

## 眼窩悪性リンパ腫の遺伝子解析による診断

川本 潔, 宮永 嘉隆

東京女子医科大学附属第二病院眼科

### 要 約

眼窩悪性リンパ腫は、大多数が低悪性度の B 細胞型リンパ腫と考えられており、特に小細胞型では、組織形態学的には反応性増殖である偽リンパ腫との鑑別に苦慮することがある。また、免疫組織化学的検査でも腫瘍細胞のリンパ球が未分化である場合、リンパ球はその表面に特徴的な抗原性を有していないため免疫表現型が明確でなく、膜表面抗原による診断が困難で、免疫グロブリンが証明されない。さらに、反応性細胞の増殖が多く、腫瘍細胞の少ない場合でも確定診断に至らないことがある。近年、遺伝子プローブを用いたサザンブロッティング法による

遺伝子レベルの解析法が開発され、遺伝子型からリンパ系腫瘍細胞の起源や単クローン性の証明が可能となった。遺伝子レベルでの解析による診断は、全組織中に腫瘍細胞が数%含まれていれば、腫瘍細胞の起源やクローン性、分化段階の検索が可能で眼窩リンパ系腫瘍の診断に有用であった。(日眼会誌 101: 141-147, 1997)

キーワード：眼窩悪性リンパ腫、遺伝子解析、遺伝子再構成

## Diagnosis of Orbital Lymphoma by Molecular Genetic Analysis

Kiyoshi Kawamoto and Yoshitaka Miyanaga

Department of Ophthalmology, Tokyo Women's Medical College, Daini Hospital

### Abstract

Recent advances in molecular genetics have made a great contribution to the investigation of lymphoid malignancies. We diagnosed orbital malignant lymphomas by molecular genetic analysis. Molecular genetic analysis elucidates gene rearrangements within lymphocytes that are responsible for immunoglobulin produced by B-lymphocytes, or the expression of cell surface antigen recognition receptors in T-lymphocytes. The cells of most malignant tumors are considered to be genetically homogeneous because they are assumed to represent a single clone descended from one abnormal cell. The determination that a malignancy is of clonal origin has been used as a diagnostic aid to distinguish benign from malignant proliferations. Analysis of the immunoglobulin genes and the T-cell antigen receptor genes using DNA from biopsied specimens is very useful, as it can reveal the origin of tumor cells and clonality of tumor cell characteristics which cannot be distinguished by morphological analysis. Genetic

analysis was found to be superior to immunophenotyping for identifying the monoclonality of tumor cells in instances when there were no definitive cell-lineage specific markers, or when there was a preponderance of normal counterparts with mixed appearance of neoplastic and non-neoplastic cells in malignant lymphoma. Molecular genetic analysis is used to 1) distinguish clonal from polyclonal lymphoproliferations, 2) determine the B-cell or T-cell identity of malignancies with admixed normal cells, 3) determine the genetic lineage of neoplasms lacking definitive surface antigens, and 4) determine the developmental stage of early B-cell or T-cell precursors. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 141-147, 1997)

Key words: Orbital malignant lymphoma, Molecular genetic analysis, Gene rearrangement

### I 緒 言

悪性リンパ腫は、リンパ球の腫瘍性増殖による悪性化

したリンパ球の増殖と浸潤を主な臨床病態とする疾患である。悪性リンパ腫の組織診断、分類は、ホルマリン固定標本を用いた形態観察を主体として行われてきた。しか

別刷請求先：116 東京都荒川区西尾久2-1-10 東京女子医科大学附属第二病院眼科 川本 潔

(平成8年6月1日受付,平成8年8月2日改訂受理)

Reprint requests to: Kiyoshi Kawamoto, M.D. Department of Ophthalmology, Tokyo Women's Medical College, Daini Hospital, 2-1-10 Nishiogu, Arakawa-ku, Tokyo 116, Japan.

(Received June 1, 1996 and accepted in revised form August 2, 1996)

