# 日本財団補助金による
# 1996 年度財団法人日中医学協会助成報告書

－調査並びに研究に対する助成－

1997 年 2 月 24 日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島 章 殿


研究代表者氏名 朔 敬 (印)

所属機関名 新潟大学歯学部

職名 教授 年齢 46 才

所在地〒 951 新潟市学校町通二番町5274

電話 025-223-6161 内線 4170


1．研究課題

中国における唾液腺癌のエプスタイン・バーウィルス感染に関する病理学的検索

2．研究期間 自 1996 年 4 月 1 日 ～ 至 1997 年 3 月 15 日

3．研究組織

日本側研究者氏名 朔 敬 (46才)

所属機関 新潟大学歯学部 職名 教授

中国側研究者氏名 林 漢良 (59才)

所属機関 中山医科大学医学部 職名 教授

4．研究目的、方法、成果と考察、結論の形式で、Ａ４版にて4,000字以上で報告し、研究成果の発表予定についても記載して下さい。尚、論文発表に当っては、日本財団補助金による旨を明記して下さい。

5．収　支　決　算　報　告

1996年4月11日交付通知のあった研究課題 中国における唾液腺癌のエプスタイン・バーウィルス感染に関する病理学的検索 についての収支決算を行ないました。　関係書類を添えて、次のとおり報告します。

| 交付を受けた金額 | 支出内訳 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 消耗品費 | 謝　金 | 旅　費 | その他 | 合　計 |
| 1,000,000 円 | 307,178 円 | 50,000 円 | 642,822 円 | 0 円 | 1,000,000 円 |

支出費内訳（消耗品、謝金、旅費、その他の項目別に記載・別紙可）

| 区　分 | 金　額 | 使用目的 |
|---|---|---|
| 消耗品費 | 194,954 | 試薬およびガラス・プラスティック器具（金子薬品） |
| | 50,273 | 写真材料（カメラのデンデン社） |
| | 57,783 | 写真材料（カメラの六本木） |
| | 4,168 | 事務用品（菊池事務機） |
| 小計 | 307,178 | |
| 謝金 | 50,000 | 研究試料の調整（楊連甲教授・第四軍医大） |
| 小計 | 50,000 | |
| 旅費 | 292,822 | 1996年8月　中国訪問（朔　敬） |
| | 350,000 | 1997年3月　新潟招聘（楊連甲教授・第四軍医大） |
| 小計 | 642,822 | |

# 中国における唾液腺癌のエプスタイン・バーウィルス感染に関する病理学的研究

朔　　敬　　新潟大学歯学部口腔病理学講座
林　漢良　　中山医科大学医学部病理学教研室（前同大腫瘍病院病理科）

## 1. 研究目的

リンパ上皮腫様の病理組織像を呈する癌腫の発生にエプスタイン・バーウィルス（EBV）感染の関与が注目されている。本研究課題では、中国で多発するリンパ球間質をともなう唾液腺未分化癌（以下、リンパ上皮腫）について、中国で蓄積された組織標本を材料にして、EBV感染の実態を主にin-situハイブリダイゼーション（ISH）やポリメラーゼ連鎖反応（PCR）の技法を中心に組織化学的また分子生物学的に検索し、さらに同病変の発生に関する中国での疫学的調査をおこない、他の唾液腺病変と比較検討し、唾液腺発癌におけるEBV感染の意義を明らかにしたいとかんがえた。

## 2. 方法

①症例収集：平成6年度以来、上海市上海第二医科大学、四川省成都市華西医科大学、雲南省昆明市昆明医学院、広東省広州市中山医科大学、吉林省長春市白求恩医科大学、陝西省西安市第四軍医大学、北京市北京医科大学および首都医科大学、湖北省武漢市湖北医科大学中国各地の医科大学、台湾台北市台湾国立大学、台中市中山医学院、山東省済南市山東医赤大学と共同で唾液腺リンパ上皮腫症例の収集をおこなってきた。今年度は、日本財団補助金によって8月に四川省成都市華西医科大学、新疆ウイグル自治区烏魯木斉市新疆医学院をそれぞれ訪問し、唾液腺リンパ上皮腫症例を各地の研究分担者および協力者と共同で病理組織学的な評価をおこなったうえで抽出した。同時に、その他の唾液腺腫瘍（ワルチン腫瘍、扁平上皮癌、腺癌ほか）といわゆる良性リンパ上皮性病変を示すシェーグレン症候群等の慢性唾液腺炎の症例についても検討した。中国側からは、平成9年3月に第四軍医大学の楊が新潟大学を訪問し、持参した追加症例の組織学的評価を相互に検討するとともに分子生物学的ならびに免疫組織化学的にEBVの検出をおこない、最終的なリンパ上皮腫症例の採否を朔と共同でおこなった。

