

原 著

犬のリンパ腫20例における 組織形態学および免疫組織化学的検索

牛尾祥彦 御領政信 佐々木 淳 谷 健二

佐藤れえ子 百田 豊 岡田幸助

要 約

犬のリンパ腫20例についてパラフィン切片の免疫組織化学染色における抗原賦活化緩衝液 pHと固定条件について検討し、発症部位、腫瘍細胞の形態学的特徴と免疫表現型との関連性について検索した。染色性は抗原賦活化緩衝液がpH8.0のとき最適となり、固定条件による差はみられなかった。腫瘍細胞はび慢性大細胞型6例、び慢性混合型9例、濾胞性混合型4例の形態を示し、その他としてホジキン様リンパ腫が1例であった。免疫表現型はCD3⁻CD79⁺のB細胞性6例、CD3⁺CD79⁻のT細胞性12例、CD3⁻CD79⁻のNon-B, Non-T性2例であった。抗原賦活化緩衝液のpHによる染色性の差は大きく、pHの決定は診断をする上で欠かせないことが示唆された。

キーワード：イヌ、免疫組織化学染色、リンパ腫、形態学的特徴

犬における造血系腫瘍のうち最もよく認められるのはリンパ腫である。その発症率は年間13-24/10万(匹)である[1]。好発品種はボクサー、バセットハウンド、セントバーナードなどであり、好発年齢は5-11歳である。リンパ腫はその解剖学的発症部位、形態学的特徴、免疫表現型などを基準として分類される[1]。

犬リンパ腫の免疫表現型は、予後因子として重要な役割を担っており、治療として主流である化学療法への反応性と再発率はB細胞性よりT細胞性の方が悪いとされる[1, 2]。近年、

解剖学的発症部位と免疫表現型との関連性は多数検索されているが、形態学的特徴、特に、腫瘍細胞の大きさと免疫表現型との関連性はあまり検討されていない。一方、凍結切片における免疫組織化学染色では良好な成績が得られるが、パラフィン包埋切片では不適な場合が多い。本研究では、パラフィン切片でも良好な成績が得られる条件について検討するとともに、犬のリンパ腫の腫瘍細胞の形態学的特徴と免疫表現型との関連性および腫瘍摘出後の経過観察について検索した。

材料および方法

検索材料は1996年から現在に至るまでに本研究室に病性鑑定・剖検依頼として持ち込まれた犬の症例のうち、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色によりリンパ腫と診断された症例で、ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックあるいはホルマリン固定として組織が保存されていた20例の生検・剖検材料を用いた。

検索材料は10%ホルマリン液にて固定後、定法に従いパラフィン包埋ブロックを作製した。これを4 μ mに薄切し、HE染色を施し、光学顕微鏡にて病理組織学的に検索した。腫瘍細胞の形態学的特徴はNational Cancer Institute-Working Formulation (WF) 分類 [1, 3] に基づき行った。

抗原賦活化液のpH、組織のホルマリン固定時間およびユフィックス固定についてそれぞれ

条件を設定した。抗原賦活化液のpHはChem-Mate Target Retrieval Solution (pH 6.0, Dako), それを1 N NaOHでpH 7.0に調整したもの、1 mM EDTA含有10mMトリス塩酸緩衝液 (TE緩衝液) (pH 8.0) およびTE緩衝液 (pH 9.0) の4条件とした。ホルマリン固定時間は1日と1ヵ月とし、ユフィックス固定は2時間とした。

一次抗体にはMonoclonal Mouse Anti-Human CD 3 (1 : 200, Dako) とMonoclonal Mouse Anti-Human CD79acy (1 : 100, Dako) を使用した。それぞれ、正常犬扁桃、脾臓あるいはリンパ節を対照とした。4 μ mに薄切した組織切片をMASコートスライドガラス (Matsunami) に伸展した。脱パラフィン後、TE緩衝液 (pH 8.0) に浸け、オートクレーブ (121°C, 15分) を用いて抗原賦活化した。30分間室温にて冷却後、洗浄し、0.3%過酸化水素

