

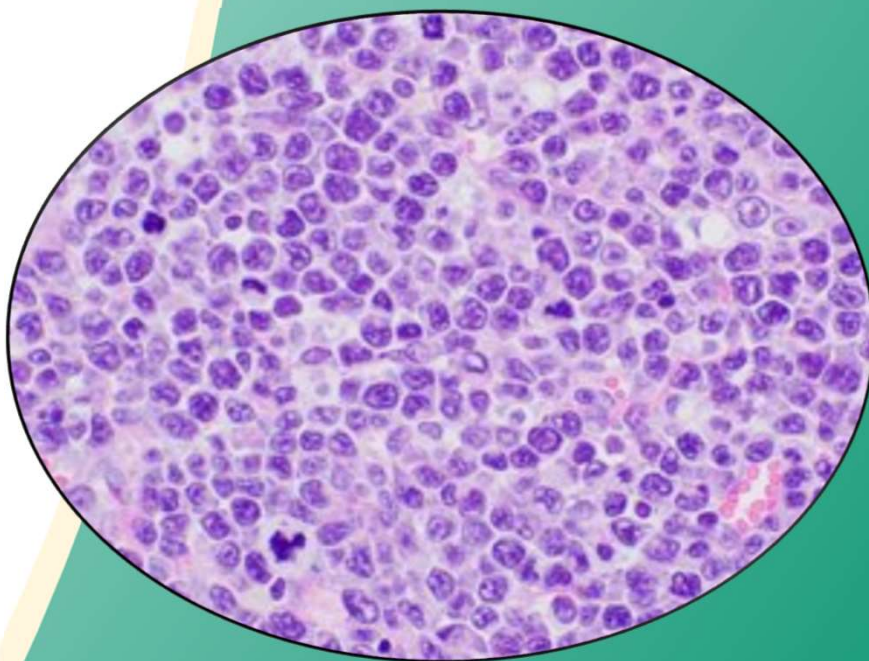
FUJIFILM

Value from Innovation

2023年1月28日

第27回 日本獣医がん学会
富士フイルムVETシステムズ株式会社協賛
ランチョンセミナー

犬猫のリンパ腫の 組織型分類の体系化と 臨床活用への取り組みについて



富士フイルムVETシステムズ株式会社

犬猫のリンパ腫の組織型分類の体系化と 臨床活用への取り組みについて

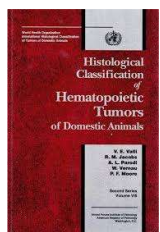
「共同研究の概要および集計報告」

富士フイルムVETシステムズ株式会社
二瓶和美

富士フイルムVETシステムズ株式会社

1

犬猫のリンパ腫



2002年
WHO

リンパ・造血器系
腫瘍分類

20年以上

イヌやネコのリンパ腫
に関する新しい知見が
散発的に報告

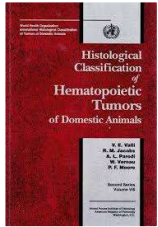
組織型分類を

- ・ 診断や治療に応用
- ・ 予後予測に応用

できるレベルでない

2

犬猫のリンパ腫



2002年
WHO

リンパ・造血器系
腫瘍分類

- ・組織検査が必要
- ・T/B分類が必要
 - 免疫染色
 - クローナリティ解析

リンパ腫診断の現状

多くの症例が細胞診
で確定診断
↓
人よりも進行した状態
で検査される

臨床に応用しにくい

富士フイルムVETシステムズ株式会社

3

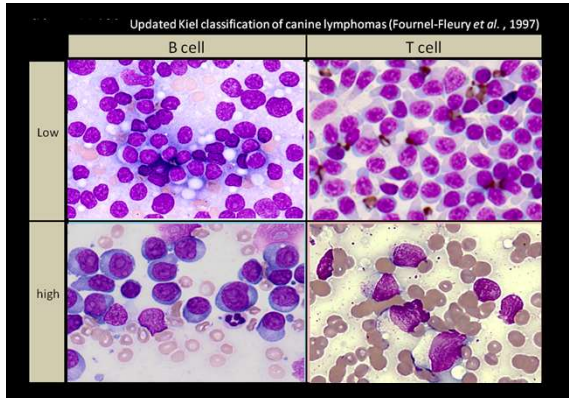
犬猫のリンパ腫で使われる分類

新Keil分類	細胞診で使える <ul style="list-style-type: none"> ・高グレードと低グレードに分類 ・T/Bもある程度分類
WHO分類	組織診や免疫染色が必要 <ul style="list-style-type: none"> ・組織型にもとづく悪性度分類 ・腫瘍を体系化するのに有用

富士フイルムVETシステムズ株式会社

4

犬猫のリンパ腫の診断と分類 (Kiel分類)



	B cell	T cell
Low	<ul style="list-style-type: none"> ・小型～中型 ・クロマチンは凝集 <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">成熟傾向のある細胞</div>	<ul style="list-style-type: none"> ・小型～中型 ・クロマチンは凝集 <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">成熟傾向のある細胞</div>
High	<ul style="list-style-type: none"> ・大きさは様々 ・クロマチンは繊細 	<ul style="list-style-type: none"> ・大きさは様々 ・多形性 ・クロマチンは繊細

富士フイルムVETシステムズ株式会社

犬猫のリンパ腫の診断と分類 (WHO分類)

T/NK細胞腫瘍

WHO組織分類	臨床的挙動	新Kiel分類
前駆T細胞腫瘍		
T細胞リンパ芽球型白血病/リンパ腫	Rapidly progressive	High
成熟T細胞およびN K細胞腫瘍		
大顆粒リンパ球増殖異常症 (LGL)		Low
T細胞慢性リンパ球性白血病	Slowly progressive	Low
T細胞大顆粒リンパ球性リンパ腫/白血病	Slowly progressive(dog) Aggressive(cat)	
N K細胞慢性リンパ球性白血病		
皮膚T細胞腫瘍		
皮膚上皮向性リンパ腫 (CEL)		
CEL、菌状息肉腫型	Locally aggressive, Slowly progressive	Low
CEL、バジネット様細胞腫瘍型 (ウォランジェ・コロップ (Woringer-Kolopp) 型)	Locally aggressive, Slowly progressive	Low
皮膚非上皮向性リンパ腫	Slowly progressive, Malignant, Multiple	Low
節外性/末梢性T細胞リンパ腫 (PTCL)		
PTCL、リンパ球混合型	Variable	
PTCL、炎症混合型	Variable	
成人T細胞様リンパ腫/白血病	Variable	
血管免疫芽球型リンパ腫 (AILD)		High
血管向性リンパ腫		
血管中心性リンパ腫	Locally aggressive,	
血管免疫性リンパ腫	Locally aggressive,	
腸管型T細胞リンパ腫	Slowly progressive	Low
未分化大細胞リンパ腫 (ALCL)	Rapidly progressive	High

