

## 結膜原発濾胞性リンパ腫の1例

安積 淳<sup>1)</sup>, 平井 宏二<sup>1)</sup>, 田村 泰<sup>1)</sup>, 齋藤 和子<sup>1)</sup>  
山本 博之<sup>1)</sup>, 根木 昭<sup>1)</sup>, 大林 千穂<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>神戸大学大学院医学研究科器官治療医学講座(眼科学)

<sup>2)</sup>神戸大学医学部附属病院病理部

## 要 約

**背景**：本邦の統計によると、World Health Organization Classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues (WHO 分類)で規定される「濾胞性リンパ腫」が眼付属器に原発することは極めて稀である。

**症例**：65歳、女性。左眼結膜にサーモンピンクの隆起性病変があった。

**所見**：病理組織学的には、明瞭な濾胞構造をもったリンパ増殖性病変であった。免疫組織染色では、濾胞細胞はL26 (CD20)とBCL-2が陽性であった。フローサイトメトリーを用いた表面マーカー検索では、CD10とCD20がともに陽性の細胞が70%以上を占めた。抽出したDNAからは免疫グロブリン遺伝子の再構成バンドが検出され、染色体には転座 t(14, 18) (q32, q21)があっ

た。全身検索では、その他のリンパ腫病巣は発見されなかった。

**結論**：前述の所見から左眼結膜原発の濾胞性リンパ腫と診断した。眼付属器にも濾胞性リンパ腫が発生する可能性がある。組織病理学的検討に加えて、細胞表面マーカー、遺伝子、染色体を精査することで、反応性リンパ過形成や marginal zone B cell lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue type (MALT リンパ腫)と鑑別することができる。(日眼会誌 106 : 420-425, 2002)

**キーワード**：濾胞性リンパ腫, 反応性リンパ過形成, WHO 分類, フローサイトメトリー, 遺伝子再構成

## A Case of Follicular Lymphoma Derived from the Conjunctiva

Atsushi Azumi<sup>1)</sup>, Koji Hirai<sup>1)</sup>, Yasushi Tamura<sup>1)</sup>, Kazuko Saito<sup>1)</sup>,  
Hiroyuki Yamamoto<sup>1)</sup>, Akira Negi<sup>1)</sup> and Chiho Obayashi<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Ophthalmology, Kobe University School of Medicine

<sup>2)</sup>Department of Pathology, Kobe University Hospital

## Abstract

**Background** : Follicular lymphoma, derived from ocular adnexa as defined by World Health Organization Classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues, is quite rare in Japan.

**Case** : A 65-year-old woman visited our clinic for treatment of a conjunctival tumor in the left eye.

**Findings** : Incisional biopsy revealed that the lesion was a lymphoma with well-defined follicles, and it was L26 (CD20) and BCL-2 positive immunohistochemically. Flow cytometric analysis showed that more than 70% of the cells were double positive for CD10 and CD20. Southern blot hybridization demonstrated gene rearrangement bands in the immunoglobulin gene JH region. The chromosome

had a translocation t(14, 18) (q32, q21). Systemic evaluation detected no other lymphoma.

**Conclusion** : The lesion was a follicular lymphoma derived from conjunctival tissue. Additional examinations such as flow cytometric analysis, gene analysis, and chromosome examination were useful for differential diagnosis of marginal zone B cell lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue type and benign reactive lymphoid hyperplasia. (J Jpn Ophthalmol Soc 106 : 420-425, 2002)

**Key words** : Follicular lymphoma, Reactive lymphoid hyperplasia, WHO classification, Flow cytometric analysis, Gene rearrangement

別冊請求先：650-0017 神戸市中央区楠町7-5-2 神戸大学医学部眼科学教室 安積 淳  
(平成13年12月27日受付, 平成14年3月4日改訂受理)

Reprint requests to : Atsushi Azumi, M.D. Department of Ophthalmology, Kobe University School of Medicine,  
7-5-2 Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe 650-0017, Japan

