

遺伝子再構成の検索による結膜悪性リンパ腫の診断

鈴木 純¹⁾, 五十嵐保男¹⁾, 中川 喬¹⁾, 佐藤 昌明²⁾, 高橋 稔³⁾

茂木 良弘³⁾, 佐藤 俊哉⁴⁾, 小野寺一史⁴⁾, 今 信一郎⁴⁾

札幌医科大学眼科学教室¹⁾, 札幌医科大学病院病理部²⁾

札幌医科大学第4内科学教室³⁾, 同 第1病理学教室⁴⁾

要 約

最近の分子病理学の進歩によりリンパ増殖性疾患の診断に形態学, 免疫組織学的方法に加えて免疫グロブリン (Ig) 遺伝子, T細胞受容体 (TCR) 遺伝子の DNA プローブをもちいた診断が用いられている. 我々は結膜リンパ性腫瘍の2症例にこの方法をもちいた診断を行った. 症例1は36歳男性で, 1年前から左結膜腫瘍に気づき, 初回の生検ではびまん性の小リンパ球の増生をみたが免疫組織学的には monoclonality はみられなかった. その後右結膜にも腫瘍が出現したため, 左結膜を再度生検した. これで Ig 重鎖の遺伝子再構成が検出された. 症例2は53歳女性で両眼の結膜腫瘍で, 初回の生検では偽リンパ腫の診断がされていたが, 腫瘍が増大し, 再び生検を行った. 免疫組織学的に monoclonality は証明されなかったが, 凍結組織にて Ig 重鎖の遺伝子再構成が検出された. これから2症例をB細胞悪性リンパ腫と診断した. (日眼会誌 96:1142-1147, 1992)

キーワード: 結膜リンパ性腫瘍, 悪性リンパ腫, 免疫グロブリン遺伝子, 遺伝子再構成, サザンブロッティング

Gene Rearrangement Analysis of Conjunctival Malignant Lymphomas

Jun-Ichi Suzuki¹⁾, Yasuo Igarashi¹⁾, Takashi Nakagawa¹⁾,
Masaaki Satoh²⁾, Minoru Takahashi³⁾, Yoshihiro Mogi³⁾,
Toshiya Satoh⁴⁾, Kazufumi Onodera⁴⁾ and Shin-Ichiro Kon⁴⁾,

¹⁾Department of Ophthalmology, Sapporo Medical College

²⁾Division of Pathology, Sapporo Medical College Hospital

³⁾Department of Internal Medicine, Sapporo Medical College

⁴⁾Department of Pathology, Sapporo Medical College

Abstract

Specific DNA probes for genes encoding immunoglobulins (Ig) and the T cell receptor (TCR) are useful diagnostic tools in lymphoproliferative disorders. Gene rearrangement analysis was carried out in 2 cases of conjunctival lymphoid lesions. A 36-year-old man (case 1) had a 1-year history of left conjunctival tumor. A biopsy was performed and histopathological findings showed diffuse proliferation of small lymphocytes, but monoclonality was not revealed by immunophenotypic analysis. A right conjunctival lesion developed and five months later a biopsy of the left conjunctiva was performed again. A frozen sample was analyzed and immunoglobulin heavy chain gene rearrangement was

別刷請求先: 060 札幌市中央区南1条西16丁目 札幌医科大学眼科学教室 鈴木 純一
(平成4年3月9日受付, 平成4年4月9日改訂受理)

Reprint requests to: Jun-Ichi Suzuki, M.D. Department of Ophthalmology, Sapporo Medical College,
S-1, W-16, Chuo-ku, Sapporo 060, Japan

(Received March 9, 1992 and accepted in revised form April 9, 1992)

found. A 53-year-old woman (case 2) had a 6-month history of bilateral conjunctival tumor. The first biopsy did not reveal monoclonality immunophenotypically. A second biopsy with a frozen specimen was analyzed and immunoglobulin heavy chain gene rearrangement was found. We diagnosed these two cases as B-cell lymphoma. We discuss the clinical value of gene rearrangement analysis as a diagnostic method for lymphoproliferative disorders. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96 : 1142-1147, 1992)

