

学 位 論 文 要 旨

氏名 古澤 悠

題 目：伴侶動物における細胞診の診断精度向上のための新規検査法の開発

論文要旨：

細胞診は、簡便かつ非侵襲的に行うことができることから、獣医学領域において重要な診断ツールのひとつである。近年、伴侶動物の高齢化に伴い腫瘍性疾患の発症が増加している。高齢動物は全身麻酔や試験開腹などの侵襲的な検査に対してリスクを伴うことから、非侵襲的に行うことができる細胞診は腫瘍性疾患のスクリーニング検査として欠くことのできない臨床検査であり、今後その需要はますます高まると考えられる。獣医学領域の細胞診は、一般的にロマノフスキー染色を施した乾燥塗抹標本による細胞形態の観察が主流である。これは臨床の現場で日常的に行われている検査法であるが、正しい診断を行うためにはある程度の経験が必要であり、その診断はしばしば主観的になりやすい。また、細胞診はある程度の良性悪性の判定はできても細胞の由来や浸潤・転移の予測は困難である。非侵襲的な検査法で疾病の確定診断を求めることは獣医療の高度化のために必要であり、実用的な診断手法の開発は必須である。獣医学領域における非侵襲的検査として必要不可欠なツールである細胞診の診断精度をより向上するためには、客観的な評価および腫瘍性疾患の予後予測が可能な検査法の確立が必要である。そこで本研究では、伴侶動物における細胞診の診断精度向上のための新規検査法の開発を行った。

第 1 章では、**Argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR)** 染色をイヌとネコの細胞診に応用するために対比染色法、最適な固定法および保存標本への応用の検討を行った。AgNOR 染色とは、核内に存在する核小体形成領域を特異的に染色する方法であり、腫瘍の良性悪性の判定や悪性度・予後の推定などに有用性が知られている。しかしながら、AgNOR 染色単独では腫瘍細胞と炎症細胞を判別することが困難である。伴侶動物の細胞診標本において AgNOR 染色を臨床応用するためにはロマノフスキー染色を併用した二重染色が必要である。本研究では、AgNOR 染色とロマノフスキー染色を組み合わせた新規の対比染色法を確立し、イヌとネコから採取した臨床サンプルに対して様々な設定で検討を行った。サンプルは、細胞診あるいは病理組織検査でリンパ球増殖性疾患と診断されたイヌ (n=17) およびネコ (n=13) から得た。サンプルは、採取後に速やかに乾燥させた未固定の標本、未固定で凍結保存した標本 (-30°C)、既にメイ・グリュンワルド-ギムザ染色を施され室温で封入保存した標本を使用した。凍結保存の期間は、1 ヶ月～3 年間である。また、封入保存の期間は、1 ヶ月～10 年間である。最適な固定液の選出には、アセトン、95%エタノール、10%中性緩衝ホルマリン、メタノールを用いた。対比染色法の確立は、サンプルを固定後に、メイ・グリュンワルド-ギムザ染色、メイグリュンワルド単染色、ライト単染色、ギムザ単染色をそれぞれ AgNOR 染色の前

後に施した。メイ・グリーンワルド染色およびギムザ染色については、染色時間についても検討した。確立した対比染色法を用いて、凍結保存標本および封入後保存標本の染色性について検討した。結果として、本研究で使用した全ての固定液で AgNOR 染色は可能であった。また、AgNOR 染色後にメイ・グリーンワルド染色を短時間施す対比染色法が AgNOR スポットおよび細胞形態を最も明瞭に観察することができた。さらに、未固定の凍結保存標本であれば少なくとも 3 年間、ロマノフスキー染色が既に施された保存標本であれば 1 年間は AgNOR 染色の染色性が維持されることが分かった。本法は、固定液を選ばないことから免疫細胞化学との併用が可能であり、さらに長期冷凍保存標本への染色が可能であることからレトロスペクティブ解析への利用も可能である。よって、伴侶動物の腫瘍性疾患の臨床的挙動を細胞診で予測するための重要なツールとなることが期待される。

