

豚の回腸リンパ腫の病理学的研究

谷本忠司

1996

豚の回腸リンパ腫の病理学的研究

— 1996 —

谷 本 忠 司

高知県中央食肉衛生検査所

■ 目 次 ■

緒 言.....	1
第 1 部 ホルマリン固定・パラフィン切片とした豚組織中の リンパ球に反応する抗体の検索	
1. 緒言.....	2
2. 材料.....	3
3. 方法.....	3
(1) 抗体	
(2) 抗原賦活処理	
(a) マイクロウェーブ熱処理	
(b) 熱湯処理	
(c) 酵素処理	
(3) 免疫組織化学	
4. 結果.....	6
5. 考察.....	8
6. 図と表	11
7. 和文要約	16
8. 英文要約	17
第 2 部 豚の回腸リンパ腫の組織学的, 酵素細胞化学的, 免疫組織化学的および超微形態学的検索	50
1. 緒言.....	18
2. 材料.....	19

3. 方法.....	20
(1) 発生率	
(2) 臨床事項	
(3) 肉眼検査	
(4) 組織・細胞学	
(5) 酵素細胞化学	
(6) 免疫組織化学	
(7) 超微形態学	
4. 結果.....	24
(1) 発生率	
(2) 臨床事項	
(3) 肉眼所見	
(4) 組織・細胞学的所見	
(5) 酵素細胞化学的所見	
(6) 免疫組織化学的所見	
(7) 超微形態学的所見	
5. 考察.....	28
6. 図と表.....	37
7. 和文要約.....	43
8. 英文要約.....	45
結 論.....	47
謝 辞.....	49
文 献.....	50

緒 言

リンパ腫（同義語：悪性リンパ腫，リンパ肉腫）[94] は，豚の好発腫瘍の一つであるが，詳細な病理学的特徴は十分に明らかにされていない [8, 45, 94]。家畜のリンパ腫（非ホジキンリンパ腫）は，腫瘍の解剖学的位置によって多中心型（multicentric），胸腺型（thymic），消化器型（alimentary），皮膚型（cutaneous）および孤立型（solitary）に分類されており [45, 94, 107]，豚のリンパ腫では，大部分を多中心型，一部を胸腺型が占め，他の病型は極めて希とされている [8, 45, 107]。しかし，最近になって，豚の消化器型リンパ腫と見なしうる症例が相次いで報告された [2, 27, 36, 37, 42, 52, 80, 96 - 101, 133, 148 - 150]。著者も 1980 年から 1994 年までの 15 年間に，高知県の 2 か所で行った食肉衛生検査で発見された 26 例の豚のリンパ腫中に，回腸を侵す 12 例を見いだした。

リンパ腫の大部分は B 細胞あるいは T 細胞から発生するので [134, 157]，ヒトのリンパ腫の検索では，それぞれの細胞系列に特異的な抗体を使った免疫染色を実施することが多い [58, 155]。また最近では，形態保持の良好なパラフィン切片に使用可能な抗ヒトリンパ球抗体が，次々と市販されている [51, 58, 119, 155]。一方，豚のリンパ球に反応する抗体は，大部分が T 細胞の膜抗原を認識するものであり，しかも染色する場合は凍結切片を必要とする [1, 44, 68 - 71]。このため，豚のリンパ腫の免疫学的特徴付けは十分にされていない。

そこで，本論文では，豚の回腸リンパ腫の病理学的特徴，特に十分に検索されていない腫瘍細胞の起源や特徴を明らかにするために，第 1 部では，「ホルマリン固定・パラフィン切片とした豚組織中のリンパ球に反応する抗体の検索」，第 2 部では，第 1 部での研究成果を加えた「豚の回腸リンパ腫の組織学的，酵素細胞化学的，免疫組織化学的および超微形態学的検索」を実施した。これらの検索は，著者が報告した研究（第 1 部 [141 - 144]，第 2 部 [88, 137 - 140, 143, 144]）に基づいて行った。

第1部 ホルマリン固定・パラフィン切片とした豚組織中のリンパ球に反応する抗体の検索

1. 緒言

組織や血液中のリンパ球 subset を同定することは、家畜の正常および病的な免疫反応の解明、リンパ球増殖性疾患の診断のために重要である。特に豚は、ヒトの心血管、皮膚および栄養性疾患、移植並びに悪性黒色腫などのモデル動物として広く使われているために、人体医学の立場からも免疫応答の解明が必要とされている [68]。

単クローン性抗体を使った免疫組織化学的検索は、これらの研究手段として最も高感度で有用なものの一つである。豚のリンパ球の分化抗原 (cluster of differentiation, CD) を認識する単クローン性抗体は幾つか作製されているが [26, 68, 69, 71], これらは通常、新鮮な細胞浮遊液あるいは組織の凍結切片にしか応用出来ない。

一方ヒトでは、パラフィン切片に応用可能な抗リンパ球抗体が作製され、リンパ腫の診断などに広く活用されている [12, 58, 119]。ヒトの抗 CD18 抗体 (leukocyte function-associated antigen 1, LFA-1, clone MHM23), 抗 CD35 抗体 (C3b receptor, clone To5) および抗 human leukocyte antigen (HLA-DR) 抗体 (clone CR3/43) は、細胞浮遊液とした豚のリンパ球に反応することが報告されている [1, 44, 70]。しかし、著者の知る範囲では、ホルマリン固定・パラフィン切片とした豚組織中のリンパ球に反応する抗体は検索されていない。

ホルマリン固定は形態保持が良好であるが、免疫組織化学的検索では、抗原の消失や masking のために満足のゆく結果が得られないことがある [124]。従来から行われているタンパク分解酵素による脱パラフィン切片の消化法は、一部の抗原回復には劇的な効果があるが、リンパ球抗原を含む大部分の抗原には効果がない [124]。

最近、脱パラフィン切片を金属 [54, 124, 132, 151], 尿素 [10], 緩衝液 [10, 54, 123, 145, 151] あるいは他の物質 [7] を含む浸漬液に入れ、電子レンジ [124], 恒温槽 [54, 151] などによって加熱処理する新しい抗原賦活法が次々と考案された。これらの方法によって、凍結切片を必要とする抗体の幾つかが、パラフィン切片にも応用可能であることが確認されている [10]。

これらの研究成果を踏まえて、本論文の第1部では、ヒトあるいは豚のリンパ球に反応する抗体の内、ホルマリン固定・パラフィン切片とした豚組織中のリンパ球に良好に反応する抗体があるかどうか、脱パラフィン切片に対する幾つかの抗原賦活処理法を組み合わせる免疫染色を行い、検討した。また、これらの抗体に最適な抗原賦活処理法についても検討した。

2. 材料

6 か月齢の肉用豚, 5 頭からリンパ組織を含む正常組織を採取し, 市販 20% 中性緩衝ホルマリン液 (マイルドホルム 20N: 和光純薬工業, 大阪) に入れ, 室温で 48 時間振盪固定した [143, 144]。固定材料は, パラフィン包埋後, 2~4 μm に薄切した。切片は, 細胞核の形態保持のために, 40°C の湯上でゆっくり伸展させ, 剥離防止のために, aminopropyl triethoxysilane (ナカライテスク, 京都) を塗布したスライドガラス [55, 74] に密着させてから, 37°C の孵卵器内で一晩乾燥させた [5, 103, 155]。

3. 方法

(1) 抗体

合計 33 種類の抗体 (Table 1) について検討した。その内, ヒトのリンパ球に反応する抗体は 25 種類, 豚のリンパ球に反応する抗体は 8 種類であった。

(2) 抗原賦活処理

使用した抗体に対する最適な抗原賦活条件を決定するために, 11 種類の抗原賦活処理法 (6 種類の浸漬液を使ったマイクロウェーブ熱処理, 2 種類の市販浸漬液を使った熱湯中での加熱処理および 3 種類のタンパク分解酵素を使った酵素処理) を実施した。処理効果の評価は, 免疫染色に使用したヒトおよび豚のリンパ球に反応する抗体の陽性対照切片の反応性を基準とした。

(a) マイクロウェーブ熱処理

浸漬液 (250ml) をポリプロピレン製バット (Dako, 京都) に入れ, 電子レンジ (H2500 microwave processor, Energy Beam Science, USA) の回転皿の中央部分に置き, 沸騰させた。その後, 脱パラフィン切片を浸漬し, 3 分間 \times 3 回マイクロウェーブ熱処理 (600W) した [124, 156]。1 回の照射毎に, 蒸発した水分を補給した。マイクロウェーブ照射後, 氷水中でバットごと 10 分間冷却し, それから切片を phosphate-buffered saline solution (PBSS, pH 7.4) で洗浄した。浸漬液として 4% 塩化アルミニウム水溶液 [132], 0.1M クエン酸塩緩衝液 (pH 6.0) [10, 54, 123, 124, 145, 151], 0.05M グリシン塩酸緩衝液 (pH 3.5) [145], 0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) [123], 6M 尿素水溶液 [10] および 5% 硫酸亜鉛水溶液 [54, 123, 151] を使用した。

(b) 熱湯処理

浸漬液 (250ml) をポリプロピレン製バット (Dako, 京都) に入れ, 恒温水槽 (Thermominder EX, Tatec, 埼玉) 内で 95°C まで加温した。その後, 脱パラフィン切片を浸漬し, 95°C で 10 分間熱湯処理した [54, 151]。処理後, 氷水中でバットごと 10 分間冷却し, それから切片を PBSS で洗浄した。浸漬液として antigen retrieval solution (Dako, 京都) および target unmasking fluid (Monosan, Netherlands) [7] を使用した。

(c) 酵素処理

免疫染色の前処理として酵素処理を必要とする抗ヒト κ 鎖抗体 (3 種), 抗ヒト λ 鎖抗体 (3 種), 抗 CDw75 抗体, 抗 HLA-DR 抗体 (clone TAL. 1B5), polyclonal 抗 CD3 抗体, 抗 CD45RO 抗体 (clone OPD-4) の 10 種類の抗体にのみ行った。酵素液を脱パラフィン切片上に滴下し, 湿室 (多目的インキュベーションチャンバー, コスモ・バイオ, 東京) 内で 37°C で 30 分間反応させた。酵素液および湿室は, 孵卵器内で予め 37°C に保温していたものを使用した。処理後, 切片を PBSS で洗浄した。酵素液として 4% pepsin (Dako, 京都) - 0.2M 塩酸水溶液, 0.1% pronase (Dako, 京都) - PBSS および 0.1% trypsin (Dako, 京都) - PBSS を使用した。

(3) 免疫組織化学

一般的な染色作法は, 成書に従った [156]。染色試薬は, Labelled streptoavidin-biotin 法 [23, 25] による免疫染色キット (Universal LSAB kit, Dako, 京都) を使った。標識酵素は, horseradish peroxidase または alkaline phosphatase を使用した。染色手順の概略は以下の通りであった。切片は, レモゾール (和光純薬工業, 大阪) 中で脱パラフィン後, エタノール下降系列を通した。標識酵素として horseradish peroxidase を使用する場合には, 内因性ペルオキシダーゼ活性を除去するために, 100% エタノールを通した後, 0.3% 過酸化水素水加メタノールに 30 分間浸した。水洗後, 抗原性賦活処理を行なった。その後, 染色キットの手引き書に従って, 湿室内で免疫染色を行なった。一次抗体は, 4°C で 24 時間反応させた。標識酵素の発色基質溶液として, peroxidase には 0.02% 過酸化水素水を含む 0.02% 3,3' - diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB : 和光純薬, 大阪) - PBSS を, alkaline phosphatase には new fuchsin 基質キット (Dako, 京都) を使用した。なお, DAB による peroxidase の発色を増強するために, 発色基質液に 0.02% 塩化ニッケルを添加したり [35, 156], DAB 反応後の標本を 0.5% 硫

酸銅・0.9%塩化ナトリウム混合水溶液に5分間浸漬した [117]。対比染色として、Mayerのヘマトキシリン液で1分間染色した。陽性対照として、ヒトのリンパ球に反応する抗体には、ホルマリン固定・パラフィン切片としたヒトの扁桃組織 (Dako, 京都) を、豚のリンパ球に反応する抗体には、豚の扁桃組織の凍結切片をアセトン固定したものを使用した。陰性対照として、マウスおよびウサギの正常血清 (Dako, 京都) を使用した。

4. 結果

検討した合計 33 種類の抗体の内、15 種類の抗体が、ホルマリン固定・パラフィン切片とした豚組織中のリンパ球に陽性反応を示した (Table 2)。ヒトのリンパ球に反応する抗体では、抗ヒト κ 鎖抗体 (3 種)、抗ヒト λ 鎖抗体 (3 種)、抗 CDw75 抗体、抗 CD79 α 抗体、抗 CD79 β 抗体、抗 HLA-DR 抗体 (3 種) および polyclonal 抗 CD3 抗体の 13 種類が反応し、豚のリンパ球に反応する抗体では、抗 SLA class-II 抗体 (clone H42A) および抗 CD2 抗体 (clone MSA4) の 2 種類が反応した。陽性反応を示した抗体の豚リンパ球に対する反応部位は、陽性対照と同様であった。

11 種類の抗原賦活処理の効果を比較したところ、抗軽鎖抗体には、trypsin による酵素処理が、その他の抗体 (抗 HLA-DR 抗体: clone LN-3 を除く) には、Tris-HCl buffer 中でのマイクロウェーブ熱処理および antigen retrieval solution 中での熱湯による加熱処理が最も良い結果を示した (Table 3)。また、クエン酸塩緩衝液または尿素水溶液中でのマイクロウェーブ熱処理、target unmasking fluid 中での熱湯による加熱処理または pepsin による酵素処理 (polyclonal 抗 CD3 抗体のみ) でもほぼ同様の効果が得られたが、クエン酸塩緩衝液では polyclonal 抗 CD3 抗体の反応性に効果がなく、尿素水溶液および target unmasking fluid では中等度の background staining が見られ、尿素水溶液および pepsin では細胞の収縮や融解が見られた (Table 3)。抗 HLA-DR 抗体 (clone LN-3) にのみ、未処理が最適であった。

抗原賦活処理によって陽性反応を示した 15 種類の抗体 (LN-3 のみ未処理) の豚組織に対する反応性は、Table 2 に示している。

抗ヒト κ 鎖および λ 鎖抗体の陽性部位は、主に濾胞内外や髄質に存在する免疫芽球や形質細胞に見られた。Trypsin による酵素処理や尿素中でマイクロウェーブ熱処理した切片では、mantle zone のリンパ球表面にも陽性像が見られたが、結果が不安定で、再現性に乏しかった。正常リンパ節での κ 鎖と λ 鎖の発現比率は、1:1~1.5 であった。使用した抗ヒト軽鎖抗体の内、交差反応性は Dako 社製の IgG 分画抗体が最も優れていた。

CDw75 の陽性像は、主にリンパ濾胞の胚中心のリンパ球に見られたが (Fig. 1)、染色性は同一切片内でもリンパ濾胞によって様々であった。抗 CDw75 抗体は、胚中心内の tingible body macrophage や濾胞樹状細胞には反応しなかった。非リンパ性組織での CDw75 の陽性像は、上皮細胞 (胆管、胆嚢、腎尿細管、気管支、食道粘膜、胃粘膜、腸粘膜、膵臓導管部、副腎皮質、卵胞、甲状腺濾胞、顎下腺導管部、汗腺、皮膚粘膜、毛根細胞など)、骨格筋細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、筋上皮細胞および神経細胞に見られた。

抗 CD79 α 抗体および抗 CD79 β 抗体の反応性は本質的に同様であり、陽性像

はリンパ濾胞の mantle zone のリンパ球に強く見られた (Fig. 2)。CD79 α の陽性像は、免疫芽球や形質細胞にも見られた。非リンパ性組織では、CD79 α の陽性像は、粘膜上皮細胞 (大腸, 直腸) および平滑筋細胞に見られ、CD79 β の陽性像は、上皮細胞 (毛包, 汗腺, 腎臓集合管, 糸球体たこ足細胞, 気管支, 食道粘膜, 胃粘膜, 卵胞, 顎下腺導管部など), 骨格筋細胞, 心筋細胞, 平滑筋細胞, 血管内皮細胞およびシュワン細胞に見られた。

Polyclonal CD3 陽性細胞は、T 細胞領域に局限していた。リンパ節および扁桃の傍皮質領域 (Fig. 3), 脾臓の動脈周囲リンパ鞘 (Fig. 4), 回腸パイエル板の濾胞間領域および胸腺 (Fig. 5) のリンパ球が polyclonal CD3 に陽性であった。胸腺では、髄質リンパ球が皮質リンパ球よりも抗 polyclonal CD3 抗体に強く染色された。また、polyclonal CD3 陽性リンパ球は、リンパ濾胞, 表皮, 気管支上皮および胃腸粘膜内にも混在して見られた。

HLA-DR 陽性部位は、リンパ濾胞の胚中心および mantle zone のリンパ球に見られた。パイエル板では、dome region のリンパ球も陽性であった。リンパ組織での HLA-DR 陽性細胞は、非リンパ球にも見られた。リンパ節および扁桃では、濾胞樹状細胞, 糸状嵌入細胞および高内皮小静脈 (Fig. 6) が、胸腺では、上皮性細網細胞および糸状嵌入細胞 (Fig. 7) が HLA-DR に陽性であった。非リンパ性組織での HLA-DR (clone TAL. 1B5) の陽性像は、表皮の Langerhans 細胞, 肝臓の Kupffer 細胞, 肺胞マクロファージ, 肥満細胞, 周皮細胞, 平滑筋細胞, 内皮細胞 (毛細血管, 小血管) および腎臓の間質細胞に見られた。抗 SLA class-II 抗体の染色には、中等度の background staining が見られ、反応性は clone TAL. 1B5 よりもはるかに弱かった。

5. 考察

今回の実験から、脱パラフィン切片を適切に抗原賦活処理することによって、凍結切片しか反応しない抗体や抗原由来の動物種しか反応しない抗体でもパラフィン切片に応用可能であることが判明した。また、検討した合計 33 種類の抗体の内、抗ヒト κ 鎖抗体 (Dako 社製 polyclonal 抗体, Tago 社製 polyclonal 抗体および clone Hp 6053), 抗ヒト λ 鎖抗体 (Dako 社製 polyclonal 抗体, Tago 社製 polyclonal 抗体および clone Hp 6054), 抗 CDw75 抗体 (clone LN-1), 抗 CD79 α 抗体 (clone HM57), 抗 CD79 β 抗体 (clone B29/123), 抗 HLA-DR 抗体 (clones TAL. 1B5, CR3/43, and LN-3), polyclonal 抗 CD3 抗体, 抗 SLA class-II 抗体 (clone H42A) および抗豚 CD2 抗体 (clone MSA4) の 15 種類の抗体が豚リンパ球に陽性反応を示した。11 種類の抗原賦活処理の効果を比較したところ、抗ヒト軽鎖抗体には、0.1% trypsin による酵素処理が、他の抗体 (抗 HLA-DR 抗体: clone LN-3 を除く) には、0.1M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 中でのマイクロウェーブ熱処理または Dako 社製 antigen retrieval solution 中での熱湯による加熱処理が最良の結果を得た。しかし、抗 HLA-DR 抗体 (clone LN-3) にのみ、未処理が最適であった。これらの抗体の陽性部位は、ヒトまたは豚での報告とほぼ一致した。

豚の軽鎖の各タイプに対する抗体は市販されていない。本研究で使用した Dako 社製抗 κ 鎖および λ 鎖ポリクローナル抗体は、サルとイヌとに交差反応することが報告されている [62, 115, 116]。ホルマリン固定・パラフィン切片を使った免疫グロブリンの免疫染色には、前処理としてタンパク分解酵素による脱パラフィン切片の消化が必要である [11, 81, 155]。ヒトでは、trypsin 処理によって強い染色性が得られるが [11, 81], 今回の検討によって豚でも同様であることが判明した。脱パラフィン切片を酵素処理して染色される免疫グロブリンは、細胞質内免疫グロブリンのみである [81, 155]。ホルマリン固定・パラフィン切片を使った細胞膜表面の免疫グロブリンの証明には、脱パラフィン切片の前処理として、酵素処理時間の微調整 [11] や尿素溶液中でマイクロウェーブ処理する方法 [85] が報告されているが、今回の実験 (Table 3) では、これらの方法は結果が不安定で再現性に乏しかった。

抗 CDw75 抗体 (clone LN-1) は、リンパ濾胞の胚中心の B 細胞に反応し、pre-B 細胞が表面免疫グロブリンを発現する時期から表出される 45~85-kd の sialoantigen を認識する [14]。豚のリンパ組織および非リンパ組織での CDw75 の反応性は、ヒトとほぼ同様であった [14, 58]。

抗 CD79 α 抗体 (clone HM57) および抗 CD79 β 抗体 (clone B29/123) は、B 細胞の細胞膜に発現する抗原レセプター (surface IgM) に結合する mb-1 遺伝子産物の 47-kd の分子および B29 遺伝子産物の 37-kd の分子の合成ポリペプチドを免疫して得られた単クローン性抗体である [83, 84]。CD79 α の発現は precursor

B細胞から始まるが、CD79 β はこれに遅れて（主に pre-B細胞から）発現してくる。また、CD79 α の発現はB細胞が形質細胞に分化するまで持続するが、CD79 β の発現はそれ以前に消失する [84]。ヒトのリンパ組織でのCD79 α およびCD79 β の陽性部位は、主として mantle zone のB細胞、まれに胚中心のB細胞であるが [83, 84]、豚のリンパ組織でも同様であった。ヒトでは、非リンパ組織での抗CD79 α 抗体および抗CD79 β 抗体の反応性は、十分に検索されていない [83]。

Polyclonal 抗CD3抗体は、ヒトのCD3 ϵ 鎖の156~168番目のアミノ酸配列部分の合成ペプチドを免疫して得られた抗体で、成熟T細胞の細胞膜および未成熟T細胞（precursor T細胞）の細胞質内19-kd, 21-kd および26-kdの抗原を認識する [82]。Polyclonal CD3は、ヒトでは特異性の極めて高い汎T細胞マーカーとされており [58]、豚の組織での反応部位もT細胞領域のみであった。

Polyclonal 抗CD3抗体は、イヌにも交差反応することが知られている [17, 46, 83]。Polyclonal 抗CD3抗体を使った免疫染色の前処理として、イヌの組織切片の場合には pronase による酵素処理が最適とされているが [17]、豚の組織切片の場合には pepsin が最適であった。抗豚CD2抗体（clone MSA4）は豚の汎T細胞マーカーとされているが、今回の検討によって、豚のホルマリン固定・パラフィン切片には polyclonal CD3 が良好に反応することが判明した。

大部分の抗リンパ球抗体は細胞膜表面を認識するが、この部位の抗原量は少なく、しかも大部分の抗原性はホルマリン固定で失活する [46]。Masonらは、細胞膜表面よりもはるかに抗原量の多い細胞質内抗原に注目し、目的とするリンパ球の細胞質内の特異抗原領域の合成ペプチドを抗原とすることによって（anti-peptide antibody technique） [46]、ホルマリン固定・パラフィン切片に応用でき、反応性も良好な抗ヒト汎T細胞抗体（polyclonal CD3） [82]、抗ヒトT細胞 subset 抗体（CD8）および抗ヒト汎B細胞抗体（CD79 α , CD79 β ） [83, 84] を得ている。Polyclonal 抗CD3抗体、抗CD79 α 抗体および抗CD79 β 抗体は、動物組織の凍結切片をアセトン固定したものやカルノア固定・パラフィン切片を使った免疫組織化学的検索によって、サル、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ、ネコ、ウサギ、ニワトリ、モルモット、ラット、マウスおよびフクロネズミにも広く交差反応することが確認されている [46, 83, 155]。

主要組織適合遺伝子複合体クラスII抗原（major histocompatibility complex, MHC）は、immune-associated antigen（Ia抗原）とも呼ばれ、主としてCD4陽性T細胞の活性化に関与している [58]。ヒトのMHCクラスII分子は、ヒト白血球抗原（human leukocyte antigen, HLA）のD領域に位置しており、DR, DQ, DP と呼ばれる3つの遺伝子座から成っている [58]。一方、豚のMHCクラスII分子は、豚白血球抗原（swine leukocyte antigen, SLA）のD領域に位置しており、DR, DQ と呼ばれる2つの遺伝子座から成っている。MHCクラスII分子の抗原

決定基は、動物種間での免疫学的交差が確認されており [67]、抗 HLA-DR 抗体の幾つか（本研究で使用した clone CR3/43 も含む）は、SLA-D に交差反応することが確認されている [1, 34, 65]。本研究で使用した 3 種類の抗 HLA-DR 抗体の内、clone TAL. 1B5 は、豚の組織に最も良く反応した。HLA-DR はもともと B 細胞にのみ発現すると考えられていたが [58]、今回の検索結果 (Table 2.) が示す様に、他の免疫担当細胞である T 細胞や抗原提示細胞（濾胞樹状細胞、糸状嵌入細胞、表皮 Langerhans 細胞など）のみならず、様々な細胞に広く発現していることが判明している [13, 58, 105, 125]。パラフィン切片とした豚組織での HLA-DR の陽性部位は、ヒトや他の動物種（豚も含む）とほぼ同様であった。

マイクロウェーブや熱湯を使った加熱処理による抗原賦活の科学的根拠は不明であり、浸漬液の違いによって抗原賦活効果に差がでる理由も不明である。しかし、抗原賦活効果は、切片に加えられた熱エネルギーの総量、浸漬液の pH、浸透圧またはイオン強度に依存するのではないかと考えられている [151]。Shi ら [123] は、9 種類の抗体に対する反応性の改善効果を 7 種類の浸漬液の pH を 10 段階に調整した状態（合計 70 種類）で比較し、0.1M Tris-HCl buffer (pH 8.0) が全ての抗体の反応性の向上に最も高い効果が得られたと報告している。本研究で使用した抗体においても、0.1M Tris-HCl buffer (pH 8.0) で最も安定した抗原賦活効果が得られた。

Table 1. Antibodies used for immunohistochemical evaluation of the reactivities for swine lymphocytes in formalin-fixed, paraffin-embedded, and antigen-retrieved tissue sections.

