症 例

乏突起膠腫の 2 例の細胞像と OLIG2 蛋白の発現

安倍 秀幸¹⁾ 河原 明彦¹⁾ 杉田 保雄²⁾ 山口 知彦¹⁾多比良朋希¹⁾ 内藤 嘉紀²⁾ 鹿毛 政義¹⁾久留米大学病院病理部¹⁾, 久留米大学医学部病理学講座²⁾

背景：乏突起膠腫において OLIG2 蛋白の高発現あるいは 1p と 19q の遺伝子欠失が報告されている。今回われわれは、乏突起膠腫の 2 例の細胞所見、OLIG2 蛋白発現と組織所見を併せて報告する。

症例：症例 1 は 60 歳代の女性、症例 2 は 50 歳代の男性である。ともにめまいや痙攣発作を主訴に来院し、腫瘍摘出術が施行された。

症例：細胞診において症例 1, 2 の腫瘍細胞は裸核状で小集塊から孤在性に出現していた。核は円形で顆粒状クロマチンを呈し、一部には切れ込み状の核不整が認められた。ともに免疫細胞化学において腫瘍細胞は OLIG2 の高発現を示した。症例 1, 2 の組織診は、小型円形の腫瘍細胞が増生し perinuclear halo を伴っており、免疫組織化学にて OLIG2 の高発現を示し Ki-67 index は 5% 以下であった。Fluorescence *in situ* hybridization 法にて 1p19q 遺伝子の欠失を認め乏突起膠腫と診断した。

結論：細胞診における乏突起膠腫の組織型推定は、小型円形核や背景の毛細血管、免疫細胞化学において OLIG2 の高発現をみるにより可能であると考ええる。

Key words : Brain, Oligodendroglioma, OLIG2, 1p19qLOH, Case report

I. はじめに

乏突起膠腫 (oligodendroglioma) の発生頻度は、原発性脳腫瘍中の約 0.9%、神経上皮性腫瘍 (広義の glioma) の約 3.5% といわれている^{1,2)}。乏突起膠腫の大部分は成人男性の大脳半球に好発し、しばしば基底核、脳幹、小脳半球、脊髄や髄膜にも発生する²⁾。乏突起膠腫の組織所見におい

て、ほぼ均一な円形核を有し、細胞質の明るい腫瘍細胞が敷石状に配列する蜂巢構造 (honeycomb appearance) や perinuclear halo が特徴的所見とされている^{3,4)}、小型類円形核を有する退形成乏突起膠腫や central neurocytoma などとの鑑別が必要な腫瘍である。

近年、乏突起膠腫の診断、予後推定や化学療法などに有用な因子として OLIG2 蛋白 (以下 OLIG2) や fluorescence *in situ* hybridization (以下 FISH) 法を用いた 1p19q 欠失が報告されており^{3~5)}、遺伝子学的に 1p19q 欠失が認められた oligodendroglial tumor は procarbazine, lomustine, vincristine (PCV 療法) の化学療法が有効であるという報告がなされている^{6,7)}。したがって、患者の治療方針決定において乏突起膠腫を組織診や細胞診を用いて診断することは重要である^{8,9)}、本邦において細胞所見に関する乏突起膠腫の報告は少なく、また OLIG2 抗体を用いた免疫細胞化学の報告はされていない。

今回、われわれは、乏突起膠腫と診断された 2 例を経験し、その細胞像と OLIG2 発現、さらに FISH 法を用い 1p19q 欠失を確認したので報告する。

The characteristic cytological findings of oligodendroglioma and identification of OLIG2 expression : two case reports

Hideyuki ABE¹⁾, C. T., C. M. I. A. C., Akihiko KAWAHARA¹⁾, C. T., C. F. I. A. C., Yasuo SUGITA²⁾, M. D., Tomohiko YAMAGUCHI¹⁾, C. T., C. M. I. A. C., Tomoki TAIRA¹⁾, C. T., C. M. I. A. C., Yoshiki NAITOU²⁾, M. D., Masayoshi KAGE¹⁾, M. D.

¹⁾Department of Diagnostic Pathology, Kurume University Hospital

²⁾Department of Pathology, Kurume University School of Medicine

論文印刷請求先 〒830-0011 福岡県久留米市旭町 67 久留米大学病院病理部 安倍秀幸

平成 23 年 3 月 30 日受付

平成 24 年 2 月 2 日受理

Photo. 1 Cytological findings of squash smear of oligodendrogliomas in cases 1 (a) and 2 (b). Tumor cells show scant cytoplasm and round to oval nuclei with fine chromatin patterns and inconspicuous nucleoli (Papanicolaou stain, $\times 40$).

