

免疫組織化学の基礎と応用

蓮井 和久 鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科・講師

この講義は、2007 年から大学院専門基礎過程の選択科目として開講しているものである。教科書には、改訂四版 渡辺・中根の酵素抗体法（名倉宏、長村義之、堤寛 編集）学際企画を用いています。それに、最近のポリマー法の開発等と私の研究への応用等を基礎にしています。

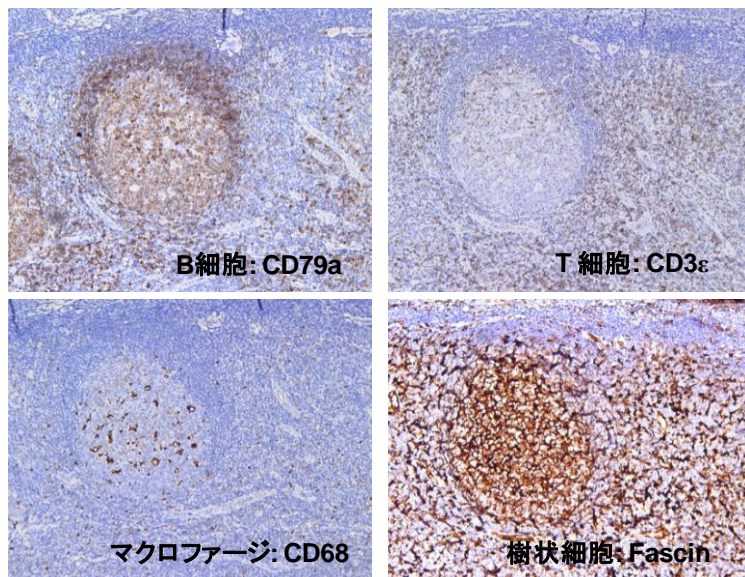
XII. 悪性リンパ腫の免疫組織化学

悪性リンパ腫は、リンパ球の悪性腫瘍で、肉腫の一つである。一般に、B細胞性、T・NK細胞性、ホジキンリンパ腫に大別され、更に、亜分類される。

悪性リンパ腫の免疫組織化学は、ホルマリン固定パラフィン包埋標本作製の自動化と抗原回復法の導入、それに、パラフィン切片でも使用可能な抗体の作製・供給により、その（外科）病理診断に於いては無くてはならないものとなっている。

悪性リンパ腫の免疫組織化学は、1) リンパ腫細胞の系列と分化レベルの検出、2) 特異な形質の検出、a. 原因（遺伝子異常、染色体異常、細菌、ウイルス感染の検出） b. 原因から誘導された特異形質の検出、3) 特異な間質細胞の特徴の検出が期待されている。

悪性リンパ腫の免疫組織化学的診断を行うには、正常リンパ組織でのB細胞、T細胞等の免疫組織化学的特徴を理解する必要がある。右図（口蓋扁桃組織）は、B細胞を汎B細胞マーカーであるCD79aで、T細胞は汎T細胞マーカーのCD3εで、マクロファージは汎マクロファージマーカーのCD68で、樹状細胞は汎樹状細胞マーカー



の Fascin で、通常のクエン酸緩衝液 pH6 中でオートクレーブで熱による抗原回復して、ポ

リマー法で検出したものである。B細胞は濾胞を構成し、胚中心にも多く分布する。T細胞は濾胞周囲に分布し、肺中心に僅かに認められる。マクロファージは、胚中心にも分布している。樹状細胞(DC)は、一面に分布し、濾胞の Follicular DC(FDC)や濾胞周囲に Interdigitating DC (IDC)が認められる。

