口腔悪性腫瘍患者における HTLV-I の浸淫と免疫抑制機能に関する研究

国 芳 秀 晴

Prevalence of HTLV-I infection and immunosuppression
in patients with oral malignant tumors

Hideharu KUNIYOSHI

Abstract: Adult T-cell leukemia (ATL) patients are frequently associates with other malignancies. To elucidate the possible association of HTLV-I infection with the tumorigenesis of oral malignancies in Kagoshima prefecture, I analyzed the correlation between HTLV-I and the patients with oral malignant tumor (OMT). The following results were obtained;

1) The organ distribution of oral malignancies in Kagoshima prefecture was found in the tongue most frequently. The male to female sex ratio was 2 to 1 and the age distribution of the highest incidence ranged from 60 to 80 years. The most frequently observed histopathology was the squamous cell carcinoma (74/78 cases).

2) HTLV-I seropositivity of OMT in total, was 2.3 times more than that of normal adults in Kagoshima prefecture and the male to female sex ratio was 4 to 3.

3) HTLV-I provirus was detected in 5 cases of 7 peripheral blood lymphocytes (PBLs) donors of the seropositive OMT.

4) OMT was associated with HLA-DRw8 in significantly high frequency ($p < 0.05$).

5) The strength of T-cell immune response to HTLV-I and Phytohemagglutinin P(PHA) was observed in order of normal controls > seronegative OMT > seropositive OMT. The autologous proliferative response (APR)²¹⁾ of PBLs was detected in 9 cases of 14 seropositive OMT, indicating immunological abnormality associated with HTLV-I infected OMT.

6) When T-cell subset in the seropositive OMT were analyzed after the culture of PBLs, CD4/8 ratio was segregated to 2 groups, one with an increased CD4/8 ratio (3 cases) and the other with a decreased CD4/8 ratio (7 cases). The former produced poor prognosis and the latter a good prognosis.

In conclusion, OMT infected with HTLV-I had a tendency of less immune response to HTLV-I and PHA compared with those of seronegative controls. The CD4/8 ratio was primarily associated with the prognosis of OMT. OMT had HLA-DRw8 in significantly high frequency comparing with the normal population. Thus, HLA-DRw8 and HTLV-I infection may interact each other and modulate the host immune system against OMT.

Key words: oral malignant tumors (口腔悪性腫瘍), HTLV-I infection (HTLV-I 感染), immunosuppression (免疫抑制)

目 次

I 緒 言

II 研究対象ならびに方法

1. 研究対象

2. 研究方法

- (1) 患者血清およびリンパ球の分離
- (2) 抗 HTLV-I 抗体の測定
- (3) 患者末梢血リンパ球 (PBLs) からの HTLV-I プロウイルス DNA の検出
- (4) HLA タイピング
- (5) 患者 PBLs の細胞性免疫能の分析

III 研究結果

- (1) 鹿児島県における口腔悪性腫瘍患者の属性の検討
- (2) 口腔悪性腫瘍患者における抗 HTLV-I 抗体の保有状況
- (3) 口腔悪性腫瘍患者の PBLs からの HTLV-I プロウイルス DNA の検出
- (4) 口腔悪性腫瘍患者に関連する HLA の検索
- (5) 口腔悪性腫瘍患者の HTLV-I に対する免疫応答性
- (6) 口腔悪性腫瘍患者の非特異的免疫応答能と T 細胞サブセットの解析

IV 総括ならびに考察

- (1) 鹿児島県における口腔悪性腫瘍患者の属性の検討
- (2) 口腔悪性腫瘍患者における抗 HTLV-I 抗体の保有状況
- (3) 口腔悪性腫瘍患者の PBLs からの HTLV-I プロウイルス DNA の検出
- (4) 口腔悪性腫瘍患者に関連する HLA の検索
- (5) 口腔悪性腫瘍患者の HTLV-I に対する免疫応答性
- (6) 口腔悪性腫瘍患者の非特異的免疫応答能と T 細胞サブセットの解析

V 結 語

I. 緒 言

悪性腫瘍の発生には、外的要因と内的要因の2つが関与していると考えられている。前者には生活環境に存在する癌原性物質、放射線などの物理化学的因子¹⁾のほか、癌ウイルス²⁾などの生物学的因子が含まれており、後者には腫瘍発生の体質的遺伝素因³⁾が関係し、民族や家系によって異なった素因が知られている。これらの外因と内因は、相互に作用して腫瘍の発生にかかわっていることが考えられている。以上のうちウイルス性腫瘍については、近年、分子遺伝学的メカニズムについての解

折が著しく進歩してきた⁴⁾ ウイルス性腫瘍にはバーキットリンパ腫⁵⁾、乳頭腫⁶⁾、成人T細胞白血病 (以下 ATL と略す)⁷⁾ などが知られており、宿主細胞遺伝子の活性化と発癌との関係が示唆されている。このうち、ATLの原因ウイルスである Human T-cell leukemia virus type I (以下 HTLV-I と略す)⁸⁾ は日本の南西部、アフリカ、カリブ海周辺諸国に高度に浸淫し⁹⁻¹¹⁾、白血病⁷⁾ならびに痙性脊髄麻痺 (HAM/TSP)^{12,13)} に関与することが知られている。Asou らの報告¹⁴⁾ によると、膀胱癌患者における HTLV-I の浸淫度は健康人集団におけるその5倍強、頭頸部悪性腫瘍では4倍強であることが明らかにされている。また、丸山ら¹⁵⁾ も頭頸部悪性腫瘍患者のうち HTLV-I ウイルスキャリアは ATL 多発地域である沖縄県では5倍、ATL 非多発地域である千葉県でも高率であり、しかも、臓器特異性はなく種々の癌患者で全般的に HTLV-I キャリアが多かったと報告している。鹿児島県は ATL 多発地区であり、HTLV-I ウイルスキャリアは16.5万人と推定されている¹⁶⁾ が、本県における悪性腫瘍患者での HTLV-I 浸淫の実態は、まだ明らかにされていない。近隣の各地でみられる ATL と固型癌の合併例¹⁷⁻²⁰⁾ と同様な症例が多数存在する可能性がある。

最近、宇宿・園田らは、ATL 患者の HLA は特異な型別を示し免疫遺伝学的背景が平均的日本人とは異なっていることを報告している²¹⁾。この HLA 抗原はヒト第6染色体短腕に存在する組織適合性抗原を代表する分子であり、臓器移植での適合性、免疫生体防御での異物識別、疾患感受性の素因などに関連して重要な機能を有するといわれ、親から子に優性遺伝する形質である²²⁾。

そこで、著者は口腔悪性腫瘍の発症に関する外的要因の一つとして HTLV-I⁸⁾ の関与に着目し、また、内的要因として HLA に連鎖した遺伝素因²²⁾ に注目し、これらと口腔悪性腫瘍の発症との関係を検索した。

II. 研究対象ならびに方法

1. 研究対象

昭和62年1月から12月までに鹿児島大学歯学部第一口腔外科学教室外来および病室で治療中の口腔悪性腫瘍患者のうち、鹿児島県内に本籍をおく78例の患者を対象として研究を行った (表1)。非口腔悪性腫瘍患者対照群として、他疾患 (智歯周囲炎、扁平苔癬、術後性上顎嚢胞、上下顎骨折、プランマービンソン症候群、唾石症、唾液腺炎、異物による炎症) の外来患者8例を対象として用いた。これらの患者の輸血歴の有無については、本人からの問診により聴取した。

