

舌癌組織内浸潤リンパ球亜群の免疫組織学的解析とその臨床的意義

平塚博義

札幌医科大学口腔外科学講座 (主任 小浜源都 教授)

今村正克

札幌医科大学病理学第1講座 (主任 菊地浩吉 教授)

Clinical Significance of Lymphocyte Subpopulations and T-Cell Subsets in Carcinoma of the Tongue with Specific Xenoantisera and Monoclonal Antibodies

Hiroyoshi HIRATSUKA

*Department of Oral Surgery, Sapporo Medical College
(Chief: Prof. G. Kohama)*

Masakatsu IMAMURA

*Department of Pathology (Section 1), Sapporo Medical College
(Chief: Prof. K. Kikuchi)*

Biopsied cancer tissues from 26 patients with squamous cell carcinoma of the tongue were examined immunohistopathologically as to the responsiveness of the host against its own cancer cells. Subpopulations and T-cell subsets of infiltrating lymphocytes in the cancer tissues were identified on paraffin-embedded and frozen serial sections by a highly sensitive immunoperoxidase technique (PAB method) with rabbit antihuman B-cell and peripheral T-cell sera and monoclonal anti-Leu-1, -2a, and -3a antibodies. T-cells were predominant over B-cells in 23/26 tissues. T-cells surrounded the cancer nests, occasionally accumulated around cancer cells, infiltrated at the marginal parts of the cancer nests and frequently produced perivascular massive accumulations. B-cells, on the other hand, were almost entirely absent or were negligible around cancer tissues. Killer/suppressor T-cells, which were identified with Leu-2a, were more prominent in 7/8 tissues than helper/inducer T-cells, which were identified with Leu-3a.

The grade of T-cell infiltration in the biopsied specimens correlated well with the size of the tumor, and was also significantly in patients without cervical lymph node metastasis as compared those with lymph node metastasis. Furthermore, there was a significant positive correlation between the grade of T-cell infiltration in the biopsy specimens and the clinical tumor regression rates after bleomycin treatment. These facts suggested that T-cells might inhibit the development and spread of cancer cells, and that T-cell infiltration correlates with the clinical course or prognosis of patients with carcinoma of the tongue. (Received December 21, 1982 and accepted January 31, 1983)

Key words: Tumor of the tongue, Lymphocyte subpopulations, T-cell subsets, Specific xenoantisera, Monoclonal antibodies

1 緒 言

癌患者の予後の推測は臨床的に患者の治療方針ならびに治療法の選択を考慮する上から最も重要視されて

いる。現在、病理組織学的予後予測因子として腫瘍細胞自体の示す悪性度に加えて、腫瘍-宿主相互関係が総合的に検討されている。特に、担癌生体が示す宿主抵抗性の一つの表現と考えられる間質性反応の重要性

が指摘されている。このような組織学的因子のうち、癌組織間質におけるリンパ系細胞の反応性が術後生存率との関係から注目されてきた¹⁻³⁾。乳癌においては、リンパ球浸潤の強い症例の予後の良いことが知られており、Shimokawara *et al.*⁴⁾は免疫組織学的手法を用いて乳癌組織に浸潤するリンパ球が主にT細胞であり、癌進展の予後に重要な因子となりうることを示唆した。また、実験動物腫瘍による研究の発展によっても、担癌宿主における細胞性免疫の重要性が指摘されており^{5,6)} Kikuchi *et al.*⁷⁾は組織適合抗原の関与を完全に否定したラット自家癌を用いた実験により、自家癌の拒絶に際しリンパ球、殊にT細胞が重要な役割を担っていることを種々の *in vitro*, *in vivo* 試験で証明してき

た。

近年、細胞工学の技術改良に伴ってBハイブリドーマ法によって多種のモノクローナル抗体が開発され、リンパ球表面抗原の解析が進んでいる。また、T細胞の機能的亜群に対応するモノクローナル抗体も多数作成されている^{8,9)}。癌組織間質におけるリンパ球浸潤の臨床的意義を追究するためには癌増殖局所におけるリンパ球亜群、T細胞亜群の浸潤をあらためて詳細に観察し、各症例における臨床病態所見との関係を明らかにすることが重要であり、それが可能となってきたと考えられる。しかし、現在までヒト癌組織に浸潤するリンパ球をその亜群にまで識別して臨床的意義を検討した報告は極めて少なく、しかもT細胞の機能的亜群の癌組

Table 1 Summary of Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Tongue

Case No.	Sex	Age	TNM Classification	Tumor Cell Differentiation	BLM (mg)	Regression Rate (%)	Lymph Node Metastasis	Lymphocyte Infiltration
1	M	47	T1N0M0	well	90	66		+
2	M	39	T1N0M0	moderately	90	35		++
3	M	60	T1N0M0	moderately	90	41		++
4	M	52	T1N0M0	well	N. D.			+++
5	M	45	T2N0M0	moderately	90	44		++
6	F	65	T2N0M0	well	80	32	Yes	+++
7	M	69	T2N0M0	poorly	90	39		++
8	F	50	T2N0M0	poorly	105	51		+++
9	M	54	T2N0M0	well	90	43		+++
10	M	38	T2N0M0	moderately	90	27		+
11	F	40	T2N0M0	poorly	90	73		+++
12	M	56	T3N1M0	poorly	60	44		+++
13	M	32	T2N1M0	moderately	90	64		+++
14	M	36	T2N1M0	well	90	30		+++
15	M	53	T2N1M0	poorly	90	45		++
16	M	47	T3N1M0	moderately	90	23		+
17	M	54	T2N1M0	well	105	61		+++
18	M	61	T3N1M0	well	90	35	Yes	+
19	M	29	T4N1M0	well	105	50	Yes	++
20	M	31	T4N1M0	moderately	90	13	Yes	+
21	M	41	T4N0M0	poorly	90	0	Yes	-
22	M	64	T4N2M0	well	80	41	Yes	+
23	M	63	T4M0M0	moderately	90	47	Yes	-
24	M	67	T4N0M0	poorly	70	21		++
25	F	56	T4N1M0	moderately	60	10	Yes	+
26	F	32	T4N0M0	moderately	90	67		++