Key words: Conjunctival lymphoid tumor, Malignant lymphoma, Immunoglobulin gene, Gene rearrangement, Southern blotting

I 緒 言

眼科領域のリンパ増殖性疾患の分類は Knowles and Jacobiec¹⁾²⁾によると reactive lymphoid hyperplasia (pseudolymphoma, 偽リンパ腫), atypical lymphoid hyperplasia, plasmacytoma, malignant lymphoma に分けられる。さらに malignant lymphoma は形態学的に LSG 分類³⁾あるいは working formulation 分類⁴⁾で分類されることが多く、これにリンパ球の単クローン抗体の使用による T リンパ球 (T 細胞), B リンパ球 (B 細胞) の細胞系列や細胞の分化, 成熟段階を決定して良性あるいは反応性 (多クローン性) か腫瘍性 (単クローン性) の診断が行われている^{5)~10)}。しかしながらこれらの方法を用いても明確な診断が困難な症例が存在するといわれている⁹⁾¹⁰⁾。最近の分子病理学の発展により, 免疫グロブリン (Ig) 遺伝子の再構成の検出は B 細胞への分化が決定された細胞の同定を可能にし, また T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子の再構成は T 細胞への分化が決定された細胞の同定を可能にし, これをリンパ性腫瘍, 白血病に応用することによって, 細胞の特異的な抗原を発現していない症例における細胞系列の決定とその細胞の単クローン性増殖の証明が可能となってきた^{10)~13)}。今回我々は結膜悪性リンパ腫を疑った症例および初回に偽リンパ腫と診断されさらに再発してきた症例に対して Ig, TCR の遺伝子再構成の検索を行い, 2 症例ともに Ig 遺伝子の再構成が検出され, B 細胞悪性リンパ腫の診断となった症例を経験したので, 報告する。

II 方 法

1. 免疫組織化学

試験切除された組織はホルマリン固定, パラフィン包埋し, hematoxylin-eosin 染色で組織像を検討した。また細胞表面抗原の検出にはパラフィン切片で染色可

能な単クローン抗体 L-26 (B 細胞), UCHL-1 (T 細胞) を用いて酵素抗体法で検索した。二次抗体として biotinyl horse anti-mouse Ig を反応させ, さらに avidin-biotin-peroxidase complex を反応させた。その後, ペルオキシダーゼ反応基質液 (0.01% H₂O₂ 加 3, 3'-diamino-benzidine 液, pH 7.6) 中で発色させた。

2. Ig, TCR 遺伝子解析 (サザンプロット法)¹⁴⁾

1) DNA 抽出法: 液体窒素で凍結し, それを粉末状に破砕した組織を 10 倍量の lysis buffer (1% N-lauryl-sarcosine, 10 mM EDTA, 100 mM Tris-Cl (8.0), 200 mM NaCl, 400 mM Urea) に溶解した。これに RNase を 60 μ g/ml 加え, 55°C で 1 時間半反応させ, さらに proteinase K を 120 μ g/ml 加え 55°C で 3~5 時間反応させた。続いてこの溶液を等量のフェノール, フェノール/クロロフォルム, クロロフォルムで二回ずつ抽出し, 夾雑物を除去した。この DNA 溶液に 1/10 量の 3 M sodium acetate と 2.5 倍量の冷エタノールを加えて析出, 遠心後 70% エタノールで洗浄, 乾燥させ, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0 (TE) にて溶解し, DNA 濃度がほぼ 500~1,000 μ g/ml とするように調整した。

2) 使用した probe および制限酵素による消化: 使用した probe は Ig 重鎖には J_H¹²⁾, TCR β 鎖には Jur β ¹⁵⁾ を使用した。10 μ g の試料 DNA を制限酵素 60 unit を用い 37°C, 12 時間消化した。使用した制限酵素は BamHI, EcoRI, Hind III の 3 種類であった。

