

6 *in situ* hybridization 法による牛伝染性リンパ腫の解析

○浅沼まりな

はじめに

牛伝染性リンパ腫は、レトロウイルス科の牛伝染性リンパ腫ウイルス(以下 BLV)の感染により引き起こされる地方病性牛白血病(以下 EBL)と、ウイルスが関与しない原因不明の散発性牛白血病(以下 SBL)として家畜伝染病予防法の届出伝染病に指定される疾病である[1, 2]。BLV は血液, 乳, 唾液を介する水平感染, あるいは医原性感染による伝播の他, 野外ではアブなどの吸血による感染が重要視されており, EBL の国内での発生は増加傾向にある[2, 3]。全ての BLV 感染牛が発症するわけではなく, 約 30%が持続性リンパ球増多症を示すが, 臨床的な異常は認められず, 感染後数カ月から数年の無症状期を経て, 数%が B 細胞性リンパ腫を発症する[3]。一方, SBL は BLV に関係なく発生し, 子牛型 B 細胞性リンパ腫(子牛型), 若齢型 T 細胞リンパ腫(子牛型と胸腺型), 皮膚型 T 細胞リンパ腫(皮膚型)に分類される[1]。

BLV 感染による EBL と SBL の区別は BLV の感染状況を正確に把握するために重要であるが, 両者を肉眼や細胞形態で判別することは難しい。EBL は一般的に潜伏期間が長期にわたることから4歳以上での発生が多いとされているが[4], 近年では生後数カ月で EBL を発症した報告[5]もあり, SBL との鑑別がより一層難しくなっている。また, EBL は B リンパ球が腫瘍化するが, SBL は B および T リンパ球が腫瘍化する可能性があり, 免疫組織化学染色(以下 IHC)の成績のみで診断をすることはできない。さらに BLV 遺伝子や抗体を検出しても, BLV 感染牛に発生したリンパ腫の全てが BLV に起因するとは限らないため[3], 確定診断とはならない。一方, EBL では全身リンパ節の腫大や, 全身諸臓器での腫瘍細胞の肉腫性増殖による腫瘍形成を認め, 特に前胃, 第四胃, 子宮で顕著であり, 心臓では右心房に結節性病変が好発する[2, 4]。さらに BLV は感染後, B 細胞 DNA 中にプロウイルスとして組み込まれ持続感染が成立する。また, B 細胞は B1a 細胞, B1b 細胞および B2 細胞に分類され, EBL の腫瘍細胞は B1a 細胞由来が最多という報告もある[1]。しかし, これらの臓器好発性や腫瘍の発生機序の詳細は解明されていない。

2020 年, 安藤ら[6]は BLV が発現する非翻訳性 RNA を標的とする *in situ* hybridization(以下 ISH)法を開発し, 組織内での BLV 感染細胞の検出を可能とした。BLV は腫瘍細胞内において潜伏感染状態となり, ウイルス由来のタンパク質を発現しないため, 通常は IHC では直接ウイルスを検出することはできない[6]。一方, ISH 法では腫瘍細胞内での BLV の存在を証明することが可能であり, RNAscope® キットはターゲット RNA 配列に特異的なプローブを使用しており, 発現するシグナルを計測することで遺伝子を半定量的に検出することができる。

今回, ISH 法を用いて, 当所で牛のリンパ腫と診断した牛について詳細に検索すると共に, 発現細胞および発現している遺伝子量について分析をしたので併せて報告する。

材料と方法

材料

令和 3 年 12 月から令和 5 年 1 月に当所管轄と畜場に搬入された牛のうち, 解体所見で全身性の腫瘍を疑い, 捺印標本検査で牛のリンパ腫と診断された牛 3 頭(症例 1~3)を用いた(表 1)。全ての症例で生体検査では異常を認めなかった。また, EBL の罹患を認めない牛 1 頭を BLV 陰性対照として用いた。

病理組織学的検査

臓器を 10%中性緩衝ホルマリン液で固定し, パラフィンに包埋した。薄切後, ヘマトキシリン・エオジン染色(以下, HE 染色)を実施し, 光学顕微鏡で観察した。

表1 臨床所見と肉眼所見

症例 No.	品種	性別	月齢	肉眼所見
1	J	C	32	心臓にピンポン玉大の白色腫瘍を形成し、肝臓、第一胃、盲腸、直腸、腎臓、膀胱に直径2cm大の多数の白色腫瘍
2	H	F	97	子宮を最大腫瘍とし、心臓にびまん性の白色病変、腎臓に7cm大の白色腫瘍、胃に10cm大の白色腫瘍。胃リンパ節、縦隔リンパ節が腫大。
3	J	F	210	胃リンパ節がソフトボール大に腫大。肺、肝臓に数cm大、腎臓に5cm大、脾臓に10cm大の白色腫瘍。肺、肝臓、脾臓付属のリンパ節が腫大。

