

豚リンパ球のマーカーとしての酸性フォスファターゼ

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	清水, 俊夫
巻/号	41巻11号
掲載ページ	p. 814-817
発行年月	1988年11月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



豚Tリンパ球のマーカーとしての酸性フォスファターゼ

清水俊夫*

(昭和63年9月16日受理)

Cytochemical Study on the Swine Lymphocyte Acid
Phosphatase as T-cell Marker

TOSHIO SHIMIZU (Tokushima Health Center, Tokushima Prefecture,
Shinkura, Tokushima 770)

SUMMARY

Acid phosphatase activities, used in the diagnosis of human and bovine leukemia as a marker of T cell population, were studied on the lymphocytes separated from clinically healthy pigs. The ratio of acid phosphatase activity positive cells was clearly higher in rosette forming lymphocyte (43.6 ± 5.7%) than in non-rosette forming cells (11.6 ± 4.8%). Among the seven cases of swine leukemia (multicentric type: 6 cases, thoracic type: 1 case), found during meat inspection processes in Tokushima city Shokuniku center abattoire and Nippon meat packer's Tokushima abattoire, the acid phosphatase activity was detected in tumor cells and/or lymphocytes from 2 cases of multicentric type and 1 case of thoracic type.

These results indicated that the cytochemical staining of acid phosphatase activity could be applicable to the diagnosis of swine leukemia as a T cell marker.

要 約

人および牛などにおいて、Tリンパ球の細胞化学的マーカーとして用いられている酸性フォスファターゼ (Acp ase) 活性を豚の場合にも適用できるかどうか検討した。と殺前検査において正常と認められた豚の放血液から分離したリンパ球分画をさらにロゼット形成および非形成リンパ球分画に分離した。これらの両分画について、細胞化学的にAcp ase活性を検索すると、ロゼット形成リンパ球分画では非形成リンパ球分画に比較して約4倍高いAcp ase活性陽性率を示した。また、7例の豚全身性リンパ肉腫症例についてAcp ase活性を検索し、3例の腫瘍細胞あるいは残存血中の腫瘍性リンパ球にAcp ase活性を認めた。

このように、Acp ase活性は豚においてもTリンパ球の細胞化学的マーカーとして有効であり、豚全身性リンパ肉腫の細胞学的な診断に適用可能であることが示唆された。

家畜の全身性リンパ肉腫の病理学的研究には腫瘍細胞の由来を明らかにすることが重要であり、1974年 JARETTE と MACKAY⁴⁾により腫瘍についての組織・細胞学的分類が提起されている。しかし、豚の全身性リンパ肉腫については発生頻度が低く⁸⁾、また、と殺後に発見されることが多いため臨床的に注目されることが少ない。したがって、その分類についても、通常、解剖学的分類が行われているにすぎない。しかし、ここ数年来、徳島保健所管内のと畜場において発見される豚全身性リンパ肉腫の症例数は、それ以前と比較して増加してきており、また、この傾向は今後も続くことが予想されるため、よ

り詳細な細胞学的把握を試みることは急務であり有意義なことと考えられる。

いっぽう、免疫学の発展にともない全身性リンパ肉腫の主体となるリンパ球は、その機能および膜表面の性質により、Tリンパ球、Bリンパ球および非T非Bリンパ球 (Null cell) に分類されている。これらのリンパ球を鑑別するためには、それぞれのリンパ球に特異的な抗体を用いる蛍光抗体法を含めて種々の方法が提案され用いられている。しかし、その中には、特殊な技術を必要としたり、高価な機器あるいは試薬を用いなければならないため、と畜検査などにおいて日常的に用いるには不向きなものが多い。Tリンパ球の鑑別については、羊赤血球をはじめとする異種赤血球とのロゼット形成が最も基本的

* 徳島県徳島保健所 (徳島市新蔵町3丁目)

なマーカーとして従来から用いられてきた。しかし、ここ10年程前から酸性フォスファターゼ (Acp ase) や α -ナフチルアセテートエステラーゼ (ANAE) などのリンゾーム酵素の活性をTリンパ球のマーカーとして用いる簡便な細胞化学的鑑別法が用いられるようになり、その有効性については、すでに人^{5,12,13)} および牛¹⁴⁾での報告がある。

ここでは、豚全身性リンパ肉腫の細胞学的把握にAcp aseによるTリンパ球の鑑別法を適用するため、豚リンパ球のロゼット形成能とAcp ase活性との相関について検討した。

さらに、徳島保健所管内の2ヶ所のと畜場において発見された7例の豚全身性リンパ肉腫について、その腫瘍細胞あるいは残存血中の腫瘍性リンパ球のAcp ase活性を検索した。

