

眼科領域原発性悪性リンパ腫の 免疫組織化学的検索 (図8, 表5)

末永 雅之・塩谷 浩・加藤桂一郎 (福島県立医科大学眼科学教室)
若 狭 治 毅 (福島県立医科大学病理学第一教室)

An Immunohistochemical Study of Primary Malignant Lymphomas of Orbital and Adnexal Regions

Masayuki Suenaga, Hiroshi Shioya, Keiichiro Kato

Department of Ophthalmology, Fukushima Medical College

Haruki Wakasa

Department of Pathology, Fukushima Medical College

要 約

眼窩, 結膜に原発した悪性リンパ腫4例について免疫組織化学的検討を行った. 組織型は Lymphoma Study Group 分類に従うとびまん性小細胞型1例, びまん性中細胞型2例, びまん性混合型1例であった. 免疫組織化学的検索には periodate-lysine-paraformaldehyde 固定後の凍結標本を用い, モノクローナル抗体 HLA-DR, B1, B2, B4, BA-1, J5, PCA-1, Leu 4, 免疫グロブリン, Ki-67を使用した免疫染色, ならびにアルカリ性ホスファターゼ染色を行った. 4例は B1, B2, B4, BA-1に陽性でB細胞性リンパ腫と診断した. このうち2例はアルカリ性ホスファターゼ陽性で腫瘍細胞は mantle-zone 由来と考えられ, 他の2例は胚中心細胞由来とみなされた. 4例の腫瘍細胞はいずれもモノクローナル抗体 Ki-67陽性率が低値を示し, 増殖能の低いことを伺わせた. (日眼 92: 1057—1062, 1988)

キーワード: 悪性リンパ腫, 免疫組織化学染色, B細胞性リンパ腫, アルカリ性ホスファターゼ染色, モノクローナル抗体 Ki-67

Abstract

Immunohistochemical studies on 4 cases of primary orbital and conjunctival malignant lymphomas were reported. According to the Lymphoma Study Group classification, diffuse small cell type was found in one case, diffuse medium-sized cell type in 2 cases and diffuse mixed type in one case. Fresh biopsied materials fixed with periodate-lysine-paraformaldehyde solution for immunohistochemical study were used. Staining was performed with different monoclonal antibodies including HLA-DR, B1, B2, B4, BA-1, J5, PCA-1, Leu4, immunoglobulins, Ki-67 and alkaline phosphatase. Positive reactions for B1, B2, B4, BA-1 in 4 cases indicated B-cell origin. A positive reaction for alkaline phosphatase in 2 cases suggested that lymphoma cells might occur from mantle-zone lymphocytes. The other 2 cases were thought to be lymphomas occurring from follicular center cell. A very low positivity for Ki-67 in 4 cases suggested that lymphoma cells in the proliferating phase are extremely sparse in number. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 1057—1062, 1988)

別刷請求先: 960-12 福島市光が丘1 福島県立医科大学眼科学教室 末永 雅之 (昭和63年2月9日受付)

Reprint requests to: Masayuki Suenaga, M.D. Dept. of Ophthalmol., Fukushima Medical College
1 Hikarigaoka, Fukushima 960, Japan

(Accepted for publication February 9, 1988)

Key words: Malignant lymphoma, Immunohistochemical staining, B cell lymphoma, Alkaline phosphatase stain, Monoclonal antibody Ki-67

I 緒 言

近年、リンパ系腫瘍に関する研究はモノクローナル抗体の開発に伴い、その発生部位や分化段階も次第に明らかにされてきている。

前回、我々は眼科領域に原発した悪性リンパ腫11例のパラフィン切片を免疫組織学的に検討し、10例がB細胞性リンパ腫という結果を得た。さらに、この10例は follicular center のB細胞マーカーであるモノクローナル抗体 LN-1に全例陰性、また単クローン性の胞体内免疫グロブリン陽性を示す症例や腫瘍細胞内に形質細胞様の形態を示す症例が多く、細胞学的には post-follicular center cell 由来が多いのではないかと推察した¹⁾。しかし、パラフィン切片は細胞の抗原性保持や使用できるモノクローナル抗体の数・種類が少ないなどの問題点があり、分化段階を決定するうえではさらに詳細な検索を必要とする。今回、我々は periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) 固定後の凍結切片を用いて免疫組織化学的検索を行い、分化段階ならびに増殖能についての検討を加えたので報告する。