富士フイルムVETシステムズ株式会社

犬猫のリンパ腫の診断と分類（WHO分類）

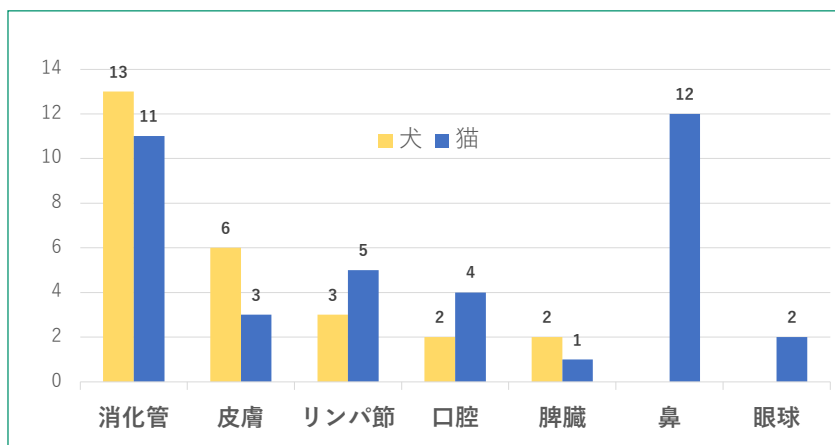
B細胞腫瘍		新Kiel分類
WHO組織分類	臨床的挙動	
前駆B細胞腫瘍		
B細胞リンパ芽細胞型白血病/リンパ腫	Rapidly progressive	High
成熟B細胞腫瘍		
B細胞慢性リンパ性白血病/リンパ腫	Slowly progressive	Low
B細胞リンパ性リンパ腫中間型 (LLI)	Slowly progressive	Low
リンパ形質細胞性リンパ腫 (LPL)	Slowly progressive	Low
濾胞性リンパ腫		
マンテル細胞リンパ腫 (MCL)	Slowly progressive	Low
濾胞中心細胞リンパ腫I	Slowly progressive	Low
濾胞中心細胞リンパ腫II	Slowly progressive	Low
濾胞中心細胞リンパ腫III	Slowly progressive	Low/High
節状辺縁帯リンパ腫	Slowly progressive	Low
脾辺縁帯リンパ腫	Slowly progressive	Low
節状性粘膜関連リンパ組織型辺縁帯B細胞リンパ腫 (MALTリンパ腫)	Slowly progressive	Low/High
有毛細胞白血病 (ヘアリー細胞白血病)	Slowly progressive	Low
形質細胞腫瘍		
緩進型形質細胞腫	Indolent	-
未分化型形質細胞腫	Locally aggressive, Slowly progressive	-
形質細胞骨髄腫	Slowly progressive, Malignant, Multiple	-
大細胞型B細胞リンパ腫		
T細胞豊富型B細胞リンパ腫	Slowly progressive	High
大細胞型免疫芽球性リンパ腫	Moderately aggressive	High
びまん性大細胞型B細胞 (非切れ込み核、切れ込み核) リンパ腫	Moderately aggressive	High
胸腺型B細胞リンパ腫 (腺様型B細胞)	Slowly developing	High
血管内大細胞型B細胞リンパ腫	Sudden onset	High
パーキット型リンパ腫		
高悪性度B細胞リンパ腫、パーキット様	Rapidly progressive	High

富士フイルムVETシステムズ株式会社

7

トライアル集計結果（発生部位）

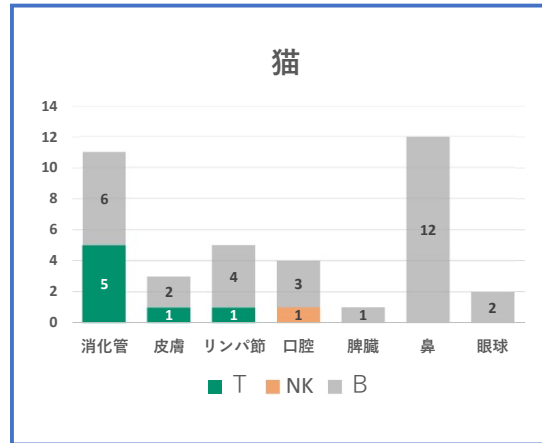
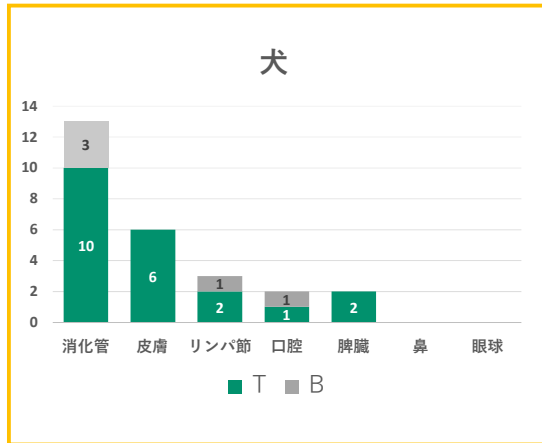
N = 75 (犬33例、猫42例)



富士フイルムVETシステムズ株式会社

8

トライアル集計結果（発生部位とT/B分類）



富士フイルムVETシステムズ株式会社

トライアル集計結果（組織型分類）

部位	T/B	組織型	犬	猫
消化管	T	peripheral T-cell lymphomas, NOS	5	2
		LGL lymphoma		1
		CD8+ peripheral T-cell lymphomas		1
	B	腸管型T細胞リンパ腫（小細胞性、上皮向性）		1
		peripheral T-cell lymphomas, mixed inflammatory type	3	
		Anaplastic Large cell Lymphoma	1	
脾臓	T	Tcell lymphoma, angiotropic	1	
	B	Diffuse large B-cell lymphoma	3	6
口腔	T	peripheral T-cell lymphomas, NOS	2	
	NK	Splenic marginal zone lymphoma		1
皮膚	T	epitheliotropic lymphoma	1	
		Angiotropic lymphoma / extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type		1
	B	Diffuse large B-cell lymphoma	1	3
		peripheral T-cell lymphomas, NOS	2	
リンパ節	T	Cutaneous nonepitheliotropic T/NK lymphoma	2	
		CD8+ 上皮向性リンパ腫	1	
	B	Anaplastic Large Tcell Lymphoma	1	1
		Diffuse large B-cell lymphoma	2	
鼻腔	T	peripheral T-cell lymphomas, NOS	1	1
	B	T-zone lymphoma	1	
眼球	B	T cell rich B cell lymphoma (Feline Hodgkin-like lymphoma)		2
		B-cell lymphoblastic lymphoma / B-cell chronic lymphocytic lymphoma	1	

B細胞性は
Diffuse large B-cell lymphoma
が多い

T細胞性は
peripheral T-cell lymphomas、NOS
が多い

富士フイルムVETシステムズ株式会社

トライアル集計結果（組織型分類）

部位	T/B	組織型	犬	猫
消化管	T	peripheral T-cell lymphomas, NOS	5	2
		LGL lymphoma		1
		CD8 + peripheral T-cell lymphomas		1
		腸管型 T 細胞リンパ腫（小細胞性、上皮向性）		1
		peripheral T-cell lymphomas, mixed inflammatory type	3	
		Anaplastic Large cell Lymphoma	1	
		Tcell lymphoma, angiotropic	1	
脾臓	B	Diffuse large B-cell lymphoma	3	6
	T	peripheral T-cell lymphomas, NOS	2	
口腔	B	Splenic marginal zone lymphoma		1
	T	epitheliotropic lymphoma	1	
皮膚	NK	Angiotropic lymphoma / extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type		1
	B	Diffuse large B-cell lymphoma	1	3
	T	peripheral T-cell lymphomas, NOS	2	
		Cutaneous nonepitheliotropic T/NK lymphoma	2	
		CD8 + 上皮向性リンパ腫	1	
B	Anaplastic Large Tcell Lymphoma	1	1	
リンパ節	B	Diffuse large B-cell lymphoma		2
	T	peripheral T-cell lymphomas, NOS	1	1
	T	T-zone lymphoma	1	
	B	T cell rich B cell lymphoma (Feline Hodgkin-like lymphoma)		2
鼻腔	B	B-cell lymphoblastic lymphoma / B-cell chronic lymphocytic lymphoma	1	
	B	Diffuse large B-cell lymphoma		2
眼球	B	Diffuse large B-cell lymphoma		2

CD8+細胞は細胞障害性細胞のため予後が悪い可能性がある

富士フイルムVETシステムズ株式会社

11

トライアル集計結果（組織型分類）

部位	T/B	組織型	犬	猫
消化管	T	peripheral T-cell lymphomas, NOS	5	2
		LGL lymphoma		1
		CD8 + peripheral T-cell lymphomas		1
		腸管型 T 細胞リンパ腫（小細胞性、上皮向性）		1
		peripheral T-cell lymphomas, mixed inflammatory type	3	
		Anaplastic Large cell Lymphoma	1	
		Tcell lymphoma, angiotropic	1	
脾臓	B	Diffuse large B-cell lymphoma	3	6
	T	peripheral T-cell lymphomas, NOS	2	
口腔	B	Splenic marginal zone lymphoma		1
	T	epitheliotropic lymphoma	1	
皮膚	NK	Angiotropic lymphoma / extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type		1
	B	Diffuse large B-cell lymphoma	1	3
	T	peripheral T-cell lymphomas, NOS	2	
		Cutaneous nonepitheliotropic T/NK lymphoma	2	
		CD8 + 上皮向性リンパ腫	1	
B	Anaplastic Large Tcell Lymphoma	1	1	
リンパ節	B	Diffuse large B-cell lymphoma		2
	T	peripheral T-cell lymphomas, NOS	1	1
	T	T-zone lymphoma	1	
	B	T cell rich B cell lymphoma (Feline Hodgkin-like lymphoma)		2
鼻腔	B	B-cell lymphoblastic lymphoma / B-cell chronic lymphocytic lymphoma	1	
	B	Diffuse large B-cell lymphoma		2
眼球	B	Diffuse large B-cell lymphoma		2

