

# 濾胞性リンパ腫における Fluorescence in situ hybridization の有用性の検討

黒山 祥文 大棟 久美江 川口 貴子  
大畑 雅彦 藤田 浩之<sup>1)</sup>

静岡赤十字病院 検査部

1) 同 内科

**要旨：**濾胞性リンパ腫 (FL) における IgH/bcl-2 の FISH をリンパ節および骨髄で検討した。対象はリンパ節生検で FL と診断された 6 例および FCM 分析で CD 10 が陽性を示した 2 例の計 8 例、骨髄は FL と診断された 8 例 14 検体を用いた。リンパ節で t(14; 18) (q 32; q 21) が認められる症例では、FISH でも高率に陽性を示したが、1 例は陰性であった。FCM との関係では、B 細胞の中の CD 10 の比率が高値で、CD 23 が低値の症例は IgH/bcl-2 陽性の可能性が示唆されたが、症例数が少なく今後の更なる検討が必要と考えられた。さらに、Light chain が発現しない 3 症例は、IgH/bcl-2 陽性であり、FISH 法の重要性が認識できた。骨髄の悪性リンパ腫細胞の比率と IgH/bcl-2 陽性率は、ほぼ一致した結果であった。骨髄への浸潤の有無に FISH 法は、重要な検査項目の一つになりえると思われた。

**Key words :** Fluorescence in situ hybridization, 濾胞性リンパ腫, 染色体, IgH/bcl-2

## I. はじめに

悪性リンパ腫の分類として新たに提唱された新 World Health Organization (WHO) 分類<sup>1)</sup>は、発生分化および分子生物学的観点から分類されている。この背景には、従来の病理形態学のみでは分類不能であったものが、免疫学的検索法、染色体検査法、遺伝子解析法の進歩により、独立疾患として認識できるようになったことがある。濾胞性リンパ腫 (follicular lymphoma; FL) の特徴として、細胞表面形質では CD 10 が陽性であること、染色体異常として t(14; 18) (q 32; q 21) がみられることである。特に、t(14; 18) (q 32; q 21) はアポトーシス抑制遺伝子の BCL-2 (18 q 21) と免疫グロブリン重鎖 (14 q 32) の相互転座であることがわかっており、70~95%の症例で認められる<sup>2)</sup>。しかし、染色体検査の核型解析では、常に分裂中期細胞が得られるとは限らず、すべての症例に異常を見つけることは困難である。一方、Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法は間期核でも検査可能で、病型特異的染色体異常を認める造血器腫瘍の診断、治療後の評価

などに有用とされている<sup>3)</sup>。

今回は、t(14; 18) (q 32; q 21) を認識する FISH プローブを用いて、FL と診断された症例のリンパ節および骨髄での検討を行い、その有用性について検討した。

## II. 対象・方法

2004 年 6 月~2005 年 10 月までを対象期間とし、リンパ節生検は FL と診断された 6 例および FCM 分析で CD 10 が陽性を示した 2 例 (diffuse small B cell lymphoma, diffuse large B cell lymphoma) の計 8 例を対象とした。骨髄穿刺は FL と診断された 8 例 14 検体を対象とした。また、陰性コントロールとして、リンパ節炎 3 例、特発性血小板減少性紫斑病 2 例の 5 例を用いた。

今回の検討で使用したプローブは、LSI IGH/BCL 2 Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe (VYSIS 社) を用いた。FISH 染色方法は表 1 に示し、カルノア固定標本および May-Giemsa (MG) -FISH 標本の作製は表 2 に示す手順で行った。