BLM: Bleomycin

N. D.: Not done

-: None, +: Slight, ++: Moderate, +++: Marked

組織内分布を観察，検討した報告はみられない。

本研究では，ヒト舌癌患者より得た生検組織を検索対象とし，舌癌組織内に浸潤するリンパ球亜群，T細胞亜群を同定し，各々のリンパ球の舌癌組織内分布を検索するとともに，その臨床的意義について検討した。

2 材料および研究方法

2.1 舌癌患者および舌癌組織

1979年6月より1982年10月までの3年4か月間に札幌医科大学口腔外科外来を受診した舌癌患者は41名であるが，このうち確定診断の目的で生検が行なわれ，組織片内に癌発育先進部が十分に含まれていた26症例を対象とし，生検組織を材料として研究を行なった。すなわち，生検によって採取された組織片を健常部および腫瘍組織を含む部分を長軸方向に2分割し，一方を通常の病理組織学的検索に，他方を本研究に供した。

本研究に供した舌癌患者の臨床，病理組織学的所見をTable 1に示した。1症例を除き術前化学療法としてブレオマイシン (BLM) を1回15 mg，週2回，総量60~105 mg 静注投与の後，手術療法が施行されており，遠隔転移は認められていない。

2.2 固定および切片作製法

組織の固定にはperiodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) 液¹⁰を用いた。組織採取後ただちにPLP液で4°C，12時間固定し，冷phosphate-buffered saline (PBS) で48時間洗浄，その後エタノールで脱水，キシロールに透徹後パラフィンに包埋し，4 μmの連続切片を作製した。ただちに染色しない場合にはブロックともども4°Cに保存した。また，一部の組織は固定，洗浄後，液体窒素で瞬時に凍結し，クライオスタットで4 μmの連続切片を作製したが，ただちに染色しない場

合は染色するまで-20°Cに保存した。

2.3 特異的異種抗血清およびモノクローナル抗体

ヒトB細胞，末梢T細胞に対応する抗血清は家兔を免疫して作成した抗ヒトB細胞血清 (ABS)¹¹ならびに抗ヒト末梢T細胞血清 (ALS-T)¹²を用いた。抗血清の作成法および特異性については既に報告されているので省略する。本研究を行なうに際し，ABS，ALS-Tともに正常ヒト赤血球，ヒト肝末で吸収し，さらに前者はヒト胸腺細胞，ヒト白血病由来T細胞系培養株で，後者はヒト扁桃細胞よりE-ロゼット法によって分離したB細胞ならびにヒト白血病由来B細胞系培養株で十分に吸収した。吸収後，ABS，ALS-Tともに上記の培養株を用いて蛍光抗体法，細胞障害試験を行ない，それぞれ交叉反応がないことを確認した上で本研究に供した。

ヒトT細胞，T細胞亜群に対応するモノクローナル抗体は市販の抗Leu-1，Leu-2a，Leu-3a抗体^{13,14} (BECTON DICKINSON, U. S. A.)を用いた。因みに，Leu-1はヒトgeneral T細胞マーカーとして知られ，Leu-2aはヒトの suppressor/cytotoxic T細胞 (Ts/c)に発現し⁹，正常ヒト末梢T細胞の30%に発現する。これに対しLeu-3aはヒトの helper/inducer T細胞 (Th/i)に発現し⁹，正常ヒト末梢T細胞の70%に発現することが知られている。

2.4 酵素抗体法

免疫組織学的検索に際しては peroxidase-antiperoxidase 法と avidin-biotin system を併用した PAP-Avidin-Biotin 法¹⁵を用いた (Table 2)。腫瘍組織の連続切片の一枚には H. E. 染色を施し，リンパ球浸潤の程度および分布を検討すると同時に，酵素抗体法による染色との比較検討に用いた。

Table 2 Procedures of Immunoperoxidase Technique Combined with PAP-Avidin-Biotin System (PAB method)

1. React with 1:100 diluted specific antisera and monoclonal antibodies for 45 min at room temperature
2. *React with 1:100 diluted rabbit antimouse serum for 30 min
3. React with 1:100 diluted biotin conjugated goat antirabbit serum for 30 min
4. Inactivate the endogeneous peroxidase activity in methanol containing 0.6% H₂O₂ for 30 min
5. React with 1:200 diluted peroxidase antiperoxidase complex containing 1:100 diluted avidin-peroxidase for 30 min
6. The sections incubated with 0.05% 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride and 0.01% hydrogen peroxide in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6)
7. Counterstain with 0.2% methylgreen for 3 min
8. Dehydrate in alcohol, clear in xylene and mount in resin

* monoclonal antibodies: added this step.

2.5 リンパ球浸潤の程度の評価ならびに腫瘍縮小率の算定

リンパ球浸潤の程度は Shimokawara *et al.*⁴⁾ の評価に準じた。すなわち、各症例における H. E. 標本について、リンパ球浸潤のないものを(-)、軽度の浸潤を示すものを(+), 高度の浸潤を示すものを(+++)とし、その中間を(++)として判定した。同様に T 細胞, B 細胞, T 細胞亜群の浸潤の程度もこれに準じて評価した。なお、T 細胞亜群の浸潤の程度についてはこの判定基準に加えて、便宜上(±)の判定も行った。

BLM 投与による化学療法効果の判定には肉眼的な腫瘍縮小率を算定してこれを用いた¹⁹⁾。すなわち、初診時の腫瘍の大きさを長径×短径として計測し、BLM 投与前における相対的な大きさを算定して投与後のそれとの比で表わした。

腫瘍縮小率(%)

$$= \left(1 - \frac{\text{BLM 投与後の腫瘍の大きさ}}{\text{初診時の腫瘍の大きさ}}\right) \times 100$$

3 結 果

3.1 対象症例の臨床, 病理組織学的所見 (Table 1)