II 対象と方法

1. 症例及び臨床的検索

対象は1977年1月から1986年12月までに当科を受診した眼科領域原発の悪性リンパ腫11例のうち PLP 固

定後の凍結標本が採取され、免疫組織化学的検索が可能であった4症例である。この4例は前回の検索¹⁾においてB細胞性リンパ腫と診断された症例であった。診断及び種々の検索には治療前に生検したものを使用した。

臨床所見については入院及び外来カルテにより、年齢・性・発生部位・臨床症状・臨床病期・治療について検討した。また、予後については主として電話連絡または当科最終受診日の病歴記載によって判定した。

2. 病理組織学的検索

光顕的検索として、ホルマリン固定後のパラフィン切片に Hematoxylin and Eosin (HE), Periodic acid Schiff (PAS), Giemsa 及び Methylgreen pyronin (MGP) 染色を行った。病理組織学的診断は Lymphoma Study Group (LSG) 分類²⁾に従った。

3. 免疫組織化学的検索

生検摘出した標本を PLP 固定後、凍結切片を作製し、モノクローナル抗体を使用した4段階 peroxidase-antiperoxidase (PAP) 法による免疫染色を行った。使用したモノクローナル抗体及び方法については表1、2に示した。さらに組織化学的検索として PLP 固定後の凍結切片を用いて、Alkaline phosphatase (ALP) 染色を行った。

表1 使用した単クローン抗体

Monoclonal antibodies	Specificity	Source
HLA-DR	Ia-like antigen	Becton Dickinson
B1 (CD20)	Pan-B cell	Coulter Clone
B2 (CD21)	Subpopulation of B cell	Coulter Clone
B4 (CD19)	Pan-B cell	Coulter Clone
BA-1 (CD24)	Pan-B cell	Hybritech
J5 (CD10)	Common acute lymphoblastic leukemia antigen	Coulter Clone
PCA-1	Plasma cell	Coulter Clone
Leu 4 (CD 3)	Pan-T cell	Becton Dickinson
IgG	IgG heavy chain	Becton Dickinson
A	A heavy chain	Becton Dickinson
M	M heavy chain	Becton Dickinson
D	D heavy chain	Becton Dickinson
κ	κ light chain	Becton Dickinson
λ	λ light chain	Becton Dickinson
Ki-67	Proliferating cell	Dakopatts

表2 4段階 PAP 法

1) Air-dry	
2) Fixed with acetone	room temp. 5min.
3) 1/10 normal swine serum	room temp. 10min.
4) 1/100 monoclonal antibodies	4°C over night
5) 1/200 anti-mouse IgG or IgM rabbit serum	37°C 30min.
6) 1/100 anti-rabbit IgG swine serum	37°C 30min.
7) 1/100 rabbit PAP	37°C 30min.
8) DAB reaction	

III 結 果

1. 臨床的所見（表3）

1) 年齢

年齢は50歳から64歳，平均年齢は57.3歳であった。

2) 性別

男性 3 例，女性 1 例であった。

3) 発生部位

眼窩腫瘍 3 例，結膜腫瘍 1 例であった。

4) 臨床症状

初診時の主症状として眼球突出，腫瘤触知，複視，流涙がみられた。悪性リンパ腫の B 症状(発熱，寝汗，体重減少)を呈した症例はなかった。

5) 臨床病期

治療開始以前の臨床病期は Ann-Arbor 分類に従うと全例 Stage I であった。

6) 治療

症例 1 には腫瘍摘出術，他の症例には放射線療法を施行した。線量は4,000～5,000rad 照射した。

7) 予後

症例 1 は初回治療の 1 年 9 カ月後に局所再発がみられ，2 年 4 カ月後には肺，肝，全身リンパ節への転移性広がりきたし死亡した。他の症例は 1 年 4 カ月～4 年 7 カ月の経過観察期間中，局所再発も他部位への転移もなく生存している。

