症 例

子宮頸部原発悪性リンパ腫の1例

——細胞診材料を用いた免疫グロブリン重鎖遺伝子再構成の検討——

筑波大学附属病院病理部¹⁾, 筑波大学臨床医学系産婦人科²⁾池澤 剛¹⁾ 森下由紀雄¹⁾ 角田 肇²⁾ 藤原 広美¹⁾
深澤 政勝¹⁾ 鈴木 悦¹⁾ 西田 正人²⁾ 野口 雅之¹⁾

背景: 比較的まれな子宮頸部原発悪性リンパ腫を経験し, 細胞診材料を用いた免疫グロブリン重鎖遺伝子再構成の検討を行ったので報告する。

症例: 66歳女性。5経妊, 3経産。不正性器出血を主訴に受診した。前壁から直径10 cmの腫瘤が腔内に突出していた。腔壁擦過細胞診では, 壊死性背景の中に大型で一部核縁不整, 核クロマチン増量した裸核様の腫瘍細胞が出現していた。出現細胞量としては少ないものの, 腫瘍細胞の異型の程度, 上皮性結合を示さず散在傾向を呈することにより Class V 悪性リンパ腫と細胞診断された。生検にても, びまん性大細胞性B細胞型の悪性リンパ腫と診断された。化学療法施行後, 腫瘍縮小が認められ子宮摘出が行われた。捺印細胞診標本, 生検標本, 手術標本よりDNAを抽出し, PCR法を利用した免疫グロブリン重鎖遺伝子の再構成を解析した。いずれの標本からも同一の長さの単一バンドを確認することができた。

結論: 組織標本と同様に細胞診標本を用いた免疫グロブリン重鎖遺伝子の再構成の検索は可能であり, 悪性リンパ腫の細胞診断の補助として有用である。

Key words: Malignant lymphoma——PCR——Cytological specimen——Immunoglobulin gene rearrangement——Monoclonality

I. はじめに

Primary malignant lymphoma of the uterine cervix—
Examination of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement using cytological material—

Tsuyoshi IKEZAWA¹⁾, C.T., I.A.C., Yukio MORISHITA¹⁾, M.D., M.I.A.C., Hajime TSUNODA²⁾, M.D., Hiromi FUJIWARA¹⁾, C.T., I.A.C., Masakatsu FUKASAWA¹⁾, C.T., I.A.C., Etsu SUZUKI¹⁾, M.T., Masato NISHIDA²⁾, M.D., Masayuki NOGUCHI¹⁾, M.D.

¹⁾Department of Pathology, University Hospital of Tsukuba

²⁾Department of Gynecology, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba

論文別刷請求先 〒305-8576 つくば市天久保2の1の1 筑波大学附属病院病理部 池澤 剛

平成12年10月16日受付

平成13年3月16日受理

近年では病理組織標本から抽出したDNAを用いた各種遺伝子の検索がなされ, 病理診断の補助診断として用いられている^{1,2)}。たとえば, 免疫グロブリン重鎖(IgH)遺伝子の再構成の検索は悪性リンパ腫の診断に応用されている。

漿膜や深部臓器・リンパ節に悪性リンパ腫が発生ないし進展した場合, 組織材料の採取が困難なためこれらの診断は細胞診標本を用いて行われることとなる。また, 組織材料の採取が可能でも, 細胞診材料の採取の方が手技的に容易なため悪性リンパ腫を後者のみに依存する場合もある。しかしながら, 腫瘍細胞そのものが多彩でモノトーンな所見に乏しい場合や, 背景

に幼若リンパ球の出現が目立つ場合などは、細胞診標本上、反応性ないし炎症性変化との鑑別を要する。このような標本ではIgH遺伝子再構成の検索が細胞診断の補助として期待されるが、この検索方法は現在十分に確立されたとはいえない。

