

| | |
|---------|---|
| 氏名(本籍) | 谷津壽郎(宮城県) |
| 学位の種類 | 博士(獣医学) |
| 学位記番号 | 乙第411号 |
| 学位授与年月日 | 平成19年3月13日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第3条第3項該当 |
| 学位論文題名 | 豚リンパ腫の染色体異常に関する研究 |
| 論文審査委員 | (主査) 野村靖夫 (副査) 山田隆紹 村上賢 福岡秀雄 押田敏雄 |

論文内容の要旨

【背景と目的】

豚リンパ腫は、病理解剖学的な病変分布、病理組織・細胞学的特徴に基づく分類がなされてきたが、免疫学的手法による細胞質内免疫グロブリンや表面抗原の検出および超微形態学的所見など腫瘍細胞の由来を明らかにする手法が開発され、従来の分類に検討が加えられてきた。近年は、動物の造血器腫瘍についても免疫組織化学的解析をはじめとするさまざまな所見を総合するヒトの新WHO分類と同様の分類法が提案されている。しかし、豚リンパ腫症例の血液検査所見および染色体異常に関する報告はない。

本研究は「豚染色体の簡易な検査法」を確立し、染色体異常の核型進化を基礎にして、豚リンパ腫の病態を解明することを目的とする。

【材料と方法】

1976～2005年に宮城県内のと畜場で発見され、病理学的にリンパ腫と診断された症例について染色体検索を実施し、50例の染色体標本を得て、それらを詳細に分析した。解剖学的病型はJarret and Mackeyの分類に従い、組織・細胞学的病型はLSG分類に従ってとりまとめた。染色体標本の作製は、末梢血と腫瘍化したリンパ節および腫瘍結節などの細胞を材料とし、培養法と本研究で開発した直接法に拠った。核型分析は、PARIS conferenceに準拠した。

【結果】

1. 豚染色体の直接検査法（直接法）の開発

と殺解体後2時間以内に血液を採取し、冷蔵庫内で保存し、12時間以内に染色体標本を作製すれば、G、C分染法でも解析することが出来た。

2. 血液を材料とする染色体検査で認められた染色体異常

(1) 対照群の生体血の染色体数正常率は、PHA無添加培養法【PHA (-)】84.2%、PHA添加培養法【PHA (+)】73.2%、直接法96.3%で、と体残血の成績もほぼ同率であった。

(2) 豚リンパ腫の罹患例の血液では、PHA (-) の約7割、PHA (+) の約6割および直接法の約4割で、染色体数の異常細胞の存在が明らかになった。この染色体異常の頻度差は、正常染色体の得られる比率からみて「培養」の影響と思われた。

(3) 血液の培養法では、多中心型8例、消化器型4例、胸腺型1例で染色体異常が認められた。

イ. 多中心型8例の染色体による分類は、非クローン性異常2例、クローン性異常6例であった。クローン性異常は、欠失型2例、付加型1例、欠失型・付加型、付加型・転座型、転座型・欠失型それぞれ1例に細分類された。

ロ. 消化器型4例は、非クローン性異常1例、クローン性異常3例であった。クローン性異常は、付加型2例、欠失型・付加型1例に細分類された。

ハ. 胸腺型1例は非クローン性異常であった。

(4) 血液の直接法では、多中心型8例、消化器型1例、その他1例で染色体異常が認められた。

イ. 多中心型8例の染色体による分類は、非クローン性異常3例、クローン性異常5例であった。クローン性異常は、付加型2例、転座型2例、付加型と部分的欠失型の単独または重複1例に細分類された。

ロ. 消化器型1例とその他1例は非クローン性異常であった。

3. 腫瘍細胞を材料とする染色体検査で認められた染色体異常

(1) 多中心型16例の染色体は、正常核型2例、非クローン性異常3例、クローン性異常11例であった。クローン性異常の細分類は、欠失型1例、付加型4例、転座型3例、部分的付加型1例、部分的欠失型1例、転座・倍数型1例であった。

(2) 消化器型11例の染色体による分類は、正常3例、非クローン性異常5例、クローン性異常3例であった。クローン性異常の細分類は、欠失型1例、欠失・付加型1例、倍数型1例であった。