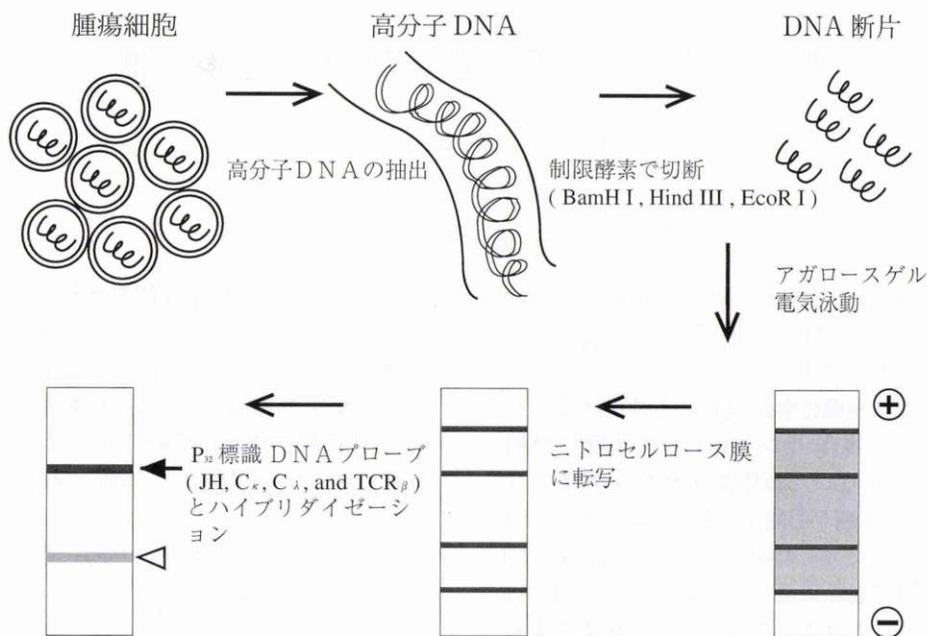


図1 サザンブロッティング法の説明図.

し、リンパ球の腫瘍性増殖である悪性リンパ腫と反応性増殖である偽リンパ腫の鑑別は、組織形態学的にはときに困難で、形態面のみからはリンパ球の多様性を正確に把握することはできない。特に、眼窩の悪性リンパ腫では、びまん性小細胞型は形態学的に異型性が乏しく、偽リンパ腫との鑑別に苦慮する。近年、遺伝子プローブを用いたサザンブロッティング法による遺伝子レベルの解析法が開発され、遺伝子型から腫瘍細胞の起源や単クローン性の証明が可能となった<sup>1)~3)</sup>。我々は、眼窩悪性リンパ腫においてサザンブロッティング法による遺伝子解析を行った。本邦において、眼窩悪性リンパ腫の遺伝子解析の有用性と可能性につき詳細な報告はみられないので報告する。

## II 方法

遺伝子レベルでの解析のため、サザンブロッティング法により腫瘍細胞の再構成バンドを検討した。生検により得られた腫瘍組織をProteinase Kで処理後、フェノールおよびエタノール沈澱により5μgの高分子DNAを抽出した。この高分子DNAを制限酵素Hind III, BamH I, およびEcoR Iで切断処置、アガロース電気泳動後、ナイロンフィルターに転写し、ピオチン標識した免疫グロブリン重鎖のJHプロープ、軽鎖Cκ, CλプロープおよびTCRβプロープとハイブリダイゼーションを行った。Germ-lineの対象として、健康正常人のリンパ球を用いた。Germ-lineと異なる再構成バンドが認められたときは、その部位での単クローンな増幅があるとして悪性リンパ腫と診断した(図1)。



図2 症例1. 49歳, 男性.

左上眼瞼内側腫瘤(矢印), 腫瘤による圧迫のため眼裂幅は右側に比べ狭小化している。

## III 症例

### 症例1: 49歳, 男性.

10数年前から左眼瞼の腫脹に気付くも放置、数か月前から急激に増悪し近医受診、精査目的に当科紹介となった。初診時、視力は右眼0.3(0.8), 左眼0.5(0.8)。眼裂幅は右側に比べやや狭小化し、左上眼瞼内側に母指頭大の腫瘤を触知した(図2)。中間透光体、眼圧は正常で、血液および生化学検査に異常を認めなかった。Magnetic resonance imaging (MRI) 検査で左眼窩内側から上眼瞼に腫瘍陰影を認め(図3)、組織検査を行った(図4)。ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色で小型の核分裂像を有するリンパ球様細胞のびまん性増殖を認め核クロマチンはやや粗に分布し、異型性は軽度であった(図5 a, b)。免疫染色で腫瘍細胞は抗B細胞抗体L-26染色に不規則に

