

牛リンパ造血系腫瘍の診断のための標本作製と見方

門田耕一*, 石川義春

(平成 28 年 9 月 12 日 受付)

Methods for the preparation and observation of tissue sections in bovine lymphohematopoietic neoplasms

Koichi KADOTA* & Yoshiharu ISHIKAWA

序

牛のリンパ系腫瘍の分類は何十年も前から、牛の年齢、腫瘍の形成部位、牛白血病ウイルス (bovine leukemia virus: BLV) 感染の有無に基づいて、地方病性 (enzootic bovine leukosis: EBL) または成牛型、子牛型、胸腺型、皮膚型に分けられてきた¹⁾。一方、免疫組織化学の発展により、人のリンパ腫は病理形態と免疫学的表現型に基づいて分類することが常識となり、最近では遺伝子の異常も考慮されている²⁾。牛においてもパラフィン切片に適用できる抗体の入手が可能となり、従来の病名はいくつもの疾患単位を含んだ疾患群名に過ぎないことが明らかとなった³⁾。しかも、防疫上重要な EBL は子牛にも起こることが判明し⁴⁾、子牛型、胸腺型、皮膚型においても BLV 感染が認められるようになり^{3,7)}、従来の分類では対応できない状況となっている。人における発症数から考えると、牛においても骨髓系腫瘍の発生は稀ではないと思われるが、子牛であれば子牛型に分類され、成牛で BLV 陽性なら EBL に分類されている可能性が高い。

動物の悪性腫瘍は元の細胞に似ていないことが多く、しかもマーカーがしばしば脱落するため、組織学的診断は容易ではない (寿命が短くて腫瘍の発生と進行が短期間で起こることと関係があり、未分化または脱分化した細胞が出現しやすいと考えられる)。牛リンパ系腫瘍の場合、腫瘍細胞が人の症例とはあまり似ていない点も診断を難しくしている。しかし、現場から送付された切片では、標本作製時の失敗のために細胞や組織が破壊されていることが多く、これが組織診断を難しくしている最大の原因と考えられる。リンパ系腫瘍は他の腫瘍とは異なり細胞学的な特徴が比較的乏しく、アーチファクトが出た切片では細胞学的に区別することが不可能になる (どの組織型も同じような細胞形態を示す)。骨髓系腫瘍の場合は、ギムザ染色や免疫染色を使えば、診断は比較的容易であるが、細胞の状態が悪く顆粒の存在に気がつかない場合もある。そこで、リンパ造血系腫瘍の診断のために、病理組織学的観察に適した標本の作り方と診断上注意すべき点について述べてみたい。

1. 採材

正常リンパ球よりも腫瘍性リンパ球は細胞形態が破壊されやすいので、大きな腫瘍からだけ採材するのではなくて、小さめの腫瘍や腫大していないリンパ節の採材も重要である。症例によっては、軽度に腫大したリンパ節において腫瘍細胞のホーミングが観察されることもある (例えば、豚胚中心細胞性リンパ腫)⁸⁾。なお、腫瘍細胞は生体中での壊死ならびに死後変化によって細胞形態にダメージを受けることもあるが、後述する切り出し部位

農研機構 動物衛生研究部門 北海道研究拠点

文責：門田耕一

* Corresponding author: Koichi KADOTA
Hokkaido Research Station, National Institute of Animal Health,
NARO
4 Hitsujigaoka, Toyohira, Sapporo 062-0045, JAPAN
Tel: 011-851-5226
E-mail: kkadota@affrc.go.jp

の選択の失敗により観察に適さない標本になることが非常に多い。

固定時のホルマリンの浸透が重要なので、採材臓器にはたくさん割を入れておくとよい。

小腸では死後変化が急速に進むので、腸リンパ腫や腸炎では、剖検の最初に小腸を採材しておくことが重要である。

肉眼的に腫瘍があり、腫瘍が疑われた材料には、菌や寄生虫が原因の肉芽腫と診断された例もある。組織の一部を冷凍保存しておく、その後の菌分離やPCRによる検索も可能となる⁹⁾。パラフィン包埋切片からのPCRは、うまくいかないことも多い^{10,11)}。

2. 固定

10%の中性緩衝ホルマリン液を使うこと。20%は必要ない。

熱や圧を加えてはいけませんが、振盪機は使ってもかまわない。熱を加えると、ホルマリンが浸透する前に組織内で死後変化が急速に進む。診断を急ぐ場合は、迅速診断用と確定診断用の両方のブロックを作る。

赤血球の密集は固定液の浸透を阻害するので、血液の多い脾臓ではホルマリンの浸透が阻害されて、死後変化を起こしやすい。赤血球ほどではないが、リンパ系腫瘍細胞が密に集簇する場合、固定液の浸透に影響するため、正常の組織よりも固定に気をつける必要がある。つまり、固定液の浸透に難がある組織では、最初から組織片を小さくしておくか、割をたくさん入れておく。

固定の良好な小さな組織片があればよく、1つの組織を大量に採材する必要はない。大量の組織を固定用容器に詰め込むと、固定が悪くなる。

3. 切り出し

組織の表面が最も固定がよいため、表面を含んだ包埋用組織片を作ることが肝要である。剖検時の断面を含んだ組織片を作った時、断面の部分は平滑にならないが、整形してきれいな四角形や正方形の組織片にする必要はない(つまり、固定の最もよい部分を切り落とさないこと)。免疫染色においては、固定液に最初に接した部分が最も染まりがよい(図1)。ただし、切片の辺縁部では抗体がうまく載りにくいため、染まりが悪いか染まらないことがある。

固定液が最初に接した面は最も固定が良好なので、カミソリ(薄切で使用した後の替刃)で薄くそいで電顕用の材料とする(ただし、稀に挫滅していることがある)(図

2-4)。このホルマリン固定試料をしばらく保存しておきたい場合は、ホルマリン・グルタルアルデヒド固定液(リン酸緩衝液)に入れておくとよい¹²⁾。長期間、ホルマリンに漬けておくと、膜構造が不明瞭化する。超薄切片作製時、電顕用樹脂を台形にトリミングし、粘膜表面を観察する場合と同様に、最初にホルマリンに接した部分と台形の斜面が平行になるようにする(つまり、組織片と台形の斜面の間に組織の入っていない部分を持つてくる)。

大きすぎる組織片を作ってはならない。薄切時に薄く切るのが難しくなる(厚い切片は600倍での観察や1,000倍での写真撮影に悪影響が出る)。しかも、大きな切片の場合、腫瘍細胞が破壊されていることが多い(固定液の浸透に時間がかかる)。

