

牛伝染性リンパ腫の迅速診断（第一報）

香川県東部家畜保健衛生所

○四宮有果、野崎 宏

はじめに

牛伝染性リンパ腫は悪性腫瘍疾患として届出伝染病に指定されている。牛伝染性リンパ腫ウイルス感染により引き起こされる地方病型（EBL）と、子牛型・胸腺型・皮膚型にわけられる散発型（SBL）の2つの型がある。全身性のリンパ節の腫大、消瘦、眼球突出などの症状があり、末梢血液中に異型リンパ球を認める。本報告は EBL の迅速診断を目的とする。

目的

香川県では生検による生体診断を行っており、生検トレパンを用いて検体を採取し、2分割に切り出しホルマリン固定パラフィン包埋標本（FFPE 標本）を作製する（図 1）。FFPE 標本は 10%ホルマリン 12 時間固定、自動包埋機で夜間に 14 時間包埋、包埋ステーションでの包埋ブロック作成に 30 分、薄切に 15 分、乾燥に 1 時間、自動染色装置を使用した HE 染色に 50 分、顕微鏡での鏡検・診断に 10 分。これらの作業は合計で 29 時間、診断までは 3 日を要する（図 2）。さらに、週末作業時は自動包埋機に検体を長時間薬液に浸漬するため、金・土・日曜日に使用できず、作業期間は最長で 6 日間を要する。これは、牛の飼育期間が最長 6 日間延長、農家の負担が増加することとなる。そのため、標本作製時間を短縮かつ正確な診断が可能な手法を検討した。