鼻腔リンパ腫は猫に好発し全てB細胞性

富士フイルムVETシステムズ株式会社

12

トライアル まとめ

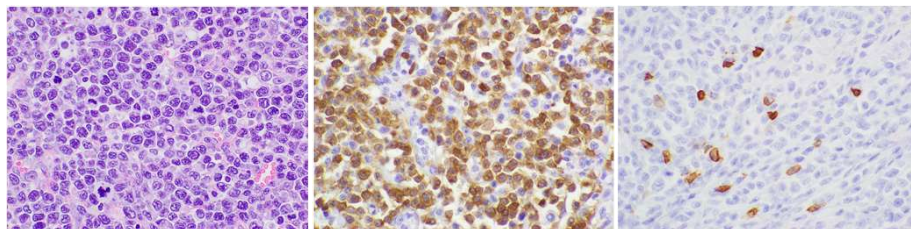
検査部位	犬猫…消化管 猫 …鼻腔 犬 …皮膚や皮下組織
免疫表現型	猫 …発生部位によらずB細胞性が多い 犬 …T細胞性が多い
組織型	B細胞性 犬猫ともにびまん型大細胞性B細胞性リンパ腫(DLBCL)が多い T細胞性 末梢性T細胞性リンパ腫(PTCL)が多い ※B細胞性よりも多様で分類に苦慮する症例もある ※DLBCLやPTCLはより詳細な分類が必要？

富士フイルムVETシステムズ株式会社

13

謝辞

弊社では、東京大学とリンパ腫細分類の共同研究を実施するにあたり、獣医病理学研究室の先生方の指導のもとHE標本や免疫染色の品質改善を実施いたしました。
この場を借りて御礼を申し上げます。



HE染色

CD3

CD20

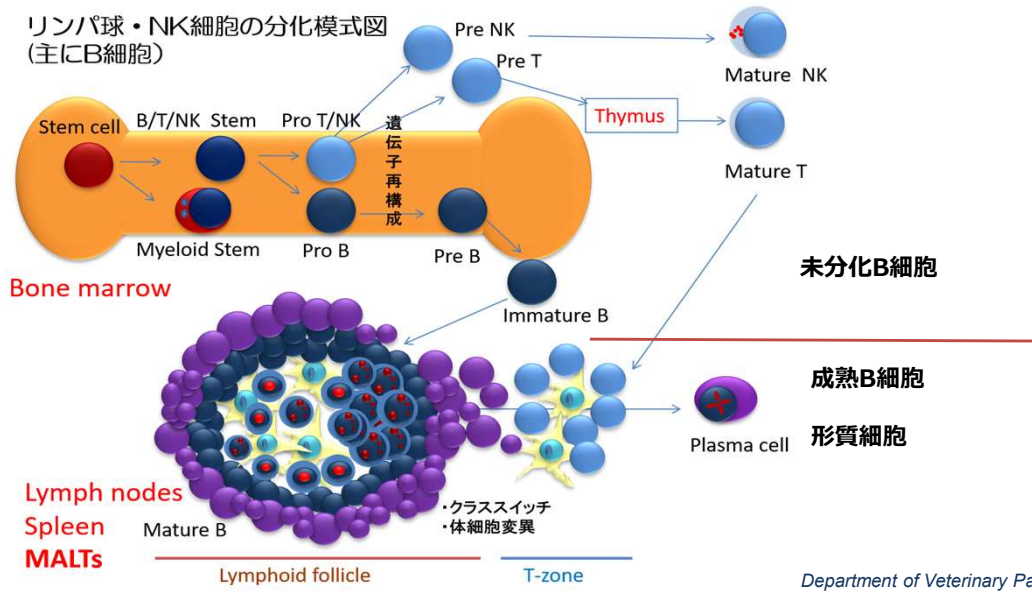
14

正確な動物のリンパ腫組織型分類のために

正確な動物のリンパ腫組織型分類のために

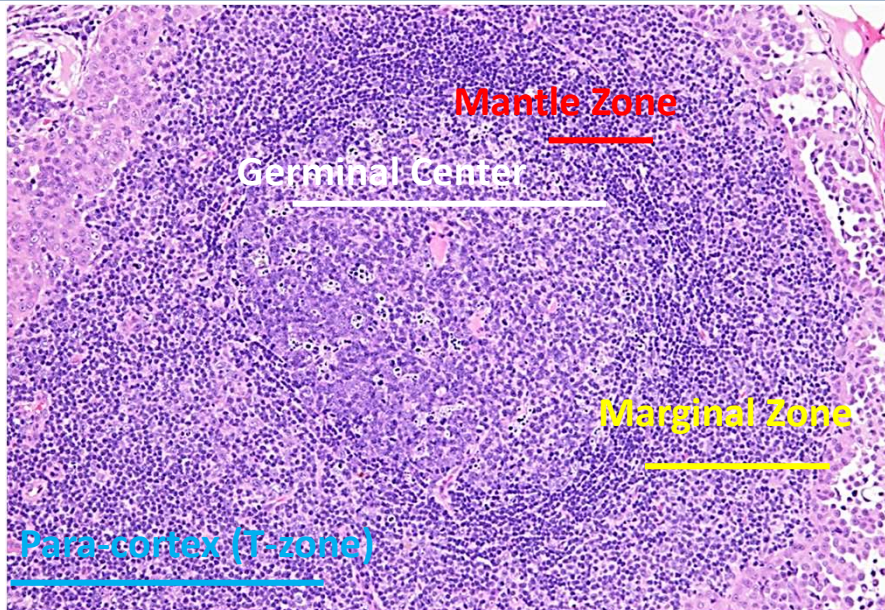
- ✓ リンパ腫分類のためのリンパ球分化の確認
- ✓ ヒトのリンパ腫vs動物のリンパ腫
- ✓ リンパ腫組織型分類の意義
- ✓ 臨床の先生方には是非お願いしたいこと

リンパ球・NK細胞の分化模式図 (主にB細胞)



3

リンパ節皮質 (リンパ2次濾胞) の組織構造



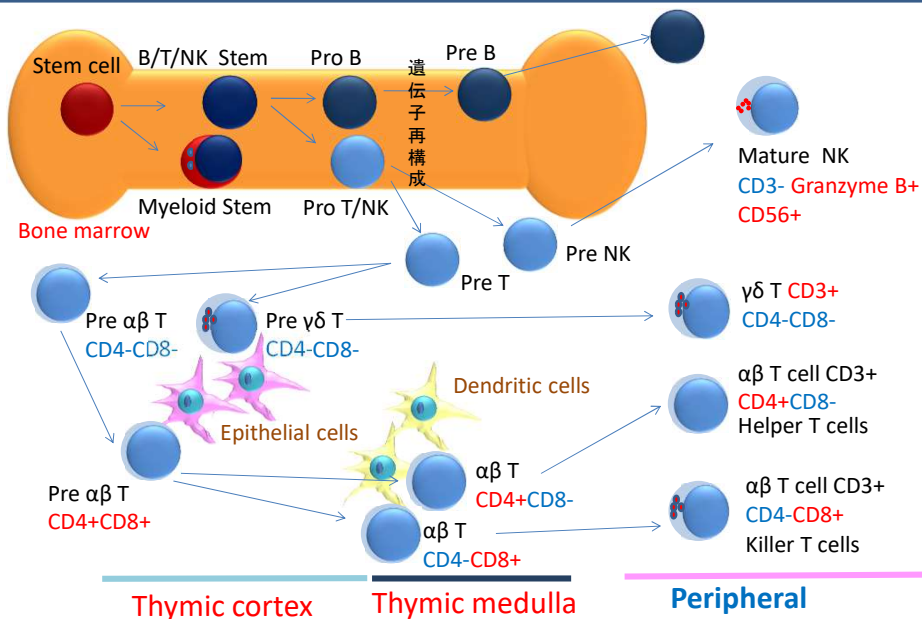
4

B細胞・形質細胞のマーカーと遺伝子再構成

骨髄			リンパ節・脾臓・MALT			
リンパ幹細胞	リンパ芽球		前リンパ球	成熟B細胞		形質細胞
	Pro-B	Pre-B	Immature B	Mature B	Activated B	
B細胞の前駆細胞			成熟前(抗原刺激前)のB細胞(マントル細胞等)		胚中心における抗原刺激を受けた後の細胞(大リンパ球等)	
TdT						
CD34						
			CD10			
			PAX5			
			CD20			
						MUM1
			CD79α			
			H鎖の遺伝子再構成(IgH)			

