

イヌ消化管型悪性リンパ腫由来腫瘍細胞株の樹立と 担癌 SCID マウスにおける血中カルシウム濃度の 変化およびPTH-rP 所見

小笹由香子¹, 柳川美由紀¹, 納谷 裕子¹, 荻原喜久美¹,
久松 伸², 秋山 孝洋³, 山田 隆紹⁴, 岸川 正剛¹

¹麻布大学・環境保健・病理, ²環境化学, ³細胞生物, ⁴獣医学部・内科II

イヌの悪性リンパ腫の発生頻度は比較的高いが、消化管型は少なく症例の10%未満であるといわれている。悪性リンパ腫の場合、ヒトでは高カルシウム血症を発生することがあり、腫瘍の随伴症候群としてQOLの点からも非常に着目されている。今回、腹部超音波検査で腹腔内に腫瘍が認められ消化管型悪性リンパ腫を疑うイヌの腹水よりTリンパ球の性状を示す細胞株を樹立し、その性状について詳細に検討したので報告する。

【材料および方法】症例は7歳齢、雄、ヨークシャテリアで、腹水貯留と下痢を主訴に来院した。身体検査では体重2.15 kgで重度消瘦が認められた。常法に従い腹水より初代培養し、樹立した細胞株は限界希釈法にてクロニングを行った。細胞株は免疫組織化学的染色を施し、電顕および共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。SCIDマウス10匹の背部皮下に株化細胞を接種し、担癌SCIDマウスから採取した血清を用いて血中Ca濃度の測定を行った。また、増殖した腫瘍組織についてPTH-rP (parathyroid hormone-related peptide; 副甲状腺関連タンパク質)を用いて免疫組織化学的に検討した。さらにイヌのPTH-rPを用いてRT-PCR法を行い、PTH-rP mRNAの発現も調べた。陽性コントロールとして病理学研究室で樹立された扁平上皮癌由来細胞株を用いた。

【結果】1. 腹水の形態学的所見：腫瘍細胞は、小型で、幼若～成熟したリンパ球系の形態を示した。電

顕所見では、明瞭な核小体をもち、核縁の不規則性が認められる細胞も存在した。2. 細胞株の培養所見：培養細胞は類円形～涙滴状で浮遊し、一部は集塊状に増殖していた。13ヶ月後の細胞の倍加時間は植込み細胞数 $2.0 \times 10^5/\text{ml}$ のときに36時間であった。3. 樹立細胞の形態的所見：腫瘍細胞は胞体がやや豊富で、明瞭な核小体が認められた。電顕所見では、細胞の表面は平滑で、freeなribosomeが中等度に分布し、RERとmitochondriaが散在し、いわゆるリンパ球様で細胞質にはlysosomeやミエリン様物質が認められた。4. 細胞株の免疫組織化学的所見：腫瘍細胞は、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ陰性で、酸ホスファターゼおよび β -グルクロニダーゼ陽性であった。CD2, CD3, CD5, CD8およびThy-1陽性、CD4, BLA36, IgGおよびIgMが陰性を呈した。(Fig. 1) また、モルモットの赤血球に対してロゼット形成が認められた。5. SCIDマウス移植所見：SCIDマウスへの移植は10例全例に生着し、約2ヶ月で大豆大となった。生着した組織は結合組織に乏しく全て腫瘍細胞で占められており、涙滴様で細胞質が比較的広く核小体明瞭な、樹立株と全く同様の形態をした細胞が認められた。SCIDマウスの肝類洞内には多数の好中球が認められた。また、脾腫と好中球増多症が認められ、抹消血中の好中球の割合は85～93%を示した。樹立細胞株および移植された腫瘍組織は抗PTH-rp抗体陽性を呈した。6.