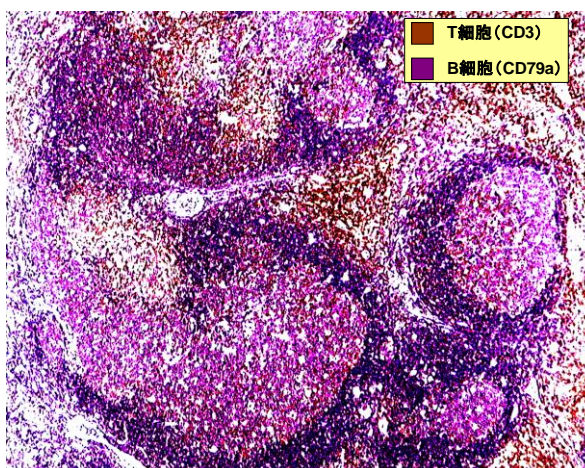
1) リンパ腫細胞の系列の免疫組織化学

一般的な悪性リンパ腫の最終的な診断は、クロナリティーの証明による。例えば、B細胞性リンパ腫では **Ig H 遺伝子の、T細胞性リンパ腫ではT細胞受容体 (TCR)遺伝子の再構成と云ったゲノタイプ**の検出で診断される。しかし、NK細胞性リンパ腫ではゲノタイプでの診断が一般には出来ない。

そこで、悪性リンパ腫細胞の**単一形質性 (モノタイプ)**を持って一般に診断されている。

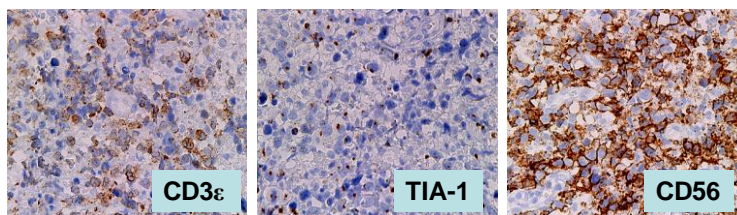
悪性リンパ腫の免疫組織化学は、リンパ腫細胞のモノタイプを検出する。

右図は、口蓋扁桃組織の **CD3ε** (DAB 発色がグリシン処理にてやや明調になっている)と **CD79a** (VIPによる紫の発色)の Elution 法による二重染色であり、B細胞が優勢な胚中心を伴う濾胞形成とその周囲のT細胞の分布を認める。



この**T細胞性 (CD3ε/CD5/UCHL-1/MT-1 他) と B細胞性 (CD79a/L26/MB-1 等) 形質の通常染色と二重染色**は、B細胞性とT細胞性リンパ腫の鑑別診断に用いることが、**細胞系列のモノタイプの検出**により可能である。

右図では、鼻のNK/T細胞性リンパ腫細胞が、**CD3ε**、TIA-1(細胞毒性顆粒)、**CD56** (NK細胞マーカー)の免疫染色



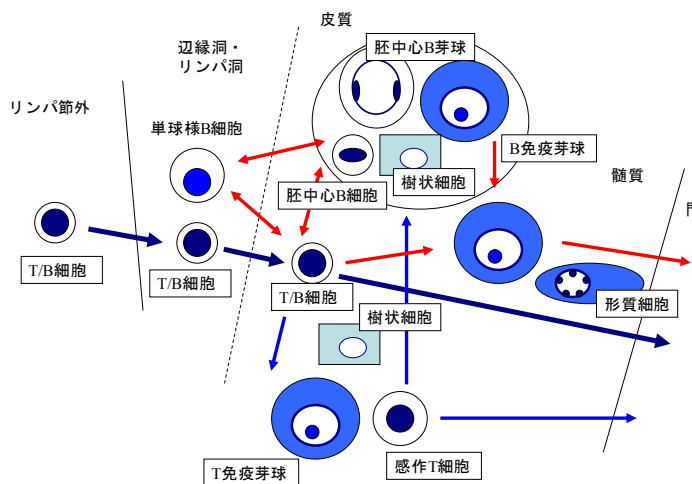
(0.01M クエン酸緩衝

液 pH6 での熱による抗原回復とポリマー法) で、**CD3ε 陽性あるいは陰性、TIA-1 陽性、CD56 陽性**でNK細胞性リンパ腫細胞と、**CD3ε 陽性、TIA-1 陽性、CD56 陰性**は**CD8**で標識される細胞傷害性T細胞性リンパ腫細胞と評価されるが、これも、**NK/T細胞性リンパ腫細胞のモノタイプの形質の検出**によるものである。