本研究に供した舌癌患者 26 例の年齢分布は 29 歳から 69 歳にわたり、平均年齢は 49 歳であった。性別では男性 21 例、女性 5 例と男性に多い。組織型はすべて扁平上皮癌であった。TNM 分類に基づく臨床病期分類では Stage I が 4 例、Stage II 7 例、Stage III 7 例、Stage IV は 8 例であり、腫瘍の大きさ(T categories)でみると T₁ が 4 例、T₂ 11 例、T₃ 3 例、T₄ 8 例であった。腫瘍細胞の分化度別でみると高分化型扁平上皮癌は 9 例、中等度分化型 10 例、低分化型 7 例であった。また、臨床的に頸部リンパ節への転移が強く疑われ、頸部廓清術が施行された症例のうち、病理組織学的にリンパ節転移が確認されたものは 8 例である。BLM 投与による腫瘍縮小率は 0% から 73% と強い分散を示し、平均 41% であった。

3.2 ALS-T, ABS およびモノクローナル抗体を用いたヒト正常リンパ節における T, B 細胞ならびに T 細胞亜群の同定

舌癌組織を検索する前に、PAB 法による免疫組織学的染色方法および使用する免疫血清、モノクローナル抗体の希釈倍数を検定する目的で、舌癌組織の場合と同様に固定、包埋あるいは凍結保存した正常ヒトリンパ節を用いて染色を行なった。一次抗体として ALS-T を用いた染色では Fig. 1 に示すように傍皮質領域の大多数のリンパ球が細胞膜に一致して強くリング状に染

色され、T 細胞領域に位置するリンパ球が特異的に染色された。一方、2 次濾胞の胚中心では mantle zone に近接して陽性細胞がわずかに認められるにすぎなかった。これに対し、ABS による染色ではリンパ濾胞の大部分のリンパ球が強く染色され、その染色態度は ALS-T と同様に細胞膜に一致したリング状を呈した。傍皮質領域ではごく少数のリンパ球が散在性に陽性を呈するにすぎなかった。対照として正常ウサギ血清を一次抗体として用いた場合、陽性細胞は全く見出されなかった。抗 Leu-1 抗体の PAB 法における応用に関しては既に報告されている¹⁵⁾。我々はその後の予備実験で抗 Leu-2a, Leu-3a 抗体によって検出されるリンパ球膜抗原がパラフィン包埋過程でなされるアルコールによる脱水操作で完全に失活されることを確認しており、したがってモノクローナル抗体の免疫組織学的応用に際しては凍結切片を用いて検索した。正常ヒトリンパ節における Leu-1, Leu-2a, Leu-3a 陽性細胞の分布、染色態度を要約すると以下の如くである。まず、抗 Leu-1 抗体を一次抗体に用いた場合、同時に行なった ALS-T による染色と同様、胸腺依存領域の大部分のリンパ球がリング状に陽性を呈し、逆に濾胞部分ではごく少数の陽性細胞を認めるにすぎなかった。また、抗 Leu-2a, Leu-3a 抗体による染色でも陽性細胞の大多数は胸腺依存領域に限局していた (Fig. 2)。しかし、Leu-3a 陽性 T 細胞数は明らかに Leu-2a 陽性 T 細胞数をはるかに上回っており、正常ヒト末梢 T 細胞に占める割合と非常によく一致していた。以上の結果は本研究に用いた特異的異種抗血清、モノクローナル抗体ならびに高感度 PAB 法の有用性を十分に示すと考えられる。

3.3 舌癌生検組織における T, B 細胞ならびに T 細胞亜群の同定とその分布

舌癌生検組織における T, B 細胞および T 細胞亜群の浸潤の程度を Table 3 に示した。検索症例 26 例中、T 細胞浸潤が認められたものは 24 例であり、浸潤程度の内訳は軽度の浸潤を示すもの 8 例、中等度浸潤 9 例、高度浸潤 6 例であった。一方、T 細胞浸潤が認められた 24 例中、B 細胞浸潤は 4 例に認められ、その程度はいずれも軽度であった。また、同一組織内における T, B 細胞浸潤の程度を比較すると B 細胞軽度浸潤 4 例のうち 3 例は中等度以上の T 細胞浸潤が認められ、残りの 1 例では B 細胞と同程度の T 細胞浸潤が認められた。すなわち、T 細胞が優位に浸潤していたものは 26 例中 23 例と最も多く、両細胞が同程度に浸潤していたものは 1 例であり、残りの 2 例ではリンパ球浸潤が認

Table 3 *Lymphocyte Infiltration in Biopsy Specimens of Carcinoma of the Tongue*

Case No.	ALS-T	ABS	Leu-1	Leu-2a	Leu-3a
1	+	-			
2		-	++	+	+
3		-	++	+	+
4		-	+++	+++	+
5	++	-			
6	++	+			
7	++	-			
8	+++	+			
9		-	+++	+	++
10		-	+	±	±
11		-	+++	++	++
12	++	+			
13	+++	-			
14	+++	-			
15	++	-			
16	+	-			
17	+++	-			
18		-	+	±	±
19	++	-			
20	+	-			
21	-	-			
22	+	-			
23	-	-			
24	+	+			
25	+	-			
26		-	++	+	+

-: None, +: Slight,
 ++: Moderate, +++: Marked.

められなかった。

一般に、T細胞は癌組織間質に広く慢性に浸潤するが、癌組織中央部の間質では概して軽度の浸潤を示すことが多かった。これに反し、癌浸潤の先進部における間質では、中心部に比較してT細胞浸潤が強くなり、癌細胞巣に一致してこれを取り囲む様相を呈した(Fig. 3)。症例によっては、癌発育先進部の遊離小細胞巣に密接して限局性にT細胞浸潤が観察された(Fig. 4)。また、多数のH.E.標本で血管周囲にリンパ球集簇が認められ、酵素抗体法による観察ではいずれもT細胞集団であることが確認された。潰瘍形成を伴う舌癌では潰瘍に一致して多数の形質細胞、好中球が浸潤しており、この部にごく少数のT細胞浸潤が認められた。癌組織に隣接して異型上皮が認められる症例では、異型上皮層下

に慢性にT細胞の集簇が認められた。一方、B細胞はT細胞集団に混在してわずかに認められるのみであり(Fig. 5)、数的に少ないこともあってその特徴的な浸潤様式は把握できなかった。マクロファージは一般にT細胞よりはるかに少なく、その出現も特に一定の傾向は認められなかった。

