

眼内悪性リンパ腫が疑われた 1 例に対する遺伝子解析とサイトカイン測定

横田 眞子¹⁾²⁾, 高瀬 博¹⁾, 今井 康久¹⁾, 鴨居 功樹¹⁾杉田 直¹⁾, 森田 博之²⁾, 滝澤登一郎³⁾, 田中 住美⁴⁾De Fen Shen⁵⁾, Chi-Chao Chan⁵⁾, 望月 學¹⁾¹⁾東京医科歯科大学視覚応答調節学, ²⁾川口市立医療センター眼科³⁾東京医科歯科大学病理診断科学, ⁴⁾帝京大学市原病院眼科⁵⁾米国国立眼研究所免疫研究室

要 約

背景: 眼内悪性リンパ腫の診断は、硝子体細胞診のみでは診断が困難なことが多い。ステロイド抵抗性の硝子体混濁を伴うぶどう膜炎と診断された症例に対し、特殊な方法で採取した比較的多量の硝子体ゲルおよび硝子体液を用いてマイクロダイセクション法と polymerase chain reaction (PCR) 法やサイトカイン測定など複数の新しい検査を行い、その後の臨床経過からも眼内悪性リンパ腫と確定診断できる症例を経験したので報告する。

症 例: 症例は 68 歳、女性。両眼のステロイド抵抗性のびまん性硝子体混濁に対し、右眼硝子体生検を行い、病理診断の結果は class III であった。硝子体病理標本からの PCR 検査で、免疫グロブリン重鎖遺伝子の third framework (FR3A) と complementary determining region 3 (CDR3) 領域の再編成とアポトーシス抑制因子

B cell lymphoma/leukemia-2 (bcl-2) 遺伝子の転座が検出された。また、硝子体液のサイトカイン測定ではインターロイキン (IL)-10/IL-6 比が 100 以上と高値を示した。以上から、眼内悪性リンパ腫を疑い、放射線療法と化学療法を行った。その後、脳内多発転移を発症し、臨床的にも悪性リンパ腫の確定診断に至った。

結 論: 遺伝子解析とサイトカイン測定などの多角的検査を行うことは眼内悪性リンパ腫の診断に有用と考えられた。(日眼会誌 107: 287-291, 2003)

キーワード: 眼内悪性リンパ腫, マイクロダイセクション, 免疫グロブリン遺伝子再構成, サイトカイン測定, PCR

A Case of Intraocular Malignant Lymphoma Diagnosed by Immunoglobulin Gene Rearrangement and Translocation, and IL-10/IL-6 ratio in the Vitreous Fluid

Mako Yokota¹⁾²⁾, Hiroshi Takase¹⁾, Yasuhisa Imai¹⁾, Kojyu Kamoi¹⁾Sunao Sugita¹⁾, Hiroyuki Morita²⁾, Toichiro Takizawa³⁾, Sumiyoshi Tanaka⁴⁾De Fen Shen⁵⁾, Chi-Chao Chan⁵⁾ and Manabu Mochizuki¹⁾¹⁾Department of Ophthalmology and Visual Science, Tokyo Medical and Dental University Graduate School²⁾Kawaguchi Medical Center Eye Clinic³⁾Department of Surgical Pathology, Tokyo Medical and Dental University Graduate School⁴⁾Department of Ophthalmology, Teikyo University Ichihara Hospital⁵⁾Laboratory of Immunology, National Eye Institute (NIH)

Abstract

Background: The diagnosis of primary intraocular lymphoma is difficult in many cases even with conventional cytological tests using vitreous samples. Recently new diagnostic tests, such as microdissection and polymerase chain reaction (PCR) and measurement of cytokines using intraocular samples, have been applied to the diagnosis of the disease. We report here a case where we used the new diagnostic tests and the results aided us to make a diagnosis of intraocular lymphoma.

Case: A 68-year-old woman with an initial diagnosis of bilateral idiopathic uveitis with steroid-resistant vitreous opacities underwent a vitreous biopsy. The cytological examinations of the vitreous samples revealed class III. The microdissection and PCR using the vitreous samples detected IgH rearrangement gene in the third framework (FR3A), the complementary determining region 3 (CDR3) of the V_H region and Bcl-2-associated translocation. The interleukin (IL)-10 to IL-6 ratio in the vitreous

fluid was greater than 100. Because the results of the examinations strongly suggested intraocular lymphoma, the patient was treated with radiation and chemotherapy. One month after the therapy, however, the patient developed multiple metastatic lesions in the brain. The clinical course of the patient together with the new diagnostic results of examinations led to a diagnosis of intraocular lymphoma.