1. 材料と方法

1) 血液の採取

と殺前検査において正常と認められた約6カ月齢の交雑種の雌あるいは去勢豚8頭の放血液を用いた。血液の採取に際しては、抗凝剤としてAnglot/ET(日本商事・大阪)を全血1mlに対し1滴の割合で用いた。血液は採取後ただちに氷冷し、2時間以内に供試した。

2) ロゼット形成

(1) リンパ球および羊赤血球浮遊液の調整：採取した血液からFicoll-Paque (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden, 比重1.077, 以下FPと略す)を用いBøyumの方法²⁾により、主としてリンパ球および単球を含む分画を分離した。この分画をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)により洗浄した後、細胞濃度をPBS 1mlあたり 5×10^6 個に調整し、これを全リンパ球分画とした。羊赤血球は市販のもの(日本バイオテスト研究所・東京)を用い1 vol. %になるように6カ月齢以下の牛胎児血より調整した血清に浮遊させた。この際血清はあらかじめ56°C 30分処理したものをを用いた。

(2) ロゼット形成：Layらの方法⁹⁾をやや変更した方法を用いて行った。全リンパ球分画および羊赤血球浮遊液をそれぞれ0.5mlずつ混合し、37°C 15分インキュベートし、400Gで5分遠心後、そのまま4°Cで60分静置しロゼットを形成させた。ロゼット形成率は沈澱した血球成分を再浮遊させた後、その1滴を取り血球計算盤上で測定した。

3) Acp ase 活性染色

ロゼット形成細胞を含む血球浮遊液をFPに重層し、400gで30分遠心し中間層(ロゼット非形成リンパ球分画)および下層(ロゼット形成リンパ球分画)を分離、採集した。これらの両分画に冷蔵庫で保存しておいた0.83%塩化アンモニウムと0.173M トリシュー酸緩衝

液(pH 7.65)を9:1に混合した液を加え、ただちに240Gで10分間遠心した。細胞沈澱をPBSにより2回洗浄し、牛胎児血清に浮遊させたものを試料として塗抹標本を作製した。標本は冷40%アセトン-20%ホルマリン加0.03Mクエン酸緩衝液(pH 4.2)により1分間固定後、氷冷した蒸留水で3分ごとに3回洗浄して染色に供した。

Acp ase 活性染色はBarka-Anderson 渡辺変法¹⁾により行った。反応液はパラロズアニリン溶液0.5mlに4%亜硝酸ナトリウム溶液を等量加えて調製したヘキサゾニウム・パラロズアニリン溶液を、1mg/mlになるように0.1M酢酸緩衝液(pH 5.0)10mlに加えた後、1N NaOHであらためてpHを0.5に調整し、蒸留水で20mlにしたものを用いた。染色は37°Cで60分行った。染色後、蒸留水で3分ごとに2回洗浄した後、1%メチルグリーンにより核染色を行った。以後、型のごとく脱水、透徹後HSR(国際試薬、神戸)にて封入した。

細胞質内に、1個ないし数個の赤色点状あるいは微細顆粒状の反応産物の沈着を示す細胞をAcp ase活性陽性とし、300ないし400個のリンパ球を観察して陽性率を求めた。また、単球もAcp ase活性を示すのでリンパ球との鑑別のため、同時にペルオキシダーゼ活性の染色を行い、単球の混入を補正した。

4) 全身性リンパ肉腫豚の腫瘍細胞および残存血中の腫瘍性リンパ球のAcp ase活性の検索

昭和59年11月から昭和61年8月の間に徳島保健所管内の徳島市食肉センターと畜場および日本ハム徳島工場附設と畜場において、と殺後、全身性リンパ肉腫と診断された7例について、その腫瘍細胞あるいは残存血中の腫瘍性リンパ球のAcp ase活性を検索した。

肉眼的に明らかな肉腫化を示し、かつ壊死、出血等の変化のないリンパ節から安全カミソリを用いて $10 \times 10 \times 1$ mm程度の組織片を切り出し、1%牛血清アルブミン(ワコー純薬・大阪)加PBS 10ml中で静かに揺り動かして腫瘍細胞を浮遊させた。240g 10分遠心後上清を捨て、再びこの洗浄を行った後、わずかに残った上清と沈澱を混和し、その1滴をスライドグラスに滴下し、塗抹標本を作製した。

外腸骨静脈あるいは空腸静脈より残存血の採取されたものについては、常法にしたがって塗抹標本を作製した。

風乾後、塗抹標本を前述した方法によって固定し、Acp ase 活性染色を行った。

Acp ase 活性の判定は、腫瘍細胞あるいは残存血中のリンパ球を観察し、形態学的に明らかな腫瘍細胞と認められた細胞の細胞質内に赤色の沈着を示したものを陽性とした。