2. 研究方法

(1) 患者血清およびリンパ球の分離

対象患者の末梢静脈血を本人の同意のもとに採血し、

表 1 対象患者の属性分布

ID-No.	性別	年齢	診 断 名	輸血	病理組織像	ID-No.	性別	年齢	診 断 名	輸血	病理組織像
001	男	60	舌 癌	無	扁平上皮癌	040	男	64	頬粘膜癌	無	扁平上皮癌
002	男	62	舌 癌	無	扁平上皮癌	041	男	81	頬粘膜癌	無	扁平上皮癌
003	男	78	舌 癌	無	扁平上皮癌	042	男	54	頬粘膜癌	無	扁平上皮癌
004	男	77	舌 癌	無	扁平上皮癌	043	男	81	頬粘膜癌	無	粘表皮癌
005	男	58	舌 癌	無	扁平上皮癌	044	男	72	上唇癌	無	扁平上皮癌
006	男	51	舌 癌	無	扁平上皮癌	045	男	75	下唇癌	無	扁平上皮癌
007	男	75	舌 癌	無	扁平上皮癌	046	男	58	下唇癌	無	扁平上皮癌
008	男	51	舌 癌	無	扁平上皮癌	047	男	71	下唇癌	無	扁平上皮癌
009	男	64	舌 癌	無	扁平上皮癌	048	男	32	上顎歯肉癌	無	扁平上皮癌
010	男	61	舌 癌	無	扁平上皮癌	049	男	67	下顎歯肉癌	無	扁平上皮癌
011	男	53	舌 癌	無	扁平上皮癌	050	男	59	下顎歯肉癌	無	扁平上皮癌
012	男	71	舌 癌	無	扁平上皮癌	051	男	60	下顎歯肉癌	無	扁平上皮癌
013	男	70	舌 癌	無	扁平上皮癌	052	男	51	悪性リンパ腫	無	悪性リンパ腫
014	男	70	舌 癌	無	扁平上皮癌	053	男	62	悪性黒色腫	無	悪性黒色腫
015	男	67	舌 癌	無	扁平上皮癌	054	男	62	耳下腺癌	無	腺様嚢胞癌
016	男	66	舌 癌	無	扁平上皮癌	055	女	36	舌 癌	無	扁平上皮癌
017	男	48	舌 癌	無	扁平上皮癌	056	女	72	舌 癌	無	扁平上皮癌
018	男	63	舌 癌	無	扁平上皮癌	057	女	72	舌 癌	無	扁平上皮癌
019	男	67	舌 癌	無	扁平上皮癌	058	女	77	舌 癌	無	扁平上皮癌
020	男	75	舌 癌	無	扁平上皮癌	059	女	64	舌 癌	無	扁平上皮癌
021	男	59	口底癌	無	扁平上皮癌	060	女	30	舌 癌	無	扁平上皮癌
022	男	59	口底癌	無	扁平上皮癌	061	女	73	舌 癌	無	扁平上皮癌
023	男	50	口底癌	有	扁平上皮癌	062	女	82	舌 癌	無	扁平上皮癌
024	男	72	口底癌	無	扁平上皮癌	063	女	67	舌 癌	無	扁平上皮癌
025	男	63	口底癌	無	扁平上皮癌	064	女	51	舌 癌	無	扁平上皮癌
026	男	63	口底癌	無	扁平上皮癌	065	女	76	舌 癌	無	扁平上皮癌
027	男	59	口底癌	無	扁平上皮癌	066	女	47	舌 癌	無	扁平上皮癌
028	男	73	口底癌	無	扁平上皮癌	067	女	69	口底癌	無	扁平上皮癌
029	男	79	口底癌	無	扁平上皮癌	068	女	61	口底癌	無	扁平上皮癌
030	男	72	口底癌	無	扁平上皮癌	069	女	50	下顎歯肉癌	無	扁平上皮癌
031	男	57	口底癌	無	扁平上皮癌	070	女	77	下顎歯肉癌	無	扁平上皮癌
032	男	68	口底癌	無	扁平上皮癌	071	女	62	下顎歯肉癌	有	扁平上皮癌
033	男	64	口底癌	無	扁平上皮癌	072	女	77	頬粘膜癌	無	扁平上皮癌
034	男	54	口底癌	無	扁平上皮癌	073	女	71	頬粘膜癌	無	扁平上皮癌
035	男	64	口底癌	有	扁平上皮癌	074	女	61	頬粘膜癌	無	扁平上皮癌
036	男	83	下顎歯肉癌	無	扁平上皮癌	075	女	62	下唇癌	無	扁平上皮癌
037	男	74	下顎歯肉癌	無	扁平上皮癌	076	女	48	上顎歯肉癌	無	扁平上皮癌
038	男	73	下顎歯肉癌	無	扁平上皮癌	077	女	59	上顎歯肉癌	無	扁平上皮癌
039	男	45	下顎歯肉癌	無	扁平上皮癌	078	女	78	上顎歯肉癌	無	扁平上皮癌

常法により血清を分離し-20℃保存，用時検体とした．リンパ球の分離はヘパリン（ノボヘパリン：ノボインダストリー A/S）加末梢静脈血を採取し，ダルベッコの磷酸緩衝液（以下 PBS と略す）で 2 倍希釈したのち，Böyum の変法^{23）}を用いて行った．分離されたリンパ球

（PBLs）は氷冷下で30％ウシ胎児血清（以下 FCS、Flow Labs.）加 RPMI 1640 に 1×10^7 /ml となるように浮遊させたのち，等量のジメチルスルホキシド（以下 DMSO）を含む培地の冷 20％ DMSO-10％FCS-RPMI 1640 を段階的（50 μ l/sec）に添加し，終濃度 10％DMSO-

図1 ドットブロット法およびサザンブロット法

20%FCS-RPMI 1640 とし、これをセラムチューブ (住友ベークライト: MS 4502) に入れ slow freezing (1°C/min) で -80°C 超低温冷凍庫内に一晚保存後、液体窒素容器に凍結保存した²⁴⁾ これを用時解凍して検体として用いた。

(2) 抗 HTLV-I 抗体の測定

a) セラチン粒子凝集法 (PA 法)

抗 HTLV-I 抗体の一次スクリーニングとしてセロディア ATLA キット (富士レビオ社) を用いて Ikeda らの方法²⁵⁾により凝集反応を行った。判定は3時間判定で16倍以下を陰性、32倍以上を陽性とし、抗体価は最大血清希釈倍数で表示した。

b) 間接蛍光抗体法 (IF 法)

二次スクリーニングは、HTLV-I 感染リンパ球である MT-1 細胞抗原 (鹿児島大学医学部ウイルス学教室から分与) を用いる間接蛍光抗体法²⁶⁾により行った。MT-1 細胞は 5-ヨード-2'-デオキシウリジン (以下 Iudr: 50 µg/ml) を含む 10%FCS-RPMI 1640 で3日間培養により HTLV-I 関連抗原陽性細胞を誘導²⁷⁾し、その細胞浮遊液を PBS で洗浄後、マルチスライドプレート (Flow labs.) に塗抹乾燥後、冷アセトン固定 (10分間)、-20°C で乾燥保存し用時開封して用いた。患者血清 5 µl を MT-1 細胞プレートにのせ湿潤箱内で20分間反応させ PBS で3回洗浄後、2次抗体としてイソチオシアン酸フルオレセイン (以下 FITC) 標識抗ヒト IgG (Jackson

immunoresearch Labs.) を同様に反応させた。90%buffered glycerin (0.05 M Carbohydrate buffer, pH 9.5) で封入後、蛍光顕微鏡 (オリンパス BH-2) 下に蛍光陽性細胞を検鏡した。

(3) 患者末梢血リンパ球 (PBLs) からの HTLV-I プロウイルス DNA の検出

a) PBLs-DNA の迅速抽出法

著者は、HTLV-I プロウイルス DNA の迅速診断を行うために、以下に述べる方法を開発し本研究に応用した。凍結保存 PBLs を用いて、10%ヒト非働化血清加 RPMI 1640 で6日間培養 (一次培養)、Percoll 密度勾配遠心法で生細胞のみを分離²⁸⁾し、これを Difco 社のフィトヘマグルチニン p (以下 PHA) 5 µg/ml と、武田薬品工業社のリコンビナントインターロイキン 2 (以下 r-IL 2) 10 U/ml を含む 10% FCS-RPMI 1640 で20日間培養 (二次培養) を行い 2×10^7 個の生細胞標品を得た。これを PBS で洗浄後、細胞沈渣を氷冷下でよくほぐし10倍量の溶解用バッファー (10 mM トリス塩酸 (pH 7.4), 10 mM EDTA, 150 mM 塩化ナトリウム, 0.4% SDS および 1 mg/ml プロテイナーゼ K (Merck)) をすばやく加え、50°C, 3時間軽く振蕩反応させながら DNA 結合性蛋白を消化した。等量のフェノール:クロロホルム液 (1:1) を加え数分間静かに振蕩させたのち 1,400 G, 10分間遠心、上層の DNA 溶液を分取した。この操作を3回繰り返して除蛋白したのち、2倍量のエタ

ノール液(エタノール:アセテートバッファー(pH 5.5)=9:1)を加え白濁液を得た。これをガラスマイクロファイバーフィルター(Whatman GF/F)で濾過し、DNA沈澱を分取した。10倍量の冷70%エタノールで洗浄したのち、DNA沈澱をフィルターごと1mlの10 mM トリス塩酸(pH 7.4), 1 mM EDTA(以下 TE 溶液)にひたし、24 μ l のリボスクレアーゼ A (SIGMA, デオキシリボスクレアーゼ不含有, 10 mg/ml)を加えガラス棒でよく碎き、37°C で3時間、保温振蕩後12,000 G, 10分間遠心して DNA を遊離させた。この操作を37°C, 1時間溶出で2回繰り返す。ブールした DNA 溶出液にエタノールを加え沈澱させた DNA を TE 溶液に再溶出し精製 DNA を回収した(図1A)。DNA の濃度は260 nm の吸光度(50 μ g/ml=OD²⁶⁰1.0)で、精製度は OD 260/280=1.8 を指標に評価、分析した。