Conclusion: A combination of tests, such as conventional cytology, microdissection, and PCR, and cytokine assay using intraocular biopsy samples, is useful to make a diagnosis of intraocular lymphoma. Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 107: 287-291, 2003)

Key words: Intraocular malignant lymphoma, Microdissection, Immunoglobulin gene rearrangement, Cytokine analysis, PCR

別刷請求先: 113-0034 東京都文京区湯島 1-5-45 東京医科歯科大学視覚応答調節学 横田 眞子
(平成 14 年 3 月 12 日受付, 平成 14 年 10 月 23 日改訂受理)

Reprint requests to: Mako Yokota, M.D. Department of Ophthalmology and Visual Science, Tokyo Medical and Dental University Graduate School. 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0034, Japan

(Received March 12, 2002 and accepted in revised form October 23, 2002)

I 緒 言

眼内悪性リンパ腫は、びまん性硝子体混濁と網膜脈絡膜の黄白色滲出斑を特徴とする仮面症候群と呼ばれるステロイド抵抗性のぶどう膜炎症状を呈することがある^{1)~3)}。組織学的にはそのほとんどが非ホジキン悪性リンパ腫であり、その生命予後の悪さから放射線療法や化学療法などの積極的治療の対象となる²⁾。

眼内に限局した悪性リンパ腫の診断には、従来から硝子体生検や経強膜網脈絡膜生検⁴⁾による悪性細胞の同定が行われているが、近年それに加え免疫組織学的検索による硝子体浸潤細胞の単クローン性の解析⁵⁾や補助診断として硝子体液のサイトカイン測定の有用性が報告⁶⁾⁷⁾されている。しかし、腫瘍細胞以外の反応性リンパ球の存在や、硝子体検体採取以前にしばしば行われるステロイド薬の全身投与による硝子体浸潤細胞数の減少や変性などにより、細胞診や免疫組織学的検索による硝子体浸潤細胞の評価には困難を伴う場合が多い。また、経強膜網脈絡膜生検は、病変部の直接的な病理組織診断ができる利点があるものの、一定の面積の網脈絡膜を切除するために網膜剥離などの合併症が危惧される。

最近、従来用いられてきた細胞診、免疫組織学的検査法に加え、マイクロダイセクション法⁸⁾と polymerase chain reaction (PCR) 法を用いた眼内浸潤細胞の遺伝子解析法⁹⁾が開発された。マイクロダイセクション法は、硝子体検体からリンパ球や異型細胞を顕微鏡下で採取することを可能とし⁸⁾、硝子体浸潤細胞の単クローン性免疫グロブリン再構成の検出に際しても感度良く安定した結果を得られる手法として報告¹⁰⁾されている。しかし、reactive lymphoid hyperplasia においても単クローン性免疫グロブリン遺伝子再構成が検出されたとの報告¹¹⁾もあり、遺伝子解析のみで診断に至るにはまだ検討を要する点がある。

今回、著者らはステロイド抵抗性のびまん性硝子体混濁を呈する症例に対し、診断目的で硝子体ゲルおよび硝子体液を採取し、硝子体液の細胞診に加え眼内浸潤細胞の遺伝子解析とサイトカイン測定を行った結果眼内悪性リンパ腫が疑われ、その後脳内転移などの臨床経過で同疾患の確定診断に至ることができた 1 例を経験したので報告する。

