

---



---

原 著

---



---

## 脳原発リンパ腫における免疫グロブリン遺伝子の解析

新潟大学脳研究所分子神経病理学分野 (主任: 熊西敏郎教授)

遠藤 純 男

Analysis of Immunoglobulin Gene in the Brain Lymphomas

Sumio ENDO

*Department of Molecular Neuropathology,  
Brain Research Institute, Niigata University, Niigata  
(Director: Prof. Toshiro KUMANISHI)*

We examined 6 brain lymphomas, pathologically diffuse large B-cell lymphoma, for rearrangements of immunoglobulin heavy chain gene. We amplified the rearranged  $V_H-D-J_H$  sequences by RT-PCR, sequenced them, and confirmed their patient- or specimen-specificity by in situ hybridization of individual lymphoma tissues with the use of their own CDR3 sequences as probes. In subsequent comparative nucleotide analysis and mutation analysis, we found frequent use of  $V_H4$  gene family (4/6 cases), in particular  $V4-34$  gene (3/6 cases), and, in all the 6 brain lymphomas, frequent somatic mutations (8.8–27.3%, mean 18.2%) with a significantly low frequency of R (replacement) mutations in the framework regions of  $V_H$  gene. These findings suggested that brain lymphomas are related with germinal center lymphocytes, and composed of relatively homogenous tumors in respect of immunological nature.

---

Key words: Brain lymphoma, immunoglobulin gene, in situ hybridization, somatic mutation, on going mutation, germinal center  
脳原発リンパ腫, 免疫グロブリン遺伝子, in situ hybridization, 体細胞突然変異, on going mutation, germinal center

---

Reprint requests to: Sumio ENDO,  
Department of Molecular Neuropathology,  
Brain Research Institute,  
Niigata University,  
Asahimachi-Dori 1-757,  
Niigata City, 951-8585, JAPAN

別刷請求先: 〒951-8585 新潟市旭町通1-757  
新潟大学脳研究所分子神経病理学分野  
遠藤 純 男

## はじめに

脳原発リンパ腫は高齢者の脳実質内に発生し、全身臓器にはリンパ腫は認められない<sup>1)</sup>。病理学的には、ほとんどの脳原発リンパ腫は diffuse large B cell lymphoma に分類される<sup>2)</sup>。発生頻度は頭蓋内腫瘍の 1～3%と低いが<sup>3)</sup>、近年次第に増加の傾向にある<sup>3)</sup>。本腫瘍の臨床的、病理学的、免疫組織化学的研究は既に多数報告されているが<sup>1)–4)</sup>、腫瘍性 B リンパ球の分子生物学的特性やその組織発生を含めて未解決の問題が多く残されている。

一般に B リンパ球では、免疫グロブリン重鎖と軽鎖遺伝子が再構成される<sup>5)</sup>。重鎖では、germ line の variable ( $V_H$ ), diversity (D), joining ( $J_H$ ) 遺伝子がそれぞれ 1 つずつ選択されて再結合する結果、再構成  $V_H-D-J_H$  遺伝子配列に多様性が生じる<sup>6)</sup>。この多様性は、体細胞突然変異や、 $V_H-D$  と  $D-J_H$  接合部での塩基の欠失や挿入がおこるため更に高くなる<sup>7)–9)</sup>。このためこの遺伝子接合部、すなわち complementarity determining region 3 (CDR 3) は、それぞれの再構成遺伝子ごとに、あるいは B 細胞ごとに極めて特異性が高い。

これまでのリンパ球増殖性疾患の研究では、この特異的な免疫グロブリン遺伝子再構成を Southern blot にて検出し、腫瘍の診断やクロナリティーの解析に利用されて来た<sup>4)</sup>。近年は、PCR 法が再構成遺伝子を迅速、鋭敏に検出し、遺伝子分離も容易であることから Southern blot に代わって汎用されている<sup>10)11)</sup>。しかし、PCR 法にはこれらの利点と同時に、留意すべきいくつかの技術的な難点がある。その一つは腫瘍組織に共存する正常あるいは反応性のリンパ球に起因する DNA 増幅である<sup>12)–16)</sup>。コンタミネーションによる DNA 増幅も稀ではない。これまでの研究には、PCR の反応条件を改善する試みや<sup>13)14)17)–24)</sup>、PCR 産物の特異性を証明する試み<sup>22)25)–30)</sup> を、種々の方法で行ったものもある。しかし、非特異的な DNA 増幅の可能性を完全に排除するには到っていない。

本研究では、脳原発リンパ腫 6 例を対象として、免疫グロブリン重鎖遺伝子の再構成について検討した。まず再構成  $V_H-D-J_H$  配列を RT-PCR にて増幅し、その特異性を CDR 3 配列をプローブとした in situ hybridization (ISH) にて決定した。次に  $V_H-D-J_H$  配列を germ line 遺伝子の塩基配列と比較解析し、その変異パターンを明らかにした。

## 材料と方法

## 腫瘍組織：

未治療の脳原発リンパ腫 6 例の腫瘍組織を用いた。1 例 (症例 1) では、初発腫瘍摘出 9 ヶ月後に他の部位に再発した腫瘍組織も用いた。病理診断は全例 diffuse large B cell lymphoma であった (表)。

## RT-PCR クローンの単離：

DNase-1 処理 total RNA 5  $\mu$ g から、Super Script TM Preamplification System (Gibco BRL, Grand Island, NY) により、オリゴ (dT) プライマーで逆転写を行った。その後の PCR は 2 組のプライマーの組合わせを用いて行った。Northern blot 解析では全てのリンパ腫に IgM mRNA の発現が認められたので (表)、いずれのプライマーの組合わせにも  $C\mu$  領域 5' 端に一致する  $C\mu$  アンチセンスプライマー (5'-GGTTGGGGCGGATGCACT-3') を用いた (図 1)。センスプライマーには、1 組の組合わせでは IgH  $V_H$  のフレームワーク (FR) 2 領域の 5' 端に相当する FR 2 A プライマー (5'-TGG (A/G) TCCG (C/A) CAG (G/C) C (C/T) (C/T) CNGG-3')<sup>31)</sup> を、また他の組合わせでは 7 種類の  $V_H$  ファミリー特異的リーダープライマー<sup>32)</sup> を用いた (図 1)。これらのプライマーにより、部分的  $V_H-D-J_H$  (np 120 ~ 約 300) と全長  $V_H-D-J_H$  (np 1 ~ 約 300) を増幅した (図 1)。PCR は AmpliTaq DNA polymerase (Perkin Elmer) を用いて行った。PCR 産物は電気泳動で精製し、pBluescript-SK (+) を用いてクローン化した。

## RT-PCR クローンの塩基解析：

RT-PCR クローンの塩基解析は Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI, Foster City, CA) と Applied Biosystems 373 S DNA Sequencer を用いて行った。それぞれの腫瘍ごとに、部分的  $V_H-D-J_H$  は 10~16 クローン、また全長  $V_H-D-J_H$  は 4~6 クローンについて解析した。