次に、8例の舌癌生検組織を用いて、モノクローナル抗体によって認識されるT細胞亜群の腫瘍組織内浸潤について検討した。Ts/c細胞であるLeu-1⁺2a⁺3a⁻細胞およびTh/i細胞であるLeu-1⁺2a⁻3a⁺細胞は検索した8例のすべての癌組織間質に認められた。Leu-1⁺2a⁺3a⁻細胞の浸潤程度は(±)2例、(+)4例、(++)1例、(+++)1例であり、他方、Leu-1⁺2a⁻3a⁺細胞の浸潤程度は(±)2例、(+)4例、(++)2例であった。同一切片上におけるおおよその割合をLeu-2a陽性T細胞がより多く浸潤しているもの(2a>3a)、逆にLeu-3a陽性T細胞が優勢なもの(2a<3a)あるいは同程度に浸潤するもの(2a=3a)の3群に分類すると、2a>3a群1例、2a=3a群6例、2a<3a群1例であった。

3.4 舌癌患者の臨床、病理組織学的所見と局所T細胞浸潤との関係

癌増殖局所におけるT細胞浸潤の強さと舌癌患者が示す臨床病態所見ならびに病理組織学的所見との関係

Table 4 *Relationship Between T Categories of TNM Classification and Grade of T-Cell Infiltration*

T-cell Infiltration	T Categories			
	T1	T2	T3	T4
None	0	0	0	2
Slight	1	1	2	4
Moderate	2	4	1	2
Marked	1	6	0	0
Total	4	11	3	8

p<0.005

Table 5 *Relationship between Lymph Node Metastases and T-Cell Infiltration*

T-cell infiltration	Lymph node metastases	
	positive	negative
None	2	0
Slight	4	4
Moderate	2	7
Marked	0	6

p<0.025

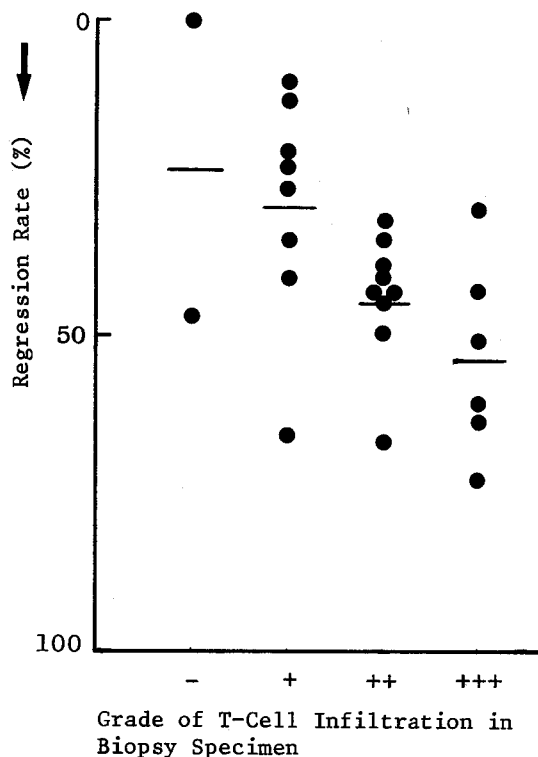


Fig. 1 Relationship between grade of T-cell infiltration in biopsy specimens and tumor regression rates

を検索する目的で統計学的検討を行なった。統計学的評価は Fisher の直接確率検定および分散分析法によった。

先ず、生検組織における T 細胞浸潤と腫瘍の大きさを示す T categories との関係を見たが、Table 4 に示すように、腫瘍の最大幅径が 4 cm またはそれ以下の症例と 4 cm 以上の症例との間では T 細胞浸潤の程度は著しく異なっており、腫瘍が小さいほど T 細胞浸潤の程度が高いことが判明した ($p < 0.005$)。次に、BLM 投与後の癌根治手術時に同時に行なわれた頸部瘻清によって組織学的にリンパ節転移が確認された 8 例について、原発部位における T 細胞浸潤の強さを検討したところ、(-)群; 2/2(100%)、(+)群; 4/8(50%)、(++)群; 2/9(22%)、(+++)群; 0/6(0%)であり、T 細胞浸潤の弱いものではリンパ節転移が高率に認められることが推計学的有意差 ($p < 0.025$) をもって示された (Table 5)。また、BLM 投与による平均腫瘍縮小率を生検組織における T 細胞浸潤の程度に基づいて分類すると、(-)群; 23.5%、(+)群; 29.5%、(++)群; 44.1%、(+++)群; 53.7%であり、T 細胞浸潤

の強さに応じて腫瘍縮小率が段階的に上昇していた (図 1)。推計学的には (+)群および (+++)群の間に危険率 5% で有意差が認められた。なお、BLM 投与後の根治手術で剔除された縮小した癌組織内のリンパ球浸潤の様相は大変興味ある問題であり、本論文ではふれないが、現在詳細に検討中である。

4 考 按

4-1 癌組織間質におけるリンパ系細胞反応の意義

ヒト癌組織間質に浸潤するリンパ系細胞の意義に関しては、特に患者の予後との関連性において古くから注目されてきた¹⁷⁻²¹⁾。口腔領域の悪性腫瘍に関しても、井上²²⁾は舌癌組織における癌実質の発育先進部に限局して単核細胞浸潤が認められる場合が多いこと、殊に、癌胞巢の全周囲にわたってリンパ球を主とする細胞浸潤が認められる例で手術後長期生存をとげていると述べている。同様に Sherwin and Zovickian²³⁾は口腔、喉頭癌における宿主抵抗性因子の一つに lymphoid stroma を挙げ、著明なリンパ球浸潤が認められる例では予後が良好なことを指摘している。このように口腔癌においても乳癌の場合と同様に予後予測の一因子に癌組織間質のリンパ球反応を重要視し、予後との関連性について肯定的見解をとるものが多い²²⁻²⁶⁾。しかし、一方ではこれに反対する意見もまた多い。その問題点の一つは癌組織間質における単核細胞浸潤が示す現象は感染あるいは癌の壊死組織に対する炎症反応であろうとする解釈である。殊に、口腔領域に包含される器官は多種多様な機能を有し、可動性に富むことから機械的刺激を受けることが多いことを考慮すると上述の指摘は大きな問題点と考えられる。このような見解をふまえ、我々の教室では現在、生検材料の採取にあたっては可能な限り、癌の発育先進部が十分に含まれるよう、注意深く切除されている。また、従来は単核細胞あるいはリンパ系細胞の種類が明確に分類されておらず、分布様式についても詳細に検討されていなかったこと、さらに個々の患者が示す臨床病態所見との関係が細かに検討されていなかったことなども大きな問題点である。本研究では、上述の諸点を考慮し、最近の進歩をとり入れその意義を明らかにした。