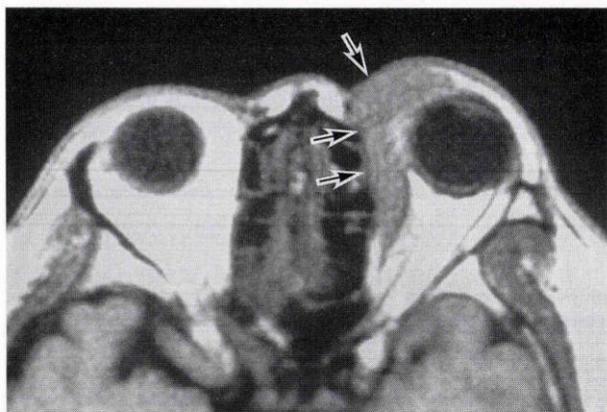


図3 MRI(magnetic resonance imaging)所見。  
左眼窩内側から上眼瞼に腫瘍陰影を認める(矢印)。

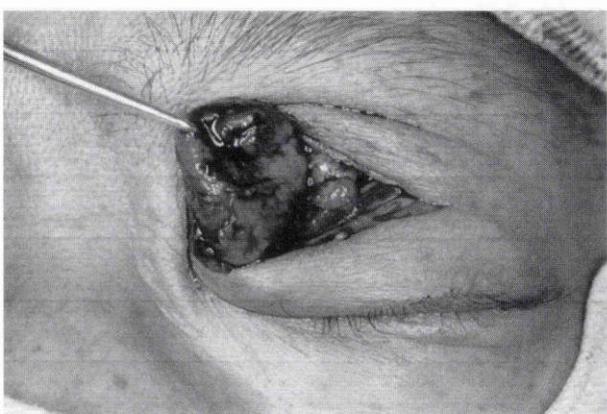


図4 組織検査術中所見。

陽性所見を示し、 $\kappa$ 染色陰性、 $\lambda$ 染色陰性、抗T細胞抗体 UCHL-1染色陰性であった(図6)。腫瘍細胞のフローサイトメトリーによる細胞表面マーカーの検索ではCD19,20およびHLA-DRで陽性率が高く、B細胞分画の増加が示された(図7)。遺伝子検索において、JHおよびC $\kappa$ プロンプで再構成バンドを認めた(図8,9)。形態学的には異型性に乏しいものの、遺伝子型で腫瘍細胞にB細胞の単クローン性増殖が確認され、びまん性小細胞型のB細胞型悪性リンパ腫と診断した。超音波、全身computed tomography(CT)、ガリウムシンチによる全身検索で眼窩以外にリンパ節腫脹は認められず、病期はAnn-Arber分類<sup>4)</sup> Stage Iであった。

症例2:65歳,男性。

数か月前から左眼の異物感、結膜充血を自覚し近医を受診、下眼瞼内側に小指頭大の腫瘤を認め、精査目的で当科紹介となった。初診時、視力は右眼0.4(1.2)、左眼0.7(0.9)。左内眼角部から下眼瞼にかけて数個の小指頭大の腫瘤を触知し、結膜の充血、下眼瞼の腫脹を認めた(図10)。中間透光体および眼圧は正常、眼球運動制限はなく、Hertel眼球突出計で有意な眼球突出はみられなかった。血液、生化学検査で著変なく、末梢血に異常細胞の出現を認めなかった。CTおよびMRI検査で眼窩内側

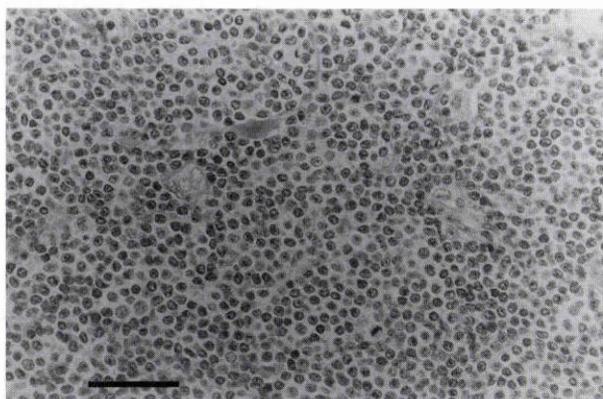


図5a HE(hematoxylin eosin)染色(弱拡大像)。  
バーは100  $\mu$ m

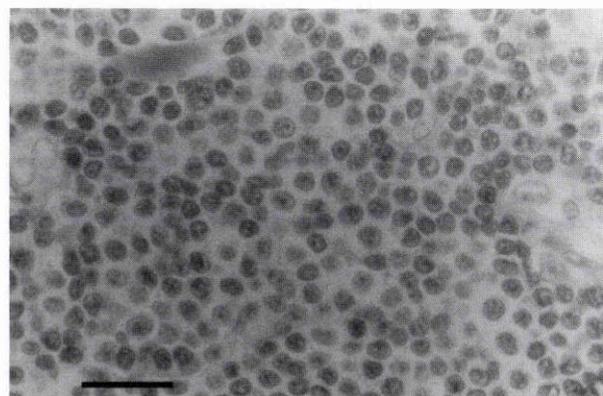


図5b HE染色(強拡大像)。

核クロマチンは粗で、ときに小さい核小体をみる異型性に乏しい小型のリンパ球様細胞のびまん性増殖を認めた。バーは30  $\mu$ m

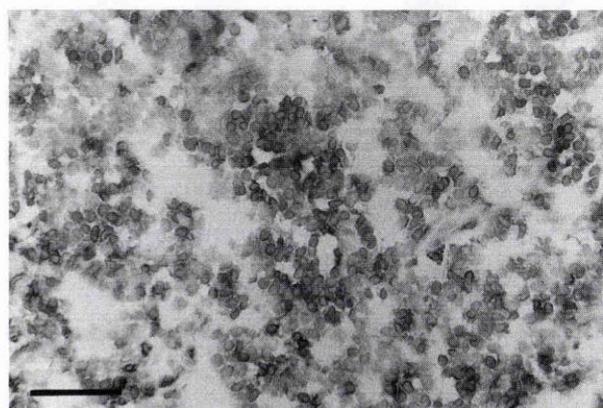


図6 抗B細胞抗体L-26モノクローナル抗体染色。  
不規則に陽性所見を認めた。バーは100  $\mu$ m

に腫瘍陰影を認め、腫瘍組織の組織検査を行った。HE染色で小型のリンパ球様細胞のびまん性増殖を認めたが、形質細胞への分化はなく細胞の異型性は軽度であった(図11a,b)。また、抗B細胞抗体L-26染色、 $\kappa$ 、 $\lambda$ 染色、および抗T細胞抗体UCHL-1染色による免疫組織化学染色では単クローン性を確認することができず、悪性リ