(Received December 27, 2001 and accepted in revised form March 4, 2002)

## I 緒 言

悪性リンパ腫は、免疫学的検査、分子生物学的検査、染色体検査などを通して、その本態に関する理解が近年急速に変遷しつつある。新しい知見と解釈をまとめるかたちで、1994年に Revised European-American Lymphoma Classification(以下、REAL分類)<sup>1)</sup>が提唱されたが、1999年には、これを基礎とした World Health Organization Classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues(以下、WHO分類)<sup>2)</sup>が発表された。それらの分類に従うと、本邦において眼科領域に発生する眼外のリンパ増殖性病変については、多くが marginal zone B cell lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue type(以下、MALTリンパ腫)であり、WHO分類でいうところの follicular lymphoma(以下、濾胞性リンパ腫)の発生は極めて稀とされている<sup>3)</sup>。今回、免疫組織学的な染色パターンや染色体異常の特徴から、濾胞性リンパ腫と確定診断できた結膜原発悪性リンパ腫の1例を経験した。MALTリンパ腫とは明確に区別することができる低悪性度リンパ腫が、眼付属器に発生し得ることを示す症例として報告する。

## II 症 例

症 例：65歳，女性。

初 診：2001年8月7日。

主 訴：左眼結膜腫瘍。

既往歴・家族歴：特記すべきことなし。

現病歴：2000年7月頃より左眼の軽い充血に気付いていた。市販の点眼薬で様子を見ていたが、軽快しないため、2001年7月17日に近医眼科を受診したところ、左眼結膜腫瘍を指摘された。精査加療を勧められ、神戸大学医学部附属病院眼科を紹介され、初診した。

眼科所見：視力は右眼0.4(1.0×+1.75 D<-1.0 D Ax 50°)、左眼0.7(0.9×+1.5 D Ax 130°)で、眼圧は右眼16 mmHg、左眼12 mmHgであった。対光反応に異常はなかった。左眼の涙丘部から下方円蓋部結膜にかけて、サーモンピンクのリンパ増殖性病変があった(図1)。その他の前眼部、中間透光体、眼底には異常がなかった。

経 過：左眼結膜に発生したMALTリンパ腫を疑い、同年8月16日に腫瘍生検を行った。この際摘出された組織は9×5×3 mmで、半分を病理部に提出し、残りの4分の1をフローサイトメトリーによる表面マーカー解析に、最後の4分の1を染色体検査に使用した。また、病理部に提出した組織の一部凍結保存を依頼し、DNAを抽出して遺伝子解析に使用した。病理診断は濾胞性リンパ腫であった。リンパ腫に関する全身検索を行ったが、表1に示すように、全身の他部位にリンパ腫は



図 1 初診時の前眼部所見。

左内眼角から下眼瞼円蓋部にかけてサーモンピンクの隆起性病変があった。

表 1 全身検査結果

コンピュータ断層撮影：

眼窩部に腫瘍性病変なし

頸部、胸部、腹部、骨盤内に異常リンパ節腫脹なし

その他の異常所見なし

クエン酸ガリウムシンチ：異常集積なし

骨髓生検：正常骨髓

胃内視鏡：腫瘍性病変なし

リンパ腫に関する血液検査：

sIL-2 R 152(正常値；135-483 U/ml)

LD 160(正常値；117-205 IU/l 37°C)

sIL-2 R：soluble interleukin-2 receptor, LD：Lactate dehydrogenase

なく、Ann Arbor分類 stage IAEと診断した。このため、2001年9月20日より合計30.6 Gy(4 MeV電子線5×5 cm前方一門照射、17分割)の放射線照射を残余腫瘍に対して行い、外来にて経過観察中である。現在まで腫瘍の再発をみない。