Photo. 2 Capillary vessel findings in oligodendroglioma. Capillary vessels showing spindle shape cells are mixed in tumor cells, and express CD34 (a : Papanicolaou stain, $\times 40$, b : Immunocytochemistry, $\times 40$).

Photo. 3 Some of tumor cells have clear cytoplasm. (a) and irregular nuclei as hollow (b) (Papanicolaou stain, a : $\times 60$, b : $\times 100$).

II. 症 例

症例 1 : 60 歳代, 女性.

主 訴 : めまい, 痙攣発作.

既往歴 : 特記すべきことなし.

現病歴 : 患者はめまいを自覚し, さらに痙攣発作を生じたため近医を受診された. Magnetic resonance imaging にて右頭頂に 3.0×3.5 mm の腫瘍が認められ, 精査加療目的にて当院に来院した. その後, 腫瘍摘出術が施行された.

症例 2 : 50 歳代, 男性.

既往歴 : 特記すべきことなし.

現病歴 : 患者は痙攣発作を主訴に近医を受診し, Magnetic resonance imaging にて右前頭葉に 4.0×3.5 mm の腫瘍が認められた. その後, 精査加療目的にて当院に来院し, 腫瘍摘出術が施行された.

III. 細胞学的所見

症例 1, 症例 2 の圧挫細胞診標本において, 腫瘍細胞は, 小型類円形核ではほぼ同様の細胞所見を呈していた. 症例 1 は膠線維状背景を呈し (Photo. 1a), 症例 2 は神経基質様背景を呈し, これらは既存の背景物質であった (Photo. 1b). また, 血管内皮の増生を伴わない CD34 陽性の毛細血管が認められたが (Photo. 2), 核分裂像や壊死の出現はみられなかった. 症例 2 では, 背景に石灰化小体が認められた. 腫瘍細胞は小集塊状～孤立性に出現し, 裸核状または狭小な細胞質, わずかな細胞突起を有していた. 部分的に核周囲が明るく抜けた所見 (Photo. 3a) が認められた. 核は円形～類円形で長径 $12 \sim 35 \mu\text{m}$ の範囲で軽度の大小不同が認められ, 一部の核に切れ込み状の核不整が認められた (Photo. 3b). 核クロマチンは細顆粒状で 1～数個の核小体を有しており, 核分裂像はみられなかった. 免疫細胞化学において OLIG2 labeling index は症例 1 が 63%, 症例 2 が 68% と高率であった (Photo. 4).

IV. 病理組織学的所見

腫瘍は症例 1, 2 ともに小型均一な類円形核を呈した腫瘍細胞が敷石状に増生し, 明らかな壊死や核分裂像はみられなかった. 腫瘍細胞は軽度の核クロマチン増量を示し, 1～数個の核小体を有していた. また, 樹枝状の微細血管網の増生や perinuclear halo が認められ, 症例 2 には少数の石灰化小体が認められた (Photo. 5a). 免疫組織化学において, 腫瘍細胞は glial fibrillary acidic protein 陽性, シナプトフィジン陰性で MIB-1 labeling index は 5% 未満であった.

Photo. 4 Immunocytochemistry for OLIG2 in oligodendroglioma. Tumor cells strongly express OLIG2 in the nucleus (Immunocytochemistry, $\times 40$).

Photo. 5 Typical histological findings of oligodendroglioma. Monomorphic tumor with hyperchromatic nuclei, clear cytoplasm and many capillary vessels are seen (a). Immunohistochemistry is diffusive and strongly positive for OLIG2 as well as squash smears (b) (a: Hematoxylin and Eosin stain, $\times 20$, b: Immunohistochemistry, $\times 20$).

Photo. 6 The 1p/19q fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis using 1p36/1q25 (a) and 19q13/19p13 (b) dual color probe sets. (a) Normal signals of 1p36/1q25 and 19q13/19p13 are two red signals and two green signals, respectively. FISH showing a nucleus with 1p loss (a: 1p36 = red, 1q25 = green, DAPI = blue), and a nucleus with 19q loss (b: 19q13 = red, 19p13 = green, DAPI = blue).