J=黒毛和種 H=ホルスタイン種 C=去勢 F=雌

PCR 検査

DNA 抽出キット(QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, QIAGEN)を用いてホルマリン固定パラフィン包埋(以下 FFPE)組織から DNA を抽出し、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法を実施し、BLV 遺伝子の有無を確認した。PCR 試薬は *TaKaRa Ex Taq®*(タカラバイオ㈱)を使用し、既報[7]のプライマーペアおよび増幅条件で PCR 法を実施した。

IHC 検査

FFPE 切片を用いてストレプトアビジンビオチン化ペルオキシダーゼ複合体法による IHC を実施した。一次抗体としてヒト CD3 (DaKo), ヒト CD79 α (DaKo) に対するマウスモノクローナル抗体を用いた。二次抗体以降の操作ではキット(ヒストファイン SAB-PO(M)キット, ニチレイ)を使用した。抗原賦活化はオートクレーブを用いた加熱処理を実施した。

ISH 検査

FFPE 切片を 60°C で 1 時間乾燥させ、定法に従い脱パラフィンを行い、キット(RNAscope®, ACD)を用いて ISH 法を実施した。抗原賦活化は 98°C で 15 分、プロテアーゼ処理は 40°C で 30 分実施し、3, 3'-ジアミノベンジジンで発色した。RNA の検出には安藤ら[8]が開発したプローブを使用し、対比染色として Gill のヘマトキシリンを用いた。光学顕微鏡で細胞を観察し、IHC で陽性となった細胞中の BLV 遺伝子発現細胞の割合(BLV 発現率)を求めた。また、1000 倍の視野で BLV 遺伝子の発現シグナル数を計測し、~50 個を+, 50~100 個を++, 100 個~を+++としておおよその定量を行った(BLV 遺伝子の発現量)。

成績

病理組織学的検査: 全ての症例の腫瘍形成部において腫瘍細胞の増殖が確認された。症例1では腫瘍形成部の腫瘍細胞は細胞質に乏しく、類円形から楕円形を示し、クロマチンは疎で核小体は目立たなかった(図1)。腫瘍細胞は浸潤性に増殖し、正常組織の固有構造は消失していた。症例2の腫瘍細胞も細胞質に乏しく、類円形を示し、クロマチンが密な核を持ち、核の異型性を認めた。心筋および心耳にびまん性に白色病変がみられ、腫瘍細胞が心筋の間に浸潤していた。腫大したリンパ節も腫瘍細胞によって置換され、固有構造が消失していた。症例3の腫瘍細胞は細胞質に乏しく、中型から大型で楕円形の核を有し、クロマチンの軽度な凝集が認められた。症例3では心臓に肉眼的病変を認めなかったが、心筋線維の間に円形から類円形で細胞質に乏しく、クロマチンが疎のリンパ芽球様細胞の浸潤がみられた。心筋の組織固有構造は保たれていた。

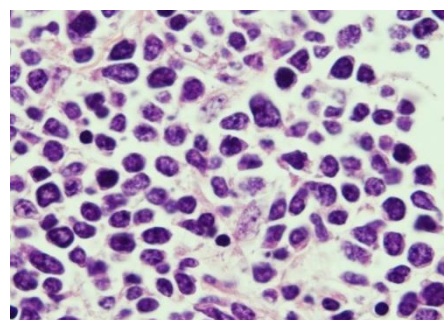


図1 症例1 心臓 HE染色 (×400)

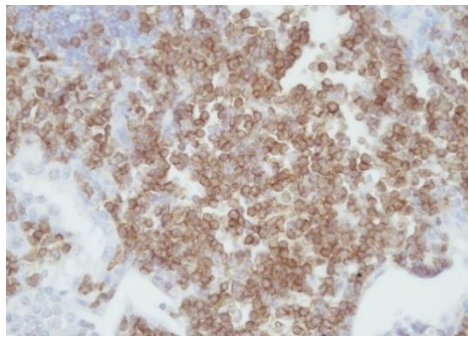


図2 症例1 心臓 CD79α (×400)

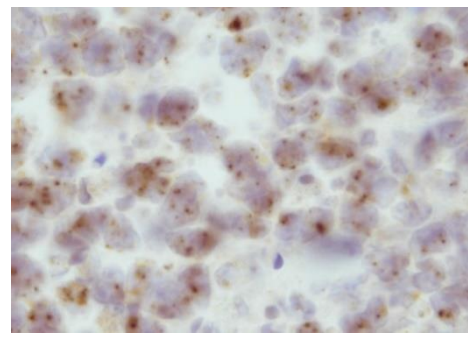


図3 症例1 心臓 ISH (×1000)