## CDR 3 オリゴヌクレオチドプローブの作成：

各リンパ腫から RT-PCR 法にて検出された CDR 3 配列をもとに 41~48mer のアンチセンスオリゴヌクレオチドプローブを作成し、in situ hybridization (ISH) に用いた。CDR 3 領域の短い症例では、隣接す

症例	年齢 ／性	腫瘍 部位 <sup>a)</sup>	診断 <sup>b)</sup>	V <sub>H</sub> 遺伝子	変異の 頻度	変異の 総数	変異の 領域 <sup>c)</sup>	変異の種類 <sup>d)</sup>		p Value <sup>e)</sup>	J <sub>H</sub> 遺伝子
								R	S		
1	65/男	F	DLB μ	V4-34	20.6%	60	FR	17	22	<0.001	JH4
							CDR	10	11	NS	
2	61/女	F	DLB μ	V4-34	21.3%	62	FR	19	20	<0.001	JH4
							CDR	11	12	NS	
3	58/男	F	DLB μ	V3-15	27.3%	82	FR	34	26	0.003	JH5
							CDR	13	9	NS	
4	54/女	P	DLB μ	V4-59	16.2%	47	FR	16	14	0.001	JH3
							CDR	9	8	NS	
5	78/男	C	DLB μ	V3-23	8.8%	26	FR	6	5	<0.001	JH4
							CDR	12	3	<0.001	
6	73/男	P	DLB μ	V4-34	14.8%	43	FR	9	20	<0.001	JH5
							CDR	11	3	NS	

表 IgH V<sub>H</sub> 遺伝子の体細胞性変異

- a) F, 前頭葉; P, 頭頂葉; C, 小脳
- b) DLB, diffuse large B cell lymphoma; μ, IgM 発現
- c) FR, framework 領域 1 ~ 3; CDR, complementarity determining region 1 + 2
- d) R, replacement 変異; S, silent 変異
- e) 期待値と比較して, R 変異が FR 領域で有意に少ないか, CDR 領域で有意に多いかの検定を, Lossos ら<sup>34)</sup> の multinominal distribution model で行った結果. Chang と Casali<sup>35)</sup> の binominal distribution model でも検定を行ったが, ほぼ同様の検定結果が得られた.  
; NS, 有意差無し.

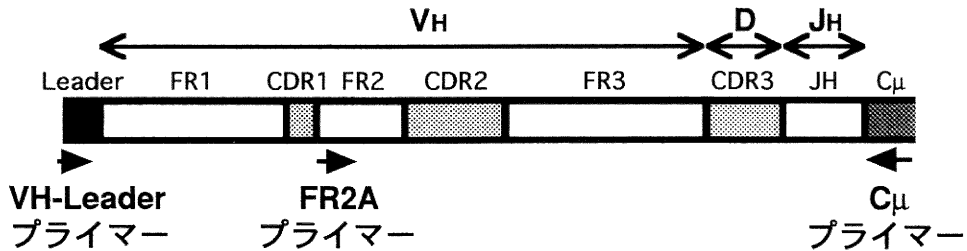


図1 IgH mRNA の構造と, RT-PCR で用いたプライマー部位

る V<sub>H</sub> あるいは J<sub>H</sub> 領域の塩基配列を15-30%程度プローブ配列に含めた(図5).

In situ hybridization (ISH) 解析:

RT-PCR により得られた CDR 3 配列の特異性を検討する為に, それぞれの CDR 3 プローブを用いてリンパ腫組織の凍結切片に対して ISH を行った. 10 μm の凍結切片を, 4%パラホルムアルデヒド/0.1M PBS, pH 7.2 で30分間固定し, 2 mg/ml グリシン/

PBS で20分間, 次いで0.25%酢酸/0.1M Tris, pH 8.0 で10分間処理した. Prehybridization<sup>33)</sup> は42℃で3時間, hybridization<sup>33)</sup> は<sup>35</sup>S 標識オリゴヌクレオチドプローブ (5 × 10<sup>3</sup> cpm/μl) にて42℃, 16時間おこなった. 切片は0.1 × SSC/0.1%サルコシル, 42℃にて洗い, 脱水後, NTB2 nuclear track emulsion (Kodak, Rochester, NY, USA) を用いて4℃にて4~8週間オートラジオグラフィを行った. 切片は, Fujix BAS 5000 イメージアナライザー (Fuji Photo

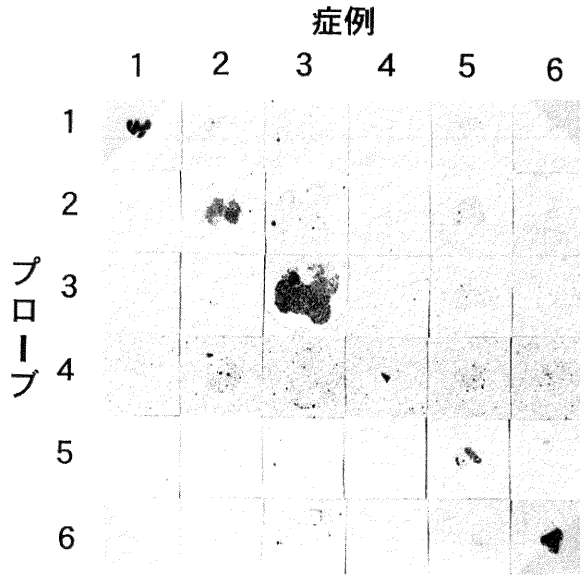


図2 CDR 3 プロープによる脳原発リンパ腫の in situ hybridization BAS 5000 イメージアナライザーによる解析

リンパ腫 6 例全例において, 同一患者由来の CDR 3 プロープを用いた時のみ明瞭なシグナルが検出され, 異なる患者の CDR 3 プロープではシグナルはみられなかった.

Film co., Tokyo) でも観察した. 対照実験は, 標識プロープに25倍量の未標識プロープを加えた hybridization 溶液を用いて行った.

#### 変異の解析:

リンパ腫の  $V_H$  遺伝子の種類は, もっとも多数のクローンでみられた塩基配列を GenBank データベースの germ line 遺伝子の塩基配列と比較し, 最もホモロジーの高い germ line 遺伝子を, リンパ腫の  $V_H$  遺伝子の由来と決定した. また, それぞれのリンパ腫の体細胞突然変異の数と変異の頻度も同時に決定した. 変異のパターンの解析では, FR 領域 (FR 1 ~ FR 3) と, CDR 領域 (CDR 1 と CDR 2) ごとに, replacement (R) 変異と silent (S) 変異の数を決定し, FR 領域と CDR 領域の R 変異の頻度を Lossos ら<sup>34)</sup>の方法と Chang and Casali<sup>35)</sup>の方法に従って検定した. Intracлонаl heterogeneity の解析では, Lossos ら<sup>34)</sup>の方法に従って, 塩基置換が2クローン以上で認められた場合を変異と考えた.

