（様式　乙 8）

氏　　名	秋　岡　寿　一
（ふりがな）	（あきおか　としかず）
学位の種類	博士（医学）
学位授与番号	乙第　　号
学位審査年月日	平成 28 年 6 月 29 日
学位授与の要件	学位規則第４条第２項該当
学位論文題名	Three-color flow cytometry for the diagnosis of mature B-cell malignant lymphoma based on the kappa/lambda ratio of CD45-gated CD19-positive cells （CD45 ゲーティング CD19 陽性細胞の κ/λ 比を用いた 3 カラー解析フローサイトメトリーによる成熟 B 細胞リンパ腫の診断）
論文審査委員	（主）　教授　廣　瀬　善　信 教授　岡　田　仁　克 教授　髙　井　真　司

学位論文内容の要旨

《目　的》

悪性リンパ腫の診断においては、リンパ腫細胞の形態学的異常とモノクローナルな増殖を病理学的に確認する事が不可欠である。しかしながら、低悪性度リンパ腫など成熟 B 細胞腫瘍ではリンパ腫細胞は明瞭な形態学的変化に乏しく、非腫瘍性変化との鑑別やモノクローナルな増殖の確認が困難な例がみられる。造血器腫瘍の診断アプローチとして、病理組織学的手法と併用してフローサイトメトリーを用いた腫瘍細胞の表面抗原検索が広く用いられている。特に、リンパ腫細胞表面に発現する免疫グロブリンの κ/λ 比解析は、B 細胞腫瘍を、反応性リンパ節病変や非 B 細胞腫瘍と鑑別するのに有用であり、前者では κ 鎖と λ 鎖の発現が大きく乖離する事が知られている。したがって、κ/λ 比解析は成熟 B 細胞

腫瘍の診断に大きく寄与する情報と考えられるが、診断において適切と考え得る κ/λ 比ついて詳細に検討された報告は少ない。また、悪性リンパ腫診断におけるフローサイトメトリーでは、まずは散乱光サイトグラムでリンパ腫細胞と推測される領域をゲーティングするが、この方法では検索対象に正常血球が含まれてしまう。したがって、成熟リンパ球や単球が CD45 強陽性である一方、生理的な幼若細胞を含むリンパ腫細胞が CD45 弱陽性であることを利用した、CD45 ゲーティングが最近用いられている。さらに、B 細胞のゲーティングに有用なマーカーとして CD19 が知られており、この抗原は前駆 B 細胞を含むすべての分化段階において持続的に発現し形質細胞へ分化した段階で消失する分子量 95kDa の I 型膜貫通糖蛋白である。今回、3 カラーフローサイトメトリーを用い、CD45 ゲーティングを行った CD19 陽性細胞における κ 鎖と λ 鎖の発現を解析し、成熟 B 細胞リンパ腫の診断におけるその有用性を検討した。

《方　法》

2001 年 1 月から 2007 年 4 月までの間に、大阪医科大学附属病院血液内科で悪性リンパ腫を疑い精査を受けた 92 症例を対象とし、対象のリンパ節生検検体等を用いて得られた既存の情報を後向きに解析した。検体の内訳は、リンパ節 77 検体、末梢血 6 検体、骨髄血 6 検体、胸水 3 検体である。B 細胞腫瘍の最終病理診断は World Health Organization (WHO) 分類に則って行われた。病理学的に 64 症例が B 細胞リンパ腫と診断され（びまん性大細胞型リンパ腫 38 検体、濾胞性リンパ腫 18 検体、マントル細胞リンパ腫 5 検体、節外性辺縁帯リンパ腫 2 検体、Burkitt リンパ腫 1 検体)、他の 28 症例は非腫瘍性と診断されていた（反応性リンパ節炎 14 例、非特異的リンパ節症 5 例、濾胞過形成 4 例、正常リンパ節 5 例)。これら全ての検体を対象に行われたフローサイトメトリーの結果を解析し、CD45 ゲーティングでスクリーニングしたリンパ球分画の細胞を対象に、CD19 と、κ、λ、IgG、IgA、IgM および IgD の二重陽性細胞の割合を分析した。κ/λ 比は、CD19 陽性かつ κ 陽性細胞と、CD19 陽性かつ λ 陽性細胞の比率と定義した。誤診断率（偽陽性、偽陰性の全体に占める割合）が最少となる値を κ/λ 比の適切なカットオフ値とし、病理学的確定診断と