4-2 癌組織間質に浸潤するリンパ球亜群の解析

実験的には、Kikuchi *et al.*⁷⁾による遺伝的背景を全く同一にした自家癌拒絶実験によって、自己の癌に対して強い抵抗性を示す宿主に自家移植された癌組織に浸潤するリンパ球の大多数が T 細胞であり、しかも、T 細胞が癌細胞拒絶に重要な役割を担うことが示された。

さらに、ヒト癌組織間質に浸潤するリンパ球亜群に関する研究においても、T細胞が優位に浸潤するという知見が集積されつつある^{4,27,28)}。しかし、リンパ球亜群の浸潤様式および浸潤程度の臨床的意義を詳細に追究した報告は極めて稀である。先に、Shimokawara *et al.*⁴⁾により、ヒト乳癌組織間質におけるリンパ球亜群の解析に関する研究が凍結切片を用いた酵素抗体法によってなされ、実に、21例中17例の乳癌組織においてT細胞が優位に浸潤しており、しかもその浸潤の強さが患者の臨床病期、リンパ節転移の有無との間に統計学的な有意差をもって密接に相関することが示された。本研究では、ALS-T、ABSの応用に際し、操作の煩雑さあるいはartifactを極力避けることを目的としてパラフィン包埋組織切片を作製し、通常、病理組織学的検査に用いられる標本と比較して遜色ない明瞭な染色標本を作製しうることを示した。特に、扁平上皮癌組織の凍結切片における観察ではしばしば遊離小胞巣と形質細胞の集簇との区別が困難な場合があることなどを考慮すると、このような技術的改良は大きな利点と考えられる。

先に述べたように、舌癌組織においてはT細胞がB細胞と比較して優位に浸潤しており、T細胞は腫瘍の発育先進部に相応して浸潤するという大きな特徴を有していた。病巣の中心部では癌巣間の間質自体、面積としては狭小であり、多くの症例で比較的少数のT細胞が散在性に浸潤しているにすぎなかった。しかし、癌巣内に浸潤するリンパ球がT細胞であることは注目される所見であった (Fig. 6)。一方、表層部の上皮が欠落し、腫瘍細胞が口腔へ露出している部分では、好中球、形質細胞を中心とする細胞浸潤が認められ、T細胞はこれに混在して少数観察されるにすぎなかった。また、高分化型扁平上皮癌ではしばしば癌巣中心部の高度に分化した角化細胞の崩壊像を認めることが多いが、この部位には著明な好中球浸潤が認められた。以上の所見は我々が同定、観察したT細胞浸潤が感染あるいは壊死組織に対する非特異的な炎症反応とは到底考えにくく、Shimokawara *et al.*⁴⁾が指摘したように、癌細胞に対する担癌宿主の防禦機構としての細胞性免疫の存在を強く示唆する所見と考えられる。B細胞は散在性にごく少数T細胞に混在しており、乳癌組織で観察されたような集簇は認められなかった。

口腔領域の悪性腫瘍組織におけるリンパ球亜群の解析に関する研究は本邦の古阪²⁹⁾の論文をみるにすぎないが、彼は6例の舌癌を含む上顎癌16例、喉・咽頭癌23例の扁平上皮癌組織間質に浸潤するリンパ球亜群を

それぞれ抗ヒト胸腺細胞血清、抗ヒトIgM、D血清を用いて同定、検討している。彼の報告によれば、頭頸部領域の扁平上皮癌組織間質にはB細胞浸潤は33例中6例に認められるにすぎず、逆にT細胞は30例に認められたが乳癌等に比較してリンパ球浸潤が少ないとしている。臨床的にはT細胞浸潤の程度が病期あるいはリンパ節転移の有無に相関することを認め、今回の我々の結果と一致するが、これらの関連性はいずれも統計学的評価がなされておらず、さらに幾つかの重要な問題点を含んでいる。その一つは検索した癌組織内間質の部位が不明瞭なことである。我々の舌癌組織における観察では、T細胞は癌発育先進部により強く浸潤しており、癌巣中心部の間質ではT細胞浸潤は比較的少ない症例が多かった。また、上顎癌は今回の検索対象から除外したが、我々の観察では、上顎癌組織自体、リンパ球浸潤は軽度の症例が多く、しかも周囲を骨組織に囲まれているという解剖学的特異性から癌の発育先進部の間質を観察することは容易なことではないと考えている。事実、彼の報告でも強いT細胞浸潤を示す6例のうち3例は最も症例数の少ない舌癌症例に集中しており、我々の観察結果の妥当性を裏付けているものと考えられる。このように骨に裏打ちされた部位に原発した腫瘍組織を用いて免疫応答の存在を把握するには、よほど厳密に症例を選択する必要がある。

4.3 癌組織間質に浸潤するT細胞亜群の同定と意義

周知のごとく、T細胞はさらに、helper, suppressor, killer T細胞など機能的に種々の亜群に分けられ、細胞性免疫反応の成立と発現に大きく関与することが知られている³⁰⁾。近年、細胞融合法の技術の進歩に伴い、ハイブリドーマ法によるモノクローナル抗体の作成が可能となった。特に、リンパ球抗原に対するモノクローナル抗体がリンパ球分化抗原の検索あるいは免疫反応の機序の解明などに広く応用されている。腫瘍免疫学の分野においても腫瘍特異抗原の解析³¹⁾と治療への応用³²⁾あるいは悪性リンパ腫の病態の解明³³⁾などに用いられているが、現在のところリンパ球の機能的亜群を特異的に認識するモノクローナル抗体を癌組織に応用し、検討した報告は全く見当たらない。本研究において、我々は8例の舌癌組織間質に浸潤するT細胞亜群の識別にモノクローナル抗体を応用した。舌癌組織間質に浸潤するリンパ球の大多数は抗Leu-1陽性細胞であり、その分布はALS-T/によって検出されたT細胞とほとんど同様であった。1例を除いて正常リンパ組織、あるいは末梢T細胞のminor populationであるLeu-1⁺2a⁺3a⁻細胞が癌組織内に優位に浸潤していると