Antibody*	Specificity	Dilution	Source
Human CD45 (clones 2B11 + PD7/26)	Leukocyte	prediluted	Dako, Kyoto, Japan
Human κ light chain (Polyclonal)	B cell	1 : 30,000	Dako
Human κ light chain (Affinity-purified polyclonal)	B cell	1 : 100	Tago, Burlingame, USA
Human κ light chain (clone Hp 6053)	B cell	Prediluted	Nichirei, Tokyo, Japan
Human λ light chain (Polyclonal)	B cell	1 : 30,000	Dako
Human λ light chain (Affinity-purified polyclonal)	B cell	1 : 100	Tago
Human λ light chain (clone Hp 6054)	B cell	Prediluted	Nichirei
Human CD20-cy (clone L-26)	B cell	1 : 50	Dako
Human CD35 (clone To5)	B cell	1 : 200	Dako
Human CD45RA (clone 4KB5)	B cell	1 : 50	Dako
Human CD45RA (clone MB-1)	B cell	1 : 25	Bio-Science Products AG, Emmenbrucke, Switzerland
Human CD74 (clone LN-2)	B cell	Prediluted	Nichirei
Human CDw75 (clone LN-1)	B cell	Prediluted	Nichirei
Human CD79 α (clone HM57)	B cell	1 : 10	Masson et al. [83]
Human CD79 β (clone B29/123)	B cell	1 : 10	Masson et al. [84]
clone DBA.44	B cell	1 : 50	Dako
clone DBB42	B cell	Prediluted	Immunotech SA, Marseilles, France

clone MB-2	B cell	1 : 25	Bio-Science
HLA-DR (clone TAL. 1B5)	B cell	1 : 100	Dako
HLA-DR (clone CR3/43)	B cell	1 : 50	Dako
HLA-DR (clone LN-3)	B cell	Prediluted	Nichirei
Human CD3 (polyclonal)	T cell	1 : 200	Dako
Human CD43 (clone MT-1)	T cell	1 : 25	Bio-Science
Human CD45RO (clone UCHL-1)	T cell	1 : 50	Dako
Human CD45RO (clone OPD-4)	T cell	1 : 50	Dako
SLA class-II (clone H42A)	B cell	1 : 100	VMRD, Pullman, Washington
SLA class-II (clone MSA3)	B cell	1 : 200	VMRD
SLA class-II (clone TH14B)	B cell	1 : 50	VMRD
Swine CD2 (clone MSA4)	T cell	1 : 100	VMRD
Swine CD2 (clone PG168A)	T cell	1 : 100	VMRD
Swine CD4 (clone PT90A)	T cell	1 : 50	VMRD
Swine CD8 (clone PT36B)	T cell	1 : 50	VMRD
Swine CD8 (clone PT81B)	T cell	1 : 50	VMRD

* HLA = human leukocyte antigen; SLA = swine leukocyte antigen.

Table 2. Reactivities of 15 antibodies in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of swine lymphoid and nonlymphoid tissues with or without antigen retrieving.

Antibody	Antigen retrieving	Lymphoid Tissues							Nonlymphoid tissues*
		B-cell areas			T-cell areas				
		Germinal center	Mantle zone	Immunoblast Plasma cell	Paracortical area	Periarteriolar lymphoid sheath	Thymus		
κ light chain (Dako)	trypsin	+++	-~+	++	-	-	-	-	-
κ light chain (Tago)	trypsin	+	-	+	-	-	-	-	-
κ light chain (clone Hp 6053)	trypsin	-~+	-	-~+	-	-	-	-	-
λ light chain (Dako)	trypsin	+++	-~+	++	-	-	-	-	-
λ light chain (Tago)	trypsin	+	-	+	-	-	-	-	-
λ light chain (clone Hp 6054)	trypsin	-~+	-	-~+	-	-	-	-	-
CDw75	MW	-~++	-~+	++	-	-	-	-	+
CD79 α	MW	-	++	-	-	-	-	-	+
CD79 β	MW	-	++	++	-	-	-	-	+
HLA-DR (clone TAL. 1B5)	MW	++	++	++	+++	-	-	++\$	++
HLA-DR (clone CR3/43)	MW	+	-	+	+	-	-	+\$	ND
HLA-DR (clone LN-3)	ND	++	+	+	+	-	-	+\$	ND
SLA (clone H42A)	MW	+	-	+	-	-	-	-	ND
Polyclonal CD3	MW	-	-	-	++	++	++	++#	-
CD2 (MSA4)	MW	-	-	-	+	+	+	+	ND

* Cells positive for each antibody are described in Results.

† Reactivity was restricted to immunoblasts and some lymphocytes.

‡ Reactivity was restricted to interdigitating cells and high endothelial venules.

§ Reactivity was restricted to epithelial reticular cells and interdigitating cells.

|| Moderate background staining was observed.

Medullary thymocytes stained more intensely than did cortical thymocytes.

Staining intensity of all the cells was graded as - = negative, + = positive, and ++ = strongly positive.

MW = microwave heating in Tris-HCl buffer, ND = not done; HLA = human leukocyte antigen; SLA = swine leukocyte antigen.

Table 3. Antigen-retrieval effects of 3 kinds of methods (11 pretreatments) on immunostaining for 15 antibodies in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of swine lymphoid tissues.

Antibody*	No treatment	Microwave heating						Simple heating			Enzyme digestion		
		AlCl ₃	CB	GB	TB	Ureat [†] ‡	ZnSO ₄	ARS	TUF [†]	Pepsin	Pronase	Trypsin	
κ light chain (Dako)	ND	ND	ND	ND	ND	~++	ND	ND	ND	+	+	+++	
λ light chain (Tago)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
κ light chain (clone Hp 6053)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
λ light chain (Dako)	ND	ND	ND	ND	ND	~++	ND	ND	ND	+	+	+++	
λ light chain (Tago)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
λ light chain (clone Hp 6054)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
CDw75	-	+	+++	+	+++	+++	+	+++	+++	-	-	-	
CD79 α	-	+	+++	+	+++	+++	+	+++	+++	ND	ND	ND	
CD79 β	-	+	+++	+	+++	+++	+	+++	+++	ND	ND	ND	
HLA-DR (clone TAL. 1B5)	-	+	+++	+	+++	+++	+	+++	+++	-	-	-	
HLA-DR (clone CR3/43)	-	+	+++	+	+++	+++	+	+++	+++	ND	ND	ND	
HLA-DR (clone LN-3)	+++	+	++	+	++	++	+	++	++	ND	ND	ND	
SLA class-II (clone H42A) †	-	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND	ND	
Polyclonal CD3	-	+	+	+	+++	+++	+	+++	++	+++‡	-	-	
CD2 (clone MSA4)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND	ND	

* HLA = human leukocyte antigen; SLA = swine leukocyte antigen.

† Moderate background staining was present.

‡ Severe morphologic damage was observed.

AlCl₃ = 4% aluminum chloride; CB = 0.1M citrate buffer (pH 6.0); GB = 0.05M glycine-HCl buffer (pH 3.5); TB = 0.1M Tris-HCl buffer (pH 8.0); Urea = 6M urea;

ZnSO₄ = 5% zinc sulfate; ARS = antigen-retrieval solution; TUF = target unmasking fluid; Pepsin = 4% pepsin in 0.2M HCl; Pronase = 0.1% pronase in 0.15M PBSS;

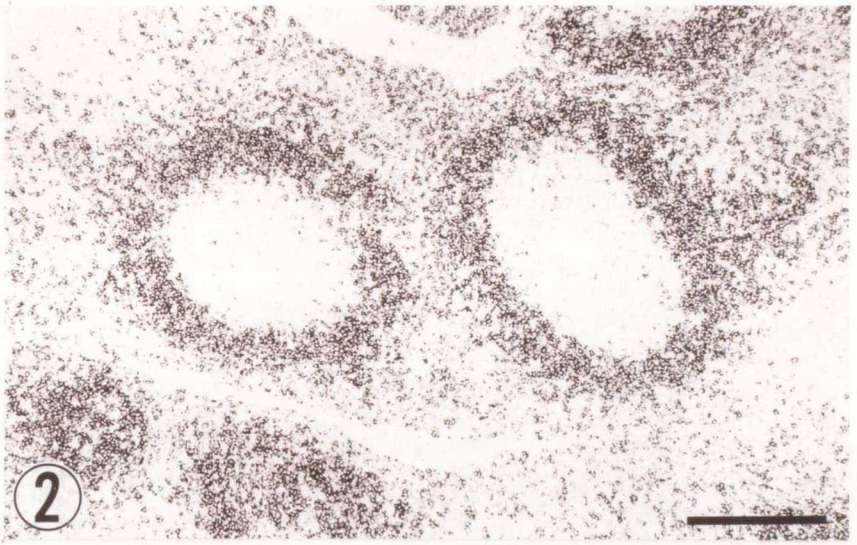
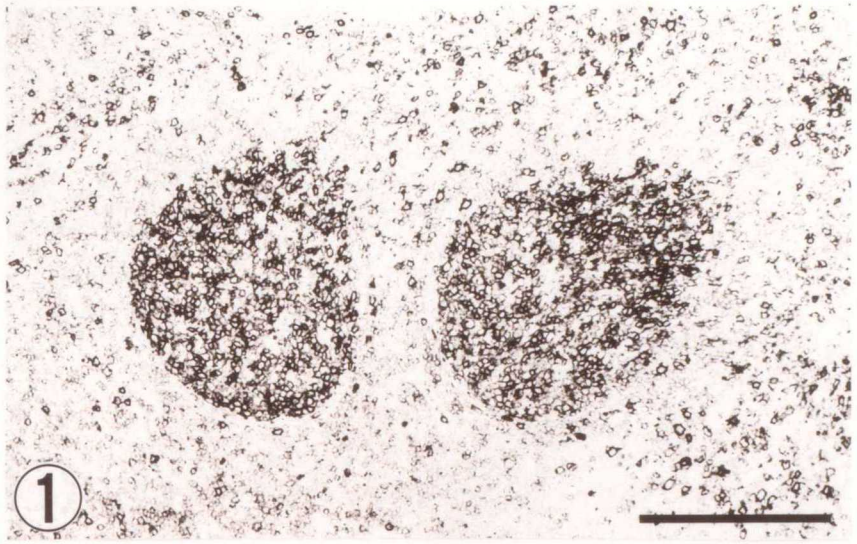
Trypsin = 0.1% trypsin in 0.15M PBSS; ND = not done.

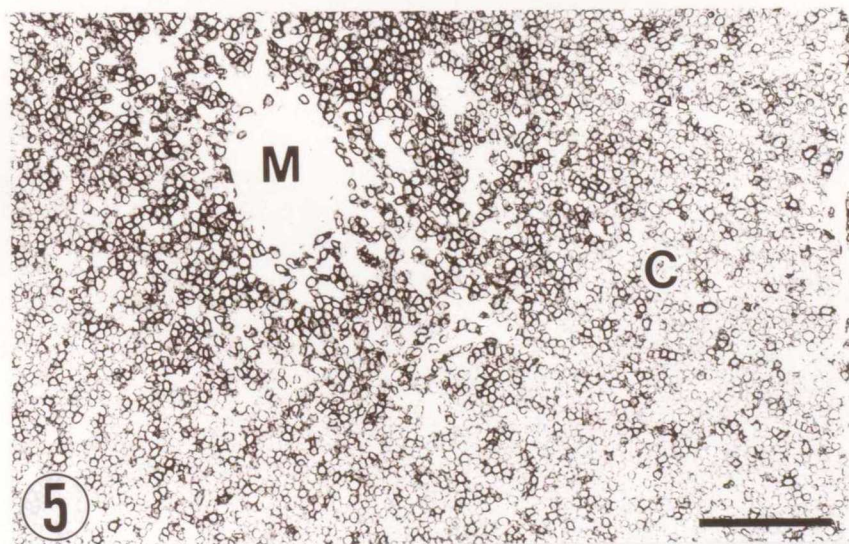
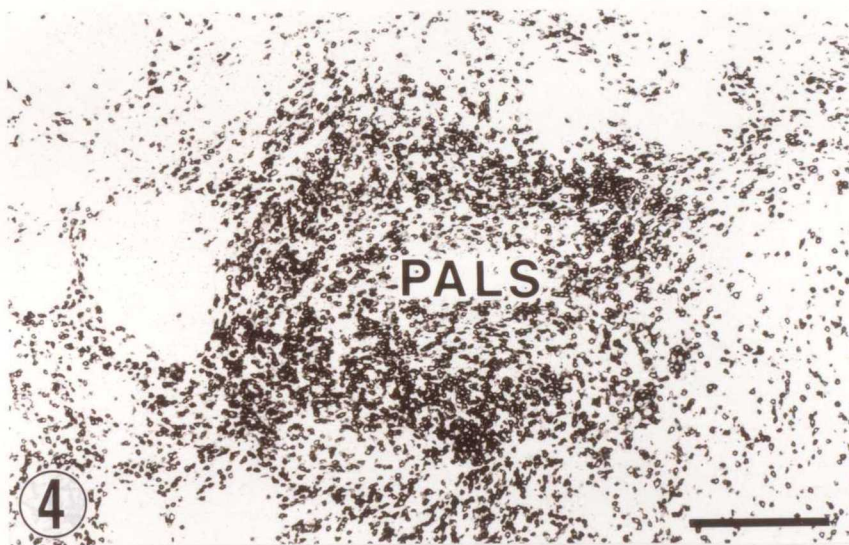
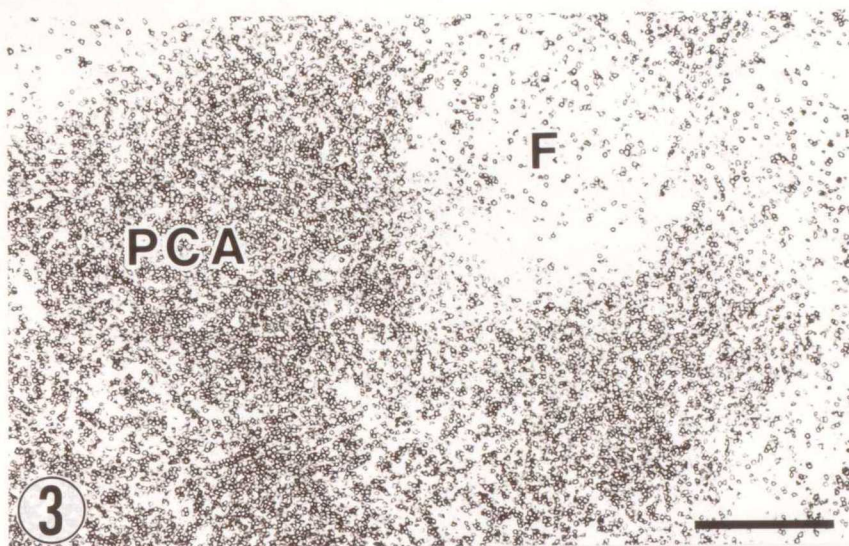
Staining intensity of positive controls (see details in Materials and Methods) was used as the standard for grading the antigen-retrieval effects:

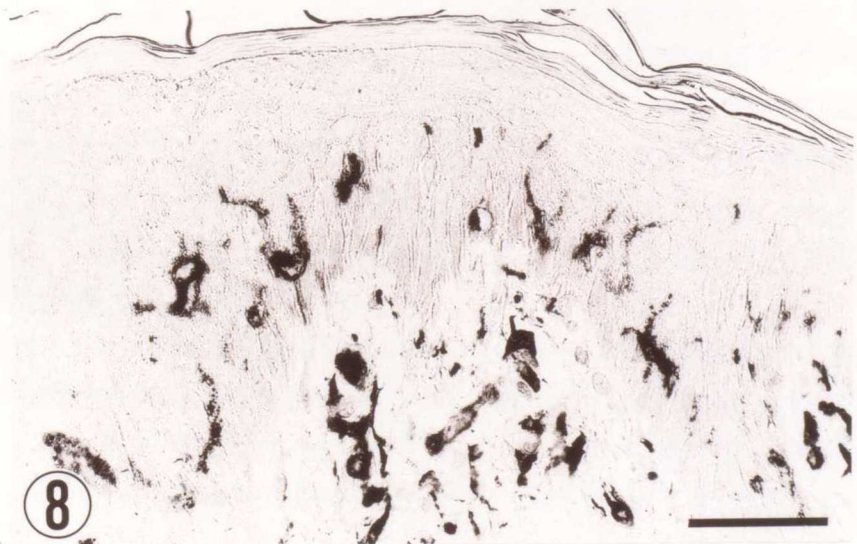
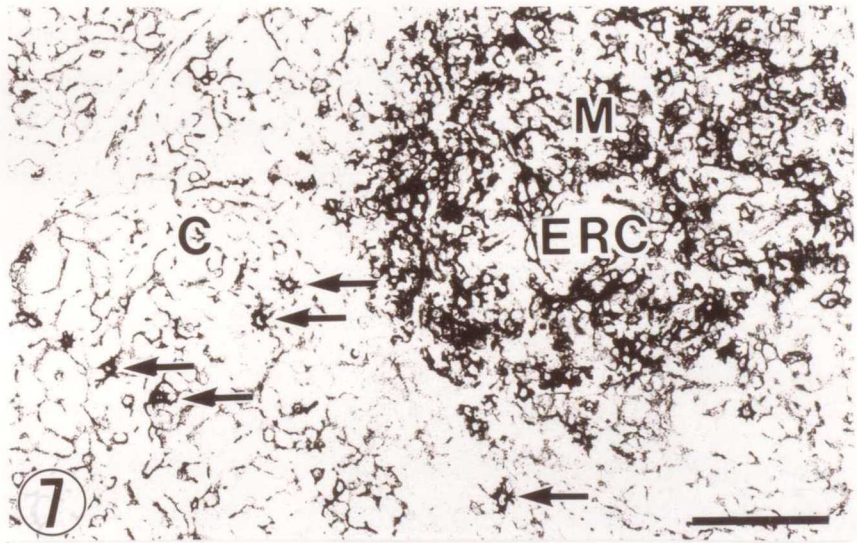
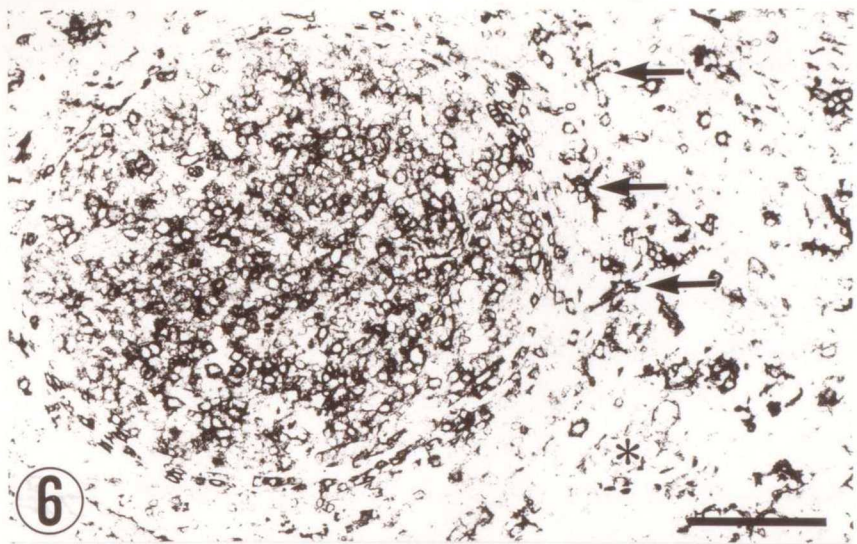
- = negative; + = much inferior; ++ = inferior; +++ = equivalent.

Figure Legends

- Fig. 1** Lymph node; pig. Specific CDw75 (clone LN-1) staining of germinal centers. Labelled streptoavidin-biotin (LSAB) method with microwave heating in 0.1M Tris-HCl buffer (pH 8.0). Bar = 200 μ m.
- Fig. 2** Lymph node; pig. Specific CD79 β (clone B29/123) staining of mantle zones. LSAB method with microwave heating in 0.1M Tris-HCl buffer (pH 8.0). Bar = 200 μ m.
- Figs. 3 ~ 5** Polyclonal CD3-positivities in lymphoid tissues; pig. The positivities specific to T cell areas: paracortical area (PCA) in a lymph node (**Fig. 3**), and periarteriolar lymphoid sheath (PALS) in a spleen (**Fig. 4**), and thymus (**Fig. 5**). Notice some positive cells in lymphoid follicles (F, in **Fig. 3**). Medullary thymocytes (M) had more intense polyclonal CD3-reactivity than did cortical thymocytes (C). LSAB method with microwave heating in 0.1M Tris-HCl buffer (pH 8.0). Bar = 200 μ m (Figs. 3 and 4) and 100 μ m (Fig. 5).
- Figs. 6 ~ 8** HLA-DR (clone TAL. 1B5)-positivities in lymphoid and nonlymphoid tissues; pig. Localizations of HLA-DR in germinal center lymphocytes, interdigitating cells (arrows), and high endothelial venules (asterisk) of lymph node (**Fig. 6**), epithelial reticular cells (ERC) in the medulla (M) and interdigitating cells (arrows) in the cortex (C) of thymus (**Fig. 7**), and Langerhans cells of skin (**Fig. 8**). LSAB method with microwave heating in 0.1M Tris-HCl buffer (pH 8.0). Bar = 100 μ m (Figs. 6 and 7) and 50 μ m (Fig. 8).







7. 和文要約

ホルマリン固定・パラフィン切片とした豚組織中のリンパ球に反応する抗体の検索

組織や血液中のリンパ球 subset を同定することは、家畜の正常および病的な免疫反応の解明、リンパ球増殖性疾患の診断のために重要である。特に豚は、ヒトの心血管、皮膚および栄養性疾患、移植並びに悪性黒色腫などのモデル動物として広く使われているために、人体医学の立場からも免疫応答の解明が必要とされている。単クローン性抗体を使った免疫組織化学的検索は、これらの研究手段として最も高感度で有用なものの一つである。豚のリンパ球を認識する単クローン性抗体は幾つか作製されているが、これらは通常、新鮮な細胞浮遊液あるいは組織の凍結切片にしか応用出来ない。そこで、ヒトあるいは豚のリンパ球に反応する抗体の内、ホルマリン固定・パラフィン切片とした豚組織中のリンパ球に良好に反応する抗体があるかどうか、脱パラフィン切片に対する幾つかの抗原賦活処理法を組み合わせる免疫染色を行い、検討した。また、これらの抗体に最適な抗原賦活処理法についても検討した。

材料と方法：合計 33 種類のリンパ球に反応する抗体（ヒトのリンパ球に反応する抗体は 25 種類、豚のリンパ球に反応する抗体は 8 種類）について検討した。使用した抗体に対する最適な抗原賦活条件を決定するために、11 種類の抗原賦活処理法（6 種類の浸漬液を使ったマイクロウェーブ熱処理、2 種類の市販浸漬液を使った熱湯中での加熱処理および 3 種類のタンパク分解酵素を使った酵素処理）を実施した。処理後、未処理切片と一緒に免疫染色した。

結果：検討した合計 33 種類の抗体の内、polyclonal 抗ヒト κ 鎖抗体 (Dako 社)、polyclonal 抗ヒト λ 鎖抗体 (Dako 社)、抗 CDw75 抗体 (clone LN-1)、抗 CD79 α 抗体 (clone HM57)、抗 CD79 β 抗体 (clone B29/123)、抗 HLA-DR 抗体 (clone TAL.1B5) および polyclonal 抗 CD3 抗体 (Dako 社) の合計 7 種類のヒトのリンパ球に反応する抗体が、ホルマリン固定・パラフィン切片とした豚組織中のリンパ球に良好な反応性を示した。これらの抗体の陽性部位は、ヒトでの報告とほぼ一致した。11 種類の抗原賦活処理の効果を比較したところ、抗ヒト軽鎖抗体には、0.1% trypsin による酵素処理が、他の抗体には、0.1M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 中でのマイクロウェーブ熱処理または antigen retrieval solution (Dako 社) 中での熱湯による加熱処理が最も良い結果を得た。

結論：7 種類のヒトのリンパ球に反応する抗体は、ホルマリン固定・パラフィン切片とした豚組織中のリンパ球 subset の同定、鑑別および特徴付けに役立つ。また、脱パラフィン切片を適切に抗原賦活処理することによって、凍結切片しか反応しない抗体や抗原由来の動物種しか反応しない抗体でもパラフィン切片に応用可能である。

Evaluation of Antibodies Reactive with Swine Lymphocytes in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, and Antigen-Retrieved Tissue Sections.