b) HTLV-I プロウイルス DNA のドットプロット法およびサザンプロット法による検出

著者は、ビオチン標識 DNA プローブを用いた非放射線性プロウイルス検出法²⁹⁻³⁰⁾を応用し、HTLV-I プロウイルス DNA の検出を試みた。HTLV-Igag-pol DNA (pATK-32, 癌研究所ウイルス部吉田光昭博士より分与)をマルチプライム DNA ラベリングシステム (Amersham)^{31,32)}により Biotin-11dUTP で標識した。患者 PBLs より抽出された DNA (5 μ g)と制限酵素 EcoRI (Bethesda Research Labs.) 5 ユニットで18時間、37°C 反応させ DNA 断片を作製した。これをエタノールで沈澱させ、TE 溶液に溶解後以下のごとく電気泳動によるサザンプロット法³³⁾およびドットプロット法³⁴⁾でプロウイルス DNA を検索した。DNA 検体を吸着させ、またはトランスファーしたニトロセルロース膜を2倍 SSC で洗浄風乾のち、80°C, 2時間焼き付けし DNA フィルターを作製した。これを用いてプレハイブリダイゼーションを42°C, 4時間行ったのち、上記のビオチンでラベルした HTLV-I プローブ(2 μ g/ml)をハイブリバグ(コスモバイオ株式会社:S-1001)にいれ、42°C, 18時間反応させた。反応後、非放射性核酸検出システム (BluGENETM: Bethesda Research Labs.)により以下のごとく反応させた。HTLV-I プローブとハイブリダイズさせたフィルターを0.1% SDS を含む2倍 SSC (室温, 5分間)で2回、0.1% SDS を含む0.2倍 SSC (室温, 5分間)で2回、0.1% SDS を含む0.16倍 SSC (50°C, 15分間)で2回洗浄後、2倍 SSC で1回洗い、バッファー1(後述)に室温で1分間浸した後、ブロッキングのためにバッファー2(後述)で65°C, 1時間ハイブリバグ内で保温した。ブロッキング後1 μ g/mlのストレプトアビジンアルカリフォスファターゼコンジュゲート(以下 SA-AP conjugate)を入れ、ゆっくり振蕩させながら室温で10分間反応させ、つづいて、バッファー1(室温, 10分間)で2回、

バッファー3(後述, 室温, 10分間)で1回洗浄後、NBT-BCIP 溶液で発色させた(図1B)。この操作で用いた試薬の組成は、以下のとおりである。2倍 SSC: 0.3 M 塩化ナトリウム, 0.03 M クエン酸ナトリウム(pH 7.0) 10倍 SSC: 1.5 M 塩化ナトリウム, 0.15 M クエン酸ナトリウム(pH 7.0) プレハイブリダイゼーション溶液: 50%脱イオン化ホルムアミド(以下 diFA), 5倍 SSC, 5倍 Denhardt's 溶液(0.1% (W/V) フィコール, 0.1% (W/V) ポリビニルピロリドン, 0.1% (W/V) ウシ血清アルブミン(以下 BSA), 25 mM リン酸ナトリウム(pH 6.5), 0.5 mg/ml 鮭精巢 DNA ハイブリダイゼーション溶液: 45% diFA, 5倍 SSC, 1倍 Denhardt's 溶液, 20 mM リン酸ナトリウム(pH 6.5), 0.2 mg/ml 鮭精巢 DNA, 5%硫酸デキストラン, バッファー1: 0.1 M トリス塩酸(pH 7.5), 0.15 M 塩化ナトリウム, バッファー2: 3 g (W/V) BSA/100 ml バッファー1, バッファー3: 0.1 M トリス塩酸(pH 9.5), 0.1 M 塩化ナトリウム, 50 mM 塩化マグネシウム, SA-AP conjugate: 1.0 mg/ml in 3 M 塩化ナトリウム, 1 mM 塩化マグネシウム, 0.1 mM 塩化亜鉛, 30 mM トリエタノールアミン(pH 7.6)

(4) HLA タイピング

凍結保存 PBLs を解凍しBリンホクイック(ベリタス社)³⁵⁾でTリンパ球とBリンパ球を分離して HLA タイピングの検体とした。HLA タイピングトレーは第9回国際 HLA ワークショップ標準化血清を用いて作製されたものを応用した(鹿児島大学医学部ウイルス学教室より分与)。HLA タイピングの手技は Terasaki の標準法³⁶⁾に従い HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ 抗原についてリンパ球傷害テストで行った。HLA 抗体との反応性は死細胞のエオジン染色性を位相差顕微鏡(ニコンTMS)で検鏡し、死細胞%が81~100%(スコア8), 41~80%(スコア6), 21~40%(スコア4), 11~20%(スコア2), 0~10%(スコア1)の5段階で評価し、スコア6以上を陽性反応とした。日本人正常集団の HLA タイプは第9回日本 HLA ワークショップ共同報告書(1985.10)により、また、鹿児島県一般健康人集団の HLA タイプは鹿大ウイルス学教室の研究成績を参考として用いた。

(5) 患者 PBLs の細胞性免疫能の分析

患者末梢血中の Tリンパ球サブセットを FITC 標識モノクローナル抗体 T11, T4, T8 (Coulter Immunology, USA) でそれぞれ反応させ、フローサイトメトリー (EPICS CS, Coulter Immunology, USA) で全 T 細胞, CD 4, CD 8 陽性 Tリンパ球サブセットの比率を測定した。レーザーの波長および出力は、488 nm, 500 mW を使用した。また、HTLV-I 抗原に対する特異 Tリンパ球応答反応の測定では、HTLV-I 感染リンパ球である MT-2 細胞由来 HTLV-I ビリオン抗原(6.25 ug protein/well)(鹿児島大学医学部ウイルス学教室よ

表 2 口腔悪性腫瘍患者（非輸血者）における抗 HTLV-I 抗体陽性率

男				女			合 計		
年 齢	対象数	陽性数	陽性率(%)	対象数	陽性数	陽性率(%)	対象数	陽性数	陽性率(%)
0~29	0	0	0.0	0	0	0.0	0	0	0.0
30~39	1	0	0.0	2	1	50.0*	3	1	33.3
40~49	2	0	0.0	2	1	50.0	4	1	25.0
50~59	13	3	23.1	3	0	0.0	16	3	18.8
60~69	17	4	23.5	6	3	50.0	23	7	30.4
70~79	16	3	18.8	9	4	44.4	25	7	28.0
80~89	3	1	33.3	1	0	0.0	4	1	25.0
合 計	52	11	21.2**	23	9	39.1**	75	20	26.7***

鹿児島県一般健康人集団（野村紘一郎，医学研究，54(7)：34~65，1984）との比較

*：p<0.05，**：p<0.01，***：p<0.001

表 3 迅速 DNA 抽出法

	回収率 (c.p.m.)	回収率 (%)
³ H-チミジン標識 MT-2 細胞ライゼート	994,304±77,973 c.p.m.	100 (%)
フィルター捕捉 DNA	851,399±33,222 c.p.m.	85.9±3.4
溶出 DNA* (1, 2, 3 回をプール)	565,527±77,841 c.p.m.	56.6±3.4
*DNA 精製度 (OD**)	1.76±0.06	

OD**=Optical density

り分与)を用いて *in vitro* 混合培養による ³H-チミジン (1 μCi/well) の取り込み法²¹⁾で測定した。これを抗 HTLV-I 抗体価ならびに CD 4, CD 8 サブセット比と関連させ評価した。また、同様の反応を非特異的 T 細胞刺激抗原である PHA (0.4 μg/well) を用いて行った。

なお，T11 は T 細胞全般，T4 は helper/inducer T 細胞，T8 は suppressor/cytotoxic T 細胞とそれぞれ反応するマウスモノクローナル抗体である。

III. 研究 結 果

(1) 鹿児島県における口腔悪性腫瘍患者の属性の検討

対象患者78例について部位別発生頻度，年齢，性差，病理組織像について調べた(表1)。部位別発生頻度は，舌32例(41.0%)，口底17例(21.8%)，下顎歯肉10例(12.8%)，頬粘膜7例(9.0%)，口唇5例(6.4%)，上顎歯肉4例(5.1%)，その他3例(3.8%)であった。

年齢別では，60歳代，70歳代がそれぞれ25例(32.1%)で最も多く，次に50歳代(21.8%)，40歳代・80歳

代(5.1%)と続き30歳代(3.8%)が最も少なかった。年齢は最低36歳から最高83歳にわたり平均は63.7歳であった。

性差は男性54例，女性24例で男女比はほぼ2:1を示した。

性差年齢別では男性では60歳代が最も多く，ついで70歳代，50歳代と続くが，女性では70歳代が最も多く，ついで60歳代，50歳代となっていた。

病理組織学的検索では扁平上皮癌が74例(94.9%)，悪性リンパ腫1例(1.3%)，悪性黒色腫1例(1.3%)，腺様嚢胞癌1例(1.3%)，粘表皮癌1例(1.3%)であった。

(2) 口腔悪性腫瘍患者における抗 HTLV-I 抗体の保有状況

鹿児島県内に本籍を有する口腔悪性腫瘍患者78例のうち，抗 HTLV-I 抗体陽性者，すなわち HTLV-I キャリアは26.9%であり，そのうち男性22.2%，女性37.5%であった。また，非輸血群では抗 HTLV-I 抗体陽性者が26.7%であり，そのうち男性21.2%，女性39.1%で，一方輸血群では33.3%でありそのうち男性50.0%，女性0.0%であった(表2)。すなわち，輸血による有意差

