

6 牛白血病ウイルス感染牛における末梢血中リンパ球標本を用いた免疫組織化学的検討

県中央畜保健衛生所

戸崎香織、小島浩一

はじめに

牛白血病は、牛白血病ウイルス (BLV) の感染に起因する B 細胞性リンパ腫である地方病性牛白血病 (EBL) と原因不明の散発型牛白血病とに分類される。BLV 感染牛のうち、EBL を発症するのは数%と高くはないものの、発症すると死の転帰をとる。EBL 発症が疑われた際、生前に実施する検査方法としては、血液検査により白血球数及びリンパ球数の高度の増数や末梢血中への腫瘍性異常リンパ球出現を確認する方法、抗体検査や遺伝子検査により感染の有無やウイルス量を測定する方法等が挙げられる。しかし、発症を判断する客観的な基準はなく、BLV 感染牛における散発型牛白血病的の発生も多数報告されていることから、EBL と EBL 以外の牛白血病とを明確に区別することは難しい。また、末梢血中への異常リンパ球の出現は病態末期に起こるため、病勢によっては出現が認められない、あるいは極めて少数であるため見逃す恐れもある。加えて、炎症による反応性の異型リンパ球との鑑別も難しく、検査実施者の知識や経験に左右されることから、生前に確定診断することが困難である。

そこで、増数したリンパ球が B 細胞かどうかを識別し、末梢血中に出現する異常リンパ球が少数であっても見逃さず、客観的に判断することを目的とし、末梢血中からリンパ球を含む単核細胞 (PBMC) を回収し、病理組織学的検査で実施されている免疫組織化学的検査

法 (免疫染色) を応用し、EBL を発症しているか否かを生前に血液のみを用いて診断する手法を検討したので、概要を報告する。

材料及び方法

1 材料

(1) 血液

臨床的に EBL を発症していない牛 (非発症牛) 60 頭、体表リンパ節の腫脹や骨盤腔内に腫瘤が触知される等の臨床検査で発症が疑われた牛 (発症疑い牛) 4 頭、と畜場で牛白血病と診断された牛 (発症牛) 5 頭の計 69 頭の血液を用いた。血液はプレーン採血管により採取した血清及び EDTA-2Na 入り採血管により採取した全血を検査に供した。また、発症牛については心残血を用いた。

(2) 臓器及びリンパ節

発症牛 5 頭について、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、第四胃、子宮及び内腸骨リンパ節を採材した。

2 方法

(1) 血液

ア 血清

ELISA 法により BLV 抗体検査を実施した。

イ 全血

(ア) 白血球数及びリンパ球数の測定

全自動血球計算装置により実施した。

(イ) 末梢血中リンパ球の形態観察

血液塗抹標本を作製し、メタノール固定

後、ライト・ギムザ染色を実施した。

(ウ) PBMC を用いたリンパ球標本の作製

全血を PBS で 2 倍希釈 (白血球数が 20,000/ μ L 以上の場合は 3 倍希釈) し、比重液 (Histopaque1.077、SIGMA 社) と分離チューブ (Leucosep、Greiner Bio-One 社) を用いて定法により PBMC を回収した。回収した PBMC を PBS で洗浄し、得られた沈渣を牛胎子血清に浮遊して懸濁させた後、スライドガラスに塗抹した。当日染色を実施する場合には 95% エタノールで 30 秒固定した。当日染色を実施しない場合はメタノールで 15 分固定後、 -20°C で凍結保存した。ここまでの作業の所要時間は、約 2 時間であった。

