

眼部リンパ球増殖性疾患の免疫組織化学および遺伝子解析による検討

久保田敏信¹⁾, 谷田部 恭²⁾, 栗屋 忍¹⁾, 浅井 淳平³⁾, 森 尚義³⁾

¹⁾名古屋大学医学部眼科学教室, ²⁾愛知県がんセンター臨床検査部病理

³⁾名古屋大学医学部第一病理学教室

要 約

眼部リンパ球増殖性疾患の20例21検体を従来の組織学的, 免疫組織化学的な検索に加え polymerase chain reaction (PCR) 法による遺伝子解析を用いて, クローン性の有無を中心に検討した. 方法はパラフィン切片を使用し, ヘマトキシリン・エオジン染色, 免疫グロブリン軽鎖限定性および免疫グロブリン重鎖・可変領域遺伝子のクローン性の有無を検討した. 組織学的に腫瘍と判定し得なかった8検体中, 免疫組織化学的な検索において1例が, 遺伝子解析では4例にクローン性増殖が確認され, これらの症例は腫瘍性疾患であることが示唆された. 免疫

組織化学的に軽鎖限定性が確認されたにもかかわらず, 遺伝子学的クローン性が証明できなかった症例が2例存在した. 眼部リンパ球増殖性疾患は主として小リンパ球を主体とした増殖を示し, 組織学的評価はしばしば困難である. しかしながら, 免疫組織化学的な検索, 遺伝子学的検索を加えることで, その病態をより詳細に把握することができた. (日眼会誌 101: 510—515, 1997)

キーワード: 眼部リンパ球増殖性疾患, 免疫組織化学, 遺伝子解析, 悪性リンパ腫, クローン性

Immunohistochemical and Immunogenetic Analysis of Ocular Adnexal Lymphoid Proliferations

Toshinobu Kubota¹⁾, Yasushi Yatabe²⁾, Shinobu Awaya¹⁾,
Junpei Asai³⁾ and Naoyoshi Mori³⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Nagoya University School of Medicine

²⁾Department of Pathology and Clinical Laboratories, Aichi Cancer Hospital

³⁾First Department of Pathology, Nagoya University School of Medicine

Abstract

We examined 20 cases (21 specimens) of ocular adnexal lymphoid proliferations, using the histological, immunohistochemical and molecular genetic methods. The latter two protocols were performed to detect the light chain restriction of immunoglobulin with peroxidase-antiperoxidase (PAP) methods, and the clonality of immunoglobulin heavy chain gene with the hemi-nested polymerase chain reaction (PCR) method, respectively. Although in 8 cases it could not be morphologically determined whether they were neoplastic or not, clonality was revealed in 1 case with immunohistochemistry and in 4 cases with PCR. Two cases showed discordant results between immunohistochemistry and PCR probably due to

somatic mutation of the framework region of the immunoglobulin heavy chain gene. Therefore, we concluded that examination with these methods contribute to a better understanding of the nature of the ocular adnexal lymphoid proliferations. Furthermore, the immunoglobulin gene PCR method is very useful in practical examination, as it can be used with formalin-fixed paraffin-embedded specimens. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 510—515, 1997)

Key words: Ocular adnexal lymphoid proliferation, Immunohistochemistry, Polymerase chain reaction, Malignant lymphoma, Clonality

I 緒 言

眼窩領域におけるリンパ球増殖性疾患は, これまで炎症性偽腫瘍, 反応性リンパ球過形成などの反応性と考え

られる病態と, 悪性リンパ腫を中心とした腫瘍性リンパ球増殖症, およびその境界病変である異型リンパ球過形成に大別されてきた. これらの病変は, とくに小型リンパ球の増殖または浸潤から成る病変を形成し, しばしば鑑

別刷請求先: 〒466 愛知県名古屋市昭和区鶴舞町65 名古屋大学医学部眼科学教室 久保田敏信

(平成8年12月24日受付, 平成9年2月14日改訂受理)

Reprint requests to: Toshinobu Kubota, M.D. Department of Ophthalmology, Nagoya University School of Medicine, 65 Tsuruma-cho, Showa-ku, Nagoya-shi Aichi-ken 466, Japan.