表 4 口腔悪性腫瘍患者末梢血リンパ球からの Proviral DNA の検出

ID-No.	性別	年齢	診 断 名	抗 HTLV-I 抗体価		Proviral DNA
				PA 法	IF 法	
001	男	60	舌 癌	16384	+	n.t.*
002	男	62	舌 癌	1024	+	—
003	男	78	舌 癌	512	+	n.t.
004	男	77	舌 癌	4096	+	n.t.
005	男	58	舌 癌	256	+	n.t.
021	男	59	口底癌	256	+	+
022	男	59	口底癌	2048	+	+
023	男	50	口底癌	4096	+	n.t.
024	男	72	口底癌	4096	+	—
036	男	83	下顎歯肉癌	256	+	n.t.
040	男	64	頬頬膜癌	32	+	n.t.
054	男	62	耳下腺癌	16384	+	n.t.
055	女	36	舌 癌	1024	+	+
056	女	72	舌 癌	16384	+	+
057	女	72	舌 癌	8192	+	n.t.
067	女	69	口底癌	4096	+	n.t.
072	女	77	頬粘膜癌	256	+	n.t.
073	女	71	頬粘膜癌	4096	+	n.t.
074	女	61	頬粘膜癌	128	+	n.t.
075	女	62	下唇癌	1024	+	n.t.
076	女	48	上顎歯肉癌	8192	+	+

* : n.t.=not tested

陽性率 5/7

写真 1 ドットプロット法による抗 HTLV-I 抗体陽性悪性腫瘍患者 (OMT-AC-022) からの Proviral DNA の同定

a: OMT-AC-022 (DNA : 10 μ g) b: OMT-AC-022 (DNA : 5 μ g) c: OMT-AC-022 (DNA : 1 μ g)
d: OMT-AC-022 (DNA : 0.1 μ g) e: 陽性コントロール (MT-2 細胞 DNA : 5 μ g) f: 陰性コントロール (NIS-DNA : 5 μ g)

は認められなかった。抗体価は32倍～16,384倍まであり、平均2,048倍であった。抗体を保有する男性患者群のうち50～89歳までの年齢層で、鹿児島県一般健康人集団の抗 HTLV-I 抗体保有率¹⁶⁾と比較すると、口腔悪性腫瘍患者で2倍以上の陽性率が認められた。女性患者群でも30歳代から抗体保有者が認められ、これらを上記一般健康人集団のそれと比較すると、男性患者同様に2倍の陽性率が認められた。

(3) 口腔悪性腫瘍患者の PBLs からの HTLV-I プロウイルス DNA の検出

今回、著者が開発したグラスマイクロファイバーを用いた迅速 DNA 抽出法では陽性対照標品である³⁾H-チミン標識 MT-2 細胞からの DNA の回収率は全細胞の約半分 (56.6%) であったが、精製度の高い高分子 DNA が調製される従来法³⁷⁾とほぼ同様の DNA 標品を入手することができた (表3)。口腔悪性腫瘍患者で抗 HTLV-I 抗体陽性者のうち長期培養可能であった7名の PBLs より上記の方法で DNA を抽出し、ピオチン標識した非放射性 HTLV-I プロブで HTLV-I プロウイルスの検索を行ったところ、写真1に示す如く1 μ g

表 5 口腔悪性腫瘍患者の HLA 抗原頻度

HLA ^a	OMT(AC+N) ^b (N=48)		Kagoshima (N=110)		Japanese (n=1998)	
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
A 1	1	(2.1)	1	(0.9)	33	(1.7)
A 2	25	(52.1)	41	(37.3)	834	(41.7)
A 3	0	(0)	2	(1.8)	22	(1.1)
A 11	8	(16.7)	22	(20.0)	369	(18.5)
A 24	23	(47.9)	79	(72.8)	1169	(58.5)
A 26	16	(33.3)	19	(17.3)	441	(22.1)
A 31	4	(8.3)	10	(9.1)	321	(16.1)
Aw 33	4	(8.3)	9	(8.2)	283	(14.2)
B 7	2	(4.2)	12	(10.9)	223	(11.2)
B 13	1	(2.1)	4	(3.6)	70	(3.5)
B 17	1	(2.1)	1	(0.9)	36	(1.8)
B 27	0	(0)	0	(0)	17	(0.9)
B 35	1	(2.1)	26	(23.6)	260	(13.0)
B 37	0	(0)	0	(0)		
B 38	0	(0)	1	(0.9)	25	(1.3)
B 39	1	(2.1)	4	(3.6)	159	(8.0)
B 44	3	(6.3)	12	(10.9)	271	(13.6)
Bw 46	0	(0)	2	(1.8)	167	(8.4)
Bw 48	1	(2.1)	7	(6.4)	116	(5.8)
B 51	7	(14.6)	9	(8.2)	289	(14.5)
Bw 52	13	(27.1)	29	(26.4)	333	(16.7)
Bw 54	6	(12.5)	16	(14.5)	284	(14.2)
Bw 55	7	(14.6)	6	(5.5)	110	(5.5)
Bw 56	0	(0)	1	(0.9)	49	(2.5)
Bw 59	5	(10.4)	10	(9.1)	82	(4.1)
Bw 60	4	(8.3)	6	(5.5)	218	(10.9)
Bw 61	11	(22.9)	11	(10.0)	469	(23.5)
Bw 62	9	(18.8)	20	(18.2)	287	(14.4)
Bw 67	1	(2.1)	1	(0.9)	58	(2.9)
Cw 1	20	(41.7)	33	(30.0)	531	(26.6)
Cw 2	0	(0)	0	(0)		
Cw 3	24	(50.0)	75	(68.2)	916	(45.8)
Cw 4	4	(8.3)	6	(5.5)		
Cw 5	0	(0)	1	(0.9)		
Cw 6	0	(0)	0	(0)		
Cw 7	4	(8.3)	14	(12.7)	459	(23.0)
DR 1	4	(8.3)	12	(10.9)	203	(10.2)
DR 2	16	(33.3)	35	(31.8)	581	(29.1)
DR 3	1	(2.1)	1	(0.9)	13	(0.7)
DR 4	16	(33.3)	39	(35.5)	696	(34.8)
DR 5	3	(6.3)	8	(7.3)	253	(12.7)
DRw 6	3	(6.3)	25	(22.7)	318	(15.9)

表 5 つづき

HLA ^a	OMT (AC+N) ^b (N=48)		Kagoshima (N=110)		Japanese (n=1998)	
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
DR 7	0	(0)	1	(0.9)		
DRw 8	20	(41.7)	17	(15.5)	369	(19.8)
DRw 9	13	(27.1)	24	(12.8)	479	(24.0)
DRw 10	0	(0)	0	(0)	20	(1.0)
DQw 1	28	(58.3)			1122	(56.2)
DQw 3	30	(62.5)			882	(44.1)
TA 10	6	(12.5)			388	(19.4)
Bw 4	28	(58.3)			1040	(52.1)
Bw 6	42	(87.5)			1684	(84.3)
DRw 52	25	(52.1)			996	(49.9)
DRw 53	16	(33.3)			1060	(53.1)

a: HLA=Human Leukocyte Antigen, b: OMT(AC+N)=Patients with Oral Malignant Tumor (Asymptomatic Carrier+Anti-HTLV-I antibody Negative)

表 6 口腔悪性腫瘍患者の HLA 抗原頻度 (鹿児島県一般健康人集団との比較)

HLA	OMT ^a (n=48)		Kagoshima (n=110)		P ^b	RR ^c	CP ^d
	No.	(%)	No.	(%)			
A 26	16	(33.3)	19	(17.3)	<0.05	2.40	NS ^e
B 35	1	(2.1)	26	(23.6)	<0.005	0.07	NS
Bw 61	11	(22.9)	11	(10.0)	<0.05	2.68	
DRw 6	3	(6.3)	25	(22.7)	<0.025	0.23	NS
DRw 8	20	(41.7)	17	(15.5)	<0.0005	3.84	<0.05

a: OMT=Patients with Oral Malignant Tumor, b:P=Yates' correction, c: RR=relative risk, d: CP=corrected p value, e: NS=not significant

以上の DNA 検体量で HTLV-I プロウイルスの存在を確認することができた。陽性コントロール(MT-2 細胞)を含め 5 μ g の DNA 量を用いると、プロウイルスをほぼ確実に検出できることから、他の症例についても 5 μ g の DNA を標準検体量として実験に用いた。その結果、7 例の抗 HTLV-I 抗体陽性者中 5 例からプロウイルスが検出された(表 4)。

(4) 口腔悪性腫瘍患者に関連する HLA の検索

鹿児島県在住の口腔悪性腫瘍患者は HTLV-I の潜伏感染を高率に受けていることが上記の抗体調査ならびにプロウイルスの検索から明らかとなった。そこで、口腔悪性腫瘍の発症と HTLV-I 感受性に関する宿主側素因

の関与を検索する目的で、48例の口腔悪性腫瘍患者を対象として HLA タイピングを行い、鹿児島県一般健康人集団(Kagoshima)ならびに日本人一般集団(Japanese)の HLA と比較検討した(表 5)。HLA-A、-B、-C のクラス I 抗原の分布では鹿児島県一般健康人集団に比し有意差を認めなかったが、HLA-DR 抗原のうち HLA-DRw 8 抗原が口腔悪性腫瘍患者群で有意に高く検出された。(鹿児島県一般健康人集団との比較: RR=3.84, $\chi^2=12.80$, corrected $P<0.05$)(表 6)。次に、口腔悪性腫瘍患者の抗 HTLV-I 抗体保有率との関係を調べるために、口腔悪性腫瘍患者48例の HLA タイプで比較的多く検出された抗原型について、HTLV-I キャリアロ