(エ) リンパ球標本の免疫染色

作製したリンパ球標本について、各種抗体を用いた免疫染色を実施した。一次抗体には、T 細胞マーカーとして CD3 (Dako、1:200)、CD4 (AbD Serotec、1:10)、CD8 (BIO-RAD、1:150) 及び WC1 (BIO-RAD、1:400)、T・B 細胞共通マーカーとして CD5 (AbD Serotec、1:100)、B 細胞マーカーとして CD21 (BIO-RAD、1:70) 及び CD79 α (ニチレイ、1:150)、細胞増殖期マーカーとして Ki67 (Dako、1:50) を用いた。また、PBMC にはリンパ球の他、骨髄球系細胞の単球を含むことから、骨髄球系細胞マーカーとして CD14 (BIO-RAD、1:40) も用いた。一次抗体は室温で 30 分間反応させた。PBS で洗浄後、標識ポリマーであるヒストファインシンプルステイン MAX-PO (MULTI) (ニチレイ) を 30 分間反応させた。PBS で洗浄後、AEC 試薬 (ニチレイ) で 10 分間反応させ、マイヤー・ヘマトキシリンで 30 秒間の対比染色を実施した。なお、Ki67 については、細胞増殖期にある核に反応する抗体であるため、対比

染色は実施しなかった。水溶性封入剤で封入・乾燥後、透徹・封入した。染色後、血球 100 個中の陽性細胞数を 2 回計測し、平均値を算出した。免疫染色に要した時間は、約 3 時間であった。

(2) 臓器及びリンパ節

20% 中性緩衝ホルマリンにて固定後、定法によりパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色及び免疫染色 (CD3、CD79 α 及び ki67) を実施した。抗原賦活化は、pH8 の EDTA 液を用いてオートクレーブ処理 (121°C 、10 分) により実施した。一次抗体、ポリマー試薬及び発色試薬は、リンパ球標本の免疫染色と同様の試薬を用いた。

結果

1 BLV 抗体検査

(1) 非発症牛

60頭のうち、20頭が抗体陰性、40頭が抗体陽性であった。

(2) 発症疑い牛及び発症牛

9頭全てで抗体陽性であった。

2 白血球数及びリンパ球数

(1) 非発症牛

抗体陰性牛20頭ではいずれの増数も認められなかった。抗体陽性牛40頭のうち、8頭で白血球数及びリンパ球数がともに増数しており (表1)、持続性リンパ球増多症 (PL) と判断した。

(2) 発症疑い牛

4頭全てで白血球数の増数が認められ、3頭でリンパ球数の増数も認められた (表1)。

(3) 発症牛

5頭のうち、3頭で白血球数の増数、1頭でリンパ球数の増数が認められた (表1)。

表1 白血球数及びリンパ球数の増数が認められた個体の概要

分類	No.	品種	性別	月齢	白血球数 (/ μ L) ^{※1}	リンパ球数 (/ μ L)
PL牛 ^{※2}	1	黒毛和種	雌	153	14,400	8,800
	2	ホルスタイン種	雌	86	17,900	12,800
	3	ホルスタイン種	雌	28	22,300	13,500
	4	ホルスタイン種	雌	52	16,600	11,400
	5	ホルスタイン種	雌	61	17,300	9,500
	6	ホルスタイン種	雌	54	20,100	13,100
	7	ホルスタイン種	雌	52	19,300	13,300
	8	ホルスタイン種	雌	64	16,100	10,900
発症疑い牛	9	ホルスタイン種	雌	30	59,700	14,500
	10	黒毛和種	雌	27	22,300	4,000
	11	黒毛和種	去勢	12	85,300	81,900
	12	交雑種	去勢	13	87,700	85,900
発症牛	13	ホルスタイン種	雌	78	11,100	5,100
	14	ホルスタイン種	雌	56	8,300	2,800
	15	ホルスタイン種	雌	117	18,900	5,100
	16	ホルスタイン種	雌	56	17,000	4,400
	17	ホルスタイン種	雌	129	14,700	8,200

※1 白血球数 12,200/ μ L、リンパ球数 8,000/ μ L 以上を増数とした。

※2 非発症牛の抗体陽性牛のうち、リンパ球数 8,000/ μ L 以上を持続性リンパ球増多症とした。

3 末梢血中リンパ球の形態

(1) 非発症牛

60頭全てで末梢血中に異常リンパ球は認められなかった。

(2) 発症疑い牛及び発症牛

9頭全ての末梢血中に、大型で細胞質にやや乏しく、不整形の核を有しクロマチンがやや粗剛な異常リンパ球が認められた。核の切れ込みや明瞭な核小体、細胞質に空胞を有する細胞も観察された。

