

スタンプ標本を用いた免疫組織化学染色のと畜検査への応用について

千葉県東総食肉衛生検査所 ○吉野 学、綿村 崇宏、藤後 年彦¹⁾
岡田 峰幸、三浦 貞夫²⁾、佐々木康夫

1) 現 千葉県夷隅健康福祉センター 2) 現 千葉県南総食肉衛生検査所

はじめに

牛白血病は、牛白血病ウイルス（BLV）感染に起因する地方病性（成牛型）と発病因子が特定されていない散発性（子牛型、胸腺型、皮膚型）に分類される。発症牛の多くは地方病性であり、リンパ節の腫大、眼球突出のほか全身に肉腫病巣が見られる。また、と畜場法第 16 条により、とさつ・解体の禁止及び全部廃棄の措置を講ずべき疾病であるとともに、家畜伝染病予防法第 4 条に基づく届出伝染病である。しかし、肉眼での解体所見のみでの確定診断は難しく、また通常の病理組織学的検査では判定までに日数を要する。今回、我々はと畜検査において、スタンプ標本を用いた免疫組織化学染色を実施し、牛白血病の迅速診断への応用を試みたので報告する。

材料及び方法

症例は、平成 25 年 2 月 18 日に管内と畜場に搬入された交雑種の去勢牛 26 カ月齢で、生体検査では著変を認めず、解体後検査において、心耳及び腹壁に腫瘤を認めた。

1 材料：当該畜の心耳腫瘤、腹壁腫瘤及び浅頸リンパ節を検査材料とした。

2 方法：

(1) スタンプスメア検査

心耳腫瘤及び腹壁腫瘤に割を入れ、割面をスライドグラスに押し付けスタンプ標本を作製した。作製した標本は風乾後、ヘマカラー（メルク社）を用いた簡易ギムザ染色を行い鏡検した。

免疫組織化学染色では標本をアセトンで 3 分間固定し、一次抗体は T 細胞マーカーである抗 CD3 抗体（F7.2.38 : Dako 社）及び B 細胞マーカーである抗 CD79 α 抗体（HM57 : Dako 社）を使用、各 50 倍希釈し、30 分反応させた。PBS で洗浄後、標識ポリマーであるシンプルステイン MAX-PO (MULTI) (ニチレイ社) を 30 分反応させ、DAB 試薬 (Dako 社) で 5 分間発色させた。ヘマトキシリンで対比染色を行い、脱水・透徹・封入し鏡検した。

(2) 病理組織学的検査

ユフィックス（サクラファインテックジャパン社）を用いて固定し、パラフィン切片を作製、ヘマトキシリン・エオジン染色（HE 染色）を実施した。また、免疫組織化学染色では、抗 CD3 抗体を 400 倍希釈、抗 CD79 α 抗体を 200 倍希釈し使用した。ポリマー試薬及び発色試薬は、スタンプスメア検査と同様の試薬を使用した。

(3) 遺伝子検査

High Pure PCR Template Preparation Kit（ロシュ社）を用いて検体から DNA を抽出し、BLV プロウイルスの env 領域に特異的なプライマーを用いて PCR を実施した。

成績

1 肉眼所見：

心耳にゴルフボール大の白色腫瘍を認め、断面は白色充実性で髄様だった。腎臓付近の腹壁にも白色腫瘍を認め、割を入れると筋肉間への浸潤を認めた。各躯幹リンパ節及び臓器付属リンパ節には著変を認めなかった。

2 スタンプスメア検査：

簡易ギムザ染色の結果、やや大型で細胞質は狭く、核は不整形、核小体を複数持ち、一部に分裂像を認める異型リンパ球を認めた。免疫組織化学染色の結果、簡易ギムザ染色で認めた異型リンパ球は抗 CD3 抗体に陰性、抗 CD79 α 抗体に陽性を示した。

3 病理組織学的検査：

HE 染色の結果、心筋間に異型リンパ球様細胞のび漫性浸潤・増殖を認めた。同細胞の核は濃染から淡染で明瞭、不整形であった。腹壁腫瘍にも同様の異型リンパ球様細胞を認めた。免疫組織化学染色の結果、異型リンパ球様細胞は抗 CD3 抗体に陰性、抗 CD79 α 抗体に陽性を示した。

4 遺伝子検査：

PCR では使用したプライマーから想定されるサイズの増幅産物（210bp）を確認し、BLV プロウイルスの DNA を検出した。

考察

地方病性牛白血病は BLV の感染に起因する B 細胞性リンパ腫で、その感染様式の殆どは水平伝播で、感染牛は常に汚染源となる。発病は 3 歳以上といわれ、全身のリンパ節の腫大、心臓及び腎臓の白色化及び結節病変などが多くみられる。しかし本症例は、26 カ月齢と若く心耳に病変はあるもののリンパ節の腫大は認めず、また腹壁の腫瘤も散発でと畜場での判定に苦慮した。そのため、スタンプ標本を作製し、各種染色を実施したところ B 細胞マーカーである抗 CD79 α 抗体に陽性を示す異型リンパ球を認めたことから、B 細胞性リンパ腫である地方病性牛白血病を疑い、当該畜に対し保留措置を講じた。翌日、遺伝子検査で BLV プロウイルスの DNA を検出し、翌々日、病理組織学的検査の結果 B 細胞性リンパ腫を認めたため、地方病性牛白血病と診断し、全部廃棄措置とした。

迅速性が求められると畜検査における腫瘍診断の問題点は、肉眼での確定診断は困難なこと、通常の病理組織学的検査では日数を要すること、また保留措置の適応について業者等へ説明する必要があることが挙げられる。今回、保留措置を講じるにあたりスタンプ標本を用いた免疫組織化学染色を実施することで、約 2 時間 30 分で B 細胞由来の異型リンパ球様細胞の有無を確認することができ、保留措置等現場での判断の一助となるとともに、業者等に対し精密検査の結果に基づき適切な説明をすることができた。また、その結果は病理組織学的検査の結果と一致した。今後、症例を増やし、病理組織学的検査の結果と比較することにより、牛白血病の迅速診断に応用することが可能であることが示唆された。