表 7 口腔悪性腫瘍患者の HLA 抗原頻度 (OMT (AC) と OMT (N) との比較)

HLA	OMT(AC) ^a (n=19)		OMT(N) ^b (n=29)		p ^c
	No.	(%)	No.	(%)	
A 24	11	(57.9)	12	(41.4)	NS ^d
Bw 52	6	(31.6)	7	(24.1)	NS
Bw 60	3	(15.8)	1	(3.4)	NS
Cw 7	3	(15.8)	1	(3.4)	NS
DR 5	2	(10.5)	1	(3.4)	NS
DRw 8	9	(47.4)	11	(37.9)	NS
DRw 53	8	(42.1)	8	(27.6)	NS

a: OMT (AC)=Patients with Oral Malignant Tumor (Asymptomatic Carrier),
b=Patients with Oral Malignant Tumor (Anti-HTLV-I antibody Negative),
c: P=Yates' correction, d: NS=not significant

図 2 口腔悪性腫瘍患者における HTLV-I 特異的 T 細胞免疫応答

a: OMT-AC=Patients with Oral Malignant Tumor-Asymptomatic Carrier
b: OMT-N=Patients with Oral Malignant Tumor-Anti-HTLV-I antibody Negative
c: 10%人血清加 RPMI-1640 培地で 6 日間培養, ³H-チミジン16時間パルスによるとりこみ, HTLV-I ビリオン抗原ある, なしで行った
d: n.t.=not tested

腔悪性腫瘍患者 (19例) と非キャリア口腔悪性腫瘍患者 (29例) で比較したところ, いずれの抗原についても有意差を認めることができなかった (表 7). したがって,

特定の HLA 型別が HTLV-I に感染しキャリアとなることに関連する直接的な証拠は見い出されなかった.
(5) 口腔悪性腫瘍患者の HTLV-I に対する免疫応

答性

口腔悪性腫瘍患者の PBLs を精製 HTLV-I ビリオン抗原と *in vitro* 培養し、T細胞の HTLV-I 特異的免疫応答を測定し非口腔悪性腫瘍患者群のそれらと比較した(図2 a, b, c). HTLV-I キャリア群(図2 a)での HTLV-I 特異的免疫応答反応は HTLV-I 抗原なしで起こる自己増殖反応 (Autologous proliferative response, 以後 APR と略す)²¹⁾を差し引いた ^3H -チミジンの取り込み量で示した。口腔悪性腫瘍患者で HTLV-I キャリアと非キャリア、非口腔悪性腫瘍患者(智歯周膜炎, 扁平苔癬, 術後性上顎嚢胞, 上下顎骨折, プランマービンソン症候群, 唾石症, 唾液腺炎, 異物による炎症)の3群での HTLV-I 特異T細胞免疫応答性の分布を比較するために, 検体の母数を a 群にあわせて換算し投影したものを図2の a', b', c' の折線グラフで示した。a, b, c 群ともに高応答性のものから低応答性のものまで連続的な分布がみられたが, 3者の反応分布パターンに少しずつ偏差傾向が認められた。これに, HTLV-I キャリアにおける自己増殖反応 (APR) の個人差を勘案して再評価すると, 全体的な反応分布パターンは c' > b' > a' の順であった。

HTLV-I キャリア患者群で認められた APR の意義については, 宇宿, 園田らの ATL 家系および HAM 家系での研究から, HTLV-I キャリアに特発する反応として報告されている²¹⁾が, 著者の研究でも APR は HTLV-I 非キャリア群 (e) および非口腔悪性腫瘍患者群 (f) ではまったく認められず, HTLV-I キャリア患者群 (d) においてのみ認められ, HTLV-I キャリアの特性として再確認された。

以上の結果から, HTLV-I に感染した患者群の T 細胞免疫応答は患者の個体間で高・低の反応性を示し, HTLV-I に対する免疫応答の素因が不均一であることが明らかになったが, 液性免疫応答 (抗 HTLV-I 抗体価) においても同様な個体差が認められた。すなわち, 抗 HTLV-I 抗体価と T 細胞応答の反応強度との相関性をみると, 高応答群 (>2,500 cpm) と低応答群 (<2,500 cpm) の間で抗体価はランダムな分布を示し, 細胞性免疫と液性免疫の応答性がそれぞれの患者で分離して機能していることが判明した (図3)。

(6) 口腔悪性腫瘍患者の非特異的免疫応答能と T 細胞サブセットの解析

HTLV-I キャリアでは APR の発現があり, 何らかの免疫異常が想定されたが, これが T 細胞の全般的機能にどのように影響しているかを調べるために PHA に対する非特異反応性を測定した。その結果, HTLV-I キャリア患者群では非キャリア患者群に比し, c' > b' > a' のように PHA 反応が低下していることが明らかとなった (図4)。PHA に対する応答性は T 細胞の機能と密接に関連するといわれ, HTLV-I キャリアにおける免疫

図3 OMT (AC) における細胞性免疫能と液性免疫能の比較

能の低下が示唆されたので, APR に基づく T 細胞サブセットの増殖を CD 4/8 比の変化を指標として解析を行った。HTLV-I キャリア患者 10 例について検索した結果, APR によって CD 4/8 比が増加する群 (ID-No. 021, 072, 076) と CD 4/8 比が減少する群 (ID-No. 002, 003, 022, 024, 055, 056, 073) が存在することが明らかになった (図5)。これを患者の臨床経過と照合させてみると, CD 4/8 比増加群のうち 2 例は初診後 1.0年~1.5年で死亡, 1 例は 3 年後頸部転移を認めた。CD 4/8 比減少群では 7 例中 5 例は予後良好であり, 現在も再発なく生存している。しかし, 2 例は 2 年後に再発をきたしていた (表8)。したがって, APR 反応で CD 4/8 比が上昇する群は予後不良であり, 逆に CD 4/8 比が減少する群では予後良好となることが示され, HTLV-I キャリア患者における, T 細胞サブセットの動きが口腔腫瘍の進展, 予後に関連していることが示唆された。

IV. 総括ならびに考察

(1) 鹿児島県における口腔悪性腫瘍患者の属性の検

図 4 口腔悪性腫瘍患者における PHA に対する T 細胞応答性

a: OMT-AC=Patients with Oral Malignant Tumor-Asymptomatic Carrier
b: OMT-N=Patients with Oral Malignant Tumor-Anti-HTLV-I antibody Negative
c: 10%人血清加 RPMI-1640 培地で 6 日間培養, ^3H -チミジン 16 時間パルスによるとりこみ, PHA (Phytohemagglutinin P, 0.4 $\mu\text{g}/\text{well}$) で行った.

討

一般に口腔癌の発生頻度は全癌腫の 3~6%と報告されている³⁹⁾.

部位別では、小野ら³⁹⁾は 300 例中上顎 45.7%, 下顎 24.7%, 舌 24.4%と報告し、一方、中村ら⁴⁰⁾は 107 例中舌 56.1%, 下顎歯槽・歯肉 15.0%, 口底 13.1%, 頬粘膜 8.4%, 上顎歯槽・歯肉 6.5%, 硬口蓋 1.0%と報告している。今回の著者の成績では、舌 41.0%, 口底 21.8%, 下顎歯肉 12.8%, 頬粘膜 9.0% (表 1) で、中村らの報告に近く、両者が九州地区の患者を対象としたためではないかと推測された。また、著者の結果は教室の山下⁴¹⁾、堂原ら⁴²⁾が報告した結果とほぼ同様であった。欧米諸国では舌癌が多数を占めるといわれているが、今回の患者対象も舌癌が多く欧米型に近かった。

年齢別では 60~70 歳代が最も多く堂原らの報告⁴²⁾とほぼ同様であった。

性別では、男:女=2:1 の比率であったが、これは一般日本人での成績^{38,41,43)}と等しく、欧米諸国 (男:女=3:1)⁴⁴⁾とは多少異なっていた。病理組織像では、94.9

%が扁平上皮癌であり諸家の報告 (90%)^{39,43,45)} とほぼ同頻度であった。

以上のことより、鹿児島県の口腔悪性腫瘍患者は舌癌が圧倒的に多く、欧米型に近いのが特徴的であった。年齢、性別、病理組織像では一般日本人の成績とほぼ同様であった。舌癌を発生させる誘因として、歯牙鋭縁部、不良補綴物などによる慢性刺激が原因となっている例が多いが、欧米諸国と鹿児島県との類似点は、その誘因として、山下⁴¹⁾は患者において飲酒や喫煙者が多かったと報告しており、これらの疫学的背景が両者を類似させているのではないかとと思われる。

(2) 口腔悪性腫瘍患者における抗 HTLV-I 抗体の保有状況

鹿児島県は HTLV-I の高度の浸淫地区として知られているが、ここでの一般健康人における抗 HTLV-I 抗体陽性率は、野村らにより全年齢層での平均は 11.7% (男 9.5%, 女 13.8%) であったと報告¹⁰⁾されている。今回の結果では、口腔悪性腫瘍患者のウィルスキャリアは 78 例中 21 例 (26.9%), 非輸血群では 75 例中 20 例 (26.7

