパ球浸潤は浸潤程度によるサブセットの多くに大差はないが、GCLSとはいえないリンパ球浸潤の軽度なものでは腫瘍内部のCD57陽性細胞すなわちNatural Killer (NK)細胞が有意に増加していた。NK細胞がヘルペスウイルスや一部の細菌に対して障害性に働くことが知られており^{3, 22)}、EBVに対しても細胞障害性に作用する可能性が示唆された。そして同じEBV (+)にA群とB群ではリンパ球サブセットの分布が異なるのはA群はB群よりEBV陽性率が多いことより癌化に関して免疫反応が影響する事が示唆された。

3. EBV 再活性と局所免疫反応

EBV 関連腫瘍の発生を考える場合、非腫瘍性組織における潜在感染の有無が重要である。EBV の感染経路については、ほぼ十分な説明がなされている。EBV は通常口腔粘膜上皮に感染し、上皮細胞間に存在するリンパ球の Bcell に感染が成立し、Tcell により不活化される。胃粘膜において、Fukayama ら^{9, 16)} は、非癌部胃底腺領域粘膜の剥離上皮細胞と、その周囲に浸潤するリンパ球に EBV 陽性シグナルを示す細胞を確認している。このことから、腺頸部の増殖帯近傍で EBV 保有リンパ球から、上皮細胞に再感染が成立すると推測される。この再感染の際には、宿主側に免疫不全のような EBV 再活性をうながす要因が必須¹⁸⁾ である。また最近、田中²³⁾ は EBV が胃粘膜上皮細胞に再感染した後、P53 蛋白とウイルス蛋白が結合し、これが胃癌発生の原因の一つと考えられると報告している。しかし、健常者における EBV の再活性については不明な点が多い。今回の研究では、GCLS 群やリンパ球軽度浸潤群の EBV 陽性胃癌において、B リンパ球の標識抗原である CD79a が、癌巣内で高率に検出された。このことは、胃粘膜局所における EBV 再感染には、B リンパ球の過剰反応あるいは、異常増加が要因となることを推測させる。また B リンパ球の異常増加の要因としては、*Helicobacter pylori* 感染や、慢性胃炎などが考えられている²⁴⁻²⁷⁾ が、現時点では不明である。さらに、腫瘍内における NK 細胞の増加が、EBV の再活性に何らかの影響を与えている可能性も推測される。このような条件で B リンパ球も活性化し、形質細胞への分化が再開される。EBV 関連胃癌においては通常の胃癌よりも IgA が高値を示すとの報告^{6, 28)} があり、集簇した多数のリンパ球が形質細胞へと分化し、多量の IgA 複合体を産生するものと思われる。上皮細胞基底膜から細胞内に入り IgA は Secretary component と結合した状態で放出される。同様に EBV も胃腺窩上皮頸部 Stem 細胞に再感染すると推測される。

結 論

SM 以深の胃癌 102 症例を検討し、以下の結果を得た。

1. 進行胃癌 29.0%，早期胃癌 18.3% に EBV 陽性を認め、臨床病理学的には、① 男性に多い。② 穹隆部、胃体上部に多い。③ Type3, IIa が多い。

④ por, tub2 が多い、という結果であった。

2. GCLS 群の 62.5%，リンパ球軽度浸潤群の 10.9% に EBV 陽性胃癌を認めた。両群間リンパ球サブセットを比較すると、腫瘍内の NK 細胞において後者が有意に高かった。また、リンパ球浸潤のない胃癌にも EBV 陽性を 1例認めた。

3. EBV 陽性胃癌の浸潤リンパ球では、CD8 が特に高率に認められた。すなわち、EBV 胃癌における細胞障害性 T リンパ球の増加が確認された。この CD8 の増加は癌巣周囲よりも癌巣内で有意に高かった。

4. EBV 陽性胃癌は陰性胃癌に比べ、癌巣内における B リンパ球の増加を認めた。特にリンパ球軽度浸潤群では有意差を認めた。

以上のことから、EBV 陽性胃癌に浸潤しているリンパ球のうち、T リンパ球は、反応性浸潤増殖で、その主体は細胞障害性 T リンパ球であることが確認された。また、腫瘍内においては B リンパ球の異常増殖が EBV 再感染を起こす条件であることが推測された。さらに癌巣内で、NK 細胞が、有意に高く、これが、EBV 再活性に関与している可能性のあることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御校閲を賜りました斎藤利彦教授に深く感謝いたします。