4 リンパ球標本の免疫染色

各種抗体毎の計測結果(陽性細胞数の平均値±標準誤差)は表2のとおりであった。なお、非発症牛については、抗体陰性牛、抗体陽性牛及びPL牛の3つに分けて示した。

CD3では、発症疑い牛及び発症牛で非発症牛

よりも少ない傾向が認められた(図1、2)。

CD5及び CD79 α では、発症疑い牛及び発症牛で非発症牛よりも多く、PL牛でもやや多い傾向が認められた(図2、3、4、5)。Ki67では、発症疑い牛及び発症牛で非発症牛よりも多い傾向が認められた(図5、6)。CD4、CD8、CD14、CD21及び WC1では、差は認められなかった。

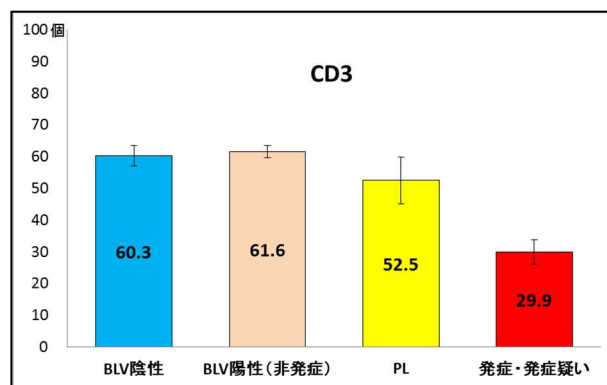


図1 T細胞マーカー(CD3)の計測結果

表2 各種抗体毎の計測結果(血球100個中の陽性細胞数の平均値±標準誤差)

抗体	非発症牛			発症疑い牛 ・発症牛	
	抗体陰性牛	抗体陽性牛	PL牛		
T細胞マーカー	CD3	60.3±3.1	61.6±2.0	52.5±7.4	29.9±3.9
	CD4	8.1±1.9	11.8±1.0	8.9±1.6	8.5±2.4
	CD8	27.7±1.2	30.9±1.0	24.6±3.4	15.0±2.9
	WC1	3.8±0.5	4.3±0.5	9.6±6.9	12.4±10.0
T・B細胞共通マーカー	CD5	56.2±4.8	61.8±1.5	74.9±3.9	89.0±2.1
B細胞マーカー	CD21	24.1±1.7	31.5±0.9	44.4±2.6	33.6±5.6
	CD79 α	19.7±1.6	32.6±1.5	53.5±4.4	61.1±6.5
細胞増殖期マーカー	Ki67	3.2±2.4	3.2±0.5	8.4±1.0	46.7±3.7
骨髄球系細胞マーカー	CD14	36.2±3.5	23.9±1.2	19.4±3.5	21.3±2.6

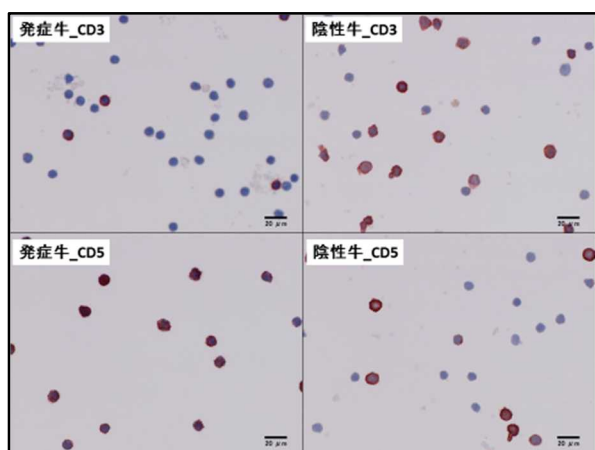


図2 発症牛及び抗体陰性牛のリンパ球標本免疫染色結果(CD3、CD5)