## 結 果

再構成  $V_H-D-J_H$  クローンの単離:

再構成  $V_H-D-J_H$  の部分配列と全長配列に対する RT-PCR 産物は, 電気泳動上, 予想通りのサイズの単一バンドとして検出された. それらに由来するほとんど全ての RT-PCR クローンは, 配列が全く同一の, あるいはほぼ同一の  $V_H-D-J_H$  配列が含まれており, いずれも in frame であった. いずれのリンパ腫でも CDR 3 配列に関しては, 全てのクローンで完全に一致し, そのサイズは30~57bp であった. CDR 3 配列はリンパ腫特異的であった (図5). CDR 3 以外の配列に関しては後記する.

In situ hybridization (ISH) 解析:

CDR 3 プロープを用いた ISH では, 6 例のリンパ腫切片の全てにおいて, 同一患者由来の CDR 3 プロープを用いた時のみ明瞭なシグナルが検出された. それは組織切片上のほとんど全てのリンパ腫細胞に認められた (図2, 図3-a). 同一患者 (症例1) の初発, 再発

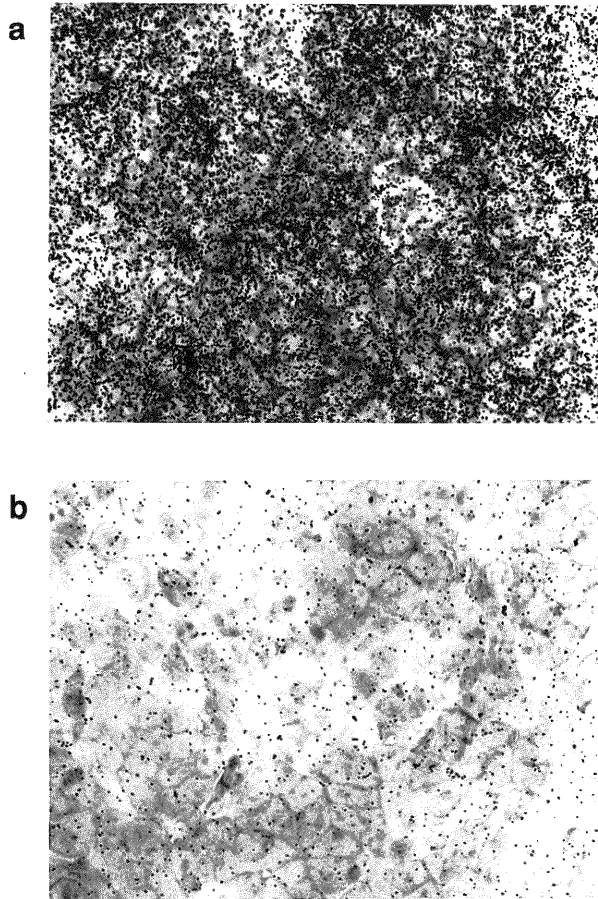


図3 CDR3プローブによる脳原発リンパ腫の in situ hybridization の例

- (a) 症例3由来の標識 CDR3 プローブで、症例3の切片を用いて行った ISH. ほとんど全ての腫瘍細胞にシグナルが認められた.
- (b) 症例3の標識 CDR3 プローブに25倍量の未標識プローブを加えた ISH の対照実験. a と比べて、シグナルの著明な減少が観察された.

リンパ腫の ISH では両者のいずれに由来するプローブでもシグナルが検出された (図略). 一方、異なる患者の CDR3 プローブでは、いずれのリンパ腫切片でも明瞭なシグナルは全くみられなかった (図略). 以上の結果から、単離された  $V_H-D-J_H$  はそれぞれのリンパ腫の腫瘍細胞由来であることが明確に確定された. また、ISH シグナルがほとんど全ての腫瘍細胞にみられるこ

とから、それぞれのリンパ腫のモノクロナリティーが確認された (図3-a). 1例 (症例1) の初発と再発リンパ腫でも同一起源の腫瘍細胞のみから構成されることが明らかにされた.

対照の競合実験では、標識プローブに25倍量の未標識プローブを加えることによってシグナルが著明に減少することが観察された (図3-b).

A V4-34 (症例 1、2、6)

FR1															CDR1																					
1	5	10	15	20	25	30	31	34	1	5	10	15	20	25	30	31	34																			
症例	CAG	GTC	CAG	CTA	GAA	CAG	TGG	GCC	GCA	GGA	CTG	TTC	ATG	GCT	TGG	GAG	ACC	CTG	TCC	CTC	ACC	TGC	GCT	GTC	TAT	GAT	GGG	TCC	CTC	AGT	GCT	TTC	TTC	TCC		
1	..a	..	A..	E..	G.g	...	...	A..	...	..a	...	..a	..	..a	..	..a	..	..g	..	..g	..	..g	..	..a	..	..E	...	..g	..	..Ac	..Tg	...	..TC	..GT	...	
2	..	..a	..C	...	...	...	...	..A	..	..a	..	..G	..	..T	..g	..	..C	..	..T	..A	..	..E	..	..g	..	..a	..	..g	..	..	..	..g	..	..T	..T	..
6	..	..	..	..	..g	...	...	..A	...	...	...	..A	..	..C	...	...	...	...	...	...	...	..g	...	..E	...	...	..A	...	..	..	..	..	..	..	..C	...

FR2															CDR2															FR3						
35	40	45	50	55	60	65	68	1	5	10	15	20	25	30	31	34																				
症例	AGC	TGG	ATC	GCC	CAG	CCC	CCA	GGG	ANG	GGG	CTG	GAG	TGG	ATT	GGG	GAA	ATC	AAT	GAT	AGT	GGA	AGC	ACC	AAC	TAC	AAC	CCG	TCC	CTC	ANG	AGT	GGA	GTC	ACC		
1	..At	...	...	...	...	...	...	...	...	..a	...	..a	...	..a	..	..g	..	..C	..AA	...	..A	..G	..	..Cg	..	..c	..T	..g	...	..	..	..	..	..T	..	
2	..T	..	..	..	..	..	..a	..G	..	..a	..	..a	..	..C	..A	..a	..A	..A	..GA	..	..c	..tc	..Gt	..C	..t	..E	..	..	..	..	..	..	..	..	..G	..
6	..At	...	...	..c	...	..a	..a	..a	...	..a	..	..a	..	..c	..A	..	..G	...	..T	..TA	..	..G	..Gt	..	..T	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..

69	70	75	80	82	82a	82b	82c	83	85	90	94																										
症例	ATA	TCA	GTA	GAC	AGG	TCC	ANG	AAC	CAG	TTC	TCC	CTG	ATG	CTG	AGC	TCT	GTC	ACC	GCC	GCG	GAC	AGG	GCT	GTC	TAT	TTC	TGT	GCG	AGA								
1	..G	..	..g	...	...	..t	..a	..	..G	..	..C	..	..G	..	..C	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	
2	G.G	..T	..g	..	..T	..g	...	..a	...	..t	...	..a	..	..C	..G	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
6	..	..	..g	...	..a	...	..t	G.a	E.a	..G	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	..	..T	..	..E	..	..	..	..	..	..	..	..	..C	..