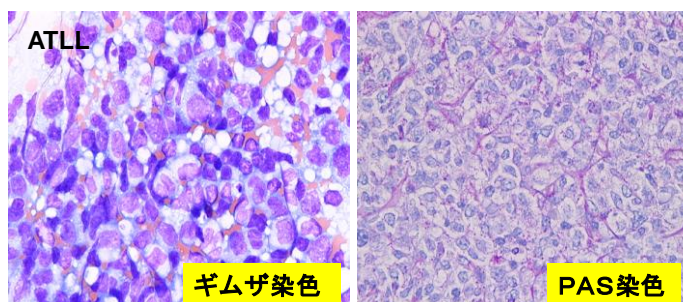
2) リンパ球とリンパ腫細胞の形態

リンパ球は、リンパ節やリンパ装置で、その形態を大きく変える。

右図に示すように、小リンパ球、格異型小リンパ球（マントル細胞、胚中心細胞等）、大リンパ球（胚中心芽球、活性化T細胞、免疫芽球）、形質芽球、形質細胞等のリンパ球が見られる。このそれぞれのリンパ球の形態を示す悪性リンパ腫細胞があり、この形態の表現がリンパ腫の亜分類の表現に用いられている。



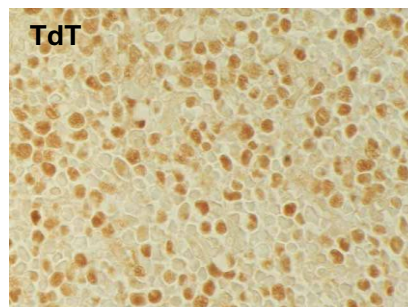
右図は成人T細胞白血病ないしリンパ腫(ATLL)のリンパ節の捺印標本のギムザ染色と病理標本のPAS染色であるが、ATLL細胞はギムザ染色の淡明な塩基好性の細胞質を示し、PAS陽性顆粒(グリコーゲン)を有し、形態的にはT免疫芽球の形態を示す。しかしその原因論的分類として human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I)によるリンパ腫として独立した亜型と扱われている。



3) リンパ腫細胞の分化レベルを知る免疫組織化学

a. Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)

小リンパ球性のリンパ腫の中に、前駆 B/T細胞性リンパ芽球性白血病ないしリンパ腫がある。このリンパ腫細胞は、未熟な細胞の特徴である TdT を有している。右図には、このリンパ腫の TdT 染色（抗原回復なしで、抗 TdTモノクローナル抗体のカクテルで標識し、ABC法で検出）を示す。

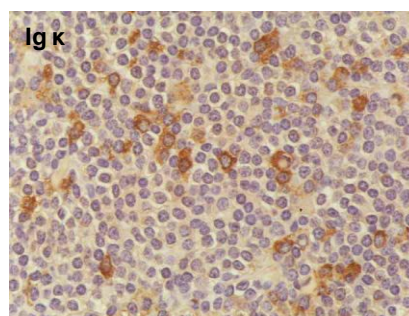


b. 免疫グロブリン(Immunoglobulin: Ig)

Igには、B細胞受容体(BCR)として細胞膜に存在するsIgと細胞質に存在するcIgがある。B細胞は、分化段階で、胚中心細胞まではsIgのみであるが、胚中心細胞以降では、sIgに加えてcIgが出現する。