OLIG2 labeling index は症例 1 が 59%, 症例 2 が 78% と高率であった (Photo. 5b). さらに, 1p36/1p25 と 19q13/19p13 dual color プローブ (Vysis) を用いた FISH 法において, 症例 1 の腫瘍細胞は, 56% の 1p36 シグナル欠失および 63% の 19q13 シグナル欠失が認められた. 症例 2 の腫瘍細胞も同様に 57% の 1p36 シグナル欠失および 65% の 19q13 シグナル欠失が認められ (Photo. 6), これらの所見より 2 例ともに乏突起膠腫と診断された.

V. 考 察

乏突起膠腫は, 現在にいたるまで細胞起源が明らかになっていない腫瘍といわれている^{1,10}. 乏突起膠腫の組織学

的 grading の評価は, 星膠細胞腫に準じて行われるが, 予後と相関していない^{1,2,7,9,10}. 乏突起膠腫は, 小型類円形を呈し, 神経上皮性腫瘍のなかで診断に苦慮する腫瘍の一つにあげられている². その細胞学的特徴は, 小型類円形で不明瞭な細胞質を有した腫瘍細胞がみられ, 一部の細胞はわずかな膠線維を有する. 核は類円形～卵円形で細顆粒状のクロマチンパターンと 1～数個の核小体が認められる.

また, 好酸性細胞質を有した microgemistocyte や eosinophilic cytoplasm の混在や, 石灰化小体と網状の細血管がみられるといわれている¹¹⁻¹³. OLIG2 蛋白は, oligodendroglial 系に関連した転写調節因子であり, oligodendroglial cell に発現するという報告がある³. 抗 OLIG2 抗体を用いた免疫染色において乏突起膠腫は OLIG2 の過剰発現を示すため小型類円形を呈する脳腫瘍との鑑別診断に有用であるといわれている³. 近年, OLIG2 蛋白は星細胞系腫瘍にも発現することが報告されているが, 一般的に星細胞系腫瘍の OLIG2 発現は陽性率や発現強度は乏突起膠腫と比較して低い⁴. しかしながら乏突起膠腫に類似した細胞の出現する毛様細胞性星膠細胞腫は OLIG2 蛋白の陽性率が高いと報告されており, 鑑別に用いる際は慎重に判定する必要がある⁴. 鑑別診断に星細胞系腫瘍乏突起膠腫は遺伝子検査において 1p や 19q 遺伝子欠失が 60～80% に認められるため, 本腫瘍の診断の際に有用な所見の一つとなる^{2,7}. さらに 1p や 19q 遺伝子欠失をみることは, 患者の予後や治療効果の予測のための重要な指標となり, 積極的に施行する方が望ましいと考える⁷.

今回, われわれが経験した 2 例の細胞像は, 上述した乏突起膠腫の特徴的細胞所見を満たしていると考え. 一般

Table 1 Cytological features of oligodendroglioma and other brain tumors¹¹⁻¹⁵⁾

Cytological findings	Oligodendroglioma	Anaplastic oligodendroglioma	Astrocytoma	Oligoastrocytoma	Central neurocytoma
Background	calcification fine capillary network hemorrhagic clean	enlarged endothelial cell partially necrotic	clean	fine capillary network clean	neuropil calcification clean
Cell arrangement	unevenly	densely	unevenly	unevenly	evently perinuclear halos neurophil island
Cytoplasm	filamentous indistinct narrow	plump distinct fibrillary	filamentous	filamentous indistinct narrow	naked
Nucleus	round to oval	round to oval irregular	round to oval extend slender	oval to round extend slender	round
Chromatin pattern	coarse granular uniform	coarse granular	fine granular	fine granular coarse granular	fine granular