今回、比較的まれな子宮頸部原発の悪性リンパ腫を経験し、その腫瘍捺印細胞診標本と生検材料、手術材料から同様の免疫グロブリンの再構成を確認できたので報告する。

II. 症 例

患 者：66歳，女性，5経妊，3経産

主 訴：不正性器出血

既往歴：特記すべきことなし

家族歴：姉；甲状腺腫瘍

現病歴：1998年6月頃より血性帯下を自覚していたが放置していた。同年8月19日 下腹部痛，不正性器出血を主訴に当院産婦人科受診。身体所見上，腔前壁から直径10cmの腫瘍が腔内に突出していた。腔壁擦過細胞診にてClass V悪性リンパ腫，生検にても，びまん性大細胞性B細胞型の悪性リンパ腫と診断され，同月24日当院血液内科に入院した。入院時検査所見としてはLDHが1804 IU/lと高値を示していたが，他に異常所見は認められなかった。MRIにて腫瘍は腔前壁から子宮頸部，体部まで一塊となっており，CTでは，子宮腫瘍（100×75×100mm）と右閉

鎖リンパ節腫大（70×70×70mm）を認め，腫瘍は子宮にびまん性に浸潤しているところから限局性病変でないと考え，非ホジキンリンパ腫 Stage IV BE（Ann Arbor分類），FIGO分類II a期とした。CTによる検索にて頸部，肺，縦隔の各リンパ節の腫大は認められなかった。また，ガリウムシンチグラムでは，子宮腫瘍部のみに集簇が認められた。骨髄生検でも腫瘍細胞は認められず，子宮原発悪性リンパ腫の診断のもと治療が開始された。化学療法はTHP（pirarubicin）—CVP（cyclophosphamide, vincristine, prednisone）を用いて4クール施行された。右閉鎖リンパ節の縮小が確認され，同年11月26日広汎子宮全摘出術が行われた。現在，血液内科・産婦人科外来で経過観察しているが再発はみられていない。

III. 細胞診所見

腔壁擦過細胞診では，壊死性背景の中に大型で一部核縁不整，核クロマチン増量した核小体の目立つ裸核様の腫瘍細胞が少数ながら出現しており，Class V悪性リンパ腫と診断された。鑑別診断として濾胞性頸管炎と低分化の癌があげられたが，腫瘍細胞の異型の程度で前者と，上皮性結合を示さず散在傾向を呈する点で後者と鑑別可能であった（Photo. 1）。手術材料の腫瘍捺印細胞診標本では，腔壁擦過細胞診標本と同様

Photo. 1 Vaginal smear before therapy. A, B: Large atypical lymphoid cells were scattered in a somewhat necrotic background. They possess prominent nucleoli. Mitotic figures are occasionally seen (Papanicolaou stain×40).

Photo. 2 Tumor mass touch smear in hysterectomy material. A: Tumor cells with various sizes have pleomorphic or slightly indented nuclei, admixed with necrotic debris. In individual cells, 1 to 2 nucleoli are prominent (Papanicolaou stain ×40). B: Tumor cells reacted with anti-CD20 antibody (arrow) (ABC method, ×20).

の異型の強い腫瘍細胞が多数出現し、核分裂像も散見された。自動免疫染色装置NXシステム(VENTANA社製:AZ USA)で免疫染色を施行したところ細胞膜にCD20陽性像が確認された(Photo. 2)。

IV. 病理学的所見

生検標本では、組織学的に大型で異型性の強い核を有し、核小体の目立つ腫瘍細胞がびまん性に増殖していた。一部では壊死も認められた。免疫組織化学的には、B cell マーカーであるL26とMB-1が陽性所見を示し、T cell マーカーのMT-1とUCL-1は陰性であった。

広汎子宮全摘術材料は重量296g、子宮の大きさは140×120×40mmで卵巣は両側とも萎縮していた。肉眼的には、白色の充実性腫瘍が子宮体部下方から頸部にかけて広がり漿膜直下まで浸潤していた。腫瘍の大きさは95×90×75mmに達していた(Photo. 3)。組織学的には生検標本と同様の所見を示す腫瘍細胞が増殖・浸潤していた(Photo. 4)。ただし、子宮外への浸潤はみられず、腔側断端は陰性だった。