表1 FISH染色方法

- (1) ハイブリダイゼーション  
75°Cのヒートブロックに標本2分間置き、プローブを5µlを滴下
- (2) カバーガラス(18×18mm)をのせ、ペーパーボンドでシール
- (3) 湿潤箱にいれ、遮光下37°C 4~16時間インキュベーション
- (4) 洗浄  
シールを取り除き、2×SCCに5分間  
75°Cの0.4%×SCC / 0.3% NP-40で2分間  
75°Cの2×SCC / 0.1% NP-40で30秒  
2×SCCに10分以上
- (5) 封入  
5µlの対比染色液DAPI IIを滴下、カバーガラスをかけ  
透明マニキュアでシール
- (6) 落射型蛍光顕微鏡(OLYMPUS BX52)にて検鏡

<プローブ調整>  
 プローブミックス  
 プローブ 0.5µl, Hybridization bufer 4.5µl,  
 をマイクロチューブ内に分注し混和

表2 カルノア標本およびMG-FISH標本作製方法

1. カルノア標本作製方法
  - (1) 抹消血液(骨髄液)を30mlのPBSにて1500rpm, 5分間洗浄し上清除去
  - (2) 0.75mmol KClを30ml加え、室温にて30分間静置
  - (3) カルノア固定液(メタノール:酢酸=3:1)を2ml重層し、静かに混和
  - (4) さらにカルノア固定液10ml重層し静かに混和
  - (5) さらにカルノア固定液20ml重層し静かに混和
  - (6) 1500rpm, 5分間洗浄し上清除去
  - (7) カルノア固定液を10ml重層し、静かに混和
  - (8) 1500rpm, 5分間洗浄し上清除去
  - (9) (7)と(8)の操作を4~5回繰り返す
  - (10) カルノア固定液で細胞浮遊液調整
- (11) 展開  
カルノア固定液に浸したスライドガラスに1滴落とし67°Cで10分間静置
- (12) 冷風乾燥
2. MG-FISH標本作製
  - (1) May-Giemsa塗抹標本を70%エタノールで脱色・冷風乾燥
  - (2) 0.75mmol KClを重層し、室温にて20分間
  - (3) カルノア固定液をそのまま混和し5分間
  - (4) スライドガラス上の液を捨て、カルノア固定液を重層し5分間
  - (5) 冷風乾燥
  - (6) ペプシン処理(37°C)  
ペプシン溶液: 10%ペプシン溶液 25µl, 蒸留水 49.5ml, 1NHCl 500µl
  - (7) PBSにて5分間, 2回洗浄
  - (8) 脱水(70%, 85%, 100%エタノールを各1分)・冷風乾燥

表3 各症例のIgH/bcl 2 と染色体および病理診断の関係

No	IgH/bcl2陽性率(%)	染色体	病理診断
1	86.2(431/500)	正常核型	FL, grade1~2
2*	0( 0/500)	+18,add(22)(q11)	FL, grade3
3**	0( 0/500)	t(18;22)(q21;q11)	diffuse small B cell lymphoma
4***	0( 0/500)	t(14;18)(q32;q21)	DLBCL
5	41.6(208/500)	t(14;18)(q32;q21)	FL, grade1
6	0( 0/500)	増殖不良	FL, grade1
7	58.0(290/500)	t(14;18)(q32;q21)	FL, grade1~2
8	79.5(159/200)	t(14;18)(q32;q21)	FL, grade1
* : SpectrumOrangeが3コの比率 14.8%(74/500)			FL, follicular lymphoma
** : SpectrumOrangeが3~5コの比率 77.0%(385/500)			DLBCL, diffuse large B cell lymphoma
*** : SpectrumGreenが3コの比率 38.0%(190/500)			

分析細胞数は、リンパ節および骨髄とも単核球500細胞を分析したが、細胞が少ない検体に関しては認められる細胞数で行った。IgH/bcl-2の陽性パターンを図1-a、陰性パターンを図1-bに示す。陽性細胞は、Fusion signal (yellow)が2コ、SpectrumGreen signalが1コ、SpectrumOrange signalが1コ認められ、陰性細胞は、SpectrumGreen signalが2コ、SpectrumOrange signalが2コ認められる。