Introduction: Typing of lymphocyte subsets in tissues and blood is important for understanding normal and pathologic immune reactions and for diagnosis of lymphoproliferative diseases in domestic animals, as well as human beings. Clarification of immune responses in swine in particular has been needed for human studies, because swine have been widely used as animal models of diseases of the cardiovascular system and skin, and of nutrition, transplantation, and malignant melanoma. Immunohistochemical labeling with monoclonal antibodies is one of the most sensitive and useful methods for such studies. Although some monoclonal antibodies that recognize swine lymphocytes have been generated, these antibodies usually require fresh cell suspensions or use of frozen tissue sections. The purposes of the study were to determine whether antibodies raised against human or swine lymphocytes are reactive with swine lymphocytes in formalin-fixed, paraffin-embedded, and antigen-retrieved tissue sections, and to determine the conditions suitable for antigen retrieval.

Materials and Methods: A total of 33 antibodies (25 anti-human and 8 anti-swine) reactive with lymphocytes were evaluated. For antigen retrieval, we tested 11 methods: heating with 6 soaking solutions in a microwave oven, heating with 2 commercially available soaking solutions in a water bath, and enzyme digestion with 3 proteases. After these treatments, sections were immunostained along with untreated sections.

Results: Of 33 antibodies tested, polyclonal anti-human κ light chain antibody (Dako), polyclonal anti-human λ light chain antibody (Dako), CDw75 (clone LN-1), CD79 α (clone HM57), CD79 β (clone B29/123), HLA-DR (clone TAL. 1B5), and polyclonal CD3 (Dako) were strongly reactive with swine lymphoid tissues, when deparaffinized sections were digested with 0.1% trypsin (for anti-human light chain antibodies), or heated in 0.1M Tris-HCl buffer (pH 8.0) in a microwave oven or with antigen-retrieval solution (Dako) in a water bath (for the rest of antibodies). All patterns of positive staining were essentially the same as those previously described in human beings.

Conclusion: These 7 antibodies, with the antigen retrieval sequences, are helpful in identifying, distinguishing, and characterizing lymphocyte subsets in archival sections of swine lymphoid tissues. In addition, the findings indicate that some antigen-retrieval methods can appreciably expand the range of antibodies useful in paraffin-immunohistochemistry, including those that otherwise work only on sections from frozen tissues or from an antigen-derived species.

第2部 豚の回腸リンパ腫の組織学的、酵素細胞化学的、免疫組織化学的および超微形態学的検索

1. 緒言

リンパ腫（同義語：悪性リンパ腫，リンパ肉腫）[94]は，豚の好発腫瘍の一つであるが，詳細な病理学的特徴は十分に明らかにされていない [8, 45, 94]。

家畜のリンパ腫（非ホジキンリンパ腫）は，腫瘍の解剖学的発生部位によって，多中心型（multicentric），胸腺型（thymic），消化器型（alimentary），皮膚型（cutaneous）および孤立型（solitary）に分類されている [45, 94, 107]。豚のリンパ腫では，大部分を多中心型，一部を胸腺型が占め，他の病型は極めて希とされている [8, 45, 107]。しかし，最近になって，豚の消化器型リンパ腫と見なされる症例が相次いで報告された [2, 27, 36, 37, 42, 52, 80, 96 - 101, 133, 148 - 150]。なかでも鹿嶋ら [52] は，7例の小腸原発のリンパ腫を病理学的に検索し，特徴として腹腔臓器漿膜への腫瘍細胞の播種および濾胞性リンパ腫の好発を報告している。

家畜の消化器型リンパ腫は，猫に類発することが知られている [94, 147]。腫瘍は胃幽門部から大腸にかけて単発あるいは多発し，特に空腸と回腸に好発する。転移は，腸間膜リンパ節，肝臓，脾臓，腎臓および骨髄に見られ，白血化は希とされている [73, 92, 127, 147, 152]。回腸パイエル板での初期リンパ腫病変および腸間膜リンパ節への初期転移は，胚中心に見られる。腫瘍細胞はB細胞由来で，腫瘍組織内に核崩壊物を貪食した組織球の散在を伴う [73, 94, 127, 147]。この像は腫瘍細胞を夜空，組織球を星にたとえ，星空像（starry sky appearance, starry sky phenomenon）と呼ばれている [56, 73, 127]。これら猫の消化器型リンパ腫の病理像は，ヒトのバーキットリンパ腫に似ているとされている [78, 127, 153]。Hayashiら [27] は，豚のリンパ腫36例中16例に，ヒトのバーキットリンパ腫に似た組織学的特徴を見いだしている。ヒトのバーキットリンパ腫の腫瘍細胞は，びまん性に増殖する中型～大型細胞で，微細なクロマチンと数個の核小体を有する類円形核，好塩基性かつピロニン好性の狭い細胞質が特徴である。細胞質には空胞が見られ，空胞には脂肪が証明される。腫瘍細胞は，相互に密着するために，多角形を呈することが多い。免疫学的にはIgM型の表面免疫グロブリンを有する。超微形態学的には，豊富な脂肪滴とポリゾーム，核ポケット形成を特徴とする [56, 134, 154, 155]。Epstein-Barr ウイルス（EBV）は，ヒトのバーキットリンパ腫の原因の一つとされており [146, 158]，Southern blotting 法による検索では，ヒトの非ホジキンリンパ腫にも EBV 遺伝子や関連蛋白が高率に検出され，これらの腫瘍の発生における関連が注目されている [51, 128, 146, 158]。

家畜の消化器型リンパ腫の様にリンパ節以外の臓器組織から発生するリンパ腫は、ヒトでは節外性リンパ腫と呼び、リンパ節から発生する節性リンパ腫と区別されている [102, 131]。ヒトの節外性リンパ腫は、ワイダイエル輪や回腸パイエル板の様に生理的にリンパ組織のある臓器に発生する場合と、胃や甲状腺の様にリンパ組織のない臓器に慢性炎症を背景に発生する場合とが区別されている [4, 102]。ヒトでの部位別発生頻度は、約 30%を消化管が占め、その大部分が胃および回腸から発生する [4, 15, 16, 63, 66, 93, 95, 102, 131]。

リンパ球の大部分は、免疫学的に B 細胞と T 細胞に分類され、リンパ球の悪性腫瘍であるリンパ腫は、それぞれの細胞系列から発生する [134, 157]。家畜のリンパ腫の研究は、臨床・肉眼・組織学・細胞学的検索が中心であったが、病理検査技術の進歩によって、電子顕微鏡、酵素組織化学および E ロゼット形成法を組み合わせたリンパ腫細胞の細胞由来の決定および特徴付けに発展した [94]。更に最近では、家畜のリンパ球の分化抗原 (cluster of differentiation, CD) に対する単クローン性抗体の開発によって [68 - 71]、リンパ腫細胞の免疫学的な特徴付けが可能になっている。しかし、大部分の抗リンパ球抗体は、ホルマリン固定・パラフィン切片に応用不能で、しかも市販されていない [1, 44, 68 - 71]。しかし、著者は本論文の第 1 部において、脱パラフィン切片を適切に抗原賦活処理することによって、ヒトのリンパ球に反応する抗体である polyclonal 抗ヒト κ 鎖抗体 (Dako 社)、polyclonal 抗ヒト λ 鎖抗体 (Dako 社)、抗 CDw75 抗体 (clone LN-1)、抗 CD79 α 抗体 (clone HM57)、抗 CD79 β 抗体 (clone B29/123)、抗 HLA-DR 抗体 (clone TAL. 1B5) および polyclonal 抗 CD3 抗体 (Dako 社) がホルマリン固定・パラフィン切片とした豚組織中のリンパ球に良好に反応することを見いだした [132, 133]。

本論文の第 2 部では、豚の回腸リンパ腫の病理学的特徴、特に十分に検索されていない腫瘍細胞の特徴を明らかにするために、第 1 部での研究成果を免疫組織化学的検索に加え、更に最近のヒトおよび家畜のリンパ腫の研究手段や成果を参考にしながら、収集した 12 例を肉眼的、組織学的、酵素細胞化学的、免疫組織化学的および超微形態学的に検索し、得られた所見を猫やヒトの小腸リンパ腫、ヒトのバーキットリンパ腫と比較し、特徴付けた。また、免疫組織化学的手段を使った腫瘍組織からの EBV の検出も試みた。

2. 材料

1980 年から 1994 年までの 15 年間に、高知県の 2 か所で行った食肉衛生検査で発見された 26 例の豚のリンパ腫の内、回腸を侵す 12 例を本研究の材料とした。明らかに多中心型リンパ腫の病型を示し、腫瘍が小腸および支配リンパ節に波及したと考えられる症例は、除外した。

3. 方法

(1) 発生率

豚のリンパ腫および回腸リンパ腫の発生率を、10万頭あたりの発生頭数として算出した。また、豚のリンパ腫の発生頭数に占める各解剖型の割合も計算した。

(2) 臨床事項

症例の臨床症状、品種、性別、年齢、生産者および生産地を調査した。

(3) 肉眼検査

一般的な観察作法は、成書に従った [108, 122]。

症例の原発部位、形と性状、大きさ、色、硬さ、腸管壁の侵襲、腸管の狭窄の有無および近隣リンパ節への連絡について観察した。

転移巣の確認は、脳を含む全身の臓器およびリンパ節（特に原発部位の支配リンパ節）にわたって、病変の有無、程度および性状について観察した。

(4) 組織・細胞学

一般的な採材作法 [5, 108, 122, 155] およびリンパ節の検体処理 [103] は、文献に従った。リンパ節の丸のまま固定、ホルマリン固定の時間、パラフィン包埋中の脱水の具合、切片の伸展温度および切片の厚さなどは、リンパ腫の細胞型の決定に重要な細胞の大きさ、核の形態、クロマチンの分布などの形態保持に影響を与えるので [5, 103, 155]、リンパ腫の組織標本は、こうした点に注意して作製した。

腫瘍組織を含む全身臓器およびリンパ節を採材し、断面の膨隆を避けるために、被膜の一部に断面を入れてから [103]、10%中性緩衝ホルマリン液または市販20%中性緩衝ホルマリン液（マイルドホルム 20N：和光純薬工業，大阪）を使い、室温で48時間振盪固定した [143, 144]。ただし症例1, 2は、少量のホルマリン液中で、2週間ほど固定されていた。固定材料は、パラフィン包埋後、2~4 μm に薄切した。切片は、細胞核の形態保持のために、40°Cの湯上でゆっくり伸展させ、剥離防止のために、aminopropyl triethoxysilane（ナカライテスク，京都）を塗布したスライドガラス [55, 74] に密着させてから、37°Cの孵卵器内で一晩乾燥させた [5, 103, 155]。

組織染色は、一般的観察のためにHE染色、細胞の観察のためにメイ・ギム

ザ染色，細胞内多糖体の観察のためにジアスターゼ消化試験を併用した過ヨウ素酸シッフ（PAS）反応，細胞質内 RNA の観察のためにリボヌクレアーゼ消化試験を併用したメチルグリーン・ピロニン染色，および細網線維の発達具合によってリンパ腫細胞の増殖様式を観察するために渡辺氏鍍銀染色・NF 変法を行った。

回腸リンパ腫の組織分類には，我が国で広く用いられているヒトのリンパ腫の組織分類である the lymphoma-leukemia study group of Japan (LSG) 分類を採用した [56]。細胞型は，腫瘍組織中に半数以上を占めるリンパ腫細胞の核の大きさに基づいて決定し，腫瘍組織中に混在する組織球の核と比較して，リンパ腫細胞の核が大きいものを大型，同大と見なされるものを中型，より小さいものを小型とした [56]。

白血化の有無の確認のために，前腸間膜静脈から残存血液を採取し，塗沫標本をメイ・ギムザ染色した。残存血液塗抹内または組織標本中の血管内にリンパ腫細胞の存在が確認できた場合，リンパ腫の白血化と見なした [100]。

(5) 酵素細胞化学

回腸リンパ腫の細胞由来を決定するために，alkaline phosphatase (ALP) 陽性所見を B 細胞の指標にした [104, 113]。また，acid phosphatase (ACP)， α -naphthyl butyrate esterase (ANBE) および β -glucuronidase (BG) については，びまん性顆粒状～点状陽性所見を B 細胞の指標に，限局性点状陽性所見を T 細胞の指標にした [113]。症例 6～12 のリンパ腫組織と染色の対照のための正常な豚のリンパ節および胸腺組織は，5mm 厚に切り出し，割面を浅く，さいの目に切った。そこからタッチ・スメア標本を作製し，ドライヤーで 5 分間，送風乾燥した。染色まで標本を保存するために，乾燥固定した標本をプラスチック製スライド・ボックスに入れて蓋をビニル・テープで密封し，更にチャック付きポリ袋に入れ， -80°C のディープ・フリーザーに入れた。保存標本の染色は，冷凍保存したポリ袋入りスライド・ボックスを 1 時間ほど放置して室温に戻してから開封し，標本をドライヤーで 5 分間，送風乾燥してから行った。酵素染色は，ALP を Nanba らの方法 [104] で，他の酵素は染色キット（ACP，ANBE：武藤化学薬品，東京；BG：Sigma Chemical, USA）で行った。

(6) 免疫組織化学

回腸リンパ腫の腫瘍細胞，増殖様式，増殖能および浸潤細胞の特徴を明らかにするために，固定状態の悪かった症例 1 と 2 を除く，10 例のホルマリン固定・パラフィン切片を使った免疫染色を行った。EBV (clone PE 2) の染色には，症

例 6~12 のタッチ・スミア標本をアセトン固定したものを使用した。一般的な染色作法は、成書に従った [156]。染色試薬は、Labelled streptoavidin-biotin 法 [23, 25] による免疫染色キット (Universal LSAB kit, Dako, 京都) を使った。標識酵素は、horseradish peroxidase または alkaline phosphatase を使用した。用いた一次抗体は Table 1 に示した。これらの抗体には、本論文の第 1 部での研究で、豚組織のホルマリン固定・パラフィン切片中のリンパ球に良好に反応することが判明した polyclonal 抗ヒト κ 鎖抗体 (Dako 社), polyclonal 抗ヒト λ 鎖抗体 (Dako 社), 抗 CDw75 抗体 (clone LN-1), 抗 CD79 α 抗体 (clone HM57), 抗 CD79 β 抗体 (clone B29/123), 抗 HLA-DR 抗体 (clone TAL. 1B5) および polyclonal 抗 CD3 抗体 (Dako 社) を含んでいる。

染色手順の概略は以下の通りであった。組織切片は、レモゾール (和光純薬工業, 大阪) 中で脱パラフィン後, エタノール下降系列を通した。標識酵素として horseradish peroxidase を使用する場合には, 内因性ペルオキシダーゼ活性を除去するために, 100%エタノールを通した後, 0.3%過酸化水素水加メタノールに 30 分間浸した。水洗後, 抗原性の賦活処理を行なった。抗原賦活法として, 免疫グロブリン, アルブミンおよび EBV (clone CS1-4) の染色には, 0.1% trypsin (Dako, 京都) -PBSS を使って脱パラフィン切片を 37°C で 15~60 分間消化した [11, 84]。消化後, 切片を PBSS で洗浄した。Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) の染色には, 0.5% deoxyribonuclease I (grade II DNase-I, Boeringer Mannheim Biochemica, Germany) 加 0.05M Tris-HCl buffer (pH 8.1) を使って, 脱パラフィン切片を 37°C で 60 分間消化後, PBSS で洗浄し, 更に 0.1% trypsin -PBSS で, 37°C で 30 分間消化した [47, 114]。消化後, 切片を PBSS で洗浄した。また, 他の抗体の染色には, 脱パラフィン切片のマイクロウェーブ熱処理を行った。まず 250ml の 0.1M Tris-HCl buffer (pH 8.0) の入ったポリプロピレン製バット (Dako, 京都) を電子レンジ (H2500 microwave processor, Energy Beam Science, USA) の回転皿の中央部分に置き, 沸騰させた。その後, 脱パラフィン切片を浸漬し, 3 分間×3 回マイクロウェーブ熱処理 (600W) した [124, 156]。1 回の照射毎に, 蒸発した水分を補給した。マイクロウェーブ照射後, 氷水中でバットごと 10 分間冷却し, それから切片を PBSS で洗浄した。抗原性の賦活処理後, 湿室 (多目的インキュベーションチャンバー, コスモ・バイオ, 東京) 内で, 染色キットの手引き書に従って免疫染色を行なった。一次抗体は, 4°C で 24 時間反応させた。標識酵素の発色基質溶液として, peroxidase には 0.02% 過酸化水素水を含む 0.02% 3,3' - diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB: 和光純薬, 大阪) -PBSS を, alkaline phosphatase には new fuchsin 基質キット (Dako, 京都) を使用した。なお, DAB による peroxidase の発色を増強するために, 発色基質液に 0.02% 塩化ニッケルを添加したり [35, 156], DAB 反応後の標本を 0.5% 硫酸銅・0.9% 塩化ナトリウム混合水溶液に 5 分間浸漬した [117]。対比染色として,

Mayer のヘマトキシリン液で 1 分間染色した。血漿成分の diffusion artifact による免疫グロブリンの偽陽性は、アルブミンの陽性染色で確認した [81]。EBV 以外の免疫染色の対照には、ホルマリン固定・パラフィン切片とした正常な豚のリンパ節、脾臓、扁桃、胸腺、回腸および肝臓を使った。

(7) 超微形態学

一般的な検体処理、標本作製および観察の作法は、成書 [30, 90] および文献 [20, 89] に従った。

回腸リンパ腫組織のホルマリン固定材料 (症例 3, 7~9) および新鮮材料 (症例 4~6, 10~12) を細切し、2.5% グルタルアルデヒド液で 4°C で 2 時間固定し、更に 1% オスミウム酸液で 4°C で 1 時間後固定し、アルコール脱水、プロピレンオキサイドによる置換後、エポン包埋した。各症例とも 2 個以上の包埋ブロックから超薄切片を作製し、酢酸ウラン液とクエン酸鉛液とで二重染色後、電子顕微鏡 (H-300 型, 日立, 東京) で 50 個以上の細胞を観察した。

4. 結果

(1) 発生率

高知県での豚のリンパ腫および回腸リンパ腫の発生率は、1980年から1994年までの15年間で、10万頭あたりそれぞれ1.7頭、0.8頭であった。リンパ腫26例の解剖学的病型は、回腸に発生した消化器型12例(46%)および多中心型10例(38%)で、その他は、肝臓漿膜面だけに多数の腫瘍が見られた3例(12%)および胸腺型1例(4%)であった。

(2) 臨床事項

各症例の品種、性別および年齢は、Table 2に示した。臨床症状、特に、消化管障害によって生じる削瘦および下痢は記録されていなかった。全症例とも県内産の豚であったが、特定の生産者や生産地にリンパ腫が発生する傾向は見いだせなかった。

(3) 肉眼所見

回腸腫瘍の大きさ及び転移部位は、Table 2に示した。回腸腫瘍は、回腸末端部の腸間膜付着部の反対側から孤立性に発生し、直径は3~25cmであった(Fig. 1)。回腸腫瘍の断面では、粘膜面の潰瘍や出血が見られ、粘膜下に乳白色の腫瘍塊が回腸壁の外側に向かって隆起していた(Fig. 1)。回腸腫瘍による内腔の狭窄は見られなかった。腸間膜リンパ節に転移が見られ、回腸原発腫瘍と同大か、それ以上の大きさの腫瘍塊を形成し、原発巣よりも広範な壊死や出血が見られた(Fig. 1)。特に、症例3, 6~8, 10, 11では、回腸腫瘍が腸間膜の脈管を通じて近隣リンパ節に波及していた(Fig. 1)。症例10, 11では、回腸に直径約20cmの腫瘍が見られ、重度の潰瘍によって内腔が拡張していた(Fig. 2)。また症例10, 11では、特徴的な漿膜転移が肝臓、大腸、大網および脾臓に広範囲に見られた(Fig. 2)。症例9では、わずか直径3cmの原発腫瘍であったにもかかわらず、リンパ節転移が見られた(Fig. 3)。胸腺、皮膚、骨髄および神経系を含む他の臓器に、著変は見られなかった。

(4) 組織・細胞学的所見

回腸腫瘍の辺縁には、パイエル板から腫瘍組織への移行が観察された(Fig. 4)。12例の腫瘍細胞は、細胞学的特徴によって2種類に大別された。

症例 9 を除く 11 例の腫瘍細胞は、組織球の核よりも幾分大きい程度の細胞核を持ち、粗網状クロマチンを持つ円形～類円形の胞状核、厚い核膜に付着する数個の核小体が特徴であった。細胞質は乏しく、両染色性で、細胞境界は明瞭であった (Fig. 5)。これらの細胞の形態学的特徴は、正常リンパ組織の胚中心に存在する大型非切れ込み細胞の特徴に酷似し、大きさは、やや大型または同大であった (Fig. 6)。また、一部の腫瘍細胞は、より大型化し、一個の明瞭な核小体が核の中央に位置する免疫芽球様の形態を示していた (Fig. 5)。これらの特徴を持つ腫瘍細胞は、LSG 分類によって、びまん性・大細胞非切れ込み型 (DLNC 型)、胚中心細胞性 [130] に分類されたが、ヒトのびまん性大細胞非切れ込み型リンパ腫細胞と比べ、やや小型であった [56, 130, 155]。

一方、1 例 (症例 9) の腫瘍細胞は、大型の免疫芽球様細胞と中型から小型の形質細胞様細胞で、細胞が小型になるにつれ、核の偏在、核クロマチンの核縁への凝集が見られた (Fig. 7)。細胞質は好塩基性を示し、細胞境界は明瞭であった。形質細胞様のリンパ腫細胞には、PAS 陽性で、ジアスターゼ抵抗性の核内封入体 (Dutcher body) や細胞質封入体 (Russell body) が見られた (Fig. 8)。腫瘍組織中には、軽度の線維化が見られた。これらの腫瘍細胞の特徴は、LSG 分類によって、びまん性混合型 (DM 型)、抗体産生細胞性 [31] に分類された。

その他の組織所見は、二つの細胞型に共通していた。細胞質には、リボヌクレアーゼ感受性ピロニン好性物質が充満し、豊富な RNA の存在が証明された。また細胞質は、ギムザ染色で紫色に染まり、いわゆる形質細胞様色調を示した (Fig. 7)。分裂像は、400 倍で 1 視野当り 3~5 個であった。リンパ腫細胞は、パイエル板のリンパ濾胞を胚中心の暗調帯から侵襲・置換し (Fig. 9)、びまん性に増殖しながら筋層に浸潤し、列をなしていた (Indian file infiltration) (Fig. 10)。症例 10, 11 に見られたリンパ腫細胞の腹腔臓器漿膜への播種性病変には、肝臓を除いて、臓器実質への浸潤は見られなかった。腫瘍組織、特に壊死・出血部位では、核崩壊物を貪食した組織球が散在し、星空像を示していた (Fig. 11)。また、回腸の腫瘍組織には、好酸球が散在性に見られた。転移の見られたリンパ節は、腫瘍細胞によって大部分が置換されており、辺縁に残存するリンパ濾胞やリンパ洞にもリンパ腫細胞が浸潤していた (Fig. 12)。

症例 10, 11 では、腸間膜静脈の残存血液および組織標本中の脈管内にリンパ腫細胞が見られた (Fig. 13)。

回腸やリンパ節の腫瘍の被膜直下や剖面付近のリンパ腫細胞には、細胞の収縮や核クロマチンの繊細化が見られた。また、メイ・ギムザ染色標本は、HE 標本よりもリンパ腫細胞の核膜、核小体およびクロマチンが明瞭に染色され、形態観察が容易であった。

(5) 酵素細胞化学的所見

結果は、Table 3 に示した。ALP 陽性像は、症例 6~8, 10 のリンパ腫細胞の細胞膜に見られた (Fig. 14)。ACP (Fig. 15) と ANBE 陽性像は、検索できた 7 例全部のリンパ腫細胞の細胞質内に、びまん性顆粒状に見られた。正常リンパ節の大部分のリンパ球は、ALP 陽性、ACP および ANBE のびまん性顆粒状陽性を示した。一方、正常胸腺の大部分のリンパ球は、ALP 陰性で、ACP および ANBE の限局性点状陽性を示した。豚リンパ球では、ACP が ANBE や BG よりもはるかに強い染色性を示した。-80°C で保存した未固定標本は、少なくとも 2 年間は酵素活性に変化が見られなかった。