3) 制限酵素で消化した DNA は 0.7% アガロースゲルにおいて 50 V, 15 時間泳動し, 0.4 N NaOH により Nylon membrane (Pall Biosupport[®]) にトランスファーした。membrane は salmon sperm DNA と 50% formamide を含む pre-hybridization solution と 42°C, 24 時間反応後, random hexamer 法により ³²P-dCTP で標識されたプローブを加え反応させた。42°C, 24 時間反応後洗浄し, プローブが反応した特異的なバンドを Kodak X-AR[®] フィルムによるオート

ラジオグラフィーにて検出した。露出時間は24～72時間であった。

III 症例および結果

症例1：36歳男性で左眼瞼の腫瘍のため1990年12月22日に近医を受診した。左眼球結膜に囊腫状の腫瘍がみられ、ステロイド剤の点眼で経過をみていたが、やがて腫瘍は充実性でやや赤味を帯びてきたため、その一部を1991年2月12日に切除した。組織学的には異型に乏しい小型リンパ球の比較的単調で密な増殖よりなり、濾胞形成は認めなかった(図1)。免疫組織学的には、L26、UCHL-1はともに陽性で、L26陽性細胞が圧倒的に優性で(図2a, 2b)、悪性リンパ腫が疑われたが、標本が小さかったため確診には至らなかった。その後当科に紹介され、経過観察を行うことになった。ところが、7月になって右眼上眼瞼眼蓋部にも左眼と同様の腫瘍が出現してきたため、再度左眼の腫瘍の切除を行った。その組織の一部を凍結し、遺伝子検索を行った。その結果、図3のようにJ_H probeでIg遺

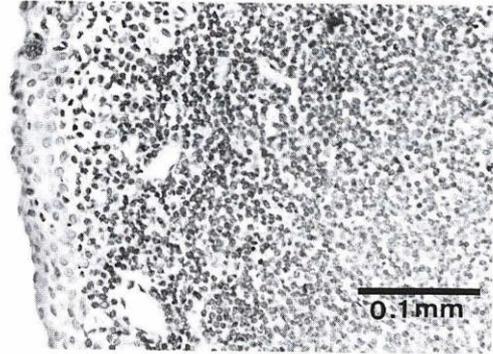


図1 症例1の組織像 (hematoxylin-eosin 染色)。小リンパ球の密な増殖からなり、濾胞形成は認められない(×160)。

伝子の再構成 band が検出され、Jur β₂ probe では再構成 band が検出されず、びまん性 B 細胞リンパ腫、小細胞型 (LSG³⁾) と診断された。経過中、当院内科を受診したが、全身リンパ節は触知されず、超音波、MRI 検査にて異常は認められなかった。