②疫学調査：リンパ上皮腫およびその他の病変の患者の氏名、年齢、性、住所、初診時期、症状、経過、処置、予後等の調査方法の解析用コンピュータ入力様式をさだめ、調査を中国側研究分担者・研究協力者に依頼した。とくに患者の民族、出身地の確認を強調した。

③免疫組織化学的実験：①で収集した症例のパラフィンブロックから連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色はじめ各種組織染色をおこない、病理組織学的に再検討した。癌細胞の上皮性格は、免疫組織化学的に上皮膜抗原（EMA）、細胞膜糖鎖抗原CA15-3、UEA-Iレクチン結合性の免疫反応性で判定し、間質リンパ球サブクラスは、UCHL-1およびL26抗体をもちいてＴ細胞およびＢ細胞をそれぞれ判別した。また、EBV関連分子の潜在膜抗原LMA-1と同核抗原EBNA-2等についても検討をくわえた。そのほか組織化学としては、PAS染色、マッソン三重染色、アルシアン青染色等をおこない、ＨＥ所見と対比させた。

④分子生物学的実験：③と同様に作製したパラフィン切片について、EBVのコードするsmall RNA(EBER-1)の発現を検索するためにその相補的なRNAプローブ（30 bps）をもちいて、ディゴキシゲニンラベリングと抗ディゴキシゲニン抗体およびアルカリフォスファターゼ発色によるISHをおこなった。さらに、切片を脱パラフィン後、プロテイナーゼＫで除タンパク質をおこなってDNA

を抽出し、PCR法によってEBVの*Bam*HI W領域の増幅される断片（123 bps）をアガロースゲル電気泳動で検出した。

## 3. 成果と考察

①症例：唾液腺リンパ上皮腫症例は、平成6年度よりの調査以来、上海第二医科大学で42例、華西医科大学で40例、昆明医学院で3例、中山医科大学で42例、白求恩医科大学で4例、第四軍医大学で3例、北京医科大学で7例、首都医学院で2例、湖北医科大学で4例、台湾国立大学で36例、中山医学院で3例、新疆医学院で２例抽出し、合計159例となった。山東省では済南および青島両市の施設からは本癌腫症例をみいだすことはできなかった。各施設は各地域の主要な病院の症例を掌握しており、各施設ごとのリンパ上皮腫症例数の総唾液腺癌／唾液腺腫瘍総症例数に対するそれぞれの割合は、相対的な発生率とみなすことができよう。したがって、癌腫に占める割合では、広州で13％、上海で4.4％、北京で1.2％、良悪性をふくめた全唾液腺腫瘍にしめる割合では、上海で1.7％、西安で0.15％であった。上海から広州へかけての沿海地域でのリンパ上皮腫の発生は北京、西安など内陸北方地域の4-10倍となった。したがって、本癌腫の発生には地域的な要因があることがしめされた。

以下は臨床記録が確認された症例で検索した結果である。男女比は1:1であった。平均年齢は43歳、最年少は9歳で、39歳以下が35％をしめ、若年発生が特徴的であった。臓器部位では、耳下腺が70％でもっとも多くをしめたが、顎下腺11％に対比しても小唾液腺14％の発生は高率で、とくに口蓋10％には注目された。また、耳下腺顎下腺同時発生例が１例みいだされた。民族はこれまで判明している範囲ではほぼ漢族で、新疆ウイグル自治区ではウイグル族と錫伯族がそれぞれ一例ずつみられた。四川省での多発は広東省から四川省への移民の歴史と関連している可能性がある。グリーンランド、アラスカ等の極地ではアジア系少数民族での発生がしられているが、中国症例では、少数民族での発生は少ないことがわかった。ちなみに、ロシア・カムチャツカ地域でも少なからず発生があるが、すべて白色人種であるという結果を私聞している。