II 症 例

症 例：69 歳，女性。

主 訴：右眼霧視，視力低下。

既往歴：特記すべき事項なし。

家族歴：特記すべき事項なし。

現病歴：2000 年 8 月初旬から右眼の霧視，視力低下を自覚し，近医を受診した。右眼ぶどう膜炎の診断でベタメタゾン点眼とデキサメタゾンのテノン嚢下注射を受

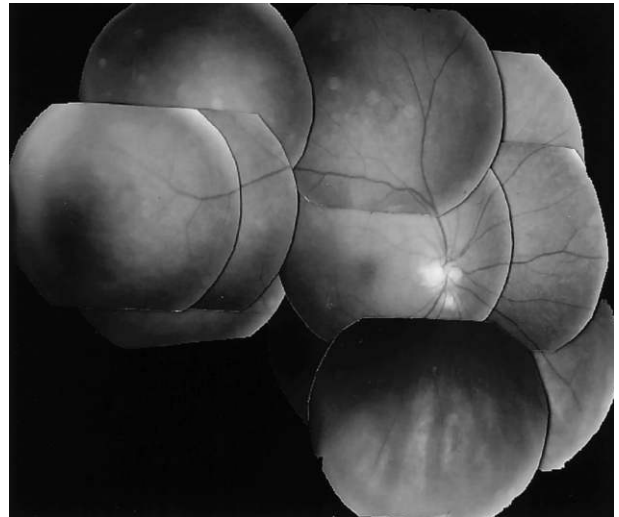


図 1 A 初診時の右眼眼底写真 (2000 年 9 月 18 日)。

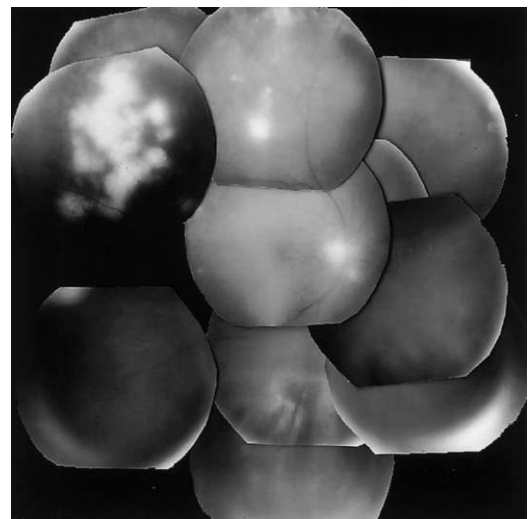


図 1 B 治療開始直後の右眼眼底写真 (2000 年 12 月 8 日)。

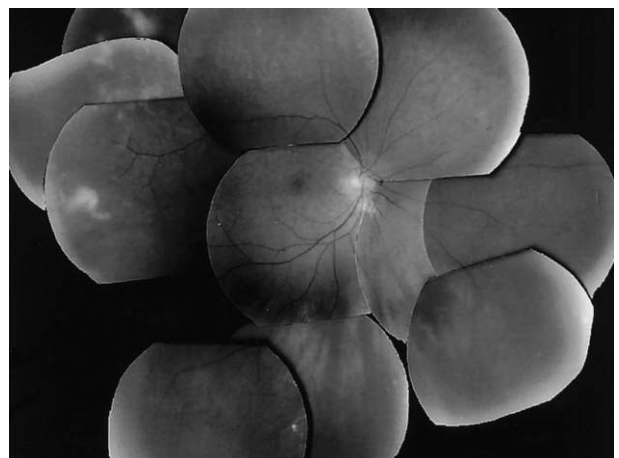


図 1 C 治療終了直前の右眼眼底写真 (2001 年 1 月 25 日)。

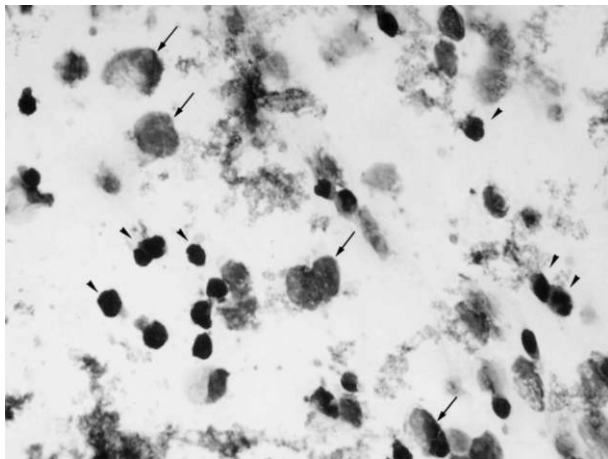


図 2 右眼硝子体生検の病理標本の光学顕微鏡写真(ギムザ染色×200)。

矢じりは核の濃縮像, 矢印は核の膨化像を示す。

けたが改善せず, 同年 9 月 18 日当科紹介受診した。

初診時所見: 視力は右眼 0.1 (0.2×-0.75 DCyl-1.5 D Ax 65°), 左眼 0.1 (0.3×+0.75 DCyl-2.0 D Ax 85°), 眼圧は右眼 8 mmHg, 左眼 9 mmHg, 前眼部・中間透光体は, 右眼に微細な角膜後面沈着物があり, 前房中細胞は右眼+2, 左眼+1, 硝子体混濁は Nussenblatt ら¹²⁾の分類で右眼 grade II, 左眼 grade I であった。眼底は, 硝子体混濁のため一部透見不良であったが, 両眼とも検眼鏡的に明らかな網脈絡膜病変はなかった(図 1 A)。全身検査では血算・生化学的検査に異常なく, 梅毒血清反応陰性, 血中ウイルス抗体価はヒト T 細胞白血病ウイルス陰性, 単純ヘルペスウイルス 32 倍, 水痘帯状疱疹ウイルス 4 倍, サイトメガロウイルス 64 倍, EB ウイルス抗 EBNA 10 倍および各種腫瘍マーカー (CEA 4.1 ng/ml, AFP 5.7 ng/ml, CA 19-9 5.7 U/ml, CA 125 6.1 U/ml, TPA 54 U/l, PIVKA-2 22 mAU/ml, γ -Sm 0.3 以下, SCC 0.5 以下) はすべて正常範囲内で, 可溶性 IL-2 レセプターも 334 U/ml と正常であった。頭部の造影 magnetic resonance imaging (MRI) と頭部 computed tomography (CT) では特記すべき異常所見はなかった。