κ/λ 比の相関を Fisher 解析で検定した。

《結　果》

Ｂ細胞リンパ腫症例における κ 陽性率は 0.10 – 99.2% (mean ± 2SD, 43.6 ± 82.0%)、λ 陽性率は 0.10 – 99.8% (31.5 ± 74.2%)であった。非腫瘍性症例では、κ 陽性率は 20.6 – 92.8% (mean ± 2SD, 52.2 ± 7.8%)、λ 陽性率は 13.6 – 92.8% (42.8 ± 13.6%) であった。適切な κ/λ 比のカットオフ値を 1.6 より高値、もしくは 0.89 より低値と設定した場合、病理学的にＢ細胞リンパ腫と診断された 64 症例のうち 58 例(90.6 %)がこれに該当した。反応性リンパ節病変と B 細胞リンパ腫を鑑別できる感度および特異度は、それぞれ 100 % および 82.4 %（$p < 0.001$）であった。

《結　論》

悪性リンパ腫が疑われた症例のリンパ節検体等をフローサイトメトリーで解析した。病理学的確定診断の結果に基づいて、CD45 ゲーティングを行った CD19 陽性細胞の κ/λ 比を評価した結果、カットオフ値を 1.6 より高値、もしくは 0.89 より低値と設定することで、Ｂ細胞リンパ腫の診断精度を向上させることが可能と考える。

（様式　乙 9）

論 文 審 査 結 果 の 要 旨

悪性リンパ腫の診断確定において病理組織診断は必須であるが、同時に、詳細な組織型の確定には、形態学的評価に加えて、表面抗原などの免疫学的解析や染色体・遺伝子解析が不可欠である。いずれの所見も診断における重要性は病型毎に異なるため、多彩な病態を呈しうる悪性リンパ腫の診断においては、複数の手法でアプローチした総合的な判断が必要である。

成熟 B 細胞腫瘍では、腫瘍細胞は明瞭な形態学的変化に乏しい例やクローナルな増殖が確認しがたい例があり、HE 染色標本のみでは、反応性の濾胞増殖など、非腫瘍性変化との鑑別が困難であることが問題となる。リンパ腫病変に対する免疫学的手法としては免疫組織学的手法とフローサイトメトリーが用いられており、反応性病変との鑑別と病型分類の補助として有用性が高い。

申請者は、CD19 細胞表面抗原が前駆 B 細胞から持続的にほぼ全分化過程を通じて発現する優れた B 細胞特異的マーカーであることと、B 細胞リンパ腫では細胞表面免疫グロブリン軽鎖（κ 鎖、λ 鎖）の発現に乖離がみられることに着目し、B 細胞腫瘍における κ/λ 比の診断的有用性について検討した。

申請者はまず、リンパ節生検等で得られた検体を 3 カラーフローサイトメトリーで解析し、CD45 ゲーティングを行った CD19 陽性細胞における κ 鎖と λ 鎖の発現を検討した。κ/λ 比は、CD19 陽性かつ κ 陽性細胞と、CD19 陽性かつ λ 陽性細胞の比率と定義した。誤診断率（偽陽性、偽陰性の全体に占める割合）が最少となる値を κ/λ 比の適切なカットオフ値とし、病理学的確定診断と κ/λ 比との相関を Fisher 解析で検定した。その結果、適切な κ/λ 比のカットオフ値を 1.6 より高値、もしくは 0.89 より低値と設定した場合、B 細胞リンパ腫と診断された 64 症例のうち 58 例（90.6 %）がこれに該当した。反応性リンパ節病変と B 細胞リンパ腫を鑑別できる感度および特異度は、それぞれ 100 % および 82.4 %（$p < 0.001$）であった。

申請者が今回試みた CD19 陽性かつ κ あるいは λ 陽性細胞を用いる解析法は、これまで報告されていないものであり、確認された κ/λ 比のカットオフ値を用いることは、B 細胞

リンパ腫の診断精度の向上に寄与すると考えられる。したがって、その知見は今後における悪性リンパ腫の診断治療に少なからず貢献するものと思われる。

以上により、本論文は本学学位規程第 4 条第 2 項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

（主論文公表誌）

Bulletin of the Osaka Medical College　62(1, 2):　1-9, 2016