2. 結 果

1) ロゼット形成および非形成リンパ球分画における Acp ase 活性の検索

写真1に豚放血液より FP を用いて分離したリンパ球のロゼット形成を示す。全リンパ球分画の羊赤血球に対するロゼット形成率は平均で 20.4% (n=4) であった。写真2は、Acp ase 活性陽性細胞を示している。このように、細胞質内に1個または数個の赤色点状あるいは微細顆粒状の反応産物が認められる。表1に示すようにロゼット形成リンパ球分画では、ロゼット非形成リンパ球分画に比べて平均で4倍高い Acp ase 活性陽性率を示し、統計学的にも有意差が認められた (P<0.01)。また、全リンパ球分画における Acp ase 活性陽性率と比較しても、わずかであるが高い陽性率を示している。

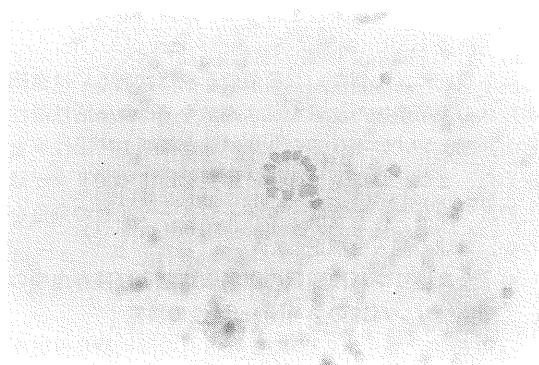


写真1 豚リンパ球ロゼット形成

表1 末梢リンパ球における酸性フォスファターゼ活性陽性細胞の検出

リンパ球分画	酸性フォスファターゼ活性陽性細胞率 (平均±SD, %)
全リンパ球分画 (n=8)	32.1±5.4
ロゼット形成リンパ球分画 (n=8)	43.6±5.7
ロゼット非形成リンパ球分画 (n=7)	11.6±4.8

表2 調査した豚白血病症例

症例	性別	年齢 (年)	系 統	解剖学的分類	酸性フォスファターゼ活性*		
					判定	腫瘍組織 (%)	残在血 (%)
1	♂	2	ランドレース系	多中心型	-	1.3	ND**
2	♀	1/2	ハンブ系	多中心型	-	0.6	ND
3	♂	1/2	交 雑 種	多中心型	-	0	ND
4	♀	2	ランドレース系	多中心型	-	0	3.8
5	♀	1/2	交 雑 種	多中心型	+	85.0	78.0
6	♀	1/2	交 雑 種	多中心型	+	54.0	ND
7	♀	1/2	交 雑 種	胸 腺 型	+	ND	79.0

注) *: + 陽性, - 陰性 ** : 検討せず

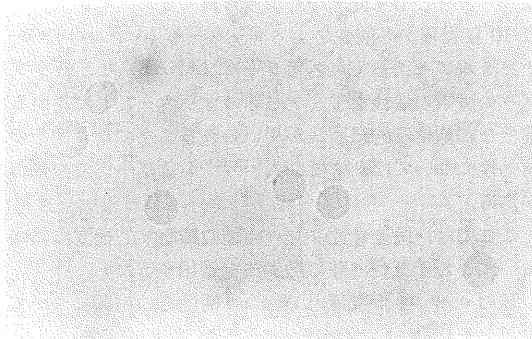


写真2 Acp ase 活性染色像

2) 豚全身性リンパ肉腫における Acp ase 活性の検索

表2に示したように、解剖学的に多中心型と診断されたものの中で2例、胸腺型と診断されたものの1例において、Acp ase 活性陽性の腫瘍細胞が認められた。また、表2には腫瘍組織、あるいは残存血中の正常リンパ球を含めたリンパ様細胞、および腫瘍細胞の Acp ase 活性陽性率を示した。

3. 考 察

豚全身性リンパ肉腫の組織・細胞学的分類のための基礎的研究の一つとして、正常な豚の放血液から得たリンパ球の Acp ase 活性をロゼット形成能を示標として検索した。

リンパ球のロゼット形成能は、豚においても T リンパ球の標準的なマーカーであることが示されている³⁾。今回の豚リンパ球のロゼット形成率は、同様の方法を用いた場合に得られる人末梢血リンパ球⁶⁾および豚リンパ球¹⁾の値とほぼ一致している。表1に示したように、ロゼット形成リンパ球分画とロゼット非形成リンパ球分画の Acp ase 活性陽性率の間には明らかな差が認められた。また、実際の応用例においては、7例中3例の腫瘍細胞に Acp ase 活性が認められた。これらの結果は、豚においても Acp ase 活性を T リンパ球の細胞化学的マーカーとして用いることができるということ、および解剖学的分類では同じ型に属する症例であっても、細胞学的には異なっているということを示唆している。

