

リンパ球を用いた免疫染色による牛伝染性リンパ腫診断の有用性の検討

食肉衛生検査所 ○國井菜那子 杉山愛実 寺井克哉 塩崎康永 神田政宏

【はじめに】

牛伝染性リンパ腫は、家畜伝染病予防法では届出伝染病に指定されており、と畜場法では全部廃棄対象疾病である。また、その型別は、牛伝染性リンパ腫ウイルスの感染に起因し腫瘍性（以下、B細胞性）リンパ腫である地方病型と、原因不明の散発型に分類されるが、発生のほとんどは地方病型である¹⁾。近年、その届出頭数は全国的に年々増加傾向にあり、当所においても同様の状況である。

当所では、牛伝染性リンパ腫の診断として、解体後検査で特徴的な病変が認められた牛で、血液塗抹及び病変のスタンプ塗抹標本で異型リンパ球を確認している。しかし、血液塗抹においては、炎症による反応性の異型リンパ球と、B細胞性の異型リンパ球の識別は難しく、細胞診の知識と経験が必要である。

そこで、B細胞性異型リンパ球の識別を目的に、戸崎らの方法²⁾による末梢血リンパ球標本を用いた免疫染色を行い、病理学的検査、PCR検査の結果と比較したところ、この方法によるB細胞性異型リンパ球の識別が、牛伝染性リンパ腫の診断材料の一助となる有用性が示唆されたので報告する。

【材料及び方法】

1 材料

(1) 血液

臨床的に牛伝染性リンパ腫を発症していない牛（非発症牛）44頭、当所における診断基準により、牛伝染性リンパ腫と診断された牛（発症牛）4頭及び牛伝染性リンパ腫を疑ったものの診断基準に満たなかったため全身に及ぶ腫瘍で全部廃棄された牛（発症疑い牛）2頭の計50頭の血液を供試材料とした。

(2) 臓器及びリンパ節

発症牛及び発症疑い牛では、心臓、脾臓、子宮及び腫大を呈していた内腸骨リンパ節を供試材料とした。

2 方法

(1) 血液塗抹及び病変のスタンプ塗抹標本による鏡検

発症牛及び発症疑い牛においては、血液塗抹及び病変臓器のスタンプ塗抹標本を作製し、それぞれヘマカラー染色（Merck製）を行って鏡検し、異型リンパ球の有無を確認した。

(2) リンパ球標本の作製

戸崎らの方法により、全血を遠心分離してリンパ球を含む単核細胞の層を回収し、回収した単核細胞層をPBSで洗浄した。得られた沈渣を血清に浮遊させて懸濁した後、スライドガラスに塗抹し、風乾後100%アセトンで固定してリンパ球標本を作製した。

(3) リンパ球標本の免疫染色

作製したリンパ球標本について、各種抗体を用いた免疫染色を実施した。一次抗体には、T細胞マーカーとしてCD3（Dako製）、B細胞マーカーとしてCD79 α （Dako製）及び細胞増殖期マーカーとしてki67（Dako製）を用い、二次抗体はヒストファインシンプルステインMAX-PO（MULT I）（ニチレイ製）を用いた。反応後はDABによる発色を行い、マイヤー・ヘマトキシリンによる1分間の対比染色を実施した。なお、ki67については、細胞増殖期にある核に反応する抗体であ

るため、対比染色は実施しなかった。

T細胞、B細胞及び細胞増殖期である腫瘍細胞の免疫染色の判定基準は、当所³⁾及び戸崎らの方法を参考に、DAB発色後に細胞質が茶色に染色されたものを陽性とし、血球100個中の陽性細胞数を2回計測して平均値を算出して、CD3及びCD79 α においては60%以上を陽性、60%未満を陰性とし、ki67においては40%以上を陽性、40%未満を陰性とした。

(4) 病理学的検査

発症牛及び発症疑い牛の検体は常法に従い免疫組織化学染色を行った。併せてスタンプ塗抹標本も作製し、免疫染色を行った。各免疫染色では、一次抗体等は全てリンパ球標本免疫染色と同じ試薬を使用し、同じ判定基準により判定した。

(5) PCR検査

約1cm³程度の大きさに採取した臓器をポリ袋内で粉碎し、滅菌綿棒で拭った後1mlの滅菌PBSに懸濁してDNA抽出し、抽出したDNAを鋳型として、牛伝染性リンパ腫特異的なプライマー(表1)を用いて定性PCRを行った。反応は、TaKaRa Ex Taq[®](TAKARA)を用いた。反応液の組成は、DW 28.0 μ l、プライマーF/R (10 μ M) 1.5 μ l、10 \times Ex Taq Buffer 5.0 μ l、dNTP Mixture 4.0 μ l、TaKaRa Ex Taq 1.0 μ l、サンプルDNA 4.0 μ lとし、プログラムは94 $^{\circ}$ C \cdot 2分、(94 $^{\circ}$ C \cdot 15秒 \rightarrow 68 $^{\circ}$ C \cdot 50秒) \times 45サイクル、4 $^{\circ}$ Cとした。