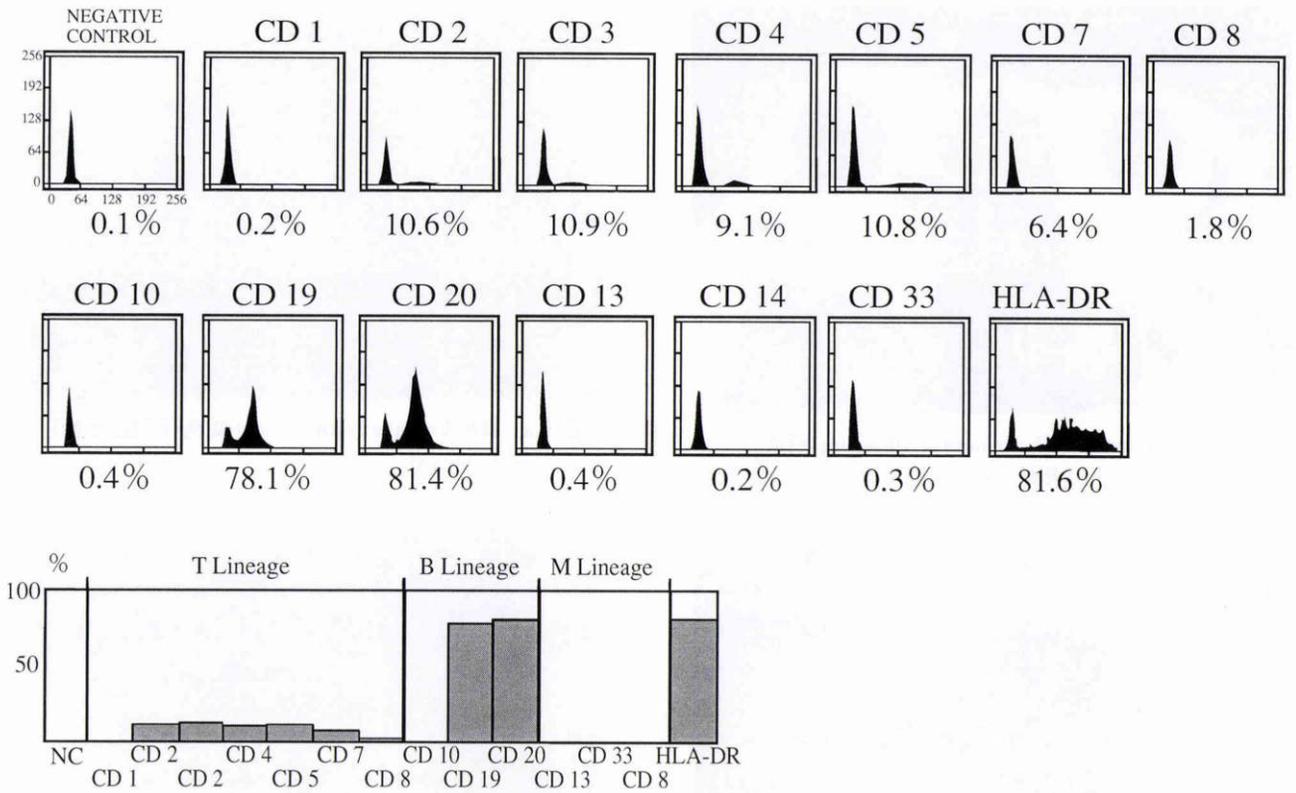


図7 腫瘍細胞のフローサイトメトリー。  
CD-19, CD-20, HLA-DR で陽性率が高く, B 細胞分画の増加を認めた。

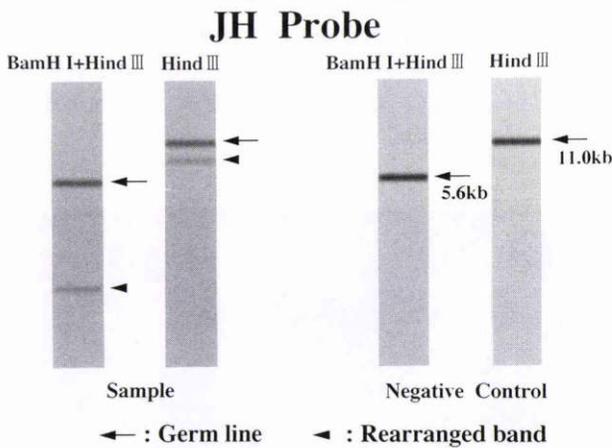


図8 症例1のH鎖遺伝子サザンプロットング法結果。  
再構成バンド(矢じり)を認め, B細胞の単クローンな増殖を示した。Hind III で11.0 Kbに, Hind III+BamH I で5.6 KbにH鎖の正常Germ line(矢印)を示す。