本研究では、リゾゾーム酵素として Acp ase を用いたが、この酵素のほかに T リンパ球の細胞化学的マーカーとして β-グルクロニダーゼ⁷⁾、α-ナフチルアセテートエステラーゼ⁸⁾ などのリゾゾーム酵素が報告されている。MACHIN ら⁷⁾

は人リンパ球について、ロゼット形成および非形成リンパ球分画における β -グルクロニダーゼ活性陽性率を調べ、それぞれ87~93%および1~10%という値を得ている。今回ロゼット形成豚リンパ球分画について得られたAcpase活性陽性率は彼らの報告した値よりはるかに低くなっている。その理由として、細胞の処理に長時間を要し、その間に細胞を障害したということが考えられる。したがって、本実験では行わなかったが、トリパンブルーを用いて細胞のViabilityを測定し陽性率を補正することが必要であると思われる。また、組織間における酵素活性の違い¹³⁾や酵素活性に種差があること¹⁰⁾などが報告されているので、このような報告を参考にして、豚ではどのようなリゾソーム酵素がTリンパ球の細胞化学的マーカーとして最も適切であるかということも検討する必要がある。

また、ロゼット形成法そのものにしても、BINNS¹⁾は羊赤血球浮遊液にデキストランを添加すると反応の特異性を損うことなく、豚リンパ球によるロゼット形成率を従来の方法に比較して約2倍に上昇させることができると報告している。したがって、このような方法を併用しながら適切な酵素の選択を行い、より信頼性の高い豚全身性リンパ肉腫の細胞学的診断法を確立することが今後の課題である。

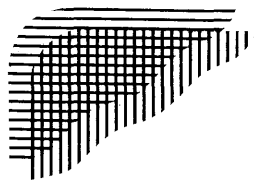
稿を終えるにあたり、懇切なるご指導をたまわりました徳島大学医学部第一解剖学教室の山田正典教授、および藤盛健助教授に感謝いたします。また、原稿を校閲していただいた広島大学生物生産学部の松田治男助教授に

感謝いたします。

引用文献

- 1) BINNS, R. M.: *J. Immunol. Methods*, 21, 197~210 (1978).
- 2) BØYUM, A.: *Scand. J. Immunol.*, 5, (Suppl. 5) 9~15 (1976).
- 3) ESCAJADILLO, C., BINNS, R. M.: *Int. Achs. Allergy appl. Immun.*, 48, 261~275 (1975).
- 4) JARETTE, W. F. H., MACKEY, L. T.: *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 50, 21~34 (1974).
- 5) KNOWLES, D. M. II, HOFFMAN, T., FERRARINI, M., et al.: *Cell. Immunol.*, 35, 112~123 (1978).
- 6) LAY, W. H., BIANCO, C. NUSSENZWEIG, V.: *Nature*, 230, 531~532 (1971).
- 7) MACHIN, G. A., HALPER, J. P., KNOWLES, D. M. II: *Blood*, 56, 1111~1119 (1980).
- 8) MIGAKI, G.: *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 32, 121~148 (1969).
- 9) RANKI, A.: *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 10, 47~58 (1978).
- 10) TAMAOKI, N., ESSNER, E.: *J. Histochem. Cytochem.*, 17, 238~243 (1969).
- 11) 玉置憲一, 鈴木 裕: 免疫細胞Ⅷ, 2036~2047 (1977).
- 12) WEHNINGER, H., MÖBIUS, W.: *Acta. Haematol.*, 56, 129~136 (1976).
- 13) YANG, K., BEARMAN, R. M., PANGALIS, G. A., et al.: *Am. J. Clin. Pathol.*, 78, 141~149 (1982).
- 14) YOSHIKAWA, T., YAMAMURA, T., YOSHIKAWA, H., et al.: *Jap. J. Vet. Sci.*, 46, 541~547 (1984).

健保適用



健保略称
強ミノC

慢性肝疾患の 肝機能異常を改善する...

- 適応症 「慢性肝疾患における肝機能異常の改善」
- 用法・用量 1日1回、40mlを静脈内に注射する。
年齢、症状により適宜増減する。

■グリチルリチン製剤

強力ネオミノファーゲンシ

包装 20ml 5管・30管, 5ml 5管・50管, 2ml 10管・100管

▶使用上の注意などについては、添付文書をご参照下さい。

株式会社 ミノファーゲン製薬本舗 営業本部 〒107 東京都港区赤坂8-10-22 TEL(402)6201