に乏突起膠腫の核所見は、小型類円形と記載されていることが多いが、実は長径 12 μm ~35 μm 範囲の大小不同を有し、2~3 視野に数個程度の切れ込み状の核不整を認める (Photo. 3b)。この核所見は組織標本中では目立たず、個々の細胞を詳細に観察できる細胞診の利点と思われる。組織標本において核周囲が明るく抜ける perinuclear halo は、組織標本を作製する過程でホルマリン固定によるアーチファクトといわれており、乏突起膠腫の組織学的特徴所見の一つにあげられている^{1,2,4,13)}。本症例中の細胞診では、わずかに核周囲が明るく抜ける所見がみられた。本症例の組織標本や Kobayashi ら¹⁴⁾が報告した central neurocytoma の perinuclear halo 所見と比較すると、われわれが経験した乏突起膠腫の核周囲が明るく抜ける所見は、標本中の一部の細胞にしかみられず perinuclear halo と断定する所見に乏しいと思われた。また Kobayashi らは central neurocytoma の細胞像は perinuclear halo を認めるが、乏突起膠腫の perinuclear halo は常に認められる所見ではないと述べている¹⁴⁾。細胞診における乏突起膠腫 perinuclear halo 所見は、組織診断と同様に honeycomb appearance または fried-egg appearance といわれる所見をみることが必要である^{1,2,14)}。しかし細胞診における乏突起膠腫の perinuclear halo に着目した報告は少なく今後さらなる検討が必要かもしれない¹¹⁻¹⁵⁾。2 例ともに毛細血管が比較的多く認められ、これらは紡錘形の核が流れをもって配列し、細胞間に赤血球が認められた (Photo. 2)。上述する所見は、われわれが経験した 2 例に共通してみられた細胞所見であり、乏突起膠腫を推定するのに役立つ細胞所見と考える。症例 1 と 2 に違いがみられた背景所見として石灰化小体の出現、膠線維状と神経基質様の状態であった。石灰化小体は、乏突起膠腫を示唆する所見の一つにあげられるが、症例 2 にのみ認め

られたため、採取部位や症例間で差があると考えた方が妥当である。症例 1 は、膠線維性背景で症例 2 は神経基質様背景であり、これらの背景の違いは、組織の採取された部位による違いであると考え¹⁰⁾。

乏突起膠腫と鑑別が必要な小型類円形を呈する脳腫瘍は anaplastic oligodendroglioma, low grade astrocytoma, oligoastrocytoma と central neurocytoma である。Anaplastic oligodendroglioma の細胞像は乏突起膠腫と比較して細胞密度の増加、核不整、核クロマチン増量や血管内皮の増生などがみられ、明らかな異型性を示し、上述した乏突起膠腫の細胞像を認識しておけば鑑別可能である¹⁵⁾ (Table 1)。今回われわれが経験した症例 2 の背景は神経基質様で石灰化小体を伴っていたため central neurocytoma の細胞像に類似していた。Preusser らは central neurocytoma との鑑別に OLIG2 が有用であると報告しているが⁴⁾、central neurocytoma は部分的に発現を示す。そのため、OLIG2 発現が低い場合は、Neu-N や GFAP などを併せて診断することが必要であると報告している⁴⁾。また細胞像では、核所見に着目した方がよく、乏突起膠腫の核は切れ込み状の核不整を有し、大小不同を認める。一方 central neurocytoma は一般に均一な円形核を有する腫瘍細胞が出現する。発生頻度からみると常に low-grade astrocytoma や oligoastrocytoma との鑑別が必要である^{1,10)}。Low-grade astrocytoma は、清浄な背景に不均一で線維性の細胞質を有し、軽度の核不整を伴った円形~紡錘形の細胞がみられる。また、乏突起膠腫の核面積は、low-grade astrocytoma よりも小さいという報告があり¹¹⁾、両者の鑑別は比較的容易である。一方、oligoastrocytoma は、乏突起膠腫成分と星細胞腫成分から構成されるため、鑑別は非常に困難である。診断の確定は、広範囲に腫瘍を観察できる組織診に委ねられているのが現状であるた

め、さらなる検討が必要と考える。

細胞診における乏突起膠腫の組織型推定は、小型円形で軽度の核大小不同を伴い、核の切れ込みや背景の毛細血管に着目することにより可能である。さらに OLIG2 の過剰発現と 1p19q 遺伝子の欠失の確認により確定診断にいたることが可能になると考える。

筆者らは、開示すべき利益相反状態はありません。

Abstract

Background : We report two cases demonstrating typical oligodendroglioma, focusing on the characteristic cytological features, and discuss the importance to OLIG2 expression and 1p19q deletions.

Case : Case 1 was 60-year-old female and case 2 was 60-year-old male, respectively. They complained of subjective symptoms, such as vertigo and convulsions, and a mass was found in the right parietal lobe of brain by magnetic resonance imaging. Squash smears showed a loose cluster of round tumor cells with scant cytoplasm in both cases 1 and 2. Although there were aggregates of capillary vessels, there were no mitotic figures or necrosis. The nuclei of tumor cells were irregular with small inconspicuous nucleoli and fine chromatin patterns. Histologically, tumors appeared monotonous with clear cytoplasm and capillary vessels. There were no mitotic figures, necrosis or endothelial proliferation in the tumor. On immunohistochemistry, the tumor expressed OLIG2 protein and showed a low Ki-67 labeling index. Furthermore, 1p19q deletions were identified in both cases 1 and 2 by fluorescence *in situ* hybridization.