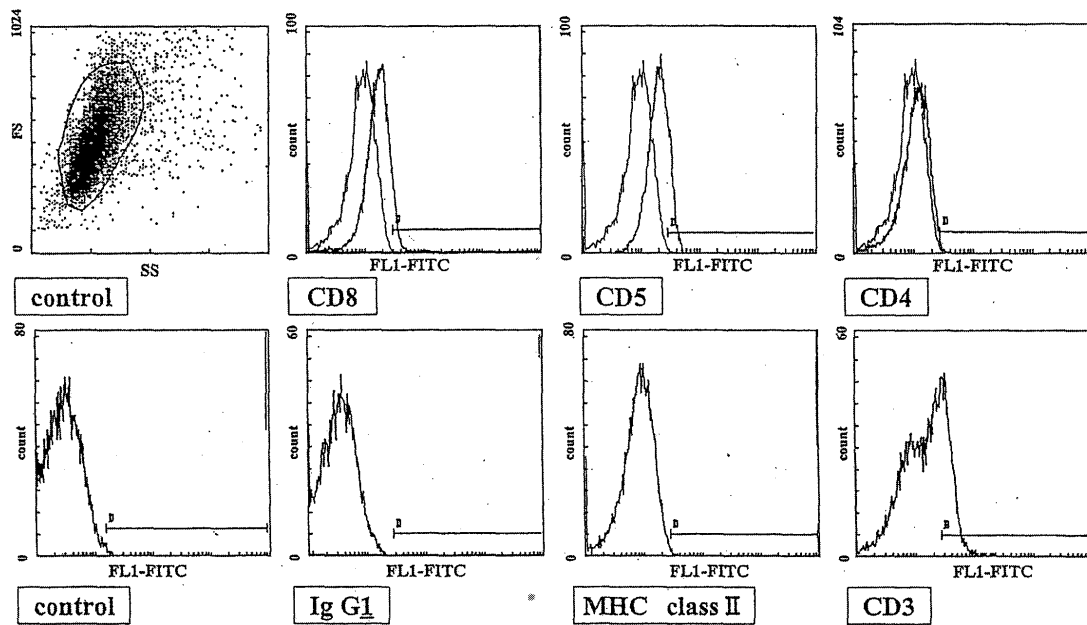


Fig. 1 フローサイトメーターによるイヌ消化管型悪性リンパ腫由来腫瘍細胞株の解析

担癌 SCID マウスの血中 Ca 濃度：全症例において高 Ca 血症がみられ、血清 Ca 値は 12.8 ~ 14.3 mg/dl であった。7. RT-PCR 法によるイヌ PTH-rP mRNA の検出結果は Fig. 2 に示す通りであった。扁平上皮癌由来細胞株および当樹立株さらに SCID マウス由来の腫瘍細胞株について 281bp にバンドが検出された。
【考察】 この症例は腹部超音波検査において腹腔内に腫瘍を認め、消化管型悪性リンパ腫であることを示唆した。腹水より樹立した細胞株が CD2, CD3, CD5, CD8, Thy-1 陽性を呈し、CD4 陰性により suppressor/cytotoxic T リンパ球由来であることを確認した。また、本実験に用いた腫瘍細胞株は、SCID マウスに高 Ca 血症を起こし、PTH-rP の mRNA およびタンパク質レベルでの発現が確認されたことによ

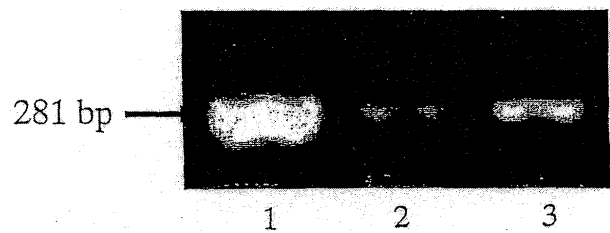


Fig. 2 RT-PCR 法によるイヌ PTH-rP mRNA の検出
 Lane 1. Squamous cell carcinoma (8×10^6)
 2. Lymphoma (1×10^7)
 3. SCID (1×10^7)

り、今回樹立された細胞株はイヌ悪性リンパ腫における腫瘍随伴症候群として良いモデルになると考えられた。