B V3-15 (症例 3)

FR1															CDR1																					
1	5	10	15	20	25	30	31	34	1	5	10	15	20	25	30	31	34																			
症例	CAG	GTC	CAG	CTG	GTC	GAG	TCT	GGG	GGA	GCC	TTC	GTA	ATG	GCT	GGG	GGA	TTC	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA	GCC	TCT	GGA	TTC	ACT	TTC	AGT	AAC	GCC	TGG	ATG			
3	..	..	..	..	..	..	..Gg	...	..A	..	..C	Act	..	..C	..	..A	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..

FR2															CDR2															FR3						
35	36	40	45	50	52	52a	52b	52c	53	55	60	65	1	5	10	15	20	25	30	31	34															
症例	AGC	TGG	GTC	GCC	CAG	GCT	CCA	GGG	ANG	GGG	CTG	GAG	TGG	ATT	GGG	GAT	ATC	TAT	TAC	AGT	GGG	AGC	ACC	AAC	TAC	AAC	CCG	TCC	CTC	ANG	AGT	GGA	GTC	ACC		
3	..T	..t	Gtg	...	..g	...	..c	..	..C	..	..c	..	..g	..	..E	..	..G	..	..A	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..

66	70	75	80	82	82a	82b	82c	83	85	90	94																									
症例	AGA	TTC	ACC	ATC	TCA	AGA	GAT	GAT	TCA	AAA	AAC	ACG	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	AAA	ACC	GAG	GAC	ACA	GCC	GTC	TAT	TAC	TGT	GCG	AGA				
3	..	..t	Gtg	...	..g	...	..c	..	..C	..	..g	..	..t	..G	..	..C	..	..G	..	..A	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..

C V4-59 (症例 4)

FR1															CDR1																						
1	5	10	15	20	25	30	31	34	1	5	10	15	20	25	30	31	34																				
症例	CAG	GTC	CAG	CTG	CAG	GAG	TCT	GGG	GGA	GCC	TTC	GTA	ATG	GCT	GGG	GGA	TTC	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA	GCC	TCT	GGA	TTC	ACT	TTC	AGT	AAC	GCC	TGG	ATG				
4	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..

FR2															CDR2															FR3							
35	36	40	45	50	52	52a	52b	52c	53	55	60	65	66	68	1	5	10	15	20	25	30	31	34														
症例	AGC	TGG	ATC	GCC	CAG	GCT	CCA	GGG	ANG	GGG	CTG	GAG	TGG	ATT	GGG	GAT	ATC	TAT	TAC	AGT	GGG	AGC	ACC	AAC	TAC	AAC	CCG	TCC	CTC	ANG	AGT	GGA	GTC	ACC			
4	..A	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..

69	70	75	80	82	82a	82b	82c	83	85	90	94																										
症例	ATA	TCA	GTA	GAC	AGG	TCC	ANG	AAC	CAG	TTC	TCC	CTG	ATG	CTG	AGC	TCT	GTC	ACC	GCT	GCG	GAC	AGG	GCC	GTC	TAT	TTC	TGT	GCG	AGA								
4	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..

D V3-23 (症例 5)

FR1															CDR1																						
1	5	10	15	20	25	30	31	34	1	5	10	15	20	25	30	31	34																				
症例	CAG	GTC	CAG	CTG	TTC	GAG	TCT	GGG	GGA	GCC	TTC	GTA	ATG	GCT	GGG	GGA	TTC	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA	GCC	TCT	GGA	TTC	ACT	TTC	AGT	AAC	GCC	TGG	ATG				
5	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..

FR2															CDR2															FR3							
35	36	40	45	50	52	52a	53	55	60	65	67	1	5	10	15	20	25	30	31	34																	
症例	AGC	TGG	GTC	GCC	CAG	GCT	CCA	GGG	ANG	GGG	CTG	GAG	TGG	ATT	GGG	GAT	ATC	TAT	TAC	AGT	GGG	AGC	ACC	AAC	TAC	AAC	CCG	TCC	CTC	ANG	AGT	GGA	GTC	ACC			
5	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..

68	70	75	80	82	82a	82b	82c	83	85	90	94																										
症例	AGC	ATC	TCC	AGA	GAC	ACT	TCC	ANG	AAC	AGG	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	AGA	GCC	GAG	GAC	AGG	GCC	GTA	TAT	TAC	TGT	GCG	AGA							
5	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..

図 4 脳原発リンパ腫の V<sub>H</sub> 遺伝子の塩基配列

脳原発リンパ腫の V<sub>H</sub> 遺伝子の体細胞性変異の位置を, germ line 配列と比較して示した. 大文字は replacement (R) 変異, 小文字は silent (S) 変異を示す.

症例	FR3													CDR3			JH
	95	96	97	98	99	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	101	
	a b c d e f g h I j k																
1	<u>TCG AAA ATA GAA ACT TCG TGG GAC CAA ACT GCC GCG GGC GGG GCC AAT TAT GAC TTC</u>																
2	<u>TGT GCG AGA CGA ATC GAT TTT GAC AAT GGT TTG TCA TAT TAT</u>													<u>GAC TAT</u>			
3	<u>TAT TGT TGT ATA GAC AAA TCA GIG ICT GGA CGC GGT TTC</u>													<u>GAT TTC</u>			
4	<u>TGT GCG AAG GCC GGT GGA TAC AGT AAT GCT CTT</u>													<u>CIA TTG TGG CG</u>			
5	<u>GCG AAA TTG GCA ACA CGT TCT ACA CTG ACT TTC GAG</u>													<u>GAC TAC</u>			
6	<u>GT GCG ACC TCT TCT TCG ACT GTC ATG GGA CTT ACC GGG TGG TTC</u>													<u>GAC CCC</u>			

図5 脳原発リンパ腫の CDR 3 配列

CDR 3 配列は症例ごとに長さも配列も全く異なっていた。ISH に用いた CDR 3 プローブの配列を下線で示してある。プローブ配列には CDR 3 配列のみのものも、あるいは CDR 3 配列に FR 3, 又は J<sub>H</sub>, 又は両者の短い配列を付加したのを用いた。

症例	FR1		CDR1			FR2		CDR2		FR3					
	4	13	23	32	35	54	55	64	68	73	89	90	94		
1	( 5/ 6)	5'-												-3'	
	( 1/ 6)	5'-								C-				-3'	
	(10/11)					5'-								-3'	
	( 1/11)					5'-	G-							-3'	
3	( 2/ 4)	5'-												-3'	
	( 1/ 4)	5'-		A-										-3'	
	( 1/ 4)	5'-						G-						-3'	
	(10/10)					5'-								-3'	
4	( 3/ 6)	5'-												-3'	
	( 2/ 6)	5'-							G-					-3'	
	( 1/ 6)	5'-	C-											-3'	
	(14/16)					5'-								-3'	
	( 1/16)					5'-					C-			-3'	
	( 1/16)					5'-						C-		-3'	
5	( 3/ 4)	5'-												-3'	
	( 1/ 4)	5'-			T-									-3'	
	(11/12)					5'-								-3'	
	( 1/12)					5'-			A-					-3'	
6	( 4/ 5)	5'-												-3'	
	( 1/ 5)	5'-	T-	C-										-3'	
	(12/12)					5'-								-3'	

図6 On going 変異の解析

( ) ; 同一配列のクローン数/検索したクローン数. 塩基置換は英字大文字で示した. 症例 4 のドロン68の塩基置換のみが2クローンにみられ, on going 変異と考えられた. 他の塩基置換はそれぞれ1クローンにしかみられなかった.