検査所見：

### 1) 病理組織検査

図2Aにヘマトキシリン・エオジン染色(以下、HE染色)による弱拡大像を示す。大きさ、形の揃った明瞭な濾胞構造がみられるが、濾胞は極性を欠き全体にやや明るく見える。濾胞部分の強拡大像(図2B)では、中型で切れ込みのある核を有するcentrocytes様の細胞が主体であるが、大型で1~2個の核小体を伴う明るい核を有するcentroblasts様細胞が10個程度混在する。Tingible body macrophageはほとんどみられない。また、結膜上皮内にリンパ球が浸潤する所がある。

免疫組織染色(図2C~E)では、濾胞様構造内の細胞はL26(CD20)(DAKO JAPAN)とBCL-2(DAKO JAPAN)に陽性で、CD3(DAKO JAPAN)は陰性である。

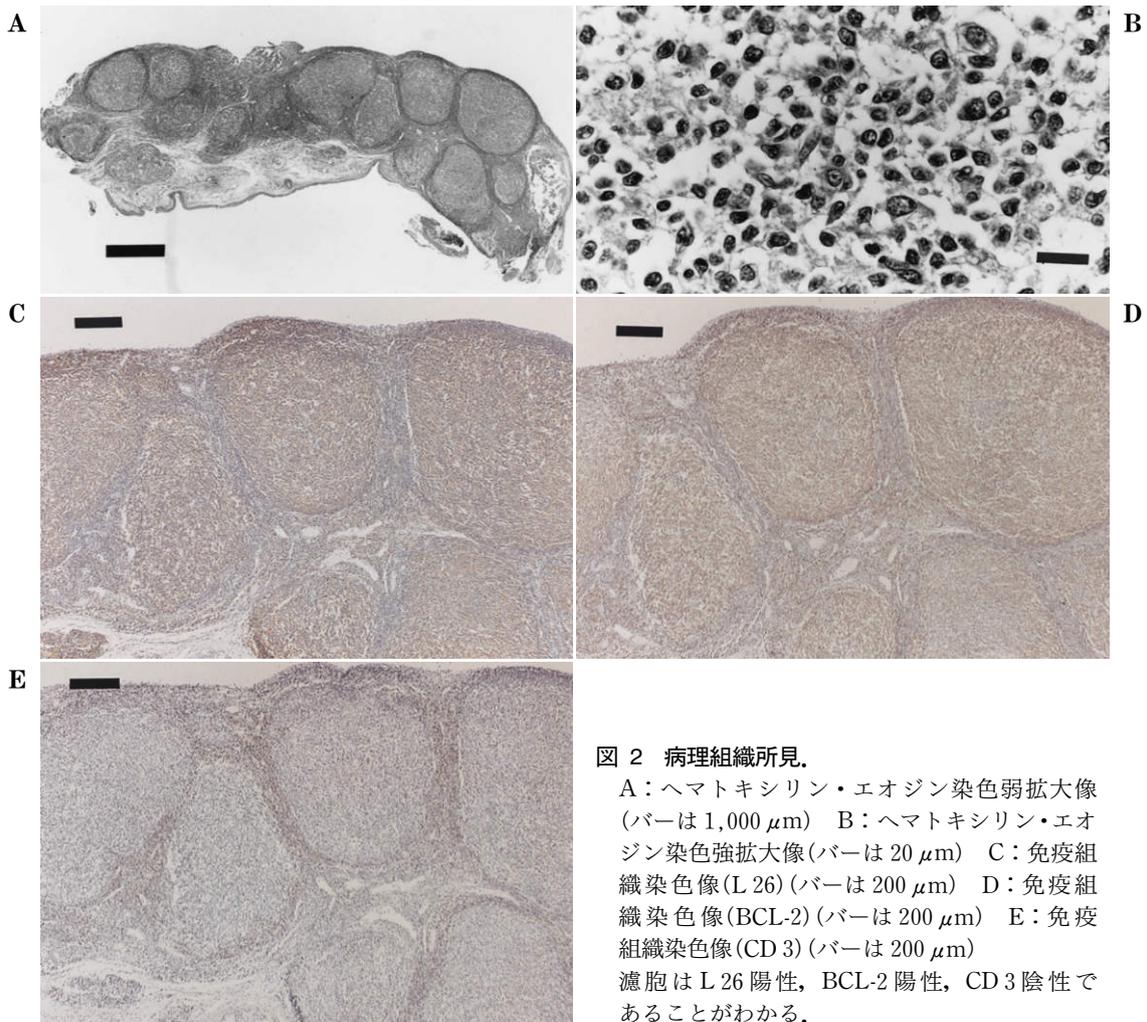


図 2 病理組織所見.