V. DNA抽出

捺印細胞診標本: キシレン内でPapanicolaou染色標本のカバーガラスを剥がし、脱キシロール後乾燥させた。プロテナーゼK溶液(200 µg/ml,

ESTAMAN KODAK:NY USA) 50 µlを0.5 mlマイクロチューブに分注し、爪楊枝の先をこの溶液に湿らせ、捺印細胞診標本1枚の約1/2の領域から爪楊枝で細胞を削り、分注したプロテナーゼK溶液内に入れた。37°Cで12時間反応を行い、95°C7分間でプロテナーゼKを失活後、15000 rpm 10分間遠心し、その上清を後述するpolymerase chain reaction (PCR)法のテンプレートとした。

パラフィン標本: 6 µmに薄切した標本を脱パラフィン後、100%アルコールにて脱キシロールし、冷風乾燥させた。この標本上の病変部位を爪楊枝で削り、上述の細胞診標本と同様にDNA抽出を行った。Polyclonalityの陰性対照として反応性リンパ過形成と病理診断されたリンパ節の捺印細胞診標本と病理組織標本を用いた。また、陽性対照としてはB細胞性悪性リンパ腫と病理診断されたリンパ節の捺印標本と病理組織標本、ならびに非ホジキン悪性リンパ腫培養細胞(RAMOS)のそれぞれからDNAを抽出した。

VI. PCR

IgH遺伝子のCDR3領域を標的としてsemi nested PCRを行った。1回目の反応には、上流域にFR2A (5'-TGG (A/G) TCCG (C/A) CAG (G/C) C (T/C) (T/C) C (N) GG-3')とFR3A (5'-ACACGCC (C/T) (G/C) TGTATTACTGT-3')、下流域にLJH (5'-TGAGGAGACGGTGACCC-3')の各プライマーを用い、2回目の反応では上流域にFR2A

Photo. 3 Hysterectomy material. The tumor occupies the lower portion of the uterine corpus to cervix, and infiltrates immediately beneath the serosa.

Photo. 4 Histological section of tumor mass in surgical specimen. Tumor cells having large atypical nuclei with coarse chromatin proliferate diffusely. Occasionally, tumor cells with huge nuclei and prominent nucleoli are observed (H-E stain, ×20).

Photo. 5 Analysis of IgH Rearrangement by amplification with FR 2 A and FR 3 A. T : touch smear, B : biopsy section, S : surgical section, N : no template, R : reactive lymph node, P : positive control (lymphoma cell line), M : molecular weight marker. Electrophoresis of PCR products for analysis of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement using FR 3 A and FR 2 A primers. Single discrete sharp bands are evident in lanes T, B, and S.

と FR 3 A, 下流域に VLJH (5'-GTGACCAGGT (N) CCTTGGCCCCAG-3') を用いた. 反応液の内容は, 2.5 U TaKaRa Ex Taq. (宝酒造, 京都), 2.5 mM dNTP mixture, ExTaq buffer, 1 μ M プライマーで総量 49 μ l とし, 前述のごとく抽出した DNA テンプレート 1 μ l を加え反応させた. テンプレート以外の反応溶液はすべて混合し凍結保存³⁾したものを利用した.

1 回目の反応条件は, denaturation 94°C 15 秒, annealing 55°C 30 秒, extension 72°C 30 秒とし 35 サイクル施行した. 2 回目の反応には, 100 倍に希釈した 1 回目の PCR 産物を 1 μ l 用い, denaturation 94°C 10 秒, annealing 60°C 10 秒, extension 72°C 10 秒を 20 サイクル施行した^{4,5)}.

電気泳動は 12% polyacrylamide gel (DNA - PAGE mini : TEFCO CO., 東京) を用い, PCR 産物 10 μ l を 30 分間泳動した. 染色は ethidium bromide 溶液 (1 μ g/ml) で 10 分行った.