2. 病理組織学的所見（表3）

4 症例とも non-Hodgkin's lymphoma であった。

症例 1 は小リンパ球大の円形核を有する腫瘍細胞がびまん性に増殖しており，核分裂像はほとんど認められなかった。これら腫瘍細胞の一部に small cleaved cell も散見された。以上より diffuse small cell type と診断した（図1）。

症例 2 は腫瘍細胞が主として中細胞と大細胞の混在よりなり，びまん性増殖を示していた。大細胞の混在の程度は30～50%の範囲内にあり，diffuse mixed type と診断した（図2）。

症例 3 は腫瘍細胞が小リンパ球より大きく，血管内

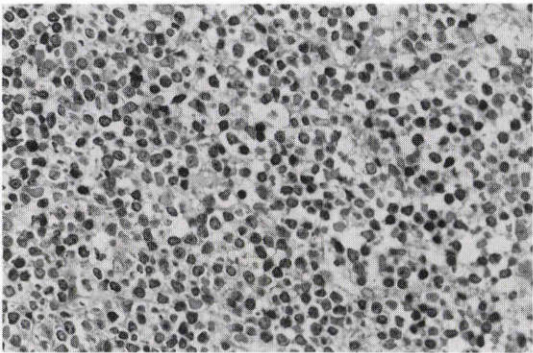


図1 症例1：小リンパ球大の円形核を有する腫瘍細胞からなり，一部はくびれた核を有する。（H・E染色，×540）

表3 症 例

	年齢	性	部位	組織分類 (LSG)	症 状	臨床病期	治 療	予後（観察期間）
症例 1	64	女	左）眼窩	diffuse small	眼球突出，複視	Stage I	腫瘍摘出術	死亡（2 年 4 カ月）
症例 2	50	男	右）眼窩	diffuse mixed	腫瘤触知，流涙	Stage I	放射線療法 (4,000rad)	生存（4 年 7 カ月）
症例 3	54	男	右）眼窩	diffuse medium	眼球突出	Stage I	放射線療法 (4,000rad)	生存（3 年11 カ月）
症例 4	61	男	左）結膜	diffuse medium (intermediate)	腫瘤触知	Stage I	放射線療法 (5,000rad)	生存（1 年 4 カ月）

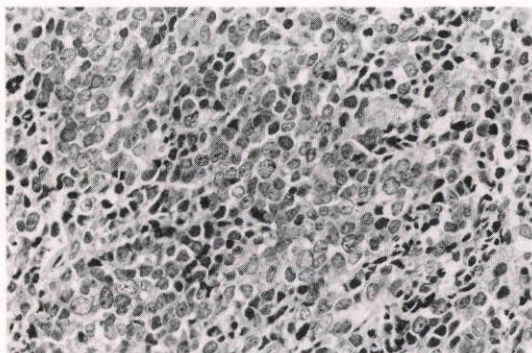


図2 症例2：腫瘍細胞は中細胞と大細胞の混在からなる。(H・E染色, ×540)

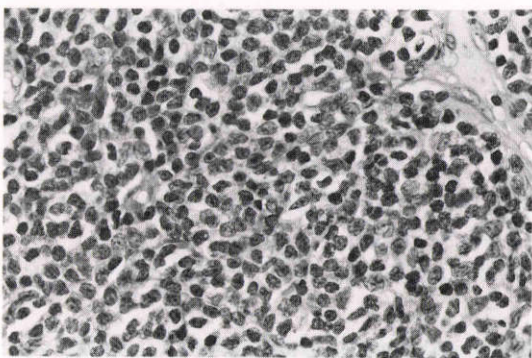


図3 症例3：腫瘍細胞は中細胞の単調な増殖よりなり、くびれた核を有する。(H・E染色, ×540)

皮細胞より小さい核を持つ small cleaved cell の単調な増殖よりなり、diffuse medium-sized cell type と診断した(図3)。