従って、B細胞性リンパ腫細胞のsIgに関するモノタイプの検出は病理診断に有用な情報を提供する(4M尿素溶液による電子レンジ・マイクロウェーブでの加熱抗原回復とsABC法にて、非常淡く、sIgの検出が可能である(Hasui K, Jia HM, Jia XS, Nomoto M, Sato E. Antigen retrieval in paraffin-immunohistochemistry detecting monoclonality of immunoglobulin light chain in B-cell malignant lymphomas. Lymphoreticular cells and disease, Proceedings of the fourth Japanese-Korean Lymphoreticular Workshop, Hara H and Lee JD eds., p.321-329, Lymphoreticular Study Group, Department of Pathology, Kochi Medical School, Nankoku, Japan, 1995)。最近の高感度のポリマー法等では、十分にsIgの検出の病理診断への導入が可能と思われる。

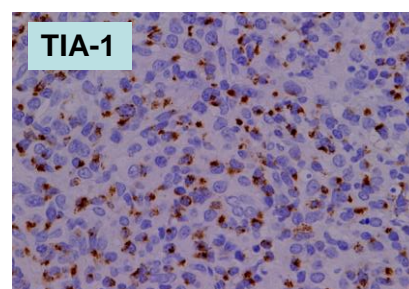
一方、cIgのB細胞リンパ腫の病理診断への導入は行われている。右図はリンパ形質細胞性リンパ腫(Immunocytoma)で、リンパ腫細胞は小リンパ球と形質細胞への分化を示し、小リンパ球は細胞質の一部に、形質細胞への分化を示す細胞は細胞質全体に、Igκ(軽鎖)のモノタイプの形質を示す(これを、免疫グロブリン軽鎖拘束: Light chain restrictionと表現される)。



免疫染色で判別が難しい場合には、Igκ/λのmRNAのin-situ hybridization (ISH)が実用化されている。

c. 細胞毒性顆粒 (TIA-1, Granzyme B, Perforin)

T・NK細胞で、細胞傷害T細胞やNK細胞への分化は、細胞毒性顆粒の免疫組織化学的検出で知ることが出来る(前術)。TIA-1については、細胞変性が強い標本でも、比較的良好な染色結果が得られることから、有用である。右図は、鼻NKTCL細胞のTIA-1染色である



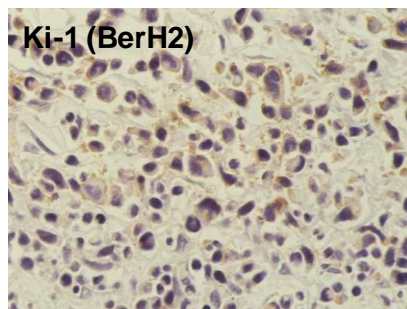
(0.01Mクエン酸緩衝液 pH6でのオートクレーブによる熱による抗原回復とポリマー法)。

4)リンパ腫細胞の特異な形質の検出

a. リンパ腫の発病原因となるものには、遺伝子異常、染色体異常、細菌、ウイルス感染等がある。

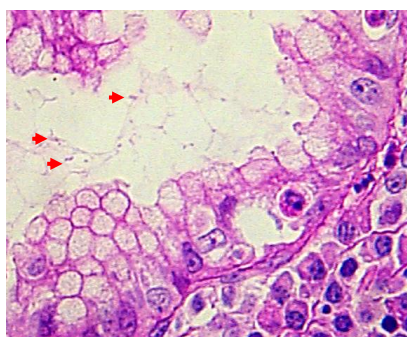
i) リンパ腫の発病原因となる遺伝子・染色体異常

リンパ腫の発病原因となる遺伝子・染色体異常には、**マントル細胞リンパ腫**の **t(11:14) (q13;q32)**の転座による **Cyclin D1** の高発現、**退形成性大細胞性リンパ腫 (ALCL)** の **t(2:5)(p23;q35)**による **nucleophosmin (NPM)**と **anaplastic lymphoma kinase (ALK)**のキメラ遺伝子によるその蛋白発現が知られている。右図は若年者のALCLでKi-1 (BerH2)が陽性である。ALCLには予後が比較的良好な若年症例とその他のものがある。