Flow cytometer (FCM) での表面形質の検索は、COULTER EPICS XLを用いCD45 gating法にて

分析を行った。特に、CD10、CD19、CD20、CD22、κ鎖、λ鎖の発現とIgH/bcl-2陽性率とを対比した。骨髄中のmalignant lymphoma (ML) 細胞の比率は、骨髄塗抹標本をMG染色後500細胞カウントして求めた。

### III. 結 果

1. リンパ節生検におけるIgH/bcl-2と染色体、および病理診断との関連(表3)  
今回比較対照として用いた、陰性コントロールの

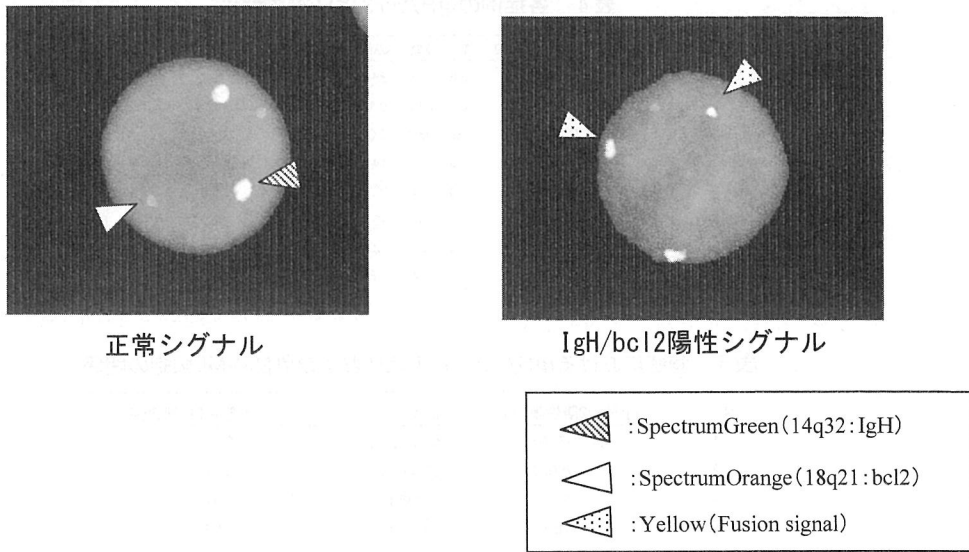


図1 IgH/bcl2における正常シグナルと陽性シグナル

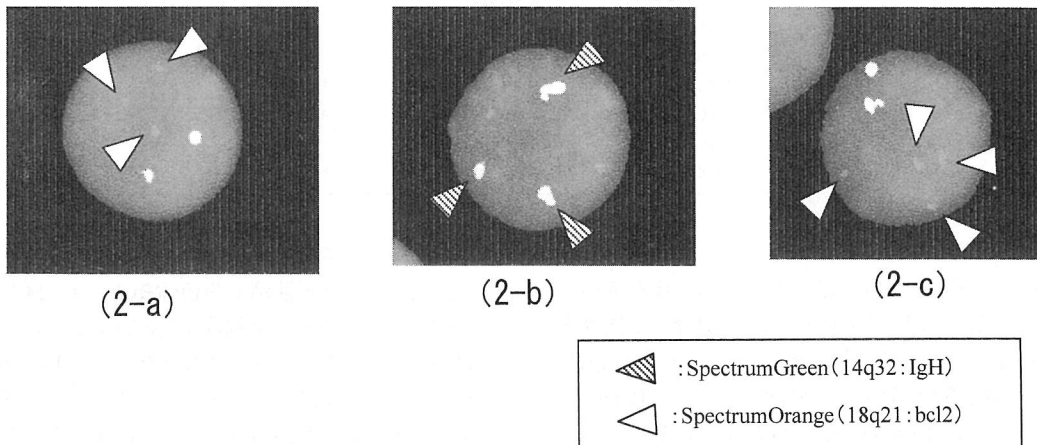


図2 シグナルの数的異常を示す症例

5例すべて、IgH/bcl-2陽性シグナルは認められなかった。対象例では、IgH/bcl-2陽性シグナルが認められたのは4例(Case 1, 5, 7, 8)であった。その中で、3例(Case 5, 7, 8)は染色体検査にてt(14;18)(q32;q21)が認められたが、1例(Case 1)は正常核型の結果であった。また、t(14;18)(q32;q21)が認められたが、IgH/bcl-2陽性シグナルは認められなかった症例が1例(Case 4)存在し、病理診断はDiffuse large B cell lymphoma (DLBCL)であった。この症例のFISHでは、SpectrumGreen signalの数的異常が認められ、190/500コ(38.0%)にSpectrumGreen signalが3コ認

められた(図2-a)。その他、Case 2および3ではSpectrum Orange signalが数的異常を示し、Case 2(図2-b)では74/500(14.8%)にsignalが3コ、Case 3(図2-c)では385/500(77.0%)に3~5コのsignalがみられた。Case 6の症例は、IgH/bcl-2陽性シグナルが認められず、染色体は増殖不良の結果であった。

2. リンパ節生検におけるIgH/bcl-2とFCMとの関連(表4)

FCMとの関連では、IgH/bcl-2陽性例のB細胞中のCD10の比率(CD10/CD20)は64.3±21.1(%)であり、陰性例47.6±26.6に比し高値の傾向があっ

表 4 各症例のIgH/bcl 2 とFCMの関係

No	CD10	CD19	CD20	CD22	CD23	κ鎖	λ鎖	κ/λ比	CD10/CD20	CD23/CD20	IgH/bcl2陽性率
