

と畜検査における迅速病理診断法の検討

○浅沼 まりな

はじめに

と畜場で発見される腫瘍において、リンパ腫は発生頻度が高く[1、2]、他の腫瘍性病変との鑑別診断を要する疾病の1つである。当所では、と畜検査におけるリンパ腫の迅速診断法として、病変部等の押捺標本および凍結標本を作製し、病理検査に供してきた。しかし、リンパ腫は押捺標本のみでは腫瘍細胞と正常リンパ球との鑑別が困難なこともあり、凍結標本と併せても診断に苦慮する症例もある。また、牛伝染性リンパ腫ウイルス(以下 BLV)の感染により引き起こされる牛伝染性リンパ腫(以下 EBL)については BLV の感染状況把握のためにも迅速で正確な診断が求められるが、当所では EBL を疑った場合、全部廃棄としたのち、後日ホルマリン固定臓器を用いた免疫組織化学染色(以下 IHC)および遺伝子検査により BLV の関与を確認して EBL と診断していた。この場合、EBL と診断するまで一週間以上の期間を要しており、検査担当者の作業手順も多く、負担が大きかった。

本研究では、リンパ腫の迅速診断法の確立を目的として、凍結標本を用いた IHC(以下迅速免疫染色法)を検討することとした。通常、ホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いた IHC(以下ホルマリン法)では、ホルマリン固定臓器を用いてパラフィンブロックを作製し、マイクロームで薄切後脱パラフィン作業を行い染色工程に入るため、染色可能標本が完成するまで時間を要する。また、ホルマリン固定により生じる蛋白架橋反応による立体障害やマスキングの影響で、抗原は抗体と反応しにくくなるため、抗原賦活化処理を行う必要がある。一方、凍結標本では、組織を凍結し直ちに凍結切片作製装置(以下クリオスタット)内で薄切可能であり、抗原賦活化処理も短縮できるため、迅速に染色可能標本を作製することができる。今回、迅速免疫染色法においてホルマリン法で用いられている抗体および発色基質を使用し、各抗体反応時間を既知のホルマリン法を参考に設定し、迅速に標本作製が可能な条件を検討した。

また、検討で得られた結果をもとに、実際の症例を用いて迅速免疫染色法の成績を検討すると共に、牛のリンパ腫については簡易迅速 PCR 法[3]を併せて実施することで、EBL のより正確かつ迅速な鑑別診断に向けた知見が得られたのでその概要を報告する。

材料および方法

【迅速免疫染色法の検討】

- ・材料:正常な豚の腸間膜リンパ節(検体 1)、肺門リンパ節(検体 2)、および牛の正常な肺門リンパ節(検体 3)を試験に供した。
- ・方法:凍結切片作製用包埋皿に少量の包埋剤、2 mm厚に切り出した検体の順に入れ、その上からさらに包埋剤を重層した。その後 -80°C のディープフリーザー内で、あらかじめ冷却しておいたアルミ製の冷却板で皿を上下から挟み、3 分間急冷した。クリオスタット内に移動後、台座を取り付け、検体を $6\mu\text{m}$ 厚に薄切し、スライドグラスに貼り付けた。冷風でよく乾燥させ、4%パラホルムアルデヒドで 10 分間固定後、水道水で水洗し、包埋剤を完全に洗い流した。その後 PBS で洗浄し、スライドグラス上の水分を濾紙で拭き取り、一次抗体を組織上に積載し反応させ、一次抗体反応時間を検討した。PBS で一次抗体を洗い流した後、酵素標識二次抗体(以下二次抗体)を同様に積載し、二次抗体の反応時間を検討した。PBS で二次抗体を洗い流した後 DAB で発色させた。使用した一次抗体、二次抗体および発色基質は表1に示したとおりである。判定は、ほとんど細胞が染まらないものを×、一部の細胞は染まるものの、リンパ節の T 細胞領域、B 細胞領域が不明瞭なものを△、T 細胞領域、B 細胞領域が明瞭に区別できるものを○とした。一次抗体の反応時間は室温 10 分、30 分、60 分、 4°C オーバーナイトとし、二次抗体反応時間は室温 10 分、20 分、30 分とした。なお、室温は 15°C から 25°C の範囲内とした。