組織中で生きていた腫瘍細胞と変性、壊死した腫瘍細胞が混在している病変があっても、固定液の浸透に時間がかかると、すべての細胞が死んでいたように見えるので、生きていた細胞と壊死した細胞の区別が難しくなる。

切り出し時に、血の色が残っている組織は、再固定により通常の固定組織の色に変化した場合でも細胞の状態はよくない。

4. 包埋

脱水剤、仲介剤、パラフィンの汚れにより、水分がアルコールと有機溶媒を経て完全にパラフィンに置き換わっていない場合は、薄切しづらだけでなく細胞形態に悪影響を及ぼす。さらに、後の作業の湯伸ばしにも影響する。

パラフィンの質が悪い場合も、似たような悪影響がある。

5. 薄切

薄く切ること(2-3 μm)が非常に重要である(600倍で観察するから)。そのためには、組織片の周囲にある余分なパラフィンを取り除いた方がよい。

室温は低ければ低いほど薄く切れるので、重要な切片を作る際には部屋を寒くする。必要な切片が1枚だけなら、冷蔵庫でブロックを冷やし、温度が上がる前に切ればよい。

包埋に失敗したブロックは切りにくいが(薄切後、ブロックがへこんだり、有機溶媒の臭いがしたりする)、室温を下げると若干切りやすくなる。

6. 湯伸ばし

41℃または42℃で湯伸ばしをし、適度に伸展したら、水槽の縁で水分を十分に落とし、切片の過度な伸展を防ぐことが重要である。その後はふ卵器内で(37℃)オーバーナイトで乾燥させるが、水分を十分に切った切片を伸展板上で仮置きする際に(伸展板上に標本を直接置かないこと)、あまり熱をかける必要はない。

湯伸ばしをした後に伸展板上に標本を載せたり、水の上に浮かべた後でそのまま伸展板上に放置したりすると(つまり伸展板上で伸展させる)(放置法)、切片が伸展しすぎてアーチファクトが入ることが多い(図5, 6)。臨床検査分野において、温度と時間を調整すれば伸展板上で伸展させてもよいという考えもあるが¹³⁾、ブロックの状態を常に一定に保つことは難しく、組織によっても伸展条件が違うので、お湯で伸ばして適当な状態になれば、伸展を止めることが重要である。また、放置法では一挙に水が蒸発する訳ではないので、初期に乾燥した部位と最後に乾燥した部位で標本のできに差が生じる。

46℃や50℃での湯伸ばしにおいても(高温法)、明らかにアーチファクトが入る。この方法や放置法を使うと、包埋に失敗したブロック(系列の汚れや質の悪いパラフィンにより起こる)では、組織が完全に破壊された切片になる。また、急速に切片が膨張してくるので、すくって貼り付ける作業に手間取ると、アーチファクトの入り方がさらにひどくなる。

包埋に失敗したブロックでは、41℃よりももっと温度を下げて湯伸ばしする。ただし、アーチファクトの入り方が多少は改善されるものの、よい標本にはならない。

湯伸ばし法の実験: EBLの子牛のリンパ節を用い、以下の条件で実施した。なお、包埋に失敗したブロックだと、どの条件下でもアーチファクトが強く出るので、状態のよいブロックを使用した。

- ① 41℃で湯伸ばし後、十分に水を切る(通常法)
- ② 46℃で湯伸ばし後、十分に水を切る(高温法)
- ③ 50℃で湯伸ばし後、十分に水を切る(高温法)
- ④ 水に浮かべた後、41℃の伸展板上で10分間放置(放置法)
- ⑤ 水に浮かべた後、46℃の伸展板上で10分間放置(放置法)
- ⑥ 水に浮かべた後、50℃の伸展板上で10分間放置(放置法)
- ⑦ 41℃で湯伸ばし後、50℃の伸展板上で10分間放置
 - ①ではアーチファクトが認められなかった(図7)。
 - ⑦で最も強いアーチファクトがみられ(図8)、次いで

放置法がひどかった(図9)。ブロックの状態が非常によい(図10)、高温法ではアーチファクトの程度が比較的軽かったが、細胞への人工的ダメージは確実にあるので、特にリンパ系腫瘍の正しい診断のためには、適切な温度で湯伸ばしをするべきである。放置法や高温法によるアーチファクトとしては、核は核膜が二重になっているので破壊はされないが、クロマチンは核膜にくっつき、核の中には何もなくなり、ひどい場合には実際に穴があく。細胞膜はすぐに壊れて不明瞭化し、細胞同士の境界が分からなくなる。細胞質は膨らみながら泡沫状になり、ひどいとちりぢりになって完全に消失する。生体内で生きていた細胞の細胞質は明瞭であり(普通は均質で、もやもやとはしていない)、病理所見で細胞質が見えないとか、細胞境界が不明瞭だとか書いてあれば、標本作製に失敗していると考えられる。膠原線維などから成る間質は一部に偏在し、大きな空隙が形成される。要するに、病理標本のあらゆる部位にダメージがある。

アーチファクトが強く出ている切片は、細胞がきれいに見える切片よりもサイズが大きくなっている。

病変部は正常組織よりもアーチファクトが強調されて出現しやすい。例えば、湯伸ばしの失敗により、水腫の部分は不自然な大きな空隙となりがちである。

腫瘍組織を見るのが目的なので、間質の結合組織が良く発達しているような場合に、これが十分に伸展するまで待つてはいけない。見たい部分が伸展した段階で水を切ること。また、切片において泡やシワを認めても、無理に取る必要はない(切片の見目は重要ではない)。

7. 染色

リンパ系腫瘍と骨髄系腫瘍の鑑別だけでなく、菌や原虫の観察にも、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色よりもギムザ染色の方が優れている^{11, 14, 15)}。塗沫標本用のギムザ染色液では赤い色が出ないので、以下のようなpHを調整した液を使用すること。

ギムザ染色法¹⁶⁾

- ① 脱パラ→水洗→蒸留水
- ② ギムザ染色液(pH 6.4のリン酸緩衝液1 ml + ギムザ液50 μl) 2時間
- ③ 液から取り出し、余分な液を拭う
- ④ 酢酸水(蒸留水100 mlに250 μl)でちょっと洗う
- ⑤ イソプロピルアルコール(I)を通す。青色の雲が取れ結合織がピンクになるまで(この段階で色が落ちる)
- ⑥ 脱水: イソプロピルアルコール(II) → イソプロピルアルコール(III)