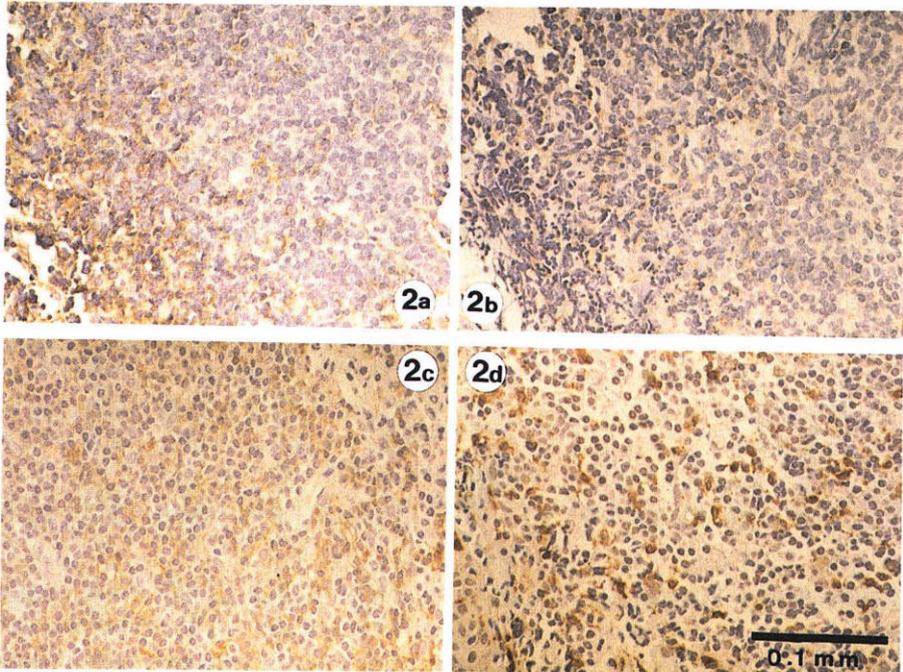


図2 L-26, UCHL-1 による免疫染色。

症例1：L-26 陽性細胞 (2a) が UCHL-1 陽性細胞 (2b) の数に比べて圧倒的に多くみられる。(×180)

症例2：L-26 陽性細胞がびまん性にみられる (2c) が、UCHL-1 陽性細胞も多くみられ (2d)、単クローン性はみられない (×180)。

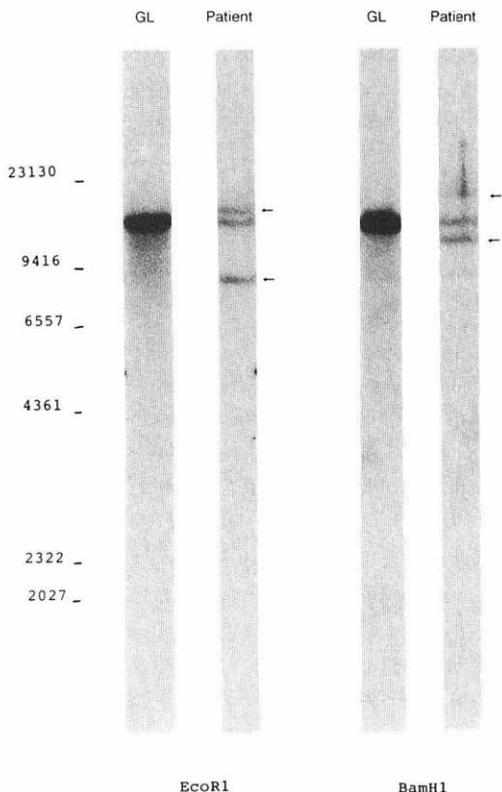


図 3 症例 1 のサザンブロッティング。
EcoRI, BamHI による probe JH の消化で再構成 band (矢印) が認められる。



図 4 症例 2 の初診時の結膜腫瘍の写真。

症例 2 : 53 歳女性。1990 年 10 月右下眼球結膜に腫瘍を認め、近医での生検の結果は偽リンパ腫の診断であった。その後腫瘍が徐々に拡大してきたため、1991 年 4 月に当科を紹介され、精密検査のため入院した。入院時、図 4 のように右下円蓋部から上耳側にかけて