表1 使用抗体および発色基質

| | | |
|------|---------------------------------|--|
| | 一次抗体 | 二次抗体 |
| 抗体 | 抗 CD3(DAKO) | ヒストファインシンプルステイン MAX-PO (MULTI、ニチレイ) |
| | 抗 CD79 α (ニチレイ) | |
| 発色基質 | DAB ヒストファイン SAB-PO (M)キット(ニチレイ) | |

【リンパ腫と診断した症例の迅速免疫染色法および簡易迅速 PCR 法】

・材料:と畜検査時にリンパ腫を疑い病理組織検査を実施し、病変部の押捺標本および凍結標本によりリンパ腫と診断した豚の鼠径リンパ節、肝門リンパ節(症例1)および牛の心臓病変部、第4胃病変部、腎臓病変部(症例2)を試験に供した。

・迅速免疫染色法:症例1および症例2において、迅速免疫染色法の検討で得られた結果をもとに、抗 CD3 抗体、抗 CD79 α 抗体を用いて IHC を実施した。一次抗体反応時間は 60 分、二次抗体反応時間は 20 分とした。

・簡易迅速 PCR 法:症例2の病変部を用いて、既報[3]のとおり実施した。また、ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックも同時に作製し、DNA 抽出キット(QIAamp DNA FFPE Tissue Kit、QIAGEN)を用いて DNA を抽出し、同条件で PCR 検査を実施した。

結果

【迅速免疫染色法の検討】

各検体の染色結果は表2のとおりであった。一次抗体の反応時間が10分の場合、二次抗体の反応時間に関わらず全ての検体で陽性を示す細胞はほとんど認められなかった。一次抗体の反応時間が30分の場合には全ての検体で陽性を示す細胞が認められ、抗 CD3 抗体では T 細胞領域が良好に染まる検体も認められたが、検体1および検体2では、二次抗体反応時間にかかわらず抗 CD79 α 抗体がまばらに染まった。一次抗体の反応時間が60分の場合には二次抗体の反応時間が20分以上であれば全ての検体で良好な染色結果が得られ、これは当所で普段実施しているホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いた IHC プロトコルである 4℃オーバーナイトと遜色ない標本が得られた。従って、凍結標本で免疫染色を実施する場合、一次抗体を60分、二次抗体を20分で反応させると最短で判定可能な標本が得られるという結果となった。

表2 迅速免疫染色結果

| 一次抗体反応時間 | 二次抗体反応時間 | 検体1 | | 検体2 | | 検体3 | |
|-----------|----------|-----|---------------|-----|---------------|-----|---------------|
| | | CD3 | CD79 α | CD3 | CD79 α | CD3 | CD79 α |
| 10分 | 10分 | × | × | × | × | × | × |
| | 20分 | × | × | × | × | × | × |
| | 30分 | × | × | × | × | × | × |
| 30分 | 10分 | △ | △ | △ | △ | △ | △ |
| | 20分 | ○ | △ | ○ | △ | ○ | △ |
| | 30分 | ○ | △ | ○ | △ | ○ | ○ |
| 60分 | 10分 | △ | △ | △ | △ | △ | △ |
| | 20分 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| | 30分 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 4℃オーバーナイト | 30分 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |

【リンパ腫と診断した症例の迅速免疫染色法および簡易迅速 PCR 法】

- ・症例 1: 病変部で増殖していた細胞は抗 CD3 抗体陰性、抗 CD79 α 抗体陽性を示したため、B細胞性リンパ腫と診断した。
- ・症例 2: 病変部で増殖していた細胞は抗 CD3 抗体陰性、抗 CD79 α 抗体陽性を示したため、B細胞性リンパ腫と診断した(図1)。また、簡易迅速 PCR 法では全ての病変部から BLV 遺伝子が検出されたことから、EBL と診断した(図 2)。迅速免疫染色法および簡易迅速 PCR 法を組み合わせることで、検査開始後約 2 時間 30 分で EBL と判定することができた。同 DNA 抽出キットで抽出したサンプルを用いた PCR 検査でも同様の結果が得られた。