V<sub>H</sub> 配列の解析 :

個々のリンパ腫ごとに, 全長 V<sub>H</sub>-D-J<sub>H</sub> と部分的 V<sub>H</sub>-D-J<sub>H</sub> での最も頻度の高いクローンを比較してみると, 全長 V<sub>H</sub>-D-J<sub>H</sub> クローンには部分的 V<sub>H</sub>-D-J<sub>H</sub> クローンの配列と完全に一致する配列が常に含まれており, いずれの V<sub>H</sub>-D-J<sub>H</sub> クローンでも最も

頻度の高いクローンがそれぞれのリンパ腫を代表するものと思われた. これらの V<sub>H</sub>-D-J<sub>H</sub> 配列を用いて, それぞれの V<sub>H</sub> 遺伝子と, 松田ら<sup>36)</sup> によって報告された germ line の V<sub>H</sub> 遺伝子とのホモロジーを解析した. その結果, リンパ腫の V<sub>H</sub> 遺伝子では, 4例で V<sub>H</sub> 4, 2例で V<sub>H</sub>3 遺伝子ファミリーに最も高いホモロジー

(72.7 ~ 91.2%) が認められた。V<sub>H</sub>4 遺伝子ファミリーの中の V4-34 (=V<sub>H</sub>4-21 and DP-63) 遺伝子が 3 例で選択されていた。V<sub>H</sub>4 ファミリーの V4-59 (=V71-4 and DP-71) 遺伝子、V<sub>H</sub>3 ファミリーの V3-15 遺伝子と V3-23 遺伝子がそれぞれ 1 例で選択されていた。以上より、本研究で検索したリンパ腫では、V<sub>H</sub>4 ファミリー、特に V4-34 遺伝子が高頻度で使用されていた (表)。

#### 変異の解析:

Germ line V<sub>H</sub> 遺伝子とのホモロジー解析の結果から、リンパ腫の V<sub>H</sub> 遺伝子の体細胞突然変異の頻度は、8.8 ~ 27.3% (平均 18.2%) と高頻度であることも示された (表)。体細胞性変異は replacement (R) 変異と silent (S) 変異のみであり、欠失や挿入は認められなかった。症例数が少ないため、変異のホットスポットの解析は行わなかった。しかし、これまでの報告で高頻度な変異部位として提唱されている V4-34 遺伝子の CDR1 の最初のコドンの第 2 塩基の G→A 置換<sup>37)</sup> は、我々の 3 例の V4-34 遺伝子ではみられなかった。個々のリンパ腫の体細胞突然変異の位置を図 4 に示した。

R 変異と S 変異の統計学的解析を行ったところ、全てのリンパ腫で V<sub>H</sub> 遺伝子の FR 領域 (FR1 ~ 3) の R 変異の数は、期待値と比べ有意に低く、免疫グロブリンの構造を維持させるような選択の存在が示唆された (表)。CDR 領域 (CDR1 と 2) の R/S 比は、全例とも FR 領域の R/S 比よりも高かった。しかし、1 例 (症例 5) を除いて、R 変異の数は期待値と比較して有意に多くはなく、ほとんどの症例については抗原による選択は示唆されなかった (表)。

Intraclonal heterogeneity の解析では、6 例中 5 例の V<sub>H</sub>-D-J<sub>H</sub> クローンに塩基置換を示すものが認められた。塩基置換を示したクローン数と塩基置換の数は図 6 に示したが、いずれも少数であった。1 例 (症例 4) では 2 クローンに同じ塩基置換が 1 ケ所認められたが、この症例のその他の塩基置換および他の症例の塩基置換は全て 1 クローンにしか認められなかった。1 クローンのみの塩基置換は Taq の読み違いによる可能性があるため、2 クローン以上での塩基置換を変異と仮定すれば、intraclonal heterogeneity が示唆されたのは 6 例中 1 例だけであった。

1 例 (症例 1) では、初発と再発のリンパ腫の V<sub>H</sub>-D-J<sub>H</sub> 配列と体細胞突然変異はほぼ完全に同一であった。しかし、腫瘍の V<sub>H</sub>-D-J<sub>H</sub> クローンを比較する

と、それぞれの腫瘍の全てのクローンで FR3 領域と CDR3 領域のそれぞれ 1 ケ所に塩基の違いが認められた (図略)。この塩基の違いは, intraclonal heterogeneity あるいは on going mutation の結果である可能性の他に、再発腫瘍への放射線治療と化学療法の影響の可能性も考えられ、判定困難であった。

## 考 察

現在、PCR はリンパ球増殖性疾患の免疫グロブリン遺伝子の解析にしばしば用いられている<sup>38)</sup>。しかし、PCR では腫瘍組織に混在する正常あるいは反応性リンパ球由来の DNA 増幅<sup>12)-16)</sup> の可能性が常に存在する。コンタミネーションによる増幅も稀ではない。これらの可能性を除外する目的でこれまで、症例の選択<sup>16)</sup>、複数のプライマーの組合わせの使用<sup>16)</sup>、異なる濃度の鋳型 DNA の使用<sup>13)</sup>、単個細胞の DNA の使用<sup>20)</sup>、PCR 産物の高感度検出法<sup>17)18)</sup> など、PCR の方法論上の様々な試みがなされてきた。これらの方法はいずれも PCR 産物やその中の CDR3 配列の信頼性を高める上で有用と考えられる。しかし、正常あるいは反応性リンパ球による DNA 増幅やコンタミネーションによる増幅の可能性を完全に除外するまでには到っていない。

治療後の患者の血液や骨髄中の残存腫瘍細胞を追跡した研究には、初回の PCR で得られた CDR3 配列から CDR3 特異的プライマーを作製し、それをその後の PCR や<sup>19)22)23)27)</sup> in situ RT-PCR に用いた研究がある<sup>26)</sup>。CDR3 配列をプローブとして用いて、PCR 産物の Southern blot<sup>19)25)</sup> や ISH<sup>28)-30)</sup> も行われている。この中で、Brown らの研究では、CDR3 プローブを用いた ISH によって、患者血液と骨髄細胞中に内在する骨髄腫細胞を検出している<sup>28)</sup>。彼らはまた、腫瘍再発時の ISH による骨髄腫細胞の検出結果と臨床データとの一致性も示している<sup>30)</sup>。