経過: 特発性ぶどう膜炎として 2000 年 9 月 21 日からプレドニゾロン 50 mg/日の内服を開始したが, 硝子体混濁は改善しなかった。10 月下旬から右眼耳側周辺部網膜に小さな斑状の黄白色病変が数個出現したが, 左眼には異常所見はなかった。精査の目的で 11 月 8 日に当科に入院し, 11 月 14 日に右眼硝子体生検を施行した。硝子体液の採取に当たっては, 以下の手順で行った。すなわち 3 ポートを設置後, 硝子体カッターに三方活栓を介して 5 ml ディスポシリンジを接続し, 無灌流下で硝子体を切除吸引した。その際, 吸引は手動で行い, 綿棒を用いて強膜を圧迫・陥凹させながら眼圧調節を行った。シリンジへの硝子体液の流入が停止したこと

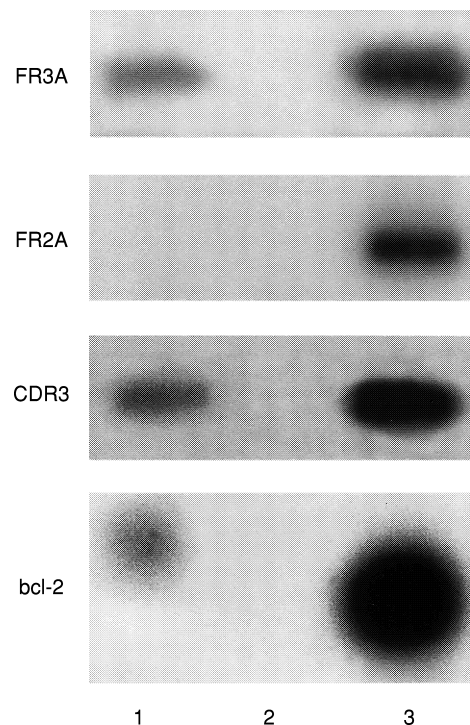


図 3

Polymerase chain reaction (PCR) 法により, 免疫グロブリン重鎖遺伝子の third framework (FR3A) 領域と complementary determining region 3 (CDR3) 領域に遺伝子再構成が示された。また, アポトーシス抑制因子 B cell lymphoma/leukemia-2 (bcl-2) 遺伝子の転座も示された。1 は症例, 2 は陰性対照, 3 は陽性対照である。

を確認した後, 硝子体カッターを眼内から抜去し, 吸引チューブ内に残存した硝子体液もシリンジ内に回収した。この結果, 灌流液を混じらない硝子体ゲルおよび硝子体液が約 1 ml 採取された。その後眼内灌流を行いながら, 残存硝子体の切除を行った。

採取した硝子体液は, 直ちに一部を病理用ガラススライド板上に 4 枚塗抹乾燥し, 米国国立眼研究所に送付した。残りの硝子体のうち 0.5 ml を病理細胞診に提出し, その他約 0.4 ml の硝子体液は 8,000 rpm, 5 分の遠心分離を行い, その上清と沈渣をそれぞれ -80°C に凍結保存し, 上清はその後のサイトカイン濃度の測定に用いた。

硝子体生検標本は, 直ちに病理部においてガラススライド板に塗抹しギムザ染色し光学顕微鏡下で観察した。大多数の細胞において変性が強く正確な細胞診は困難であったが, 細胞の形態から class III と病理診断された(図 2)。ほとんどすべての細胞は, 核の濃縮(図中矢じり)あるいは核の膨化(図中矢印)を伴っており, 良・悪性の判定が困難であった。硝子体液上清中のサイトカイン濃度を enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 法 (R&D systems, Minneapolis, MD) により測定したところ, インターロイキン (IL)-10 が 5,000 pg/ml と異常