7

リンパ球NK細胞の分化模式図(主にT/NK細胞)



8

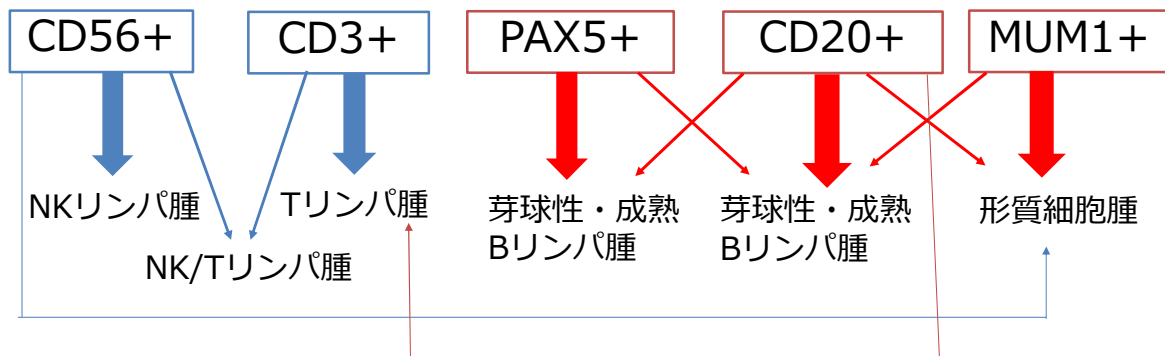
T/NK細胞性腫瘍の分類と基本的な増殖パターン

	低グレード (小型リンパ球)		中間～高グレード (小型～大型、時に多形性)		
	上皮向性	非上皮向性	血管向性	混合細胞性	高度浸潤性
分布					
特徴	成熟リンパ球が上皮内にびまん性あるいは巣状に増殖	成熟リンパ球が真皮・粘膜固有層に増殖する。	中間異型のリンパ球が血管周囲あるいは壁内に浸潤。	中間異型のリンパ球が他の白血球とともに浸潤増殖。	異型性と多形性の高いリンパ球が高度に浸潤増殖。
分類	皮膚上皮向性リンパ腫 消化管 T 細胞リンパ腫 (EATCL 様)	皮膚非上皮向性リンパ腫	血管向性リンパ腫	節外末梢 T 細胞性リンパ腫 (PTCL)	退形成性大細胞リンパ腫 (ALCL)

9

イヌやネコのリンパ腫分類にパラフィン標本で主に使用する一次抗体

CD56, CD3, PAX5, CD20, MUM1



10

正確な動物のリンパ腫組織型分類のために

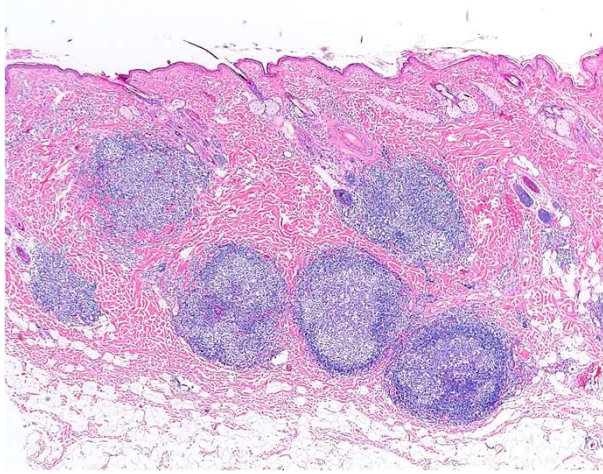
- ✓ リンパ腫分類のためのリンパ球分化の確認
- ✓ ヒトのリンパ腫vs動物のリンパ腫
- ✓ リンパ腫組織型分類の意義
- ✓ 臨床の先生方には是非お願いしたいこと

ヒトの原発性皮膚リンパ腫の分類

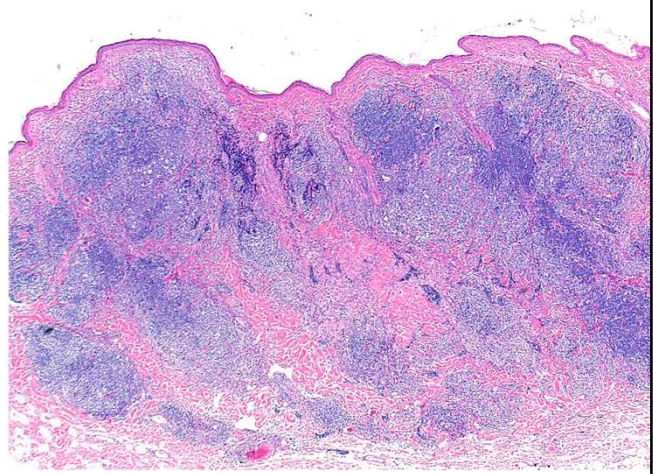
原発性皮膚B細胞性リンパ腫

- 原発性皮膚（節外MALT）辺縁帯リンパ腫
- 原発性皮膚濾胞中心リンパ腫
- 原発性皮膚びまん性大細胞型B細胞リンパ腫
- 血管内大細胞型B細胞リンパ腫下肢型（暫定分類名）

日本語名は皮膚悪性腫瘍ガイドライン第3版・皮膚リンパ腫診療ガイドライン2020参照

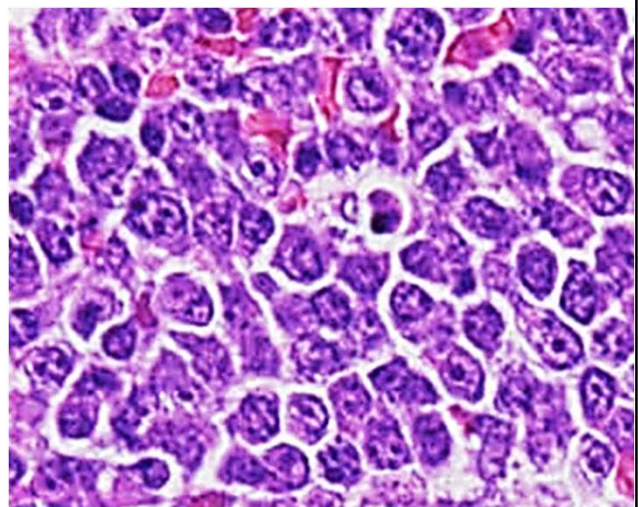
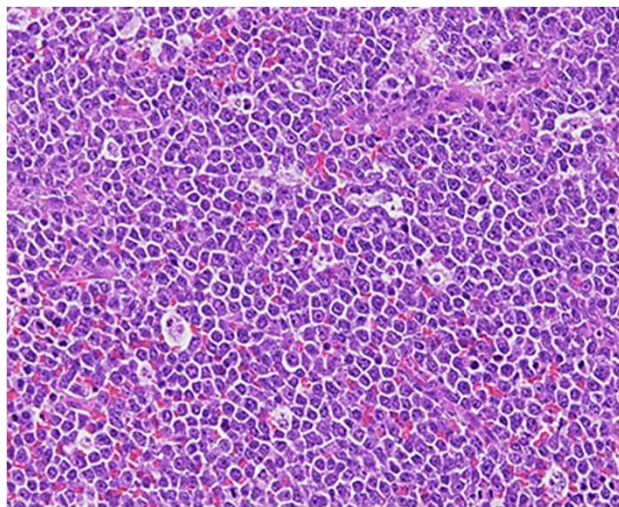