⑦透徹：キシロール (I) →キシロール (II) →キシロール (III)

⑧封入

膠原線維や筋肉の観察にはゴモリのワンステップトリクロム染色が簡便でよい¹⁷⁾。元の文献には媒染がないが、これをやらないと筋肉が赤くならずレンガ色になる。

①脱パラ→水洗

②媒染：3%重クロム酸カリウム, 37度で3日間→水洗

③核をヘマトキシリンで濃く染めておき, 水洗後,

④ゴモリのトリクロム染色液 (クロモトローブ 2R 0.6g, ファストグリーン Fast green FCF 0.3g, リンタングステン酸 0.8g, 水酢酸 1 ml, 蒸留水 100 ml) に20分間

⑤0.2%酢酸水に軽く漬け (30秒)

⑥脱水：100%アルコール (I) → (II) → (III)

⑦透徹：キシロール (I) →キシロール (II) →キシロール (III)

⑧封入

免疫染色において、後染色をヘマトキシリンに限定する必要はない。細胞質内顆粒を有するリンパ腫細胞においては、免疫染色とHE染色を行うとよいが¹⁸⁾、通常の染め方では、強く染まりすぎるため、染色時間は一瞬にする。腸の感染症で、アルシアンブルー染色が有用なことがある (図11)。

免疫染色において通常の発色法 (茶色) とニッケル・コバルト法 (黒色) を使えば、二重染色が容易である¹⁹⁾。色がかぶってくることがあるので、最初に黒く発色させた方がよい。二番目の染色の前に加熱処理を入れれば、緩衝液を用いて最初の抗体を除去する必要がなくなる。

8. 観察

60倍の対物レンズを使用すること。菌や原虫の観察にも役立つ。封入剤の量が多すぎると、補正環を使ってもピントが合わなくなる。対物の40倍で得られる情報は少ない。厚い切片だと細胞が重なって腫瘍細胞の形態の観察ができない。腫瘍細胞、原虫、細菌などの詳細な形態を提示するために^{9, 11)}、油浸で1,000倍の写真をきれいに撮る必要がある場合、特に薄い切片を作らなければならない (図10)。

血管の周囲は細胞の状態がよいことが多いので、腫瘍細胞の観察に適している。

腫瘍細胞が密に詰まっている部位では、腫瘍細胞が観察しにくいし、変性や壊死も多い。また、赤血球で充満した部分ほどではないが、ホルマリンの浸透が悪くて固定不良になりやすい。一方、血管内、リンパ管内、リン

パ洞内は細胞が浮遊し、固定もよくて観察に適している。

組織の表層部は固定が最もよくて電顕観察に向いているが、細胞がぎっしり詰まり、光顕レベルでは所見が取りにくい (各組織型の特徴が出にくい) (図12)。この下部は細胞間にやや隙間ができ、観察に適している (図13)。さらに深い部位では、腫瘍細胞の死後変化が起きている (図14)。

固定時間が長すぎると、免疫染色で染まってこないことが多い。ピメンチン陽性細胞は広範に分布しているため、ピメンチン染色により固定時間が適切だったかどうかを判断することができる (細胞の状態が良好にも関わらず染まってこない場合)。

各々の一次抗体の特徴を十分に把握しておく必要がある。標本の状態が悪いと染まらない抗体は多い。非特異的反応が出やすい抗体があり、陽性と誤って判断する可能性がある。特異性の低い抗体もある。例えば、ニューロンスペシフィックエノラーゼ (NSE) は、いろいろな腫瘍で染まることがあり、nonspecific enolase と言われるほどである²⁰⁾。しかし、他の免疫染色や形態から神経系の腫瘍である可能性が高いと絞り込めれば、有用なマーカーである。

高解像度の顕微鏡写真がネットにアップされる時代になり、高倍率で腫瘍細胞を提示した場合、標本作製上の失敗が明白になるため、今まで以上の標本作製能力が必要になってくると思われる。

9. 鑑別診断

大部分のリンパ系腫瘍では、腫瘍細胞はびまん性またはシート状に増殖し、細胞学的特徴は比較的乏しいため、未熟な円形細胞の腫瘍との鑑別が問題となる。牛では髄芽腫、神経芽腫群腫瘍、横紋筋肉腫などに比較的多く遭遇するが²¹⁾、髄芽腫は小脳に原発し真正ロゼットの形成があるので²²⁾、鑑別は容易である。神経芽腫細胞は細胞質の乏しいリンパ腫細胞と似ているが (図15A)、免疫染色でNSEが陽性となる (図15B)。一方、より分化した組織型である神経節芽腫を構成する細胞は、細胞質の豊富なリンパ腫に似ているが (図16A)、NSEとニューロフィラメント (NF) が陽性である (図16B)。胎子性横紋筋肉腫、高分化型は横紋の形成が明らかで (図17A)²³⁾。トリクロム染色やリンタングステン酸ヘマトキシリン (PTAH) 染色を用いると、筋原線維の観察が容易である (図17B)。しかし、多形性横紋筋肉腫では筋原線維を持つ細胞は少なく (図18A)、横紋の形成は非常に稀にしか認められない (図18B)²⁴⁾。

胎子性横紋筋肉腫，低分化型では，腫瘍組織の多くが円形細胞から成るが（図 19A），一部の腫瘍細胞に横紋の形成が認められる（図 19B）。分化した細胞ではデスミンが陽性となる（図 19C）。 α 平滑筋アクチンは平滑筋や筋線維芽細胞のマーカーであるが^{25, 26)}，多形性横紋筋肉腫で少数の腫瘍細胞が染まったことがある¹⁷⁾。胎子性横紋筋肉腫，未分化型では，分化を示す細胞が少なく診断が難しい。

10. あとがき

一般的に，診断の正確さ＝読む能力×きれいな標本だと言えるかもしれない。たとえ病理診断の能力が高い人でも，標本が不適切ならば正しい診断に到達するのは困難である。ただし，ある病気に関してたくさんの経験を積み，質の低い切片における組織学的特徴を十分に把握することで，その病気の診断は可能かもしれない。しかし，経験の乏しい疾病では，たぶん対応はできない。固定から封入までがうまくできた組織標本は，アート作品と言っても過言ではないほど美しいものである。ギムザ染色標本の観察時に 60 倍の対物レンズを使えば，細胞質内顆粒や様々な病原体などを詳細に観察でき，見たことのない現象に遭遇する機会も増え，最終的には見る力の向上につながってくる。実際，以前に見逃していたが²⁷⁾，牛の好酸球性肉芽腫の切片を詳細に観察することで，Splendore-Hoeppli 物質が *Nocardia* と類上皮細胞の間に形成されることを発見し¹⁵⁾，非常に嬉しかったことがある。放置法や高温法を使えば若干の時間の節約ができるが，そのために観察の楽しさを経験できなくなるのは非常に残念なことである。

