原 著 I

パラフィン包埋切片を用いた胸腺組織内 非上皮細胞の免疫組織化学的検討

—特に重症筋無力症との関連について—

谷野幹夫¹⁾, 小出 紀²⁾, 島津 明³⁾
鈴木和幸³⁾, 吉松 博³⁾

- 1) 埼玉県立がんセンター病理（現：金沢医科大学第一病理）
- 2) 産業医科大学第二病理
- 3) 産業医科大学第二外科

（平成元年6月15日受付）
（平成元年7月11日受理）

Immunohistochemical studies on non-epithelial cells in thymoma tissues using paraffin-embedded sections with special reference to myasthenia gravis

Mikio Tanio¹⁾, Osamu Koide²⁾, Akira Shimazu³⁾, Kazuyuki Suzuki³⁾, and Hiroshi Yoshimatsu³⁾

- 1) Department of Pathology, Saitama Cancer Center (present: Department of Pathology, Kanazawa Medical University)
- 2) Department of Pathology & Surgical Pathology, and
- 3) Department of Thoracic & Cardiovascular Surgery, School of Medicine, University of Occupational & Environmental Health, Japan

Immunohistochemical studies on the difference of the distribution of non-epithelial cells in thymoma tissues either with or without myasthenia gravis (MG) were done using paraffin embedded sections (thymoma with MG: 8 cases, without MG: 14 cases). The formation of the lymph follicles and infiltration of B lymphocytes outside of the lymph follicles within the tumor tissues were seen in 75% and 87.5% of cases with MG respectively. Contrarily, such findings were seen only in 14.2% of cases without MG. S-100 β positive lymphocytes were seen in almost all cases more or less, however, significantly increased in number in cases with MG ($p < 0.01$). S-100 α positive dendritic cells appearing in the germinal centers in thymoma tissues, most cases were with MG, were significantly increased in number compared with those in inflammatory lymph nodes or tonsils ($p < 0.01$). These findings were thought to be closely related to the manifestation of MG.

Key words: myasthenia gravis, thymoma, lymphocytes, reticulum cells

はじめに

結 果

胸腺腫にしばしば重症筋無力症(MG)を代表とする自己免疫疾患を伴うことはよく知られている。この腫瘍自体は上皮性であるが、非腫瘍胸腺と同様にその組織内にリンパ球を主とした非上皮細胞を種々の程度に介在させている。これら胸腺腫組織内の上皮や非上皮細胞および両者の関係についてはこれまで種々の検索がなされてきたが^{1)~8)}、自己免疫疾患との関連という視点でなされたものは乏しく、また自己免疫疾患発現機序やそこにおけるこれらの細胞の役割や相互の関係もよく明らかにはされていない。自己免疫疾患を伴う胸腺腫と伴わないその形態学的差異について明らかになっていることも乏しい。

今回、著者等はパラフィン包埋切片を用い、MG合併の有無と関連づけた胸腺腫組織の形態学的特徴を、とりわけリンパ球を主とした非上皮細胞の分布の差異に着目して免疫組織化学的に検索し、その意義について検討した。

対象と方法

22例の胸腺腫組織、このうちMGを伴うもの8例、合併症のないもの14例を用いた。MG以外の合併症を有するもの、対射線照射やステロイド投与などの治療を受けているもの、thymic carcinomaと診断された例は除外した。パラフィン標本は通常のH-E染色の他、MT 1, MB 1抗体(以上BioScience社)、S-100 α 、S-100 β 抗体(以上日本抗体研究所)を用い、酵素抗体間接法にて染色した。各例につき、カセットサイズ2ブロックの標本を作成し、一般的な組織構築やリンパ濾胞の有無の検索の他、それぞれの染色において陽性細胞の分布のしかたを調べ、数や比率を算定した。MB 1陽性リンパ球比率の算定においては濾胞から離れた視野で500個以上のリンパ球を数え、その陽性率を表した。S-100 β 陽性リンパ球数の算定においては強拡大10視野で認められる陽性細胞数を10回求め、その1回あたりの平均を表した。また、S-100 α 染色では胸腺腫組織内に形成されるリンパ濾胞の胚中心内で陽性に染色されるdendritic cellの数を算定し、一個の胚中心あたりに認められる平均陽性細胞数を表した。胚中心の対照群としては、非特異リンパ節炎のリンパ節5例、慢性扁桃炎の扁桃5例、結核性リンパ節炎のリンパ節3例を用いた。