上流域のプライマーを FR 2 A とした場合, 捺印標本, 生検標本, 手術標本から抽出したいずれの DNA においても 260 bp 付近の位置に単一のバンドが確認できた. FR 3 A では 3 者の標本とも 80 bp 付近の位置に単一のバンドが確認できた (Photo. 5).

VII. 考 察

女性性器に発生する悪性リンパ腫はまれであ

る⁶⁻⁸⁾. 森脇らが本邦における子宮頸部原発悪性リンパ腫の臨床報告例 38 例や剖検輯報をまとめた報告では, 発生頻度は子宮腫瘍の 0.05%, 節外性悪性リンパ腫の 2% とわめて少ない. 節外性の悪性リンパ腫の多くは B 細胞性であり, 婦人科領域でも多くが B 細胞性でびまん性, 中・大細胞型の頻度が高い⁹⁾. 本症例も B 細胞性大細胞型であり, 不正性器出血を主訴とした臨床所見も, 子宮原発悪性リンパ腫の多くにみられるものと一致している.

細胞形態的に悪性リンパ腫との鑑別が必要になる疾患として濾胞性頸管炎, 小細胞性非角化型扁平上皮癌, 低分化型腺癌, 小細胞癌, 白血病などが挙げられ¹⁰⁾, 細胞像からだけでは鑑別の難しい場合がある. また, 腫瘍細胞が粘膜表面に露出していない場合は細胞診標本中に腫瘍細胞の出現が少なく, 診断に苦慮することが多い¹¹⁾. このように, 細胞所見のみで診断が困難な場合, PCR 法を利用した IgH 遺伝子の検索が有力な診断の補助になると思われる.

リンパ節の穿刺吸引細胞診材料を用いて IgH 遺伝子の再構成と bcl-2 および bcl-1 遺伝子の検索を併用した報告では, 37 例の悪性リンパ腫患者のうち 30 例が検出可能であったと述べている¹²⁾. しかし, 節外性の悪性リンパ腫の細胞診材料を用いた PCR 法による報告例は, 体腔液材料の cell block 標本を利用したものがみられるにすぎない¹³⁾. 今回の症例では, 術前の擦過細胞診標本が 1 枚であったため, この標本から DNA を抽出して PCR 法を行うことができなかった. しかしながら今回の検討により, 診断に用いた術前の擦過細胞診標本を利用し PCR 法を行うことは, 悪性リンパ腫の細胞診断の補助として有用であることが示唆された.

今回の検索において捺印, 生検, 手術材料よりそれぞれ DNA を抽出して PCR 法を行ったところ, 3 者とも同じ大きさの単一バンドが検出された. これらの材料は基本的に同一症例の同一検体であるので, この結果より細胞診材料を用いた本手法の信頼性が確認された. また, これら標本の採取は異なった時期に異なった採取方法で行われているので, 時間や採取方法に影響されない再現性のある特異性の高い手法と考えられる. したがって, 腫瘍が複数認められる場合, クローンの異同を検討することによる原発と転移の鑑別にも応用可能と思われる.

細胞診標本を用いた分子生物学的検索は, 病理標本を用いた方法に比べてその開発が遅れている. 今回,

組織標本と同様に Papanicolaou 染色細胞診標本からも IgH 遺伝子の再構成の検索が可能であることが分かった。このことは、診断に供された細胞診標本上の標的細胞から抽出された DNA により、病理組織標本と同様に分子生物学的検索が可能であることを意味している。さらに、癌遺伝子など他の遺伝子検索への応用により、細胞診断の精度向上が期待される。

Abstract

Background : We report a relatively rare case of primary non-Hodgkin malignant lymphoma of the uterine cervix. We examined immunoglobulin heavy chain gene rearrangement using DNA extracted from the cytological specimen and histological specimens.

