

氏名(本籍)	谷 本 忠 司 (高知県)
学位の種類	獣医学博士
学位記番号	乙第358号
学位授与の番号	学位規則第3号第2項該当
学位論文の要件	豚の回腸原発リンパ腫の病理学的研究
論文審査委員	(主査) 野 村 靖 夫 (副査) 高 橋 令 治 小林 好 作 代 田 欣 二

## 論 文 内 容 の 要 旨

豚の好発腫瘍の一つであるリンパ腫は、大部分が多中心型、一部が胸腺型の解剖学的病型をとり、消化器型や皮膚型の病型は極めて稀とされているが、最近、回腸や腸間膜リンパ節に原発した消化器型リンパ腫とみなしうる症例が相次いで報告され、著者も、肉用豚に見られた回腸原発リンパ腫を12例見いだした。豚リンパ腫では、パラフィン切片に応用可能な抗リンパ球抗体がないために、腫瘍細胞の起源や特徴が十分に明らかにされていない。そこで、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、「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。

### 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

組織や血液中のリンパ球subsetを同定することは、ヒトと同様に家畜での正常および異常な免疫反応の解析、リンパ球増殖性疾患の診断のために重要である。単クローン性抗体を使った免疫組織化学的検索は、これらの研究手法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が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うち、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、脱パラフィン切片を抗原賦活処理した後、免疫染色して検討し、また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（抗ヒト抗体は25種類、抗豚抗体は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 $\kappa$ 鎖抗体（Dako社）、polyclonal抗ヒト $\lambda$ 鎖抗体（Dako社）、CDw75 (clone LN-1)、CD79 $\alpha$  (clone HM57)、CD79 $\beta$  (clone B29/123)、HLA-DR (clone TAL 1B5)

およびpolyclonal CD3 (Dako社)の合計7種類のヒト抗体が、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、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が最も良い結果を得た。

#### 結論：

これら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。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り、凍結切片にしか反応しない抗体や抗原因来の動物種しか反応しない抗体でもパラフィン切片に应用可能である。

## 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

豚では、消化器型リンパ腫は極めて稀とされているが、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。しかし、病理学的特徴、特に腫瘍細胞の起源や特徴は十分に明らかにされていない。著者も、1980～1994年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パーキットリンパ腫に似ているとされ、豚のリンパ腫の研究の中には、ヒトのパーキットリンパ腫との類似性を指摘したものがある。さらに、ヒトの非ホジキン型リンパ腫には、ヒトのパ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、豚の回腸原発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病理学的検索を行った。

#### 材料と方法：

12例の豚の回腸原発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並びにヒトのパーキットリンパ腫と比較し、特徴付けた。また、免疫組織化学的手法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原発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、ヒトのパーキットリンパ腫とは類似性がなく、the lymphoma-leukemia study group of Japan (LSG) 分類により、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、多数の星空像を示す組織球が見られた。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 $\alpha$ -

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- $\lambda$ 型7例, IgG- $\lambda$ 型1例, IgG- $\kappa$ 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 $\alpha$ とCD79 $\beta$ に陽性であった。リンパ濾胞の侵襲部では、S-100蛋白 $\beta$ 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、筋層に侵潤し、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形態学的特徴を持ち、腫瘍細胞の免疫学的表現型としてIgM- $\lambda$ 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。

### 論文審査の結果の要旨

リンパ腫は、ヒトと同様に種々の動物に発生し、犬と豚を除けばウイルス性腫瘍としての性格が明らかにされているものが多い。豚においてもリンパ腫は好発腫瘍の一つであるが、病理学的には未解明の部分が残されている。

欧米では、豚のリンパ腫の大部分は多中心型と胸腺型とされていたが、最近、日本で消化器型リンパ腫が相次いで報告された。著者はこれまで断片的にしか記載されていなかったこの病型の病理学的特徴を詳細に検索・記述した。

本論文は2つの部分からなっている。著者は第1部で方法論的問題の解決を図り、第2部で病理形態学的特徴を詳細に解明した。

論文の概要は以下の通りである。

#### 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」

リンパ球のsubsetを同定することは免疫反応の解析、リンパ球増殖性疾患の診断のために重要であるが、現在までに作成された豚のリンパ球に対する単クローン性抗体は、新鮮な細胞浮遊液か、凍結切片にしか応用出来なかった。ヒトあるいは豚のリンパ球に反応する抗体でホルマリン固定・パラフィン切片中の豚リンパ球に良好に反応する抗体を見いだすべく、脱パラフィン切片を抗原賦活処理後免疫染色して検討し、最適な抗原賦活処理法も検討した。