また標本作成に尽力いただいた戸田国治技師に深く感謝いたします。なお本論文の要旨は、第 85 回日本消化器病学会において発表した。この研究費の一部は、平成 10 年度私学助成金大学院重点特別経費を受けて行われた。

文 献

- 1) Epstein MA, Achong BG, Barr YM: Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* **I**: 702~703, 1964
- 2) Tokunaga M, Land CE, Uemura Y, Tokudome T, Tanaka S, Sato E: Epstein-Barr virus in gastric Adenocarcinoma. *Am J Pathol.* **143**: 1250~1254, 1993
- 3) Imai S, Koizumi S, Sugiura M, Tokunaga M, Uemura Y, Yamamoto N, Tanaka S, Sato E, Osato T: Gastric carcinoma: monoclonal epithelial malignant cells expressing Epstein-Barr virus latent infection protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 9131~9135, 1994

- 4) Oda K, Tamura J, Takenouchi T, Mikata A, Nunomura M, Saitoh, Sarashina H, Nakajima N : Association of Epstein-barr virus with gastric carcinomas with lymphoid stroma. *Am J Pathol* **143** : 1063~1071, 1993
- 5) Mori M, Watanabe M, Tanaka S, Mimori K, Kuwano H, Sugimachi K : Epstein-barr virus-associated carcinomas of the esophagus and stomach. *Arc Pathol Lab Med* **118** : 998~1001, 1994
- 6) Rowlands DC, Ito M, Mangham DC, Reynold G, Harbst H, Hallisery MT, Fielding JW, Newbold KM, Jones EL, Young LS, Niedobitek G : Epstein-Barr virus and carcinoma: rare association of the virus with gastric adenocarcinomas. *Br J Cancer* **68** : 1014~1019, 1993
- 7) Yuen ST, Chung LP, Leung SY, Luk ISC, Chan SY, Ho J : In situ detection of Epstein-Barr virus in gastric and colorectal adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol* **118** : 1158~1163, 1994
- 8) Schibata D, Tokunaga M, Uemura Y, Sato E, Tanaka S, Weiss LM : Association of Epstein-Barr virus with undifferentiated gastric carcinomas with intense lymphoid infiltration. Lymphoepithelioma-like carcinoma. *Am J Pathol* **139** : 469~474, 1991
- 9) Niedobitek G, Young LS : Presence of Epstein-Barr virus and the pathogenesis of virus-associated tumours, *Lancet* **343** : 333~335, 1994
- 10) 巽 英二, 大野仁嗣 : 本邦の EBV 陽性 Burkitt Lymphoma (BL) の第8番染色体切断点. *日本臨床*, **55** : 429~435, 1998
- 11) 日本胃癌学会編 : 胃癌取り扱い規約 13 版 : 1999
- 12) OLD LJ, Boyse EA, Oettgen HF, 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
- 13) Burke AP, Yen TSB, Shekitka KM, Sobin LH : Lymphoepithelial carcinoma of the stomach with Epstein-Barr virus demonstrated by polymerase chain reaction. *Modern Pathol* **3** : 377~380, 1990
- 14) Watanabe H, Enjoji M, Imai T : Gastric carcinoma with Lymphoid stroma: its morphologic characteristics and prognostic correlations. *Cancer*, **38** : 232~243, 1976
- 15) Nakamura S, Ueki T, Yao T, Ueyama T, Tuneyoshi M : Epstein-Barr virus in gastric carcinoma with lymphoid stroma. *Cancer* **73** : 2239~2249, 1994
- 16) Fukuyama M, Hayashi Y, Iwasaki Y, Chong J, Ooba T, Takizawa T, Koike M, Mizutani S, Miyaki M, Hirai K : Epstein-Barr virus associated gastric carcinoma and Epstein-barr virus infection of the stomach. *Lab Invest* **71** : 73~81, 1994
- 17) Ohshima K, Kikuchi M, Kobari S, Masuda Y, Yoneda S, Takesita M : Demonstration of Epstein-Barr virus genomes, Using Polymerase Chain Reactin in Situ Hybridization in Paraffin-Embedded Lymphoid Tissues. *Pathology Research and Practice* **191** : 139~147, 1995
- 18) Sugiura M, Imai S, Tokunaga M, Koizumi S, Uchizawa M, Okamoto K, Sato T : Transcriptinal analysis of Epstein-Barr virus gene expression in EBV-positive gastric carcinoma: unique viral latency in the tumour cells. *Br. J. Cancer* **74** : 625~631, 1996
- 19) Hitt M M, Allday MJ, Hara T, Karran L, Jones MD, Busson P, Tursz T, Ernberg I, Griffin BE : EBV gene expression in an NPC related tumour. *EMBO J* **8** : 2639~2651, 1989
- 20) Lertprasertsuke N, Tsutsumi Y : Gastric carcinoma with lymphoid stroma. *Virchows Arch Pathol Anat A* **414** : 231~241, 1989
- 21) Ott G, Kirchner TH : Muller-Hermelink HK : Monoclonal Epstein-Barr virus genomes but lack of EBV-related protein expression in different types of gastric carcinoma. *Histopathology* **25** : 323~329, 1994
- 22) Leoncini L, Vindigini C, Megha T, Funto I, Pacenti L, Masaro M, Renieri A, Sari M, Anagnostopoulos J, Tosi P : Epstein—Barr virus and gastric cancer: data and unanswered question. *Int. J. Cancer* **53** : 898~901, 1993
- 23) 田中広章 : Epstein-Barr ウイルス再活性化による胃癌発生機構の検討. *東京医科大学雑誌*, **57** : 348~360, 1999
- 24) Morson BC : Carcinoma arising from areas of intestinal metaplasia in the gastric mucosa. *Br J Cancer* **9** : 377~385, 1955
- 25) Kimura K, Takemoto T : An endoscopic recognition of the atrophic border and its significance in chronic gastritis. *Endoscopy* **1** : 87~97, 1969
- 26) Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelmann JH, Orentreich N, Sibley RK : Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. *Engl J Med* **325** : 1127~1131, 1991
- 27) Kuipers EJ, Uytendaele AM, Pena AS, Roosendaal R, Pals G, Nelis GF, Festen HPM, Meuwissen SGM : Long-term sequelae of Helicobacter pylori gastritis. *Lancet* **345** : 1525~1528, 1995
- 28) Levine PH, Stemmermann G, Lennette ET, Hildesheim A, Shibata D : Elevated antibody titers to Epstein Barr virus prior to the diagnosis of Epstein-Barr-virus-associated gastric adenocarcinoma. *Int J Cancer* **60** : 642~644, 1995