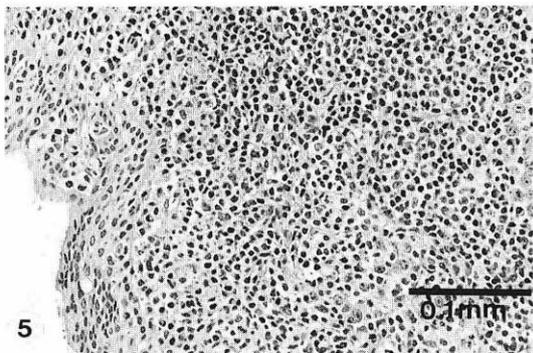


図 5 症例 2 の組織像 (hematoxylin-eosin 染色)。核に異型性を持つ小リンパ球の増生を認め、一部胚中心様の構造もみられた (×160)。

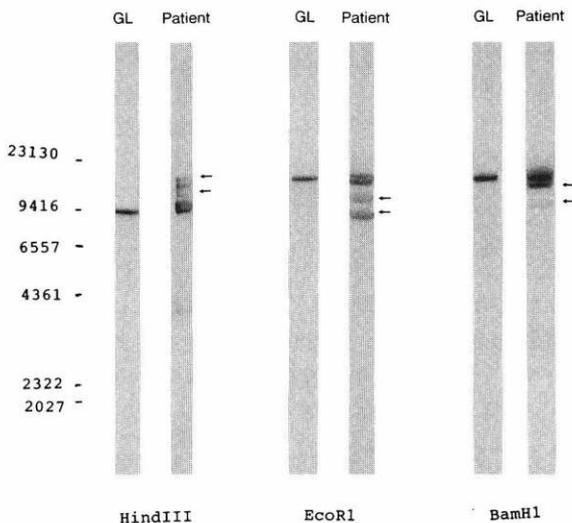


図 6 症例 2 のサザンブロッティング。
EcoRI, BamHI, Hind III による probe JH の消化で再構成 band (矢印) が認められる。

結膜下にやや赤味を帯びた腫瘍がみられ、さらに左眼の下円蓋部にも灰白色の腫瘍をみとめた。全身的には鉄欠乏性貧血、高血圧で治療中のほかには内視鏡、CT、MRI、腫瘍マーカーなどはともに正常であった。そこで再度試験切除を行った。結膜上皮下に小リンパ球の強い増生を認め、核は軽い異型性を示していたが、胚中心の形成もみられ、一部には形質細胞や好中球も認めた (図 5)。さらに免疫組織学的には L26 80%、UCHL-1 20% 程度で単クローン性は証明されなかった (図 2 c, 2 d)。ところが遺伝子検索の結果、JH probe で再構成 band が認められ (図 6)、Jurβ 2 probe では

これが検出されず、本症例はびまん性 B 細胞悪性リンパ腫、小細胞型 (LSG³⁾) と診断された。

IV 考 按

眼科領域のリンパ性腫瘍はいわゆる節外性リンパ性腫瘍の範疇にはいる²¹⁶⁾。節外性リンパ性腫瘍はびまん性の非ホジキンリンパ腫が多く、それぞれの臓器の機能と関連したリンパ系細胞の増殖がみられる¹⁶⁾。一方、節外臓器にはリンパ腫とみなされない境界領域的なリンパ増殖性疾患 (pseudolymphoma, pseudotumor, reactive lymphoreticular hyperplasia) が多く発生する¹⁶⁾。眼窩、結膜の悪性リンパ腫ではほとんどが B 細胞であり⁵⁾⁶⁾、また、眼窩にはリンパ節がないためここに生じる腫瘍には悪性リンパ腫が多いのに対して結膜には濾胞を形成するリンパ装置が結膜固有層に存在するため反応性リンパ増殖が生じやすい傾向があるといわれ²⁾、眼科領域のリンパ増殖性疾患で上述した境界領域のリンパ増殖性病変と診断される症例が 10 数%から 30% を越える報告もある¹¹⁾⁷⁾。