(Received December 24, 1996 and accepted in revised form February 14, 1997)

別が困難である。これらの鑑別手段として眼部リンパ腫のほとんどがB細胞の増殖から成ることから、免疫グロブリン軽鎖の発現を免疫組織化学的に検索する方法が用いられてきた^{1)~4)}。この方法は、腫瘍においてはクローナルなリンパ球増殖から成るため、発現される免疫グロブリンが κ, λ 軽鎖のいずれか一方に限定されるのに対し、反応性増殖の場合 κ, λ 軽鎖のモザイク状の発現パターンが認められることを利用している。Knowles ら¹²⁾によると、70%の症例でこれらの軽鎖の限定発現によって鑑別診断が可能と報告されている。しかしながら、少なからずこれらの症例においてこの免疫グロブリンの免疫組織化学的検索においても鑑別が困難な症例が存在する。今回我々は、免疫グロブリン重鎖遺伝子を polymerase chain reaction (PCR) 法によって増幅し、クローン性の有無についての検討を行った。この方法はパラフィン包埋切片に応用可能であり、感度が高いことから小さい検体でも結果が得られる利点がある。そして、組織学的、免疫組織化学的、分子病理学的な3種の方法を同一検体を用いて検索するとともに、その病態について若干の知見を得たので報告する。

II 対象および方法

1. 対 象

Open biopsy を施行され、眼部リンパ球増殖性疾患と診断された20例を対象とした。いずれの症例も同部位が初発症状であり、他部位から眼科領域への浸潤が疑われた症例は除外した。

2. 方 法

1) 組織学的、免疫組織化学的検索

組織学的検索は20例22生検標本を、免疫組織化学的検索は20例21生検標本をホルマリン固定パラフィン包埋標本を用い検討した。リンパ腫の組織分類は Working Formulation⁵⁾を用い、反応性リンパ球増殖症の診断は Knowles ら⁶⁾の分類に従った。免疫組織学的にB細胞性の確認として抗ヒトCD20マウスモノクローナル抗体 (L26, DAKO, Copenhagen, Denmark) を、腫瘍細胞産生免疫グロブリンの検出は抗ヒトIgA, IgM, IgG, κ, λ ウサギポリクローナル抗体 (DAKO, Copenhagen, Denmark) を一次抗体とした peroxidase-antiperoxidase (PAP) 法⁷⁾を用いた。