(3) 胸腺型3例の染色体による分類は、正常核型1例、クローン性異常2例であった。クローン性異常の細分類は、付加型と部分的欠失型重複1例、転座・部分的欠失型1例であった。

(4) その他4例は、正常核型2例、非クローン性異常1例、クローン性異常1例であった。クローン性異常の1例は転座型であった。

4. 病型と染色体異常の関係

解剖学的病型、あるいは組織・細胞学的病型に特徴的な染色体異常は認められなかった。

【考察】

病理学的に豚リンパ腫と診断された約8割の症例の腫瘍細胞には、染色体不分離、紡錘体抑圧、染色体接着、染色体過形成などによって生じた数の異常と形の異常があった。組織・血液でみられた染色体異常細胞は、常に正常細胞と混在し、その比率は症例によってバラツキがあった。すなわち、染色体所見で分類された「正常核型」から「非クローン性異常」までは、染色体異常細胞の割合が少なく、しかも単独異常に止まっており、染色体所見のみで腫瘍化していると判断することは出来なかった。一方、「クローン性異常」では腫瘍化した細胞が爆発的に分裂増殖し、単独異常・重複異常を起こして核型進化していた。これらの変異には時間差があり、発病初期は緩やかに、腫瘍顕在化後は極短時間に激しく変異しながら進行するものと考えられ、病期や病勢と良く一致するように思われた。また、血液の染色体検査では、組織の腫瘍細胞で染色体異常が確認された症例の約7割で同じ異常細胞が確認された。しかし、肉眼病変が軽度な症例の血液ではこのような異常細胞は認められず、末期に病変が重度になって腫瘍細胞が血液に流入するものと考えられた。

【結語】

豚染色体の直接検査法を開発した。これと培養法によって得られた染色体異常の型別分類と血液検査所見および病理解剖学的病型と病理組織学的分類を重ね合わせることによって、豚リンパ腫には急性期、緩慢期、急性転化期があるものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

リンパ腫はヒトでも各種の動物でもよく見られる腫瘍で、養豚産業が発達しきちんとした食肉衛生検査がなされている先進国では10万頭当たり1～2頭の割合で発見される。豚のリンパ腫が生体で発見されることは稀で、病理形態学的にはすでにかなり詳細な記述がなされているが、血液学的所見や病期・病勢についての記載は乏しく、多数例の染色体を分析した報告は見当たらない。

本論文は、と殺解体後2時間以内に検体を採取し、その後12時間以内に処理すれば解析可能な染色体像が得られるという食肉衛生検査の場でも実施可能な豚染色体の直接検査法（以下「直接法」という。；図1）の開発を基に宮城県下で発見された合計138例の豚リンパ腫を観察し、その中、染色体標本が得られた50例について詳細に分析・記述したものである。著者は、自ら開発した検査法を駆使して多数例の染色体標本を観察、「染色体の変化」に着目して精査し、腫瘍細胞の染色体に核型進化を認め、病理学的分類と重ね合わせ、病期や病勢との関連を考察した。

直接法の開発以外の本論文の内容を要約すれば以下の通りである。

血液細胞の染色体を検査した結果：

(1) 対照群の生体血の染色体数正常率は、PHA無添加培養法（PHA（-））84.2%、PHA添加培養法（PHA（+））73.2%、直接法96.3%で、と体残血の成績もほぼ同率であった。

(2) 豚リンパ腫のPHA（-）の約7割、PHA（+）の約6割および直接法の約4割で、染色体数異常細胞の存在が明らかになった。しかし、染色体数正常率は、血液のPHA（+）PHA（-）がともに約60%、直接法は約80%で、培養による影響が明らかであった。

(3) 血液の培養法では、多中心型8例、消化器型4例、胸腺型1例で染色体異常が認められた。多中心型8例の染色体による分類は、非クローン性異常2例、クローン性異常6例であった。クローン性異常は、欠失型2例、付加型1例、欠失型・付加型、付加型・転座型、転座型・欠失型それぞれ1例に細分類された。消化器型4例は、非クローン性異常1例、クローン性異常3例であった。クローン性異常は、付加型2例、欠失型・付加型1例に細分類された。胸腺型1例は非クローン性異常であった。