A: ヘマトキシリン・エオジン染色弱拡大像 (バーは 1,000  $\mu\text{m}$ ) B: ヘマトキシリン・エオジン染色強拡大像 (バーは 20  $\mu\text{m}$ ) C: 免疫組織染色像 (L26) (バーは 200  $\mu\text{m}$ ) D: 免疫組織染色像 (BCL-2) (バーは 200  $\mu\text{m}$ ) E: 免疫組織染色像 (CD3) (バーは 200  $\mu\text{m}$ )  
濾胞は L26 陽性, BCL-2 陽性, CD3 陰性であることがわかる.

濾胞周囲には CD3 陽性細胞は多いが, L26 および BCL-2 陽性細胞も混在する.

## 2) 表面細胞マーカー検査

生検時に採取された組織を用いて, フローサイトメトリーによる細胞表面マーカーの検索 (大塚アッセイ研究所) を行った. 結果を図 3 に示す. 提出された組織から細胞浮遊液が作られ, 7-amino actinomycin D (図中の 7 AAD) に染まらない細胞が Gate 1 によって抽出されている. 次に細胞の大きさの指標である前方散乱光 (図中の FSC) と内部構造の複雑さの指標である側方散乱光 (図中の SSC) からなる cytogram の上で, 全体を検討する Gate A, 比較的小きな細胞を検討する Gate B, 大きな細胞を検討する Gate C といった 3 つの Gate が設定されている. こうした Gate の選択条件をクリアした細胞について, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8 (以上, T 細胞系), CD10, CD19, CD20, CD23, mIg-M, mIg-D, mIg-L, mIg-K (以上, B 細胞系), CD16, CD56 (以上, NK 細胞系), CD15, CD33 (以上, 骨髄細胞系), CD25, CD30, CD103 (以上, その他) の各細胞表面マーカーの陽性率が Gate ごとに計上され, 棒グラフ表記されている. また, 2 種類の蛍光色

素を使用しているため, 2 カラーパターン解析が可能であり, Gate A での結果が示されている. CD10 と CD20 についての 2 カラーパターン cytogram から, 浮遊液中に占める両抗原陽性細胞の頻度が 73.8% に上がることがわかる. また, CD5 についても 16.9% が陽性であったが, CD23 とは独立しており, T 細胞による陽性細胞と考えられた. 以上の結果から, 腫瘍細胞は, CD5 陰性, CD10 陽性, CD20 陽性と考えられた.

## 3) 遺伝子検査

サザンブロットハイブリダイゼーション法を用いて免疫グロブリン遺伝子 J<sub>H</sub> 領域の再構成 (SRL) を検討した (図 4). 生検サンプルの一部は  $-80^{\circ}\text{C}$  の冷凍庫に保存された. 後日ここから DNA を抽出し, 制限酵素 Bam HI (レーン 1) および Bam HI+Hind III (レーン 2) を用いて切断し, アガロース電気泳動を行った. これをナイロンフィルタにサザントランスフェルし, 免疫グロブリン J<sub>H</sub> 領域と相補的な DNA プロブ (GID labeled DNA-probe) とハイブリダイゼーションさせ, フィルタ上で酵素系を用いて発色させた. 生検サンプルから得られた DNA (図中の検体) には, Germ line を示す DNA (図中の陰性対照) にはみられないバンド (図中の矢印) が検出