1	72.9	83.3	87.9	81.7	23.0	85.8	0.1	858	82.9	26.2	86.2
2	6.3	89.6	75.9	70.9	91.8	0.7	54.3	0.128	8.3	120.9	0
3	55.8	86.8	82.4	75.5	32.1	0.6	93.4	0.006	67.7	38.9	0
4	25.0	33.6	44.0	48.8	15.3	36.0	2.5	14.4	56.8	43.7	0
5	23.5	7.8	68.9	66.1	49.0	3.3	3.7	0.89	34.1	71.1	41.6
6	54.7	91.3	95.3	91.1	79.1	40.0	0.3	133.3	57.4	83.0	0
7	41.5	58.6	58.2	61.7	8.0	5.2	2.3	2.26	71.3	13.7	58.0
8	54.8	82.2	79.2	83.3	4.9	3.6	5.4	0.667	69.2	6.2	79.5

表 5 骨髄におけるIgH/bcl 2 と染色体および骨髄中ML細胞の関係

No	IgH/bcl2陽性率(%)	染色体	骨髄中ML細胞(%)
1-1	82.2(411/500)	t(14;18)(q32;q21)	53.3
1-2	1.2( 6/500)	正常核型	2.0
1-3	0( 0/500)	正常核型	0
1-4	31.0( 31/100)	t(14;18)(q32;q21)	27.7
2-1	11.3( 54/477)	t(14;18)(q32;q21)	66.2
2-2	0.4( 2/500)	正常核型	0
2-3	52.6(263/500)	t(14;18)(q32;q21)	24.3
3	27.2(136/500)	正常核型	10.5
4	0( 0/500)	正常核型	1.4
5	24.4(122/500)	正常核型	2.6
6-1	1.0( 5/500)	正常核型	4.1
6-2	0( 0/300)	正常核型	4.7
7	0( 0/500)	正常核型	0
8	64.6(323/500)	t(2;3)(p25;p21)	86.1

た。さらに、B細胞中の CD 10 の比率は、IgH/bcl-2 陽性率と一致した値を示した。また、B細胞中の CD 23 の比率 (CD 23/CD 20) は、IgH/bcl-2 陽性例 29.3±29.1(%)で、陰性症例は 69.4±40.7 と IgH/bcl-2 陽性例で低値を示す傾向があった。B細胞性 ML での clonality の証明に重要な、κ/λ 比の発現が認められない症例が 3 例 (Case 5, 7, 8) 存在したが IgH/bcl-2 は陽性であった。