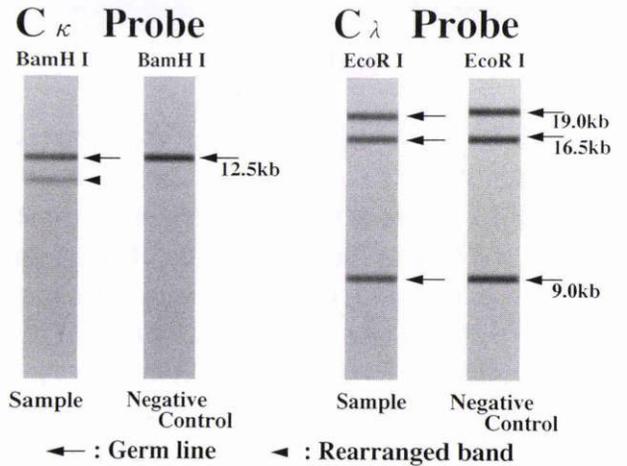


図9 症例1のL鎖遺伝子(κ, λ)サザンプロットング法結果。  
再構成バンド(矢じり)を認めた。BamH I で12.5 Kbに, EcoR I で19.0 Kb, 16.5 Kbおよび9.0 Kbに正常Germ line(矢印)を示す。

ンパ腫を疑うものの, 確定診断には至らなかった。遺伝子検索において, JHプローブで再構成バンドを認め, CκおよびCλプローブでは再構成バンドを認めなかった(図12, 13)。細胞の異型性は形態学的には小さかったが, 遺伝子解析で単クローン性が証明され, 最終的にびまん性小細胞型のB細胞型悪性リンパ腫と診断した。超音波, 全身CT, ガリウムシンチによる全身検索で左眼窩,

頸部, 腹部大動脈周囲にリンパ節腫脹が認められ, 病期はAnn-Arber分類 Stage IIIであった。

#### IV 考 按

悪性リンパ腫の診断において, 多くの症例は組織形態学的, 免疫化学的検査で診断が下される。これらの検査で悪性リンパ腫と確定診断されるものは決定的な問題とはならない。しかし, いくつかの症例においては診断に苦慮

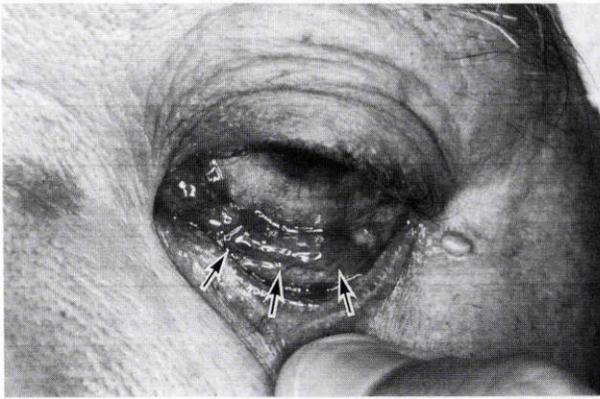


図10 症例2, 65歳, 男性.  
下眼瞼結膜の腫脹と充血を認めた(矢印).