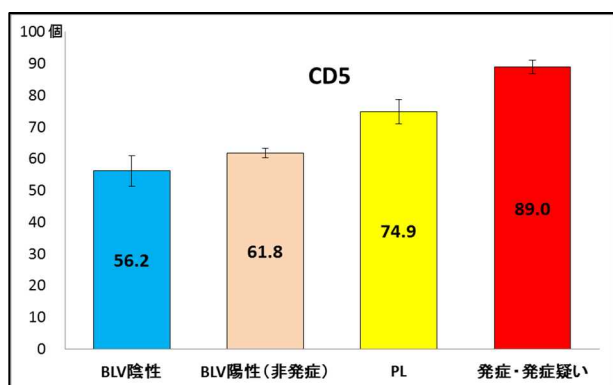


図3 T・B細胞共通マーカー(CD5)の計測結果

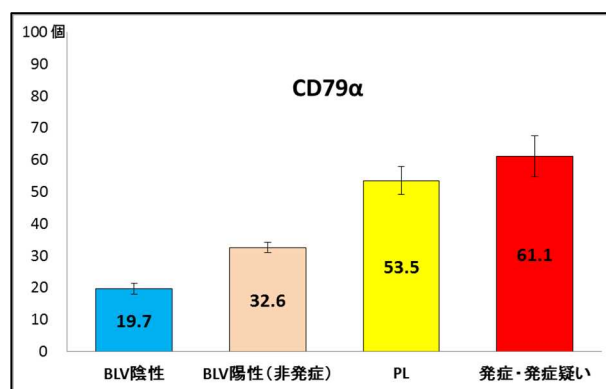


図4 B細胞マーカー(CD79 α)の計測結果

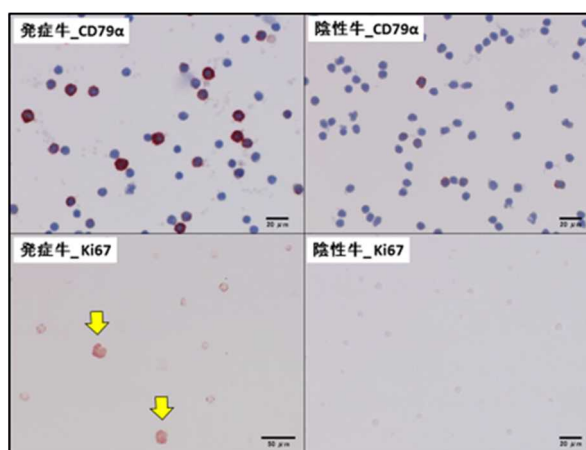


図5 発症牛及び抗体陰性牛のリンパ球標本免疫染色結果(CD79 α 、ki67)

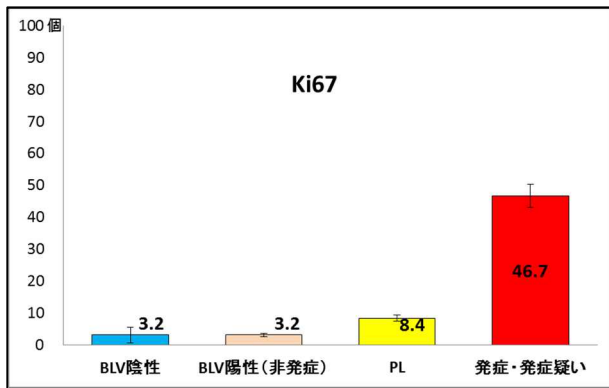


図6 細胞増殖期マーカー(Ki67)の計測結果

5 発症牛の臓器及びリンパ節の病理組織学的検査

HE染色の結果、5頭全てにおいて、検査した全臓器及びリンパ節でリンパ球様腫瘍細胞のびまん性浸潤、増殖が認められた。腫瘍細胞は大小不同、核は濃染～淡染で不整形、核分裂像も散見された。また、免疫染色の結果、これらの腫瘍細胞はCD3に陰性、CD79 α 及びKi67に陽性を示した。

6 リンパ球標本の免疫染色における各種抗体の有用性

発症牛におけるリンパ球標本の免疫染色の結果、非発症牛よりも末梢血中のT細胞数(CD3)は減少し、B細胞数(CD5及びCD79 α)及び腫瘍性増殖を示す細胞数(Ki67)が増加していることが確認された。また、病理組織学的検査の結果、腫瘍細胞はCD3陰性、CD79 α 陽性を示し、EBLの特徴と一致し、さらにKi67陽性であったことから、B細胞の腫瘍性増殖を確認することができた。