図 5 OMT (AC) での in vitro 培養後の T 細胞サブセットの変化

表 8 OMT (AC) における in vitro 培養後の CD 4/8 比の変化と予後

ID-No.	CD 4/8 比		予 後
	day 0	day 7	
021	0.19	1.27	死 亡
072	0.98	1.92	頸部転移
076	0.34	1.02	死 亡
002	1.28	0.51	良 好
003	0.29	0.17	良 好
022	1.36	0.35	良 好
024	0.83	0.32	良 好
055	1.34	0.52	頸部転移
056	1.15	0.87	頸部転移
073	0.68	0.22	良 好

る除蛋白と透析によって DNA の精製が行われているが、長時間（2日間）を要し多試料の操作には不向きである。著者の方法は、Vogelstein らのガラスビーズ法⁴⁷⁾を改良したもので、グラスマイクロファイバーフィルター（Whatman GF/F）を使用し数時間でしかも多数の検体を同時に処理することができる点が有利であった。この方法では、フェノール抽出した粗 DNA 標品をエタノールで沈澱し、グラスマイクロファイバーフィルターに捕捉させ、冷エタノール洗浄する3段階の操作で残存フェノールの除去と精製 DNA の回収が可能であり、全操作を数時間に短縮できた。しかも、フィルターから溶出された精製 DNA はプロウイルスの同定検査に十分に応用できる高分子 DNA であり、回収率も平均56.6%であり許容される範囲であった（表3）。第2の改良点は、非放射性で高感度の HTLV-I プローブを作製できた点であった。Ward らが開発したビオチン標識法^{29,30)}とアマルシャムのマルチプライム DNA ラベリングシステム^{31,32)}を併用してビオチン標識を行ったところ、HTLV-I プロウイルス DNA の検出感度はラジオアイソトープを用いる常法に比し約 1/10 程度であり、一般実験室での通常の検査に十分に適用できるものであった。データは省略したが MT-2 細胞、ATL 患者の PBLs から今回の方法で抽出した DNA の非放射性プローブを用いたサザンブロット分析にも応用することができた。一般に、HTLV-I キャリアでのプロウイルス保有細胞の PBLs 中での割合は1%以下といわれているので、著者はプロウイルスの検出率の増加をはかるために、HTLV-I 陽性細胞の比率の増幅とウイルスゲノム増加を意図して、APR を利用した in vitro 培養を行った。つまり、患者の PBLs を一次培養と二次培養をあわせて 26 日間培養した標品を検体とした。この方法でのプロウイルス

%)であり、野村らの成績の約2.3倍高率であった(表2)。男女比は4:3であり、野村らの報告(2:3)とは逆転していた。一般に HTLV-I キャリアは女性のほうが多いといわれているが、著者の成績はそれと異なっていた。これは対象者が口腔悪性腫瘍患者であり、男性のほうが女性よりも多い(男 女=2:1)ことが影響しているものと推測された。

したがって、HTLV-I は口腔悪性腫瘍患者においても高度に浸淫し、かつ一般健康人に比べて、HTLV-I 感受性が高いことが確認された。このことは、Asou ら¹⁴⁾や丸山ら¹⁵⁾が報告しているように、免疫の機能異常にも関連していることが示唆された。

(3) 口腔悪性腫瘍患者の PBLs からの HTLV-I プロウイルス DNA の検出

ATL 患者および HTLV-I ウイルスキャリアからの Proviral DNA の同定には、ラジオアイソトープを用いたサザンブロット法⁴⁶⁾が汎用されているが、一般実験室での操作が困難である。そこで、著者は非ラジオアイソトープ使用による HTLV-I プローブを用いて一般実験室での操作を迅速かつ平易に行える方法を開発し本研究に応用した(図1)。この方法の第一の改良点は、DNA の迅速抽出法である。従来法³⁷⁾ではフェノール抽出によ

の検出率は、7例中5例(71.4%)であり満足する結果であった(表4)。この成績は、吉田らのラジオアイソトープ法での検出率の100%に及ばなかったが、ビオチンの標識法を改良し、かつ発色の強度と安定化をはかる方法を検討すれば、ラジオアイソトープなみの検出率が可能と思われた。

(4) 口腔悪性腫瘍患者に関連する HLA の検索

HLA 抗原は、J. Dausset (1958) によって発見されたヒト第6染色体の短腕に存在する遺伝子複合体であり、それにはクラスⅠ(A, B, C)とクラスⅡ(D, DR, DQ)の2つがある。HLA の機能は自己の標識抗原、異物認識、体質の遺伝などに関係し親子の間で優性遺伝する形質である。したがって、癌の発症、予後に関する免疫機序やその他の宿主素因にも関連する機能を有することが提唱されている^{23,49)}。著者は、園田らの提唱する HTLV-I 感受性と HLA の相関^{21,49)}が口腔悪性腫瘍患者にも認められ、癌の発症、進展、予後にも関与しているのではないかと想定して、同患者の HLA の検索を行った。その結果、口腔悪性腫瘍患者においては HLA-DRw 8 抗原が有意に高率に検出された(表6)。この HLA-DRw 8 抗原はクラスⅡ HLA 抗原の一つであり、マクロファージ、B細胞、活性化T細胞上に表出され免疫の応答と抑制の調節に関与し、癌を排除する免疫機序にも関連した機能を有する分子である⁴⁹⁾。口腔悪性腫瘍患者において HLA-DRw 8 抗原陽性者が高率にみられたことは、ヘルパーインデューサーの機能をもつ T細胞(Th/i)が、クラスⅡ HLA 抗原と複合した腫瘍細胞抗原を認識し、細胞性免疫のエフェクターを誘導する際に HLA-DRw 8 抗原を表出する個体では Th/i の認識が弱いためか、あるいは腫瘍抗原と HLA-DRw 8 抗原の結合が弱く Th/i の誘導効率が悪いというメカニズムによって腫瘍を排除する免疫機能が十分に発揮されにくいのではないかと推測された。事実、T細胞性エフェクターの拒絶反応が原因とされる習慣性流産患者では HLA-DRw 8 抗原陽性者が際立って少ないこと⁵⁰⁾、腎移植患者の中で生着率がよく拒絶反応が起こりにくいものは HLA-DRw 8 抗原陽性者であること⁵¹⁾が報告されている。したがって、口腔悪性腫瘍患者における癌腫の拒絶反応において、HLA-DRw 8 抗原保有者は同様に低免疫応答性である可能性が推察される。

今回、著者が明らかにした HLA-DRw 8 抗原と口腔悪性腫瘍との遺伝的連鎖は、口腔悪性腫瘍患者のリスクファクターとしての有用性があり、前癌病変患者においては発癌のリスクを把握して予防指針をたてることに活用することができるかも知れない。本研究を除いては、DR 抗原と口腔悪性腫瘍との相関を確認した研究はなく、著者の研究は有意義な知見を提供したものと思われる。今後さらに、症例数を積み重ね HLA-DRw 8 を指標とする口腔腫瘍の発症要因の作用機序を明らかにして

いきたい。

一方、園田らは、ATL 患者、HAM 患者の HLA と免疫応答の機能を検索して、ATL 患者群は HTLV-I に対して低応答性、HAM 患者群は高応答性であることを示し、疾病の発症と免疫遺伝学的素因の関連を明らかにした²¹⁾。著者は、HTLV-I キャリア口腔悪性腫瘍患者においても同様な相関があるのではないかと考え、HTLV-I キャリア患者、非キャリア患者、鹿児島県一般健康人集団の三者間に共通する特異な HLA タイプおよび HTLV-I キャリアに特異な HLA タイプを検索したが、いずれにおいても確認されず、T細胞の免疫応答とも相関しなかった。しかし、園田らの研究で取り扱われたように多数例をもとに精査すれば、口腔悪性腫瘍患者でも HTLV-I に関する高応答性と低応答性の遺伝素因が発見でき、これが HLA と関連する可能性も否定できない。

(5) 口腔悪性腫瘍患者の HTLV-I に対する免疫応答性

T細胞は生体において腫瘍排除の免疫エフェクター⁵²⁻⁵⁵⁾として主体をなすものであり、それぞれの機能をもつT細胞サブセットを分析すれば悪性腫瘍患者の治療指針の設定、予後の推定などを評価できると思われる。HTLV-I は CD4⁺ T細胞に感染し年余を経て ATL を起こすが、それにいたる潜伏期においても、しばしば免疫不全状態を起こすことが知られている。Uchiyama ら⁵⁶⁾や Morimoto ら⁵⁷⁾は、ATL 細胞がサプレッサー細胞として働く可能性を示しており Popovic ら⁵⁸⁾は、HTLV-I がヘルパー T細胞(CD4⁺)やキラー T細胞(CD8⁺)に感染し、その機能を変化させることを、Mitsuya ら⁵⁹⁾は HTLV-I 感染によってキラー T細胞の細胞障害機能が消失することを報告している。Katsuki ら⁶⁰⁾は HTLV-I キャリアにおいて EB ウイルスに対する細胞性免疫の機能低下があると報告している。以上の諸家の研究を総合すると、HTLV-I 感染を受けた患者は細胞性免疫機能が全般的に低下していることがうかがえる。一方、加齢⁶¹⁾に伴う生体変化、環境因子への暴露などによって起こる発癌の可能性は常に存在していると考えられ、T細胞を主役とする生体防御監視系(細胞傷害性Tリンパ球、ナチュラルキラー細胞、K細胞など)によって癌化した細胞は排除されているといわれる。したがって、このT細胞の機能低下は癌の進展を許容し、予後に影響すると思われる⁶²⁻⁶⁵⁾が、著者が検索した鹿児島県の口腔悪性腫瘍患者は、ATL 多発地域に居住するものが多く HTLV-I 感染によるT細胞の機能に影響をうけやすい状況にあると思われた。つまり、加齢、その他の外来因子によって癌化細胞が出現すると、これを排除するT細胞機能の低下が背景となって腫瘍発生のリスクを高めているのではないかと推測された。事実、口腔悪性腫瘍患者に HTLV-I が感染すると