Lymphoid hyperplasia

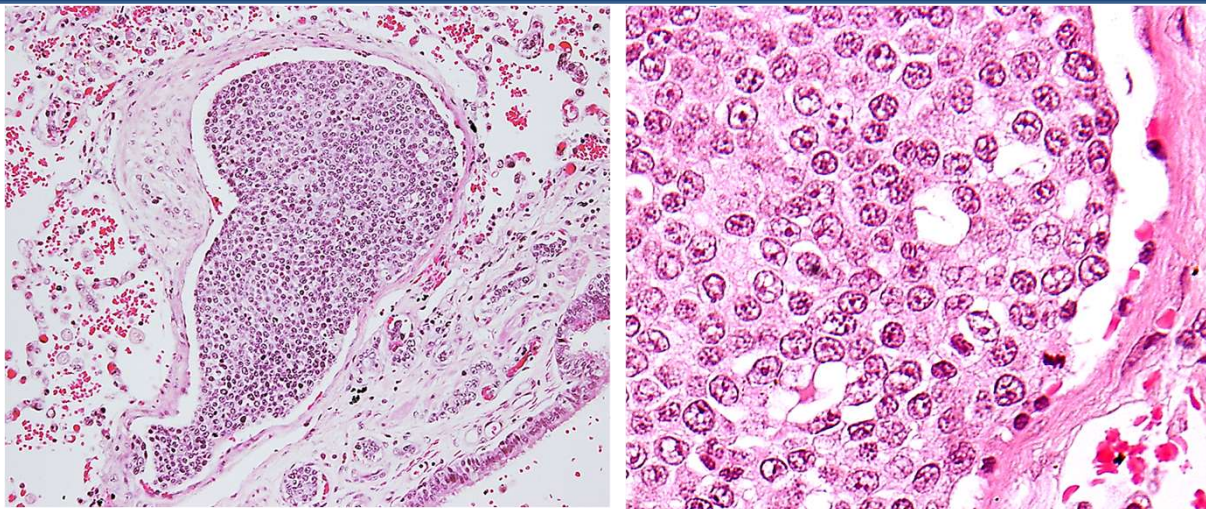


Low grade Lymphoma/lymphocytosis

Department of Veterinary Pathology



血管内大細胞型Bリンパ腫



イヌの血管内大細胞型Bリンパ腫の肺血管病変。肺の血管内に非常に大型の円形～不整形細胞の増殖が認められる。同疾患は**悪性血管内皮症**と呼ばれたが細胞表面抗原の検索により大細胞型B細胞リンパ腫に分類される。

15

ヒトの原発性皮膚リンパ腫の分類

皮膚T細胞・NK細胞リンパ腫（14型に分類）

菌状息肉症（Mycosis fungoides : MF）**CD4+細胞が主体**

菌状息肉症のバリエーションと亜型

毛包向性菌状息肉症

パジェット様細網症

肉芽腫様弛緩皮膚

セザリー症候群

成人T細胞白血病・リンパ腫

原発性皮膚**CD30**陽性リンパ増殖異常症

原発性皮膚未分化大細胞型リンパ腫

リンパ腫様丘疹症（Lymphomatoid papulosis）

皮下脂肪織炎様T細胞リンパ腫（**CD8**）

節外性 **NK/T** 細胞リンパ腫，鼻型（**CD56**）

種痘様水疱症様リンパ増殖異常症

重症型蚊刺アレルギー

原発性皮膚 $\gamma\delta$ T細胞リンパ腫

原発性皮膚**CD8**陽性進行性表皮向性細胞傷害性T細胞リンパ腫

原発性皮膚**CD4**陽性小型・中型 T細胞リンパ増殖異常症*

末梢性 T 細胞リンパ腫，非特定型(PTCL-NOS)

原発性皮膚末端型**CD8**陽性T細胞リンパ腫*

*：暫定的疾患単位

16

- 皮膚表皮向性リンパ腫
(Cutaneous epitheliotropic lymphoma: CEL)
CEL, 菌状息肉腫型
mycosis fungoides type (MF)
CEL, パジエット様細網症型
Pagetoid reticulosis type (PR)
セザリー症候群Sezary syndrome (SS)型
MF亜型：MF+白血病化

- 皮膚非表皮向性リンパ腫
(Cutaneous non-epitheliotropic lymphoma)

✓ イヌの表皮向性リンパ腫56例（MF; 39例、PR;16例、SS; 1例）の多くは、
CD8、あるいは $\gamma\delta$ 型TCRを発現。

Veterinary Dermatology, 2009, 20:569-576

Department of Veterinary Pathology

正確な動物のリンパ腫組織型分類のために

- ✓ リンパ腫分類のためのリンパ球分化の確認
- ✓ ヒトのリンパ腫vs動物のリンパ腫
- ✓ リンパ腫組織型分類の意義
- ✓ 臨床の先生方には是非お願いしたいこと

Department of Veterinary Pathology

表 10 皮膚リンパ腫の病型別予後 Willemze R 5³⁶⁾

皮膚 B 細胞リンパ腫	
原発性皮膚辺縁帯 B 細胞リンパ腫 **	99%
原発性皮膚濾胞中心リンパ腫	95%
原発性皮膚びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫, 下肢型	50%
原発性皮膚びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫, その他	65%

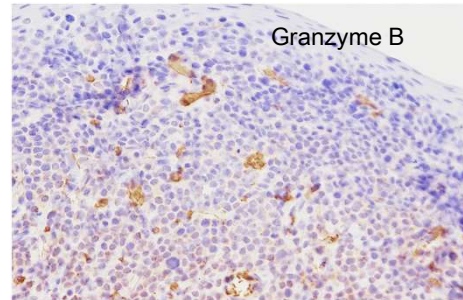
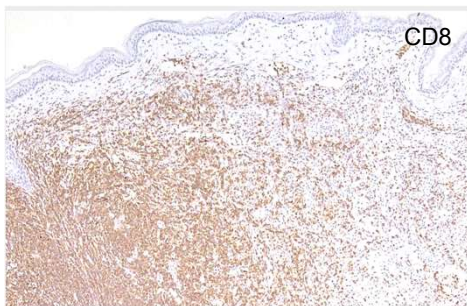
皮膚悪性腫瘍ガイドライン第 3 版・皮膚リンパ腫診療ガイドライン 2020参照

皮膚悪性腫瘍ガイドライン第 3 版・皮膚リンパ腫診療ガイドライン 2020参照

表 10 皮膚リンパ腫の病型別予後 Willemze R 5³⁶⁾

皮膚 T 細胞・NK 細胞リンパ腫	5 年生存率
菌状息肉症 CD4+細胞が主体	88%
菌状息肉症のバリエーションと亜型	
・毛包向性菌状息肉症	80%
・パジェット様細網症	100%
・肉芽腫様弛緩皮膚	100%
セザリー症候群	24%
成人 T 細胞白血病・リンパ腫	NR
原発性皮膚 CD30 陽性リンパ増殖症	
・原発性皮膚未分化大細胞型リンパ腫	95%
・リンパ腫様丘疹症	100%
皮下脂肪織炎様 T 細胞リンパ腫	82%
節外性 NK/T 細胞リンパ腫, 鼻型	NR
原発性皮膚末梢性 T 細胞リンパ腫, 非特定型	16%
・原発性皮膚進行性表皮向性 CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞リンパ腫	18%
・原発性皮膚 γδT 細胞リンパ腫	NR
・原発性皮膚 CD4 陽性小・中型多型性 T 細胞リンパ腫*	75%

	CD3	CD20	CD8	Granzyme B	TIA-1	FOXP3	HLA-DR
イヌ	15/15 100%	2/15 13%	12/15 80%	3/15 20%	2/15 13%	0/15 0%	14/15 93%
ネコ	4/4 100%	0/4 0%	1/4 25%	3/4 75%	3/4 75%	0/4 0%	1/2 50%



Department of Veterinary Pathology

ヒトのCD8陽性の皮膚リンパ腫

菌状息肉腫の一部 ?