しかし、リンパ球増殖性疾患を対象としたこれまでの研究のほとんどは、初回 PCR 産物あるいはそこに存在する CDR3 配列の信頼性を、原腫瘍組織を用いて確認してはいない。

本研究では、RT-PCR 法にて 6 例の脳原発リンパ腫から再構成 V<sub>H</sub>-D-J<sub>H</sub> 配列のクローンを単離した。単離クローンの症例特異性はその CDR3 配列に対するプローブを用いて、原リンパ腫組織に対する ISH によって確認した。次いで、個々のリンパ腫の V<sub>H</sub> 遺伝子の由来を決定した上で、変異のパターンの解析を行った。

ISH 解析では、CDR3 プローブと腫瘍切片が同一患



者由来の時のみ陽性シグナルが認められ、それはほとんど全ての腫瘍細胞に検出された。この結果は、単離された  $V_H-D-J_H$  配列がそれぞれのリンパ腫に特異的であることを示す直接的な証拠と考えられた。リンパ腫を構成している腫瘍細胞がモノクローナルであることも全例で示された。1例（症例1）であるが、初発腫瘍と再発腫瘍が同一起源の細胞からなることも示された。注目すべきと考えられたことは、CDR3 プローブがその症例と無関係な場合にはシグナルはほとんど認められずバックグラウンド程度であったことである。このことは、PCR 法で万一症例あるいは腫瘍と無関係な  $V_H-D-J_H$  が増幅されてもその判定が容易であることを意味する。このことから、ISH はリンパ腫の再構成遺伝子の解析結果の信頼性を高める上で極めて重要と思われた。既に述べたように、脳原発リンパ腫では、組織発生を含む未解決の問題が多い。個々のリンパ腫で特異性が確認された  $V_H-D-J_H$  配列を単離することは、これらの問題へのアプローチの上で基本的に重要と思われる。また、本研究の様に RT-PCR で  $V_H-D-J_H$  配列を単離する場合には、RNA 分離と切片作製のための少量の腫瘍組織片を必要とするのみであるため、脳原発リンパ腫のみならず、全身性のリンパ球増殖性疾患の研究にも広く推奨可能と考えた。

脳リンパ腫から単離された再構成  $V_H-D-J_H$  配列は全て in frame であったが、それらの  $V_H$  遺伝子は6例中4例で  $V_H4$  ファミリーで、この中の3例が  $V4-34$  遺伝子であった。検索例数は少ないが、 $V4-34$  遺伝子の高い使用頻度が注目された。変異の解析では、 $V_H$  遺伝子の体細胞性変異が全例で 8.8 ~ 27.3 %、平均 18.2 % と高頻度であること、FR 領域の R 変異が全例で統計学的に有意に低頻度であることが示された。いずれも脳リンパ腫が germinal center cell またはそれに近縁な細胞由来であることを示唆するものである。しかし、germinal center cell の他の特徴である on going 変異あるいは intracloonal heterogeneity は1例でみられたのみであった。1例の初発と再発腫瘍の  $V_H-D-J_H$  にみられた2塩基の違いも on going 変異の結果である可能性があるが、再発腫瘍は放射線治療や化学療法を受けているのでその影響の可能性も考えられた。本研究では  $V_H-D-J_H$  配列の3'側の2/3は14~22クローンで検索し、5'側の1/3は4~6クローンで検索したことになるので、5'側の1/3の配列に関しては十分な検索とはいえない。したがって、5'側に関しては更に検索する必要があるが、on going 変異

がランダムに起ると仮定すると、本研究結果は我々の症例では on going 変異が稀であることを示唆する様に思われる。

脳原発リンパ腫の免疫グロブリン遺伝子の塩基解析の報告は少ない。しかし、最近の2報告は本研究結果と共通点が多い。 $V_H$  遺伝子に関しては、Thompsett ら<sup>39)</sup>は5例中4例で、Montesinos-Rongen ら<sup>37)</sup>は10例中5例で  $V4-34$  遺伝子を検出している。いずれの報告例でも、 $V_H$  遺伝子における体細胞突然変異が高頻度であり、FR 領域の R 変異の頻度は期待値より有意に低い。Intraclonal heterogeneity は5例中3例又は3例中1例に検出されるという。このうち体細胞突然変異と FR 領域の R 変異の頻度に関しては、既報と本報のほとんど全ての症例に共通する。脳原発リンパ腫は免疫学的に比較的均一な腫瘍群からなることが示唆された。

全身性 diffuse large B-cell lymphoma では、 $V_H$  遺伝子として  $V4-34$  遺伝子が比較的高頻度を選択されているが、その有意性に関しては議論が分かっている<sup>34)40)-45)</sup>。 $V_H$  遺伝子の体細胞変異と FR 領域の R 変異の頻度に関しては症例間でのばらつきが大きい。Lossos らは多数例の全身性 diffuse large B-cell lymphoma を検索している<sup>34)</sup>。それらの症例では体細胞変異の頻度は0%から26.6%の範囲にわたっている。FR 領域の R 変異の頻度は53例中33例では有意に少ないが、他の症例では有意ではない。これらの所見から、全身性 diffuse large B-cell lymphoma は免疫学的に不均一なリンパ腫で構成されていることが示唆される。Alizadeh らによる遺伝子発現プロファイルに関する最近の報告<sup>46)</sup>では、全身性 diffuse large B-cell lymphoma は、少なくとも2種のサブタイプ、germinal center B-like と activated B-like subtype、に分類できることが示された。Lossos らはこの二群について免疫グロブリン遺伝子の比較を行い、前者には on going 変異がみられ、後者には特殊な例を除いてみられないことを報告している<sup>47)</sup>。

これらの全身性リンパ腫でみられる分類が脳リンパ腫にも当てはまるか否かは興味のあるところである。我々は、p16がん抑制遺伝子の欠失が、全身性 diffuse large B-cell lymphoma では低頻度であるのとは対照的に、脳原発リンパ腫で高頻度であることを報告している<sup>48)49)</sup>。すなわち、脳リンパ腫は全身性リンパ腫でみられる特性を示すとは限らない。本研究では、脳リンパ腫は免疫グロブリン遺伝子からみても比較的均一な腫瘍で構成されていることが示唆されたが、on going

変異の実体の解明を含めて今後の研究の更なる進展が必要と思われた。

### 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました熊西敏郎教授に心から感謝の意を表します。また、御指導頂きました鷺山和雄助教授、富山県立中央病院脳神経外科河野充夫先生、長野赤十字病院齊藤隆史先生に御礼申し上げます。更に、脳機能解析学分野松沢等先生、鈴木清隆先生、木村輝雄先生にも御指導頂きましたことを感謝致します。終始暖かく御支援、御鞭撻頂きました教室の皆様にも感謝致します。

