

# 牛白血病における免疫組織化学染色の活用

## 食肉検査部門

### Classification of bovine leukosis by immunohistochemistry

#### Division of Meat Inspection

#### Abstract

Tumor cell of Bovine leukosis (BL) is originated from B or T cell. They are identified by the surface antigen of cell. B cell has CD79 $\alpha$ , and T cell has CD3. We tried to identify T and B cell with immunohistochemistry. We got good results in staining CD79 $\alpha$ . However, we have not been able to stain appropriately CD3.

#### Key Words

bovine leukosis 牛白血病, immunohistochemistry 免疫組織化学染色

## 1 緒言

牛白血病は牛のリンパ腫で、地方病性の成牛型牛白血病と散発型の子牛型、胸腺型、皮膚型牛白血病に分類される。これらは同じリンパ腫であるが、由来する細胞が異なり、成牛型はB細胞に、胸腺型と皮膚型はT細胞に由来する腫瘍である。子牛型にはB細胞由来とT細胞由来の2種類が存在する。<sup>1)</sup>

これらの由来細胞の分類は免疫組織化学染色によって区別が可能<sup>2)</sup>で、この染色法を用いることによって病理組織診断経験の浅い検査員でも臓器に浸潤している腫瘍細胞がリンパ系由来であることを客観的に判断することが可能となる。

今回、当部門において、正常牛のリンパ節を使い、牛のリンパ球をB細胞とT細胞とに区別するための免疫組織化学染色を試みたので、その概要を報告する。

## 2 試料及び方法

### (1) 検体準備

リンパ系細胞の陽性検体として、正常牛のリンパ節を用いて行った。検体は通常の組織検体と同様に10%ホルマリン緩衝液にて固定後、パラフィン包埋した物を使用した。薄切後の切片を乗せるスライドグラスにはMASコートスライドグラス(松浪硝子工業(株))を採用し、37℃の恒温器にて24-48時間乾燥させた。

### (2) 脱パラフィン

脱パラフィンは、キシレン3槽、純エタノール2槽、95%エタノール2槽を各3分間後、リン酸緩衝液(以下PBSという)にて3分間、3回洗浄を行った。

### (3) 抗原の賦活化

緩衝液にはヒストファイン 抗原賦活化液 pH9 (株

ニチレイバイオサイエンス)を用いた。

耐熱バットにて緩衝液に切片を浸したものをオートクレーブで120℃、20分間加熱した後、室温で20分間以上放置して冷まし、PBSで洗浄した(室温、5分間、3回)。

### (4) ブロッキング

切片周囲の余分な水分をキムワイプ等で除去し、3%過酸化水素加メタノールに浸した(室温、10-15分間)後、PBSで洗浄した(室温、5分間、3回)。

### (5) 第一抗体の添加・反応

切片周囲の余分な水分を除去し、切片が完全に被われるように第一抗体を滴下した。室温で1時間、または4℃で一晩反応させた後、PBSで室温、5分間、3回洗浄した。

第一抗体には、T細胞検出用にヒストファイン CD3モノクローナル抗体(PS1)(株ニチレイバイオサイエンス)を、B細胞検出用にヒストファイン CD79 $\alpha$ モノクローナル抗体(HM57、希釈済抗体)(株ニチレイバイオサイエンス)をそれぞれ用いた。

### (6) 第二抗体の添加・反応

切片周囲の余分な水分を除去し、切片が完全に被われるようにヒストファイン シンプルステインラット MAX-PO (MULTI)(株ニチレイバイオサイエンス)を切片が完全に被われるように滴下した。室温で30分間反応させた後、PBSで室温、5分間、3回洗浄した。

### (7) 発色

切片周囲の余分な水分を除去した後、切片が完全に被われるようにシンプルステイン DAB 溶液(株ニチレイバイオサイエンス)を滴下し、室温にて5分間程度

反応させた。その際、顕微鏡で発色を確認しながら反応させた。反応が認められない場合、20分間で反応を停止させることとし、反応後は精製水でよくすすいだ。

#### (8) 対比染色

対比染色として、マイヤーヘマトキシリンを用いてDAB発色が見え易い程度に核染色し、水洗、脱水、キシレンによる透徹後、非水溶性封入剤で封入した。

### 3 結果及び考察

リンパ節は主にB細胞領域の皮質(cortex)とT細胞領域の傍皮質(paracortex), およびT細胞, B細胞, 形質細胞, 多数のマクロファージを含む中心域の髄索からなっている。<sup>3)</sup>