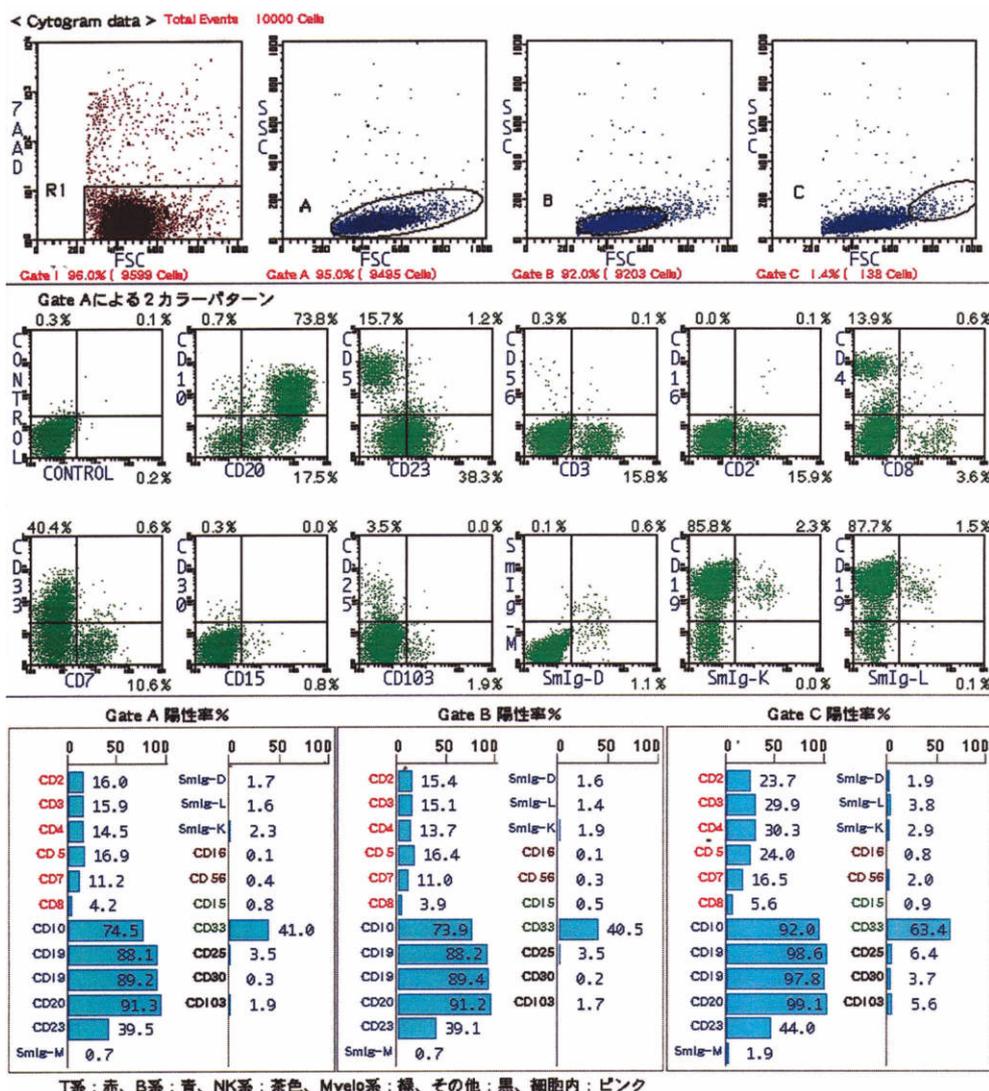


図 3 フローサイトメトリーによる細胞表面マーカー解析結果。

Gate A を用いた CD10 と CD20 の 2 カラーパターン cytogram において、浮遊液中に占める両抗原陽性細胞の頻度が 73.8% であることがわかる。