(6) 免疫組織化学的所見

結果は、Table 3 に示した。検索した 10 例中 9 例に単クローン性の細胞質内免疫グロブリンの発現が見られ、その内 7 例が IgM- λ 型 (Fig. 16)、1 例が IgG- λ 型および他の 1 例が IgG- κ 型であった。症例 9 に見られた核内および細胞質内封入体には、免疫グロブリンが証明され、細胞質内免疫グロブリンと同一クラス (IgM- λ 型) であった。免疫グロブリンの陽性部位は、アルブミン陰性であった。使用した抗ヒト B 細胞抗体の内、CD79 α と CD79 β (Fig. 17) は、検索した 10 例全てに陽性であったのに対し、CDw75 は 1 例のみ陽性であった。CDw75 の陽性像は、paranuclear globule として観察された。リンパ腫細胞によるリンパ濾胞の侵襲部位では、S-100 蛋白 β 亜分画陽性の濾胞樹状細胞 (follicular dendritic cell, FDC) の減数および網目状構造の破壊が見られた。リンパ腫細胞は、FDC に接着し、その幾らかは、FDC の細長い細胞突起で包み込まれていた (Fig. 18)。腹腔リンパ節リンパ濾胞への転移巣では、組織学的に濾胞構造を保っていたにもかかわらず、FDC は痕跡的であった (Fig. 19)。腫瘍組織中には、多数の S-100 蛋白 α 亜分画陽性の組織球が認められ (Fig. 20)、その数は組織学的に認められた組織球よりも多かった。10 例の回腸リンパ腫細胞は、腫瘍の原発部と転移部、細胞型の違いに関係なく、一様に増殖細胞核抗原に強陽性であった。EBV 抗原は全例で陰性だった。

(7) 超微形態学的所見

DLNC 型リンパ腫細胞には、時に偏在する円形～類円形核、核縁に凝集するクロマチンおよび数個の明瞭な核小体が見られた。細胞質には、粗面小胞体、ミトコンドリア、ライソゾームおよびポリソームが見られ、これらの発達の程度は様々であった (Fig. 21)。ライソゾームは、限界膜に包まれた dense body として観察され、大部分は細胞質内に散在性に分布していたが、希に集合性に分布していた。幾つかの細胞には、ゴルジ装置、脂肪滴および細胞突起が良く発達していた。DM 型リンパ腫での大型細胞は、DLNC 型リンパ腫細胞と比べてクロマチンの核縁への凝集や核小体の大型化および核の中心部への移動が顕著であり、細胞質に粗面小胞体が発達していた。幾つかのリンパ腫細胞には、中等度の電子密度を示す物質の蓄積によって拡張した核膜槽および粗面小胞体が見られた。細胞が小さくなるにつれ、核は偏在し、クロマチンは更に核縁へ凝集して形質細胞に見られる clock-face 像を示し、粗面小胞体の拡張は更に顕著になった。(Fig. 22)。DLNC 型リンパ腫細胞および DM 型リンパ腫細胞の中には、互いの細胞突起による嵌合や未分化な細胞間結合装置による接着が見られた (Fig. 23)。リンパ腫細胞には、ウイルス粒子や細菌は認められなかった。腫瘍組織中の組織球は、多数のライソゾーム顆粒や貪食された死細胞の破片を含み、隣接するリンパ腫細胞に細胞突起を伸ばしていた (Fig. 24)。

5. 考察

我が国での10万頭当たりの豚リンパ腫の発生率（調査期間、発生頭数／検査頭数、生産地）は、0.8頭（16年間、87頭／11,407,151頭、茨城県内外）[101]、1.2頭（8年間、1,005頭／80,609,950頭、全国調査）[109]、2頭（9年間、36頭／1,672,136頭、名古屋市内外）[27]、2.5頭（7年間、20頭発生、鳥取県内外）[42]と報告されており、高知県産豚での発生率（1.7頭）は、報告の範囲内であり、ほぼ全国並と思われた。一方、諸外国での10万頭当たりの発生率は、0.3頭（West Berlin, Germany）～64頭（a district, France）と様々である[8, 86, 94]。

豚のリンパ腫での解剖学的病型は、大部分を多中心型、一部を胸腺型が占め、他の病型は極めて希とされているが[8, 45, 107]、最近になって、豚の消化器型リンパ腫の症例が相次いで報告された[2, 27, 36, 37, 42, 52, 80, 96 - 101, 133, 148 - 150]。しかし、高知県で収集した豚のリンパ腫の様に、消化器型（12例、46%）が多中心型（10例、38%）よりも多く発生したという報告はない[2, 27, 42, 52, 80, 96, 101]。このことは、ヒトの小腸リンパ腫[15]と同様に、豚の消化器型リンパ腫の発生率に地域差があることを示唆しているが、原因は不明である。

ヒトの小腸に発生するT細胞性びまん性多形細胞型リンパ腫では、腸症が素因とされている[63]。また、ヒトの胃や甲状腺のリンパ腫は、慢性炎症を背景に発生することが知られており[134]、特に一部の胃のリンパ腫は、胃潰瘍や胃癌の原因として注目されている *Helicobacter pylori* の感染による反応性リンパ組織過形成から発生すると考えられている[4, 43, 102]。豚の回腸リンパ腫の原発部位と見なされるパイエル板では、反応性過形成がよく見られるので、豚の回腸リンパ腫の発生には、何らかの抗原刺激による慢性炎症が関与しているのかもしれない。

豚のリンパ腫の原因の一つとして、他の家畜のリンパ腫や白血病と同様にレトロウイルス感染が考えられている[60]。豚のリンパ腫細胞の超微形態学的検索によって、C型ウイルス粒子を認めたという報告もあるが[2, 9, 60]、好発腫瘍とはいえ発生頻度が低いこと、内在性レトロウイルスとの区別が困難であること、ウイルス接種によるリンパ腫発生の再現が成功していないことによって、原因としては確定されていない[60]。

Epstein-Barrウイルス（EBV）は、ヒトのバーキットリンパ腫の原因の一つとされている[146, 158]。また、他の非ホジキンリンパ腫や上皮細胞由来の腫瘍にもEBV遺伝子や関連蛋白が証明され、これらの腫瘍の発生における関連が注目されている[51, 128, 146, 153, 155, 158]。B細胞性の非ホジキンリンパ腫では、びまん性大細胞型や免疫芽球型にEBV陽性率が高いことが報告されている[128, 158]。Hayashiら[27]は、豚のリンパ腫36例中16例にバーキット型（LSG分類）が見られたと報告しているが、著者の検索した豚の回腸リンパ腫では、バ

ーキット型の細胞学的特徴を持った腫瘍細胞は1例も見られなかった。更にその原因の一つとされているEBVの免疫染色が全例陰性であったので、本腫瘍の発生におけるEBVの関与も考えにくい。

以前に報告された豚の消化器型リンパ腫の大部分は、回腸からの単発例であるが、なかでも鹿嶋ら [52] は、回腸腫瘍の腹腔内播種と腹腔を中心としたリンパ節転移を示した7例を報告している。また、鹿嶋らと同様の症例を、内藤 [98]、田中ら [136]、東京都芝浦食肉衛生検査所 [148] が報告している。著者の収集した症例は、12例中10例 (83%) が局所リンパ節の侵襲に留まっていたが、これらの症例に見られたリンパ腫細胞の筋層および漿膜への浸潤は、腹腔内播種に発展する途上にあったことを示している。これら10例と同様の症例は、安斎ら [2]、Hayashiら [27]、茨城県北食肉衛生検査所 [36]、茨城県西食肉衛生検査所 [37]、Musonda [96]、長嶋 [97]、内藤 [98]、中島ら [101]、栃木県食肉衛生検査所 [149]、塚本 [150] によって報告されている。一方、中島ら [99]、Nakajimaら [100] は、腸間膜リンパ節 (5例)、腹部リンパ節 (1例) および腸管 (1例) を原発とし、腹腔内播種ならびに腹部・胸部・体表リンパ節転移の見られた7例を腹部型として報告している。Marcato [80] は、イタリアのボローニャで25年間に病理解剖した豚のリンパ腫42例中に消化器型4例を見だし、腫瘍は胃 (1例)、胃と小腸 (1例) および小腸 (2例) に見られたと報告している。また、庄司ら [133] は、腫瘍が胃から直腸粘膜面に多発した1例を報告している。Marcato [80] や庄司ら [132] の報告は、豚の消化器型リンパ腫の原発部位が必ずしも回腸だけではないことを示唆している。

猫やヒトの小腸リンパ腫 [15, 16, 63, 66, 73, 93, 95] 並びにヒトのバーキットリンパ腫 [29, 78] は、豚の回腸リンパ腫の様に回腸末端部から発生することが多い。ヒトの腸管リンパ腫は肉眼的に、ポリープ型・潰瘍形成型・動脈瘤型・拘縮型に分類されている [15, 16, 93, 95]。また、猫やヒトの小腸リンパ腫の重症例では、腫瘍細胞が腸管壁全周にわたって浸潤し、筋層や漿膜に達する [15, 16, 66, 73]。しかし、豚の回腸リンパ腫の様に腸間膜の反対側に腫瘤が形成され、外側 (筋層側) に向かって膨隆し、腫瘍細胞が腹腔内に漿膜播種するに至る様な病型は、見当らない。このような増殖態度は、豚の回腸リンパ腫に特異的と思われる。症例9では、原発腫瘤が3cmであったにもかかわらず、空腸リンパ節に同じ大きさの転移腫瘍が見られた。リンパ節への転移巣がしばしば回腸の原発巣よりも大きかったことを考えあわせると、豚の回腸リンパ腫は、猫の消化器型リンパ腫 [73, 94] やヒトの腸管リンパ腫 [66, 102] と同様に早期に局所リンパ節へ転移するが、すぐに遠隔のリンパ節に転移せず、局所に長期間とどまる傾向があるのかも知れない。

豚のリンパ腫での白血化は希とされている [94]。しかし、病変が広範囲に拡大した症例 [8, 152]、多中心型の症例 [147] では、しばしば見られるといった

記載もある。いずれにしても、多数例の豚のリンパ腫の血液検査を行った報告がないので、更に検討する必要がある。豚の回腸リンパ腫では、腹腔に広範な転移の見られた症例 10, 11 で白血化が見られた。ヒトのびまん性 B 細胞性リンパ腫は、白血化を示すことがある。しかし、その傾向は細胞型によって異なり、大細胞型では約 30%に、中細胞型では約 10%に、混合型では希に見られる [56, 134]。

家畜のリンパ腫の細胞分類は、ヒトのリンパ腫に関する Rappaport 分類や WHO 分類を基本にして、Jarrett と Mackey [45] によって作成された。また、これに加えて増殖様式、解剖型、免疫学的区別を盛り込んだ家畜のリンパ性腫瘍の分類が、Moulton と Harvey によって作成されている [94]。これら家畜のリンパ腫の細胞分類では、核小体の大きい大型リンパ球は未熟型 (poorly differentiated) で、核クロマチンが濃縮した小型リンパ球が成熟型または分化型 (well-differentiated) としている。しかし、小型から中型の休止期リンパ球が抗原刺激によって transform し、大型の増殖期リンパ球になるリンパ球の transformation 現象が認識された現在では [56]、これらの分類は妥当性を欠くと思われる。実際、大部分の家畜のリンパ腫の論文には、国内では LSG 分類 [56] が、国外では Working Formulation [55, 106, 152, 155] が準用されている。これら 2 つのヒトのリンパ腫細胞の形態学的分類法は、リンパ腫の増殖様式、細胞の大きさ、核の形態に基づいており、特に Working Formulation は、細胞型によって臨床経過や予後の悪性度を軽度・中等度・高度の 3 群に設定しているのが特徴である [56, 106, 155]。両者は、形態表現が詳細で互いに類似しており、細胞型も両者でよく対応している。しかもこれらの分類法は、解説書やアトラス [56, 155] が豊富なので、適切な家畜または各動物種別のリンパ腫分類がない現時点では、リンパ腫病変を記載する“共通語”として有用であろう。家畜のリンパ腫の報告のなかには、リンパ芽球型 (lymphoblastic) として細胞分類した症例が見られるが、獣医学領域では中～大細胞型、医学領域では小細胞型をそれぞれ意味していることが多く、この用語の使用や解釈には、注意が必要である [152]。

豚の消化器型リンパ腫の報告は、剖検所見の記載が中心であり [2, 36, 37, 42, 52, 97, 101, 133, 148 - 150]、リンパ腫細胞の形態について詳しく言及したものは少ない [27, 80, 99, 100]。豚のリンパ腫の細胞型に関しては、10 例以上を組織検査した Migaki [86]、Musonda [96]、Hayashi ら [27] および Nakajima ら [100] の報告がある。Migaki [86] は、200 例を Rappaport 分類 [56] を使って lymphocytic (42%)、lymphoblastic (34%)、histiocytic (15%) および mixed (9%) に分類した。Hayashi ら [27] は、36 例を LSG 分類を使って、大部分を、バーキット型 (16 例) とびまん性混合型 (15 例) に分類した。Musonda [96] は、13 例を LSG 分類を使って、12 例をびまん性中細胞型に分類した。また、Nakajima ら [100]

は、14例をKiel分類[92, 155]を使って、11例をcentroblastic-centrocytic型(LSG分類：濾胞性リンパ腫)に分類した。いずれの報告も分類法こそ違うが、豚のリンパ腫は、小型、中型または混合型のリンパ腫細胞が多く、著者の症例のような大細胞型は少ないとしている。これらの報告の大部分は多中心型リンパ腫を材料としており、消化器型リンパ腫の細胞型と違っているのかもしれない。Valli [152]は、資料の出所を明示していないが、Working Formulationを使って136例の豚のリンパ腫の81例(60%)をdiffuse large cell type(LSG分類：びまん性大細胞型)に分類し、家畜病理学書に記載している。著者は、細胞の大きさを決定するために、混在する組織球の核の大きさを基準にした。症例9を除く11例の回腸リンパ腫は、びまん性・大細胞非切れ込み型、胚中心細胞性[130]と分類されたが、腫瘍細胞の核は組織球の核よりも幾分大きい程度であった。豚のリンパ腫の組織分類が進むにつれ、著者の症例に見られたリンパ腫細胞は、中型細胞の範疇に含まれるかもしれない。しかし、11例のリンパ腫細胞の形態学的特徴は、正常リンパ組織の胚中心に存在する大型非切れ込み細胞やヒトのびまん性大細胞非切れ込み型リンパ腫細胞に酷似していた。Working Formulationでは、中型核を持つリンパ腫細胞でも大細胞型の細胞特徴を有するものは、この範疇に入れている[155]。ヒトの腸管リンパ腫では、びまん性大細胞型が多い[15, 16, 66, 93]。また、びまん性混合型の腫瘍細胞は、猫の消化器型リンパ腫[152]やヒトの節外性リンパ腫に多い[31]。猫の場合、症例9に見られたと同様に腫瘍間質の硬化を伴う[152]。Hayashiら[27]は、36例の豚のリンパ腫中に、びまん性混合型の回腸リンパ腫を1例見いだしている。ヒトのB細胞性のびまん性大細胞型や混合型のリンパ腫は、胚中心細胞由来と考えられており[31, 130, 134, 154, 155]、回腸リンパ腫の腫瘍細胞の形態も正常リンパ組織の胚中心細胞に類似していた。

症例9(びまん性混合型)のリンパ腫細胞に見られた核内および細胞質内封入体は、それぞれ免疫グロブリン(主にIgM)の貯留によって拡張した核膜槽と粗面小胞体と考えられている[39]。これらの封入体の存在は、リンパ腫細胞の免疫グロブリン産生能を示唆する形態所見である[28, 31]。

著者は、リンパ腫の組織標本作成過程で、腫瘍細胞の形態保持に大きく影響を与えるリンパ節の丸のまま固定、ホルマリン固定時間、パラフィン包埋中の脱水の具合、切片の伸展温度および切片の厚さなど[5, 103, 155]に注意して組織標本作製したが、被膜直下や割面付近のリンパ腫細胞には、形態に人工的变化が見られた。このような箇所での形態観察は、避けるべきである。

メイ・ギムザ染色標本はHE標本よりも、リンパ腫細胞の核膜、核小体およびクロマチンが明瞭に染色された。ギムザ染色は、核構造を鮮明に染色するだけでなく、大型胚中心細胞～免疫芽球～形質細胞の分化段階にあるリンパ球の細胞質を紫色に染色するとされ、このような特徴によって、ヒトのリンパ腫研

究者の多くは、リンパ腫細胞の形態観察には、ギムザ染色標本の使用を勧めている [5, 56, 155]。

豚の回腸リンパ腫では、腫瘍細胞が筋層へ列をなして浸潤していた。この浸潤様式は、Indian infiltration (Indian in a file infiltration) と呼ばれ、ヒトのバーキットリンパ腫細胞 [29, 153] やびまん性リンパ芽球型リンパ腫細胞 [155] が密な間質を浸潤する際に見られる。家畜のリンパ腫では、このような浸潤様式は報告されていない。

豚の回腸リンパ腫の組織に組織球と好酸球が混在した理由は不明であるが、一部の組織球は壊死・出血部位に反応したものであろう。星空像は、ヒトのバーキットリンパ腫の特徴的所見とされているが [29, 153 - 155]、特異的所見ではなく、ヒトのびまん性大細胞型リンパ腫にも見られる [66, 156]。しかし、ヒトのリンパ腫から樹立した細胞株をヌードマウスに移植した場合、バーキット型 (LSG 分類) だけに星空像が見られたという報告 [154] もあり、出現するマクロファージの特徴が注目される。一方、家畜のリンパ腫でも、星空像は特定の細胞型に特異的でないとされている [94, 96, 147]。Hayashi ら [27] は、星空像の存在するびまん性中細胞型リンパ腫を診断基準にして、36 例中 16 例をバーキット型に分類しているが、Musonda [96] は、13 例の豚のリンパ腫を組織学的検査し、星空像がびまん性大細胞型 (LSG 分類) にも見られたので、バーキット型の特異性を否定している。また、星空像は、豚の濾胞性リンパ腫 [100] や免疫グロブリン産生 B 細胞性リンパ腫 [49] にも観察されている。リンパ腫組織への好酸球浸潤については、ヒトの腸管リンパ腫の一部 [66]、小腸に発生したびまん性 T 細胞性多形細胞型リンパ腫 [56]、B 細胞性びまん性混合型リンパ腫 [56]、びまん性大細胞型リンパ腫 [155] および豚の小腸リンパ腫 [27] や濾胞性リンパ腫 [49] で報告されているが、意義付けはされていない。

豚のリンパ腫細胞を酵素細胞化学的に検索した報告は少ない [9, 24, 121, 131]。後藤ら [24] は、73 例の豚のリンパ腫について、リンパ球のための ALP, ACP, adenosine triphosphate, α -naphthyl acetate (ANAE) などの酵素染色を行ったが、全例陰性であったと報告している。しかし、解剖型や細胞型が記載されていないこと、酵素染色の方法が違うこと、および陽性対照の反応性の記載がないことなどで、今回の結果と比較できなかった。豚の回腸リンパ腫について著者が行った酵素染色の結果は、ヒトの B 細胞性リンパ腫の染色性と良く一致した [87, 112, 113]。

ヒトの正常リンパ組織での ALP の陽性部位は、リンパ濾胞の mantle zone (帽状域, 暗殻または外套帯) のリンパ球であり [87, 104, 113]、ここから発生するびまん性中細胞型 B リンパ腫 (mantle zone lymphoma) に特異的とされているが [104]、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型、びまん性バーキット型の B リンパ腫にも陽性例が報告されている [87, 113]。びまん性混合型、抗体産生細胞性

に分類された症例9では、ALP陰性であったが、ヒトのB細胞性リンパ腫では、症例9の様に免疫芽細胞～形質細胞の分化を示すリンパ腫細胞はALP陰性で、それ以外の分化段階のリンパ腫細胞はALP陽性とされている [113]。

ライソゾーム酵素であるACP, ANBEおよびBGは、ヒトのT細胞に特異的な酵素とされ、細胞質内に限局性点状陽性像として観察できる [87, 112]。この内ACPとANBEは、豚のEロゼット形成リンパ球にも特異的に証明されるので、豚のTリンパ球の酵素マーカーと見なされている [38, 120]。しかし、ヒトでは、ACPとANBEがびまん性顆粒状陽性を示すB細胞性リンパ腫が報告されており [87, 112, 113]、今回、豚の回腸リンパ腫でも同様の所見が得られた。従って、豚のリンパ腫の細胞由来は、ACPまたはANBEの局在様式によって判断すべきである。ヒトの胎児の胸腺T細胞における6種類の酵素の陽性率の変化を各週齢ごとに調べた報告では、ACPだけが早期から高率に検出されている [6]。豚の正常組織およびリンパ腫細胞でも、ACPの反応性が最も強かった。

使用した抗体の内、ヒトのリンパ球に反応する抗体である polyclonal 抗ヒト κ 鎖抗体 (Dako 社), polyclonal 抗ヒト λ 鎖抗体 (Dako 社), 抗 CDw75 抗体 (clone LN-1), 抗 CD79 α 抗体 (clone HM57), 抗 CD79 β 抗体 (clone B29/123), 抗 HLA-DR 抗体 (clone TAL. 1B5) および polyclonal 抗 CD3 抗体 (Dako 社) は、本論文の第1部での研究によって、豚組織のホルマリン固定・パラフィン切片を適切な抗原賦活処理した後に、リンパ球に良好に反応することが判明した抗体で、豚組織での反応性はヒトとほぼ同様である。 [141, 142]。

豚の回腸リンパ腫は、免疫組織化学的特徴 (免疫グロブリン, CD79 α および CD79 β 陽性) によって、B細胞由来であることが判明した。豚のリンパ腫細胞の細胞由来を免疫組織学的に検索した報告 [48-50, 72, 96, 100, 121] には、T細胞由来の胸腺型を除けば、免疫グロブリンを産生するB細胞性リンパ腫が多い。豚の回腸リンパ腫の原発部位と考えられるパイエル板は、B細胞の豊富なリンパ性器官の一つで [16, 63]、豚の回腸リンパ腫がB細胞性であったことは当然と考えられる。豚では、パイエル板、空腸リンパ節および腸骨下リンパ節などに反応性リンパ組織過形成 (偽リンパ腫) がよく見られ、B細胞性リンパ腫、特に濾胞性リンパ腫との組織学的鑑別が問題になる。反応性病変でのB細胞の増殖が多クローン性であるのに対し、B細胞性リンパ腫は単クローン性増殖なので、リンパ腫細胞が重鎖 (IgM, IgG または IgA) および軽鎖 (κ 型または λ 型) を発現していれば、鑑別できる [16, 64, 103, 117, 131]。著者は、豚のリンパ腫細胞での単クローン性の免疫グロブリンの発現を初めて証明した [88, 137-140]。Dako 社製抗 κ 鎖および λ 鎖ポリクローナル抗体を使った著者の今回の検索では、免疫グロブリン陽性であった豚の回腸リンパ腫10例の内、9例が細胞質内に λ 鎖を発現していた。ヒトのB細胞性リンパ腫の κ 鎖および λ 鎖の発現率は、正常B細胞のそれを反映して (κ 鎖 > λ 鎖), κ 鎖が多い [129]。ま

た、イヌのリンパ腫や形質細胞腫でも、同じ理由 (κ 鎖 $<$ λ 鎖) によって λ 鎖が多い [62, 115, 116]。豚の軽鎖を生化学的に分析した報告では、豚の κ 鎖および λ 鎖は、同率で存在しているとされている [32, 33, 53]。本研究で行った正常リンパ節の免疫染色では、 κ 鎖： λ 鎖=1：1~1.5と、生化学的分析とほぼ同様な結果が得られた。従って、豚のリンパ腫での軽鎖の発現は同率であることが予想されたが、豚の回腸リンパ腫での免疫染色の結果は違っていた。しかし、 κ 鎖発現の多いヒトのB細胞性リンパ腫でも、濾胞性リンパ腫では、 λ 鎖の発現が多いと報告されているので [129]、豚のリンパ腫でも細胞型による軽鎖の発現様式に違いがあるのかもしれない。345例のヒトのB細胞性リンパ腫の細胞型別における免疫グロブリンの発現率について、凍結切片を使って検索した報告では、74%の症例が免疫グロブリンを発現しており、なかでもびまん性小細胞型、びまん性中細胞型およびバーキット型が最も高く（それぞれ93%、100%、100%）、大細胞型や免疫芽球型は最も低い結果（それぞれ59%）であり、証明された免疫グロブリンには、重鎖+軽鎖、重鎖のみ、軽鎖のみの発現様式があり、免疫グロブリン発現率が低い細胞型ほど、予後は悪化する傾向があるとしている [129]。豚の濾胞性リンパ腫では、同一細胞内に重鎖のclass switchが起こり、IgMとIgGが二重発現した症例が報告されている [48]。今後、豚リンパ腫細胞の免疫グロブリン発現については、症例の偏りの可能性も含め、解剖型や細胞型との関連を多数例について総合的に分析する必要がある。

免疫グロブリンなどの血清中に存在する抗原は、変性・壊死細胞、固定不良の細胞、間質（特に膠原線維とリンパ濾胞の胚中心）に拡散・残存して偽陽性化（diffusion artifact）することがある [81]。偽陽性化があれば、その部位に血清成分であるアルブミンも証明されるので、判断できる [81, 156]。著者の検索した豚の回腸リンパ腫には、偽陽性所見は見られなかった。