症例4は腫瘍細胞が small cleaved cell と small lymphocyte の混在からなり、両者の中間的性格を有していた。また、腫瘍細胞の一部にPAS陽性の核内封入体を認めた。以上より diffuse medium-sized cell type (intermediate type) と診断した(図4)。

3. 免疫組織化学的所見(表4)

pan-B cell マーカーである B1, B4, BA-1, そして

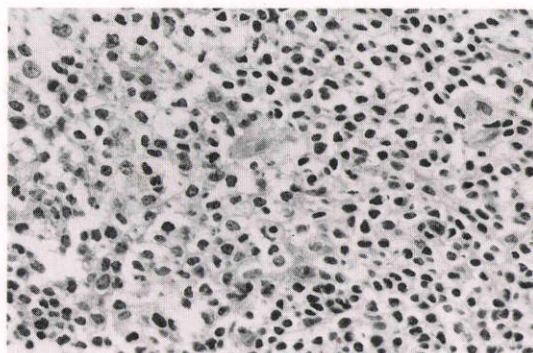


図4 症例4：小リンパ球と中細胞の中間的性格を有する腫瘍細胞からなり、くびれた核を有する。(H・E染色, ×540)

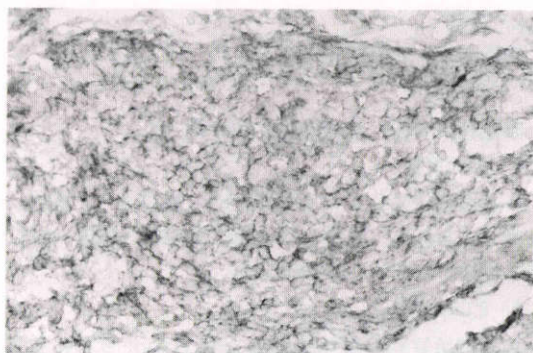


図5 B1陽性細胞。多数の腫瘍細胞が膜表面に陽性像を呈する。(免疫染色, ×340)

B cell の subpopulation を示すマーカーである B2 に全例陽性であった(図5)。しかし、common acute lymphoblastic leukemia antigen マーカーの J5 や plasma cell マーカーの PCA-1 には全例陰性であった。表面免疫グロブリンは全例 monoclonality を示し、症例1が IgM, κ 、症例2, 3, 4が IgM, λ であった(図6)。pan-T マーカーである Leu4 には全例陰性であった。ALP には症例1, 4が陽性を示した(図7)。Ki-67陽性率は症例1から4まで順に6.3%、

表4 免疫組織化学的所見

	病理診断	HLA-DR	B1	B2	B4	BA-1	J5	PCA1	Leu4	SIg	ALP	Ki-67
症例1	diffuse small	+	+	+	+	+	-	-	-	M, κ	+	6.3%
症例2	diffuse mixed	+	+	+	+	+	-	-	-	M, λ	-	4.0%
症例3	diffuse medium	-	+	+	+	+	-	-	-	M, λ	-	3.6%
症例4	diffuse medium (intermediate)	±	+	+	+	+	-	-	-	M, λ	+	4.8%

+: 明らかに陽性, +: 一部に陽性, ±: 少ないが陽性像あり。陽性, 陰性の判定困難, -: 明らかに陰性。

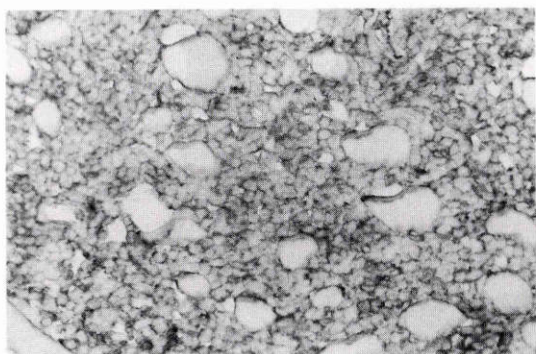


図6 SIgM 陽性細胞. 多数の腫瘍細胞が膜表面に陽性像を呈する。(免疫染色, $\times 340$)