T細胞の免疫応答性は低下傾向を示すことが確認された(図2)。この細胞性免疫能の低下は液性免疫能とは独立して起こり、HTLV-I キャリアの生体内での免疫応答の複雑さがうかがわれた(図3)。しかし、口腔悪性腫瘍患者では PHA 反応の低下(後述)にみられるように、全般的免疫能の低下傾向が進行しており、HTLV-I の感染はこれをより一層低下させる傾向を示すことから、患者の予後に悪影響を及ぼしていることが示唆された。したがって、治療指針の設定にあたってはこれを十分考慮する必要があると思われた。

(6) 口腔悪性腫瘍患者の非特異的免疫応答能と T 細胞サブセットの解析

口腔悪性腫瘍患者の T 細胞免疫能の低下傾向は非特異的抗原刺激(PHA)との反応性においても認められ、その傾向は HTLV-I 感染によってさらに増強された(図4)。一方、HTLV-I キャリアの APR に伴う T 細胞サブセットの変化を口腔悪性腫瘍患者でみると、CD4/8 比は症例ごとに異なっていたが、大別して 2 群に分けることができた(図5)。APR による CD4/8 比の変化と患者の臨床経過との関係を照合すると、CD 4/8 比増加群は一般に予後が悪く、CD4/8 比減少群では予後が良好であった(表8)。ATL患者では CD4/8 比が極端に高く、HAM 患者では低い²¹⁾。前者は予後不良であり後者は緩徐な進行で致死的ではないことが報告されているが、著者の成績ではこれらの予後の推移とよく合致していた。CD4/8 比の減少すなわち CD8⁺ 細胞の増加は CTL 活性をもつ T 細胞サブセットの増加が期待され、腫瘍細胞を殺傷し予後を好転させる結果となっているのではないかと考えられた。

ゆえに患者の T 細胞サブセット分析は口腔悪性腫瘍患者における予後の判定に寄与する有用な情報を提供するものと思われた。

V. 結 語

口腔悪性腫瘍患者における HTLV-I の浸淫とそれに対する免疫応答能、T 細胞サブセット、HLA による遺伝的背景、発癌と予後について検討し、以下の結論を得た。

1) 鹿児島県における口腔悪性腫瘍患者の属性については、部位別では舌>口底>下顎歯肉>頬粘膜の順であった。男女比では 2:1、年齢別では 60~70 歳代が最も多く、病理組織像では扁平上皮癌(94.9%)が多かった。

2) 口腔悪性腫瘍患者では、一般健康人に比べて抗 HTLV-I 抗体陽性者が約 2.3 倍多くみられた。男女比では 4:3 と男性が多かった。

3) 今回、迅速診断法開発のために行ったグラスマイクロファイバーを利用した DNA 抽出法とビオチン化プ

ローブを用いたドットプロット法では、DNA の回収率は 56.6%、精製度は $OD\ 260/280 = 1.76 \pm 0.06$ で、一般実験室での DNA 診断に有用であった。この方法を用いると、HTLV-I キャリア 7 例中 5 例から HTLV-I プロウィルスを検出でき満足すべき結果が得られた。

4) 口腔悪性腫瘍患者と対照群を HTLV-I キャリア口腔悪性腫瘍患者(OMT(AC))、非キャリア口腔悪性腫瘍患者(OMT(N))、鹿児島県一般健康人集団(N)に分け HLA タイプを比較したところ、3 者間に共通する特異な HLA タイプおよび HTLV-I キャリアでの特異な HLA タイプはみられなかったが、前 2 者の口腔悪性腫瘍患者群では HLA-DRw 8 抗原陽性者が有意に高く検出され($p < 0.05$)、口腔悪性腫瘍の発症との関連が示唆された。

5) HTLV-I ビリオン抗原に対する特異応答性は OMT(AC)、OMT(N)、(N) 群において反応分布に偏差傾向がみられ、 $N > OMT(N) > OMT(AC)$ の順位で反応強度に差異がみられた。OMT(AC)では HTLV-I 感染に特有な APR が 14 例中 9 例にみられ潜在的な免疫異常の存在が示唆された。

6) PHA に対する非特異免疫応答性では $N > OMT(N) > OMT(AC)$ の順に反応強度の低下傾向がみられ、口腔悪性腫瘍患者における HTLV-I 感染の影響が認められた。OMT(AC)での T 細胞サブセット分析では APR に伴って起こる CD4/8 比の変化が増加する群と減少する群の 2 群に分かれ、前者では患者の予後が悪く後者では予後良好であった。すなわち、CD4 が減少し、CD8 サブセットが増加する群では癌の進展を抑制する何らかの免疫能が働いていることが推察された。この結果をもとに、T 細胞サブセットを指標として予後の判定ができると考えられた。

以上の結果より、HTLV-I は口腔悪性腫瘍発生に直接作用している可能性は少ないが、間接的な効果として T 細胞の機能異常を引き起こし、細胞性免疫能の低下による腫瘍の進展、予後への悪影響が推察された。とくに、T 細胞サブセット比の個体差は患者の予後に関連して重要な決定因子であることが明らかにされ、宿主側要因として注目すべきものであった。これと、HLA-DRw 8 の口腔悪性腫瘍患者での多発との相関について、今回の研究では一見関連性を認めなかったが、さらに症例を重ね検討を加えたい。

稿を終えるにあたり、ご懇切なるご指導とご校閲を賜った鹿児島大学歯学部第一口腔外科学教室山下佐英教授に深甚なる感謝の意を表します。また、直接ご指導、ご教示、ご校閲をいただいた本大学医学部ウイルス学教室園田俊郎助教授、屋敷伸治助手、高橋和郎助手に深甚なる感謝の意を表します。最後に本学第一口腔外科学教室員各位に心からの謝意を表します。