まず、表1左側にHE染色における胸腺腫組織の特徴を示す。MGを伴う例ではencapsulated thymomaが多く、多くの上皮細胞はplump typeであったのに対し、MGを伴わない例では半数近くがinvasive thymomaであり、上皮細胞がspindle shapedを呈する例も増えていた。浸潤細胞の多寡とMG合併の有無には関連はみられなかった。MB 1染色を施すと、図1, A, Bに示すようにHE染色のみではしばしばその存在が不明瞭であった腫瘍組織内リンパ濾胞の存在が明瞭になった。但し、この染色においては腫瘍細胞自身を含め、リンパ球よりも染色性は弱い胸腺上皮細胞もまたよく染まった。

MB 1染色にて明らかとなった腫瘍組織内のリンパ濾胞の有無(胚中心の有無を含む)、濾胞外における陽性リンパ球の比率を示したものが表1のLF, GC, MB 1の項である。大部分(75%)のMGを伴う胸腺腫組織内にリンパ濾胞(その多くが胚中心を伴う)が見出され、濾胞外においては1例を除くと、平均4.9%のリンパ球がMB 1陽性であった(図1, C)。MGを伴わない胸腺腫では濾胞を形成する例はわずか2例(14.2%)であり、この2例を除いては濾胞外MB 1陽性リンパ球は極めて稀か、全く見出されなかった。なお、MT 1染色においては、MGを伴う胸腺腫と伴わないそれとの間に陽性リンパ球出現の仕方に差異を見出すことはできなかった。

S-100 β 陽性interdigitating cellはほぼ全例にみられたが、組織構築やMG合併の有無による数や分布の仕方の差異に特徴を見出し難かったのに対し、強拡大10視野で見出されるS-100 β 陽性リンパ球数は表1, S-100 β の項に示すように、MGを伴う胸腺腫では伴わないものに比し有意に多く、1例(case 1)では10視野に平均500個以上の陽性細胞が認められた(図2, A)。

胚中心内のS-100 α 陽性dendritic cellの数を算定すると、胸腺腫組織(胚中心を伴うものの殆どがMGを伴う)内では1つの胚中心内に平均15.1個の陽性細胞が認められたのに対し、対照として用いたリンパ節や扁桃の胚中心内には平均1.0個しか認められず、有意差がみられた(表2, 図2, B)。

考 察

胸腺腫の組織型とMG合併の有無の関連は当然以前から関心の持たれているところで、上皮(腫瘍)

Table 1 Clinical and histological summary of cases of thymoma

Case	Age	Sex	Invasion	Lymphocytes	Epithelial cells	MD *	MG *	LF *	(GC *)	MB1 *	S-100β *
1	64	M	+	moderate	plump	-	+	+	+	1.6	560.5
2	21	F	-	few	plump	-	+	+	+	3.2	54.3
3	45	M	-	many	plump	+	+	+	+	6.4	11.2
4	31	F	+	moderate	plump	-	+	-	-	3.5	40.7
5	71	F	-	many	plump	-	+	+	+	2.1	196.2
6	25	F	-	few	spindle	-	+	+	+	3.7	33.2
7	46	M	-	many	plump	-	+	+	-	14.0	58.6
8	55	M	-	moderate	plump	-	+	-	-	<1	7.9
						6/8		5/8		mean : 120.3±175.4	
9	48	F	-	many	spindle	-	-	-	-	0	4.3
10	67	M	+	few	plump	-	-	+	+	19.4	3.1
11	54	M	+	few	plump	-	-	+	-	7.8	6.6
12	73	M	+	few	plump	-	-	-	-	0	8.2
13	32	M	-	many	plump	-	-	-	-	0	2.2
14	58	F	-	many	plump	+	-	-	-	0	1.0
15	67	F	-	moderate	spindle	-	-	-	-	0	13.0
16	51	F	-	many	spindle	+	-	-	-	0	3.3
17	50	M	+	moderate	plump	-	-	-	-	<1	7.3
18	57	F	+	few	spindle	-	-	-	-	<1	0.5
19	58	F	-	many	plump	-	-	-	-	0	0
20	43	F	-	moderate	spindle or plump	-	-	-	-	0	0.2
21	43	F	-	many	spindle	+	-	-	-	0	8.3
22	64	F	+	moderate	spindle > plump	-	-	-	-	0	1.0
						2/14		1/14		mean : 4.2±3.8	