表2 BLV 発現率および発現量

	症例1		症例2			症例3		
	心臓*	腎臓	心臓	腎臓	子宮*	心臓**	腎臓	胃リンパ*
BLV 発現率(%)	80	70	90	40	90	80	30	40
BLV 発現量	+++	+++	+++	++	+++	++	+	+

* = 各症例における最大腫瘍

** = 肉眼的病変認めず

PCR 検査: 全ての症例で FFPE 組織から BLV 遺伝子が検出された。症例3では肉眼的病変を認めなかった心臓の FFPE 組織からも BLV 遺伝子が検出された。

IHC 検査: 全ての症例において、腫瘍細胞は CD3 陰性、CD79α 陽性を示した(図2)。症例3の心臓では肉眼的病変を認めなかったが、浸潤していたリンパ芽球様細胞は CD79α 陽性を示した。

ISH 検査: 全ての症例において、IHC で CD79α 陽性細胞内に BLV 遺伝子が確認された(図3)。症例1では心臓と腎臓では IHC で BLV 発現率、および BLV 遺伝子の発現量に大きな差はみられなかった(表2)。症例2では最大腫瘍および心臓の腫瘍のほぼ全ての腫瘍細胞内で BLV 遺伝子の発現が確認され、腎臓の腫瘍細胞に比べて細胞内での BLV 遺伝子の発現量も多かった。腎臓の腫瘍でも BLV 遺伝子の発現は確認されたが、最大腫瘍や心臓と比べると BLV の発現細胞や発現量は少なかった。症例3では最大腫瘍である胃リンパ節と腎臓腫瘍の間に明らかな遺伝子発現量の差はみられず、これらの組織では腫瘍細胞中にまばらにシグナルが確認された。また肉眼的病変を認めなかった心臓で浸潤したリンパ芽球様細胞中に BLV 遺伝子は比較的高率に検出され、BLV 遺伝子の発現量も多かった。

なお、陰性対照牛のリンパ節から抽出した DNA を用いた PCR 検査は陰性で、ISH でもシグナルは検出されなかった。

考察

牛のリンパ腫はと畜検査で散見されるが、その多くが EBL である[9]。今回、3 症例について FFPE 切片を用いた ISH 法を実施したところ、腫瘍細胞内に BLV の RNA を検出したため、これら3症例が BLV に起因する EBL であると確定診断することができた。

近年 EBL の発生は増加傾向にあり、と畜検査で摘発されるケースは農場で摘発されるケースよりも多くなっている。一方で、その多くは生体検査で体表リンパ節の腫脹や眼球突出等の特徴的な症状を認めない[9]。したがって、生体検査のみでは EBL を疑うことは困難である。また、BLV の蔓延地域では BLV 感染牛が多いため、PCR 検査を行っても、その結果は補助的診断として扱うべきである[10]。また、症例1のように比較的若齢の牛でも EBL を発症することは、過去の症例報告[5]からみても決して珍しいことではないため、EBL の動向を把握するためにも、正確な診断が求められる。

今回行った ISH 法では全ての症例で腫瘍細胞内に BLV 遺伝子を確認することができた。ISH 法の定量に関しては、顕著な差以外は慎重に行うべきとされているが[11]、同一症例内で BLV 遺伝子の発現量に差がみられたことは、体内での腫瘍化の進展、つまり転移によってウイルス量に差があることを示唆している。症例1では原発と思われる心臓でも腫瘍の大きさはピンポン玉程度で、腫瘍化してからの経過