Conclusion : Diagnosis of oligodendroglioma requires differentiation from other brain tumors demonstrating small round cells. Characteristic cytological findings of oligodendroglioma are round tumor cells with irregular nuclei and capillary vessels. Furthermore, detecting overexpression of OLIG2 and 1p19q deletions also contributes to the differential diagnosis from other brain tumors.

文 献

- 1) 河本圭司, 吉田 純, 中里洋一, 高倉公朋, 佐谷秀行, 植木敬介・ほか. 脳腫瘍臨床病理カラーアトラス医学書. 東京: 医学書院; 2009. 40-43.
- 2) 嘉山孝正, 洪井莊一郎, 青木友和, 倉津純一, 隅部俊宏, 齋藤延人・ほか. 脳腫瘍取扱い規約第3版. 東京: 金原出版;

2010. 104-105.
- 3) Preusser, M., Budka, H., Rössler, K., Hainfellner, J. A. OLIG2 is a useful immunohistochemical marker in differential diagnosis of clear cell primary CNS neoplasms. *Histopathology* 2007 ; 50 : 365-370.
- 4) 平戸純子. 病理診断に役立つ免疫組織化学の新しいマーカー 脳腫瘍診断への応用. *診断病理* 2007 ; 24 : 27-29.
- 5) Jeon, Y. K., Park, K., Park, C. K., Peak, S. H., Jung, H. W., Park, S. H. Chromosome 1p and 19q status and p53 and p16 expression patterns as prognostic indicators of oligodendroglial tumors : a clinicopathological study using fluorescence in situ hybridization. *Neuropathology* 2007 ; 27 : 10-20.
- 6) Stege, E. M., Kros, J. M., de Bruin, H. G., Enting, R. H., van Heuvel, I., Looijenga, L. H., et al. Successful treatment of low-grade oligodendroglial tumors with a chemotherapy regimen of procarbazine, lomustine, and vincristine. *Cancer* 2005 ; 103 : 802-809.
- 7) Durand, K. S., Guillaudeau, A., Weinbreck, N., DeArmas, R., Robert, S., Chaunavel, A., et al. 1p19qLOH patterns and expression of p53 and Olig2 in gliomas : relation with histological types and prognosis. *Mod Pathol* 2010 ; 23 : 619-628.
- 8) 齊藤厚志. oligodendroglial tumors の病理学的診断に関する問題点. *病理と臨床* 2000 ; 18 : 1056-1061.
- 9) Stege, E. M., Kros, J. M., de Bruin, H. G., Enting, R. H., van Heuvel, I., Looijenga, L. H., et al. Successful treatment of low-grade oligodendroglial tumors with a chemotherapy regimen of procarbazine, lomustine, and vincristine. *Cancer* 2005 ; 103 : 802-809.
- 10) 小森隆司. 希突起膠腫とその鑑別診断. *病理と臨床* 2006 ; 24 : 1216-1217.
- 11) Inagawa, H., Ishizawa, K., Hirose, T. Qualitative and quantitative analysis of cytologic assessment of astrocytoma, oligodendroglioma and oligoastrocytoma. *Acta Cytol* 2007 ; 51 : 900-906.
- 12) Klysik, M., Gavito, J., Boman, D., Miranda, R. N., Hanbali, F., De Las Casas, L. E. Intraoperative imprint cytology of central neurocytoma : The great oligodendroglioma mimicker. *Diagn Cytopathol* 2010 ; 38 : 202-207.
- 13) Joseph, J. T. *Diagnostic Neuropathology Smears*. Philadelphia : Lippincott-Raven Williams & Wilkins ; 2007. 54-81.
- 14) Kobayashi, T., Bamba, M., Ueda, M., Nishio, T., Muramatsu, M., Hino, A. Cytologic diagnosis of central neurocytoma in intraoperative squash preparations. *Acta Cytol* 2010 ; 54 : 209-213.
- 15) Mitsunashi, T., Shimizu, Y., Ban, S., Ogawa, F., Matsutani, M., Shimizu, M., et al. Anaplastic oligodendroglioma : A case report with characteristic cytologic features, including minigemistocytes. *Acta Cytol* 2007 ; 51 : 657-660.