抗CD79 α 抗体（clone HM57）の反応性は、ヒトの抗汎B細胞抗体である抗CD20-cy抗体（clone L-26）よりも優れている [59]。抗CD79 α 抗体（clone HM57）および抗CD79 β 抗体（clone B29/123）は、豚の回腸リンパ腫の大部分の腫瘍細胞に強い反応性を示したので、豚の抗汎B細胞抗体としても使用できる。

CDw75やHLA-DRの反応性には、一定の傾向を見いだせなかった。抗CDw75抗体は、正常組織での反応性を反映し、ヒトでは濾胞性リンパ腫やびまん性リンパ腫の偽濾胞性増殖領域に反応するが [13, 58, 79]、豚のリンパ腫で見られた濾胞侵襲部位には反応しなかった。また、症例9（びまん性混合型）に見られたCDw75のparanuclear stainingは、ヒトのリンパ腫では、びまん性混合型およびびまん性大細胞型にしばしば観察される [79]。HLA-DR陽性のB細胞性、びまん性リンパ腫大細胞型は予後が良いとされている [126]。これらの発現と解剖型や細胞型との関連については、多数例について総合的に分析する必要がある。

従来からヒトのリンパ腫の診断は、形態学的特徴と免疫学的特徴によって良

悪性の判定や細胞由来の決定を行ってきた。しかし、免疫グロブリンや汎 B 細胞マーカー陰性の B 細胞性リンパ腫、汎 T 細胞抗原の証明されない T 細胞性リンパ腫、反応性 T 細胞浸潤の多い B 細胞性リンパ腫 (T cell rich B cell lymphoma) など、従来の技術では診断困難な症例が報告されている [51]。最近になって、Southern blotting や polymerase chain reaction による B 細胞の免疫グロブリンの重鎖や T 細胞の T 細胞レセプターの可変領域遺伝子の単クローン性再構成の証明 [51, 57, 155] および *in situ* hybridization による免疫グロブリン軽鎖の mRNA の単クローン性の証明 [51] が報告され、より正確なリンパ腫の診断に成果をあげている。これらの技術は、家畜のリンパ腫においても腫瘍をより正確かつ詳細に特徴付けるために有用であろう。

豚の回腸リンパ腫に見られた濾胞侵襲像は、ヒトの低悪性度 B 細胞性 mucosa associated lymphoid tissue (MALT) 型リンパ腫 [40, 43]、びまん性大細胞型リンパ腫 [86, 155] およびバーキットリンパ腫 [29, 66, 78, 154] 並びに猫の消化器型リンパ腫 [73, 78] に見られるリンパ腫細胞のホーミング現象に酷似していた。また同様の濾胞侵襲像は、豚の B 細胞性リンパ腫の報告にも記載されている [48, 72, 99, 100]。最近、この現象が接着分子の面から解明されつつある [41, 110]。接着分子とは、細胞間の相互作用を司る細胞表面の蛋白質の一群で、これらの分子の多くは細胞膜を貫通して細胞骨格と結合し、これによって細胞は他の細胞や細胞外基質に向かって移動できる。このことから、接着分子は、腫瘍細胞の浸潤や転移に重要な役割を果たしていると考えられている。ヒトの濾胞性リンパ腫細胞とリンパ組織の凍結切片を使った frozen-section binding assay によって、B 細胞の胚中心への結合には、B 細胞の細胞膜表面に発現している very late antigen-4 (VLA-4) と、濾胞樹状細胞の細胞膜表面に発現している vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) が関与していることが判明している [19]。また、リンパ組織から単離した B 細胞と FDC とを混合培養し、cluster 形成 B 細胞と cluster 非形成 B 細胞の分裂・増殖能を比較すると、cluster 形成 B 細胞が高かったので、FDC は B 細胞と接着することによって、B 細胞に増殖を促す特殊な微小環境を提供しているとされている [110, 111]。豚の回腸リンパ腫に見られた濾胞侵襲・破壊、その後のびまん性増殖も、接着分子の立場から説明できるかもしれない。

びまん性リンパ腫の濾胞侵襲像と濾胞性リンパ腫の濾胞様結節像とは、しばしば鑑別困難である [155]。濾胞性リンパ腫は、時間の経過とともにびまん性化したり [48, 153, 155]、びまん性大細胞、非切れ込み型リンパ腫に形質転換すること (composite lymphoma) が知られており [134, 155]、特に豚の回腸リンパ腫にも観察されたびまん性リンパ腫大細胞型の濾胞侵襲像と鑑別を要する。主な鑑別点としては、濾胞性リンパ腫が正常リンパ濾胞のような FDC の網目状構造を保つのに対し、びまん性リンパ腫の濾胞侵襲部では、網目状構造が乱れてい

ることが挙げられる [18, 77, 91, 110, 118, 155]。FDC の観察には、抗 S-100 蛋白抗体 (β 亜分画) [135] を使った免疫染色が最適である。しかし、濾胞性リンパ腫がびまん性に移行している場合は、鑑別は困難である [3, 155]。Maeda ら [75] は、ヒトのびまん性リンパ腫組織での FDC の分布は、痕跡的になったリンパ濾胞に残存する場合 (vestigial pattern) とリンパ腫組織内に広く分布する場合 (spreading pattern) があり、前者は大細胞型やリンパ芽球型に、後者は中細胞型や混合型に見られるとを報告している。ヒトの濾胞性リンパ腫細胞では、14 番目と 18 番目の染色体の相互転座 t (14; 18) や癌遺伝子 *bcl-2* の異常発現が特徴的に見られるので鑑別診断に有効とされている [21, 155]。豚の濾胞性リンパ腫の報告 [48, 50, 100] には、濾胞様結節のびまん性化は記載されているが、それに伴う FDC の構築変化については言及されていない。

ヒトの B 細胞性リンパ腫の超微形態学的特徴は、円形または切れ込み核、細胞の分化に伴うクロマチンの核縁への凝集、同心円状に配列した長い粗面小胞体、細胞突起などである [28]。豚の回腸リンパ腫の腫瘍細胞にもこれらの特徴が観察された。特に、びまん性大細胞非切れ込み型では、豚の回腸リンパ腫細胞にも観察された様に、切れ込み型と比べ、核ポケットの形成がないこと、細胞突起が発達していない特徴がある [22]。集合性 dense body は、ライソゾーム酵素の限局性点状陽性部位と一致し、T 細胞の超微形態学的特徴とされている [28]。しかし、集合性 dense body は、著者が免疫染色によって B 細胞由来を証明した豚の回腸リンパ腫にも観察されたこと、また他の豚の B 細胞性リンパ腫の報告 [48, 99] にも同様な所見が記載されているので、豚のリンパ腫細胞の dense body の存在様式からは、細胞由来を特定することはできないと思われる。また、ヒトや豚の胚中心細胞由来の濾胞性リンパ腫には、細胞間にデスモゾーム様構造が発達する特徴がある [48, 50, 56, 99]。豚の回腸リンパ腫に見られたびまん性大細胞非切れ込み型リンパ腫細胞も胚中心に存在する B 細胞が腫瘍化したものと考えられているが [130, 134, 154, 155]、未分化な細胞間結合は発達していたが、デスモゾーム様構造は見られなかった。これは、細胞の増殖様式の違いに加え、回腸リンパ腫の腫瘍細胞が互いに接着していなかったことと関連があるかもしれない。ヒトのびまん性大細胞型リンパ腫にも、デスモゾーム様構造は見られない [22]。

Table 1. Antibodies used for immunohistochemical studies of swine ileal lymphomas.

Antibody*	Specificity†	Pretreatment‡	Dilution	Source
Human κ light chain	B cell	trypsin	1 : 30,000	Dako, Kyoto, Japan
Human λ light chain	B cell	trypsin	1 : 30,000	Dako
Swine IgM	B cell	trypsin	1 : 2,000	Bethyl Lab., Montgomery, USA
Swine IgG	B cell	trypsin	1 : 2,000	Bethyl Lab.
Swine IgA	B cell	trypsin	1 : 2,000	Bethyl Lab.
Swine albumin	Hepatocyte	trypsin	1 : 2,000	Bethyl Lab.
Human CDw75 (clone LN-1)	B cell	MW	Prediluted	Nichirei, Tokyo, Japan
Human CD79 α (clone HM57)	B cell	MW	1 : 10	Masson et al. [83]
Human CD79 β (clone B29/123)	B cell	MW	1 : 10	Masson et al. [84]
HLA-DR (clone TAL. 1B5)	B cell, MHC class II-bearing cell	MW	1 : 100	Dako
Human CD3	T cell	MW	1 : 200	Dako
Bovine TdT	T cell (lymphoblast)	DNase + trypsin	1 : 100	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
PCNA (clone PC10)	Proliferating cell	MW	1 : 500	Dako
EBV (clone PE2)	EBV	none	1 : 100	Dako
EBV (clone CS1-4)	EBV	trypsin	1 : 100	Dako
Bovine S-100 (α subunit)	Histiocyte	MW	5 μ g/ml	Takahashi K., et al. [135]
Bovine S-100 (β subunit)	FDC	MW	5 μ g/ml	Takahashi K., et al. [135]

* HLA = human leukocyte antigen; TdT = terminal deoxynucleotidyl transferase; PCNA = proliferating cell nuclear antigen; EBV = Epstein-Barr virus.

† MHC = major histocompatibility complex; FDC = follicular dendritic cell.

‡ MW = microwave heating in Tris-HCl buffer; DNase = deoxyribonuclease.

Table 2. Clinical and anatomic findings of ileal lymphomas in 12 swine.

Pig No.	Breed	Age (years)	Sex*	Tumor Size (diameter, cm)	Metastatic Site
1	Landrace	3	F	10	Jejunal LN†
2	Hybrid	0.5	F	8	Jejunal LN
3	Hybrid	0.5	F	12	Jejunal LN
4	Hybrid	0.5	M/c	12	Jejunal LN, ileocolic LN
5	Hybrid	0.5	M/c	15	Jejunal LN, ileocolic LN
6	Hybrid	0.5	F	10	Jejunal LN, ileocolic LN
7	Hybrid	0.5	F	15	Jejunal LN, ileocolic LN
8	Hybrid	0.5	F	10	Jejunal LN, ileocolic LN
9	Hybrid	0.5	F	3	Jejunal LN
10	Hybrid	0.5	F	25	Serosa of abdominal organs, abdominal LNs, mesenteric LNs
11	Hybrid	0.5	M/c	20	Serosa of abdominal organs, abdominal LNs, mesenteric LNs
12	Hybrid	0.5	M/c	5	Jejunal LN

* F = female; M/c = castrated male.

† LN = lymph node.

Table 3. Enzyme cytochemical and immunohistochemical results of ileal lymphomas in 12 swine.

	Enzyme Cytochemistry*						Immunohistochemistry†											EBV	
	ALP	ACP	ANBE	BG	κ	λ	IgM	IgG	IgA	Alb	CDw75	CD79 α	CD79 β	HLA-DR	CD3	TdT	PCNA	PE2	CS1-4
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	ND	-
4	ND	ND	ND	ND	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	ND	-
5	ND	ND	ND	ND	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	ND	-
6	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
7	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
8	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
9	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
10	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
11	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
12	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

* ALP = alkaline phosphatase; ACP = acid phosphatase; ANBE = α -naphthyl butyrate esterase; BG = β -glucuronidase.

† Alb = albumin; HLA = human leukocyte antigen; TdT = terminal deoxynucleotidyl transferase; PCNA = proliferating cell nuclear antigen;

EBV = Epstein-Barr virus.

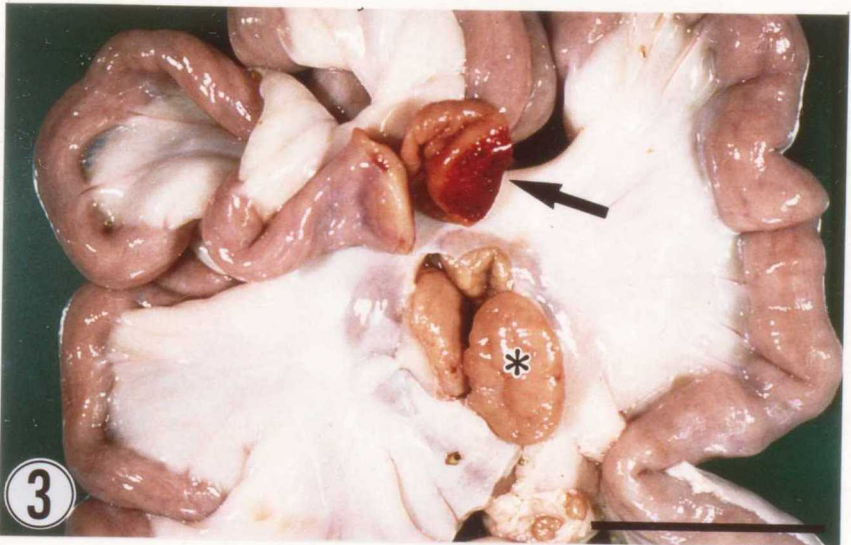
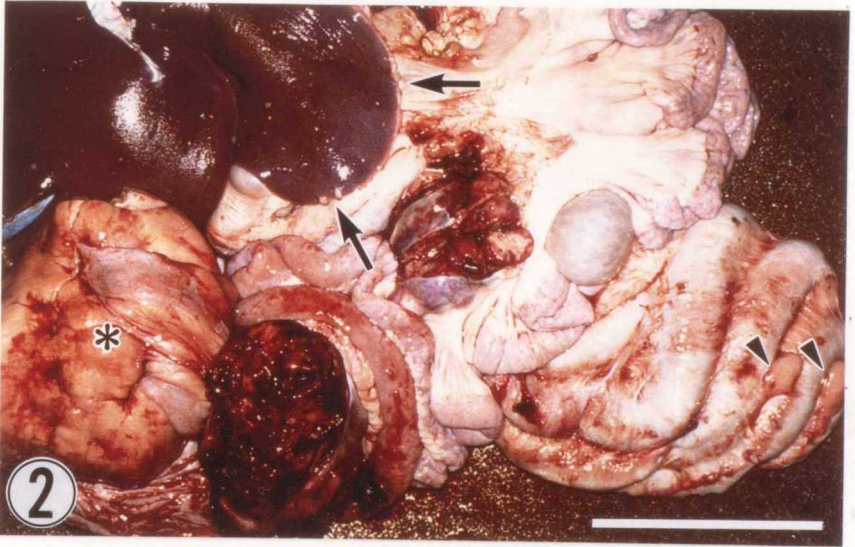
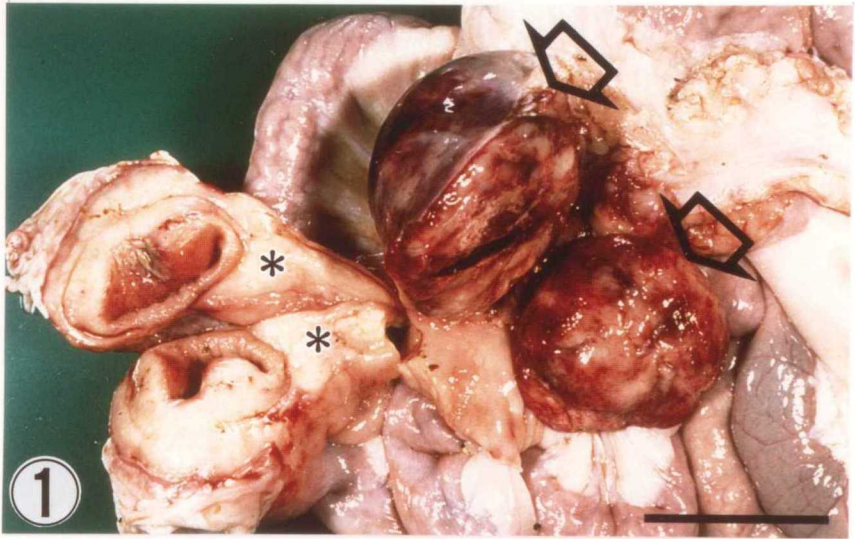
ND = not done.

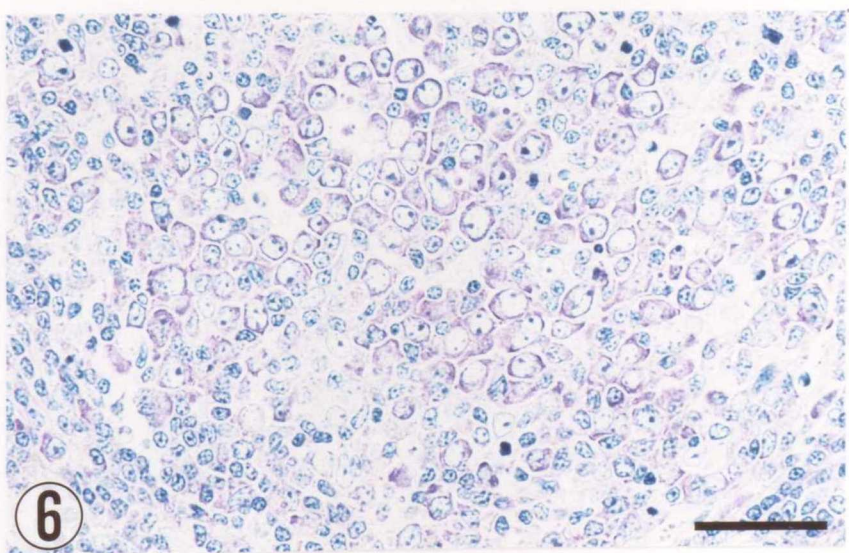
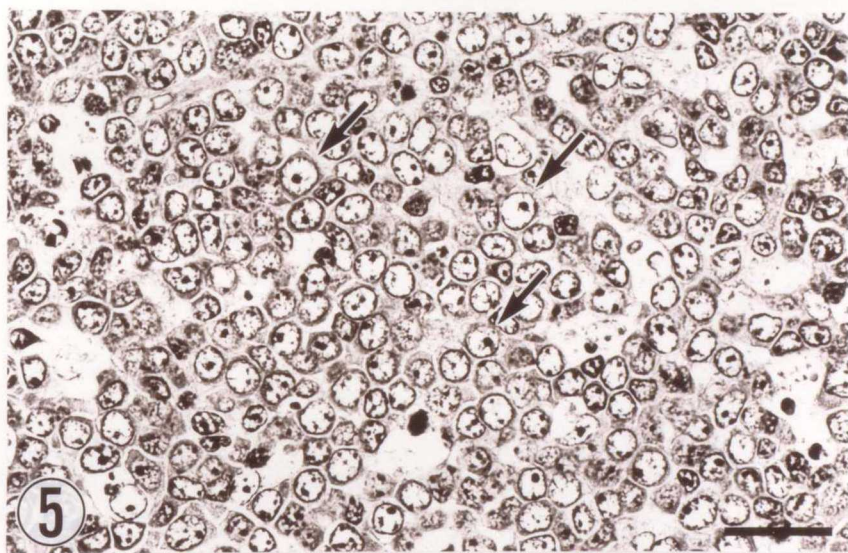
Figure Legends

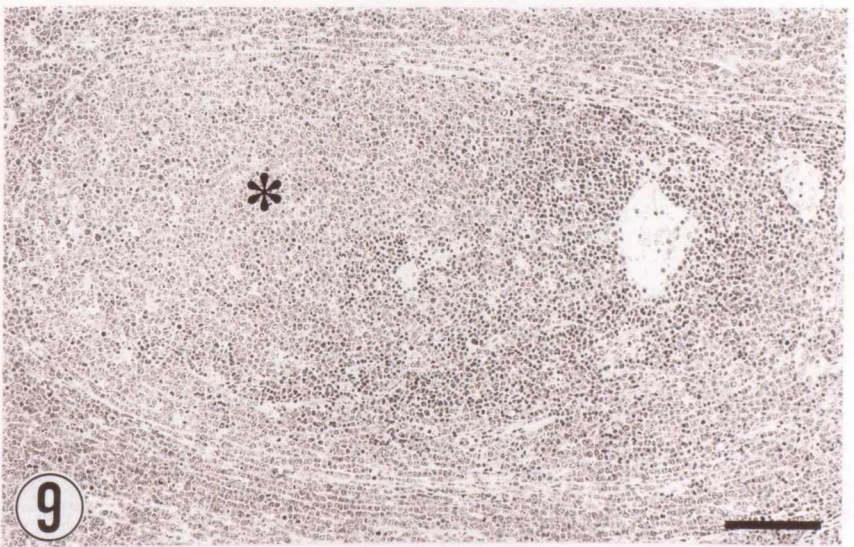
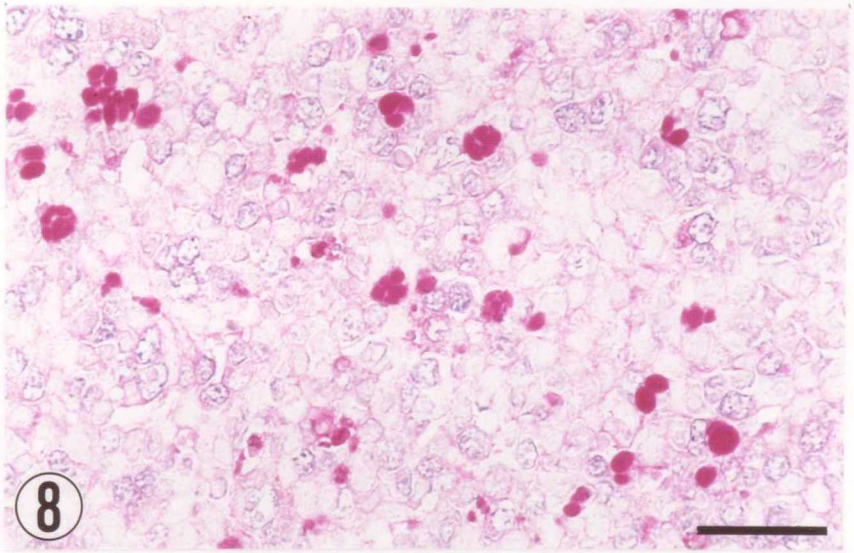
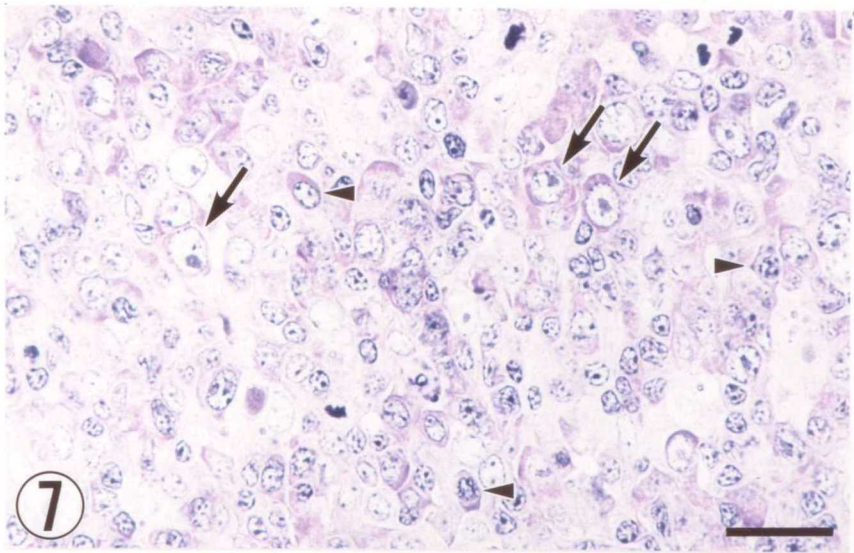
- Fig. 1** Ileum; pig No. 3. Cut surface of a solitary ileal mass localized opposite to the mesentery and protruding outside the ileal wall. Arrows indicated a jejunal lymph node metastasis with extensive necrotic and hemorrhagic foci. Note the ileal lymphoma spreading into a jejunal lymph node through the mesentery (asterisks). Bar = 10 cm.
- Fig. 2** Abdominal organs; pig No. 10. Extensive transserosal metastases (asterisk) from large ileal mass to the liver (arrows) and large intestine (arrowheads). Bar = 20 cm.
- Fig. 3** Ileum; pig No. 9. Early jejunal lymph node metastasis (asterisk) in a case with a small ileal mass (arrow). Bar = 5 cm.
- Fig. 4** Ileum; pig No. 3. Ileal mass arising from the Peyer's patch. Note the remnant of the lymphoid follicles replaced by lymphoma cells (arrowheads). HE stain. Bar = 0.25 cm.
- Fig. 5** Diffuse large noncleaved lymphoma cells, follicular center cell origin; pig No. 3. Lymphoma cells showing large oval vesicular nuclei containing coarsely reticulated heterochromatin and central prominent nucleoli, and narrow cytoplasm. Note the immunoblast-like lymphoma cells containing a single large nucleoli (arrows). May-Giemsa stain. Bar = 25 μ m.
- Fig. 6** A lymphoid follicle of a lymph node from a healthy pig. Large noncleaved lymphocytes among the follicular center cells. May-Giemsa stain. Bar = 50 μ m.
- Fig. 7** Diffuse mixed small to large lymphoma cells, immunoglobulin-producing cell origin; pig No. 9. Part of the lymphoma tissues consisted of large immunoblast-like cells (arrows) and medium to small plasmacytoid cells (arrowheads). Lymphoma cells stained purple with May-Giemsa stain just like that of plasma cells. May-Giemsa stain. Bar = 25 μ m.