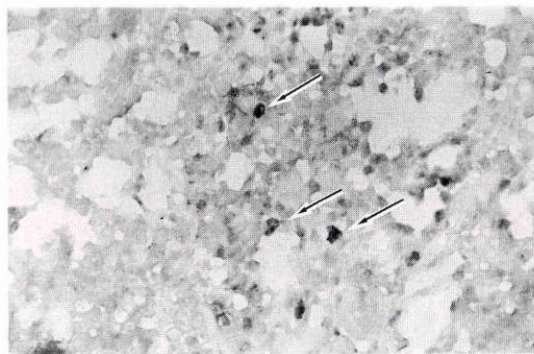


図8 Ki-67陽性細胞(矢印), (免疫染色, $\times 450$)

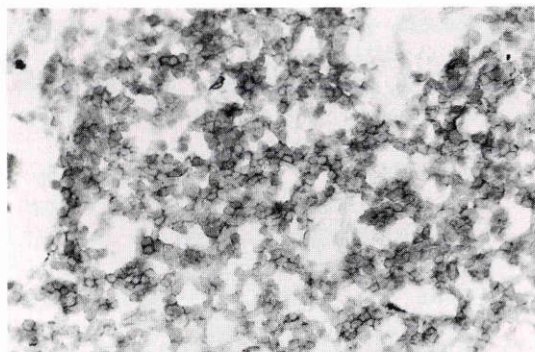


図7 ALP陽性細胞。(免疫染色, $\times 340$)

4.0%, 3.6%, 4.8%であった(図8).

IV 考 按

4 症例とも抗 B 細胞モノクローナル抗体 CD19 (B4), CD20 (B1), CD21 (B2), CD24 (BA-1) 陽性で抗 T 細胞モノクローナル抗体 CD3 (Leu4) 陰性, さらに表面免疫グロブリンが monoclonality を示すことから, 前回の結果と同様に B 細胞性リンパ腫と診断した。

悪性リンパ腫細胞は、一般に母細胞が正常リンパ球の性状を保持しているとの考えに基づき、現在表5³⁾⁻⁶⁾の如くBリンパ腫と正常Bリンパ球の分化とを対比させており、各種のモノクローナル抗体や組織化学染色を組み合わせることによってその性状を明確にすることができる。さらにBリンパ腫は発生部位別

表5 Bリンパ球分化とマーカーの発現³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾

B cell differentiation	Lymphoid stem cell	Pre-B cell	Immature B cell	Mature B cell	Follicular center cell	Immuno-blast	Plasma cell
Differentiation site	Bone marrow		Bursa-equivalent	Mantle	Follicular center	Inter-follicular	Medullary cords
Lymphoma and Leukemia	Non-T, Non-B ALL	Pre-B ALL	B-ALL Burkitt's	D-small B-CLL	Follicular lymphoma D-medium, mixed, large	IBS	Myeloma
CIg SIg		CIg (μ)	SIg (M)	SIg(M+D)	Isotype switch (+G, +E, +A)		Secretory Ig
HLA-DR							
J5							
B1							
B2							
B4							
BA-1							
PCA-1							

に, 1) pre-follicular, 2) follicular および, 3) post-follicular の3者に分けられる⁷⁾.

森⁸⁾は眼窩に発生した小細胞性リンパ腫は形質細胞により近い分化段階にあると推察している. 前回, 我々も眼科領域に原発した悪性リンパ腫を検索し, 細胞学的には post-follicular center cell 由来が多いのではないかと考えた.

今回の免疫染色では4症例のいずれも CD21(B2)陽性, CD10(J5)陰性, PCA-1陰性, SIgM 陽性であった. 以上の結果より, mature B cell~follicular center cell (pre-follicular~follicular) における分化段階をもった腫瘍細胞と考えられる.