最近の分子病理学の発展により白血病、リンパ性腫瘍にたいして遺伝子解析が行われている^{9)~13)}。特異的な抗原認識は B 細胞では表面 Ig, T 細胞では TCR が抗原と結合することで行われるが、さまざまな抗原に対する Ig, TCR の多様性はこれらの可変部をコードする遺伝子が無作為に再構成されることによって形成され、一度再構成された遺伝子は固定され、遺伝子産物を産生するために使用される¹⁸⁾。遺伝子の再構成が起こると遺伝子の大きさが変化し、検索した組織が単一な (単クローン) リンパ球によって構成されていればサザンブロット法では胚細胞型遺伝子 (germ line) とは異なった band で出現する。この方法では単一な遺伝子をもつ細胞が 1~2.5% 存在していればこのような再構成 band が得られるとされる¹²⁾。しかしながらこの遺伝子再構成の検索は決して悪性細胞を検索しているわけではなく、そこにある細胞集団の単クローン性を見ていることになるが、大量の単クローン細胞の増殖は一般に悪性腫瘍に認められるために、たとえば Ig 遺伝子の再構成 band が検索された時にはこのリンパ性腫瘍は B 細胞悪性リンパ腫と診断することができる。この方法を用いた白血病、悪性リンパ腫の診断、細胞起源決定については多くの報告がある^{9)~13)} が眼科領域のリンパ性腫瘍での報告は少なく、眼窩、眼瞼については McNally ら¹⁹⁾ が 3 例で、Neri ら²⁰⁾ が

18 例の報告をしているのみであり、しかも本報告のような結膜病変の報告はみられない。

今回、結膜におけるリンパ増殖性疾患の 2 例に対してこの方法を用いたところ、形態学的に悪性リンパ腫の疑われた症例 1 で再構成 band がみられ、また形態学的ならびに免疫組織学的に明らかな単クローン性の増殖を証明できなかった症例 2 においても、Ig 遺伝子の再構成 band が検出された。このことから 2 症例ともに B リンパ球の単クローン性の増殖を含むことが示され、これらを B 細胞悪性リンパ腫と診断した。

臨床経過をみると偽リンパ腫では悪性リンパ腫と比べて経過は良好である²¹⁾²²⁾が、なかには Knowles ら¹⁾はその 15% に転移をみ、Jakobiec ら¹⁷⁾は 29% に nonocular lymphoma の発生をみ、また 5 年死亡率が 6% であった²¹⁾報告もある。本邦では古谷ら²³⁾は初回の組織学的検査で反応性リンパ増殖 (偽リンパ腫) と診断された眼瞼腫瘍で、のちの検索で B 細胞リンパ腫であった 1 例を報告し、また小坂ら²⁴⁾は両眼の結膜腫瘍で初回の検索では悪性リンパ腫とは診断できず、3 年後の再発した組織で悪性リンパ腫と診断した症例を報告し、眼科領域のリンパ性疾患の診断の困難さ、経過の多様性を述べている。このような臨床経過をたどる偽リンパ腫と悪性リンパ腫の関係について Jakobiec ら¹⁷⁾は免疫組織学的に多クローン性を示して Ig 遺伝子の再構成のみられる偽リンパ腫について、polyclonal なリンパ球の増殖が先だって存在し (lymphoid hyperplasia)、これが monoclonal な増殖に transformation をおこす (localized lymphoma) ことで腫瘍がさらに進展する (disseminated lymphoma) というリンパ系腫瘍の進展 (tumor progression) のモデルを述べている。このような意味でも眼科領域でもリンパ性疾患の遺伝子レベルでの clonality の検索を行うことは重要であり、今後もこの検討を進めるとともに、症例の経過を十分に観察して免疫学的、分子病理学的なレベルでの診断と臨床経過の関連をさらに注意深くみつめる必要がある¹⁷⁾²⁰⁾と思われた。

文 献

- 1) Knowles DM, Jakobiec FA: Orbital lymphoid neoplasia. A clinicopathological study of 60 patients. *Cancer* 46: 576-589, 1980.
- 2) Jakobiec FA, Font RL: Orbit. Lymphoid tumor, in Spencer WH (ed): *Ophthalmic Pathology An Atlas and Textbook* (3rd ed), Philadelphia, WB Saunders, 2663-2711, 1986.