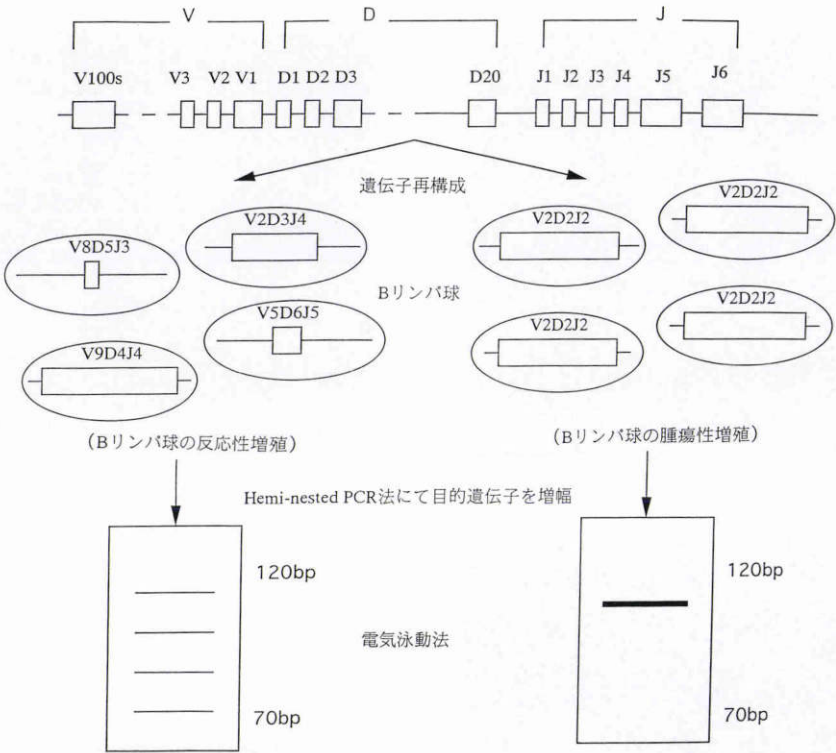


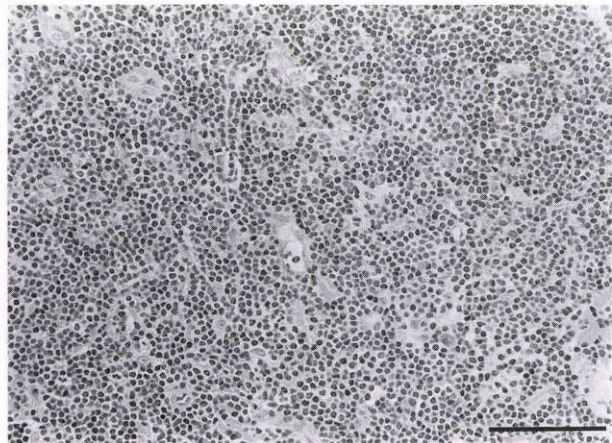
図1 免疫グロブリン重鎖、可変領域遺伝子 variable, diversity, joining (VDJ) 領域のクローン性検索の原理。
Bリンパ球では、特異な抗原を認識するため、遺伝子再構成によって多数の免疫グロブリン可変領域遺伝子VDJ領域からそれぞれ一つが選択される。反応性病変の場合多数の抗原を認識する種々の可変領域がそれぞれのリンパ球で選択され、その結果、種々の長さの可変領域が polymerase chain reaction (PCR) 法によって増幅される。その産物に対して電気泳動を行うとスメア状のパターンを示す。一方、腫瘍性増殖ではBリンパ球はクローンな増殖を示すため、ある決まった長さの可変領域が増幅される。電気泳動では、この決まった長さの遺伝子が明瞭なバンドとして検出される。本法はこの原理を利用し、電気泳動のパターンでクローン性を判定した。