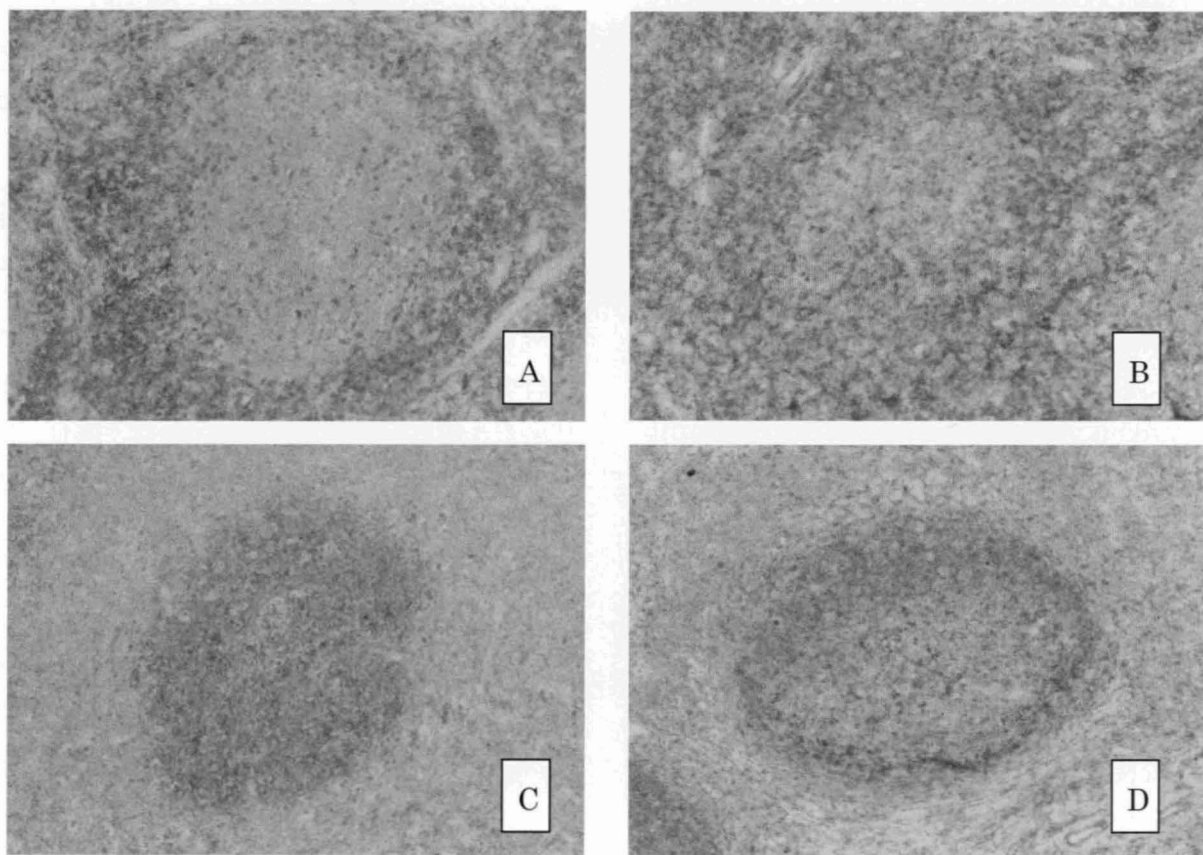


図1 AとBはCD 3 抗原に対する正常扁桃の胚中心領域を示しており、AはpH8.0、BはpH9.0でありAの条件の方が染色性は良好である。CとDはCD79a抗原に対する正常扁桃の胚中心領域を示しており、CはpH8.0、DはpH9.0でありCの条件の方が染色性は良好である。

水と室温で10分間反応させ、洗浄した。15mM NaN₃とキャリアープロテイン含有トリス緩衝液、pH7.2 (Dako) で一次抗体を希釈し、4℃、一晚反応させた。翌日、洗浄し、LSAB+キット/HRP (Dako) を用いて室温で15分間反応させ、洗浄した。3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochlorideと2分間反応させ、蒸留水で5分×3回洗浄後、ヘマトキシリンで対比染色を行った。反応はすべてチャンバー内で行った。CD3をT細胞性マーカー、CD79をB細胞性マーカーとし、両者に陰性なものをNon-B, Non-Tとした。洗浄はすべて10mMリン酸緩衝液を用い、5分×3回とした。