その結果、33種類の抗体の内、抗ヒト $\kappa$ 鎖抗体 (Dako社)、polyclonal抗ヒト $\lambda$ 鎖抗体 (Dako社)、CDw75 (clone LN-1)、CD79 $\alpha$  (clone HM57)、CD79 $\beta$  (clone B291123)、HLA-DR (clone TAL. 1B5) およびpolyclonal CD3 (Dako社) の合計7種類の抗体がホルマリン固定・パラフィン切片で豚組織中のリンパ球に良好な反応性を示し、陽性部位も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結果、抗ヒト軽鎖抗体には0.1% trypsinによる酵素処理、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が最も良い結果を示した。

このように、これら7種類の抗体はホルマリン固定・パラフィン切片で豚組織中のリンパ球subsetの同定、鑑別に役立つこと、脱パラフィン切片に適切な抗原賦活処理を施すことにより、凍結切片にしか反応しない抗体や抗原由来の動物種にしか反応しない抗体でも豚のパラフィン切片に应用可能であることを明らかにした。

## 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」

著者は1980～1994年に高知県で発見された26例の豚のリンパ腫の中に、回腸を侵す12例のリンパ腫を見出し、その病理学的特徴、特に検索の不十分な腫瘍細胞の特徴を明らかにするために詳細な病理学的検索を行った。

高知県で発見された豚のリンパ腫は、解剖学的病型から見ると腸管型(12例、46%)が、多中心型(10例、38%)より多く、回腸原発リンパ腫の発生率は、10万頭あたり0.8頭であった。

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、早期に腸間膜リンパ節に転移してリンパ濾胞を侵襲し、瀰漫性に増殖していた。

豚の回腸リンパ腫は、細胞学的にヒトのパーキットリンパ腫とは類似性がなく、LSG分類により、11例が瀰漫性大細胞非切れ込み型(DLNC型)・胚中心細胞性に、1例が瀰漫性混合型(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)を含んでいた。

2つの細胞型の腫瘍組織には、多数の星空像を示す組織球が見られた。

回腸リンパ腫の腫瘍細胞は、しばしば回腸の筋層に列をなして浸潤していた(Indian file infiltration)。

2例においては、特徴的な腹腔漿膜への転移が見られ、白血化していた。

豚の回腸原発リンパ腫細胞には、alkaline phosphataseの細胞膜での陽性像、acid phosphataseおよび $\alpha$ -naphthyl butyrate esteraseの細胞質での瀰漫性陽性像が観察された。

9例の腫瘍細胞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- $\lambda$ 型7例、IgG- $\lambda$ 型1例、IgG- $\kappa$ 型1例)。10例の腫瘍細胞が、ヒトの汎B細胞マーカーであるCD79 $\alpha$ とCD79 $\beta$ に陽性であった。

リンパ腫の濾胞侵襲部では、S-100蛋白 $\beta$ 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が多数みられた。いずれの症例にもEBV抗原は検出されなかった。

上記の所見から、豚の回腸リンパ腫はパイエル板に孤立性に発生し、早期に腸間膜リンパ節転移を示すこと、リンパ濾胞を侵襲し、瀰漫性に増殖する、筋層に列をなして浸潤する(Indian file infiltration)、腹腔漿膜に転移するなどの病理形態学的特徴を持ち、腫瘍細胞の免疫学的表現型としてはIgM- $\lambda$ 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と結論した。

著者は、まず第1部で獣医病理学に应用されている方法論を補い、ついで第2部で自家症例に基づいて、今まで十分に解明されていなかった豚の回腸原発リンパ腫の形態学的並びに免疫組織化学的特徴を明らかにした。

本論文では必ずしも強調されていないが、腫瘍細胞のリンパ濾胞への転移と濾胞性増殖像の鑑別に濾胞

樹状細胞の網目状構造の観察を取り上げたのも動物のリンパ腫の形態学的観察では、新しい試みである。

以上のごとく本論文は、看過されがちな食肉生産用動物の腫瘍を取り上げて、わが国の関係者によって存在が明らかにされた病型「豚の消化器型リンパ腫」の主体をなすとみられる回腸原発リンパ腫の全体像を明かにし、獣医病理学の持つ比較病理学的側面に新しい知見をつけ加えたもので、博士（獣医学）の学位を授与するに相応しい業績であると認める。