表 1 部位,治療および臨床経過

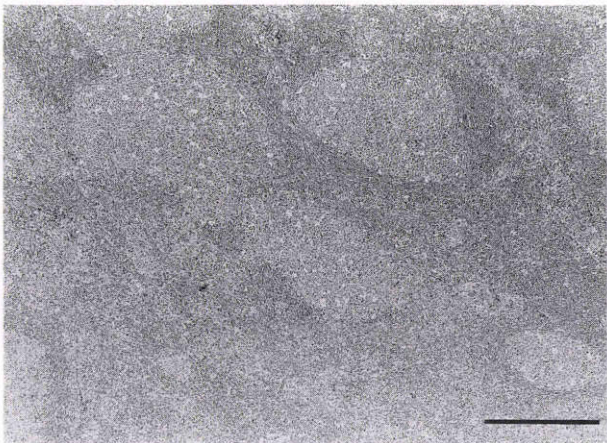
症例	年齢	性別	部位	治療	臨床経過	転帰および観察期間(月)
1	67	女	左眼窩	化学療法	完全緩解	生存(22)
2	81	女	両眼窩	経過観察	転移(左顎下腺)	他病死(7)
3	70	男	右眼窩	化学療法放射線	完全緩解	生存(26)
4	84	女	左眼窩	経過観察	転移(肺)	原病死(60)
5	59	男	右結膜	放射線	完全緩解	生存(35)
6	29	女	右結膜	放射線	再発	生存(45)
7	88	女	右眼窩	化学療法	完全緩解	生存(15)
8	63	男	左眼窩	放射線	転移(右眼窩)	他病死(8)
9	72	女	左眼窩	放射線	完全緩解	生存(39)
10	50	女	左結膜	経過観察	無症状	生存(17)
11	52	女	右結膜	化学療法	完全緩解	生存(35)
12	81	女	左眼窩	放射線	転移(右眼窩)	生存(38)
13	84	女	右眼窩	経過観察	腫瘍残存	他病死(22)
14	66	女	右結膜	経過観察	無症状	生存(39)
15	77	男	左眼窩	化学療法放射線	転移(腎)	原病死(37)
16	81	女	右眼窩	ステロイド	腫瘍残存	他病死(6)
17	49	男	左眼窩	放射線	完全緩解	生存(26)
18	48	男	右眼窩	経過観察	自然緩解	生存(123)
19	51	女	左眼瞼	経過観察	自然緩解	生存(26)
20	49	男	右眼窩	経過観察	自然緩解	生存(48)

2) 免疫グロブリン遺伝子のクローン性の検討
クローン性同定の原理については図1に示した,DNA
はホルマリン固定パラフィン包埋標本から抽出した,10

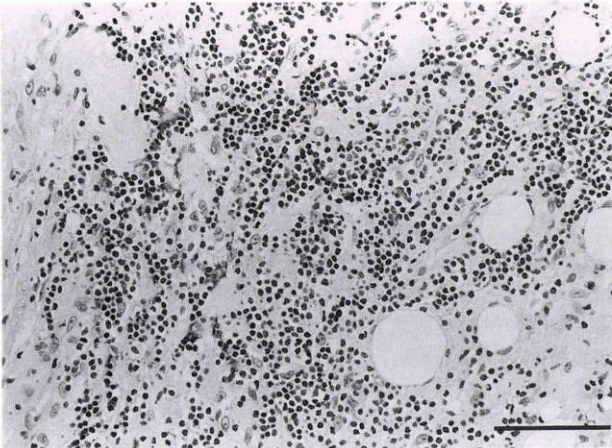
μm 厚の切片を1.5 mL 容エッペンチューブ内で脱パラ
フィンし,10 μg/mL の proteinase K で一昼夜処理後,
煮沸によって不活化し,DNA テンペレートした,PCR



A



C



B

図2 生検材料の病理組織像(ヘマトキシリン・エオジン染色).
A: 悪性リンパ腫 (small lymphocytic type), 小リンパ球様細胞がびまん性に増殖している (症例 12, 第2回目生検, バーは 200 μm). B: 異型リンパ球過形成, 結合織内に小リンパ球様細胞が浸潤している (症例 12, 第1回目生検, バーは 200 μm). C: 反応性リンパ球過形成, 反応性の胚中心が認められる (症例 19, バーは 500 μm).

表2 免疫組織化学および PCR 法による検索結果

症例	組織学	免疫組織化学	PCR
1	DL	IgMλ	Clonal
2	FM	IgMλ	Clonal
3	FM	IgMκ	Clonal
4	SL	IgMλ	Clonal
5	SL	IgAκ	Polyclonal
6	SL	IgMλ	Clonal
7	SL	IgMλ	Clonal
8	SL	IgAκ	Clonal
9	SL	IgMκ	Clonal
10	SL	IgMκ	Clonal
11	SL	IgMκ	Clonal
12	ALH	Polyclonal	Clonal
	SL	IgMλ	Clonal
13	ALH	IgMκ	Polyclonal
14	ALH	Polyclonal	Clonal
15	RLH	ND	ND
	FL	IgGλ	Clonal
16	RLH	Polyclonal	Clonal
17	RLH	Polyclonal	Clonal
18	RLH	Polyclonal	Polyclonal
19	RLH	Polyclonal	Polyclonal
20	IPH	Polyclonal	Polyclonal