いう所見は注目され、舌癌増殖局所における免疫反応の存在を示す重要な所見と考えられる。ただし、今回の研究では両亜群細胞の浸潤の量的な差異はある程度解明されたものの、その組織内分布に関しては残念ながら一定の浸潤様式を把握されず、今後の問題として残されている。先に述べた臨床病態所見の統計学的検索から、少なくとも生検組織における T 細胞浸潤は生体にとって有利に作用していることが推察されるが、本研究に用いた Leu-2a 抗体は suppressor, killer の 2 つの作用を有するとされており、今後さらに詳細な機能的亜群細胞を認識するモノクローナル抗体の作成が待たれる。いずれにせよ、T 細胞亜群の生体内病変局所における分布様式を詳細に観察し、検討することは従来の組織所見に機能的な意味づけを加えることができる点で期待される。

4.4 BLM 投与による腫瘍縮小とリンパ球ならびに T 細胞亜群の関係について

直視直達可能な舌癌は化学療法効果が比較的容易且つ客観的に把握し易い特性を有する。BLM は他の多くの抗癌剤のように生体の免疫機能を抑制することがなく³⁴⁻³⁶⁾、皮膚、口腔粘膜などの扁平上皮組織に高濃度に分布する³⁷⁾ことから、組織学的に扁平上皮癌の多い口腔領域の悪性腫瘍に対する抗癌剤の選択に際しては一次選択に使用されることも多く、その治療効果に対する臨床的評価は既に確立されている³⁸⁻⁴¹⁾。本研究で対象とした症例は、生検後根治手術に先行して BLM による化学療法が施行されており、BLM 投与に基づく癌の縮小率と生検腫瘍組織内に認められたリンパ球亜群、T 細胞亜群の分布、浸潤の強さとの関連を検索することは、リンパ球の機能的意義付けを考える上で大変興味ある問題である。我々の研究結果は舌癌患者における BLM の抗腫瘍効果、すなわち癌の縮小率が BLM 投与前の生検組織間質における T 細胞浸潤の強さと正の相関をなすことを明解に示した。類似の現象は他にも知られており、例えば、組織学的に著明なリンパ球浸潤を示す類結核型類患者では、化学療法に対する感受性が高い⁴²⁾。これらの現象を簡単に説明することは困難であるが、化学療法効果の発現の背景に宿主の癌細胞あるいは微生物に対する応答性があり、T 細胞浸潤はその端的な組織表現とみることができると考えられる。少なくとも、生検組織における T 細胞浸潤の程度を知ることで化学療法の効果のある程度予測できるという大きな意義はもつものと考えられる。一般に、化学療法効果の発現には薬剤の組織内濃度が最大要因と考えられるが、この点から癌組織内における微小循環の様相も重要である

う。一方、T 細胞の癌組織内浸潤の程度も血管構築により左右されると考えられ、薬剤の到達性に関連する可能性もある。特に、現在知られつつある T 細胞の様々な機能、殊に抗腫瘍効果を考慮する時、BLM の抗腫瘍効果との相加あるいは相乗効果の可能性も否定できない。この意味で、今回の研究では十分には解決されなかった T 細胞亜群のより詳細な機能の解明と、これに関連した腫瘍組織内に浸潤する T 細胞亜群の分布や癌細胞との相互関係の解明が今後に残された重要な課題と考えられる。

5 結 語

ヒト舌癌組織間質に浸潤するリンパ球亜群、T 細胞亜群を抗ヒト T 細胞血清、抗ヒト B 細胞血清およびモノクローナル抗体を用いた高感度酵素抗体法(PAB法)により同定し、以下の結論を得た。

- 1) 組織切片レベルでヒト T, B 細胞, T 細胞亜群を識別、同定するには、特異的染色性、検出に必要とされる抗体量の点から、PAB 法が有用であることを示した。
- 2) ヒト舌癌組織間質においては B 細胞に比較して T 細胞が優位に浸潤している症例が圧倒的に多かった。T 細胞は癌組織中央部の間質よりも、発育先進部により多く浸潤し、癌胞巣周囲に一致して带状に浸潤するものが多かった。多くの症例で血管周囲に著明なリンパ球浸潤を認め、T 細胞の集簇であることが確認された。
- 3) これに反し、舌扁平上皮癌組織において、B 細胞浸潤は極めて少なく、ほとんど無視しうる程度にしか認められなかった。B 細胞は T 細胞集団内に散在性に存在していた。
- 4) ヒト舌癌組織間質には killer, suppressor T 細胞の細胞表面形質を有する T 細胞が優位に浸潤する症例が多いことがモノクローナル抗体による検索で確認された。
- 5) 舌扁平上皮癌生検組織内における T 細胞浸潤の程度は癌の進展度、リンパ節転移の有無との間に推計学的に有意の関連を示し、予後との相関が示唆された。
- 6) 舌癌生検組織における T 細胞浸潤の程度は、感受性との間に推計学的に有意の相関を示し、化学療法効果の予測、ひいては予後予測の上で重要な因子であることが示唆された。