Immunohistological analysis of Epstein-Barr virus-positive gastric carcinomas

Yasuaki SAKAI, Hiroyuki OHNO, Ryoichi MISAKA and Minoru KAWAGUCHI
(Director: Professor Toshihiko SAITO)

The Fourth Department of Internal Medicine, Tokyo Medical University

Summary

EB virus (EBV)-related gastric carcinomas have been attracting attention and have been analyzed clinicopathologically. Indeed, EBV has been frequently detected in patients with gastric carcinoma with lymphoid stroma (GCLS). Thus, the relationship between EBV-related gastric carcinoma and GCLS has attracted interest. Lymphocytes in GCLS belong to the T cell group and lymph follicles which are swollen and grown in GCLS differ from those seen in common chronic gastritis. In an attempt to elucidate the relationship between EBV-related gastric carcinoma and T cell immune reaction, infiltrating lymphocytes were investigated immunologically in EBV-positive and -negative gastric carcinomas. Histologic sections were obtained from submucosal or deeper layer in 24 GCLS patients with lesions containing lymphocyte colonies and lymphoid follicle hyperplasia and in 78 GCLS patients with slight lymphocytic infiltration, from 1989 through 1998. Of the 24 GCLS patients among the total of 102 gastric carcinoma patients, 15 (62.5%) were tested positive for EBV, and of 78 GCLS patients with slight lymphocytic infiltration, 7 (9.0%) were tested positive for EBV. Among the 21 EBV-positive patients in which we were able to count lymphocytes, lymphocyte subsets were examined. CD8 and CD79a were detected in the T cells and the B cells of the patients much more often than in those of controls. The detection rates of these antigens were significantly higher in EBV-positive patients. In the tumor-surrounding region, only CD8 was highly positive, but not CD79a. Considering that the host lymphocytes showed an excessive reaction in EBV-positive gastric carcinoma, these data suggest that killer T cells are closely associated with the region-surrounding the tumor.

〈Key words〉 Epstein-Barr virus (EBV), Gastric carcinoma, In situ hybridization (ISH), Polymerase chain reaction (PCR).