今回の試験では、CD79 $\alpha$ モノクローナル抗体(HM57)によって室温、1時間と4 $^{\circ}$ C、一晩のいずれの反応時間においてもB細胞領域において良好な染色が認められた。

(写真1, 2)しかし、CD3モノクローナル抗体(PS1)では室温、1時間の反応時間では染色は認められず(写真3), 4 $^{\circ}$ C、一晩にて若干の染色を認める程度であった(写真4)。

### 4 結論

今回の結果ではCD3モノクローナル抗体(PS1)の反応が弱かったものの、B細胞及びT細胞の染め分けが可能だったことから、今後、当部門における牛白血病検体への免疫組織化学染色の活用が可能であることが示唆された。ただ、上記でも述べたようにCD3マーカーにおける反応が弱かったことから、今後の課題として更なる検討が必要と思われた。

### 5 文献

- (1) 見上彪, 丸山務: 獣医感染症カラーアトラス, p130-132
- (2) 熊谷智生他: 牛白血病診断体制の見直しについて, 平成21年度食肉衛生技術研修会・衛生発表会資料, p.159-161
- (3) 日本獣医解剖学会: 獣医組織学改訂第二版, p.112-113

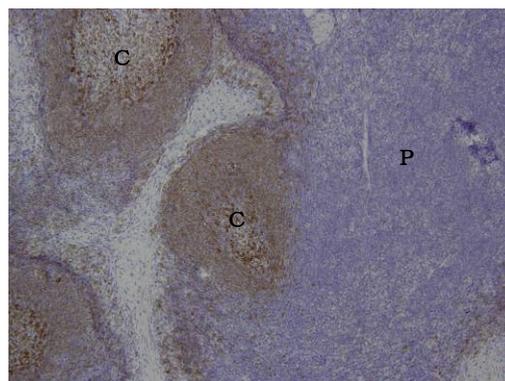


写真1: CD79 $\alpha$ ; 室温, 1時間

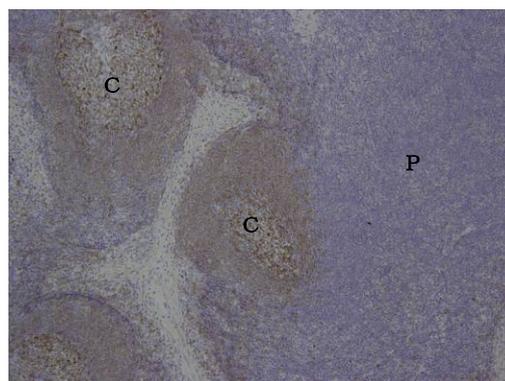


写真2: CD79 $\alpha$ ; 4 $^{\circ}$ C, 一晩

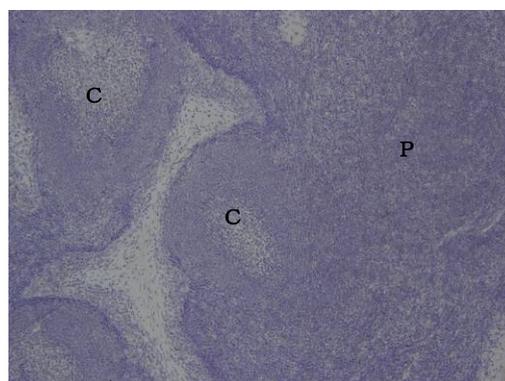


写真3: CD3; 室温, 1時間

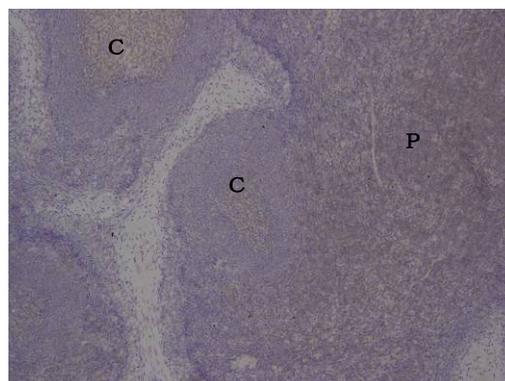


写真4: CD3; 4 $^{\circ}$ C, 一晩  
C:皮質, P:傍皮質