動物のリンパ腫や白血病に関する論文や教科書では，アーチファクトが入った顕微鏡写真を見ることがよくある。このような標本に基づいて論文を書くのは，ある意味感心するが，高倍率の写真が大抵ないので，書いている本人も自覚はしているのだと思われる。固定が悪いと漠然と思っているのかもしれないが，死亡例でもないのに全ての腫瘍細胞が壊れていることはまずあり得ない。日本の獣医病理学の現場では標本を作る人と見る人が同じなので，今回の資料が標本のレベルアップに役立ち，さらに学会発表や論文発表につながることを期待している。

謝辞

この論文を含む 4 つの資料は，全国の家畜保健衛生所と食肉衛生検査所の病理担当者が送付してくれた材料に

基づいている。彼らに深く感謝するとともに，これらの資料を日常の業務に利用し，分類法の改良，改善につなげてもらえれば幸いである。

参考文献

- 1) Theilen, G. H. & Madewell, B. R.: Bovine. In: Veterinary Cancer Medicine (Theilen, G. H. & Madewell, B. R. eds), 2nd ed. Lea & Febiger, Philadelphia. 408-430 (1987).
- 2) 木崎晶弘, 押味和夫編: 新 WHO 分類による白血病・リンパ系腫瘍の病態学. 中外医学社, 東京 (2004).
- 3) 萩原晶代, 齊藤守弘, 石川義春, 他: 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).
- 4) Kagawa, Y., Tomita, K., Nakatani, H., et al.: Immunohistochemical characterization of five types of lymphoid neoplasms in calves. Jpn. Agric. Res. Quart. 43, 239-245 (2009).
- 5) Iwama, Y., Inomata, T., Ishikawa, Y., et al.: Cytology of B cell lymphomas in cattle infected with bovine leukosis virus. Jpn. Agric. Res. Quart. 47, 103-107 (2013).
- 6) Murayama, S., Sato, K., Ikehata, T., et al.: Cytologic and immunophenotypic investigation of lymphohematopoietic neoplasms in cattle. Jpn. Agric. Res. Quart. 45, 225-231 (2011).
- 7) Yokota, R., Sato, K., Wada, Y., et al.: Immature T cell neoplasms in three young cattle. J. Vet. Med. Sci. 77, 1697-1700 (2015).
- 8) Kadota, K. & Nakajima, H.: Histological progression of follicular centre cell lymphomas to immunoglobulin-producing tumours in two pigs. J. Comp. Pathol. 99, 145-158 (1988).
- 9) Murakami, K., Hata, E., Hatama, S., et al.: Eosinophilic granuloma with Splendore-Hoeppli material caused by toxigenic *Corynebacterium ulcerans* in a heifer. J. Vet. Med. Sci. 76, 931-935 (2014).
- 10) Kondo, H., Musoke, G., Ssekiwunga, H., et al.: *Pneumocystis* infection in goat kids in Uganda. Jpn. Agric. Res. Quart. 48, 349-353 (2014).
- 11) Yamada, M., Hatama, S., Ishikawa, Y., et al.: Intracellular coccidiosis caused by *Cyclospora* spp. in calves. J. Vet. Diagn. Invest. 26, 678-682 (2014).
- 12) 水無瀬昂: 電顕材料の固定について. 電顕腫瘍病理

- 学 (小野江為則編). 南山堂, 東京. 463-467 (1982).
- 13) 長谷川秀浩: 伸展条件から考える病理組織標本作製の標準化. 病理技術. 76, 9-14 (2013).
- 14) Kawashima, Y., Takahashi, H., Shimoo, M., et al.: Eosinophilic granuloma with Splendore-Hoeppli material caused by *Mannheimia granulomatis* in a calf. J. Vet. Med. Sci. 78, 1075-1078 (2016).
- 15) Oyama, T., Higashi, T., Taniguchi, Y., et al.: Histological study of bovine nocardial eosinophilic granuloma with comparison of Splendore-Hoeppli material. Jpn. Agric. Res. Quart. 50, 169-173 (2016).
- 16) 金子 仁: ギムザ (Giemsa) 染色. 組織標本, 第2版. 医学書院, 東京. 88-89 (1978).
- 17) 森川義金, 檜澤一夫 & 片野泰雄: ゴモリ (Gomori) のワンステップトリクロム染色. 病理の基礎技術, 朝倉書店, 東京. 105-106 (1973).
- 18) Nozaki, S., Sasaki, K., Ando, M., et al.: Natural killer-like T cell lymphoma in a calf. J. Comp. Pathol. 135, 47-51 (2006).
- 19) 大西克彦, 大久保孝明, 岩佐隆範, 他: 牛膠芽細胞腫の組織学的, 免疫組織化学的観察. 日獣会誌. 43, 37-41 (1990).
- 20) 名倉 宏, 長村義之, 堤 寛, 編: 渡辺・中根酵素抗体法. 学際企画, 東京 (2002).
- 21) Omi, K., Kitano, Y., Agawa, H., et al.: An immunohistochemical study of peripheral neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, anaplastic ganglioglioma, schwannoma and neurofibroma in cattle. J. Comp. Pathol. 111, 1-14 (1994).
- 22) 海治修二郎, 杉村知子 & 門田耕一: 子牛の髄芽腫の1例. 日獣会誌. 49, 854-857 (1996).
- 23) Jimma, K., Wada, Y., Ishikawa, Y., et al.: Differentiated embryonal rhabdomyosarcoma in a cow. J. Vet. Med. Sci. 61, 577-580 (1999).
- 24) Aoyagi, T., Saruta, K., Asahi, I., et al.: Pleomorphic rhabdomyosarcoma in a cow. J. Vet. Med. Sci. 63, 107-110 (2001).
- 25) Hanzaike, T., Ito, I., Ishikawa, T., et al.: Leiomyosarcoma of soft tissue in a cow. J. Comp. Pathol. 112, 237-242 (1995).
- 26) Takai, H., Takahashi, T., Takayama, H., et al.: A histologic and ultrastructural study of fibroma, myofibroblastoma, leiomyoma and hemangiopericytoma in cattle. Jpn. Agric. Res. Quart. 38, 191-197 (2004).
- 27) Shibahara, T., Mitarai, Y., Ishikawa, Y., et al.: Bovine nasal eosinophilic granuloma with blood eosinophilia caused by *Nocardia* species. Aust. Vet. J. 79, 363-365 (2001).