RCR: polymerase chain reaction, DL: diffuse large, FM: follicular mixed, FL: follicular large, SL: small lymphocytic, ALH: 異型リンパ球過形成, RLH: 反応性リンパ球過形成, IPH: 炎症性偽腫瘍, ND: 施行せず

のプライマーは Brisco ら⁸⁾の塩基配列に従って DNA 合成機によって作製し, 10 サイクルの 94 度熱変性, 50 度のアニーリング, 72 度の進展反応の後, 25 サイクルの 94 度熱変性, 62 度のアニーリング, 72 度の進展反応の条件で hemi-nested の増幅を行った. taq ポリメラーゼおよび反応バッファーは ampli-taq PCR kit (TAKARA) を用いた. 陰性対照として胎盤 DNA を, 陽性対照として Raji B-cell line からの DNA を増幅した. 増幅反応後, 4 % の高解像度アガロースゲル (Nuscive GTC agarose gel, TAKARA) を用い, 遺伝子増幅産物を電気泳動し, クローン性の評価を行った. 陽性対照と比較し, スメア状のパターンを反応性増殖, 鋭的で明瞭なバンドをクローン性増殖と判定した.

III 結 果

1. 臨床病理学的結果

20 例の年齢, 性, 既往歴, 発生部位, 治療法および転帰については表 1 にまとめた. 男性 7 例, 女性 13 例で, 平均年齢は 65 歳, 14 例は眼窩, 5 例は結膜, 1 例は眼瞼原発であった. いずれの症例もシェーグレン症候群の既往はなかった. 治療として, 3 例 (症例 1, 7, 11) では CHOP 療法 (cyclophosphamide, hydroxydaunorubicin, vincristine (oncovin®), predonisolone) を主体とする化学療法, 2 例 (症例 3, 15) で化学療法および放射線照射, 6 例 (症例 5, 6, 8, 9, 12, 17) で放射線照射, 1 例 (症例

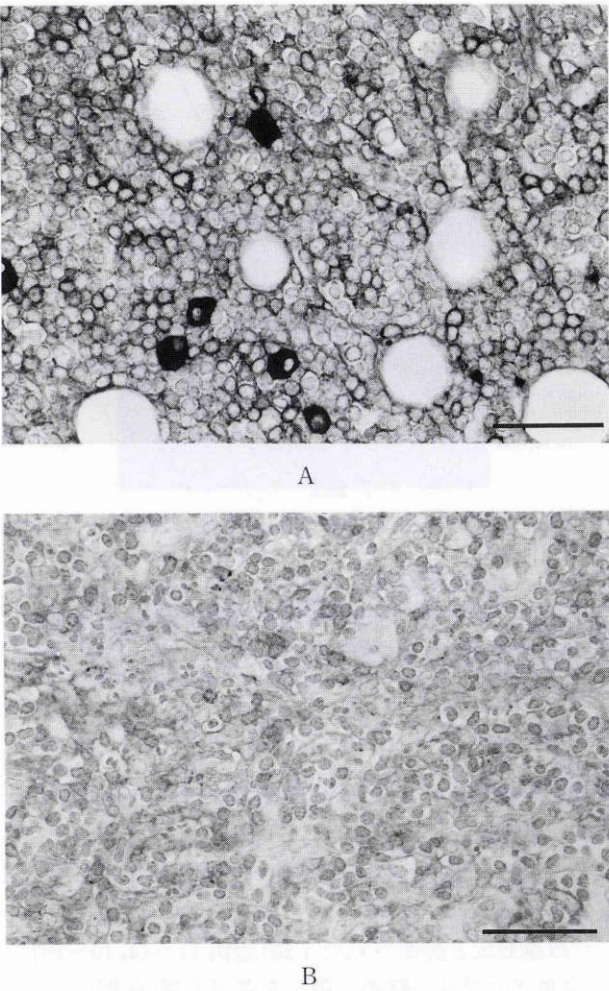


図3 免疫グロブリンλ軽鎖(A), κ軽鎖(B)染色結果(症例12, 第2回目生検). 腫瘍細胞はλ軽鎖陽性, κ軽鎖陰性を示し, 軽鎖限定性すなわち腫瘍性増殖を示す. バーは100 μm