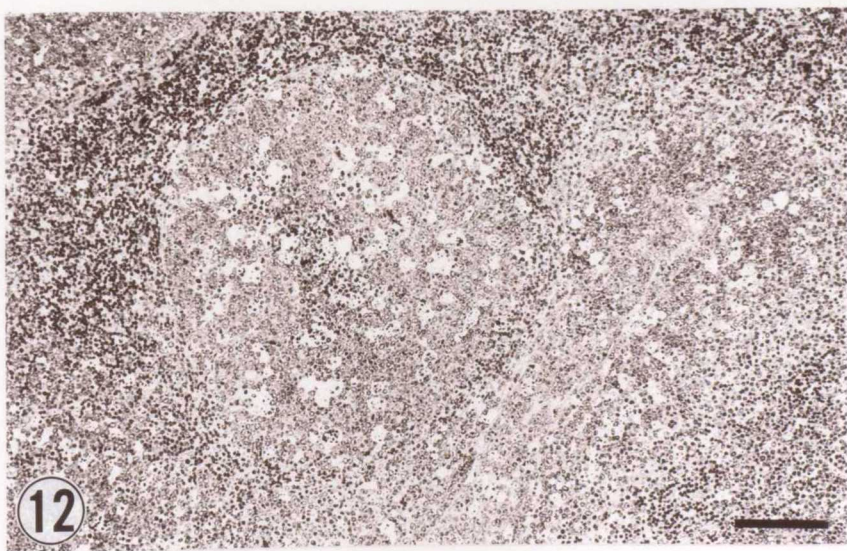
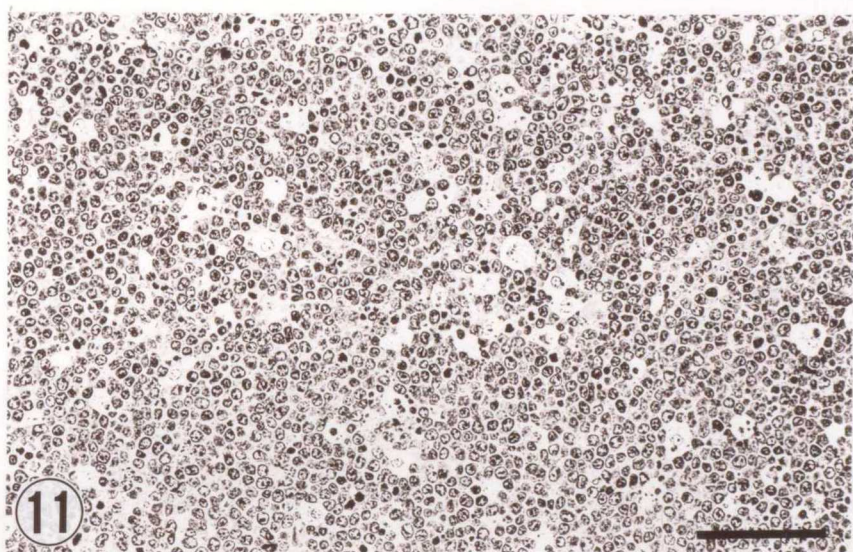
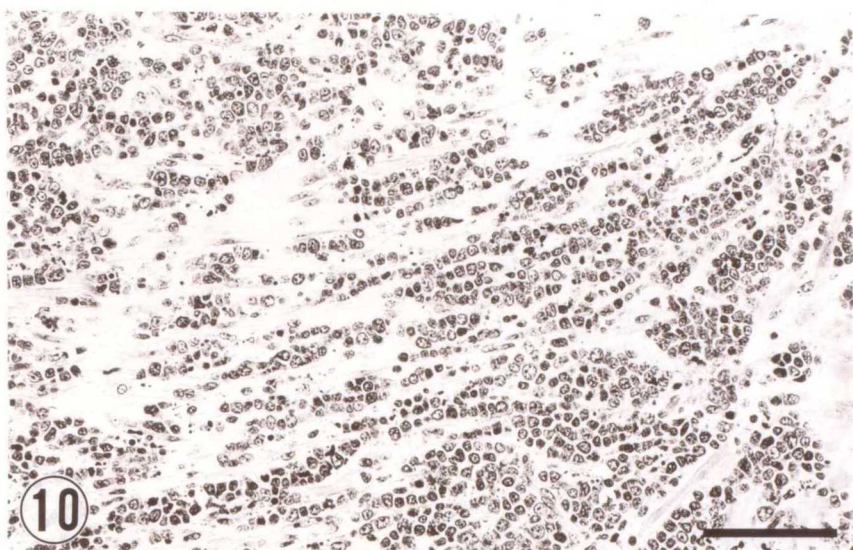
- Fig. 8** Diffuse mixed small to large lymphoma cells, immunoglobulin-producing cell origin; pig No. 9. Lymphoma cells containing PAS-positive intracytoplasmic inclusions (Russell body). Periodic acid-Schiff (PAS) stain, with hematoxylin nuclear stain. Bar = 50 μ m.
- Fig. 9** Ileum; pig No. 10. Lymphoma cells (asterisk) replacing the dark zone of a lymphoid follicle. HE stain. Bar = 150 μ m.
- Fig. 10** Ileum; pig No. 5. Lymphoma cells infiltrating the muscular layer in an "Indian file" pattern. HE stain. Bar = 100 μ m.
- Fig. 11** Ileum; pig No. 10. "Starry sky" appearance of tingible body histiocytes among the lymphoma cells. HE stain. Bar = 100 μ m.
- Fig. 12** Jejunal lymph node; pig No. 11. An edge of a metastatic mass featuring follicular and sinusoidal invasion by lymphoma cells. HE stain. Bar = 150 μ m.
- Fig. 13** Diffuse large noncleaved lymphoma cells, follicular center cell origin; pig No. 10. Lymphoma cells within or around the vessels. HE stain. Bar = 100 μ m.
- Fig. 14** Diffuse large noncleaved lymphoma cells, follicular center cell origin; pig No. 10. Membranous alkaline phosphatase-positivity in the lymphoma cells. Alkaline phosphatase stain, without nuclear stain. Bar = 50 μ m.
- Fig. 15** Diffuse large noncleaved lymphoma cells, follicular center cell origin; pig No. 10. Diffuse granular acid phosphatase-positivity in the cytoplasm of the lymphoma cells. Acid phosphatase stain, without nuclear stain. Bar = 50 μ m.
- Fig. 16** Diffuse large noncleaved lymphoma cells, follicular center cell origin; pig No. 6. Monoclonal immunoglobulin expression of IgM in most of the lymphoma cells. Labelled streptavidin-biotin (LSAB) method with Mayer's hematoxylin stain. Bar = 50 μ m.

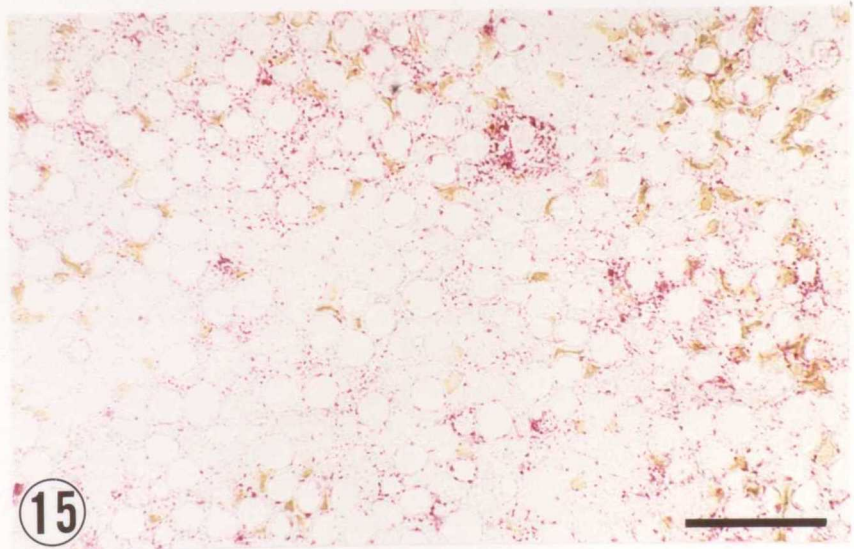
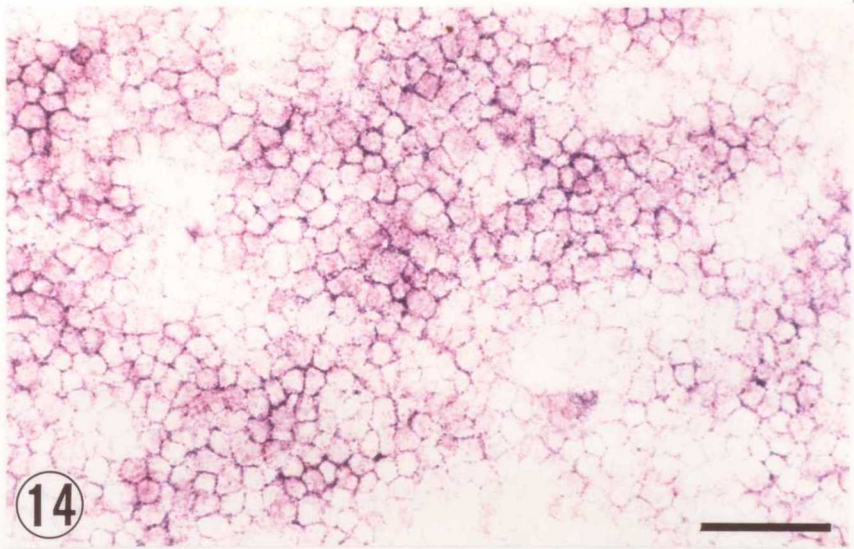
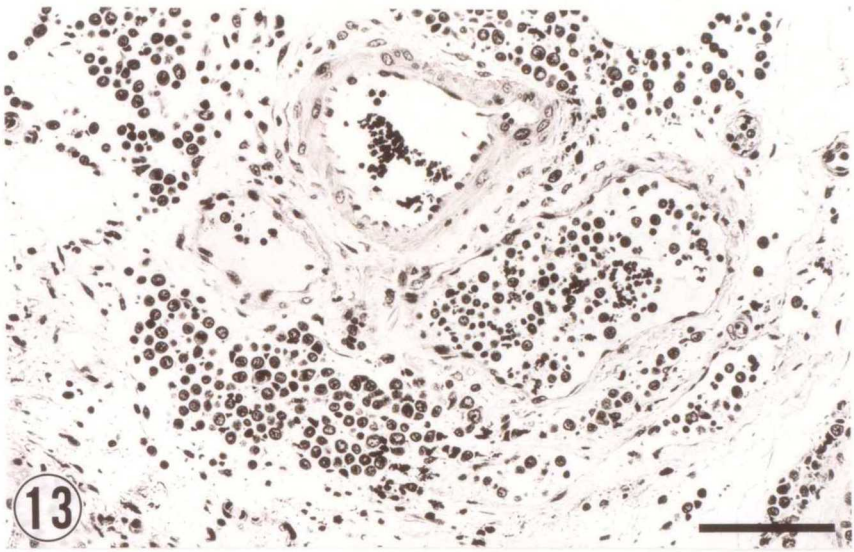
- Fig. 17** Diffuse large noncleaved lymphoma cells, follicular center cell origin; pig No. 10. CD79 β (B29, clone B29/123)-labeling of the lymphoma cells. LSAB method with Mayer's hematoxylin stain. Bar = 50 μm .
- Fig. 18** Ileum; pig No. 10. An attenuated network of β subunit of S-100 protein-positive follicular dendritic cells (FDC) in a follicle invaded by the lymphoma cells. Note some clusters of lymphoma cells (asterisks) surrounded by the cytoplasmic processes of FDC. LSAB method with Mayer's hematoxylin stain. Bar = 50 μm .
- Fig. 19** Jejunal lymph node; pig No. 10. An vestigial FDC network in an apparent follicular neoplastic nodule. LSAB method for β subunit of S-100 protein, with Mayer's hematoxylin stain. Bar = 100 μm .
- Fig. 20** Same region of Fig. 12. Ileum; pig No. 10. Many S-100 α -positive histiocytes in far greater numbers than identified histologically. LSAB method with Mayer's hematoxylin stain. Bar = 100 μm .
- Fig. 21** Electron micrograph. Diffuse large noncleaved lymphoma cells, follicular center cell origin; pig No. 6. A large noncleaved lymphoma cell containing a vesicular nucleus with a single prominent nucleolus and some intracytoplasmic strands of rough endoplasmic reticulum and clustered dense bodies (arrows). Bar = 2 μm .
- Fig. 22** Electron micrograph. Diffuse mixed small to large lymphoma cells, immunoglobulin-producing cell origin; pig No. 9. A lymphoma cell containing a peripherally located euchromatin-rich nucleus and many dilated rough endoplasmic reticulum simulating a plasma cell. Bar = 2 μm .
- Fig. 23** Electron micrograph. Diffuse large noncleaved lymphoma cells, follicular center cell origin; pig No. 6. Poorly developed intercellular junctions between the lymphoma cells. Bar = 1 μm .
- Fig. 24** Electron micrograph. Ileal Lymphoma; pig No. 6. A histiocyte containing many lysosomal granules and phagocytosed cell debris. Note its cytoplasmic processes attaching the lymphoma cells. Bar = 2 μm .

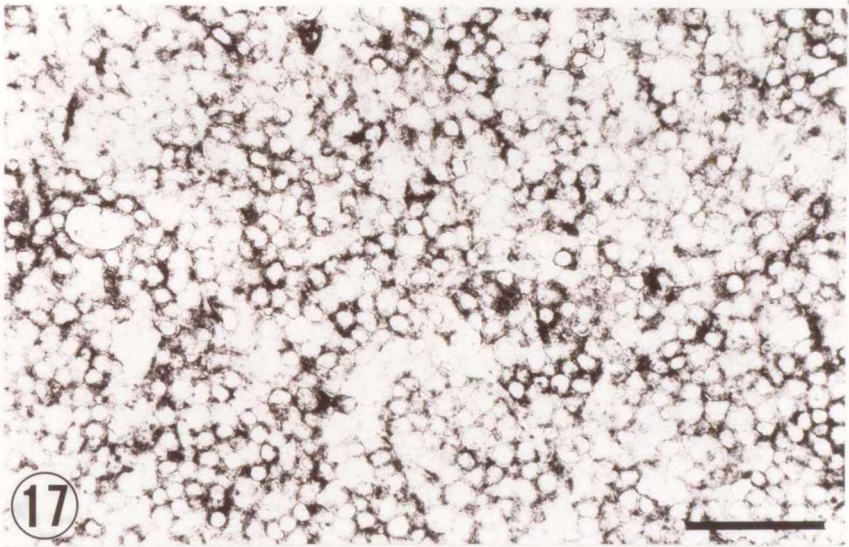
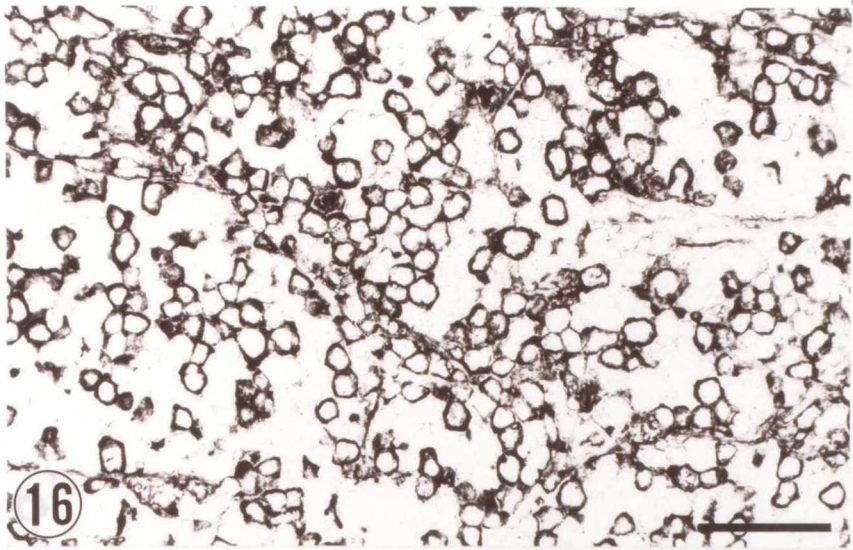


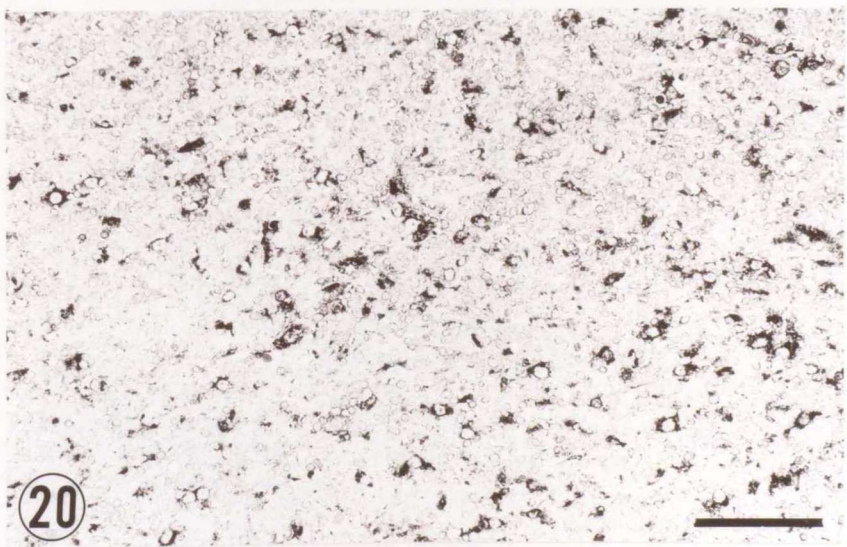
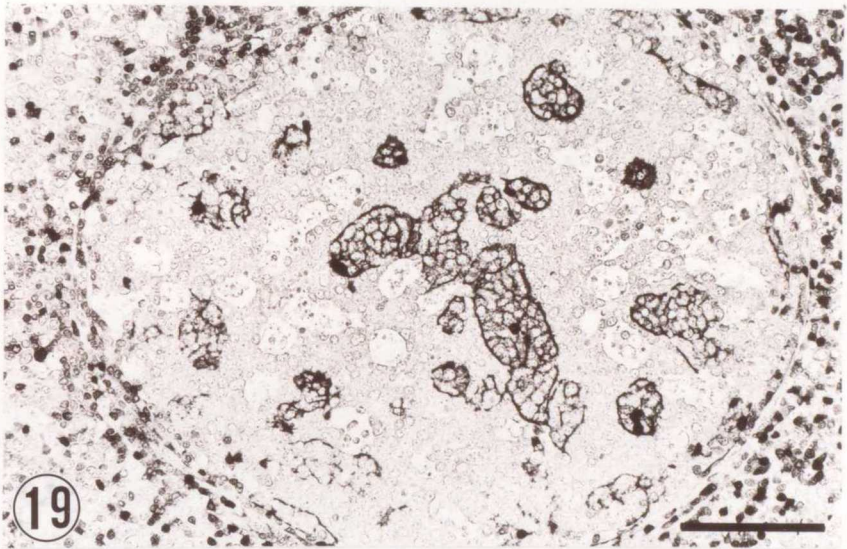
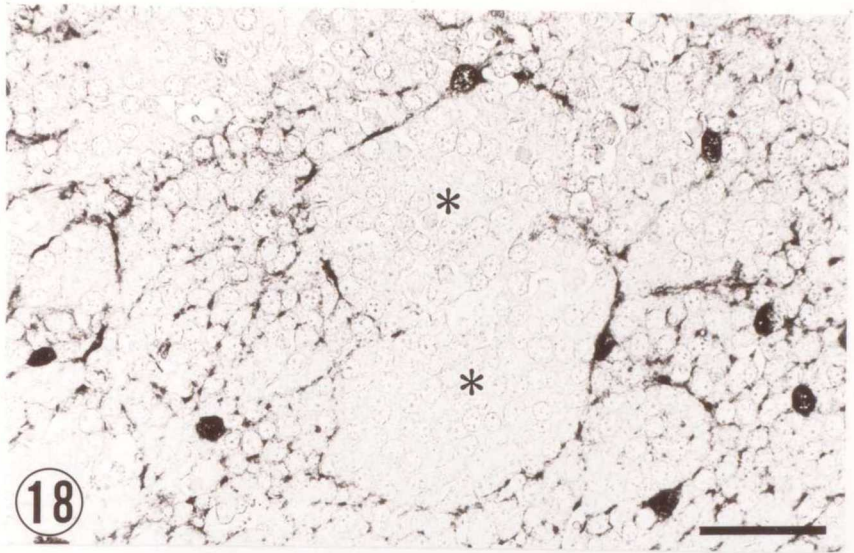


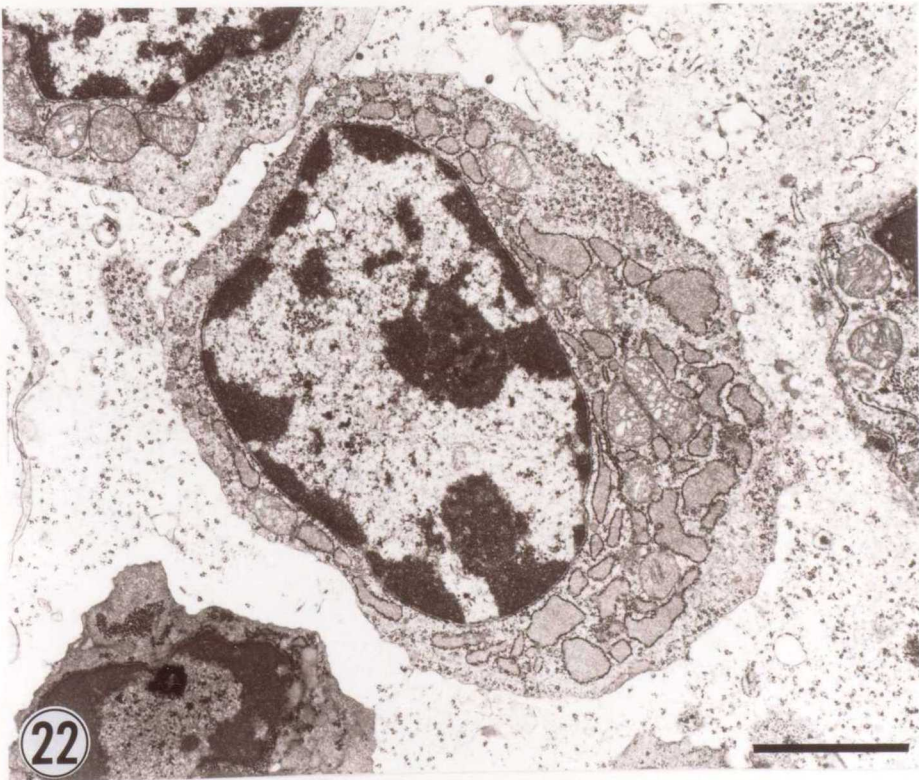
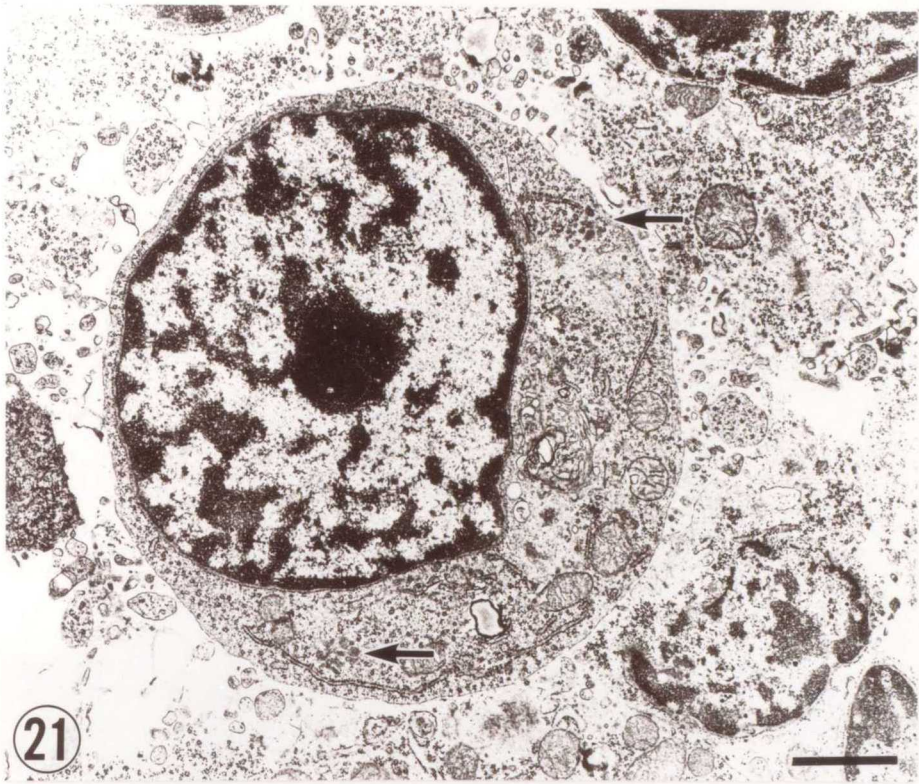