Nanba ら⁹⁾, van den Oord ら¹⁰⁾, Wakasa⁷⁾らの報告ではリンパ節の primary follicle や secondary follicle の mantle-zone に ALP 陽性のリンパ球を認め, ALP 陽性を示すリンパ腫はこの領域より発生する mantle-zone lymphoma というひとつの枠付けを有すると述べている. さらに, mantle-zone 領域には SIgM+D のリンパ球がみられ, SIgM が陽性で SIgD か ALP のいずれか一方が陽性であれば mantle-zone lymphocyte 由来と診断しうる⁷⁾. 症例1, 4は SIgM 陽性, ALP 陽性であることから, mantle-zone lymphocyte (pre-follicular) 由来と考えられる. 症例2, 3は SIgD, ALP いずれも陰性であり, また diffuse mixed, diffuse medium-sized cell type という腫瘍細胞の形態上, follicular center cell (follicular) 由来と考えられる. PLP 固定後の凍結標本が採取されなかった他の7例については, 現在のところ詳細な検索はできないがこれらの症例の中には前回行った検索において腫瘍細胞が形質細胞様の形態を示す lymphoplasmacytoid type で胞体内免疫グロブリンが monoclonality を示すものもみられた¹⁾. これを post-follicular 由来と考え, 今回の結果と合わせると眼科領域原発の悪性リンパ腫は pre-follicular, follicular, post-follicular のどの領域からも発生する可能性があるといえる.

また, 今回検索したモノクローナル抗体 Ki-67は proliferating cell に特異性を示す抗体であり, 症例1から順に6.3%, 4.0%, 3.6%, 4.8%の陽性率を示した. Gerdes ら¹¹⁾は non-Hodgkin's lymphoma の low-

grade と high-grade の Ki-67陽性率を検索し, 両者を区別するうえで Ki-67陽性率27%をパラメーターにできると報告した. 4症例の Ki-67陽性率はいずれもこの値より低値を示し, 増殖能の低い腫瘍細胞であった. これは4症例の治療開始以前における臨床病期が Stage I で他臓器への浸潤がみられないこと, また症例1以外は再発, 転移もなく生存しており, 眼科領域原発性悪性リンパ腫が治療に奏効し, 予後が良いことと関連すると考えられる.

文 献

- 1) 末永雅之, 塩谷 浩, 相葉正夫他: 眼科領域に原発した悪性リンパ腫の臨床病理学的検討. 眼紀 投稿中.
- 2) 小島 瑞, 飯島宗一, 花岡正男他: 新分類による悪性リンパ腫アトラス. 東京, 文光堂, 51—77, 1981.
- 3) 清水史郎, 紺田 進: B cell malignancy. 日本臨牀 41: 2548—2554, 1983.
- 4) 藤本 望, 小柴博文, 菊地浩吉: リンパ球分化抗原による non-Hodgkin リンパ腫の分類. 日本臨牀 41: 2511—2524, 1983.
- 5) 馬止 裕, 内山 卓: モノクローナル抗体を用いたヒトリンパ球表面抗原の解析—正常および病的状態における意義—. 臨床免疫 16: 846—857, 1984.
- 6) Foon KA, Todd RF: Immunologic classification of leukemia and lymphoma. Blood 68: 1—31, 1986.
- 7) Wakasa H: Malignant lymphomas and related disorders —A pathological study—. Acta Haematol Jpn 49: 1475—1490, 1986.
- 8) 森 茂郎: 非ホジキンリンパ腫の免疫学的組織分類. Medical Immunology 12: 357—362, 1986.
- 9) Nanba K, Jaffe ES, Braylan RC, et al: Alkaline phosphatase-positive malignant lymphoma: A subtype of B-cell lymphomas. Am J Clin Pathol 68: 535—542, 1977.
- 10) van den Oord JJ, de Wolf-Peeters C, Desmet VJ: The marginal zone in the human reactive lymph node. Am J Clin Pathol 86: 475—479, 1986.
- 11) Gerdes J, Dallenbach F, Lennert K, et al: Growth fractions in malignant non-Hodgkin's lymphomas (NHL) as determined in situ with the monoclonal antibody Ki-67. Hematol Oncol 2: 365—371, 1984.