### 引 用 文 献

- 1) Bigner, DD., McLendon, RE. and Bruner, JM.: RUSSELL AND RUBINSTEIN'S Pathology of Tumors of the Nervous System. 6th edn. Arnold, London Sydney Auckland, vol2: 195~237, 1998.
- 2) Kleihues, P. and Cavenee, WK.: Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. IARC Press, Lyon, : 198~203, 2000.
- 3) Hayakawa, T., Takakura, K., Abe, H., Yoshimoto, T., Tanala, R., Sugita, K., Kikuchi, H., Uozumi, T., Hori, T., Fukui, H., Ushio, Y., Nomura, K., Matsutani, M., Mohri, N., Kumanishi, T., Aozasa, K. and Nagashima, K.: Primary central nervous system lymphoma in Japan - A retrospective, cooperative study by CNS-Lymphoma Study Group in Japan. *J Neuro-Oncol.*, **19**: 197~215, 1994.
- 4) Kumanishi, T., Washiyama, K., Nishiyama, A., Abe, S. and Ichikawa, T.: Primary malignant lymphoma of the brain: demonstration of immunoglobulin gene rearrangements in four cases by Southern blot hybridization technique. *Acta. Neuropathol.*, **79**: 23~26, 1989.
- 5) Tonegawa, S.: Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, **302** (14) : 575~581, 1983.
- 6) Rajewsky, K.: Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*, **381**: 751~758, 1996.
- 7) Alt, FW. and Baltimore, D.: Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments: Implications from a chromosome with evidence of three D-J<sub>H</sub> fusions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **79**: 4118~4122, 1982.
- 8) Reynaud, C-A., Mackay, CR., Moller, RG. and Weill, J-C.: Somatic Generation of Diversity in a Mammalian Primary Lymphoid Organ: The Sheep Ileal Peyer's Patches. *Cell*, **64**: 995~1005, 1991.
- 9) Reynaud, C-A., Carcia, C., Hein, WR. and Weill, J-C.: Hypermutation Generating the Sheep Immunoglobulin Repertoire is an Antigen-Independent Process. *Cell*, **80**: 115~125, 1995.
- 10) Brisco, MJ., Tan, LW., Orsborn, AM. and Morley, AA.: Development of a highly sensitive assay, based on the polymerase chain reaction, for rare B-lymphocyte clones in a polyclonal population. *Br. J. Haematol.*, **75**: 163~167, 1990.
- 11) Trainor, KJ., Brisco, MJ., Story, CJ. and Morley, AA.: Monoclonality in B-Lymphoproliferative Disorders Detected at the DNA Level. *Blood*, **75** (11): 2220~2222, 1990.
- 12) Wan, JH., Sykes, PJ., Orell, SR. and Morley, AA.: Rapid method for detecting monoclonality in B cell lymphoma in lymph node aspirates using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Pathol.*, **45**: 420~423, 1992.
- 13) Taylor, JME., Spagnolo, DV. and Kay, PH.: B-cell target DNA quantity is a critical factor in the interpretation of B-cell clonality by PCR. *Pathology*, **29**: 309~312, 1997.
- 14) Diaz-Cano, S.: PCR-Based Alternative for Diagnosis of Immunoglobulin Heavy Chain Gene Rearrangement. *Diagn. Mol. Pathol.*, **5** (1): 3~9, 1996.
- 15) Weston, AP., Banerjee, SK., Horvat, RT., Cherian, R., Campbell, DR. and Zoubine, MN.: Specificity of Polymerase Chain Reaction Monoclonality for Diagnosis of Gastric Mucosa-Associated Lymphoid Tissue (MALT) Lymphoma. *Dig. Dis. Sci.*, **43** (2): 290~299, 1998.
- 16) Rockman, SP.: Determination of clonality in patients who present with diagnostic dilemmas: a laboratory experience and review of the literature. *Leukemia*, **11**: 852~862, 1997.
- 17) Storch-Hagenlocher, B., Haas, J., Vogt-Schaden, ME., Bentz, M., Hoffmann, LA., Biessmann, A.

- and Wildemann, B.: Molecular Analysis of the CDR 3 Encoding Region of the Immunoglobulin Heavy Chain Locus in Cerebrospinal Fluid Cells as a Diagnostic Tool in Lymphomatous Meningitis. *Ann. Neurol.*, **47** (2): 211~217, 2000.
- 18) Macintyre, EA. and Delabesse, E.: Molecular Approaches to the Diagnosis and Evaluation of Lymphoid Malignancies. *Semin. Hematol.*, **36** (4): 373~389, 1999.
- 19) van Belzen, N., Hupkes, PE., Doekharan, D., Hoogeveen-Westerveld, M., Dorssers, LCJ. and van't Veer, MB.: Detection of minimal disease using rearranged immunoglobulin heavy chain genes from intermediate- and high-grade malignant B cell non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia*, **11**: 1742~1752, 1997.
- 20) Kppers, R., Roers, A and Kanzler, H.: Molecular Single Cell Studies of Normal and Transformed Lymphocytes. *Cancer Surveys*, **30**: 45~58, 1997.
- 21) Sahota, SS., Leo, R., Hamblin, TJ. and Stevenson, FK.: Ig V<sub>H</sub> Gene Mutational Patterns Indicate Different Tumor Cell Status in Human Myeloma and Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *Blood*, **87** (2): 746~755, 1996.
- 22) Chen, BJ. and Epstein, J.: Circulating Clonal Lymphocytes in Myeloma Constitute a Minor Subpopulation of B Cells. *Blood*, **87** (5): 1972~1976, 1996.
- 23) Voena, C., Ladetto, M., Astolfi, M., Provan, D., Gribben, JG., Boccadoro, M., Pileri, A. and Corradini, P.: A novel nested-PCR strategy for the detection of rearranged immunoglobulin heavy-chain genes in B cell tumors. *Leukemia*, **11**: 1793~1798, 1997.
- 24) Matolcsy, A., Schattner, EJ., Knowles, DM. and Casali, P.: Clonal evolution of B cells in transformation from low- to high-grade lymphoma. *Eur. J. Immunol.*, **29**: 1253~1264, 1999.
- 25) Bakkus, MHC., Heirman, C., Riet, IV., Camp, BV. and Thielemans, K.: Evidence That Multiple Myeloma Ig Heavy Chain VDJ Genes Contain Somatic Mutations But Show No Intraclonal Variation. *Blood*, **80** (9): 2326~2335, 1992.
- 26) Szczepek, AJ., Seeberger, K., Wizniak, J., Mant, MJ., Belch, AR. and Pilarski, LM.: A High Frequency of Circulating B Cells Share Clonotypic Ig Heavy-Chain VDJ Rearrangements With Autologous Bone Marrow Plasma Cells in Multiple Myeloma, as Measured by Single-Cell and In Situ Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *Blood*, **92** (8): 2844~2855, 1998.
- 27) Billadeau, D., Blackstadt, M., Greipp, P., Kyle, RA., Oken, MM., Kay, N. and Ness, BV.: Analysis of B-Lymphoid Malignancies Using Allele-Specific Polymerase Chain Reaction: A Technique for Sequential Quantitation of Residual Disease. *Blood*, **78** (11): 3021~3029, 1991.
- 28) Brown, R., Luo, X-F., Gibson, J., Morley, A., Sykes, P., Brisco, M and Joshua, D.: Idiotypic oligonucleotide probes to detect myeloma cells by mRNA in situ hybridization. *Br. J. Haematol.*, **90**: 113~118, 1995.
- 29) Joshua, DE., Brown, RD., Luo, X-F. and Gibson, J.: Circulating Clonal Lymphocytes in Myeloma Determined by mRNA In Situ Hybridization. *Blood*, **88** (3): 1125, 1996.
- 30) Brown, RD., Luo, X-F., Gibson, J., Brisco, M., Sykes, P., Morley, A. and Joshua, D.: Longitudinal Analysis of Circulating Myeloma Cells Detected by Allele Specific mRNA In Situ Hybridization. *Am. J. Hematol.*, **58**: 273~277, 1998.
- 31) Ramasamy, I., Brisco, M. and Morley, A.: Improved PCR method for detecting monoclonal immunoglobulin heavy chain rearrangement in B cell neoplasms. *J. Clin. Pathol.*, **45**: 770~775, 1992.
- 32) Retting, MB., Vescio, RA., Cao, J., Wu, CH., Lee, JC., Han, E., DerDanielian, M., Newman, R., Hong, C., Lichtenstein, AK. and Berenson, JR.: V<sub>H</sub> Gene Usage in Multiple Myeloma: Complete Absence of the V<sub>H</sub>4.21 (V<sub>H</sub>4-34) Gene. *Blood*, **87** (7): 2846~2852, 1996.
- 33) Katagiri, T., Feng, X., Ichikawa, T., Usui, H., Takahashi, Y. and Kumanishi, T.: Neuron-specific enolase (NSE) and non-neuronal enolase (NNE) mRNAs are co-expressed in neurons of the rat cerebellum: in situ hybridization histochemistry. *Mol. Brain Res.*, **19**: 1~8, 1993.
- 34) Lossos, IS., Okada, CY., Tibshirani, R., Warnke,