MD : medullary differentiation, MG : myasthenia gravis, LF : lymph follicle, GC : germinal center

NB1 : lymphocytes positive for MB1(%), S-100β : Number of lymphocytes positive for S-100β (/10 HPF)

細胞優位型（リンパ球が乏しい）のものにMG合併が多いとするものや⁹⁾、上皮がplump shapedのものに多いとするもの^{10)~12)}、あるいはMGを伴うのは全例がplump cellであるとするもの¹³⁾などがある。著者等の成績ではリンパ球の多寡とMG合併の有無には関連はみられなかったが、上皮のtypeとしてはMG合併例の殆どはplump typeであった。1例、spindle typeでMGを合併するものがあり、Rosaiの主張¹³⁾に相反したが、このような少数の例外は他の報告例にもみられる^{10)~12)}。またMG合併の有無を問わず胸腺腫全般にplump cell typeのものが多く、少なくとも上皮（腫瘍）細胞がこのtypeを示すことのみを以てMG合併の予想やその意義の考察の指標にするのは困難と思われる。

一方、胸腺が本来、免疫の中枢器官であり、多数

のリンパ球（胸腺細胞）を主とした非上皮細胞を介在させ、胸腺腫においてもこれらの細胞を伴うことを特徴としている以上、腫瘍に随伴して存在しているにしても、自己免疫疾患の発現においては、腫瘍上皮細胞のみならず非上皮細胞も少なからずこれに関与しているであろうことは容易に想像される。一般に胸腺腫内においては胸腺皮質型（未熟型）のリンパ球が主体を占めるとされているが²⁾⁸⁾、MGとの関連という視点で検索した論文はそう多くなく、MGを伴う胸腺腫内では末梢血型（成熟型）のリンパ球が多くなるとするもの⁷⁾¹⁴⁾、逆に未熟型のリンパ球が多いとするものがみられ¹⁵⁾、現在のところ必ずしも一致した見解は得られていない。

今回、著者等はパラフィン切片を用いたので、凍結切片で初めて可能なようなリンパ球の詳細な

図1 A(H-E 染色)では不明瞭であったリンパ濾胞の存在が, B の MB-1 抗体の染色により明らかに認識され, 小さな胚中心様構造もみられる。白黒写真では分かりにくい, 上皮(腫瘍)細胞も MB-1 に弱染する。C は濾胞外における MB-1 陽性細胞を示す。
(A,B: case 1, $\times 175$ C: case 3, $\times 350$)

図2 A: 弱拡大でも多数の S-100 β 陽性リンパ球を認めることができる。 B: リンパ濾胞胚中心内の S-100 α 陽性 dendritic cell を示す。
(A: case 1, $\times 87.5$ B: case 3, $\times 350$)

Table 2 Dendritic cells positive for S-100 α in germinal centers

Case	positive cells (mean/1 GC)	No of GC *
1	22.5	4
2	3	2
3	28.5	2
5	21.3	3
6	11	1
10	4	2
mean : 15.1 $\pm$ 9.7		
Controls		
1(LA *)	2	23
2(LA)	0.8	8
3(LA)	0.6	14
4(LA)	1.3	20
5(LA)	0.6	17
6(T *)	1.2	6
7(T)	1.2	30
8(T)	1.7	17
9(T)	0.9	18
10(T)	1.2	13
11(TB *)	0.5	4
12(TB)	0.2	14
13(TB)	0.7	7
mean : 1.0 $\pm$ 0.5		