謝 辞

稿を終るにあたり、腫瘍の検索に便宜をはかって

くださった札幌医科大学口腔外科学講座の諸先生、並びに同中検病理の室谷光三助教授・成松英明助教授に深謝致します。

文 献

1. 菊地浩吉： 癌組織におけるリンパ系細胞反応。藤井源七郎，川村明義，菊地浩吉，小林 登，橋 武彦編：人癌と免疫—その基礎と臨床—，ライフサイエンス社，東京，(1976)。
2. Underwood, J. C. W.: Lymphoreticular infiltration in human tumors: prognostic and biological implications: a review. *Br. J. Cancer* **30**, 538-542 (1974).
3. Ioachim, H. L.: The stromal reaction of tumors: an expression of immune surveillance. *J. Natl. Cancer Inst.* **57**, 465-475 (1976).
4. Shimokawara, I., Imamura, M., Yamanaka, N., Ishii, Y. and Kikuchi, K.: Identification of lymphocyte subpopulations in human breast cancer tissue and its significance: An immunoperoxidase study with anti-human T- and B-cell sera. *Cancer* **49**, 1456-1464 (1982).
5. 菊地浩吉，菊地由生子： 自家癌に対する免疫反応—Methylcholanthrene 誘発自家癌の拒絶における細胞性免疫の解析。最新医学 **26**, 2170-2179 (1971)。
6. 菊地浩吉： がん免疫の成立と排除機構。総合臨床 **22**, 2146-2158 (1973)。
7. Kikuchi, K., Ishii, Y., Ueno, H. and Koshiba, H.: Cell-mediated immunity involved in autochthonous tumor rejection in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **276**, 188-206 (1976)。
8. Reinherz, E. L., Kung, P. C., Goldstein, G., Levy, R. H., and Schlossman, S. F.: Discrete stages of human intrathymic differentiation: Analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 1588-1592 (1980)。
9. Ledbetter, J. A., Evans, R. L., Lipinski, M., Cunningham-Rundles, C., Good, R. A. and Herzenberg, L. A.: Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T lymphocyte helper/inducer and cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man. *J. Exp. Med.* **153**, 310-323 (1981)。
10. McLean, I. W. and Nakane, P. K.: Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative: A new fixative for immunoelectron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* **22**, 1077-1083 (1974)。
11. Ishii, Y., Koshiba, H., Ueno, H., Maeyama, I., Takami, T., Ishibashi, F. and Kikuchi, K.: Characterization of human B lymphocyte antigen. *J. Immunol.* **114**, 466-469 (1977)。
12. Koshiba, H., Ishii, Y., Yamanaka, N. and Kikuchi, K.: Identification of human peripheral T cell antigens. *J. Immunol.* **118**, 625-629 (1977)。
13. Engleman, E. G., Warnke, R., Fox, R. I., Dilley, J., Benike, C. J. and Levy, R.: Studies of a human T lymphocyte antigen recognized by a monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 1791-1795 (1981)。
14. Evans, R. L., Wall, D. W., Platsoucas, C. D., Siegal, F. P., Fikric, S. M., Testa, C. M. and Good, R. A.: Thymus-dependent membrane antigens in man: Inhibition of cell-mediated lympholysis by monoclonal antibodies to TH₂ antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 544-548 (1981)。
15. 神谷博文，今村正克： 新しく開発された高感度 PAP 改良法，PAP-Avidin-Biotin (PAB) 法および PAP くりかえし法について—パラフィン切片におけるヒト T, B 細胞の同定—。臨床免疫 **14**, 191-200 (1982)。
16. 山本悦秀，砂川 元，小浜源郁： 口腔癌の術前化学療法に関する研究。第一報 臨床病態所見と BLM 術前投与による腫瘍縮小効果との関連性。口科誌 **29**, 19-27 (1980)。
17. MacCarty, W. C.: Factors which influence longevity in cancer. *Ann. Surg.* **76**, 9-12 (1922)。
18. Berg, J. W.: Active host resistance to breast cancer. *Acta Uni. Int. Contra Cancrum* **18**, 854-858 (1962)。
19. Bennet, S. H., Futrell, J. W., Roth, J. A., Hoyer, R. C. and Ketcham, A. S.: Prognostic significance of histologic host response in cancer of the larynx or hypopharynx. *Cancer* **28**, 1255-1256 (1971)。
20. Watanabe, H., Enjoji, M. and Imai, T.: Gastric carcinoma with lymphoid stroma. Its morphologic characteristics and prognostic correlations. *Cancer* **38**, 232-243 (1976)。
21. Nagell, J. R. Jr., Donaldson, E. S., Wood, E. G. and Parker, J. C. Jr.: The significance of vascular invasion and lymphocytic infiltration in invasive cervical cancer. *Cancer* **41**, 228-234 (1978)。
22. 井上 篤： 舌癌の組織学的研究。福岡医誌 **46**, 1039-1059 (1955)。
23. Sherwin, R. P. and Zovickian, A.: Squamous carcinoma of the oral cavity and throat. Its clinicopathologic correlation. *Am. J. Surg.* **102**, 823-829 (1961)。