以上のことから、リンパ球標本と組織標本の免疫染色結果は一致し、リンパ球標本の免疫染色が有用であると考えられた。よって、CD3、CD5及びCD79 α により異常リンパ球の由来を確認し、Ki67で腫瘍化しているか否かを

確認することで、腫瘍化したBリンパ球を間接的に識別することが可能であり、これら4種の抗体を併用したリンパ球標本の免疫染色がEBL診断に有用であると考えられた(図7)。

抗体	T細胞	B細胞	単球	細胞増殖期	発症・発症疑い牛	有用性
CD3	○				↓	○
CD4	○					
CD5	○	○(B1)			↑	○
CD8	○					
CD14		○(弱)	○			
CD21		○				
CD79 α		○			↑	○
WC1	○(v δ)					
Ki67				○	↑	○

・異常リンパ球の由来 } 腫瘍化したBリンパ球を
 ・腫瘍化しているか否か } 間接的に識別することが可能

図7 各種抗体の有用性

考察

EBLの生前診断法として、一般的な血液検査に加えて、血液塗抹標本の免疫染色も実施されているが、病態によっては異常リンパ球数が少なく見落とす恐れがある。また、腫脹した体表リンパ節のバイオプシーを実施し、生検材料の病理組織学的検査や免疫染色により診断する手法も実施されているが、バイオプシーは侵襲性が高く、アプローチ可能な部位も体表に限られることから、汎用性に欠ける。そこで、血液のみを材料とし効率的に末梢血中のリンパ球を観察するため、ウイルス学的検査や細胞培養等で用いられているPBMCを活用し、各種リンパ球表面抗原マーカー及び細胞増殖期マーカーを用いて免疫染色を実施する手法を検討した。まず初めに、分離したPBMCをそのままスライドガラスに塗抹し免疫染色を実施したところ、洗浄工程で剥離してしまった。そこで、PBMCを牛胎子血清に懸濁しスライドに塗抹したところ、剥離

を防止することが可能であった。また、血液塗抹標本で必須の内因性ペルオキシダーゼの除去は、リンパ球標本では不要であった。

このように、PBMCをスライドガラスに塗抹し、免疫染色を実施する手法は過去に報告がない。今回、PBMCの分離から免疫染色を実施するまでのプロトコルを確立することができた。また、各種抗体を用いた免疫染色により、リンパ球の識別も可能であった。よって、本手法は、血液のみを用いてEBLの発症を生前に判定できる診断方法として活用可能であり、本手法を通常実施している血液検査に追加することで、EBLの発症を客観的に判断できる診断方法として期待できるものと考えられた。

EBLは一般的にはB1細胞性リンパ腫であると考えられている^{1,2,3)}。そのため、EBLの腫瘍細胞は、CD5やCD79 α といったB1細胞マーカーに対して陽性を示す。今回、発症疑い牛や発症牛のみならず、PL牛でもB1細胞の増加が認められたことから、EBLの発症診断に加えて汚染リスクの高いBLV感染牛の摘発にも応用することで、農場における清浄化対策の一助となり得ると考えられた。

今回、検査を実施した発症疑い牛及び発症牛の検体数が9頭と少なく、発症牛については心残血であったことから、今後も継続して検査を実施し、精度向上に努めたい。

参考文献

- 1) Kagawa Y., et al.: Immunohistochemical characterization of five types of lymphoid neoplasms in calves. Jpn. Agric. Res. Quart. 43, 239-245 (2009)
- 2) Abe Y., et al.: Immunohistochemical study of lymphomas of abdominal cavity

origin in two cows with bovine leukemia virus. Jpn. Agric. Res. Quart. 41, 153-156 (2007)

- 3) 萩原昌代ら: 牛白血病ウイルス感染牛におけるリンパ系腫瘍の組織学的検討, 日獣会誌, 67, 199-203 (2014)