16) でステロイド単剤投与が行われた. また, 8 例 (症例 2, 4, 10, 13, 14, 18~20) においては特別な治療は施行されず, 経過観察された.

2. 組織学的検索結果

20 例 22 検体のうち, 13 例 (症例 1~12, 15) は悪性リンパ腫, 3 例 (症例 12~14) は異型リンパ球過形成, 5 例 (症例 15~19) は反応性リンパ球過形成, 1 例 (症例 20) は炎症性偽腫瘍と診断された. 13 例のリンパ腫症例の組織亜型は, 9 例 (症例 4~12) で small lymphocytic lymphoma, 2 例 (症例 2, 3) で follicular lymphoma, mixed cell type, 1 例 (症例 1) で diffuse lymphoma, large cell type, 1 例 (症例 15) で follicular lymphoma, large cell type とされた. 2 例 (症例 12, 15) では 2 回の生検が施行され, 1 回目および 2 回目の生検では, 症例 15 は反応性リンパ球過形成およびリンパ腫 (follicular lymphoma, large cell type), 症例 12 は異型リンパ球過形成およびリンパ腫 (small lymphocytic type) と診断された.

3. クローン性の検討結果 (図 3, 4)

組織学的診断と免疫組織化学的検索, 免疫遺伝子学的

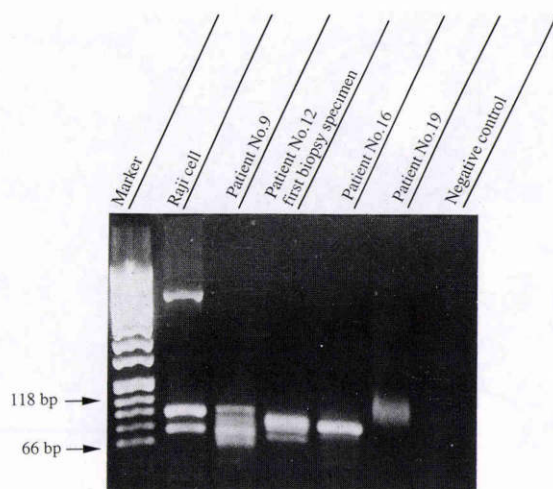


図4 PCR法によるクローン性の検索。

症例12(第1回目生検)は一本の明瞭なバンドが認められ、腫瘍性増殖が主体を占めると考えられた。症例9はスミアの中に一本の明瞭なバンドが認められ、反応性の増殖の中に腫瘍細胞が存在することが示唆された。症例19はスミアのみで反応性増殖と考えられた。

PCR: polymerase chain reaction

検索結果を表2にまとめた。組織学的にリンパ腫とされた13例(症例1~12, 15)のうち、症例5を除く12例で免疫グロブリン軽鎖の限定発現および遺伝子のクローン性増幅が観察された。異型リンパ球過形成および反応性リンパ球過形成と診断された7例(症例12~14, 16~19)では、免疫グロブリン軽鎖の限定発現が1例(症例13)に認められ、3例(症例12, 16, 17)において遺伝子のクローン性増幅のみが観察された。炎症性偽腫瘍と診断された症例は、いずれの方法においてもクローン性は検出されなかった。2回の生検を受けた症例12では、組織学的に異型リンパ球過形成と診断された検体において軽鎖の限定発現なし、遺伝子学的クローン性あり、リンパ腫と診断された検体において両方法でクローン性が確認された。