- ・緩慢
- ・CD4が主体、CD8陽性も稀にあり
- ・細胞傷害性顆粒(TIA-1)陰性

12/15
CD8(+)
Granzyme B(-)/TIA-1(-)

原発性皮膚CD8陽性進行性表皮向性
細胞傷害性T細胞性リンパ腫

- ・進行性
- ・CD8陽性
- ・細胞傷害性顆粒(TIA-1)陽性

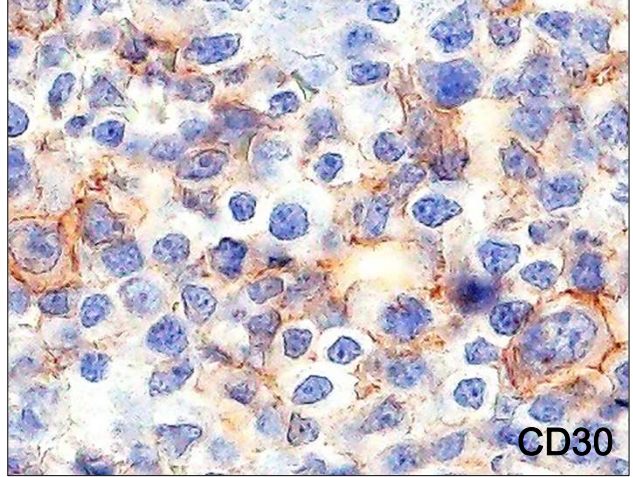
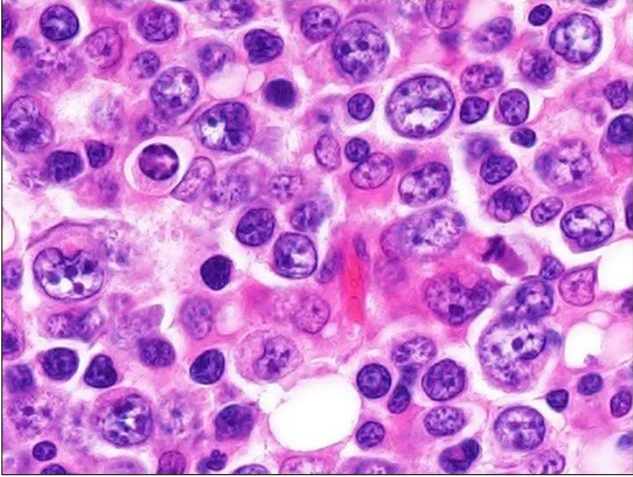
3/15
CD8(+)
Granzyme B or TIA-1(+)

イヌ・ネコの表皮向性リンパ腫

Department of Veterinary Pathology

Anaplastic large cell lymphoma

高い細胞異型性・多形性を示す退形成の著明なT細胞リンパ腫。CD30の発現を特徴とする。犬でも近年、皮膚や消化管ALCLのCD30発現に関する報告あり。



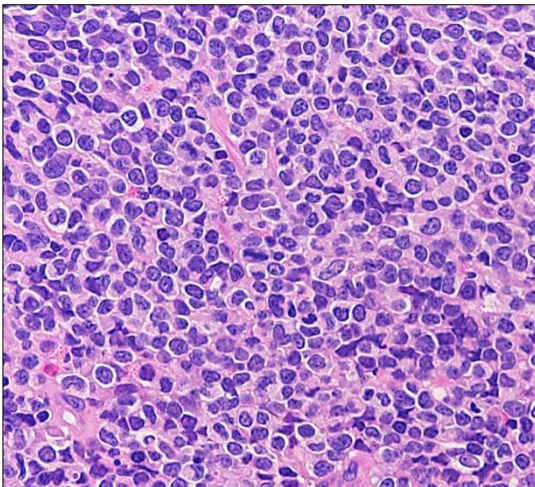
CD30

23

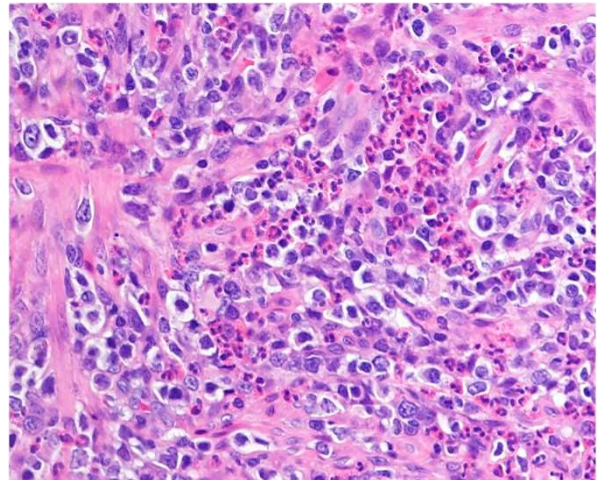
節外／末梢性T細胞リンパ腫（PTCL）

リンパ節外に発生するT細胞性リンパ腫で、B細胞や形質細胞が混合するものと主に好中球や好酸球等の顆粒球系細胞が混在するものに分類される。**TCRのクローン性解析が必要！！**

PTCL, 混合リンパ球型

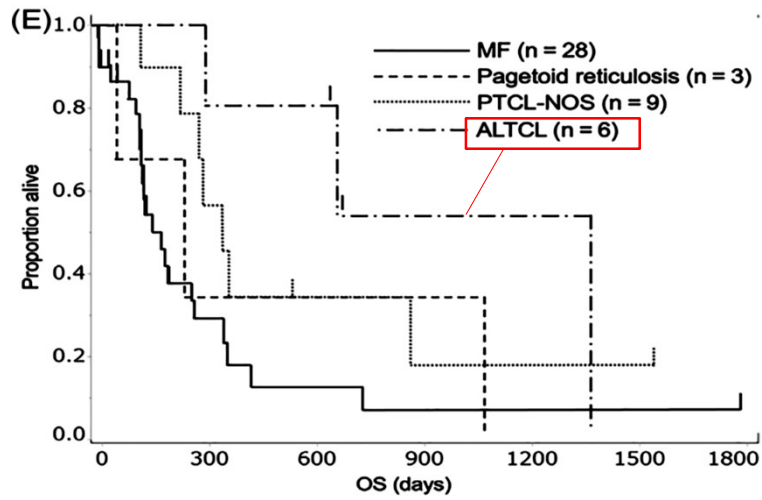


PTCL, 混合炎症型



24

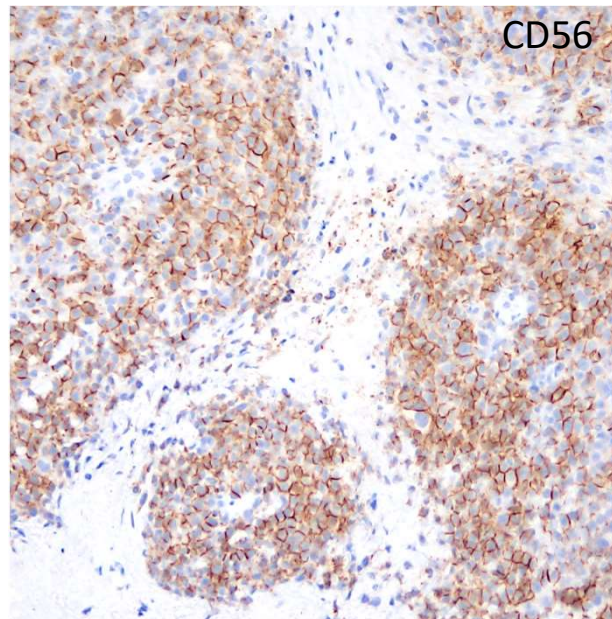
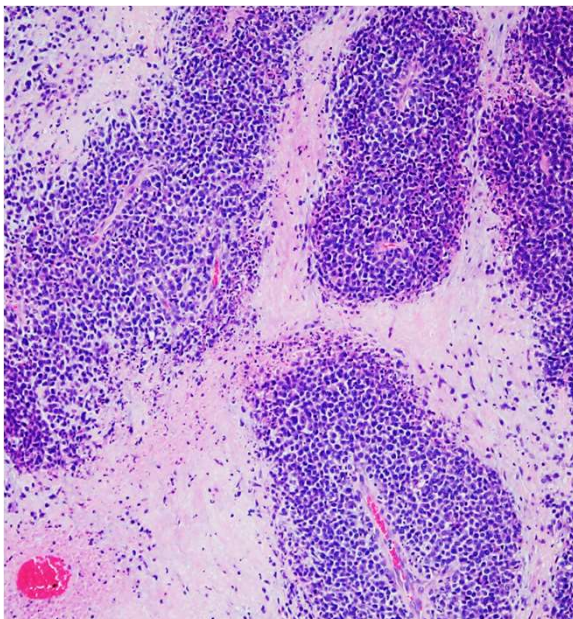
イヌの皮膚リンパ腫（46例）の組織診断別予後