Summary

Methods for the preparation and observation of tissue sections in bovine lymphohematopoietic neoplasms

Koichi KADOTA* & Yoshiharu ISHIKAWA

Different diagnostic tools and expertise are needed in order to make a correct diagnosis of lymphohematopoietic neoplasm in cattle. The information presented here would be helpful in diagnosing B cell, T cell and myeloid neoplasms.

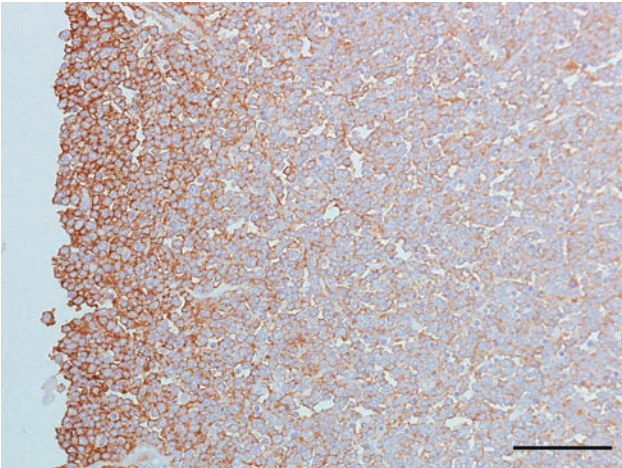


図1. 前駆Bリンパ芽球性白血病。左深頸リンパ節, CD20 染色。Bar = 50 μm 。通常, CD20 は固定の影響を受けにくい, 死亡例なので, 右側の部分は固定液が浸透するまでにさらに死後変化が進行したと考えられる。左側の部分はよく染まっており, 電顕用にはこのような部分が適している。切り出しに失敗して, この部分を切り落とすと, 陰性という判定になるかもしれない。(大分県 河上 友)

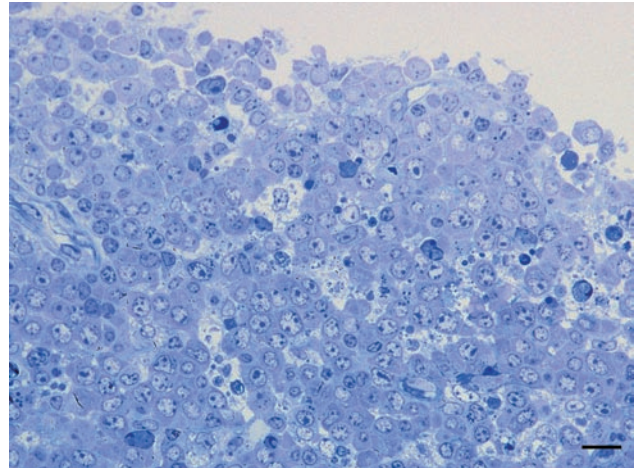


図2. $\gamma\delta$ T細胞性リンパ腫, 混合型の過剰顆粒型領域。下顎リンパ節, 電顕用厚切り切片(トルイジンブルー染色), Bar = 10 μm 。ミトコンドリアが壊れてできる空胞はなく, 全体的に固定が良好に見えるが, 電顕観察には表層部を使用する。(岩手県 小笠原房恵)

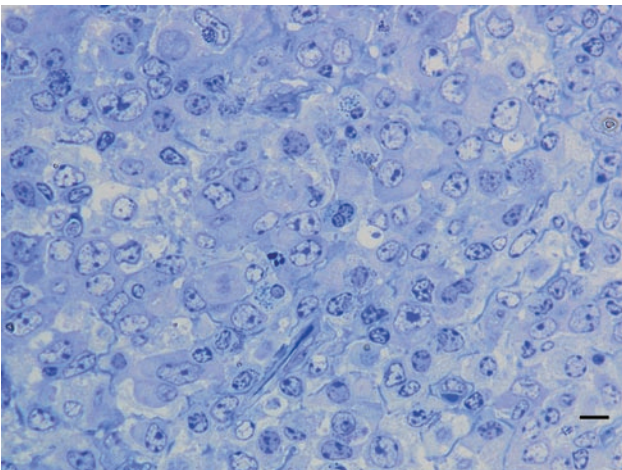


図3. 急性好塩基球性白血病。深そけいリンパ節, 電顕用厚切り切片, Bar = 5 μm 。死後変化に乏しく, 細胞の状態が良好に保持されている。(千葉県 関口真樹)

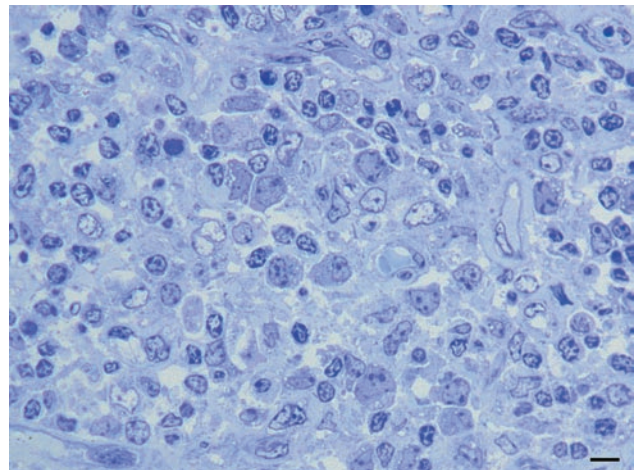


図4. 図3と同じ症例。深そけいリンパ節, 電顕用厚切り切片, Bar = 5 μm 。細胞質内にしばしば空胞があるように見え, 図3よりも超微形態の保持が悪いと考えられる。

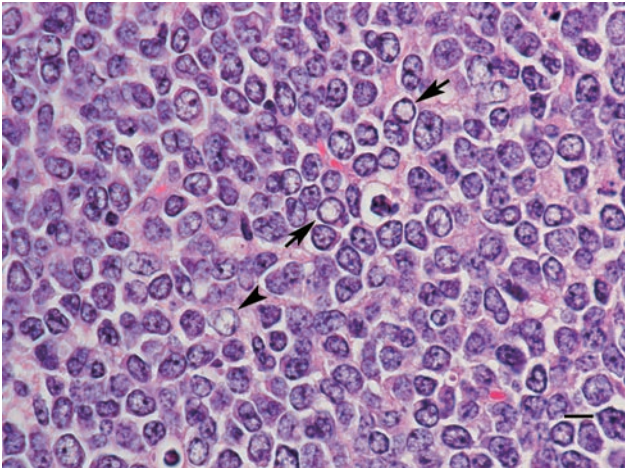


図5. 前駆Bリンパ芽球性リンパ腫。腸骨下リンパ節, HE染色, Bar = 5 μm 。青っぽく見えるが, これが問題ではなく, 核や細胞質の所見が取りづらく, リンパ芽球性リンパ腫の特徴を把握できない。矢印はクロマチン網がなくなった核を示す。間質の細胞 (矢頭) も強いダメージを受けている。