* GC : germinal center, LA : lymph nodes of non-specific lymphadenitis, T : tonsils of chronic tonsillitis, TB : lymph nodes of tuberculosis

phenotype の検索はできなかったが、逆に大切片の作成、H-E 標本との対照や、過去の例を含めた多数例での検索が可能となった。

胸腺腫内リンパ濾胞の形式については、MG を伴う例では通常認められるとするものと¹⁶⁾、認められないとするものがあり⁹⁾、近年の白井の報告¹⁷⁾でも MG 随伴例で濾胞を形成するもの、しないもの様々である。この他、この問題に触れている文献は乏しい。今回の著者等の検索では、明らかな胚中心を形成しない限り HE 染色のみでは腫瘍組織内リンパ濾胞形成の有無は意外と判定しづらく、またリンパ節のように随所にあるものでもないの、小凍結切片では標本作成部位による偶然性に大きく支配され、と考えられ、このため一定の見解が得られていなかったものと思われる。しかし、今回の著者等のパ

ラフィン切片での MB 1 染色による検索により、MG 随伴胸腺腫例の大部分においてリンパ濾胞の形成されることが確認された。このことは MG 患者に認められるもう一つの代表的な胸腺病変である胸腺過形成を直ちに連想させる所見であり、両者は腫瘍、非腫瘍病変の相違はあるが、リンパ球の反応からいえば共に「慢性炎症」というべき形態を内包する。MG 発症においても両者において同様の機序が作動しているものと推定される。

また、濾胞外においても MG を伴う胸腺腫の多くにおいて、通常の胸腺内には存在しないと考えられている MB 1 陽性リンパ球 (B 細胞) の出現がみられ、上記のリンパ濾胞の形成と同様、自己免疫疾患の発現と密接に関連した異常な B 細胞の動態と考えられる。

MB 1 染色は、このように胸腺腫組織内での B リンパ球やリンパ濾胞形成の認識に優れ、それらの存在が MG 随伴の推定のよい指標となることが分かったが (他のパラフィン用抗 B 細胞抗体も恐らく同様であろうと思われる)、同時に胸腺上皮も弱いながらもよく染色された (試験的に他の組織で検索すると、扁平上皮や粘液腺上皮等の上皮もよく染まった)。このようにこの抗体には、従来の報告¹⁸⁾に反し、腫瘍を含めた種々の上皮細胞と cross-reactivity のあるものと考えられ、今回は詳細な検索をなしてはいないが、今後の上皮マーカーとしての使用の可能性も示唆された。

reticulum cell や macrophage などといわれる大単核細胞の分類、由来やその機能の詳細については不明の部分も多く、議論のあるところだが、免疫応答系において複雑で重要な役割を果たしているであろうことはよく知られている。reticulum cell のうち、一般にリンパ節の cortex (B zone) に存在するものが dendritic cell, paracortex (T zone) に存在するものが interdigitating cell と呼ばれている¹⁹⁾。

S-100 β 抗体はリンパ節などでは interdigitating cell に陽性になることが知られている²⁰⁾。リンパ節のみならず、正常胸腺や腫瘍肥胸腺内においても S-100 β 陽性 interdigitating cell が多少なりとも出現することは周知のことであり²⁰⁾²²⁾、本例においても全例にその出現をみたが、その分布の仕方に何等かの特徴を見出したり、意義づけをすることはかなり難しく、MG との関連においてこれを見ることは更に困難であった。