された。これは、特定の遺伝子再構成パターンを持った細胞のモノクローナルな増殖(腫瘍増殖)を示唆している。

4) 染色体検査

生検時に採取された組織を用いて染色体検査(SRL)を行った結果、分裂後期像が得られた 20 個の細胞のうち、4 個で 7 番染色体のトリソミーと遺伝子転座 t(14, 18)(q32, q21) が検出された。これらは、いずれも培養液中に浮遊する細胞であった。

III 考 按

濾胞性リンパ腫は古くから使われてきた診断名であるが、その名称が意味するところは今日までに変遷を遂げてきた。Gall-Mallory の分類<sup>4)</sup>(1942 年)にすでにみられるこの名称は、1982 年に発表された International Working Formulation of Non-Hodgkin's Lymphomas

for Clinical Usage<sup>5)</sup>にも引き継がれたが、従来、それはリンパ腫が濾胞構造を保持しているかどうか、という形態学的パターンを意味するものでしかなかった。しかし、免疫学の発達に伴ってリンパ球の分化・成熟の機構が解明されてくると、こうしたリンパ球の分化・成熟のどの段階で腫瘍化が起こるか、という観点からリンパ腫を分類しようとする試みが起こった。マントル細胞リンパ腫や濾胞性リンパ腫、MALT リンパ腫といった低悪性度 B 細胞リンパ腫にみられる名称は、B 細胞の分化・成熟の場であるリンパ濾胞の構造から、腫瘍発生母地を推察した診断名に他ならない。今日、濾胞性リンパ腫は濾胞胚中心細胞が腫瘍化した B 細胞リンパ腫と考えられており、CD5 陰性、CD10 陽性もしくは陰性、CD20 陽性という細胞表面マーカーのパターンが診断に重要とされている<sup>2)</sup>。

今回の症例で鑑別診断上重要であったのは、反応性リ

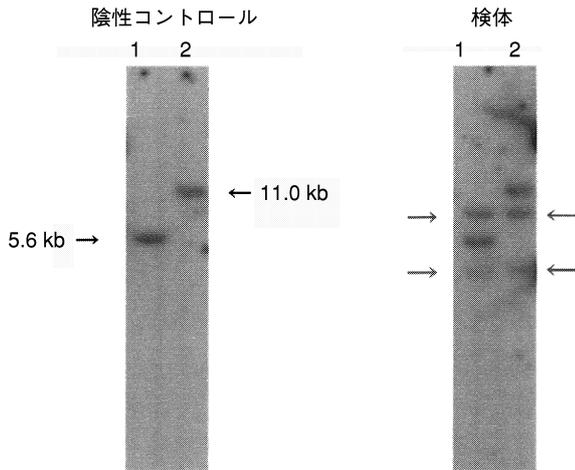


図 4 サザンプロットハイブリダイゼーション法による遺伝子再構成検索結果。

図中、陰性コントロール：正常 Germ line からの DNA，検体：生検サンプルから得られた DNA，矢印：陰性コントロールにみられないバンドを示す。陰性コントロールのレーン 1 では BamHI によって 5.6 kb に、レーン 2 では BamHI+Hind III によって 11.0 kb にバンドがみられる。検体では特定の遺伝子再構成パターンを持った細胞がモノクローナルに増殖していることを示唆する。