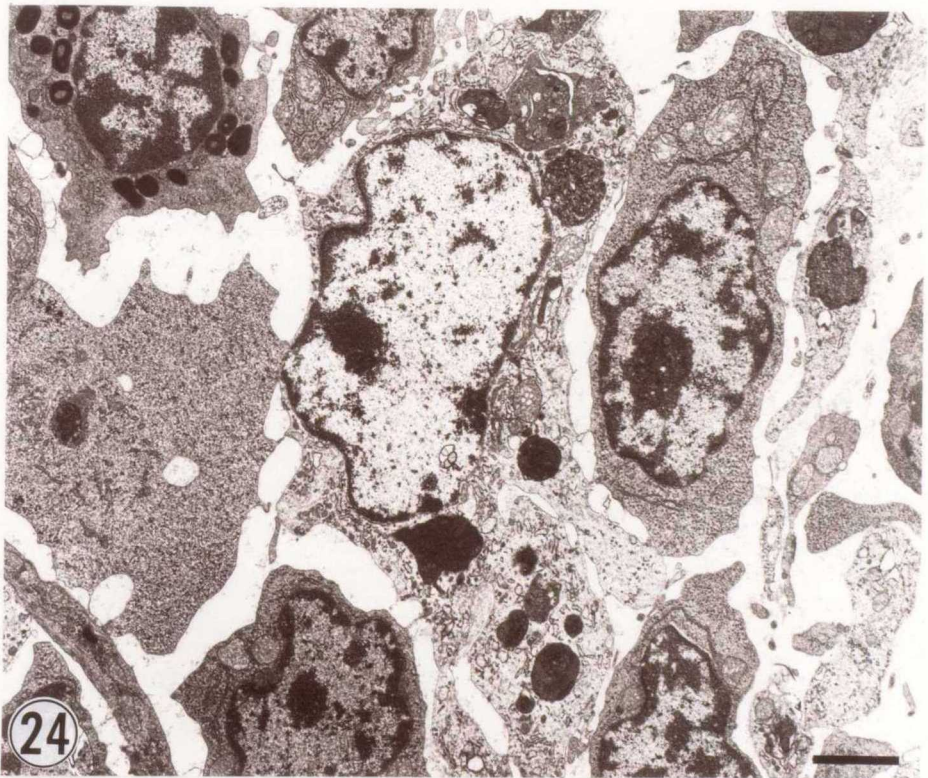












7. 和文要約

豚の回腸リンパ腫の組織学的、酵素細胞化学的、免疫組織化学的および超微形態学的検索

リンパ腫（非ホジキンリンパ腫）は豚の好発腫瘍の一つであるが、詳細な病理学的特徴は明らかにされていない。しかし、大部分が多中心型、一部が胸腺型の解剖学的病型をとり、消化器型や皮膚型は極めて稀とされている。最近、回腸や腸間膜リンパ節に発生した消化器型リンパ腫の症例が若干報告された。著者も、1980年から1994年までの15年間に、高知県で行った食肉衛生検査で発見した26例の豚のリンパ腫の中に、回腸を侵す12例を見いだした。家畜の消化器型リンパ腫は、猫で最も特徴付けられており、その病理学的特徴はヒトのバーキットリンパ腫に似ている。豚のリンパ腫の研究の中には、ヒトのバーキットリンパ腫との類似性を指摘したものがある。更にヒトの非ホジキン型リンパ腫には、ヒトのバーキットリンパ腫の原因の一つとされている Epstein-Barr virus (EBV) が高率に検出されている。そこで、これらの知見を参考にしながら、豚の回腸リンパ腫の病理学的特徴、特に十分に検索されていない腫瘍細胞の特徴を検索した。

材料と方法： 12例の豚の回腸リンパ腫を病理組織学的、酵素細胞化学的、免疫組織化学的および超微形態学的に検索し、得られた所見を猫やヒトの小腸リンパ腫、ヒトのバーキットリンパ腫と比較し、特徴付けた。また、免疫組織化学的手段を使った腫瘍組織からの EBV の検出も試みた。

結果： 高知県で発生した豚の回腸リンパ腫の発生頭数は、10万頭あたり0.8頭で、豚のリンパ腫の解剖学的病型は、腸管型（12例、46%）あるいは多中心型（10例、38%）が目立った。いずれの症例も、体重減少あるいは下痢などの臨床症状はなかった。回腸リンパ腫は、パイエル板から孤立性腫瘍として発生し、早期の腸間膜リンパ節転移を伴いながら、リンパ濾胞を侵襲し、びまん性に増殖していた。回腸リンパ腫の細胞学的特徴は、ヒトのバーキットリンパ腫とは類似性がなく、the lymphoma-leukemia study group of Japan (LSG) 分類によって、11例がびまん性・大細胞非切れ込み型 (DLNC 型)、胚中心細胞性に、1例がびまん性混合型 (DM 型)、抗体産生細胞性に分類された。DM 型リンパ腫細胞は、過ヨウ素酸シッフ (PAS) 反応陽性の核内封入体 (Dutcher body) や細胞質内封入体 (Russell body) を有していた。二つの細胞型の腫瘍組織には、核崩壊物を貪食した多数の組織球が見られ、星空像を示していた。回腸リンパ腫の腫瘍細胞は、しばしば回腸の筋層に浸潤し、列をなしていた (Indian file infiltration)。2例においては、特徴的な腹腔への漿膜転移が見られ、白血化もしていた。リンパ腫細胞には、alkaline phosphatase の細胞膜での陽性、acid

phosphatase および α -naphthyl butyrate esterase の細胞質でのびまん性陽性像が観察された。9例の腫瘍細胞には、免疫組織化学的に単クローン性の細胞質内免疫グロブリン陽性像が見られた (IgM- λ 型7例, IgG- λ 型1例, IgG- κ 型1例)。10例の腫瘍細胞は、ヒトの汎B細胞マーカーである CD79 α と CD79 β に陽性であった。リンパ濾胞の侵襲部では、S-100 蛋白 β 亜分画陽性の濾胞樹状細胞 (FDC) の網目状構造の破壊が見られた。腫瘍細胞には、超微形態学的に拡張した粗面小胞体や散在性あるいは集合性 dense body が顕著であった。いずれの症例にも EBV 抗原は検出されなかった。

結論：豚の回腸リンパ腫は、パイエル板から孤立性腫瘍として発生し、早期の腸間膜リンパ節転移を示すこと、リンパ濾胞を侵襲し、びまん性に増殖すること、筋層に浸潤し、列をなすこと (Indian file infiltration)、腹腔に漿膜転移することなどの病理学的特徴を持ち、腫瘍細胞の免疫学的表現型として IgM- λ 型の免疫グロブリンを産生する B 細胞性大細胞型リンパ腫細胞が多い。

Ileal Lymphoma in Swine: A histologic, enzyme cytochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study of 12 cases.

Introduction: Although lymphoma is the most common neoplasm in swine, little is yet known about it. However, the multicentric and thymic lymphomas are common, and alimentary and cutaneous lymphomas are believed to be quite rare. Recently, alimentary lymphoma in the ileum or the mesenteric lymph nodes has been described in a number of case reports. We also observed 12 cases of alimentary lymphoma affecting the ileum among 26 cases of swine lymphoma detected at meat inspection facilities in Kochi Prefecture from 1980 to 1994. In domestic animals, alimentary lymphoma is best characterized in cats and their pathological features are similar to those of Burkitt's lymphoma (BL). A study of swine lymphomas suggested that most of these cytology resembled those of BL. In addition, Epstein-Barr virus, an etiological agent of BL, has been demonstrated in a high percentage of human non-Hodgkin's lymphomas by the immunohistochemistry and the Southern blotting method. On the basis of these knowledge, we characterized ileal lymphomas in swine with pathological examinations.

Materials and Methods: We characterized 12 cases of ileal lymphoma in swine and compared with feline and human alimentary lymphoma and Burkitt's lymphoma using histologic, enzyme cytochemical, immunohistochemical, and ultrastructural techniques. For the detection EBV, immunohistochemical examination was also done.

Results: The prevalence of ileal lymphoma in Kochi Prefecture was 0.8 per 100,000 inspected swine, and the disease was predominantly alimentary (12 / 26, 46%) or multicentric (10 / 26, 38%). None of the swine showed any symptoms such as weight loss or diarrhea. The ileal lymphomas were a solitary neoplasm arose from the Peyer's patches, along with early involvement of regional lymph nodes, and showed a characteristic pattern of follicular invasion leading to diffuse growth. The cytology of the ileal lymphomas did not resemble of that of BL, but following the lymphoma-leukemia study group of Japan (LSG) classification, 11 neoplasms were classified as diffuse lymphoma, large noncleaved cell type (follicular center cell nature) and one neoplasm was a diffuse lymphoma, mixed cell type (immunoglobulin-producing cell nature). The latter type lymphoma cells contained PAS-positive intranuclear and/or intracytoplasmic inclusions. Both types of lymphoma featured many intermingled "starry sky" histiocytes. The lymphoma cells often infiltrate into the muscular layer of the ileum in an "Indian file" pattern. Two cases also showed a characteristic transserosal metastasis into the abdomen and leukemic change. The lymphoma cells showed membrane positivity for alkaline phosphatase and diffuse cytoplasmic staining for acid phosphatase and non-specific esterase. Immunohistochemically, monoclonal intracytoplasmic immunoglobulins were shown in nine neoplasms (IgM- λ in seven, IgG- λ in one, and IgG- κ in one). The lymphoma cells of 10 cases were also positive

for human pan-B cell markers; CD79 α (clone HM57) and CD79 β (clone B29/123). In the areas of follicular invasion, an attenuated network of follicular dendritic cells was visualized via an antiserum against the β subunit of S-100 protein. Ultrastructurally, strands of dilated rough endoplasmic reticulum and scattered or clustered dense bodies were noted. EBV antigen was not demonstrated in any of the cases.

Conclusion: Swine ileal lymphomas possess a distinctive pathological entity, which is a solitary neoplasm arising from Peyer's patches with early involvement of regional lymph nodes, follicular invasion leading to diffuse growth, infiltration of muscular layer in an "Indian file" pattern, transserosal metastasis into the abdomen, and predominantly large B cell type with IgM- λ type immunoglobulin expression.

結 論

豚の回腸リンパ腫の病理学的特徴，特に十分に検索されていない腫瘍細胞の特徴を明らかにするために，第1部では，ホルマリン固定・パラフィン切片とした豚組織中のリンパ球に反応する抗体を検索し，第2部では，第1部での研究成果を加え，1980年から1994年までに高知県で発見された12例の豚の回腸リンパ腫を組織学的，酵素細胞化学的，免疫組織化学的および超微形態学的検索し，得られた所見を猫やヒトの小腸リンパ腫，ヒトのバーキット型リンパ腫と比較し，以下の結論を得た。

第1部 ホルマリン固定・パラフィン切片とした豚組織中のリンパ球に反応する抗体の検索

1. polyclonal 抗ヒト κ 鎖抗体 (Dako 社)，polyclonal 抗ヒト λ 鎖抗体 (Dako 社)，抗 CDw75 抗体 (clone LN-1)，抗 CD79 α 抗体 (clone HM57)，抗 CD79 β 抗体 (clone B29/123)，抗 HLA-DR 抗体 (clone TAL. 1B5) および polyclonal 抗 CD3 抗体 (Dako 社) の7種類のヒトのリンパ球に反応する抗体は，脱パラフィン切片を適切に抗原賦活処理をすることによって，ホルマリン固定・パラフィン切片とした豚組織中のリンパ球に良好な反応性を示し，それぞれの抗体の陽性部位は，ヒトでの報告とほぼ一致した。

2. それぞれの抗体に対する抗原賦活処理法として，抗ヒト軽鎖抗体には，0.1% trypsin による酵素処理を，また抗ヒト・リンパ球抗体には，0.1M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 中でのマイクロウェーブ熱処理および antigen retrieval solution (Dako 社) 中での熱湯による加熱処理をすることによって，ヒト組織と同様の反応性が得られる。

3. 7種類の抗体は，ホルマリン固定・パラフィン切片とした豚組織中のリンパ球 subset の同定，鑑別および特徴付けに役立つ。

4. 脱パラフィン切片を適切に抗原賦活処理することによって，凍結切片しか反応しない抗体や抗原由来の動物種しか反応しない抗体でもパラフィン切片に応用可能である。

第2部 豚の回腸リンパ腫の組織学的，酵素細胞化学的，免疫組織化学的および超微形態学的検索

1. 高知県での豚のリンパ腫の発生率 (10万頭当たり1.7頭) は，他の地域での発生率とほぼ同様であるが，回腸を原発とする腸管型リンパ腫 (12例，46%) が多中心型 (10例，38%) よりも多く見られ，大部分が多中心型とする他の地域

からの報告とは異なる発生傾向がある。

2. 豚の回腸リンパ腫の発生部位は、猫やヒトの小腸リンパ腫、ヒトのバーキッドリンパ腫と類似していたが、肉眼像（腸間膜付着部反対側から孤立性に発生し、回腸壁の外側に向かって隆起）や進展様式（早期の腸間膜リンパ節転移、腹腔臓器漿膜への播種性転移）は、本腫瘍に特異的である。

3. 大部分の回腸リンパ腫細胞は、豚の多中心型リンパ腫に多く見られる細胞型（小型、中型または混合型）と異なり、びまん性・大細胞型（LSG分類）に分類され、ヒトの腸管リンパ腫と同じ傾向を示した。

4. 豚の回腸リンパ腫の酵素染色所見（alkaline phosphatase 陽性, acid phosphatase および α -naphthyl butyrate esterase のびまん性陽性）、免疫染色所見（単クローン性免疫グロブリンの発現, CD79 α 及び CD79 β 陽性）は、本腫瘍の B 細胞由来を示す。それぞれの染色所見は、ヒトの B 細胞性リンパ腫と同様である。

5. 豚の回腸リンパ腫細胞の免疫学的表現型として、IgM- λ 型の細胞質内免疫グロブリンを産生する B 細胞性大細胞型リンパ腫細胞が多い。

6. 豚の回腸リンパ腫に見られた濾胞侵襲像は、ヒトの低悪性度 B 細胞性 mucosa associated lymphoid tissue (MALT) 型リンパ腫、びまん性大細胞型リンパ腫およびバーキッドリンパ腫並びに猫の消化器型リンパ腫に見られるリンパ腫細胞のホーミング現象に酷似する。

7. びまん性 B 細胞性リンパ腫の濾胞侵襲像と濾胞性リンパ腫の濾胞様結節像とは、濾胞樹状細胞 (follicular dendritic cell, FDC) の網目状構造に違いがあり、抗 S-100 蛋白抗体 (β 亜分画) を使った免疫染色で鑑別できる。

8. 豚の回腸リンパ腫の超微形態像は、ヒトの B 細胞性びまん性リンパ腫・大細胞非切れ込み型に類似するが、dense body の存在様式では細胞由来を決定できない。

9. 豚の回腸リンパ腫は、猫やヒトの小腸リンパ腫、ヒトのバーキッドリンパ腫と幾つかの類似点を有するが、独特の病理像を示す。

謝 辞

終わりに、終始懇篤な御指導を賜り、論文校閲の労をとられた麻布大学獣医学部病理学第一講座・野村靖夫教授，同・代田欣二助教授，病理学第二講座・高橋令治教授，内科学第二講座・小林好作教授に心からお礼申し上げます。

また、研究活動に便宜を図ってくださった高知県中央食肉衛生検査所・末永謙吉所長，高知県環境福祉部薬務衛生課・上岡英和課長補佐，高知県土佐山田保健所衛生課・長尾正紘課長に，病理学的検索に御助言をいただいた神奈川県食肉衛生検査所・鹿嶋 傳博士，栃木県衛生環境部環境衛生課・内藤文夫先生，農林水産省家畜衛生試験場北海道支場・門田耕一博士，仙台市食肉衛生検査所・新木 茂先生に，材料の収集に御協力いただいた高知県中央食肉衛生検査所および高知県中村食肉衛生検査所の検査員各位に，技術的補助をしていただいた高知医科大学・山口拓也技官と山本直美技術補佐員（組織学），矢生健一技官（電子顕微鏡），城田雅俊技官（写真撮影），大河内美和事務補佐員（論文作成・編集）に，抗ヒト汎B細胞抗体である抗CD79 α 抗体(clone HM57)及び抗CD79 β 抗体(clone B29/123)を分与していただいた Dr. D. Y. Mason, University Department of Cellular Science, John Radcliffe Hospital, Oxford, UK に深謝いたします。

なお、著者は本論文の一部を高知県高幡家畜保健衛生所・南 明博先生，高知医科大学第二病理学教室・大舘祐治教授，高知医科大学第三内科学教室・矢野昭起博士と共同研究し，学会発表 [79, 128 - 130, 132, 134, 135] および論文発表した [131, 133]。

文 献

1. Aasted B, Blixenkroner-Møller M, Larsen EB, Ohmann HB, Simesen RB, Uttenthal A: Reactivity of eleven anti-human leucocyte monoclonal antibodies with lymphocytes from several domestic animals. *Vet Immunol Immunopathol* **19**: 31 - 38, 1988
2. 安斎俊一, 徳嶺光男, 新里武則, 城間秀栄, 島袋泰俊, 比嘉次郎, 大城章信, 大城孝喜, 山城英文: と畜検査時にみられた豚白血病について。 *食品衛生研究* **34**: 511 - 519, 1984
3. 青野逸志, 北田範次郎, 林 正紘, 虎谷卓哉, 渡辺喜正, 門田耕一, 石野清之: 牛の濾胞様増殖を示すリンパ腫の免疫組織化学的所見。 *日獣会誌* **46**: 302 - 306, 1993
4. 青笹克之, 菅野祐幸: 悪性リンパ腫の疫学。 *病理と臨床* **12** (臨増): 15 - 18, 1994
5. Banks PM: Technical factors in the preparation and evaluation of lymph node biopsies. *In: Neoplastic Hematopathology*, ed. Knowles DM, pp. 367 - 384. Williams and Wilkins, Baltimore, 1992
6. Basso G, Cocito MG, Semenzato G, Pezzutto A, Zanesco L: Cytochemical study of thymocytes and T lymphocytes. *Br J Haematol* **44**: 577 - 582, 1980
7. van den Berg FM, Baas IO, Polak MM, Offerhaus GJA: Detection of p53 overexpression in routinely paraffin-embedded tissue of human carcinomas using a novel target unmasking fluid. *Am J Pathol* **142**: 381-385, 1993
8. Bostock DE, Owen LN: Porcine and ovine lymphosarcoma. A review. *J Natl Cancer Inst* **50**: 933 - 939, 1973
9. Campbell JG: The ultrastructure of a porcine hereditary lymphoma with some observations on cell cultures and enzyme cytochemistry. *J Pathol* **122**: 191 - 209, 1977

10. Cattoretti G, Piler S, Parravicini C, Becker MHG, Poggi S, Bifulco C, Key G, D'Amato L, Sabattini E, Feudale E, Reynolds F, Gerdes J, Rilke F: Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J Pathol* **171**: 83 - 98, 1993
11. Curran RC, Gregory J: Demonstration of immunoglobulin in cryostat and paraffin sections of human tonsil by immunofluorescence and immunoperoxidase techniques. Effects of processing on immunohistochemical performance of tissues and on the use of proteolytic enzymes to unmask antigens in sections. *J Clin Pathol* **31**: 974 - 983, 1978
12. Davey FR, Elghetany MT, Kurec AS: Immunophenotyping of hematologic neoplasms in paraffin-embedded tissue sections. *Am J Clin Pathol* **93 (Suppl 1)**: S17 - S26, 1990
13. Epenetos AA, Bobrow LG, Adams TE, Collins CM, Isaacson PG, Bodmer WF: A monoclonal antibody that detects HLA-D region antigen in routinely fixed, wax embedded sections of normal and neoplastic lymphoid tissues. *J Clin Pathol* **38**: 12 - 17, 1985
14. Epstein AL, Marder RJ, Winter JN, Fox RI: Two new monoclonal antibodies (LN-1, LN-2) reactive in B5 formalin-fixed, paraffin-embedded tissues with follicular center and mantle zone human B lymphocytes and derived tumours. *J Immunol* **133**: 1028 - 1036, 1984
15. Fenoglio-Preiser CM, Lantz PE, Listrom MB, Davis M, Rilke FO: Primary lymphomas of the gastrointestinal tract. *In: Gastrointestinal Pathology*, pp. 587 - 618. Raven Press, New York, 1989
16. Fenoglio-Preiser CM, Pascal RR, Perzin KH: Tumors of the intestine. *In: Atlas of Tumor Pathology*, 2nd series, fasc. 27. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, 1990
17. Ferrer L, Fondevila D, Rabanal R, Ramis A: Detection of T lymphocytes in canine tissue embedded in paraffin wax by means of antibody to CD3 antigen. *J Comp Pathol* **106**: 311 - 314, 1992

18. Fondevila D, Ferrer L, Ramos JA, Montane V, Ramis AJ:
Immunohistochemical localization of S-100 protein and lysozyme in canine lymph nodes and lymphomas. *J Vet Med Ser A* **36**: 71 - 77, 1989
19. Freedman AS, Munro JM, Morimoto C, McIntyre BW, Rhyhart K, Lee N, Nadler LM: Follicular non-Hodgkin's lymphoma cell adhesion to normal germinal centers and neoplastic follicles involves very late antigen-4 and vascular cell adhesion molecule-1. *Blood* **79**: 206 - 212, 1992
20. 藤田尚男：標本の採取と固定法。 *J Clin Electron Microsc* **21**: 31 - 35, 1989
21. 福原資郎：濾胞性リンパ腫, t(14; 18) 型リンパ腫, *bcl-2* 遺伝子。 *病理と臨床* **9** (臨増) : 104, 1991
22. Gillespie JJ: The ultrastructural diagnosis of diffuse large-cell ("histiocytic") lymphoma. Fine structural study of 30 cases. *Am J Surg Pathol* **2**: 9 - 20, 1978
23. Giorno R: A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction. *Diagn Immunol* **2**: 161 - 166, 1984
24. 後藤公吉, 本間 卓, 小林保裕, 佐藤 博, 金子正弘, 野村靖夫：
と畜にみられた造血組織腫瘍の酵素組織化学染色による診断。
日獣会誌 **40**: 711 - 715, 1987
25. Guesdon J-L, Ternynck T, Avrameas S: The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem* **27**: 1131 - 1139, 1979
26. Hammerberg C, Schurig GG: Characterization of monoclonal antibodies directed against swine leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol* **11**: 107-121, 1986
27. Hayashi M, Tsuda H, Okumura M, Sakata T, Ito N, Suchi T: Histopathological classification of malignant lymphomas in slaughtered swine. *J Comp Pathol* **98**: 11 - 21, 1988

28. Henderson DW, Papadimitriou JM, Coleman M: Lymphoid and plasmacytic tumours. *In: Ultrastructural Appearances of Tumours. Diagnosis and Classification of Human Neoplasia by Electron Microscopy*, 2nd ed., pp. 280 - 299. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1986
29. Henry K: Neoplastic disorders of lymphoreticular tissue. *In: Systemic Pathology*, eds. Henry K and Symmers WStC, 3rd ed., vol. 7, pp. 719 - 726. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1992
30. 平光 司, 宮本博泰: 電子顕微鏡, 医歯薬出版, 東京, 1977
31. 本告 匡, 須知泰山: びまん性リンパ腫混合型。リンパ節の病理, 小島 瑞・編, pp. 146 - 149, 分光堂, 東京, 1985
32. Hood L, Grant JA, Sox HC Jr: On the structure of normal light chains from mammals and birds. Evolutionary and genetic implications. *In: Developmental Aspects of Antibody Formation and Structure*, eds. Sterzl J and Riha I, vol. 1, pp. 283 - 309. Academic Press, New York, 1969
33. Hood L, Gray WR, Sanders BG, Dreyer WJ: Light chain evolution. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **32**: 133 - 146, 1967
34. Horák V, Hruban V, Dvorák P: The tissue distribution of Ia- and IgM-positive cells in adult and newborn miniature pigs. *Anat Histol Embryol* **18**: 157-164, 1989
35. Hsu S-M, Soban E: Color modification of diaminobenzidine (DAB) precipitation by metallic ions and its application for double immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* **30**: 1079 - 1082, 1982
36. 茨城県県北食肉衛生検査所: 豚の腸管 (No. 452), 病理研修会出題標本抄録集, 全国食肉衛生検査所協議会病理部会・編, 1985
37. 茨城県県西食肉衛生検査所: 豚の回腸及び腸間膜の腫瘍 (No. 490), 病理研修会出題標本抄録集, 全国食肉衛生検査所協議会病理部会・編, 1985