- R., Vose, J.C., Greiner, T.C. and Levy, R.: Molecular analysis of immunoglobulin genes in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*, **95** (5): 1797~1803, 2000.
- 35) Chang, B. and Casali, P.: The CDR 1 sequences of a major proportion of human germline Ig V<sub>H</sub> genes are inherently susceptible to amino acid replacement. *Immunol. Today*, **15** (8): 367~373, 1994.
- 36) Matsuda, F., Shin, E.K., Nagaoka, H., Matsumura, R., Haino, M., Fukita, Y., Takaishi, S., Imai, T., Riley, J.H., Anand, R., Soeda, E. and Honjo, T.: Structure and physical map of 64 variable segments in the 3' 0.8-megabase region of the human immunoglobulin heavy-chain locus. *Nature Genetics*, **3**: 88~94, 1993.
- 37) Montesinos-Rongen, M., Kppers, R., Schletter, D., Spieker, T., Roost, D.V., Schaller, C., Reifenberger, G., Wiestler, O.D. and Deckert-Schlüter, M.: Primary Central Nervous System Lymphomas Are Derived from Germinal-Center B Cells and Show a Preferential Usage of the V 4-34 Gene Segment. *Am. J. Pathol.*, **155** (6): 2077~2086, 1999.
- 38) Diss, T.C. and Pan, L.: Polymerase Chain Reaction in the Assessment of Lymphomas. *Cancer Surveys*, **30**: 21~44, 1997.
- 39) Thompsett, A.R., Ellison, D.W., Stevenson, F.K. and Zhu, D.: V<sub>H</sub> Gene Sequences From Primary Central Nervous System Lymphomas Indicate Derivation From Highly Mutated Germinal Center B Cells With Ongoing Mutational Activity. *Blood*, **94** (5): 1738~1746, 1999.
- 40) Daley, M.D., Berinstein, N.L. and Siminovitch, K.A.: Immunoglobulin heavy chain variable gene utilization in human large cell and Burkitt's lymphoma cell lines. *Clin. Invest. Med.*, **17** (6): 522~530, 1994.
- 41) Rosenquist, R., Lindstrom, A., Holmberg, D., Lindh, J. and Roos, G.: V<sub>H</sub> gene family utilization in different B-cell lymphoma subgroups. *Eur. J. Haematol.*, **62**: 123~128, 1999.
- 42) Kppers, R., Rajewsky, K. and Hansmann, M-L.: Diffuse large cell lymphomas are derived from mature B cells carrying V region genes with a high load of somatic mutation and evidence of selection for antibody expression. *Eur. J. Immunol.*, **27**: 1398~1405, 1997.
- 43) Stevenson, F.K., Spellerberg, M.B., Treasure, J., Chapman, C.J., Silberstein, L.E., Hamblin, J. and Jones, D.B.: Differential Usage of an Ig Heavy Chain Variable Region Gene by Human B-Cell Tumors. *Blood*, **82** (1): 224~230, 1993.
- 44) Funkhouser, W.K. and Warnke, R.A.: Preferential IgH V 4-34 Gene Segment Usage in Particular Subtypes of B-Cell Lymphoma Detected by Antibody 9G4. *Hum. Pathol.*, **29** (11): 1317~1321, 1998.
- 45) Hsu, F.J. and Levy, R.: Preferential Use of the V<sub>H</sub> 4 Ig Gene Family by Diffuse Large-Cell Lymphoma. *Blood*, **86** (8): 3072~3082, 1995.
- 46) Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Davis, R.E., Ma, C., Lossos, I.S., Rosenwald, A., Boldrick, J.C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., Powell, J.I., Yang, L., Marti, G.E., Moore, T., Hudson Jr, J., Lu, L., Lewis, D.B., Tibshirani, R., Sherlock, G., Chan, W.C., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Armitage, J.O., Warnke, R., Levy, R., Wilson, W., Grever, M.R., Byrd, J.C., Botstein, D., Brown, P.O. and Staudt, L.M.: Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, **403**: 503~511, 2000.
- 47) Lossos, I.S., Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Chan, W.C., Brown, P.O., Botstein, D., Staudt, L.M. and Levy, R.: Ongoing immunoglobulin somatic mutation in germinal center B cell-like but not in activated B cell-like diffuse large cell lymphomas. *PNAS*, **97** (18): 10209~10213, 2000.
- 48) Kumanishi, T., Zhang, S., Ichikawa, T., Endo, S. and Washiyama, K.: Primary Malignant Lymphoma of the Brain: Demonstration of Frequent p16 and p15 Gene Deletions. *Jpn. J. Cancer Res.*, **87**: 691~695, 1996.
- 49) Zhang, S-J., Endo, S., Ichikawa, T., Washiyama, K., and Kumanishi, T.: Frequent Deletion and 5' CpG Island Methylation of the p16 Gene in Primary Malignant Lymphoma of the Brain. *Cancer Res.*, **58**: 1231~1237, 1998.

(平成13年 1月29日 受付)