考察

今回検討した迅速免疫染色法では、ホルマリン法で用いられている抗体および発色基質を使用しても良好な標本を得られ、迅速診断に応用できることが判明した。また、一次抗体反応時間を 60 分、二次抗体反応時間を 20 分とすることで良好な染色結果を得ることができた。一次抗体のデータシートに記載の反応時間は、ホルマリン法で抗 CD3 抗体が 20 分、抗 CD79 α 抗体が 30 分から 1 時間とされており、染色結果も概ね合致していた。抗 CD3 抗体は反応時間が 30 分でも良好に染まる標本があったが、リンパ腫の場合は抗 CD79 α 抗体と併せて判定する必要があるため、一律の操作で両抗体を用いた標本を検査に供するためには、一次抗体の反応時間は 60 分が最適であると考えられた。一次抗体の反応時間が適切な時間を超過すると、バックグラウンドが強くなる恐れがあるが、通常 IHC では一次抗体の反応時間を 30 分から 1 時間を目安にすることが多く[4、5]、今回使用した抗 CD3 抗体もデータシートに記載の 20 分と比較して 60 分でも染色性は良好であったことから、60 分まで反応させても適用できると考えられた。また、二次抗体の推奨反応時間は 30 分とされており、20 分と比較して 30 分の方が染色性はやや強かったが、20 分でも T 細胞領域、B 細胞領域が明瞭に区別できる標本が得られた。今回のような発色強度であれば、反応時間を短縮しても検査に影響しないと思われた。

通常、抗体が抗原に浸透するまでには 15 分反応する必要があるとされているが[4]、人医療分野で用いられている凍結標本を用いた迅速免疫染色は、一次抗体反応時間が 4 分、全行程終了までは 15 分程度とされている[6]。この場合、通常の IHC よりも一次抗体を高濃度で使用し、37°C に加温した伸展器上で反応させている。しかし、抗体の濃度が濃すぎると抗原の有無に関係なく非特異的に抗体が組織や細胞上に残存してしまい、過染色が起こる可能性もあり[4]、また、当所で使用している抗体はすでに適切な濃度に希釈されているため、抗体の濃度を上げて反応時間を大幅に短縮することは難しい。また、反応温度の上昇は抗原抗体反応の時間を短縮する方法として知られているが、染色性が弱いうえ非特異的な着色が起こる場合が多いとされているため[4]、今回は検討しなかった。

リンパ節は皮質、傍皮質、髄質に分けられ、皮質には B 細胞領域であるリンパ濾胞が、傍皮質には T 細胞が主に分布している[7]。リンパ節が正常よりも腫大する疾病にはリンパ腫のほかに反応性過形成やリンパ節炎等が考えられる。反応性過形成は免疫刺激に対する良性非腫瘍性の応答で、濾胞過形成、傍皮質の拡大、洞組織球症の 3 つが現れる[7、8]。反応性過形成では一般的に正常なリンパ節構造が保たれると言われているが、3 者の割合は不規則なため組織構造は一定ではない。また、リンパ節炎は病原因子のリンパ節への侵襲により起こり、濾胞過形成が認められることもあるが、基本的に炎症性反応のため、炎症細胞の浸潤や膿瘍、線維化が認められることが多い[8]。いずれの病変も複数の細胞から構成されるが、リンパ腫は単一の細胞の増殖を特徴とするため[7]、迅速免疫染色法は構成する細胞の免疫表現型を確認するための補助的な診断方法として、より正確な診断に繋げられる可能性がある。

当所の検査方法では、EBL を診断するまで時間を要していたが、今回迅速免疫染色法を検討し、併せて簡易迅速 PCR 法を実施したところ、検査開始後約 2 時間 30 分で免疫染色および遺伝子検査の結果を得ることができ、EBL と診断することができた。従来 5 日間から一週間程度かかっていた検査時間を大幅に短縮し、検査に要する手順も削減することができたため、精密検査に適用可能と考えられた。BLV 感染の有無は ELISA による抗 BLV 抗体を検出する方法が基本とされているが[9]、当所では牛の解体後検査時に腫瘍を疑った場合、血液を採材することが難しいこと、また、EBL の検査頭数自体が少ないこと