Case : A 66-years-old woman (gravida 5, para 3) was admitted with genital bleeding. She had an exophytic mass 10 cm in diameter in the vaginal anterior wall. Cytological diagnosis was malignant lymphoma and histopathological diagnosis was diffuse large B cell non-Hodgkin lymphoma. Immunohistochemical staining of the specimen was positive for L 26 but negative for UCHL-1. DNA was extracted from a cytological touch smear sample, biopsy sample, and resected material. Using extracted DNA, we conducted polymerase chain reaction (PCR) analysis of the rearrangement of the immunoglobulin heavy chain gene. A single discrete sharp band is evident in the PCR product of each sample.

Conclusion : Analysis of rearrangement in the immunoglobulin heavy chain gene, using cytological specimens, is useful in cytological diagnosis of malignant lymphoma.

文 献

- 1) Kitamura, Y., Nanba, E., Inui, S., Tanigawa, T., Ichihara, K. Diagnosis of lymphoma in paraffin wax section by nested PCR and immunohistochemistry. *J. Clin. Pathol.* 1996 ; 49 : 333~337.
- 2) Miettinen, M., Lasota, J. Polymerase chain reaction based gene rearrangement studies in the diagnosis of follicular lymphoma performance in formaldehyde-fixed tissue and application in clinical problem cases. *Pathol. Res. Pract.* 1997 ; 193 : 9~19.
- 3) 池澤 剛, 鈴木 悦, 野口雅之. 手軽に PCR. 臨床検査 2000 ; 44 : 921~922.
- 4) 福里利夫, 櫻井信司, 国崎きよみ, 中島 孝, 中里洋一. PCR 法による B 細胞の単クローン性の検討と悪性リンパ腫の補助診断への応用. *病理と臨床* 1997 ; 15 : 633~638.
- 5) Aiello, A., Delia, D., Giardini, R., Alasio, L., Bartoli, C., Pierotti, M.A., et al. PCR analysis of IgH and BCL 2 gene rearrangement in the diagnosis of follicular lymphoma in lymph node fine-needle aspiration. *Diag. Mol. Pathol.* 1997 ; 6 : 154~160.
- 6) Harris, N.L., Scully, R.E. Malignant lymphoma and granulocytic sarcoma of the uterus and vagina. A clinicopathologic analysis of 27 cases. *Cancer.* 1984 ; 53 : 2530~2545.
- 7) Grace, A., O'Connell, N., Byrne, P., Prendiville, W., O'Donnell, R., Royston, D., et al. Malignant lymphoma of the cervix. An unusual presentation and a rare disease. *Euro-J-Gynaecol-Oncol.* 1999 ; 20 : 26~28.
- 8) Amichetti, M., Chiappe, E., Mussari, S., Busana, L., Caffo, O., Botto, F., et al. Primary non-Hodgkin's lymphoma of the female genital tract. *Oncology Reports.* 1999 ; 6 : 651~654.
- 9) 森脇昭介, 万代光一. 婦人科領域のリンパ腫. *病理と臨床* 1994 ; 12 臨時増刊号 : 223~228.
- 10) 堀本江美, 小泉素生, 山川 康, 阿寒江悟, 福島道夫, 田中昭一・ほか. 子宮原発悪性リンパ腫の 1 例. *日臨細胞誌* 1990 ; 29 : 920~924.
- 11) 平園賢一, 篠塚孝男, 藤井明和, 島村数男, 覚道健一, 長村義之・ほか. 子宮頸部原発悪性リンパ腫の 1 例. *日臨細胞誌* 1991 ; 30 : 1199~1203.
- 12) Grosso, L.E., Collins, B.T. DNA polymerase chain reaction using fine needle aspiration biopsy smears to evaluate non-Hodgkin's lymphoma. *Acta-Cytol* 1999 ; 43 : 837~841.
- 13) Murphy, M., Signoretti, S., Nasser, I., Sherburne, B., Loda, M. Detection of concurrent/recurrent non-Hodgkin's lymphoma in effusions by PCR. *Hum-Pathol.* 1999 ; 30 : 1361~1366.