リンパ過形成と MALT リンパ腫であった。反応性リンパ過形成は、良性のリンパ増殖性病変と考えられており、リンパ球のモノクローナルな腫瘍性増殖がみられない<sup>3)</sup>。今回の症例は、明瞭な濾胞構造が存在したが、免疫グロブリン遺伝子の再構成がサザンプロットによって検出された。このことは、組織がモノクローナルに増殖する一群の細胞集団を含んでいたことを意味しており、腫瘍性病変として反応性リンパ過形成とは鑑別された。一方、MALT リンパ腫は眼付属器に好発する低悪性度 B 細胞リンパ腫として鑑別上重要である。リンパ濾胞辺縁帯の B 細胞が発生源地と考えられているこのリンパ腫は、多彩な病理組織上の表現型が知られており、今回の症例は、いわゆる MALT リンパ腫の follicular colonization (リンパ腫細胞が濾胞内に浸潤したために濾胞が腫大した所見) と鑑別する必要があった。病理組織学的所見からは濾胞内の腫瘍細胞は形質細胞への分化傾向がみられず、BCL-2 が陽性であったことから濾胞性リンパ腫が強く疑われたが、診断を確定的にしたのはフローサイトメトリーによる細胞表面マーカーの結果であった。この検査法は、生検時に得られた組織小片から細胞浮遊液を作製し、これに種々の蛍光抗体を反応させ、フローサイトメータで解析する方法で、腫瘍構成細胞の抗体陽性率を算出することができる。免疫組織染色法と比べると、抗体陽性細胞の組織内での局在がわからないという欠点はあるが、①例えば CD10 や CD5 のような通常の病理施設では検索が難しい、多彩な抗原についての検索ができる、②染色結果を客観的な数値として知ること

ができるという点で優れている。特に今回の症例では 2 カラーパターンの解析によって、腫瘍細胞と考えられる CD20 陽性細胞は CD10 にも重複して陽性 (double positive) であることが判明し、CD20 陽性、CD10 陰性である MALT リンパ腫は否定された。このように、今日的な診断基準に則ってリンパ腫を鑑別診断するには、従来の病理組織所見や免疫組織染色に加えて、遺伝子検査やフローサイトメトリーによる表面マーカーの解析といった、多彩な診断技術を駆使することが有用である。

濾胞性リンパ腫の頻度は、検討を行った母集団の違いによって異なり、欧米人に多く (非ホジキンリンパ腫の 35~40%)、日本人に少ない (節性リンパ腫の 1 割程度) とされる<sup>6)</sup>。眼付属器に発生するリンパ増殖性病変を REAL 分類に則って検討した報告として、Harvard Medical School の White ら<sup>7)</sup> は眼付属器原発の悪性リンパ腫 32 例中 6 例が濾胞中心リンパ腫 (WHO 分類の濾胞性リンパ腫) で、15 例が MALT リンパ腫であったとしている。また、ベルリン自由大の Copeland ら<sup>8)</sup> によると、彼女らが検討した 112 例中 10 例が濾胞中心リンパ腫であり、7 例の Ann Arbor Stage IE、すなわち眼付属器原発症例を含んでいた。これに対して、本邦の Manami ら<sup>3)</sup> によると、76 例中 37 例 (48.7%) が MALT リンパ腫であり、原発性の濾胞中心リンパ腫はなかった。また、眼付属器原発のリンパ腫について検討した国立癌センターの Nakata ら<sup>9)</sup> の報告でも、病理診断ができた 44 例中に濾胞中心リンパ腫はなかった。このように、今回の症例のような眼付属器原発の濾胞性リンパ腫は、日本人としては極めて珍しい。

結膜という外界にさらされた粘膜でリンパ濾胞を発見することは、日常臨床でもよく経験する。にもかかわらず、結膜に原発するリンパ腫のほとんどが MALT リンパ腫であり、濾胞性リンパ腫が珍しい理由は不明である。低悪性度 B 細胞リンパ腫については、近年分子生物学的な解析からその腫瘍発生のメカニズムを探る研究が盛んに行われている。濾胞性リンパ腫では、染色体転座 t(14, 18) (q32, q21) がベースにあって、アポトーシス抑制物質である BCL-2 が恒常的に発現していることが、その腫瘍発生に重要とされている<sup>10)</sup>。今回の症例でも染色体転座 t(14, 18) (q32, q21) と BCL-2 の陽性所見がみられた。濾胞性リンパ腫は、一般にリンパ節に発生するが (節性リンパ腫)、結膜に原発する場合でも (節外性リンパ腫)、節性の濾胞性リンパ腫と同様の背景をもって腫瘍発生したことが推察される。一般に、B リンパ球が抗原刺激を受けてリンパ濾胞の胚中心に移動し、somatic hypermutation を起こすようになると、本来ならば BCL-2 の発現が抑制され、抗原に対する親和性の低い形質を獲得した B 細胞はアポトーシスに陥る。ところが、染色体転座を起こした異常な B 細胞は BCL-2 の発現が抑制されないため、正常な抗体産生ができないにも