成 績

抗原賦活化緩衝液pH 6.0ではCD79, CD3ともに染色性は弱く、pH 7.0およびpH 9.0ではCD79, CD3ともにバックグラウンドに非特異反応が強く評価できなかった。pH 8.0においてはCD79, CD3ともに染色性は特異的であり、非特異反応は認められず、染色性は良好であった (図1)。固定条件による染色性の違いは認められなかった。

リンパ腫と診断された犬の症例は、ビーグル3例、ゴールデン・レトリバーとマルチーズ各2例、ラブラドル・レトリバー、ドーベルマ

ン、ウェルシュ・コーギー、ミニチュア・ダックス、スコティッシュ・テリア、ヨークシャ・テリア、パグ各1例と雑種7例の合計20例であった。年齢は9ヵ月-14歳、平均年齢が8.9歳であった。性別は雄15例、雌3例で、去勢雄1例、避妊雌1例であった。

解剖学的発症部位は、消化管型10例、皮膚型5例、多中心型3例、孤在型と縦隔型がそれぞれ1例であった。組織学的特徴は、び慢性大細胞型6例、び慢性混合型9例、濾胞性混合型4例であり、その他としてホジキン様リンパ腫と診断された症例が1例含まれていた。

犬のリンパ腫の免疫表現型については、B細胞性が6例であり、これら解剖学的発症部位でみると多中心型3/3例、皮膚型2/5例、消化管型1/10例であった。形態学的特徴に基づくと、濾胞性混合型3/4例、び慢性混合型2/9例、び慢性大細胞型1/6例であった。T細胞性は12例であり、解剖学的発症部位でみると消化管型8/10例、皮膚型2/5例、孤在型と縦隔型がそれぞれ1/1例であった。形態学的特徴によると、び慢性混合型7/9例、び慢性大細胞型5/6例であった。Non-B, Non-Tはホジキン様リンパ腫を含め2例であった (表1, 2)。

追跡調査で腫瘍摘出後の経過観察が可能であった症例は、9症例あり、その生存期間は、表3に示す通りである。B細胞性リンパ腫の2例の

表1 解剖学的発症部位別の細胞型

細胞型	消化管型	皮膚型	多中心型	孤在型	縦隔型	合計
B	1	2	3			6
T	8	2		1	1	12
Non-B, Non-T	1	1				2
Total	10	5	3	1	1	20

表2 形態学的分類別の細胞型

細胞型	び慢性大細胞型	び慢性混合型	濾胞性混合型	その他	合計
B	1	2	3		6
T	5	7			12
Non-B, Non-T			1	1	2
Total	6	9	4	1	20

表3 腫瘍摘出後の生存期間

年齢	性別	主な腫瘍部位	細胞型	化学療法	初診時からの生存期間
13歳	雌	リンパ節	B	無	94日
13歳	雄	リンパ節	B	有	325日（経過観察中）
7ヵ月	雄	縦隔	T	有	67日
6歳	雄	十二指腸	T	無	35日
7歳	雄	十二指腸	T	有	41日
11歳	雌	皮膚	T	有	41日
11歳	雄	回腸	T	有	97日
11歳	雄	指間	T	無	276日（経過観察中）
1歳	雄	リンパ節	NonT/B	有	308日

うち1例では、初診時からの経過観察では、1年近くになっており、現在も生存中であった。T細胞性リンパ腫の6例うち5例は35-97日で死亡したが、指間の小腫瘍であった皮膚型リンパ腫1例は現在も生存中である。

考 察

パラフィン切片におけるCD抗原の染色には前処理として、熱による抗原賦活化処理が必要なものが多い。今回使用したCD79およびCD3はともに強めの熱処理が必要であった。加熱処理としてはマイクロウェーブ、恒温槽、オートクレーブなどが主に知られているが、オートクレーブは条件設定が容易であり、加熱効果も安定していることから今回使用することとした[4, 5, 6]。一般に免疫組織化学染色において、前処理における抗原賦活化緩衝液のpHは染色性に影響を与える重要な因子であり[5]、Dako推奨の緩衝液のpHは両者とも9.0である。今回の検討ではpH 8.0が最も良好な染色性を示したが、ヒトにおいても推奨条件下において染色性が不安定なものも認められている[5]。今回の条件設定では、pHが染色性に及ぼす影響を解明することは出来なかったが、オートクレーブによる免疫組織化学染色を行うにあたり、各施設、各抗体における最適pHを設定することも重要であると思われた。