38. Inoue T, Iwata H, Matsumura K, Goto N: Acid α -naphthyl acetate esterase (ANAE) staining of porcine lymphocytes. *J Vet Med Sci* **50**: 1169 - 1176, 1988
39. Ioachim HL: Lymphoma, small cell plasmacytoid. *In: Lymph Node Pathology*, 2nd ed., pp. 358-365. JB Lippincott Company, Philadelphia, 1994
40. Isaacson PG, Wotherspoon AC, Diss T, Pan L: Follicular colonization in B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Am J Surg Pathol* **15**: 819 - 828, 1991
41. 石井源一郎, 張ヶ谷健一, 三方淳男: 濾胞樹状細胞と B 細胞の相互作用。臨床免疫 **26**: 1321 - 1326, 1994
42. 伊沢史隆: と畜場で発見された豚白血病について。平成 3 年度鳥取県食肉衛生検査所事業概要 44, 1992
43. 出雲俊之: 低悪性度 B 細胞性 MALT 型リンパ腫。病理と臨床 **12** (臨増) : 131 - 134, 1994
44. Jacobsen CN, Aasted B, Broe MK, Petersen JL: Reactivities of 20 anti-human monoclonal antibodies with leucocytes from ten different animal species. *Vet Immunol Immunopathol* **39**: 461 - 466, 1993
45. Jarrett WFH, Mackey LJ: Neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues. *Bull World Health Orgn* **50**: 21 - 34, 1974
46. Jones M, Cordell JL, Beyers AD, Tse AGD, Mason DY: Detection of T and B cells in many animal species using cross-reactive anti-peptide antibodies. *J Immunol* **150**: 5429 - 5435, 1993
47. Kadota K, Ishino S, Hashimoto N, Nakajima H: Malignant lymphomas of thymus origin in two sows. *J Vet Med Ser A* **37**: 592 - 600, 1990
48. Kadota K, Nakajima H: Histological progression of follicular centre cell lymphomas to immunoglobulin-producing tumours in two pigs. *J Comp Pathol* **99**: 145 - 158, 1988

49. Kadota K, Nemoto K, Mabara S, Shirai W: Three types of swine immunoglobulin-producing tumours: lymphoplasmacytic lymphosarcoma, immunoblastic lymphosarcoma and plasmacytoma. *J Comp Pathol* **96**: 541 - 550, 1986
50. Kadota K, Niibori S: A case of swine follicular lymphoma with intracytoplasmic immunoglobulin inclusions. *J Comp Pathol* **95**: 599 - 608, 1985
51. 笠井 潔, 菊池浩吉: リンパ腫研究の展望。病理と臨床 **12** (臨増): 413 - 418, 1994
52. 鹿嶋 傳, 沢谷廣志, 宮代 諱嗣, 大塚喜善, 野村靖夫: 豚の消化器型リンパ肉腫の病理学的所見。日獣会誌 **43**: 289 - 292, 1990
53. 河岡義裕, 内貴正治: 抗体の化学構造。獣医領域における免疫学, 伊沢久夫, 清水悠紀臣, 内貴正治, 見上 彪・編, pp. 201 - 241, 近代出版, 東京, 1981
54. Kawai K, Serizawa A, Hamana T, Tsutsumi Y: Heat-induced antigen retrieval of proliferating cell nuclear antigen and p53 protein in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. *Pathol Int* **44**: 759 - 764, 1994
55. 川島 徹, 喜納勝成, 石 和久: スライドに対する切片接着剤の検討, シランコーティングスライドの使用経験。病理と臨床 **8**: 413 - 415, 1990
56. 菊池昌弘, 難波紘二, 三方淳男, 毛利 昇, 森 茂郎, 若狭治毅: 新分類による悪性リンパ腫アトラス, 小島 瑞, 飯島宗一, 花岡正男, 須知泰山・編, 分光堂, 東京, 1981
57. 北 堅吉, 田中 泉: 遺伝子診断。病理と臨床 **12** (臨増): 66 - 72, 1994
58. Knowles DM, Chadburn A, Inghirami G: Immunophenotypic markers useful in the diagnosis and classification of hematopoietic neoplasms. *In: Neoplastic Hematopathology*, ed. Knowles DM, pp. 73 - 167. Williams and Wilkins, Baltimore, 1992

59. Korkolopoulou P, Cordell J, Jones M, Kaklamanis L, Tsenga A, Gatter KC, Mason DY: The expression of the B-cell marker mb-1 (CD79a) in Hodgkin's disease. *Histopathol* **24**: 511 - 515, 1994
60. 児玉 道：豚白血病。豚病学，第三版，熊谷哲夫，東 量三，柏崎 守，河田啓一郎，清水悠紀臣，波岡茂郎，吉本 正，渡辺昭三・編，pp. 321 - 324, 近代出版，東京，1987
61. 小島 瑞・編：リンパ節の病理，文光堂，東京，1985
62. Kyriazidou A, Brown PJ, Lucke VM: An immunohistochemical study of canine extramedullary plasma cell tumours. *J Comp Pathol* **100**: 259 - 266, 1989
63. Levinson DA, Hall PA, Blackshaw AJ: The gut-associated lymphoid tissue and its tumours. *Curr Top Pathol* **81**: 133 - 175, 1990
64. Levy R, Warnke R, Dorfman RF, Haimovich J: The monoclonality of human B-cell lymphomas. *J Exp Med* **145**: 1014 - 1028, 1977
65. Lewin HA, Calvert CC, Bernoco D: Cross-reactivity of a monoclonal antibody with bovine, equine, ovine, and porcine peripheral blood B lymphocytes. *Am J Vet Res* **46**: 785-788, 1985
66. Lewin KJ, Ranchod M, Dorfman RF: Lymphomas of the gastrointestinal tract. A study of 117 cases presenting with gastrointestinal disease. *Cancer* **42**: 693 - 707, 1978
67. Lunney JK, Osborne BA, Sharrow SO, Devaux C, Pierres M, Sachs DH: Sharing of Ia antigens between species. IV. Interspecies cross-reactivity of monoclonal antibodies directed against polymorphic mouse Ia determinants. *J Immunol* **130**: 2786-2793, 1983
68. Lunney JK: Characterization of swine leukocyte differentiation antigens. *Immunol Today* **14**: 147-148, 1993
69. Moshirvan U, Alarbiom F, Fagan C: Detection of porcine MHC class II antigens in different immunological assays. *J Vet Med Ser B* **38**: 321-324, 1997

69. Lunney JK, Pescovitz MD: Differentiation antigens of swine lymphoid tissues. *In: Differentiation antigens in lymphohemopoietic tissues, Immunology, Series 5, Vol. 38*, eds. Miyasaka M and Trinkka Z, pp. 421 - 454. Marcel Dekker, New York, 1988
70. Lunney JK, Walker K, Goldman T: Analyses of anti-human CD monoclonal antibodies for cross reactions with swine cell antigens. *Vet Immunol Immunopathol* **43**: 207 - 210, 1994
71. Lunney JK, Walker K, Goldman T, Aasted B, Bianchi A, Binns R, Licence S, Bischof R, Brandon M, Blecha F, Kielian TL, McVey DS, Chu RM, Carr M, Howard C, Sopp P, Davis W, Dvorak P, Dominguez J, Canals A, Vizcaino JMS, Kim YB, Laude H, Mackay CR, Magnusson U, McCullough K, Misfeldt M, Murtaugh M, Molitor T, Choi C, Pabst R, Parkhouse RM, Denham S, Yang H, Pescovitz M, Pospisil R, Tlaskalova H, Saalmueller A, Weiland E, Salmon H, Sachs D, Arn S, Shimizu M, Stokes C, Stevens K, Valpotic I, Zuckermann F, Husmann R: Overview of the first international workshop to define swine leukocyte cluster of differentiation (CD) antigens. *Vet Immunol Immunopathol* **43**: 193 - 206, 1994
72. 真原 進, 中島弘美, 橋本夏美, 門田耕一: 豚胚中心由来リンパ腫の形態学的特徴。日獣会誌 **41**: 355 - 357, 1988
73. Mackey LJ, Jarrett WFH: Pathogenesis of lymphoid neoplasia in cats and its relationship to immunologic cell pathways. I. Morphologic aspects. *J Natl Cancer Inst* **49**: 853 - 865, 1972
74. Maddox PH, Jenkins D: 3-Aminopropyltriethoxysilane (APES): a new advance in section adhesion. *J Clin Pathol* **40**: 1256 - 1260, 1987
75. Maeda K, Matsuda M, Narabayashi M, Imai Y; Follicular dendritic cells (FDC) in B-cell lymphoma. Their distribution, morphology, phenotypes and function. *Dendritic Cells* **2**: 13 - 20, 1993
76. Magnusson U, Åkerblom L, Fossum C: Detection of porcine MHC class II antigens in different immunoassays. *J Vet Med Ser B* **38**: 321-328, 1991

77. Manconi R, Poletti A, Volpe R, Sulfard S, Carbone A: Dendritic reticulum cell pattern as a microenvironmental indicator for a distinct origin of lymphoma of follicular mantle cells. *Br J Haematol* **68**: 213 - 218, 1988
78. Mann RB, Jaffe ES, Braylan RC, Nanba K, Frank MM, Ziegler JL, Berard CW: Non-endemic Burkitt's lymphoma. A B-cell tumor related to germinal centers. *N Engl J Med* **295**: 685 - 691, 1976
79. Marder RJ, Variakojis D, Silver J, Epstein AL: Immunohistochemical analysis of human lymphomas with monoclonal antibodies to B cell and Ia antigens reactive in paraffin sections. *Lab Invest* **52**: 497 - 504, 1985
80. Marcato PS: Swine lymphoid and myeloid neoplasms in Italy. *Vet Res Comm* **11**: 325 - 337, 1987
81. Mason DY, Biberfeld P: Technical aspects of lymphoma immunohistology. *J Histochem Cytochem* **28**: 731 - 745, 1980
82. Mason DY, Cordell JL, Brown M, Pallensen G, Ralfkiaer E, Rothbard J, Crumpton M, Gatter KC: Detection of T cells in paraffin wax embedded tissue using antibodies against a peptide sequence from the CD3 antigen. *J Clin Pathol* **42**: 1194 - 1200, 1989
83. Mason DY, Cordell JL, Tse AGD, van Dongen JJM, van Noesel CJM, Micklem K, Pulford KAF, Valensi F, Comans-Bitter WM, Borst J, Gatter KC: The IgM-associated protein mb-1 as a marker of normal and neoplastic B cells. *J Immunol* **147**: 2474 - 2482, 1991
84. Mason DY, van Noesel CJM, Cordell JL, Comans-Bitter WM, Micklem K, Tse AGD, van Lier RAW, van Dongen JJM: The B29 and mb-1 polypeptides are differentially expressed during human B cell differentiation. *Eur J Immunol* **22**: 2753 - 2756, 1992
85. Merz H, Rickers O, Schrimel S, Orscheschek K, Feller AC: Constant detection of surface and cytoplasmic immunoglobulin heavy and light chain expression in formalin-fixed and paraffin-embedded material. *J Pathol* **170**: 257 - 264, 1993

86. Migaki G: Hematopoietic neoplasms of slaughter animals.
Natl Cancer Inst Monogr **32**: 121 - 151, 1969
87. Mikata A, Harigaya K, Suzuki H, Ohishi T, Tsutsumi Y, Suzuki S, Watanabe S, Kageyama K: Enzyme histochemistry of non-Hodgkin's lymphomas.
Pathol Int **29**: 739 - 753, 1979
88. 南 明博, 谷本忠司, 岩井延雄, 井上浩和, 大原幸生, 安倍淳介, 上岡英和: ブタの消化器型リンパ肉腫の病理学的検索。
日獣会誌 **44**: 856, 1991
89. 宮沢七郎, 根本典子: ダイヤモンドナイフの取扱い法。
細胞 **21**: 312 - 315, 1989
90. 水平敏知: 医学・生物学領域の電子顕微鏡操作マニュアル, 講談社, 東京, 1986
91. Mori N, Oka K, Kojima M: DRC antigen expression in B-cell lymphomas.
Am J Clin Pathol **89**: 488 - 492, 1988
92. 森 茂郎: B細胞性リンパ腫。病理と臨床 **12** (臨増): 117 - 126, 1994
93. 森 茂郎: 消化管の悪性リンパ腫。病理と臨床 **4**: 480 - 485, 1986
94. Moulton JE, Harvey JW: Tumors of the lymphoid and hematopoietic tissues.
In: Tumors in Domestic Animals, ed. Moulton JE, 3rd ed., pp. 231 - 307.
University of California Press, Berkeley, 1990
95. 毛利 昇, 齊藤生朗: 消化管のリンパ腫。
病理と臨床 **12** (臨増): 209 - 213, 1994
96. Musonda MM: Pathological study on swine lymphosarcoma. Morphology, lineage and immunophenotype of tumour cells and malignancy grade.
Bull Azabu Univ Vet Med **14**: 17 - 29, 1993
97. 長嶋克典: 豚の小腸の腫瘤。臨床獣医 **9**: 97, 1991

98. 内藤文夫：豚リンパ性白血病（消化器型）の4例。
昭和59年度栃木県食肉衛生検査所事業年報 89 - 90, 1985
99. 中島弘美, 橋本夏美, 石野清之, 門田耕一：豚のリンパ腫16例の超微形態学的特徴。日獣会誌 **43**: 369 - 374, 1990
100. Nakajima H, Mabara S, Ishino S, Kadota K: Malignant lymphomas of follicular centre cell origin in 14 pigs. J Vet Med Ser A **36**: 621 - 630, 1989
101. 中島弘美, 中内 潔, 俵 嘉一, 吉野鎮夫：
豚のリンパ腫の発生状況と肉眼的腫瘍病変の検討。
平成4年度茨城県食肉衛生検査所事業概要 90 - 94, 1993
102. 難波紘二, 青木 潤, 日野理彦：リンパ節性リンパ腫と節外性リンパ腫の違い。病理と臨床 **12** (臨増) : 170 - 174, 1994
103. 難波紘二, 佐々木なおみ：リンパ節。病理と臨床 **1**: 250 - 263, 1983
104. Nanba K, Jaffe ES, Braylan RC, Soban EJ, Berard CW: Alkaline phosphatase-positive malignant lymphoma. A subtype of B-cell lymphomas.
Am J Clin Pathol **68**: 535 - 542, 1977
105. Natali PG, de Martino C, Quaranta V, Nicotra MR, Frezza F, Pellegrino MA, Ferrone S: Expression of Ia-like antigens in normal human nonlymphoid tissues. Transplantation **31**: 75 - 78, 1981
106. National Cancer Institute: The non-Hodgkin's lymphoma pathologic classification project. Summary and description of a Working Formulation for clinical usage. Cancer **49**: 2112 - 2135, 1982
107. 野村靖夫：白血病。食肉衛生検査マニュアル, 厚生省環境衛生局乳肉衛生課・編, pp. 257 - 275, 中央法規出版, 東京, 1993
108. 野村靖夫：腫瘍。食肉衛生検査マニュアル, 厚生省環境衛生局乳肉衛生課・編, pp. 379 - 390, 中央法規出版, 東京, 1993

109. 沖縄県食肉衛生検査所：ブタ白血病の全国の発生状況について。
食品衛生研究 **35**: 91 - 98, 1985
110. Petrasch S, Brittinger G, Wacker HH, Schmitz J, Kosco-Vilbois M:
Follicular dendritic cells in non-Hodgkin's lymphomas.
Leuk Lymphoma **15**: 33 - 43, 1994
111. Petrasch S, Kosco M, Perez-Alvarez C, Schmitz J, Brittinger G: Proliferation of
non-Hodgkin-lymphoma lymphocytes *in vitro* is dependent upon follicular
dendritic cell interactions. Br J Haematol **80**: 21 - 26, 1992
112. Polliack A, Leizerowitz R: Cytochemistry and ultrastructure in lymphoma and
leukemia: utility in the diagnosis of different leukemias and the recognition of
subtypes of lymphoproliferative disorders. Hematol Oncol **1**: 101 - 126, 1983
113. Poppema S, Elema JD, Halie MR: Alkaline phosphatase positive lymphomas:
a morphologic, immunologic, and enzyme histochemical study.
Cancer **47**: 1303 - 1312, 1981
114. Said JW, Shintaku IP, Pinkus GS: Immunohistochemical staining for terminal
deoxynucleotidyl transferase (TDT). Am J Clin Pathol **89**: 649 - 652, 1988
115. Sandusky GE, Carlton WW, Wightman KA: Diagnostic immunohistochemistry
of canine round cell tumors. Vet Pathol **24**: 495 - 499, 1987
116. Sandusky GE, Horton PJ, Wightman KA: Use of monoclonal antibodies to
human lymphocytes to identify lymphocyte subsets in lymph nodes of the
Rhesus monkey and the dog. J Med Primatol **15**: 441 - 451, 1986
117. 佐藤雄一, 古屋周一郎, 向井 清: 悪性リンパ腫の免疫組織診断。
病理と臨床 **7**: 854 - 862, 1989
118. Scoazec J-Y, Berger F, Magaud J-P, Brochier J, Coiffier B, Bryon P-A:
The dendritic reticulum cell pattern in B cell lymphomas of the small cleaved,
mixed, and large cell types. An immunohistochemical study of 48 cases.
Hum Pathol **20**: 124 - 131, 1989

119. Segal GH, Stoler MH, Fishleder AJ, Tubbs RR: Reliable and cost-effective paraffin section immunohistology of lymphoproliferative disorders. *Am J Surg Pathol* **15**: 1034 - 1041, 1991
120. 清水俊夫：豚Tリンパ球のマーカーとしての酸性フォスファターゼ。日獣会誌 **41**: 814 - 817, 1988
121. 新木 茂, 山口高弘, 星野忠彦：イムノグロブリン抗体による豚悪性リンパ腫の免疫組織学的考察。平成2年度日本獣医公衆衛生学会年次大会抄録 320, 1991
122. 代田欣二, 宇根ユミ：検査材料の採取と検査依頼に際しての注意点。獣畜新報 **776**: 163 - 170, 1988
123. Shi S-R, Imam SA, Young L, Cote RJ, Taylor CR: Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem* **43**: 193 - 201, 1995
124. Shi S-R, Key ME, Kalra KL: Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* **39**: 741 - 748, 1991
125. Smith MEF, Holgate CS, Williamson JMS, Grigor I, Quirke P, Bird CC: Major histocompatibility complex class II antigen expression in B and T cell Non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Pathol* **40**: 34-41, 1987
126. Spier CM, Grogan TM, Lippman SM, Slymen DJ, Rybski JA, Miller TP: The aberrancy of immunophenotype and immunoglobulin status as indicators of prognosis in B cell diffuse large cell lymphoma. *Am J Pathol* **133**: 118 - 126, 1988
127. Squire RA: Feline lymphoma. A comparison with the Burkitt tumor of children. *Cancer* **19**: 447 - 453, 1966

128. Staal SP, Ambinder R, Beschorner WE, Hayward GS, Man R: A survey of Epstein-Barr virus DNA in lymphoid tissue. Frequent detection in Hodgkin's disease. *Am J Clin Pathol* **91**: 1 - 5, 1989
129. Strauchen JA, Mandeli JP: Immunoglobulin expression in B-cell lymphoma. Immunohistochemical study of 345 cases. *Am J Clin Pathol* **95**: 692 - 695, 1991
130. 須知泰山, 本告 匡: びまん性リンパ腫大細胞型。リンパ節の病理, 小島 瑞・編, pp. 150 - 153, 分光堂, 東京, 1985
131. 須知泰山, 本告 匡, 長谷川かをり, 尾山 淳: 節外性リンパ腫の病理学的特徴。病理と臨床 **4**: 475 - 479, 1986
132. Suurmeijer AJH, Boon ME: Optimizing keratin and vimentin retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue with the use of heat and metal salts. *Appl Immunohistochem* **1**: 143-148, 1993
133. 庄司金弥, 大谷勝実, 矢作一枝: 豚の胃腸型白血病の1例。日獣会誌 **48**: 223, 1995
134. 高橋 潔: B細胞腫瘍の病理。B細胞性腫瘍, 高月 清・編, 67 - 116, 西村書店, 新潟, 1991
135. Takahashi K, Isobe T, Ohtsuki Y, Sonobe H, Takeda I, Akagi T: Immunohistochemical localization and distribution of S-100 proteins in the human lymphoreticular system. *Am J Pathol* **116**: 497 - 503, 1984
136. 田中 純, 橋端 宏, 立木紀行: 腹腔内に播種性にみられた豚の白血病。平成6年度十和田食肉衛生検査所事業概要 63, 1995
137. 谷本忠司, 南 明博, 岩井延雄, 井上浩和, 大原幸生, 安倍淳介, 上岡英和: 豚の腸管型悪性リンパ腫の細胞学的特徴。第1回全国食肉衛生検査所協議会中国・四国ブロック会議及び技術研修会抄録 23 - 24, 1991

138. 谷本忠司, 南 明博, 岩井延雄, 野島敏弘, 井上浩和, 大原幸生, 長尾正紘, 安倍淳介, 上岡英和: 豚の消化器型悪性リンパ腫の細胞学的特徴。第 27 回全国食肉衛生検査所協議会全国大会抄録 116 - 119, 1991
139. 谷本忠司, 南 明博, 矢野昭起, 大拙祐治: ブタの回腸原発悪性リンパ腫。10 例の病理学的検索。第 68 回麻布獣医学会講演要旨集 12 - 13, 1994
140. Tanimoto T, Minami A, Yano S, Ohtsuki Y: Ileal lymphoma in swine. *Vet Pathol* **31**: 629 - 636, 1994
141. Tanimoto T, Ohtsuki Y: An evaluation of antibodies reactive to swine lymphocytes in formalin-fixed, paraffin-embedded, and antigen-unmasked tissue sections. *Vet Pathol* **31**: 596, 1994
142. Tanimoto T, Ohtsuki Y: Evaluation of antibodies reactive with porcine lymphocytes and lymphoma cells in formalin-fixed, paraffin-embedded, antigen-retrieved tissue sections. *Am J Vet Res* **57**: 853 - 859, 1996
143. 谷本忠司, 山崎慎一郎, 小野英二, 矢野祐一, 岡本周一, 福永和俊, 末永謙吉: 日常の病理組織検査に適したホルマリン固定法の検討。日獣医師会誌 **46**: 799, 1993
144. 谷本忠司, 山崎慎一郎, 小野英二, 矢野祐一, 岡本周一, 福永和俊, 末永謙吉: ホルマリン固定液への硫酸亜鉛添加の効果。平成 5 年度日本獣医公衆衛生学会年次大会抄録 409, 1994
145. Taylor CR, Shi S-R, Chaiwun B, Young L, Imam SA, Cote RJ: Strategies for improving the immunohistochemical staining of various intranuclear prognostic markers in formalin-paraffin sections: androgen receptor, estrogen receptor, progesterone receptor, p53 protein, proliferating cell nuclear antigen, and Ki-67 antigen revealed by antigen retrieval techniques. *Hum Pathol* **25**: 263-270, 1994
146. 巽 英二: ウイルス (EBV, HTLV-1)。病理と臨床 **12** (臨増): 27 - 33, 1994

147. Theilen GH, Madewell BR, Gardner MB: Hematopoietic neoplasms, sarcomas and related conditions. *In: Veterinary Cancer Medicine*, eds. Theilen GH and Madewell BR, 2nd ed., pp. 345 - 464. Lea and Febiger, Philadelphia, 1987
148. 東京都芝浦食肉衛生検査所：豚の内蔵漿膜面等に見られた小豆大の腫瘤 (No. 498)。病理研修会出題標本抄録集，全国食肉衛生検査所協議会病理部会・編，1985
149. 栃木県食肉衛生検査所：豚の腸管 (No. 453)。病理研修会出題標本抄録集，全国食肉衛生検査所協議会病理部会・編，1985
150. 塚本 洋：豚の小腸の腫瘤。臨床獣医 **8**: 95, 1990
151. Umemura S, Kawai K, Osamura RY, Tsutsumi Y: Antigen retrieval for bcl-2 protein in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. *Pathol Int* **45**: 103-107, 1995
152. Valli VEO: Lymphoproliferative diseases. *In: Pathology of Domestic Animals*, eds. Jubb KVF, Kennedy PC, and Palmer N, 4th ed., vol. 3, pp. 138 - 156. Academic Press, New York, 1993
153. 若狭治毅：びまん性リンパ腫バーキット型。リンパ節の病理，小島 瑞・編，pp. 160 - 163, 分光堂，東京，1985
154. 若狭治毅：Bリンパ腫性腫瘍の組織分類。組織発生と細胞像。病理と臨床 **7**: 832 - 839, 1989
155. Warnke RA, Weiss LM, Chan JKC, Cleary ML, Dorfman RF: Tumors of the lymph nodes and spleen. *In: Atlas of Tumor Pathology*, 3rd series, fasc. 14. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, 1995
156. 渡辺慶一，中根一穂，長村義之，名倉 宏，堤 寛，多田伸彦，小松遵至，和泉伸一，吉村眞一，伊藤丈男：酵素抗体法，渡辺慶一，中根一穂・編，第3版，学際企画，東京，1992
157. 矢田純一：リンパ球の発生と分化。病理と臨床 **12** (臨増) : 2 - 8, 1994

158. 山元紀子, 徳永正義: 非ホジキンリンパ腫と EB ウイルス。
病理と臨床 **13**: 1079 - 1085, 1995