に高く、IL-6 は 50 pg/ml であり、IL-10/IL-6 比は 100 であった。ガラススライド板に塗抹乾燥した硝子体液は、米国国立眼研究所において既報¹⁰⁾¹³⁾のごとく浸潤リンパ球をマイクロダイセクション法により分離し、PCR 法により遺伝子検索を行った。マイクロダイセクション法は、ガラススライド板に塗抹した硝子体液をギムザ染色し、顕微鏡下で異型リンパ球と思われる細胞を 25 個選り、30 G 針で採取した。採取したすべての細胞を一つにまとめて抽出用バッファーに移し DNA を抽出した。この DNA を PCR 法により解析した。その結果、免疫グロブリン重鎖、V_H領域の framework である FR3A 領域と CDR3 領域に単一の遺伝子再構成が、また bcl-2 遺伝子に転座が検出された(図 3)。

以上の結果から眼内悪性リンパ腫と診断し、2000 年 11 月 29 日～2001 年 2 月 9 日まで放射線科で CHOP 療法(1 クールは cyclophosphamide 1,100 mg+hydroxydaunorubicin 90 mg+oncovin 2 mg+prednisolone 90 mg/1 日 1 回と prednisolone 90 mg のみを 4 日間)を 3 クールと、右眼に 30 Gy の放射線照射を行った。治療開始直後の 2000 年 12 月 8 日の右眼眼底所見(図 1 B)では、黄白色滲出斑が癒合拡大し、同時期に左眼耳側にも 1 乳頭径大の淡い滲出斑が 1 個出現していた。しかし、治療終了直前の 2001 年 1 月 25 日には、右眼の耳側周辺部網膜の斑状黄白色滲出性病変は萎縮限局化し(図 1 C)、左眼の滲出斑もごくわずかに変性巣を残すのみとなった。眼内炎症は鎮静化したが、治療終了約 1 か月後に脳内多発転移を発症し、現在放射線科で入院加療中である。眼底所見に著変はないが、多発性転移性脳腫瘍のため意識は混濁している。

III 考 按

今回、著者らはステロイド抵抗性の硝子体混濁を呈する 69 歳の症例に対し硝子体生検を行い、得られた硝子体検体を病理細胞診、遺伝子診断、サイトカイン測定に供した。今回行った硝子体生検方法では、硝子体を切除吸引する際に、無灌流下で硝子体を手動吸引すると同時に、綿棒で適度に眼球を加圧させることで生検中に眼球に過度の陰圧がかからないように注意した。このようにすることにより、安全に、生体内の状態と非常に近い希釈されない硝子体検体を約 1 ml 採取することができた。その結果、多面的な診断方法を選択することが可能となった。採取後直ちに処理した硝子体標本での細胞診では、細胞の変性が強く病理細胞診では、細胞の良・悪性の判定が困難であり class III と診断された。しかし、マイクロダイセクション法を用いた遺伝子解析¹⁰⁾で硝子体浸潤細胞に単クローン性の免疫グロブリン遺伝子再構成が検出され、さらに硝子体上清のサイトカイン測定で IL-10 と IL-6 の濃度比(IL-10/IL-6)が極めて高値(100)であったことから、眼内悪性リンパ腫が強く推定され

た⁷⁾。

マイクロダイセクション法を用いた遺伝子解析は、少量のサンプルでも解析が可能である。この方法では、顕微鏡下で異型リンパ球と思われる細胞を数十個選んで採取して DNA を抽出し PCR 法で増幅し、免疫グロブリン遺伝子再構成の単クローン性を調べるものである。本症例のように、硝子体生検標本の条件が悪くて質の高い染色が得られず細胞診が困難な場合でも、単クローン性免疫グロブリン遺伝子の再構成の有無の検索は可能であった。マイクロダイセクション法で異型細胞を 10～20 個選んで PCR にかけるこの方法は、硝子体切除標本から直接 DNA を抽出する方法に比べて、多数の雑多な細胞を含まないために感度が著しく高くなる利点がある¹⁴⁾。しかし、適切な細胞を選ぶにはかなりの経験と熟練を要する。