(4) 血液の直接法では、多中心型8例、消化器型1例、その他1例で染色体異常が認められた。多中心型8例の染色体による分類は、非クローン性異常3例、クローン性異常5例であった。クローン性異常は、付加型2例、転座型2例、付加型と部分的欠失型の単独または重複1例に細分類された。消化器型1例とその他1例は非クローン性異常であった。

(5) 血液の染色体検査では、組織の腫瘍細胞で染色体異常が確認された症例の約7割で同じ異常細胞が確認された。しかし、肉眼病変が軽度な症例の血液では腫瘍細胞は認められず、末期病変が重度になって腫瘍細胞が血液に流入するものと考えられた。

腫瘍細胞の染色体を検査した結果：

(6) 多中心型16例の染色体は、正常核型2例、非クローン性異常3例、クローン性異常11例であった。クローン性異常の細分類は、欠失型1例、付加型4例、転座型3例、部分的付加型1例、部分的欠失型1例、転座・倍数型1例であった。

(7) 消化器型11例の染色体による分類は、正常3例、非クローン性異常5例、クローン性異常3例であった。クローン性異常の細分類は、欠失型1例、欠失・付加型1例、倍数型1例であった。

(8) 胸腺型3例の染色体による分類は、正常核型1例、クローン性異常2例であった。クローン性異常の細分類は、付加型と部分的欠失型重複1例、転座・部分的欠失型1例であった。

(9) その他4例は、正常核型2例、非クローン性異常1例、クローン性異常1例であった。クローン性異常の1例は転座型であった。

(10) 解剖学的病型あるいは組織・細胞学的病型に特徴的な染色体異常は見いだせなかった。

病理学的に豚リンパ腫と診断された約8割の症例の腫瘍細胞には、染色体不分離、紡錘体抑圧、染色体接着、染色体過形成などによって生じた数の異常と形の異常があった。

組織・血液でみられた染色体異常細胞は、常に正常細胞と混在し、染色体所見で分類された「正常

核型」から「非クローン性異常」までは、染色体異常細胞の割合が少なく、しかも単独異常に止まっており、染色体所見のみで癌化していると判断することは出来なかった。一方、「クローン性異常」では腫瘍細胞が爆発的に分裂増殖し、単独異常・重複異常を起こして核型進化していた。これらの変異には時間差があり、発病初期は緩やかに、腫瘍顕在化後は極短時間に激しく変異しながら進行するものと考えられ、染色体異常は、単独異常から重複異常へと核型進化し、病期や病勢と実に良く一致するように思われた。

以上のごとく、本論文で著者は、食肉衛生検査の場でも実施可能な豚染色体の直接検査法を工夫し、それを駆使して長期に亘る研究を続け、多数の豚リンパ腫の染色体分析を行った。その結果、動物のリンパ腫の解剖学的病型、あるいは我が国で広く用いられてきたLSG分類による組織・細胞学的な病型と染色体異常とは直接の関わりはないことを明らかにした。一方で、異常な染色体が単純な異常から複雑な異常へと進行する現象を捉えており、これは豚リンパ腫の病勢が激しくなることと関連していると推察した。

著者の「豚染色体の直接検査法」はリンパ腫以外にも適用可能な現実的手法と考えられ、豚の腫瘍性疾患を新たな角度から考察することを可能にした。今まで記述の乏しかった豚リンパ腫の染色体所見を多数例について記述し、さまざまな染色体異常とその進展について一つの見解を提示したことは、豚リンパ腫の研究に新たな知見を加えたものといえる。これらの成果は、動物腫瘍の比較医学的研究に寄与するもので、博士（獣医学）の学位を授与するに相応しい業績であると評価した。