4. 臨床経過

経過中に2例(症例8, 12)では対側眼部に、1例(症例4)には肺、1例(症例2)で顎下腺、および1例(症例15)で腎臓に浸潤が認められた。最長123か月までの観察で、組織学的にリンパ腫と診断された13例中6例(症例1, 3, 5, 7, 9, 11)が完全寛解、3例(症例6, 10, 12)が有病生存、2例(症例14, 15)が原病死、2例(症例2, 8)が他病死した。異型リンパ組織過形成および反応性リンパ組織過形成と組織学的に診断された7例(症例13, 14, 16~20)は2例(症例13, 16)の他病死を除く全例が生存中である。

IV 考 按

眼窩領域に生じるリンパ球増殖症は、これまでの報告では22%が反応性リンパ球過形成、67%が悪性リンパ腫、残りが両者の境界病変(異型リンパ球過形成)と診断

されてきた⁵⁾。我々の結果も同様の分布を呈し、診断が困難な境界病変が3例含まれていた。これは、眼科領域のリンパ球増殖症のほとんどが小型リンパ球から成る増殖性病変を形成しているからである。検索した21検体のうち、17検体(81%)が小リンパ球から成る増殖性病変であった。これらの鑑別において免疫組織化学的に軽鎖の限定発現を検索することは有用であり、組織学的には異型リンパ球増殖症と診断された3検体中1検体にクローン性が認められ、腫瘍性の増殖が存在することが示唆された。

組織学的にリンパ腫あるいは免疫組織化学的にクローン性が確認できなかった7例においては、遺伝子学的検索で4例にクローナルな増殖を同定することができた。これら症例においても腫瘍性の増殖が存在すると推測される。このような組織学的、免疫組織化学的結果との相違については幾つかの推測が可能である。第一に、眼窩領域は解剖学的に生検材料を採取しにくい部位に当たり、組織学的検索に耐え得るだけの質および量を採取できるとは限らない点が挙げられる。我々の検索した症例13の第1回目の生検組織は量、質ともに不十分であり、この可能性に該当すると考えられる。Chenら⁹⁾はSouthern blot法による凍結組織を用いた検索で99%の診断が得られると報告しているが、組織診断用ホルマリン固定検体と凍結検体をとともに得ることは現実ではしばしば困難である。我々の用いたPCR法は組織診断、免疫組織化学的診断に用いた組織と同一のホルマリン固定標本を用いている点で実用的であり、Southern blot法に比し、簡便で短期間で結果を得ることのできる優れた方法と考えられる。第二に、随伴する反応性病変によって腫瘍性増殖がマスクされてしまった可能性が挙げられる。これまでの報告で、微小病変においては、組織学的、免疫組織化学的に腫瘍が同定される以前に遺伝子学的な検出がなされることは良く知られている。我々が用いた免疫グロブリン遺伝子の検索においても同様の現象が報告され、Fendら¹⁰⁾は胃生検において、組織学的同定に7か月先んじてクローン性の遺伝子学的検出が可能であったことを述べている。症例16, 17では組織学的、免疫組織化学的にもクローン性は同定し得なかったにもかかわらず遺伝子学的クローン性が認められ、微小な腫瘍性病変が存在していたと推測される。一方、組織学的にリンパ腫あるいは免疫組織化学的にクローン性が確認できた14例において2例(症例5, 13)は遺伝子学的検索でクローナルな増殖を同定することができなかった。この結果の説明の一つとして、抗原刺激によってリンパ球では可変領域遺伝子にsomatic mutationが加わるという現象が挙げられる。このsomatic mutationは腫瘍においても観察されることから、これらの症例においてもmutationが加わったことによりプライマーがアニーリングしなかったためではないかと考えられる。このような症例においては免疫