が短く、他の臓器に腫瘍が形成されるまでに大きな経時的な差がなかったことから、BLV 遺伝子発現量に臓器ごとの差を認めなかった可能性がある。一方で症例 2 では最大腫瘍と比べて腎臓で遺伝子発現細胞および遺伝子発現量が少なかった。腎臓腫瘍の IHC では腫瘍細胞は一様に CD79 α 陽性であったが、ISH の結果とは一致しない細胞も多く見られた。これは腎臓の腫瘍には、BLV 遺伝子を発現していない B 細胞も含まれていることを示している。近年の研究では、悪性腫瘍との関連が知られているウイルスにおいて、そのウイルスが感染した細胞から分泌されるマイクロ RNA (以下 miRNA) が細胞の悪性化誘導能をもつことが示され[12, 13], さらにある種の腫瘍では miRNA が増殖する腫瘍細胞中にまばらに存在していたとの報告[14]もある。これらの知見[12, 13]は腫瘍細胞が細胞分裂による増殖のみでなく、腫瘍細胞から miRNA が細胞外に分泌され細胞の悪性化を促すという新たな発がん機構を示唆するものであり、本症例においても腫瘍が原発巣から転移して発生したのち、BLV 遺伝子の発現にかかわらず B 細胞が増殖する可能性を示唆している。症例 3 でも腫瘍の大きさから腎臓の腫瘍は転移巣とみられるが、原発巣の胃リンパ節と腎臓腫瘍で BLV 遺伝子の発現率や発現量に差はなく、遺伝子発現量による臓器間の関係性は判断できなかった。また、肉眼的に病変を認めなかった心臓においても B 細胞が浸潤し、BLV 遺伝子が発現していた。これは原発巣から腫瘍細胞が転移した可能性も考えられるが、BLV に感染後、症状がない時期でも心臓のリンパ球集積部において B1a 細胞の優位な増殖と BLV の発現が認められたという報告もあることから[15], 症例 3 では BLV 感染後、EBL を発症する前から心臓に BLV 遺伝子が発現していた可能性も考えられる。このことは感染の初期段階ですでにこれらの非リンパ性組織に BLV 遺伝子が発現し、単に原発巣からの転移による腫瘍形成のみが機序ではなく、特異的に B1a 細胞の増殖や遺伝子の発現により腫瘍が形成されている可能性を示す。一方、症例 2 でも心臓において BLV 遺伝子の発現率および発現量が高かった。このことは、腫瘍を形成する前から心臓のリンパ球中に BLV 遺伝子が発現しており、腫瘍発生に伴いこれらのリンパ球が増殖した可能性が考えられる。

今回の検索は 3 症例のみに留まり、全て BLV 感染による EBL の症例であった。今後、さらに多くの症例で遺伝子発現細胞の分布や遺伝子発現量を検索することで、BLV 感染細胞の腫瘍化の発症機序解明に繋がるものと考ええる。

参考文献

- [1]動物病理カラーアトラス 第 2 版 日本獣医病理学専門家協会編 文永堂出版 28
- [2]動物の感染症(第三版) 近代出版 98-99
- [3]動物病理学各論 第 3 版 日本獣医病理学専門家協会編 文永堂出版 58-59
- [4]獣医内科学第 2 版 大動物編 日本獣医内科学アカデミー編 猪熊壽・北川均・内藤善久監修 文永堂出版 256-258
- [5]若槻拓司, 杉山定, 高岡亜沙子, 橋田明彦, 水上智秋:若齢牛において地方病性牛白血病と診断した 1 例 日獣会誌, 72, 608-613 (2019)
- [6]Andoh K, Kimura K, Nishimori A, Hatama S. Development of an in situ hybridization assay using an AS1 probe for detection of bovine leukemia virus in BLV-induced lymphoma tissues. Arch Virol. 2020 Dec, 165, 2869-2876 (2020)
- [7]Nishimori A, Konnai S, Ikebuchi R, Okagawa T, Nakahara A, Murata S, Ohashi K. Direct polymerase chain reaction from blood and tissue samples for rapid diagnosis of bovine leukemia virus infection. J Vet Med Sci, 78, 791-796 (2016)
- [8]Advanced Cell Diagnostics, Inc. GenBank accession no. AP018006
- [9]小西美佐子:—最新の家畜疾病情報(VI)— 地方病性牛白血病(EBL) 日獣会誌, 68, 352-354 (2015)
- [10]萩原晶代, 斉藤守弘, 石川義春, 門田耕一: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)
- [11]藤永竜太郎, 柳井章江, 國分啓司, 篠田晃:In situ ハイブリダイゼーション法による mRNA の検出～特に脳組織を対象として～ 山口医学, 63, 83-87 (2014)
- [12]西連寺剛:EB ウイルス感染と発がん ウイルス, 52, 273-279 (2002)

[13]岩切大:EB ウイルスによる発癌の分子機構 ウイルス 64, 49-56(2014)

[14]Volinia S, Nuovo G, Drusco A, Costinean S, Abujarour R, Desponts C, Garofalo M, Baffa R, Aeqilan R, Maharry K, Sana ME, Di Leva G, Gasparini P, Dama P, Marchesini J, Galasso M, Manfrini M, Zerbinati C, Corrà F, Wise T, Wojcik SE, Previati M, Pichiorri F, Zanesi N, Alder H, Palatini J, Huebner KF, Shapiro CL, Negrini M, Vecchione A, Rosenberg AL, Croce CM, Garzon R. Pluripotent stem cell miRNAs and metastasis in invasive breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 106(12), 324(2014)

[15]相原 尚之, 丹生 早耶, 服部 七星, 志賀 崇徳, 中村 溪太, 川口 絵梨, 風間 啓, 村上 裕信, 佐藤 礼一郎, 上家 潤一. 牛伝染性リンパ腫ウイルス感染牛の B-1a 細胞増殖部位とリンパ腫発生部位の解析. 日本獣医学会学術集会講演要旨集 (2022)