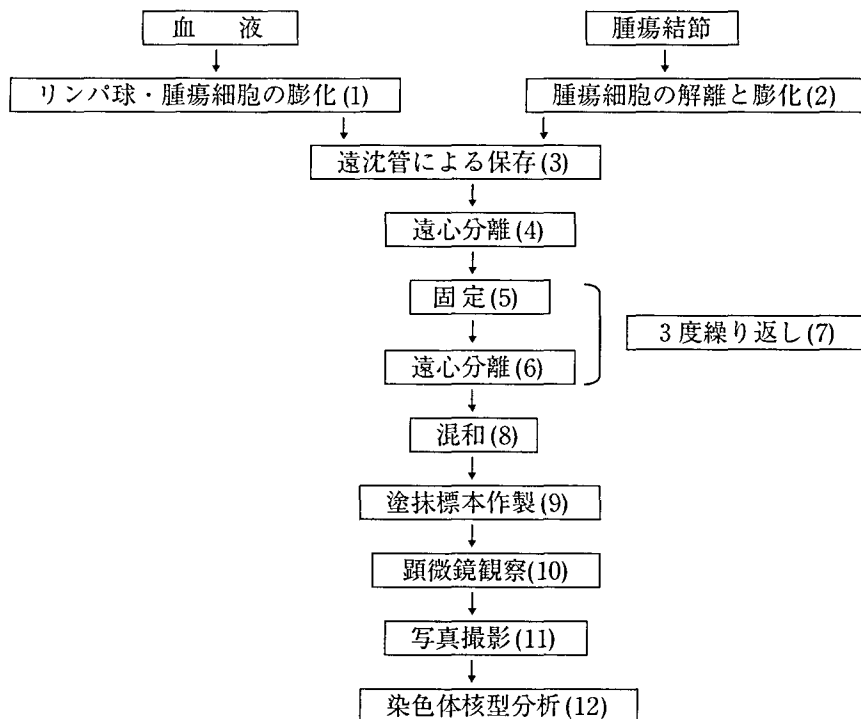


図1 直接法 (I~III) の検査の流れ

(1) 全血からリンパ球および腫瘍細胞を膨化させる。

ヘパリンで処理した1ml滅菌シリンジを用いて採血し、低張液 (0.075M-KCl) 10mlを入れた遠沈管 (滅菌Fスピッツ; 栄研化学) に0.1mlを入れ、パスツールピペットを用いて静かに混和する。ただし、直接法IIではコルセミドを加えた組織培養液 (RPMI1640; 大日本製薬) 10mlの入った遠沈管に0.1mlの全血を入れ実験室内に持ち込み、遠心分離後、沈渣にコルセミドを加えた低張液を入れて静かに混和し20分間室温に静置し、(4)に進んだ。

(2) 腫瘍結節の組織片から腫瘍細胞を解離させ膨化させる。

低張液 10mlを入れたシャーレ内で、腫瘍組織の硬い場合は鋭利なハサミで、柔らかい場合はピンセットで揺り動かす。ただし、直接法Iでは組織培養液内で解離し、遠沈管に移して遠心分離した後、上清を捨て沈渣に低張液を加えて静かに混和し、40分間室温に静置し、(4)に進む。

(3) 腫瘍細胞は40分~10時間、血液は40分~2時間、4℃で保存し、空き時間をみて(4)に進む。

(4) 1,000~1,200rpm, 5分間室温で遠心分離する。

(5) 上清を捨て、沈渣にカルノア液 (酢酸1:メタノール3, 用時調製, 4℃保存) 約10mlを加えて、静かに混和し、15分間室温に静置する。

(6) 1,000~1,200rpm, 5分間室温で遠心分離する。

(7) (5)~(6)を3度以上繰り返す。

(8) 最期に、駒込ピペットを用いて沈渣にカルノア液1mlを入れ、混和して細胞懸濁液とする。

(9) エタノールに浸漬しておいたスライドガラスを清拭し、パスツールピペットで細胞懸濁液5滴を落とし、火炎固定した後、スライドガラスに残った酢酸をろ紙の上にとたたき落とした。十分に乾いた後メタノールに浸漬してから、2%ギムザ液で30分間染色する。

(10) 最初に100~200倍で捜し、1,000倍で観察する。

(11) ミニコピーフィルムを用いて撮影し、現像・焼き付けをする。

(12) READING CONFERENCE(1980)[5]にしたがって核型分析をする。