染色が有効であり、複数の手法を用いた検索が重要であることを示唆している。

Isaacson による mucosa associated lymphoid tissue (MALT) 型リンパ腫の概念の提唱¹¹⁾¹²⁾により、これまで報告されてきた粘膜関連リンパ装置に発生する小リンパ球性腫瘍の多くが MALT 型リンパ腫の範疇にあることが明らかになってきた。我々の検索した低悪性度病変から成る症例は少なからず MALT 型リンパ腫として矛盾しない組織像であった。今回、我々の検索した症例の多くが表在リンパ節腫脹を伴わず、節外臓器を選択的に浸潤している。また、予後は良好であり、緩やかな経過をたどった。これらの特徴は MALT 型リンパ腫の臨床特徴と一致する。今回の検索においては観察期間が短く、治療法も多岐に及んだことから、その臨床病態の解明においてはさらなる多数例、長期間における解析が望まれる。

以上、我々は20例の眼部リンパ球増殖症について形態学的、免疫組織化学的、遺伝子学的に腫瘍性増殖の有無について検討した。20例21検体中、17例においていずれかの方法で腫瘍性増殖を確認した。そのうち、3例においてはPCR法でのみ検出でき、PCR法の有用性が確認し得た。

文 献

- 1) Knowles DM, Jakobiec FA: Malignant lymphomas and lymphoid hyperplasias that occur in the ocular adnexa (orbit, conjunctiva and eyelids). In: Neoplastic Hematopathology. New York, NY: Williams & Wilkins, 1009—1046, 1992.
- 2) Knowles DM, Jakobiec FA, McNally L, Burke JS: Lymphoid hyperplasia and malignant lymphoma occurring in the ocular adnexa (orbit, conjunctiva, and eyelids): A prospective multiparametric analysis of 108 cases during 1977 to 1987. Hum Pathol 21: 959—973, 1990.
- 3) Medeiros LJ, Harmon DC, Linggood RM, Harris NL: Immunohistologic features predict clinical behavior of orbital and conjunctival lymphoid infiltrates. Blood 74: 2121—2129, 1989.
- 4) 坂本泰二, 石橋達朗, 大西克尚: 眼窩悪性リンパ腫の臨床病理学的ならびに免疫組織化学的研究. 日眼会誌 96: 1033—1039, 1992.
- 5) The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project: National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: Summary and description of a Working Formulation for clinical usage. Cancer 49: 2112—2135, 1982.
- 6) Knowles DM, Jakobiec FA: Orbital lymphoid neoplasms. A clinicopathologic study of 60 patients. Cancer 46: 576—589, 1980.
- 7) Taylor CR: An immunohistochemical study of follicular lymphoma, reticulum cell sarcoma and Hodgkin's disease. Eur J Cancer 12: 61—75, 1976.
- 8) Brisco MJ, Tan LW, Orsborn AM, Morley AA: Development of a highly sensitive assay, based on the polymerase chain reaction, for rare B-lymphocyte clones in a polyclonal population. Br J Haematol 75: 163—167, 1990.
- 9) Chen YT, Godwin TA, Mouradian JA: Immunohistochemistry and gene rearrangement studies in the diagnosis of malignant lymphomas: A comparison of 152 cases. Hum Pathol 22: 1249—1257, 1991.
- 10) Fend F, Schwaiger A, Weyrer K, Propst A, Mairinger T, Umlauft F, et al: Early diagnosis of gastric lymphoma: Gene rearrangement analysis of endoscopic biopsy samples. Leukemia 8: 35—39, 1994.
- 11) Isaacson P, Wright DH: Malignant lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue: A distinctive type of B-cell Lymphoma. Cancer 52: 1410—1416, 1983.
- 12) Isaacson PG, Norton AJ: Lymphomas of the ocular adnexa and eye. In: Extranodal lymphomas (Ed): London, Churchill Livingstone, 117—129, 1994.