なお、本論文の要旨は、昭和 62 年 9 月の第 51 回日本口

腔外科学会九州地方部会（北九州），および昭和63年6月の第42回日本口腔科学会総会（札幌）において発表した。

引用文献

- 1) Shaw, M.W.: Human Chromosome Damage by Chemical Agents. *Ann Rev Med* 21: 409-432 1970.
- 2) zur Hausen, H.: The Role of Viruses in Human Tumors. *Adv Cancer Res* 33: 77-107 1980.
- 3) 菊池郁夫, 笹月健彦: 癌体質の遺伝, 代謝, 臨時増刊号, 癌 '86 23: 167-174 1986.
- 4) Bishop, J.M.: Cellular Oncogenes and Retroviruses. *Ann Rev Biochem* 52: 301-354 1983.
- 5) Epstein, M.A., Achong, B.G., et al.: Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* I: 702-703 1964.
- 6) zur Hausen, H.: Condylomata Acuminata and Human Genital Cancer. *Cancer Res* 36: 794 1976.
- 7) Uchiyama, T., Yodoi, J., et al.: Adult T-Cell Leukemia: Clinical and Hematologic Features of 16 Cases. *Blood* 50: 481-492 1977.
- 8) Watanabe, T., Seiki, M., et al.: HTLV Type I (U.S. Isolate) and ATL (Japanese Isolate) Are the Same Species of Human Retrovirus. *Virology* 133: 238-241 1984.
- 9) Hinuma, Y., Komoda, H., et al.: Antibodies to Adult T-Cell Leukemia-Virus-Associated Antigen (ATLA) in Sera from Patients with ATL and Controls in Japan: A Nation-Wide Sero-Epidemiologic Study. *Int J Cancer* 29: 631-635 1982.
- 10) Saxinger, W., Blattner, W.A., et al.: Human T-Cell Leukemia Virus (HTLV-I) Antibodies in Africa. *Science* 225: 1473-1476 1984.
- 11) Blattner, W.A., Kalyanaraman, V.S., et al.: The Human Type-C Retrovirus, HTLV, in Blacks from the Caribbean Region, and Relationship to Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. *Int J Cancer* 30: 257-264 1982.
- 12) Osame, M., Matsumoto, M., et al.: Chronic Progressive Myelopathy Associated with Elevated Antibodies to Human T-Lymphotropic Virus Type I and Adult T-Cell Leukemia-like Cells. *Ann Neurol* 21: 117-122 1987.
- 13) Gessain, A., Barin, F., et al.: Antibodies to Human T-Lymphotropic Virus Type-I in Patients with Tropical Spastic Paraparesis. *Lancet* II: 407-409 1985.
- 14) Asou, N., Kumagai, T., et al.: HTLV-I Seroprevalence in Patients with Malignancy. *Cancer* 58: 903-907 1986.
- 15) 丸山孝士: ヒトT細胞白血病ウイルス感染とヒト悪性腫瘍の発生. *医学のあゆみ* 139: 598-599 1986.
- 16) 野村紘一郎: 健康人の抗 ATLA (adult T-cell leukemia virus associated antigens) 抗体についての研究. *医学研究* 54: 34-65 1984.
- 17) 中村 正, 山本哲郎, 他: 胃癌に合併した成人T細胞白血病の1剖検例. *内科* 54: 793-796 1984.
- 18) 酒井正俊, 相良勝郎, 他: くすぶり型成人T細胞白血病 (Smouldering adult T-cell leukemia) を合併した進行胃癌の1例. *癌の臨床* 30: 301-306 1984.
- 19) 加藤 修, 滝本泰生, 他: 化学療法中に胃癌および肺癌の摘出術が可能であった ATL の2症例. *臨床血液* 27: 2136-2142 1986.
- 20) 嶋本義範, 小野和俊, 他: 成人T細胞白血病と他臓器癌を合併した5症例. *臨床血液* 29: 723-727 1988.
- 21) Usuku, K., Sonoda, S., et al.: HLA Haplotype-Linked High Immune Responsiveness Against HTLV-I in HTLV-I-associated Myelopathy: Comparison with Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. *Ann Neurol* 23: 143-150 1988.
- 22) Tiwari, J.L. and Terasaki, P.I.: HLA and Disease Associations. Springer-Verlag, New York Berlin Heidelberg Tokyo, 1985, p 1-48.
- 23) 辻 公美: 比重遠沈法によるリンパ球の分離, Conray 400-Ficoll 法. 免疫実験操作法A. 第2版, 日本免疫学会編, 金沢, 1976, 443-446頁.
- 24) 黒木登志夫, 佐藤春郎, 他: 細胞の凍結保存法. *医学のあゆみ* 69: 406-411 1969.
- 25) Ikeda, M., Fujino, R., et al.: A New Agglutination Test for Serum Antibodies to Adult T-Cell Leukemia Virus. *Gann* 75: 845-848 1984.
- 26) Hinuma, Y. and Nagata, K.: Adult T-cell leukemia: Antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc Natl Acad Sci* 78: 6476-6480 1981.
- 27) Aaronson, S.A. and Stephenson, J.R.: Endogenous Type-C RNA Viruses of Mammalian Cells. *Biochim Biophys Acta* 458: 323-354 1976.
- 28) Kurnick, J.T., Gronvik, K., et al.: Long Term Growth in vitro of Human T Cell Blasts with Maintenance of Specificity and Function. *J Immunol* 122: 1255-1260 1979.
- 29) Langer, P.R., Waldrop, A.A., et al.: Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci* 78: 6633-6637 1981.
- 30) Leary, J.J., Brigati, D.J., et al.: Rapid and

- sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots. *Proc Natl Acad Sci* 80: 4045-4049 1983.
- 31) Feinberg, A.P., Vogelstein, B., et al.: A Technique for Radiolabelling DNA Restriction Endonuclease Fragments to High Specific Activity. *Anal Biochem* 132: 6-13 1983.
- 32) Feinberg, A.P., Vogelstein, B., et al.: "A Technique for Radiolabelling DNA Restriction Endonuclease Fragments to High Specific Activity". Addendum. *Anal Biochem* 137: 266-267 1984.
- 33) Southern, E.M.: Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517 1975.
- 34) Davis, L.G., Dibner, M.D., et al.: Methods in molecular biology. Elsevier, New York Amsterdam London, 1986, p 147-149.
- 35) 堀見忠司, 笹野洋子, 他: 新しい B cell 分離精製法—B lymphokine の使用—移植 20: 697-701 1985.
- 36) Terasaki, P.I., Bernoco, D., et al.: Microdroplet Testing for HLA-A, -B, -C, and -D Antigens. *Amer J Clin Pathol* 69: 103-120 1978.
- 37) 菅野雅元: 高分子 DNA の抽出法, 免疫実験操作法 X II, 日本免疫学会編, 金沢, 1983, 3981-3986 頁.
- 38) 渡辺義男, 小林敏行, 他: わが教室において最近 3 年間に経験せる口腔領域の癌腫および肉腫について. *日口外誌* 6: 323-330 1960.
- 39) 小野史郎: 顎・口腔領域腫瘍 350 例について. *日口外誌* 5: 102-107 1959.
- 40) 中村社綱, 田代英雄, 他: わが教室 10 年間の口腔癌の臨床統計的観察. *日口外誌* 23: 533-539 1977.
- 41) 山下佐英: 口腔領域悪性腫瘍の頸部リンパ節転移に関する臨床病理組織学的研究. *鹿大医誌* 18: 674-700 1966.
- 42) 堂原義美, 川平清秀, 他: わが教室における過去 10 年間の顎口腔領域悪性腫瘍の臨床統計的観察. *日口外誌* 25: 548-558 1979.
- 43) 山城正宏, 藤井信男, 他: 口腔領域悪性腫瘍の臨床病理学的研究. 第一報 過去 8 年間の臨床統計的観察. *口科誌* 32: 110-116 1983.
- 44) Shedd, D.P., Schmidt, N.L., et al.: A Survey of Tongue Cancer over a Fifteen year Period in a General Hospital. *Surg Gyn & Obst* 106: 15-24 1958.
- 45) 足立 尚, 飯塚忠彦, 他: 当科における過去 10 年間の顎口腔領域悪性腫瘍の臨床統計的観察. *日口外誌* 33: 1442-1449 1987.
- 46) Yoshida, M., Miyoshi, I., et al.: Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc Natl Acad Sci* 79: 2031-2035 1982.
- 47) Vogelstein, B. and Gillespie, D.: Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci* 76: 615-616 1979.
- 48) 園田俊郎: ATL と HAM の発症の遺伝的振り分け. *実験医学* 5: 769-772 1987.
- 49) 西村泰治, 笹月健彦: HLA の機能. 免疫と疾患 6: 521-527 1983.
- 50) 高見沢 勝, 十字猛夫, 他: 習慣性流産の免疫療法—母子間の寛容誘導—. 感染 炎症 免疫 17: 259-265 1987.
- 51) 柏木 登: 移植免疫における HLA 抗原の役割. *日本臨床 秋季臨時増刊号* 42: 786-792 1984.
- 52) 笠井 潔, 今村正克, 他: ヒト胃癌組織に浸潤する T 細胞および T 細胞亜群の免疫組織学的検索. *癌の臨床* 29: 981-986 1983.
- 53) 林 良夫, 佐藤光信, 他: 頭頸部癌患者末梢血リンパ球サブセットの異常—単クローン抗体による解析. *医学のあゆみ* 128: 507-508 1984.
- 54) 瀬山 淳: 顎口腔領域癌腫患者の細胞性免疫能に関する研究. *広大歯誌* 14: 156-166 1982.
- 55) 瀬山 淳: 顎口腔領域癌腫患者の細胞性免疫能に関する研究. *広大歯誌* 14: 167-174 1982.
- 56) Uchiyama, T., Sagawa, K., et al.: Effect of Adult T-Cell Leukemia Cells on Pokeweed Mitogen-Induced Normal B-Cell Differentiation. *Clin Immunol Immunopathol* 10: 24-34 1978.
- 57) Morimoto, C., Matsuyama, T., et al.: Functional and Phenotypic Studies et Japanese Adult T Cell Leukemia Cells. *J Clin Invest* 75: 836-843 1985.
- 58) Popovic, M., Flomenberg, N., et al.: Alteration of T-Cell Functions by Infection with HTLV-I or HTLV-II. *Science* 226: 459-462 1984.
- 59) Mitsuya, H., Guo, H., et al.: Transformation and Cytopathogenic Effect in an Immune Human T-Cell Clone Infected by HTLV-I. *Science* 223: 1293-1296 1984.
- 60) Katsuki, T., Katsuki, K., et al.: Immune-suppression in Healthy Carriers of Adult T-Cell Leukemia Retrovirus (HTLV-I): Impairment of T-Cell Control of Epstein-Barr Virus-Infected B-Cells. *Jpn J Cancer Res* 78: 639-642 1987.
- 61) Makinodan, T., Kay, M.M.B.: Age Influence on the Immune System. *Adv Immunol* 29: 287-330 1980.
- 62) Levy, J.A.: Autoimmunity and Neoplasia. *Am J Clin Pathol* 62: 258-280 1974.

- 63) Stutman, O.: Immunodepression and Malignancy. *Adv Cancer Res* 22: 261-273 1975.
- 64) Penn, I., Tumors Arising in Organ Transplant Recipients. *Adv Cancer Res* 28: 31-61 1978.
- 65) Purtilo, D.T.: Immune Deficiency Predisposing to Epstein-Barr Virus-Induced Lymphoproliferative Diseases: The X-Linked Lymphoproliferative Syndrome as a Model. *Adv Cancer Res* 34: 279-312 1981.
-