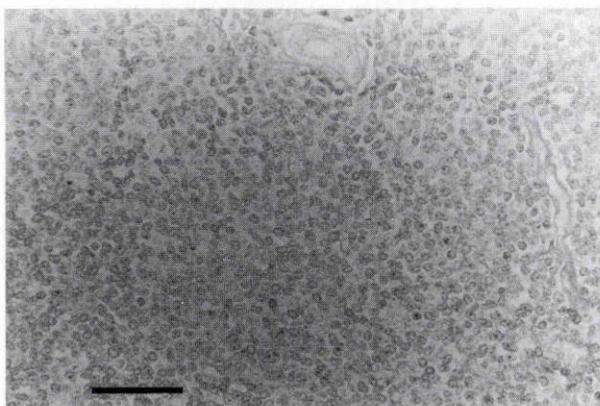


図11a HE染色(弱拡大像).  
バーは100 μm

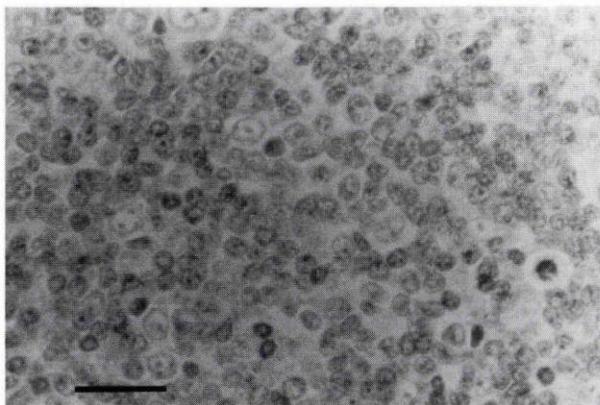


図11b HE染色(強拡大像).  
異型性の乏しい小型リンパ球様細胞のびまん性増殖を認めた. バーは30 μm

する場合があります, 悪性リンパ腫とするか, 反応性病変とするかはきわめて重大な問題である. 眼窩原発の悪性リンパ腫は, リンパ節に発生する節性の悪性リンパ腫とは組織型が異なることが多い. ある臓器に発生する節外性リンパ腫においては, その臓器の生理的状態における生体防御機能と深く関連したリンパ球, あるいはその臓器を場とする自己免疫疾患において増殖するリンパ球と同性

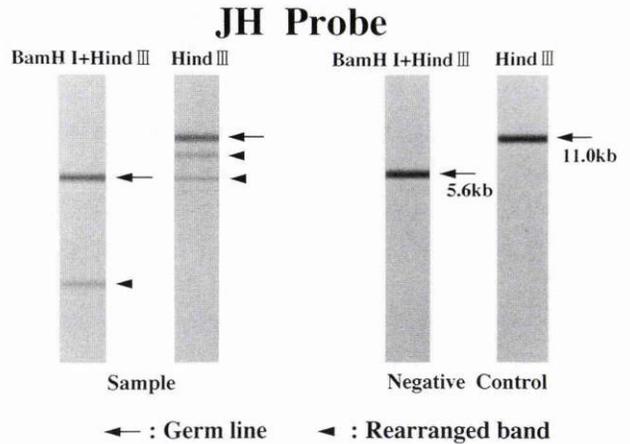


図12 症例2のH鎖遺伝子サザンブロッティング法結果.  
再構成バンド(矢じり)を認めた.

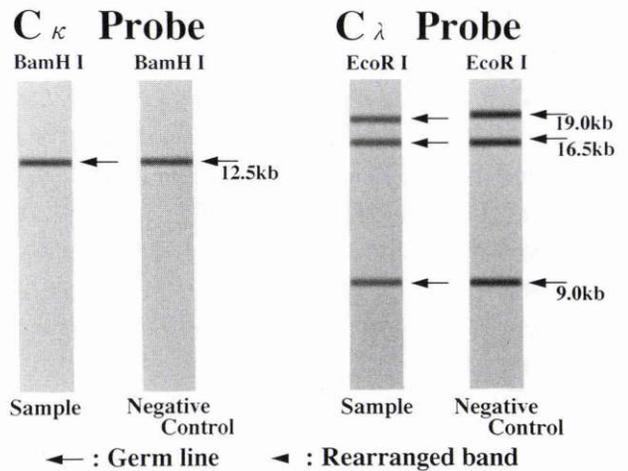


図13 症例2のL鎖遺伝子(κ, λ)サザンブロッティング法結果.  
再構成バンドを認めなかった.

状のリンパ球から成る腫瘍が圧倒的に多い<sup>5)</sup>. 節外性リンパ腫のうち, 皮膚, 鼻腔ではTリンパ球由来の腫瘍が発生するのに対し, その他の部位ではBリンパ球由来のものが多いことが明らかになっている. 眼窩原発の悪性リンパ腫の大多数は, 低悪性度のB細胞型リンパ腫と考えられている<sup>6)7)</sup>. 眼窩原発のB細胞型リンパ腫では細胞の異型性が少なく, 特に小細胞型は小リンパ球様細胞の単一増殖から成る非定型的, 境界型の病変で, 組織形態学的には反応性増殖である偽リンパ腫との鑑別に苦慮することがある. また, 免疫化学的検査でも腫瘍細胞のリンパ球が未分化である場合, リンパ球はその表面に特徴的な抗原性を有していないため, 免疫表現型が明確でなく, 膜表面抗原による診断が困難で, 免疫グロブリンが証明されないことがある. B細胞型リンパ腫では数%の症例にpan-B抗原の消失が報告されており, これらの細胞では免疫グロブリンを産生し得る分化段階にありながら, 免疫グロブリンが産生できない状態が考えられている<sup>8)</sup>.