②病理組織化学的解析：リンパ上皮腫は大胞巣型と小胞巣型に大別された。前者は小唾液腺に多発する傾向があり、後者は耳下腺に多発し間質の線維化が亢進してリンパ球反応が低下する傾向をしめした。③免疫組織化学的検索：約20％の症例のLMA-1陽性がえられたが、EBNA-2はごく少数の症例でのみ明確な陽性反応が得られた。癌細胞は上皮膜抗原陽性、DF-3抗体陽性、UEA-I結合陽性をしめし、唾液腺導管様性格が確認された。また、癌胞巣を取り囲む浸潤リンパ球はＴ細胞優勢が確認された。これは良性リンパ上皮性病変の反応リンパ球がＢ細胞であるのと対照的であった。④分子生物学的解析：ISHによって検索したリンパ上皮腫症例のほぼ全例で癌細胞はEBER-1陽性であった。反応は細胞核上、とくに核膜にそって、あるいは核小体周囲に濃縮する傾向があっが。リンパ球やその他の細胞には陽性反応はみいだされなかった。PCR法によってもEBVのDNA断片が増幅されることを確認した。対照とした良性リンパ上皮性病変およびワルチン腫瘍、多形性腺腫、粘表皮癌、腺様嚢胞癌、腺癌そのほかの唾液腺腫瘍や非特異性唾液腺炎では陽性シグナルはえられなかった。したがって、唾液腺ではリンパ上皮腫におけるEBV感染はきわめて特異的であるという結果になる。われわれの検討では、同一試料量であればPCR法はISH法よりも感度が高いことが判明しており、われわれの得た結果には信頼性は高いと考えている。他の研究グループから報告されている正常唾液腺あるいは良性唾液腺病変でのEBV陽性はその検索材料や方法の違いがあるが、今後検討されなければならない。

## 4. 結論

今年度までの中国各地における調査で、唾液腺リンパ上皮腫に特異的にEBV遺伝子の存

在が確認された。したがって、この癌腫の発生にEBV感染が重要な関与をしていることが判明した。しかし、EBV感染が癌化のどの過程にかかわっているかはなお不明である。今後は、中国のほか、アジアおよび環太平洋諸国に調査を拡大し、本癌腫発生背景の特異性を把握するとともに、各種癌関連遺伝子の検索をすすめ、EBV感染癌細胞株樹立などの新計画を実施して、EBV感染の発癌への関与のしくみを究明していきたい。

## 5．研究業績


1. Saku T, Cheng J, Tokunaga M, et al. Epstein-Barr virus infection in salivary lymphoepitheliomas in China. Journal of Oral Pathology & Medicine 1996; 25: 270.
2. Saku T, Cheng J, Tokunaga M, et al. EBV infection in salivary lymphoepitheliomas in China. Proceedings of the 2nd China-Japan Joint Conference on Oral Biology, 1996, p.62.
3. 朔　敬ほか.中国の唾液腺リンパ上皮腫におけるEBウィルス感染. 日本病理学会会誌 1996; 85: 149.
4. 朔　敬. ＥＢＶ関連唾液腺癌. 新潟歯学会雑誌 1996; 27: 73.
5. 呉　蘭雁ほか. 涎腺悪性淋巴上皮病損的臨床病理研究. 華西口腔医学雑誌 1996; 14: 13.
6. 張　偉国ほか. 淋巴節転移性癌中EB病毒表現在頭頸部腫瘤診断中意義. 第四届全国口腔病理学術会議論文適用匯編 1996, p.15.


## 6. 共同研究者

盧　勇、呉　蘭雁、周　志瑜（華西医科大学口腔医学院口腔病理学）、饒　慧蘭、李　汝瑶（中山医科大学腫瘍病院および口腔医学院口腔病理学）、欧陽　皆（白求恩医科大学口腔医学院口腔病理学）、于　世鳳（北京医科大学口腔医学院口腔病理学）、婁　鉄成（首都医科大学口腔医学院口腔病理学）、張　偉国、劉　愛如、何　栄根（上海第二医科大学口腔医学院口腔病理学）、陳　朝倫、帛提曼　斯徳克（新彊医学院病理学）、凌　滌生（山東医科大学口腔系口腔病理学）、楊　連甲（第四軍医大学口腔医学院口腔病理学）、李映芳（昆明医学院口腔医学系口腔病理学），汪　説之（湖北医科大学口腔医学院口腔病理学）、陳　志栄（台湾国立大学医学院医院病理科）、蔡　崇弘（中山医学院口腔病理学）