染色性は組織の固定法、固定時間などの影響を受けるという報告[7]がヒトにおいてなされており、犬においてもその可能性が考えられているが[4]、今回の検討において差異は認められなかった。しかし、今回は1日および1ヵ月の固定時間とユフィックス固定においてのみの検討であったので、更なる検討が必要であると思われた。

今回の検索では性差が認められ、雄の症例数(16例)が雌(4例)の4倍であり、その差は明らかであった。犬におけるリンパ腫では、消化管型においては雄の方が雌よりも発生が多いことが知られているが、それ以外では通常性差は認められていない[1, 8, 9, 10]。しかし、Sueiroら[8]の報告によると、雄34例(61.8%)、雌21例(38.2%)となっており、性差が認められている。

犬におけるリンパ腫の解剖学的発症部位は多い順に多中心型、消化管型である[1]。多中心型は全体のおよそ80%を占める[1, 8]。今回の検索においては、消化管型が50%と半数を占め、多中心型は15%と少数であった。多中心型の場合そのおよそ80%は左右対称性に末梢リンパ節が腫大する[1, 11]ので、腫大したリンパ節のfine needle aspirationにより臨床の現場で診断が可能である[10, 12]。このことが今回の検索において多中心型が少なかった原因のひとつであると考えられた。

犬のリンパ腫の免疫表現型についてはSueiroら [8] やCaniattiら [12] が示すようにB細胞性リンパ腫の方が多数を占めるが、今回の検索では、T細胞性が60%、B細胞性が30%であった。これは、多中心型のおおよそ80%がB細胞性であるということ [12,13] と今回の検索においては多中心型が少数であり、今回の検索ではその多くがT細胞性である消化管型が多数を占めたということに起因すると考えられた。ヒトにおける消化管型リンパ腫は、そのほとんどがB細胞性であり、T細胞性は極稀であるが [9]、犬の消化管型リンパ腫のおおよそ70~80%がT細胞性である [9,10]。

今回の検索において、皮膚型リンパ腫のうち、ホジキン様リンパ腫を除く4例のうちB細胞性およびT細胞性がともに2例であった。過去においても、Sueiroら [8] は7例の皮膚型リンパ腫のうち4例がT細胞性、3例がB細胞性であったとしており、Day [14] も上皮向性を示した7例の皮膚型リンパ腫のうち3例がT細胞性、残る4例はT細胞およびB細胞に陰性であったと報告している。これらは、すべて症例数が4例あるいは7例と少数であり、今後の詳細な検索が望まれる。

腫瘍細胞が混合型を示したのは、B細胞性では約83%、T細胞性では約67%であった。B細胞性混合型は全例において正常T細胞が反応性に浸潤し、腫瘍性B細胞と正常T細胞の間で大小不同が認められた。これに対し、T細胞性混合型は皮膚型1例においてのみ、正常B細胞の反応性浸潤が認められたが、その他ではB細胞の浸潤は認められず、腫瘍細胞自体に大小不同が認められた。以上のことから、HE染色標本において、腫瘍細胞以外に小型正常リンパ球が認められれば、B細胞性である可能性が示された。

犬リンパ腫の免疫学的表現型は、予後因子として重要な役割を担っており、治療として主流である化学療法への反応性と再発率はB細胞性

よりT細胞性の方が悪いとされる [1,2]。今回の症例における初診時からの生存期間は、T細胞性リンパ腫の方が短くなる傾向が伺えたものの、症例数が少ないため比較検討は困難であり、今後さらに症例数を多くして検討する必要があるものと思われた。