24. Jones, J. H. and Coyle, J. I.: Squamous carcinoma of the lip: A study of the interface between neoplastic epithelium and the underlying mesenchyma. *J. Dent. Res.* **48**, 702-708 (1969).
25. 藤野 博, 田代英雄, 池村邦男, 大部大明, 納富一幸: 主として間質反応よりみた口腔粘膜癌. *口科誌* **23**, 362-373 (1974).
26. 和田 健, 大野 浩, 山本益久, 堤 昌男, 宮田和幸, 高木健次, 森田展雄, 坂本忠幸, 横野可代二: 口腔癌におけるリンパ球様細胞浸潤の意義. *日癌治会誌* **15**, 343-352 (1980).
27. Schoorl, R., Brutel de la Riviere, A., von dem Borne, A. E. G. Kr. Feltkamp-Vroom, Th. M.: Identification of T and B lymphocytes in human breast cancer with immunohistopathological techniques. *Am. J. Pathol.* **84**, 529-544 (1976).
28. Husby, G., Hoagland, P. M., Strickland, R. C. and Williams, R. C. Jr.: Tissue T and B cell infiltration of primary and metastatic cancer. *J. Clin. Invest.* **57**, 1471-1482 (1976).
29. 古阪 徹: 頭頸部癌組織におけるTリンパ球について—免疫組織学的研究—. *日耳鼻* **85**, 557-566 (1982).
30. 菊地浩吉: 細胞性免疫. 菊地浩吉編: 医科免疫学. 第2版. 175-200, 南江堂, 東京. (1981).
31. Schlom, J., Wunderlich, D. and Teramoto, Y. A.: Generation of human monoclonal antibodies reactive with human mammary carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 6841-6845 (1980).
32. Billiland, D. G., Steplewski, Z., Collier, R. J., Mitchell, K. F., Chang, T. H. and Koprowski, H.: Antibody-directed cytotoxic agents: Use of monoclonal antibody to direct the action of toxin A chains to colorectal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **77**, 2539-4543 (1980).
33. Kikuchi, K., Koshiha, H. and Ishii, Y.: Lymphocyte differentiation and malignant lymphoma. *Acta Hematol. Jpn.* **44**, 1384-1394 (1981).
34. Andrew, E. J.: An *in vivo* evaluation of the immunosuppressive action of bleomycin. *Cancer Res.* **32**, 1993-1994 (1972).
35. Boggs, S. S., Sartiano, G. P. and DeMezza, A.: Minimal bone marrow damage in mice given bleomycin. *Cancer Res.* **34**, 1938-1942 (1974).
36. Bulgi, A. M., Robie, K. M. and Mitchell, M. S.: Failure of bleomycin to affect humoral or cell-mediated immunity of the mice. *Cancer Res.* **34**, 2504-2507 (1974).
37. 藤田 浩: プレオマイシンの吸収, 分布, 及び排泄. *日癌治会誌* **4**, 30-32 (1969).
38. 上野 正: 口腔癌の治療に関する研究. *口病誌* **36**, 4-19 (1969).
39. Clinical screening cooperative group of the european organization for research on the treatment of cancer: Study of the clinical efficiency of bleomycin in human cancer. *Br. Med. J.* **2**, 643-645 (1970).
40. Blum, R. H., Carter, S. K. and Agre, K. A.: Clinical review of bleomycin. —a new antineoplastic agent. *Cancer* **31**, 903-914 (1973).
41. Yamamoto, E., Kohama, G., Sunakawa, H., Iwai, M. and Hiratsuka, H.: Mode of invasion, bleomycin sensitivity and clinical course in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer*, in press.
42. 小沢利治, 左奈田精孝, 小関正倫: らい腫型らい, 図説感染症シリーズ22. *医学のあゆみ* **112**(9), 前付 (1980).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西17丁目

札幌医科大学口腔外科学講座 平塚博義

Legends for figures

- Fig. 1** Photomicrographs of a paraffin-embedded section of human lymph node. ($\times 110$).
- 1-A** PAB staining with anti-peripheral T-cell serum (ALS-T). T-cells in the thymus dependent area were strongly stained, but almost all cells in the mantle zone were not stained. Only a few T-cells in germinal centers were stained.
 - 1-B** PAB staining with anti-B-cell serum (ABS). B-cells in the follicles were strongly stained, but the majority of cells in the thymus-dependent area were not stained.
- Fig. 2** Higher magnification of frozen sections of human lymph node. ($\times 280$).
- 2-A** PAB staining with monoclonal anti-Leu-1 antibody. T-cells in the paracortical area were strongly stained with anti-Leu-1 antibody as well as ALS-T.
 - 2-B** PAB staining with monoclonal anti-Leu-2a antibody. A few cells which were considered to be suppressor/cytotoxic T-cells in the paracortical area were stained.
 - 2-C** PAB staining with monoclonal anti-Leu-3a antibody. A large number of cells in the paracortical area were stained.
 - 2-D** PAB staining with ABS. B-cells in the mantle zone were stained but only a few B-cells were seen in the germinal center.
- Fig. 3** Frozen sections of carcinoma of the tongue (Case 4). ($\times 110$).
- 3-A** Marginal portion of invading cancer mass stained with hematoxylin and eosin. Lymphocyte infiltration was remarkable around cancer nests.
 - 3-B** Serial section stained with monoclonal anti-Leu-1 antibody. Note infiltrating lymphocytes were almost all T-cells, of which the intensity of infiltration was graded as (+++).
 - 3-C** Serial section stained with monoclonal anti-Leu-2a antibody which is considered to recognize suppressor/cytotoxic T-cells. Majority of T-cells were Leu-2a positive. The intensity of infiltration of Leu-2a positive cells in this field was graded as (+++).
 - 3-D** Serial section stained with monoclonal anti-Leu-3a antibody. A few Leu-3a positive, helper/inducer T-cells, were scattered in the stroma. The grade of infiltration (+).
 - 3-E** Serial section stained with ABS. B-cells were almost never seen. The grade of infiltration (-).
- Fig. 4** Photomicrographs of paraffin-embedded serial sections of carcinoma of the tongue (Case 17). ($\times 280$).
- 4-A** Higher magnification of a marginal portion of invading cancer mass stained with hematoxylin and eosin. Abundant lymphocytes were accumulating around the invading cancer nest.
 - 4-B** Serial section stained with ALS-T. Note diffuse T-cell infiltration around and close to cancer nests. The grade of infiltration (+++).
 - 4-C** Serial section stained with ABS. B-cells were not seen. The grade of infiltration (-).
- Fig. 5** Photomicrographs of a paraffin-embedded serial section of carcinoma of the tongue (Case 6). ($\times 280$).
- 5-A** Central portion of the tumor. Moderate lymphocyte infiltrations were seen. Hematoxylin and eosin stain.
 - 5-B** Serial section stained with ALS-T. T-cells contact closely to the cancer cell nests. The grade of infiltration (++)
 - 5-C** Serial section stained with ABS. Only a few B-cells were accompanied by numerous T-cells. The grade of B-cell infiltration was counted as (+), which was exceptionally high B-cell infiltration in this study.
- Fig. 6** Higher magnification of the central portion of tumor tissue of the tongue (Case 4). ($\times 280$).
- 6-A** This particular area revealed an accumulation of a number of lymphocyte infiltrations in the stroma between cancer nests. Hematoxylin and eosin stain.
 - 6-B** Serial section stained with monoclonal anti-Leu-2a antibody which is considered to recognize suppressor/cytotoxic T-cells. Moderate infiltration was seen in the stroma between cancer nests. Note a few Leu-2a positive cells have penetrated into cancer nests (arrows).
 - 6-C** Serial section stained with monoclonal anti-Leu-3a antibody which is considered to recognize helper/inducer T-cells. Note a few Leu-3a positive cells as well as Leu-2a positive cells have penetrated into cancer nests (arrows).