さらに、反応性 T 細胞の増殖が多く、腫瘍性 B 細胞の少ない T cell rich B cell lymphoma や腫瘍細胞の数が少なく、非腫瘍細胞が多く混在する場合にもしばしば同定に困惑する。近年、分子生物学的手法を用いた遺伝子レベルでの解析が可能となり、従来の組織形態学的、免疫化学的方法を駆使しても腫瘍細胞の単クローン性や起源を証明できなかった場合でも遺伝子型による診断が可能となった<sup>9)~13)</sup>。本邦においても、布施らによりリンパ系眼窩腫瘍で免疫学的手法とともに遺伝子学的手法が診断の補助手段として用いられ報告<sup>14)15)</sup>されている。

リンパ球の遺伝子が他の構造遺伝子と異なる最大の特徴は、遺伝子が再構成されることがその発現に必須な要件であることである。B 細胞はその分化過程において免疫グロブリン(以下、Ig)遺伝子の再構成を伴い、T 細胞は T 細胞受容体(以下、TCR)遺伝子の再構成を伴う。Ig 遺伝子は重鎖が第 14 染色体(14 p 32)、軽鎖  $\kappa$  遺伝子が第 2 染色体(2 p 11)、軽鎖  $\lambda$  遺伝子が第 22 染色体(22 p 11)、TCR 遺伝子は第 7 染色体(7 q 35)に存在する。Ig 重鎖や TCR の可変領域遺伝子は互いに離れたいくつかの遺伝子群、すなわち V(variable), J(joining), および D(diversity) 因子から構成されている。血液幹細胞はリンパ球に分化していく段階で、Ig および TCR 遺伝子の再構成を繰り返すことにより、それぞれ B 細胞、T 細胞に分化成熟していき、この時、リンパ球では遺伝子の再構成時に遺伝子群の V, J, D 因子の組み合わせにより抗体の抗原特異性が決定される。換言すれば、それぞれのリンパ球は、V, J, D 因子の組み合わせにより特異的な再構成パターンを有していることになる。通常の Ig は多数の抗原と反応するため多クローン性で、特異的な遺伝子プローブとハイブリダイゼーションしても再構成バンドを確認することはできない。リンパ系腫瘍において、Ig 遺伝子の再構成は B リンパ球に特異的なため、ある腫瘍細胞において単クローン性に Ig 遺伝子の再構成が行われていれば、その腫瘍は B リンパ球系腫瘍であることが証明される。同様に TCR 遺伝子の再構成は T 細胞に特異的である。このため、病理形態学的診断に比し主観的見解が入らず、また単クローン抗体による免疫化学的検査で陽性反応が得られなくとも、Ig 遺伝子、または TCR 遺伝子が再構成される場合は、それぞれ B 細胞、T 細胞性リンパ腫であることが証明され、悪性リンパ腫の確定診断法として有用である。さらに、遺伝子レベルによる解析では、リンパ球の腫瘍化の分化段階の検索が可能となってきた。症例 1 では重鎖の JH プローブおよび軽鎖の C $\kappa$  プローブで再構成バンドが認められたが、症例 2 では重鎖でのみ再構成バンドがみられた。これは血液幹細胞から B 細胞が成熟する段階において前 B 細胞の段階があり、この段階で腫瘍性の変化が生じると  $\kappa$  鎖や  $\lambda$  鎖の欠落や  $\lambda$  鎖の欠落が生じるとされており<sup>8)</sup>、症例 1 と 2 はその細胞分化の異なった段階において腫瘍性変化が生じた

と考えられる。このため、組織形態学的には同一のびまん性小細胞型の B 細胞型悪性リンパ腫であるが、症例 1 は成熟した B 細胞の腫瘍化であり、症例 2 は前 B 細胞の段階での腫瘍化で、症例 2 は症例 1 に比べ細胞分化段階での分化度が異なり、治療効果、予後に違いが生じるのではないかと考えられる。悪性リンパ腫においては、組織形態学的に同一であっても遺伝子レベルでの解析では腫瘍のクローン性や分化段階が異なることがあり、遺伝子解析での腫瘍性か反応性かの鑑別とともに分化段階の検索を行い、組織形態学的検査で組織系分類するといった診断法が望ましいのではないと思われる。

近年、Burkitt リンパ腫や濾胞性リンパ腫の特定のリンパ腫において染色体異常の存在が明らかになりつつある<sup>16)~18)</sup>。いわゆる癌遺伝子や癌関連遺伝子と呼ばれるもので、特定の染色体異常が特定の腫瘍に高頻度で認められ、その異常が腫瘍化の原因となっているのではないかと推測されている。Burkitt リンパ腫は、EB(Epstein-Barr)ウイルス関与の B 細胞リンパ腫として知られているが、EB ウイルスの感染に関わりなく、第 8 番遺伝子(8 q 24)に存在する癌遺伝子 c-myc が第 14 番遺伝子(14 q 32)、第 22 番遺伝子(22 q 11)、第 2 番遺伝子(2 p 11)と相互転座して c-myc 癌遺伝子が活性化されて腫瘍化していると考えられている。また、同様に濾胞性リンパ腫においては、第 18 番遺伝子(18 q 21)の bcl-2 癌遺伝子に第 14 番遺伝子(14 q 32)との間に転座がみられる。臨床的には c-myc, bcl-2 遺伝子のプローブを用いた再構成バンドの検出による診断が可能である。現在、リンパ腫の診断、分類は組織形態学が主体となっているが、遺伝子解析により腫瘍細胞の起源の検索が可能となり、国際的には主観的見解が入りやすい形態学的診断から客観的、合理的な免疫学的、遺伝子解析による診断になりつつある<sup>19)</sup>。さらに、遺伝子レベルでの解析により腫瘍細胞の遺伝子異常が解明されるにつれ、遺伝子解析を考慮した遺伝子型分類も必要なのではないかと考えている。今回、我々は眼窩悪性リンパ腫においてサザンブロッティング法による遺伝子解析診断を行った。悪性リンパ腫の遺伝子レベルでの解析は、組織形態学的検査や免疫化学的検査で得られない情報を得ることができる。眼窩など形態学的組織診断に十分量の組織標本が得られにくい場合でも、DNA 量 5  $\mu$ g と極めて少量の腫瘍組織から腫瘍細胞の起源やクローン性、分化段階の検索が可能であり、さまざまな遺伝子プローブの開発により将来の可能性の大きい有用な検査法と考えられた。