3. 骨髄における IgH/bcl-2 と ML 細胞比率、染色体の関係 (表 5)

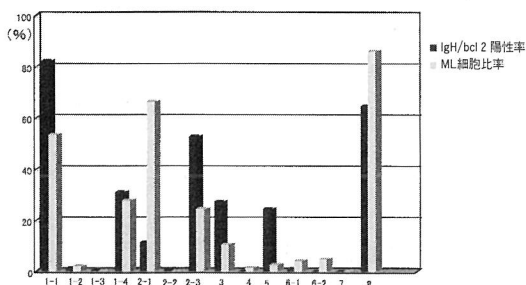


図 3 IgH/bcl 2 と ML 細胞比率との比較

IgH/bcl-2 陽性例は、12/14 例 (85.7%) 認められた。IgH/bcl-2 陽性例で染色体結果が t (14 ; 18) (q 32 ; q 21) を示す症例は 4 例のみであった。正常核型は半数存在し、Case 3 および 5 では IgH/bcl-2 陽性率が 20%以上存在するにもかかわらず、正常核型の結果であった。Case 8 では、IgH/bcl-2 陽性率が 64.6%認められたが、染色体結果では t (2 ; 3) (q 25 ; p 21) の核型であった。IgH/bcl 2 陽性率と骨髄中の ML 細胞比率との関係は、ML 細胞比率と IgH/bcl 2 陽性率は良く一致したデータであった (図 3)。しかし、Case 2-1 では ML 細胞 66.2%に比し IgH/bcl 2 陽性率 11.3%と低値であり、Case 5 では ML 細胞 2.6%に比し IgH/bcl 2 陽性率 27.2%と高値であった。

IV. 考 察

新 WHO 分類が提唱されて以来、悪性リンパ腫の診断には、病理組織学的所見に加え細胞表面形質および細胞遺伝学的検索が重要かつ不可欠となっている。成熟 B 細胞系腫瘍にみられる染色体・遺伝子異

常には、FL の t (14 ; 18) , マントルリンパ腫の t (11 ; 14) , パーキットリンパ腫の t (8 ; 14) , MALT リンパ腫の t (11 ; 18) などがあり、これらの異常は生物学的特徴や診断を知るうえで重要である<sup>4)</sup>。今回検討した t (14 ; 18) (q 32 ; q 21) は、18q 21.3 に位置する BCL 2 遺伝子が脱制御をきたし、胚中心性における B リンパ球のアポトーシスが抑制されることが悪性リンパ腫の原因と考えられている<sup>5)</sup>。しかし、このような染色体異常が必ずしも常に得られるとは限らない。一方で FISH 法の利点として、染色体検査のように分裂中期細胞を必要とせず、間期核でも検査が可能であり、染色体異常が得られない症例の診断の補助となり得ることである<sup>3)</sup>。今回検討した中でも、リンパ節生検の Case 1 のように、染色体検査で正常核型であったが FISH 法にて陽性の所見が得られ、FISH 法の重要性が確認できた。また、t (14 ; 18) (q 32 ; q 21) が認められた症例の 3/4 例 (75%) は FISH でも陽性を示したが、Case 4 の 1 例のみは、t (14 ; 18) (q 32 ; q 21) が認められるにもかかわらず FISH 法にて陽性所見が得られなかった。この原因については不明であるが、t (14 ; 18) (q 32 ; q 21) の染色体異常を認めるなかに、MALT リンパ腫が存在し、その鑑別に MALT-1 を用いた FISH 法が有用とされている<sup>6)</sup>。今回結果には示さなかったが、MALT-1 の FISH を実施したが陰性であった。また、Case 2, 3, 4 に関しては signal の数的異常が認められことにより、細胞の異常性が見いだされた。特に、Case 3 では骨髄の検体においても、signal の数的異常 (41.2%) が認められ (not data) , 腫瘍細胞の骨髄浸潤の有無や残存検査にも応用可能であると考えられた。