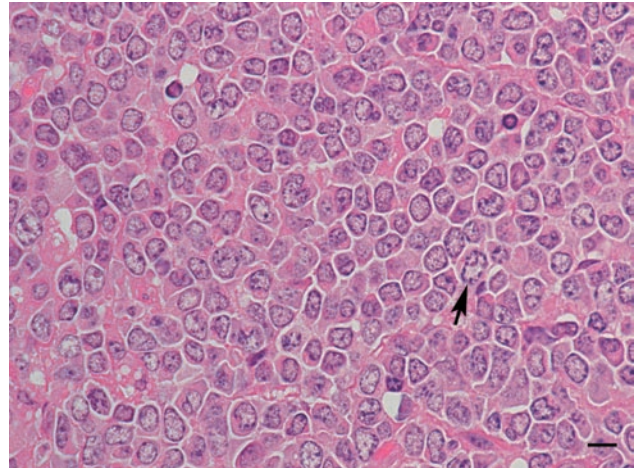


図6. 図5と同じブロックのほぼ同じ部位。41°Cで湯伸ばして適度に伸展した段階で十分にお湯を切ると, 細胞学的な所見の取れる標本になり, 繊細なクロマチンが均等に分布し, 細胞質は乏しいことが分かる。核膜過染を示す細胞も分かる (矢印)。

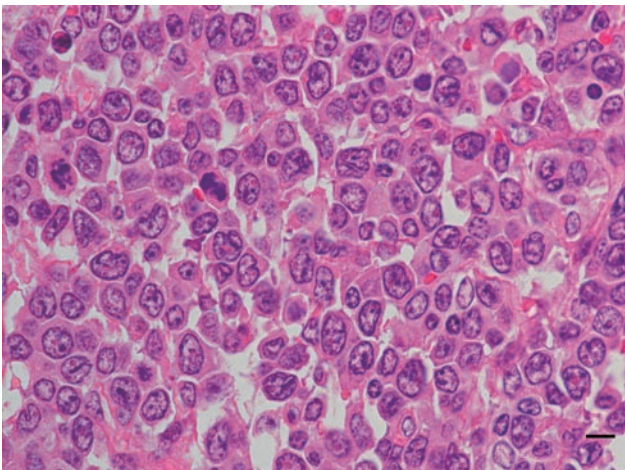


図7. 多形型リンパ腫。そけいリンパ節, HE染色, Bar = 5 μm 。41°Cで湯伸ばしすると, 腫瘍細胞の状態は良好なので, 所見が取れる。(岡山県 橋田明彦)

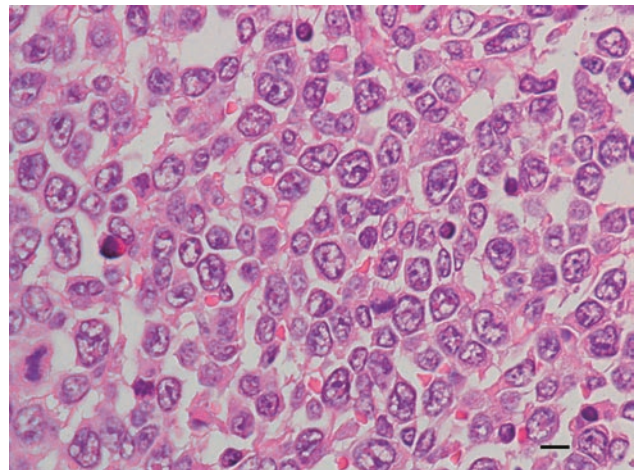


図8. 図7とほぼ同じ場所, HE染色, Bar = 5 μm 。41°Cで湯伸ばし後, 50度で放置すると, 核や細胞質に強いアーチファクトが入り, 細胞間の隙間が目立つ。不適切な標本では概ねこのような核になるので, クロマチンのパターンは読めない。

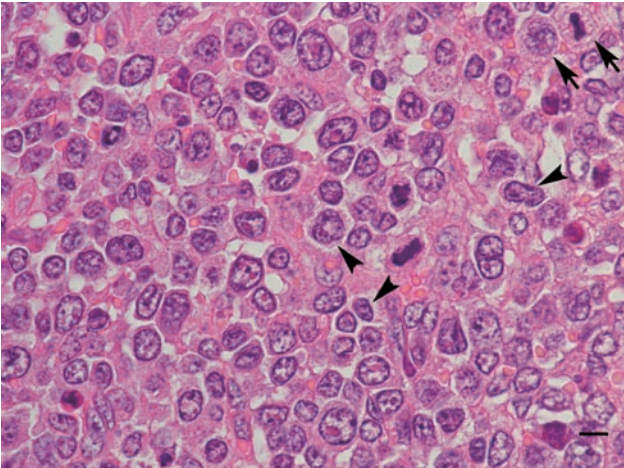


図9. 図7とほぼ同じ場所, HE 染色, Bar = 5 μm 。41 $^{\circ}\text{C}$ で伸展板上に放置すると, 核への影響は目立たないが, 細胞質は膨らんで泡状で (矢印), 細胞の輪郭が曖昧になり, 細胞質がなくなりかかっている細胞もある (矢頭)。この条件で包埋に失敗したブロックなら, 細胞質はほぼ完全に消えてなくなる。