## 文 献

- 1) Southern EM: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517, 1975.
- 2) 横田欽一, 奥山修兒, 結城正光, 齊藤祐輔, 真口宏介: RLH として 4 年 8 か月間の経過観察中に遺伝子検索で診断しえた胃 MALT リンパ腫の 1 例。胃と腸

- 28: 1101—1107, 1993.
- 3) 千葉 渉, 塩田哲宏, 池田貞雄, 小西孝明, 澤井 聡: 遺伝子解析による縦隔悪性リンパ腫の診断—腫瘍細胞の起源との関連—. 呼吸 11: 1015—1022, 1992.
  - 4) Kaplan HS: Clinical standing classification, Hodgkin's Disease. Harvard University Press, Cambridge, 340—364, 1980.
  - 5) 須知泰山, 本吉 匡, 長谷川かをり, 尾山 淳: 節外性リンパ腫の臨床病理学的特徴. 病理と臨床 4: 475—479, 1986.
  - 6) 菊地昌弘, 原 雄造: 悪性リンパ腫(非ホジキン型)組織分類上の問題点と新組織分類による眼科領域リンパ球系細胞腫瘍状病変の解析. 眼紀 30: 1437—1446, 1979.
  - 7) Medeiros LJ, Harris NL: Lymphoid infiltrates of the orbit and conjunctiva. Am J Surg Pathol 13: 459—471, 1989.
  - 8) 笠井 潔, 菊地浩吉: リンパ腫研究の展望. 病理と臨床 12: 413—418, 1994.
  - 9) Arnold A, Cossman J, Bakhshi A, Jaffe ES, Waldmann TA, Korsmeyer SJ: Immunoglobulin-gene rearrangements as unique clonal markers in human lymphoid neoplasms. N Engl J Med 309: 1593—1599, 1983.
  - 10) Cleary ML, Chao J, Warnke R, Sklar J: Immunoglobulin gene rearrangement as a diagnostic criterion of B-cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci 81: 593—597, 1984.
  - 11) Korsmeyer SJ, Hieter PA, Ravetch JV, Poplack DG, Waldmann TA, Leder P: Developmental hierarchy of immunoglobulin gene rearrangements in human leukemic pre-B-cell. Proc Natl Acad Sci 78: 7096—7100, 1981.
  - 12) Korsmeyer SJ, Arnold A, Bakhshi A, Ravetch JV, Siebenlist U, Hieter PA, et al: Immunoglobulin gene rearrangement and cell surface antigen expression in acute lymphocytic leukemias of T cell and B cell precursor origins. J Clin Invest 71: 301—313, 1983.
  - 13) Korsmeyer SJ: Antigen receptor genes as molecular markers of lymphoid neoplasms. J Clin Invest 79: 1291—1295, 1987.
  - 14) 布施昇男, 玉井 信, 清澤源弘, 一迫 玲, 澤井高志: リンパ系眼窩腫瘍の多角的補助手段を用いた病理組織学的診断. 眼紀 44: 940—945, 1993.
  - 15) 佐藤直美, 沼賀二郎, 松元 俊, 北沢万里子, 杉山 純, 新家 真: 再発後 Non Hodgkin's lymphoma と診断された右眼窩腫瘍の1症例. 眼科 37: 803—807, 1995.
  - 16) Amakawa R, Fukuhara S, Ohno H, Doi S, Ogawa S, Tanabe S, et al: Involvement of bcl-2 gene in Japanese follicular lymphoma. Blood 73: 787—791, 1989.
  - 17) Tsujimoto Y, Crossmann J, Jaffe E, Croce CM: Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. Science 228: 1440—1443, 1985.
  - 18) Weiss L, Warnke RA, Sklar J, Cleary ML: Molecular analysis of the t(14; 18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. N Engl J Med 317: 1185—1189, 1987.
  - 19) 白川 茂, 北 堅吉, 大野敏之, 三輪啓志: 悪性リンパ腫の診断の進歩. 癌と化学療法 21: 1140—1149, 1994.