引用文献

- [1] Jacobs RM, Messick JB, Valli VE : Tumor of the hemolymphatic system, Tumors in Domestic Animals, Meuten DJ ed, 4th ed, 119-151, Iowa State Press, Ames, USA (2002)
- [2] Patterson-Kane JC, Perrins Kugler B, Francis K : The possible prognostic significance of immunophenotype in feline alimentary lymphoma : A pilot study, J Comp Pathol, 130, 220-222 (2004)
- [3] Carter RF, Valli VEO, Lumsden JH : The cytology, histology, and prevalence of cell types in canine lymphoma classified according to the National Cancer Institute Working Formulation, Can J Vet Res, 50, 154-164 (1986)
- [4] 川井健司, 堤 寛 : 酵素抗体法, 200-208, 新染色法のすべて, 水口国雄ら編, 医歯薬出版, 東京 (1999)
- [5] 篠宮克彦, 細田周二, 根元充弘, 野呂昌弘, 秋草文四郎, 濱川真治 : 免疫組織化学的染色における前処理, 医学検査, 50, 167-173 (2001)
- [6] Bankfalvi AA, Piffko J, Ofner D, Dreier R, Bocker W, Werner K : Significance of wet autoclave pretreatment in immunohistochemistry, Pathol Oncol Res, 2, 71-77 (1996)
- [7] 国仲伸男, 柳橋宏子, 三五朋子, 渡司博

- 幸, 藤川淳策, 藤本純一郎: パラフィン切片における小児血液腫瘍のマーカー診断鑑別表の作成, 医学検査, 50, 174-182 (2001)
- [8] Sueiro FAR, Alessi AC, Vassallo J: Canine lymphoma: A morphological and immunohistochemical study of 55 cases, with observations on p53 immunoreexpression, J Comp Pathol, 131, 207-213 (2004)
- [9] Coyle KA, Steinberg H: Characterization of lymphocytes in canine gastrointestinal lymphoma, Vet Pathol, 41, 141-146 (2004)
- [10] Ozaki K, Yamagami T, Nomura K, Narama I: T-cell lymphoma with eosinophilic infiltration involving the intestinal tract in 11 dogs, Vet Pathol, 43, 339-344 (2006)
- [11] 辻本 元: 白血球(系)の疾患, 678-687, 新獣医内科学, 村上大蔵ら編, 文永堂出版, 東京 (2003)
- [12] Caniatti M, Roccaabianca P, Scanziani E, Paltrinieri S, Moore PF: Canine lymphoma, immunocytochemical analysis of fine needle aspiration biopsy, Vet Pathol, 33, 204-212 (1996)
- [13] Culmsee K, Simon D, Mischke R, Nolte I: Possibilities of flow cytometric analysis for immunophenotypic characterization of canine lymphoma, J Vet Med, A47, 199-206 (2001)
- [14] Day MJ: Immunophenotypic characterization of cutaneous lymphoid neoplasia in the dog and cat, J Comp Pathol, 112, 79-96 (1995)

文 献 抄 録

台湾におけるオウム類鳥類からの鳥ポリオマウイルスおよびオウム類嘴羽病ウイルスの検出と塩基配列分析

Hsu CM, Ko CY, Tsai HJ (国際台湾大学) *Avian Dis*, 50: 348-353 (2006)

鳥ポリオマウイルス (APV) およびオウム類嘴羽病ウイルス (PBFDV) は、オウム類の鳥における最も一般的なウイルス疾患である。しかし、台湾ではオウム類の鳥におけるこれらのウイルスの存在は、これまで証明されたことがなかった。台湾のオウム類の鳥類からの分離ウイルスに、APVとPBFDVのゲノムが存在するかどうかを確定するためにPCR法が採用された。2002年から2005年の間に、計22種165羽のオウム類の鳥類が検索された。調査の結果APV陽性が15.2%, PBFDV陽性が41.2%, APV/PBFDV混合感染が10.3%であることが明らかとなった。クローニングおよびシークエンス後、PCR産物

の塩基配列は、GenBank から得られた塩基配列と比較された。APVについて、VP1およびt/T抗原コード領域ヌクレオチドとの相同性は各々97.5%~100%と97.6%~100%であった。PBFDVについて、ORF V1およびORF C1塩基配列とのヌクレオチド相同性は、各々92.2~100%および83.3~100%であった。アミノ酸塩基配列由来のPBFDV ORF V1断片の配列によって、2つの複製モチーフとヌクレオチド結合領域モチーフが保存されることが明らかとなった。PBFDVにおいて、ORF V1アミノ酸配列で推定される42の位置のうちの6つが、超可変であると考えられる。この研究で調べられた4つのゲノム断片に基づいて確立された系統発生樹では、特定のAPVまたはPBFDVの塩基配列の配置で鳥種を明確にすることはできなかった。

(岩手大学獣医病理学研究室)