- 3) 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, 51-71, 1981.
- 4) **The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project**: National cancer institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphoma: Summary and description of a working formulation for clinical usage. *Cancer* 49: 2112-2135, 1982.
- 5) 末永雅之, 塩谷 浩, 加藤桂一郎, 他: 眼科領域原発性悪性リンパ腫の免疫組織化学的検索. *日眼会誌* 92: 1057-1062, 1988.
- 6) 末永雅之: 眼窩・結膜原発性悪性リンパ腫の臨床病理学のおよび免疫組織化学的研究. *眼紀* 42: 1330-1339, 1991.
- 7) 石井良文, 山口 晃, 小海康夫, 他: モノクローナル抗体による白血病・リンパ腫の分類. *Medical Technology* 14: 108-117, 1986.
- 8) **Knowles DM II, Jakobiec FA, Halper JP**: Immunologic characterization of ocular adnexal lymphoid neoplasms. *Am J Ophthalmol* 87: 603-619, 1979.
- 9) 小野寺一史, 今信一郎: 悪性リンパ腫およびリンパ性白血病の遺伝子解析による診断. *札幌医誌* 60: 445-457, 1991.
- 10) **Kamat D, Laszewski MJ, Kemp JD, et al**: The diagnostic utility of immunophenotyping and immunogenotyping in the pathologic evaluation of lymphoid proliferations. *Modern Pathology* 3: 105-112, 1990.
- 11) **Cossman J, Zehnauer B, Garrett CT, et al**: Gene rearrangements in the diagnosis of lymphoma/leukemia. Guidelines for use based on a multiinstitutional study. *Am J Clin Pathol* 95: 347-354, 1991.
- 12) **Cleary ML, Chao J, Warnke R, et al**: Immunoglobulin gene rearrangement as a diagnostic criterion of B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 593-597, 1984.
- 13) **Papadopoulos KP, Bagg A, Bezwoda WR, et al**: The routine diagnostic utility of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangement in lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol* 91: 633-638, 1989.
- 14) **Southern FM**: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517, 1975.
- 15) **Yanagi Y, Yoshiaki Y, Leggett K, et al**: A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains. *Nature* 308: 145-149, 1984.
- 16) 須知泰山, 本告 匡, 長谷川かをり, 他: 節外性リンパ腫の病理学的特徴. *病理と臨床* 4: 475-479, 1986.
- 17) **Jakobiec FA, Neri A, Knowles DM II**: Genotypic monoclonality in immunophenotypically polyclonal orbital lymphoid tumors. A model of tumor progression in the lymphoid system. *Ophthalmology* 94: 980-994, 1987.
- 18) 北 堅吉, 三輪啓志, 白川 茂: DNA 診断. 末舛恵一, 下山正徳 編: 図説臨床癌シリーズ No 17, 白血病・リンパ腫. 東京, メジカルビュー, 110-115, 1987.
- 19) **McNally L, Jakobiec FA, Knowles DM II**: Clinical, morphologic, immunophenotypic, and molecular genetic analysis of bilateral ocular adnexal lymphoid neoplasms in 17 patients. *Am J Ophthalmol* 103: 555-568, 1987.
- 20) **Neri A, Jakobiec FA, Pelicci PG, et al**: Immunoglobulin and T cell receptor β chain gene rearrangement analysis of ocular adnexal lymphoid neoplasms: Clinical and biologic implications. *Blood* 70: 1519-1529, 1987.
- 21) **Jakobiec FA, McLean I, Font R**: Clinicopathologic characteristics of orbital lymphoid hyperplasia. *Ophthalmology* 86: 948-966, 1979.
- 22) **Kelly AG, Rosas-Uribe A, Kraus ST**: Orbital lymphoma and pseudolymphoma: A clinicopathologic study of eleven cases. *Am J Clin Pathol* 68: 377-386, 1977.
- 23) 古谷和正, 難波克彦: 両側上下眼瞼に発生した IgM 単クローン性悪性リンパ腫. *眼紀* 39: 2372-2379, 1988.
- 24) 小坂敏哉, 藤武俊治, 林 雄三, 他: 結膜悪性リンパ腫の1例. *あたらしい眼科* 7: 721-724, 1990.