一方、これら interdigitating cell のみならず、核が S-100 β 陽性を示す少数のリンパ球分画が末梢血中などに存在することが近年明らかにされている²³⁾²⁴⁾。今回の著者等の検索では胸腺腫例の殆どで組織内に陽性リンパ球が出現し、且つ MG を合併するものでは有意にその出現数が多く、中には著しく多数の出現する例もあることが分かった。末梢血においては suppressor/cytotoxic T cell の分画に属するとされている S-100 β 陽性リンパ球²³⁾が胸腺や胸腺腫組織内においてはどのような成熟度の細胞で、どのような分画に属し、どのような機能を持つのかは現在のところ余り明らかにはなっていないが、これらの細胞が胸腺腫において、MG 合併例に多く出現するという事実は、この分画の細胞が本疾患の発現に少なからず関与していることを推定させる。興味ある所見であり、今後さらなる検索を要すると考える。

前述の reticulum cell のうち、リンパ節の胚中心内に局在するいわゆる dendritic cell は S-100 α 抗体に陽性に染まることが知られている²⁵⁾。著者等の検索では結核や非特異炎症等により腫脹したリンパ節や扁桃内に形成される胚中心内の S-100 α 陽性 dendritic cell の数はそう多くはなく、一個の胚中心当たり、平均僅か1個程度しかみられなかったのに対し、その大部分が MG を合併している胸腺腫内に形成されたものでは、明らかに多く認められた。MG の発現にリンパ濾胞の形成が重要な意味を持つものなら、その中に出現する、抗原提示細胞とされる dendritic cell²⁶⁾もまた本症の発現に重要な関与をしていると想像されるが、現在のところまだ全く予備的な検索に過ぎず、この所見にどれだけの意味があるのかは分からない。しかし、このようにリンパ節等と胸腺腫内とでは著しい差があることは一つの所見であろうと思われ、今後このような観点からの、SLE や RA その他種々の自己免疫疾患に伴う腫脹リンパ節や慢性甲状腺炎組織内のリンパ濾胞等での検索や、他の dendritic cell のマーカーを用いた検討も興味深いものと考ええる。

ま と め

重症筋無力症(MG)を伴う胸腺腫と伴わないそれを比較、検討して次のような所見を得た。1, MG を伴う胸腺腫組織内にはよく胚中心を伴うリンパ濾胞の形成がみられた。2, MG を伴う胸腺腫組織内では MB 1 陽性リンパ球が多少とも認められるのに

対し、伴わない胸腺腫内では多くの例において、見出されないか、極めて稀であった。3, MG を伴う胸腺腫組織内では伴わないものに比し、S-100 β 陽性リンパ球の出現頻度が有意に高かった。4, 胸腺腫組織内に存在する胚中心内 S-100 α 陽性 dendritic cell の数は、炎症により腫脹したリンパ節や扁桃の胚中心内におけるよりも有意に増加していた。5, 以上のような所見はいずれも MG の発現と密に関連したものと考えられた。

本論文の要旨は第28回日本網内系学会総会(1988年6月9日、千葉)にて発表した。

文 献

- 1) Kodama T, Watanabe S, Sato Y, Shimosato Y, and Miyazaka N: An Immunohistochemical study of thymic epithelial tumors. I. Epithelial component. *Am J Surg Pathol* 10: 26—33, 1986
- 2) Sato Y, Watanabe S, Mukai K, et al.: An immunohistochemical study of thymic epithelial tumors. II. Lymphoid component. *Am J Surg Pathol* 10: 862—870, 1986
- 3) Chilosi M, Iannucci AM, Pizzolo G, et al.: Immunohistochemical analysis of thymoma. *Am J Surg Pathol* 18: 309—318, 1984
- 4) Kornstein MJ, Hoxie JA, Levinson AI, and Brooks JJ: Immunohistology of human thymomas. *Arch Pathol Lab Med* 109: 460—463, 1985
- 5) Mokhtar N, Hsu S, Lad RP, Haynes BF, and Jaffee ES: Thymoma: lymphoid and epithelial components mirror the phenotype of normal thymus. *Hum Pathol* 15: 378—384, 1984
- 6) Van Der Kwast TH, Van Vleit E, Cristen E, Van Ewijk W, and Van Der Heul RO: An immunohistologic study of the epithelial and lymphoid components of six thymoma. *Hum Pathol* 16: 1001—1008, 1985
- 7) Chan WC, Zaatari GS, Tabei S, Bibb M, and Brynes RK: Thymoma: an immunohistochemical study *Am J Clin Pathol* 82: 160—166, 1984
- 8) Piantelli M, Ranelletti FO, Musiani P, Lauriola L, and Maggiano N: A human thymoma with prothymocyte-like infiltration. *Clin Immunol Immunopathol* 28: 350—360, 1983