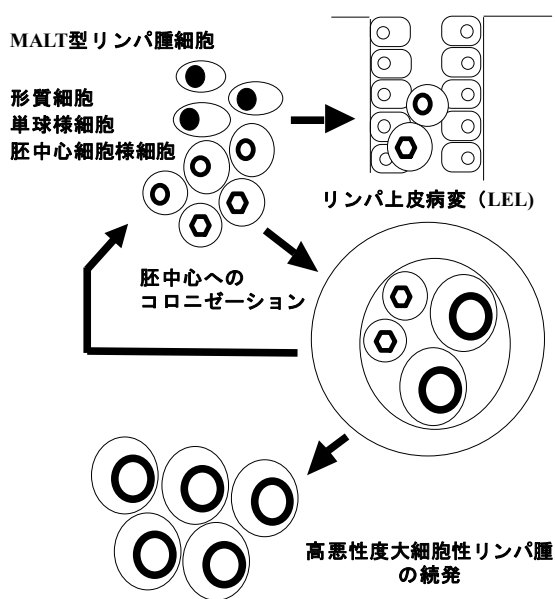
ii) リンパ腫の発病原因となる細菌

リンパ腫の発病原因となる細菌にはピロリ菌が知られている。ピロリ菌は、胃底腺領域の粘膜表面の粘液コートの粘膜面や腺腔の粘液内に、ヘマトキシリンに染まる残渣様物として観察される (右図)。



ピロリ菌の感染で、胃粘膜に炎症性病変、胃潰瘍形成、胃癌、胃の粘膜付属リンパ装置 (MALT)の過形成(RLH)や MALT 型リンパ腫を発生させる。ピロリ菌の検出には、抗ピロリ菌抗体やピロリ菌体のリポポリサッカライド(LPS)の免疫染色で検出が可能である(Hasui K, Nakamura T, Yonezawa S, Sato E, Jia XS, Nakagawa M, Yashiki S, Izumo S, Murata F. Immunohistochemical analysis of the pathogenicity of helicobacter pylori infection: Excess nitric oxide induced indirectly by Lewis X and Y is the cause of the pathogenicity of helicobacter pylori Infestation in the stomach. Acta Histochem Cytochem 35 (2) : 93-100, 2002)。

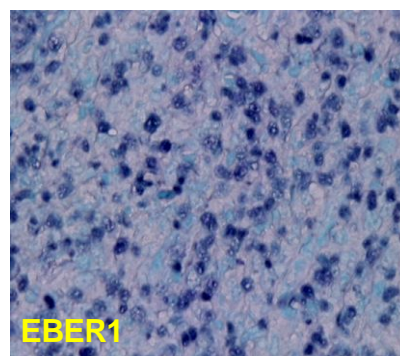
MALT 型リンパ腫細胞は、形質細胞、単球様細胞、胚中心細胞様細胞から成り、リンパ上皮病変を示すが、ピロリ菌の除菌にて、治癒するものが多い。その一方で、MALT の胚中心にコロニゼーションして、そこで大細胞性リンパ腫へ形質転換することがある。この段階では、ピロリ菌の除菌では効果がない。



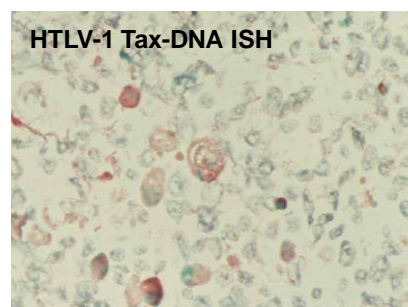
iii) リンパ腫の発病原因となるウイルス感染

リンパ腫の発病原因となるウイルス感染には、Epstein-Barr virus (EBV)、human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)、human herpes virus-8 (HHV-8)、human immunodeficient virus type 1 (HIV-1)等がある。