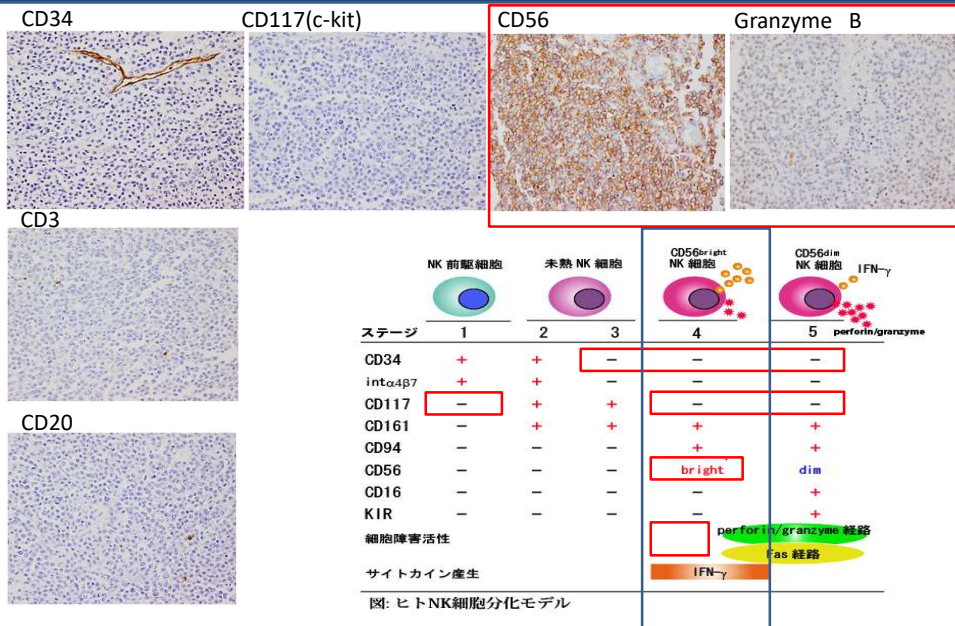
Azuma K, et al. Outcomes and prognostic factors in canine epitheliotropic and non-epitheliotropic cutaneous T-cell lymphomas. *Vet Comp Oncol.* 2021 Jul 11. doi: 10.1111/vco.12752., 2021

Department of Veterinary Pathology

Angiotrophic lymphoma (猫, 耳介部皮膚) 節外性鼻型NK/T細胞リンパ腫?



NK細胞の細胞表現型のパターン



27

正確な動物のリンパ腫組織型分類のために

- ✓ リンパ腫分類のためのリンパ球分化の確認
- ✓ ヒトのリンパ腫vs動物のリンパ腫
- ✓ +リンパ腫組織型分類の意義
- ✓ 臨床の先生方には是非お願いしたいこと

28

採取組織の固定（10%中性緩衝ホルマリン液による固定）

○良い例



- 解剖で採取したウザキの脳
- 組織に対し**10倍以上**の固定液に速やかに浸漬。
 - 手術材料は生食やPBSに浸漬しない。
 - 固定瓶は密閉可能な広口のものを使用する。
 - 消失しやすい小型組織はカセットで保存して固定。
 - 大型組織は翌日に切り出しを行う。

○よくある悪い例



- 悪性腫瘍のため断脚された犬の後肢の固定
- 固定液の容量不足。
 - 血液による固定液の混濁により固定力低下。
 - 容器が転倒しやすい。
 - 容器の密閉が困難。
 - 腫瘍組織に割面なし。

固定不良による染色性の著しい低下を招く。

採取組織の切り出し



- 包埋用カセットに入るサイズおよび厚みで組織を切り出す。
- 割面は必ず肉眼で観察し、可能であれば写真を残す。
- 切り出した組織は、新鮮な固定液で再度固定する。
- 本来はここまで作業を行い、病理診断の専門機関へ送付し、**固定期間は可能な限り3日以内**とすることが望ましい。

↓
組織の脱水・脱脂処理へ

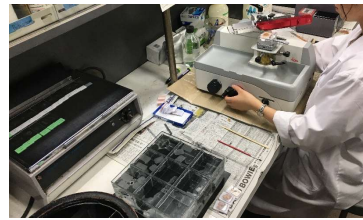
採取組織のパラフィン包埋と薄切

①脱水・脱脂



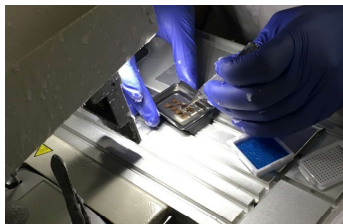
閉鎖式（左）と解放式（右）の自動包埋装置（ロータリー）。

③ミクロトームによる薄切



滑走式マイクロトームによる薄切。薄切標本はスライドガラスに貼付し乾燥させる。

②パラフィン包埋



融解したパラフィンに組織を包埋し、冷却してパラフィンブロックを作成。

④HE染色組織標本作製



エオジン液と染色カゴ（左）。HE染色組織標本と薄切後のパラフィンブロック（右）。



ホルマリン固定パラフィン包埋組織の 固定条件による遺伝子および 蛋白質解析の影響に関する研究



【症例】

- ・イヌ（M・シュナウザー）12歳5か月
- ・2020/1/24死亡。死後約1時間で病理解剖を実施、速やかに固定。
- ・下顎リンパ節を採材。
- ・病理解剖により、**T細胞性リンパ腫**、**組織球性肉腫**、**尿路上皮癌**と診断。

【固定方法】

- ・採材した下顎リンパ節を半割し、
10%中性緩衝ホルマリン液（10%NBF）、10%ホルマリン液（10%F）
に浸漬、固定。
- ・各サンプルをさらに3分割し、固定時間を2日、10日、30日とする。

【評価方法】

(1)免疫染色 (CD3、CD20、Iba-1、Ki-67)

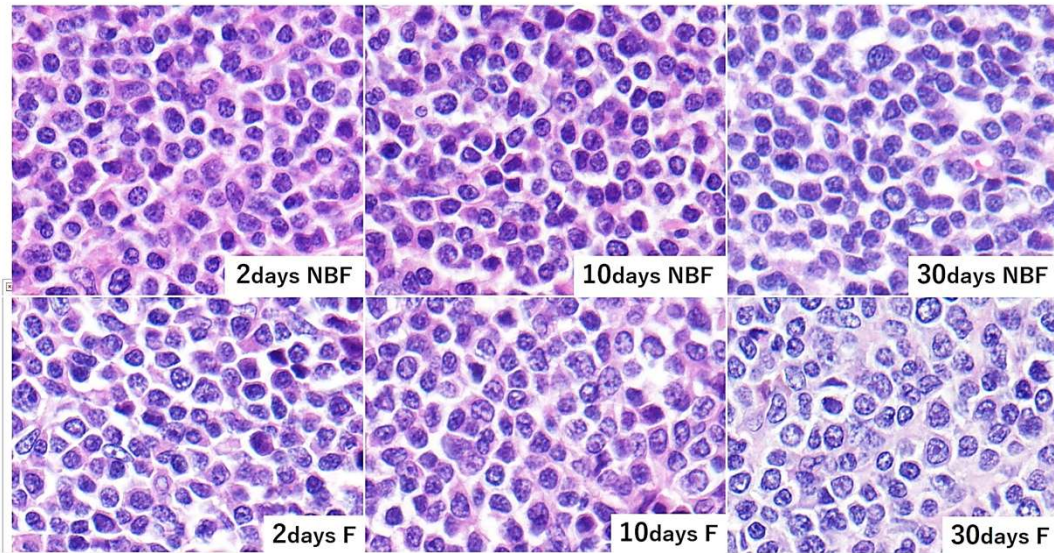
(2)遺伝子検査

- ・ DNAクオリティチェック
→キャピラリー電気泳動による解析
- ・ リンパ球クローン性解析検査
→PCR、シーケンサーによるフラグメント解析
- ・ BRAF遺伝子変異解析検査
→Digital PCRによる解析