FCM との関連では、IgH/bcl-2 陽性例の B 細胞中の CD 23 陽性率の低値傾向や、B 細胞中の CD 10 陽性率の高値傾向が認められた。このことから、CD 10 と CD 23 の二重染色により、CD 10 有意の場合は IgH/bcl-2 陽性の可能性が、CD 23 陽性もしくは CD 10 (+) & CD 23 (+) の分画の増加が認められれば陰性例の可能性が示唆されたが、症例数が少なく今後の更なる検討が必要と考える。小林ら<sup>7)</sup>は、FL における bcl-2 蛋白の検索を FCM で行った結果、t (14 ; 18) (q 21 ; q 32) を示す FL は bcl-2 蛋白が強陽性であったと述べ、さらに他の bcl-2 蛋白陽性の悪性リンパ腫に比し、bcl-2 蛋白の発現強度が高い可能性があると報告している。今後は、bcl-2 蛋白なども検索に加えることにより、より精度の高

い診断が得られるものと考ええる。

林田ら<sup>8)</sup>は、B 細胞性の悪性リンパ腫症例の 91% を  $\kappa/\lambda$  比の検索で検出することが可能であり、異常形質を加味して判断することにより 94% の腫瘍に効果があったと述べている。今回の検討では、 $\kappa/\lambda$  比で異常を示した症例は、7/8 例 (87.5%) と林田らの報告とほぼ一致していた。しかし Case 5, 7, 8 の症例では、 $\kappa$  鎖と  $\lambda$  鎖の合計が B 細胞比率と一致しておらず、信頼性に欠けるデータであった。この原因としては、 $\kappa$  鎖および  $\lambda$  鎖の欠失や、 $\kappa$  鎖あるいは  $\lambda$  鎖が細胞質までは産生されているが細胞表面に発現していないことが考えられた。しかし、この 3 例とも IgH/bcl-2 陽性であることから FL と診断され、FISH 法の重要性が確認できた症例であった。さらに、骨髄での浸潤の有無に、FCM での clonality の証明が重要となるが、このような  $\kappa$  鎖や  $\lambda$  鎖の発現の低下が認められる症例では難しい。今回の検討でも、骨髄の  $\kappa$  鎖と  $\lambda$  鎖の発現は低下しており、clonality の証明ができなかった。しかし、骨髄での IgH/bcl-2 の検索において、全例骨髄で陽性細胞が認められ骨髄への浸潤が確認できた (リンパ節 Case 5 が骨髄 Case 5, リンパ節 Case 7 が骨髄 Case 2-1, リンパ節 Case 8 が骨髄 Case 6-1)。

骨髄における悪性リンパ腫細胞の比率と IgH/bcl-2 陽性率は、ほぼ一致した結果であった。我々が異常細胞と認識している細胞と悪性リンパ腫の細胞に大きな違いがないことが確認できた。さらに、染色体が正常核型で IgH/bcl-2 陽性の症例は、5/8 例 (62.5%) 存在し、FISH 法での確認の重要性が認識できた。今後は、マントル細胞リンパ腫におけるサイクリン D1 や、MALT リンパ腫の MALT-1, パーキットリンパ腫の c-myc など検討していき、悪性リンパ腫の診断向上に FISH が貢献できるように考える。

## V. ま と め

1. 今回、FL における IgH/bcl-2 の FISH をリンパ節および骨髄で検討した。
2. リンパ節および骨髄とも t (14 ; 18) (q 32 ; q 21) が認められる症例では、FISH でも高率に陽性を示した。しかし、1 例のみは陰性であり、その原因については不明であった。
3. FCM との関係では、B 細胞の中の CD 10 の比率が高値で、CD 23 が低値の症例は IgH/bcl-2 陽性の可能性が示唆されたが、症例数が少なく今後