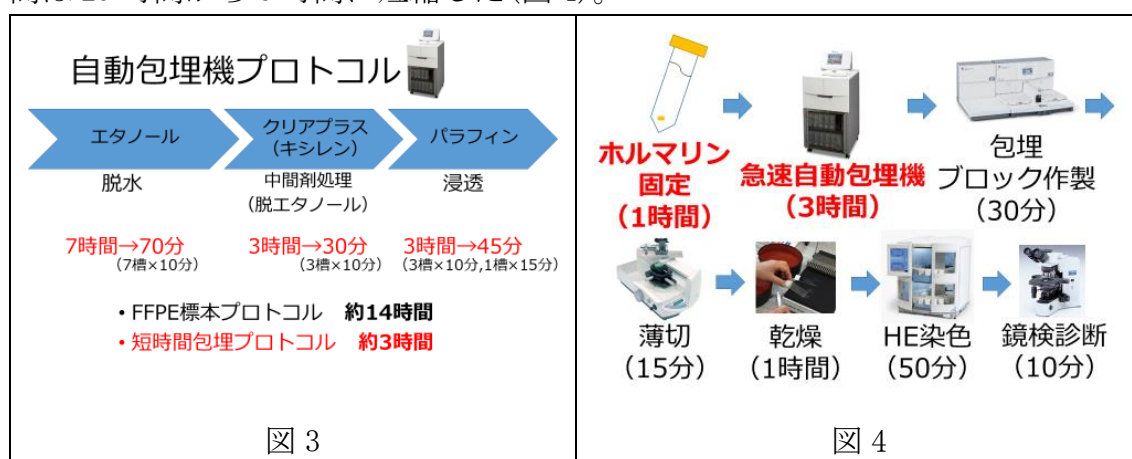
材料と方法

材料は令和 5 年度夏から令和 6 年度冬までの EBL 疑い生体診断依頼の検体を

用いた。標本作製には高品質の標本作製が可能な短時間 FFPE 標本作成法と非常に迅速な処理が可能な凍結標本作成法を検討した。

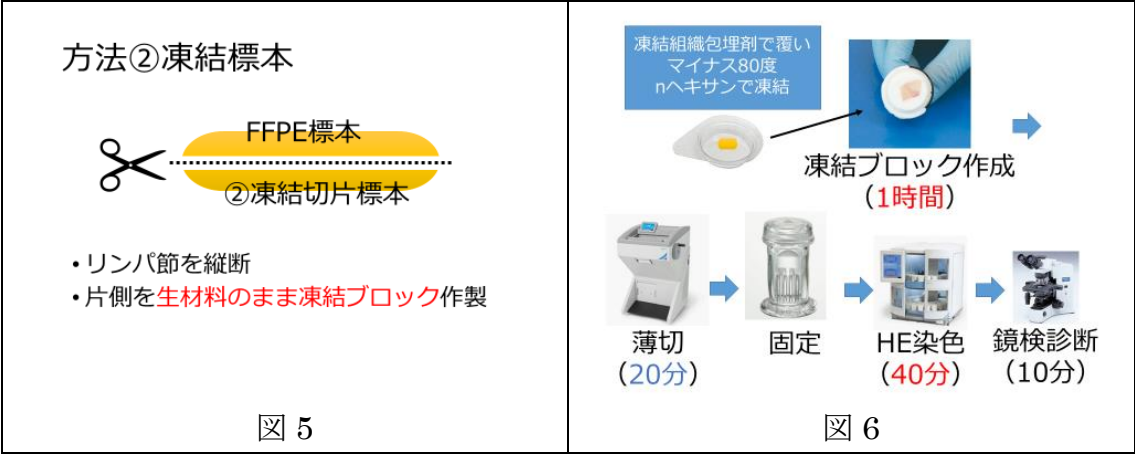
①短時間 FFPE 標本

FFPE 法は細胞及び組織構造が良好に保存され、高品質の染色が可能であるが固定やその後の処理時間に影響をうける。固定についてはホルマリンの浸透速度は 1mm/時間程度であるため、生検トレパンで採材した検体の端 2mm を切り出し、左右から 1 時間に 1mm ずつ浸透させることで、ホルマリン固定時間を 1 時間に短縮した。また、その後の工程は人の病理診断に使用される組織処理法を参考に、自動包埋機のプロトコルを約 3 時間に短縮し、パラフィン包埋ブロックを作成した (図 3)。その後は定法により薄切し、標本を作製した。標本作製時間は 29 時間から 6 時間に短縮した (図 4)。



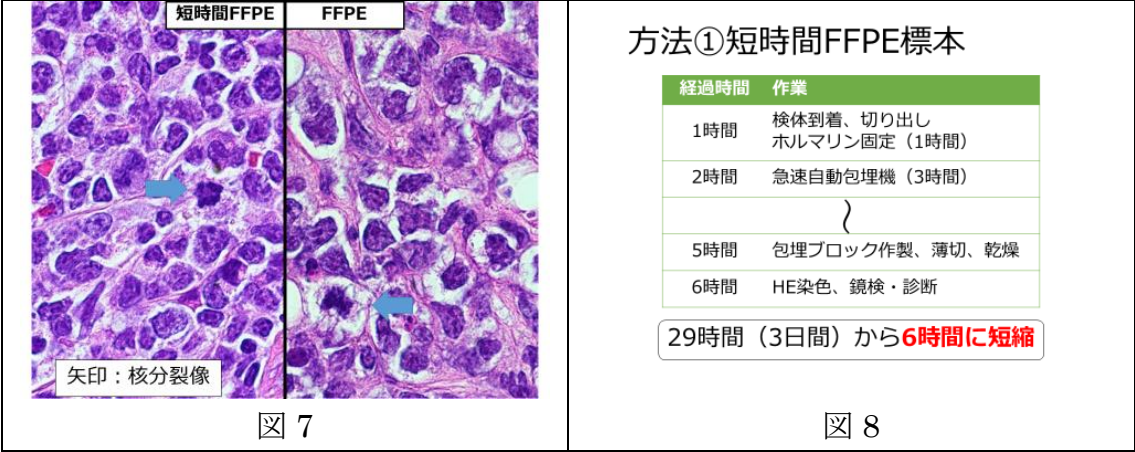
②凍結標本

凍結標本は非常に迅速な処理が可能であるが、凍結によるアーチファクトや固定、染色法による組織構造や細胞の不明瞭化を生じ、細胞鑑別が困難になることがある。今夏は、生検トレパンで採材した検体を 2 分割し、片側を利用し、凍結組織包埋剤で覆い、マイナス 80 度の n-ヘキサン中で急速凍結し、凍結ブロックを作成 (図 5, 6)。マイナス 20 度のクリオスタットで薄切を行った。薄切厚は 4 μ m、6 μ m、8 μ m の 3 種類。固定には容易に手に入り、比較的よく用いられるアセトン、メタノール、ホルマリン、ホルマリン加メタノールの 4 種類。固定後は HE 染色を行った。