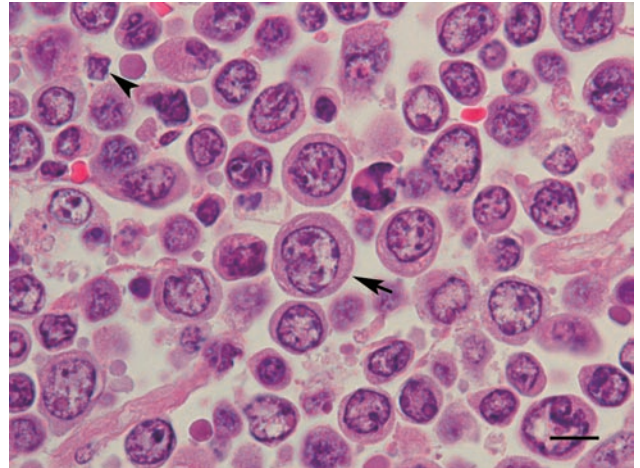


図10. 図7と同じ症例。腎リンパ節, HE 染色, Bar = 5 μm 。固定, 包埋, 薄切, 湯伸ばしがうまくできていると, 腫瘍細胞に粗面小胞体が認められることがある (矢印)。アーチファクトとして細胞に亀裂が生じることがあるが, それとは明らかに違う。小型の細胞が腫瘍性であることも明確に分かる (矢頭)。

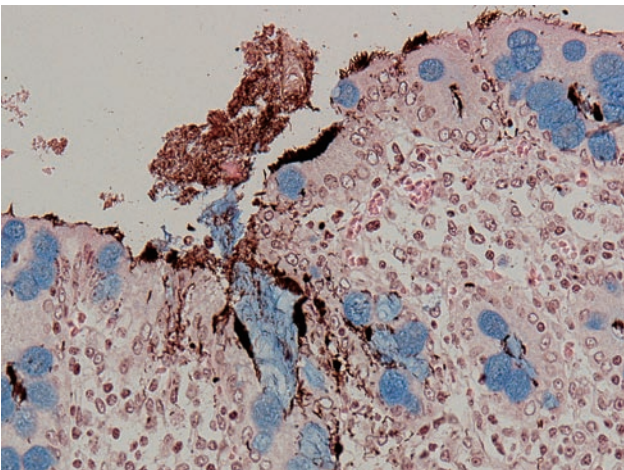


図11. 豚の腸管スピロヘータ症。スピロヘータに対する免疫染色 & アルシアンブルー染色。粘液が菌を押し流そうとしている。ニッケル・コバルト法を用いたので, 菌は黒く見える。

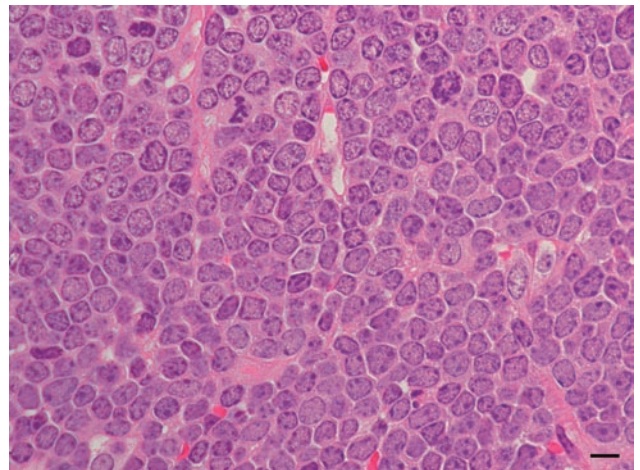


図12. 前駆 T リンパ芽球性リンパ腫。心臓, HE 染色, Bar = 5 μm 。表層部は固定がよすぎて, 所見が取りにくい。(埼玉県 平野晃司)

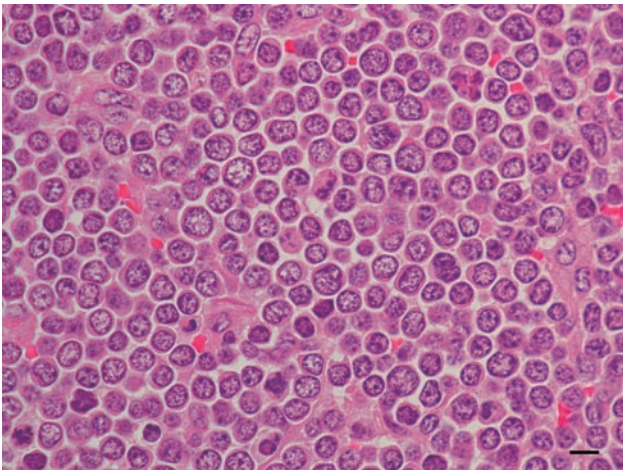


図13. 図12と同じ切片。表層部よりやや深い部分で、腫瘍細胞の特徴がよく出ている。

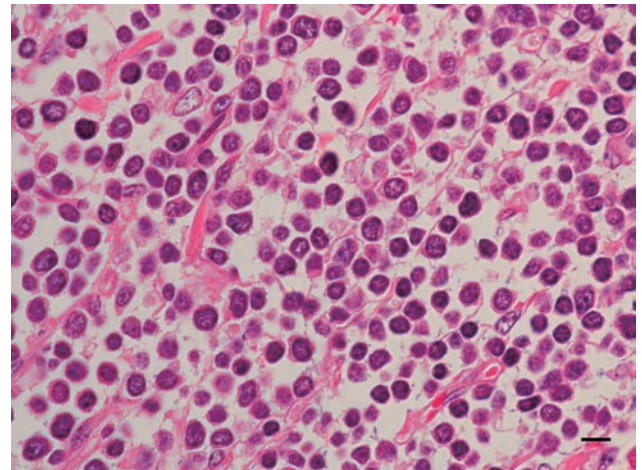


図14. 図12と同じ切片。さらに深部だとホルマリンが到達するまでに時間を要し、観察には向かない。切り出しの失敗で、標本中にこのような部位しかない場合、ヘテロクロマチックな核を有する小型腫瘍細胞が増殖しているという所見を書いてはいけない。

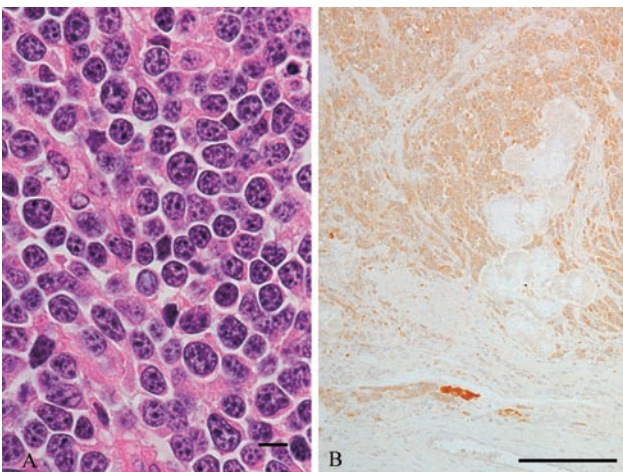


図15A. 神経芽腫。十二指腸, HE染色, Bar = 5 μ m。細胞質が比較的乏しくリンパ腫を思わせるが、核小体の数が多い。(千葉県 関口真樹)