の更なる検討が必要と考えられた。さらに, Light chain が発現しない 3 症例は, IgH/bcl-2 陽性であり, FISH 法の重要性が認識できた。

4. 骨髄の悪性リンパ腫細胞の比率と IgH/bcl-2 陽性率は, ほぼ一致した結果であった。骨髄への浸潤の有無に FISH 法は, 重要な検査項目の一つになりえると思われた。

## 文 献

- 1) Harris NL, Jaffe ES, Diebold 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* 1999; 17: 3835-49.
- 2) 大島孝一. 新 WHO 分類による白血病・リンパ系腫瘍の病態学 (森茂郎監修). 東京: 中外医学社; 2004. P.163-7.
- 3) 宮西節子, 奥村敦子. 血液検査の最新の動向血球検査 FISH 法, 染色体検査 (解説/特集). *臨床病理レビュー* 2001; 115(特): 30-6.
- 4) 三浦偉久男. 悪性リンパ腫 臨床と病理 (平野正美監修). 東京: 先端医学社; 2005. P.29-60.
- 5) 谷脇雅史. 造血器腫瘍アトラス 3 版 (阿部達夫編著). 東京: 日本医事新報社; 2000. P.105-9.
- 6) Dolores Sanchez-Izquierdo, Gerard Buchonnet, Reiner Siebert et al. MALT1 is deregulated by both chromosomal translocation and amplification in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003; 101: 4539-45.
- 7) 小林昭一, 本村茂樹, 岸 洋子ほか. Follicular lymphoma におけるフローサイトメトリーによる bcl-2 蛋白強陽性検索の意義について. *臨血* 2005; 45: 530-8.
- 8) 林田雅彦, 前川ふみよ, 宮西節子ほか. Flow cytometer を用いた悪性リンパ腫の表面形質の検討. *Cytometry Res* 1996; 6: 27-32.

# Fluorescence in Situ Hybridization Efficacy in Follicular Lymphoma

Yoshifumi kuroyama, Kumie Ohmune, Takako Kawaguchi,  
Masahiko ohata, Hiroyuki fujita<sup>1)</sup>

Department of Clinical Laboratory, Shizuoka Red Cross Hospital

1) Department of Internal Medicine, Shizuoka Red Cross Hospital

**Abstract :** In this study we examined Igh/bcl-2 in follicular lymphoma (FL) in both lymph nodes and bone marrow by use of Fluorescence in situ hybridization (FISH). A total of 8 subjects were used in the study, comprising 6 cases diagnosed with FL following lymph node biopsy, and an additional 2 cases shown to be CD10 positive after flow cytometer (FCM) analysis. 14 bone marrow samples were subsequently taken from these 8 cases diagnosed with FL. The use of FISH revealed a high positive rate in lymph nodes with confirmed cases of t(14;18)(q32;q21), although one case was seen as negative. In examining whether there was any possible connection with FCM, we found that there was a possibility of positive IgH/bcl-2 in cases with a high proportion of CD10 in B-cells, where the percentage of CD23 remains low. Due to the small number of cases used in this study, however, we believe further research may be necessary to elucidate a more detailed analysis. Moreover, the 3 cases in which expression of the Light chain remained undetected were IgH/bcl-2 positive, further stressing the value of using the FISH method. Our results show that the proportion of malignant lymphoma cells was roughly correlated to IgH/bcl-2 prevalence. Taken together, these results suggest that the use of FISH is an extremely useful tool in the examination process for detecting bone marrow infiltration.

**Key words :** Fluorescence in situ hybridization, follicular lymphoma,  
chromosome analysis, IgH/bcl-2



連絡先：黒山祥文；静岡赤十字病院 検査部

〒420-0853 静岡市葵区追手町8-2 TEL (054)254-4311