表1 牛伝染性リンパ腫ウイルスの検出に使用したPCRプライマー

プライマー名	塩基配列 (5' -3')	増幅 DNA (bp)
PV2-F	ACT TTC AGA CCC CCT TGA CTG ACA	272
PV2-R	AAA CCT CTG CCC TGG TGA TTA AGG	

【結果】

1 血液塗抹及び病変のスタンプ塗抹標本による鏡検

発症牛では血液塗抹及び病変のスタンプ塗抹標本にて異型リンパ球様細胞を認めたが、発症疑い牛2頭では両標本とも異型リンパ球様細胞は認められなかった。

2 リンパ球標本による鏡検

発症牛で異型リンパ球様細胞を、発症疑い及び非発症牛で正常リンパ球様細胞を認めた(図1)。

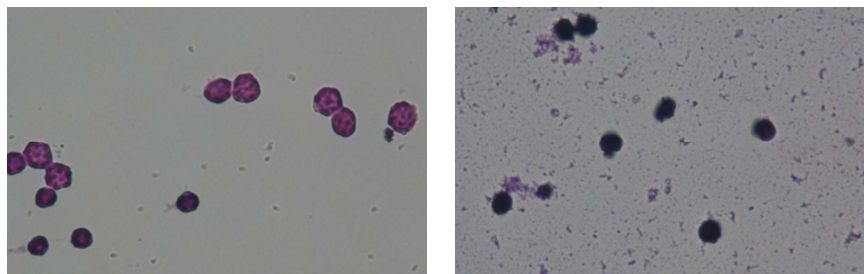


図1 リンパ球標本のヘマカラー染色結果(左:異型リンパ球様細胞、右:正常リンパ球様細胞)

3 リンパ球標本の免疫染色

リンパ球標本の免疫染色の結果、発症牛ではCD79 α 及びki67が陽性であり、CD3ではわずかに陽性を示す細胞が認められたが陰性であった(図2)。発症疑い牛及び非発症牛では、CD79 α 及びCD3においてわずかに陽性を示す細胞が認められたが、全ての抗体で陰性であった(図3)。

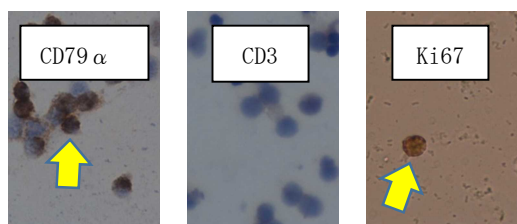


図2 発症牛の免疫染色結果 (矢印：陽性細胞)

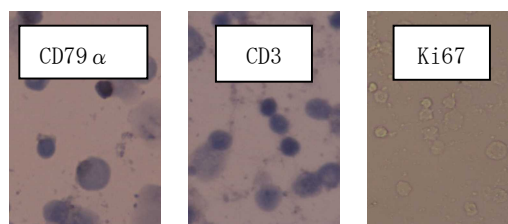


図3 発症疑い牛及び非発症牛の免疫染色結果

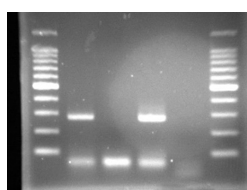
4 病理学的検査

免疫組織化学染色及びスタンプ免疫染色の結果、発症牛では CD79 α 及び ki67 が陽性であり、CD3 は陰性であった。発症疑い牛では CD79 α 、CD3 及び ki67 は全て陰性であった。

5 PCR 検査及びまとめ

発症牛で陽性、発症疑い牛で陰性を確認した (図 4)。各検査の結果は以下の通りであった (表 2)。

表 2 各検査の結果



	発症牛	発症疑い牛	非発症牛
(1) 病変のスタンプ標本	異型リンパ有	正常	正常
(2) リンパ球標本(ヘマカラー)	異型リンパ有	正常	正常
(3) リンパ球標本(免疫染色)	CD79 α (+), CD3(-), ki67(+)	CD79 α (-), CD3(-), ki67(-)	CD79 α (-), CD3(-), ki67(-)
(4) 病理学的検査	CD79 α (+), CD3(-), ki67(+)	CD79 α (-), CD3(-), ki67(-)	CD79 α (-), CD3(-), ki67(-)
(5) PCR検査	陽性	陰性	陰性

図4 発症牛の PCR 検査結果 (右から陰性、陽性、心臓、脾臓)

【考察】

戸崎らの方法によるリンパ球標本作製は、リンパ球を集めたリンパ球標本を作製することによって、末梢血中の異常リンパ球を見落とす恐れが少なく、効率的にリンパ球を観察することができ、鏡検にも適していることが分かった。

リンパ球標本の免疫染色では、発症牛においては、CD79 α 陽性及び CD3 陰性によって異型リンパ球の由来が B 細胞であること、ki67 陽性によってその異型リンパ球が腫瘍化していることが分かり、この結果は B 細胞性リンパ腫である牛伝染性リンパ腫の特徴と一致し、病理学的検査や PCR 検査の結果とも一致した。発症疑い牛においては、臨床所見にて、牛伝染性リンパ腫で見られるリンパ節の腫大及び腫瘍が確認されたが、CD3、CD79 α 及び ki67 全て陰性であり、この結果は病理学的検査や PCR 検査の結果とも一致した。

よって、リンパ球標本を用いた免疫染色は、牛伝染性リンパ腫による B 細胞性のリンパ球を識別できる方法として活用可能であり、当所の判定基準である血液塗抹で異型リンパ球の確認に加えて、診断材料の一助となる有用性が期待できる結果となった。また、今回血液塗抹で確認できた異型リンパ球は全て B 細胞性であったことから、特徴的な病変を認めた牛で確認される異型リンパ球は、炎症性によるものではなく B 細胞性である可能性が高いと考えられた。今後も引き続き、症例に遭遇した際はリンパ球標本を用いた免疫染色を実施し、牛伝染性リンパ腫診断の有用性を確認していきたい。

【参考文献】

- 1) 萩原昌代ら：牛白血病ウイルス感染牛におけるリンパ系腫瘍の組織学的検討，日獣会誌，67，199-203 (2014)
- 2) 戸崎香織ら：牛白血病ウイルス感染牛における末梢血中リンパ球標本を用いた免疫組織化学的検討，栃木県県央家畜保健衛生所，2019
- 3) 山田裕貴ら：スタンプ塗抹標本を用いた牛白血病の迅速診断法の検討，静岡県食肉衛生検査所，2017