から以前より PCR 検査を実施していた。今回行った簡易迅速 PCR 法では腫瘍部から直接採材可能であり、検出率も DNA 抽出キットを用いた方法と差は認められなかったため、簡易迅速 PCR 法は当所のと畜検査に即した手法と考えられた。

しかし、EBL を疑った症例は1頭のみであったことから、今後さらに多くの症例で迅速免疫染色法および簡易迅速 PCR 法を実施することで、迅速診断の精度を高めていく必要がある。また、今回迅速免疫染色法の手技を確立できたことで、リンパ球マーカー以外の抗体にも応用し、迅速免疫染色法をさらに活用していきたい。

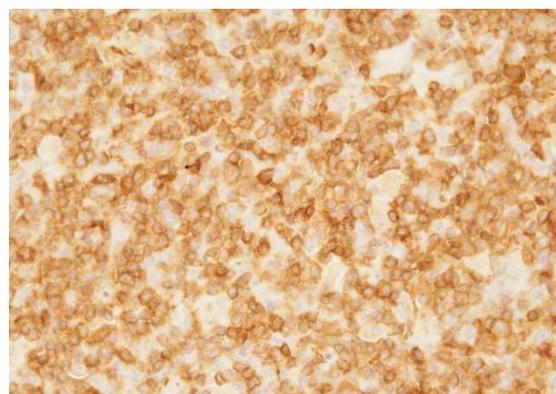


図1 症例2 心臓病変部
抗 CD79 α 抗体(×400)

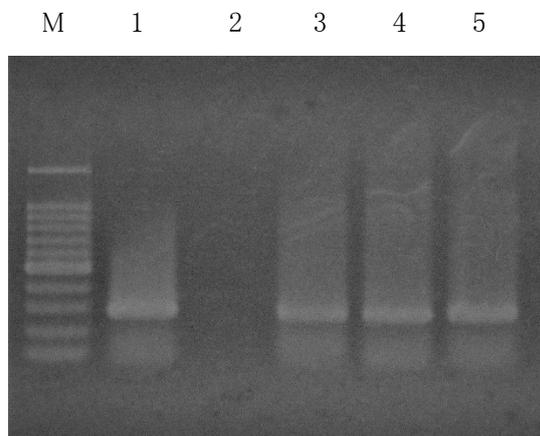


図2 症例2 簡易迅速 PCR 電気泳動像
M:100bp ladder
1:陽性コントロール 2:陰性コントロール
3:心臓病変部 4:胃病変部 5:腎臓病変部

参考文献

- [1]中島弘美ら 豚のリンパ腫—検出状況と解剖学的分類— 日獣会誌 53、319-323(2000)
- [2]全国食肉衛生検査所協議会微生物部会 令和2年度調査研究事業報告
- [3]三角加奈子ら 牛白血病ウイルスの簡易迅速 PCR 法の検討 日獣会誌 73、741-745(2020)
- [4]検査と技術 現場で“パツ”と使える免疫染色クイックガイド vol.46、No.9、973(2018)
- [5]実験医学別冊 細胞・組織染色の達人 実験を正しく組む、行う、解釈する免疫染色と ISH の鉄板テクニック 株式会社羊土社 高橋英機監修 大久保和央著 123(2018)
- [6]乳がんセンチネルリンパ節転移迅速診断における免疫染色併用の有用性 — 遺伝子検査との比較 — 日農医誌 63 巻 4 号、618-623(2014)
- [7]動物病理学各論 第3版 日本獣医病理学専門家協会編 文永堂出版 51-58 (2022)
- [8]カラーアトラス 病理組織の見方と鑑別診断 第7版 医歯薬出版株式会社 92 (2020)
- [9]大塚浩通ら:牛白血病を考える～対策と取り組み～ 臨床獣医 10、19-38 (2019)
- [9]小西美佐子:—最新の家畜疾病情報(VI)— 地方病性牛白血病(EBL) 日獣会誌 68、352-354 (2015)