これらの診断方法だけで悪性リンパ腫と診断するには注意を要しなければならない。なぜなら、reactive lymphoid hyperplasia でも単クローン性の免疫グロブリン遺伝子再構成が検出されたとの報告¹¹⁾があり、また、硝子体液中の IL-10 が上昇していても必ずしも悪性リンパ腫ではないという報告¹⁵⁾もあるからである。したがって、これらの誤った結果を避けるためにも、診断には多種類の検査を行い、このような疑陽性を最小限に抑える努力をすべきである。今回の症例では、比較的多量の純粋な硝子体サンプルが得られる方法により硝子体生検を行い、その検体を遺伝子解析とサイトカイン測定など複数の新しい検査法に用いた。その結果、眼内悪性リンパ腫が強く疑われたために化学療法と放射線治療を行っていた経過中に脳内多発転移を発症したことから、臨床的にも同疾患と確定診断できたと考えられる。このことから、方法の異なる多種類の検査を重ねることは悪性リンパ腫の早期診断に有用な情報をもたらす可能性があることがわかった。

今後、このような多角的な硝子体検体検査を行う症例を重ねて、悪性リンパ腫の早期診断における有用性を検討する必要があると考えられた。

文 献

- 1) Appen RE : Posterior uveitis and primary cerebral reticulum cell sarcoma. Arch Ophthalmol 93 : 123—124, 1975.
- 2) Peterson K, Gordon KB, Heinemann MH, DeAngelis LM : The clinical spectrum of ocular lymphoma. Cancer 72 : 843—849, 1993.
- 3) 野田航介, 鈴木参郎助, 安藤靖恭, 桂 弘, 神園純一, 宗司西美, 他 : 眼と中枢神経系に原発した悪性リンパ腫の 9 例. 日眼会誌 102 : 348—354, 1998.
- 4) Peyman GA, Juarez CP, Raichand M : Full-thickness eye-wall biopsy : Long-term results in

- 9 patients. *Br J Ophthalmol* 65 : 723—726, 1981.
- 5) **Davis JL, Solomon D, Nussenblatt RB, Palestine AG, Chan CC** : Immunocytochemical staining of vitreous cells. Indications, techniques, and results. *Ophthalmology* 99 : 250—256, 1992.
- 6) **Chan CC, Whitcup SM, Solomon D, Nussenblatt RB** : Interleukin-10 in the vitreous of patients with primary intraocular lymphoma. *Am J Ophthalmol* 120 : 671—673, 1995.
- 7) **Buggage RR, Velez G, Myers-Powell B, Shen DF, Whitcup SM, Chan CC** : Primary intraocular lymphoma with a low interleukin 10 to interleukin 6 ratio and heterogeneous IgH gene rearrangement. *Arch Ophthalmol* 117 : 1239—1242, 1999.
- 8) **Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, et al** : Laser capture microdissection. *Science* 274 : 998—1001, 1996.
- 9) **White VA, Gascoyne RD, Paton KE** : Use of the polymerase chain reaction to detect B-and T-cell gene rearrangements in vitreous specimens from patients with intraocular lymphoma. *Arch Ophthalmol* 117 : 761—765, 1999.
- 10) **Shen DF, Zhuang Z, LeHoang P, Böni R, Zheng S, Nussenblatt RB, et al** : Utility of microdissection and polymerase chain reaction for the detection of immunoglobulin gene rearrangement and translocation in primary intraocular lymphoma. *Ophthalmology* 105 : 1664—1669, 1998.
- 11) **Stewart CJ, Duncan JA, Farquharson M, Richmond J** : Fine needle aspiration cytology diagnosis of malignant lymphoma and reactive lymphoid hyperplasia. *J Clin Pathol* 51 : 197—203, 1998.
- 12) **Nussenblatt RB, Palestine AG, Chan CC, Roberge F** : Standardization of vitreal inflammatory activity in intermediate and posterior uveitis. *Ophthalmology* 92 : 467—471, 1985.
- 13) **Shen DF, Fardeau C, Roberge FG, LeHoang P, Chan CC** : Rearrangement of immunoglobulin gene in metastatic Waldenström macroglobulinemia to the vitreous. *Am J Ophthalmol* 129 : 395—396, 2000.
- 14) **Chan CC, Shen DF, Nussenblatt RB, Boni R, Zhuang Z** : Detection of molecular changes in primary intraocular lymphoma by microdissection and polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol* 7 : 63—64, 1998.
- 15) **Akpek EK, Maca SM, Christen WG, Foster CS** : Elevated vitreous interleukin-10 level is not diagnostic of intraocular-central nervous system lymphoma. *Ophthalmology* 106 : 2291—2295, 1999.
-