(1) 免疫染色での評価

- ✓ 各固定条件に応じてブロック作製後、数日以内にFFPE切片を作製。
- ✓ 切片作製後、数日以内に免疫染色を実施。
- ✓ 最も良好な結果が得られると予想される2日固定サンプルの染色性を基準とし、10日固定、30日固定での発色時間を抗体に応じて統一する。
- ✓ HE染色と免疫染色の結果から、固定液や固定時間による染色性や形態的な変化の有無を調べる。

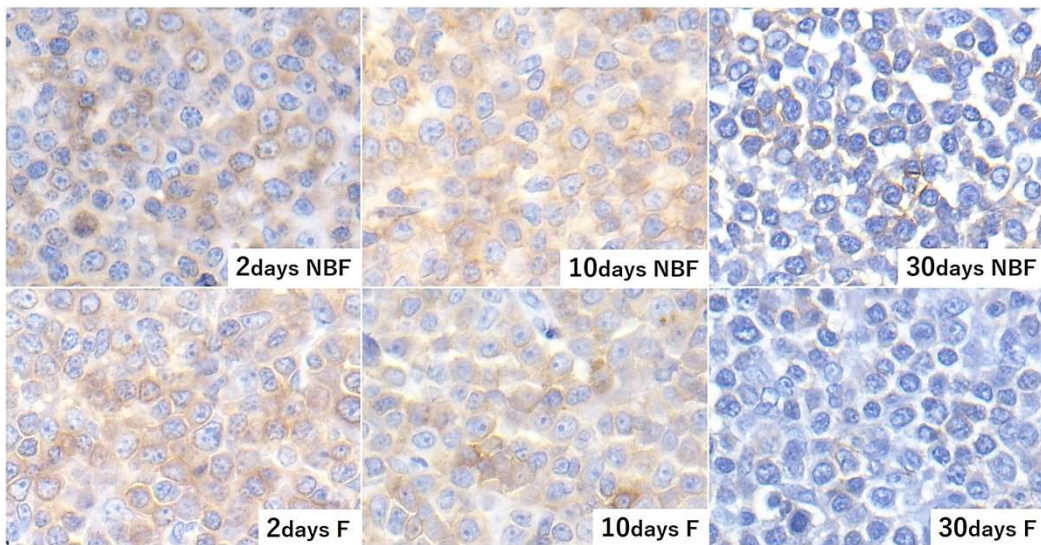
HE (強拡大)



Department of Veterinary Pathology

35

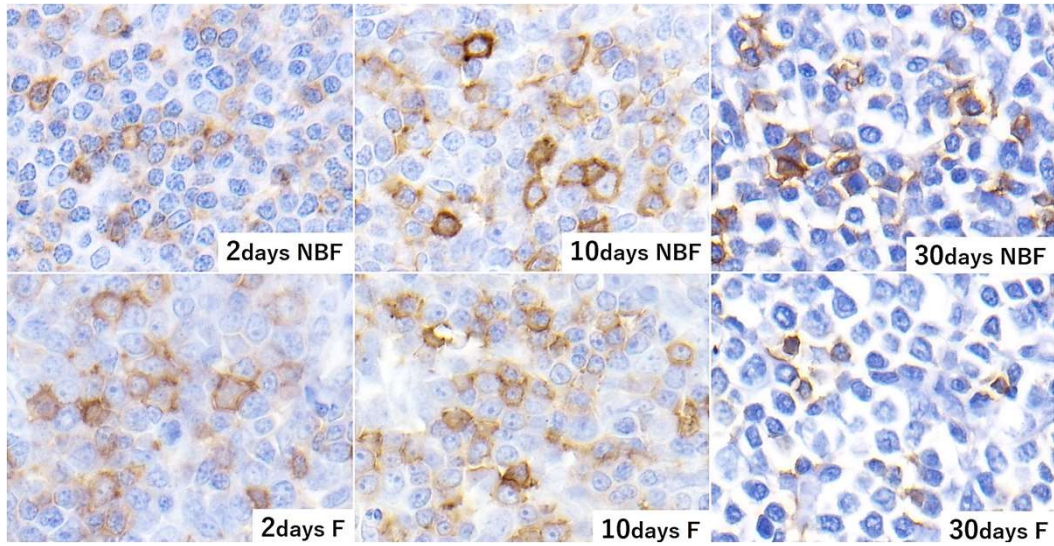
CD3 (強拡大)



Department of Veterinary Pathology

36

CD20(強拡大)

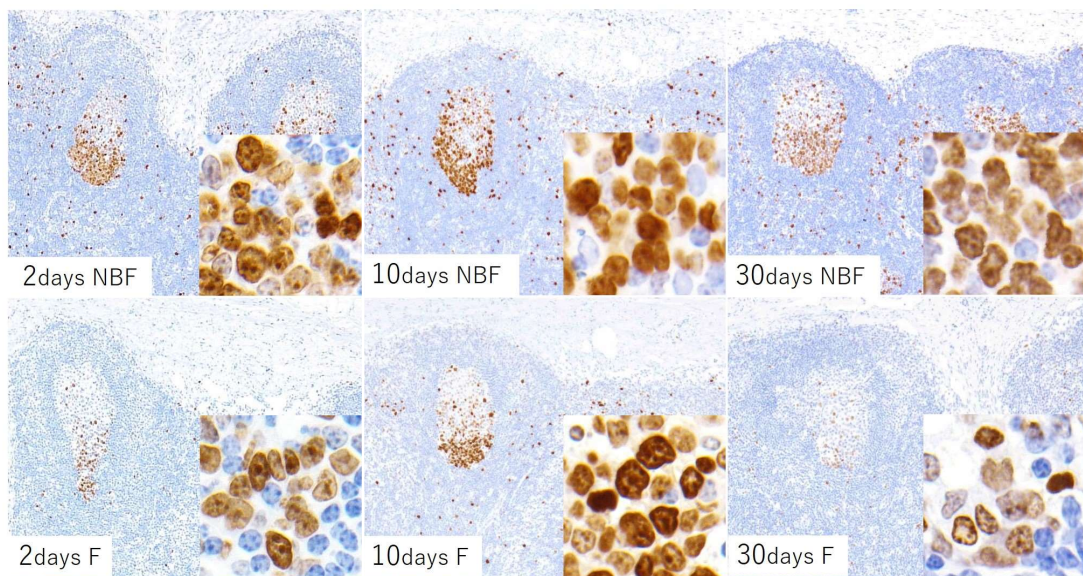


Department of Veterinary Pathology

37

Ki-67

ウシの内腸骨リンパ節



38

【免疫染色結果まとめ】

- ✓ 固定期間が10日以内の場合、非緩衝ホルマリン液の使用によりHE染色性と免疫染色性に明らかな変化は見られない。
- ✓ 固定期間が30日になると、緩衝液の使用の有無に関わらず、HE染色性と免疫染色性の低下が見られた。特にCD3、CD20、Ki-67の染色性の著しい低下が見られた。
- ✓ 非緩衝ホルマリン液の使用により、アーチファクト（細胞収縮）が見られた。

→固定期間は10日以内が望ましい。

正確な動物のリンパ腫組織型分類のために

- ✓ 細胞診のみではリンパ腫の組織型分類は不可。
- ✓ 正確な分類（NK、T、B、形質細胞など）には、最低限複数の抗体による免疫染色が必要。
- ✓ 明瞭な組織所見、免疫組織化学データ、およびPCR結果を得るためには適切な固定（中性緩衝ホルマリン液の適切な使用など）が必要。
- ✓ リンパ腫の組織型分類の意義を評価するためには診断後の予後調査が不可欠。