- 9) Lattes R: Thymoma and other tumors of the thymus. An analysis of 107 cases. *Cancer* 15: 1224—1260, 1962
- 10) Alpert LI, Papatestas A, Kark A, Osserman RS, and Osserman K: A histologic reappraisal of the thymus in myasthenia gravis. A correlative study of thymic pathology and responses to thymectomy. *Arch Pathol*, 91: 55—61, 1971
- 11) Monden Y, Nakahara K, Nanjou S, et al.: Invasive thymoma with myasthenia gravis. *Cancer*, 54: 2513—2518, 1984
- 12) 星 和栄: 胸腺腫の臨床病理学的並びに免疫組織化学的研究 日本網内系学会誌, 27: 271—284, 1988
- 13) Rosai J: Ackerman's surgical pathology, 7th edition Mosby, St. Louis, pp360, 1989
- 14) Tanio M, Koide O, Shimazu A, Suzuki K, and Yoshimatsu H: Studies on lymphocyte subsets in thymic tissue and functions of peripheral lymphocytes in patients with tumorous thymus with special reference to myasthenia gravis. *Acta Pathol Jpn*, 38: 425—434, 1988
- 15) 伊藤元彦: 胸腺腫リンパ球の OKT-series モノクローナル抗体による検討 厚生省がん研究助成金による「胸腺腫の生物学的特性に関する研究」班1987年度班会議記録報告書, 1—5, 1987
- 16) Rosai J and Levine GD: Tumors of the thymus. In *Atlas of Tumor Pathology*, 2nd Series, Fasc. 13 Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, pp86—87, 1975
- 17) 白井俊一: 胸腺腫構成細胞の細胞表面抗原 正岡昭監修, 胸腺腫の形態学=胸腺腫とは何か= 協和企画通信, 東京, 1984: 49—54
- 18) Poppema S, Hollema H, Visser L, and Vos H: Monoclonal antibodies (MT1, MT 2, MB1, MB 2, MB 3) reactive with leukocyte subsets in paraffin-embedded tissue sections. *Am J Pathol*, 127: 418—429, 1987
- 19) Lennert K: Histology of non-Hodgkin's lymphomas (based on the Kiel classification) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1981: 28
- 20) Takahashi K, Isobe T, Ohtsuki Y, et al.: Immunohistochemical localization and distribution of S-100 proteins in the human lymphoreticular system. *Am J Pathol*, 116: 497—503, 1984
- 21) Lauriola L, Michetti F, Stolfi VM, et al.: Detection by S-100 immunolabelling of interdigitating reticulum cells in human thymomas. *Virchows Archiv B*, 45: 187—195, 1984
- 22) 玉置憲一, 里 梯子, 藤本純一郎: 胸腺腫における筋様細胞, 樹状細胞およびリンパ球 病理と臨床, 5: 1171—1177, 1987
- 23) Takahashi K, Ohtsuki Y, Sonobe H, and Hayashi K: Immunocytochemical characterization of S-100 β -positive human T-lymphocytes by a double immunostaining method. *Virchows Archiv B*, 53: 375—377, 1987……
- 24) Takahashi K, Yoshino T, Hayashi K, et al.: S-100 Beta positive human T lymphocytes: their characteristics and behavior under normal and pathologic conditions. *Blood*, 70: 214—220, 1987
- 25) 佐藤雄一, 向井 清, 中島 孝, 他: 胸腺上皮腫瘍における組織球成分の免疫組織化学的検討 日本網内系学会誌, 27: 141, 1987
- 26) Inaba K, and Steinman RM: Protein-specific helper T-lymphocyte formation initiated by dendritic cells. *Science*, 229: 475—479, 1985