図15B. 図15Aと同じ症例。十二指腸, NSE染色, Bar = 100 μ m。すべての腫瘍細胞が陽性に染まる。より強く染まっている細胞は正常の神経細胞である。

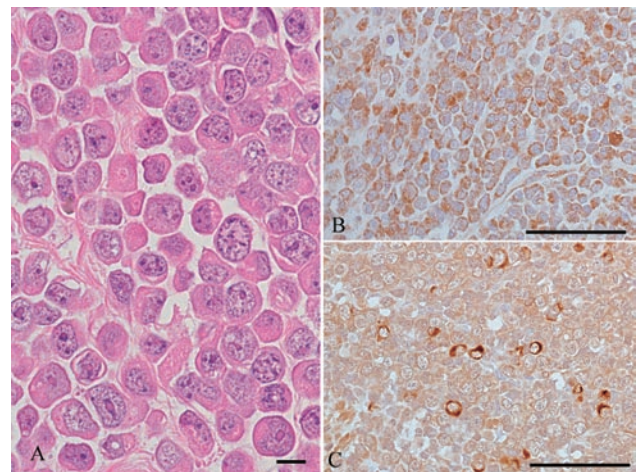


図16A. 神経節芽腫。左前肢腫瘍, HE染色, Bar = 5 μ m。細胞質の豊富なリンパ腫細胞に見える。(北海道 宮澤国男)

図16B. 図16Aと同じ症例。左前肢腫瘍, NSE染色, Bar = 50 μ m。すべての腫瘍細胞が陽性である。

図16C. 図16Aと同じ症例。左前肢腫瘍, NF染色, Bar = 50 μ m。陽性細胞が散見される。その他の腫瘍細胞も弱く染まっているように見えるが、特異的な反応ではない。

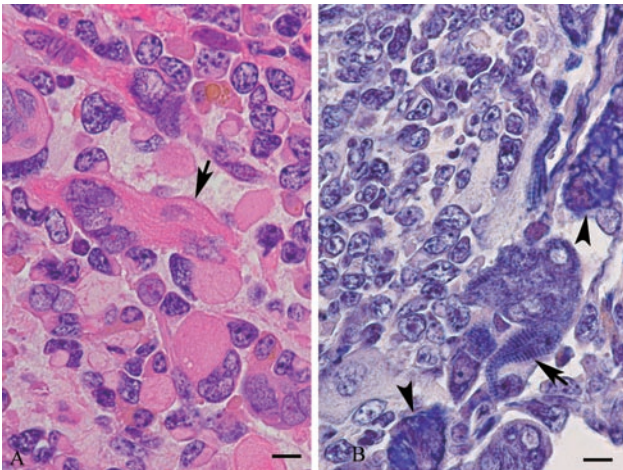


図 17A. 胎子性横紋筋肉腫，高分化型。胸膜腫瘍，HE 染色，Bar = 5 μ m。単核の腫瘍細胞が融合することで多核巨細胞が形成され，頻繁に横紋の形成を見る（矢印）。このような細胞は正常の筋線維を模倣しており，ほとんど増殖しない¹⁶⁾。

図 17B. 図 17A と同じ症例。胸膜腫瘍，PTAH 染色，Bar = 5 μ m。きれいな横紋が認められるが（矢印），腫瘍細胞の筋原線維はしばしば融解するので（矢頭），症例によっては横紋を見つけにくいことがある。

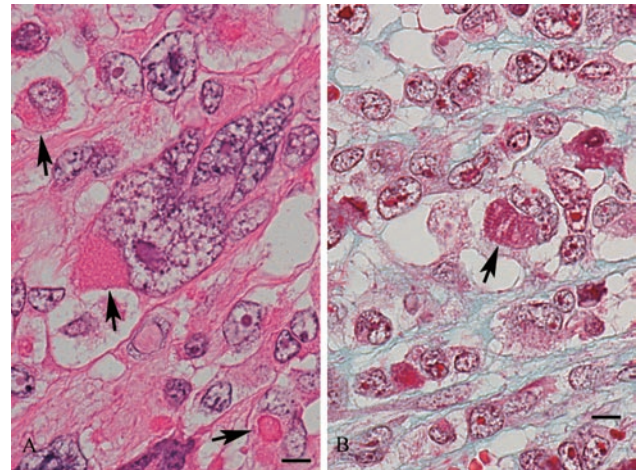


図 18A. 多形性横紋筋肉腫。胸部筋肉内腫瘍。HE 染色，Bar = 5 μ m。多形性 B 細胞性リンパ腫よりも，細胞学的な多形性と異型性ははるかに強い。筋原線維（矢印）を持つ腫瘍細胞の数は多くない¹⁷⁾。

図 18B. 図 18A と同じ症例。胸部筋肉内腫瘍。トリクロム染色，Bar = 5 μ m。きわめて稀に横紋が認められる（矢印）。

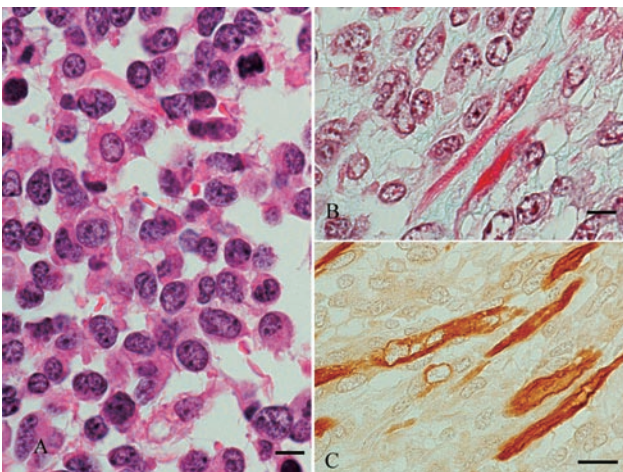


図 19A. 胎子性横紋筋肉腫，低分化型。胸腔内腫瘍，HE 染色，Bar = 5 μ m。腫瘍細胞はリンパ腫細胞によく似ている。（鹿児島県 東山崎達生）

図 19B. 図 19A と同じ症例。トリクロム染色，Bar = 5 μ m。細長い細胞が赤く染まり，横紋の形成が観察できる。

図 19C. 図 19A と同じ症例。デスマン染色，Bar = 10 μ m。核が縦に並んだ細長い細胞は筋管細胞に相当し，陽性に染まっている。