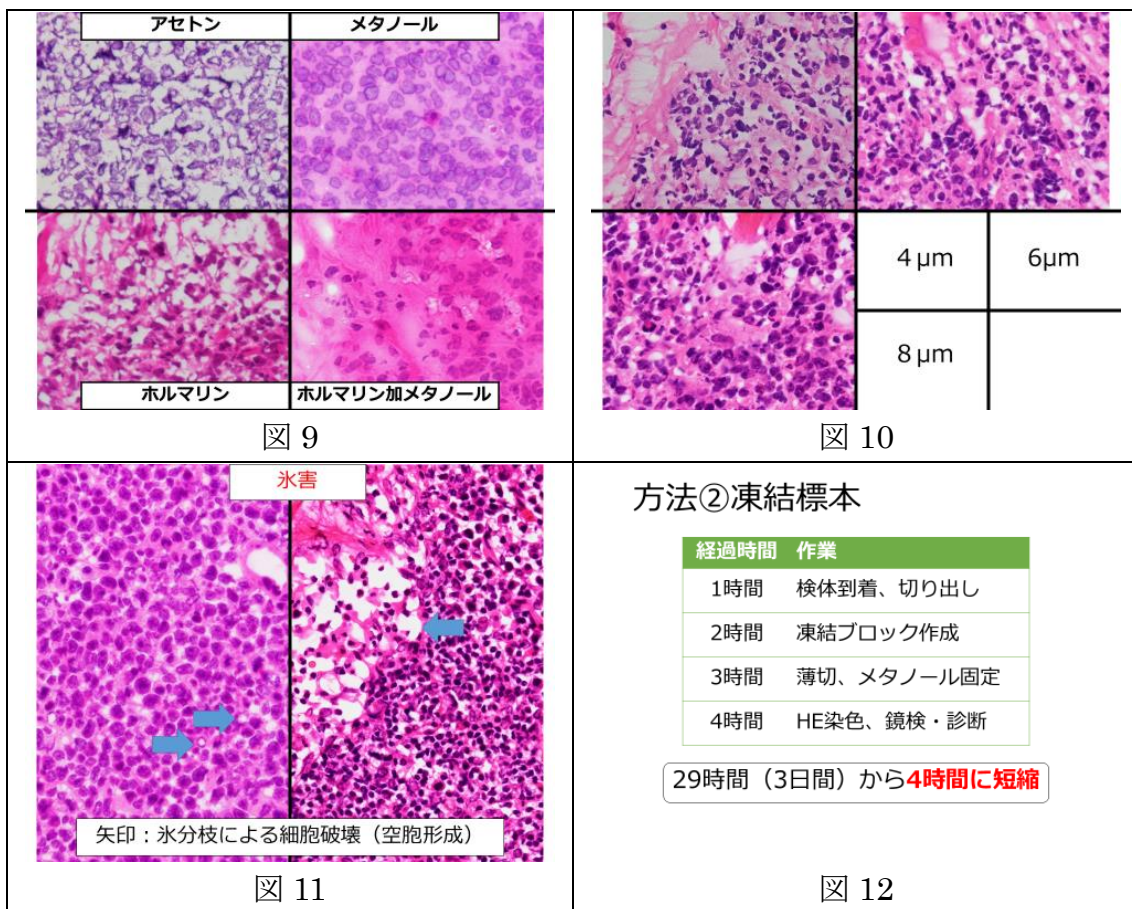


結果

①短時間 FFPE 標本では、FFPE 標本と比較して遜色のない標本が作製された (図 7)。標本作製時間は 6 時間に短縮され、検体持ち込み時間によっては当日中の診断も可能となった (図 8)。



②凍結標本では、固定液はメタノールのみ細胞形態が良好に維持され、薄切厚 $8\mu\text{m}$ が細胞形態の観察が容易であった (図 9、10)。しかし、FFPE 標本に比べ氷害による空隙形成など、細胞形態の変化が強く、正確な診断を行うことが難しかった (図 11)。標本作製時間は 4 時間に短縮された (図 12)。



まとめ

EBL の迅速かつ正確な診断のための標本作製手技を検討した。①短時間 FFPE 標本は仕上がりに問題はなく、標本作製時間も 6 時間に短縮され、実用化可能な結果であった。②凍結標本は標本作製時間が 4 時間と大幅に短縮されたが、細胞形態維持が難しく氷害など仕上がりに問題が認められたことからさらに主義の改良が必要であると思われた。