EBV は、アフリカで流行しているバーキットリンパ腫（後に、癌・増殖遺伝子の 8q24 にある c-myc 遺伝子の転座により免疫グロブリン遺伝子のプロモーターで強発現させられた胚中心リンパ球から胚中心芽球の中間段階の分化レベルにある B 細胞リンパ腫と判明）の研究の過程で見い出されたウイルスであるが、最近では、鼻 NK/T 細胞リンパ腫や膿胸後リンパ腫、HIV1 感染に続発するリンパ腫等に、EBV 感染は見られる。EBV の LMP 蛋白発現等を検出する免疫組織化学があるが、一般には、EBV-encoded small RNA-1 (EBER-1)の ISH で、その潜伏感染を含めて、検出出来る。右図は、鼻 NK/T 細胞リンパ腫の EBER-1 の ISH 像である。



HTLV-1 は、成人T細胞リンパ腫ないし白血病(ATLL)の原因ウイルスであると知られている。従って、HTLV-1 関連蛋白の免疫組織化学は、ATLL 診断に用いることが可能と思われる。その詳細は次項で述べる。また、この HTLV-1 は RNA 型レトロウイルスであり、T細胞に感染すると、そのプロウイルス DNA として、感染したT細胞の DNA に組み込まれる。このプロウイルス DNA を polymerase chain reaction (PCR)で検出出来る。我々は、このことを利用して、ビオチン高度標識 DNA プローブを作製して、その ISH を行った。右図は、その ISH 像である (ISH の検出系には、ハイブリダイズしたプローブの



ビオチンをストレプトアビチン標識アルカリフォスタターゼ (ALP) を反応させ、次にビオチン溶液反応、再度のストレプトアビチン標識 ALP 反応を行う増感法を用いている。(Hasui K, Sato E. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) infection in malignant lymphomas in a HTLV-1-endemic area, Kagoshima, Japan: HTLV-1 in-situ-hybridization (ISH) analysis employing a highly biotinylated concatamer probe synthesized by polymerase chain reaction (PCR) for HTLV-1 proviral DNA pX Tax region. DENDRITIC CELLS 4:125-137, 1994. Hasui K, Sato E, Sueyoshi K, Kitajima S, Goto M, Nakamura T, Matsumoto D. Cold in-situ hybridization of human T-cell leukemia virus type-1: Production of biotinylated probes by polymerase chain reaction and improvement of procedures. DENDRITIC CELLS 5: 27-35, 1995)

しかしながら、現在、ATLLの診断には、患者血清中の抗HTLV-1抗体の検出情報か、プロウイルスDNAのクロナールな組み込みをサザンブロット解析で検出した情報を基に、行われている。

HHV-8は、原発性滲出性リンパ腫（B細胞リンパ腫）で検出される。

5) リンパ腫の特異な間質細胞の特徴

リンパ腫の特異な間質細胞である樹状細胞等の特徴からも、特定のリンパ腫は診断が可能である。

最も有名な間質細胞は、所謂T細胞リンパ腫の中の特殊型とされたレンネルトリンパ腫（Lymphoepithelioid lymphoma: LPL）の類上皮細胞の介在であるが。類上皮細胞の介在する病変はB細胞性リンパ腫を含めて多くのリンパ腫の亜型で認められた。

一方、濾胞性リンパ腫ではFDCの介在を伴い、末梢T細胞リンパ腫はIDCの介在を示し、鼻NK/T細胞リンパ腫は特異なマクロファージの介在を示す。これらの特徴は、悪性リンパ腫そのものの診断よりも、悪性リンパ腫の浸潤病変の検出に有用であるようだ。

この悪性リンパ腫の免疫組織化学は、以下にも、発表している。

蓮井和久 第2章 診断のための基本知識 免疫組織化学 リンパ球増殖疾患（青笹克之、森井英一 専門編集）癌診療指針のための病理診断プラクティス（青笹克之 総編集）中山書店 2010. pp. 10-18.

癌診療指針のための病理診断プラクティスは、日本病理学体系の続巻と企画された本で、リンパ球増殖疾患以外の巻が出版されている。