かかわらず，胚中心で増殖，集積し，濾胞性リンパ腫の形態を呈するようになると考えられている<sup>11)12)</sup>。結膜のリンパ濾胞は，こうした somatic hypermutation の場としては，全身のごく限られた一部であるために，眼付属器の濾胞性リンパ腫発生頻度が低いと思われる。

上述のように，今日の悪性リンパ腫の診断は，正常リンパ組織の基本理解と腫瘍発生のメカニズムをベースに進められている。その結果，濾胞性リンパ腫という診断名は，従来の形態学的側面を重視した診断がもつ“あいまいさ”から脱却し，より鮮明な輪郭をもつ診断名になった。同様のことは MALT リンパ腫をはじめとする多くの悪性リンパ腫でも進行中である。眼付属器には，しばしば診断に苦慮するリンパ増殖性病変が発生するが，こうした悪性リンパ腫診断の発展は，眼付属器原発のリンパ増殖性病変の本質を解明するうえでも重要と思われる。

## 文 献

- 1) **Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, et al** : A revised European-American classification of lymphoid neoplasms : A proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84 : 1361—1392, 1994.
- 2) **Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al** : World Health Organization Classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues : Report of the clinical advisory committee meeting—Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 17 : 3835—3849, 1999.
- 3) **Mannami T, Yoshino T, Oshima K, Takase S, Kondo E, Ohara N, et al** : Clinical, histopathological, and immunogenetic analysis of ocular adnexal lymphoproliferative disorders : Characterization of MALT lymphoma and reactive lymphoid hyperplasia. *Mod Pathol* 14 : 641—649, 2001.
- 4) **Gall EA, Mallory TB** : Malignant lymphoma. A clinicopathologic survey of 618 cases. *Am J Pathol* 18 : 381—429, 1942.
- 5) **The Non-Hodgkin's lymphoma pathologic classification project** : National Cancer Institute sponsored study of classification of non-Hodgkin's lymphomas : Summary and description of a working formulation for clinical usage. *Cancer* 49 : 2112—2135, 1982.
- 6) **東 守洋, 石井源一郎, 張ヶ谷健一** : 濾胞性リンパ腫の発生と遺伝子異常. *病理と臨床* 16 : 379—383, 1998.
- 7) **White WL, Ferry JA, Harris NL, Grove AS Jr** : Ocular adnexal lymphoma. A clinicopathologic study with identification of lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue type. *Ophthalmology* 102 : 1994—2006 1995.
- 8) **Coupland SE, Krause L, Delecluse H-J, Anagnostopoulos I, Foss H-D, Hummel M, et al** : Lymphoproliferative lesions of the ocular adnexa. Analysis of 112 cases. *Ophthalmology* 105 : 1430—1441, 1998.
- 9) **Nakata M, Matsuno Y, Katsumata N, Takenaka T, Kobayashi Y, Narabayashi M, et al** : Histology according to the Revised European-American Lymphoma Classification significantly predicts the prognosis of ocular adnexal lymphoma. *Leuk Lymphoma* 32 : 533—543, 1999.
- 10) **Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM** : Involvement of the bcl-2 genes in human follicular lymphoma. *Science* 228 : 1440—1443, 1985.
- 11) **Stamatopoulos K, Kosmas C, Belessi C, Stavroyianni K, Kyriazopoulos P, Papadaki T** : Molecular insights into the immunopathogenesis of follicular lymphoma. *Immunol Today* 21 : 298—305, 2000.
- 12) **森 茂郎** : びまん性大細胞型リンパ腫の多様性について. *病理と臨床* 16 : 390—393, 1998.