第 2 章では、上皮間葉転換を伴侶動物で用いられる一般的な乾燥塗抹標本において検出する免疫細胞化学 (immunocytochemistry; ICC) を開発した。上皮間葉転換とは、上皮系細胞が間葉系の形質を獲得する現象であり、上皮系悪性腫瘍の浸潤および転移の過程において重要な役割を果たすと考えられている。本研究では、ICC を用いて一般的な細胞診塗抹標本から上皮間葉転換を検出するための多重蛍光抗体法 (multiple fluorescent ICC; MFICC) の開発を行い、組織標本における免疫組織化学 (immunohistochemistry; IHC) の結果と比較・検討を行った。本研究で用いた乾燥塗抹標本は、外科的に摘出されたイヌ (n = 22) およびネコ (n = 9) から得た上皮系腫瘍組織より作製した。採取した塗抹標本は速やかに風乾し、使用するまでは -30°C で凍結保存した。標本作製後の腫瘍組織は速やかに病理組織学的検査に供された。本研究では、上皮系マーカーとして E-カドヘリン、間葉系マーカーとしてビメンチンを検出のターゲットとした。マウスモノクローナル抗 E-カドヘリンおよびウサギモノクローナル抗ビメンチン抗体を使用して ICC および IHC を行った。ICC は MFICC を用いた。IHC は標準的なポリマー法を行った。本章では、上皮系腫瘍細胞における上皮系マーカーである E-カドヘリンの減弱および間葉系マーカーであるビメンチンの発現を上皮間葉転換と定義した。結果として、1 枚の細胞診標本上で上皮間葉転換を高感度に検出できる診断法を確立することができた。確立した MFICC を臨床症例に適用し、IHC との比較や転移との関連性を解析した結果、本法は上皮間葉転換の検出に高い感度と特異度を示した。一方、転移との明らかな関連性は認められなかったが、これは上皮間葉転換が腫瘍の種類や動物種によって異なることに起因していると考えられた。今後さらなる症例の集積を行い、本法が細胞診で腫瘍の浸潤・転移を予測するための強力な診断ツールとして活用できることを期待したい。

以上、本研究では伴侶動物における細胞診の診断精度向上のための新規検査法の開発を目的として、AgNOR 染色および上皮間葉転換を検出するための MFICC の開発とその有用性について検討を行った。両法はいずれも腫瘍の悪性度、浸潤・転移など腫瘍性疾患の臨床的挙動を客観的に評価できる非侵襲的で実用性の高い診断ツールになり得ると考えている。本研究は伴侶動物の腫瘍細胞診の高度化に貢献するものであり、今後さらに多くの診断マーカーを用いた非侵襲的かつ腫瘍の診断・治療に有用な細胞診検査法を開発していきたいと考えている。

学位論文審査の結果の要旨

氏名	古澤 悠
審査委員	主査：鹿児島大学 教授 矢吹 映
	副査：鹿児島大学 教授 大和 修
	副査：鹿児島大学 教授 藤木 誠
	副査：鳥取大学教授 保坂善真
	副査：鹿児島大学 准教授 畑井 仁
題目	伴侶動物における細胞診の診断精度向上のための新規検査法の開発
<p>審査結果の要旨：</p> <p>申請者の古澤 悠氏の研究では、伴侶動物における細胞診の診断精度向上のための新規検査法の開発を行った。</p> <p>第 1 章では、腫瘍の悪性度の判定や予後の推定などに有用性が知られている好銀性核小体形成領域 (argyrophilic nucleolar organizer region: AgNOR) 染色について、伴侶動物の細胞診に応用するための固定法、対比染色法および保存標本への応用を検討した。</p> <p>リンパ増殖性疾患と診断されたイヌ (n=17) およびネコ (n=13) から得たリンパ節、腫瘍、胸水および腹水から細胞診標本を作成した。実験には、未固定の標本、未固定で凍結保存した標本 (-30℃)、既にメイグリュンワルド・ギムザ (MG) 染色を施され室温で封入保存した標本を使用した。凍結保存の期間は、1 ヶ月～3 年間である。また、封入保存の期間は、1 ヶ月～10 年間である。最適な固定法の選出には、10%中性緩衝ホルマリン、アセトン、95%エタノール、メタノールを用いた。メタノールについては固定時間についても検討した。対比染色法は、MG 染色、メイグリュンワルド単染色、ライト単染色およびギムザ単染色について検討した。</p> <p>結果として、AgNOR スポットは全ての固定液で検出可能であった。AgNOR スポットおよび細胞形態の観察に最も適した対比染色法 (メタノール固定) は、AgNOR 染色後にメイ・グリュンワルド染色を 1～3 分施したプロトコルであった。その他の対比染色法では核が濃染して明瞭な AgNOR スポットの観察が困難であった。凍結保存した標本については、全ての保存期間で染色可能であった。封入保存標本については、1 年間以内の保存標本は染色可能であった。</p> <p>以上の結果から、AgNOR 染色には獣医学領域で最も一般的に用いられているメタノール固</p>	

定が利用可能であり、AgNOR 染色後にメイ・グリーンワルド染色を短時間施す対比染色法が最良であった。また、本法が凍結保存標本や封入保存標本にも応用可能であることも明らかになった。

第 2 章では、悪性上皮系腫瘍の浸潤・転移に重要な役割を果たす上皮間葉転換を細胞診標本において検出するための細胞診多重蛍光抗体法を開発した。本研究では、免疫細胞化学 (immunocytochemistry; ICC) を用いて一般的な細胞診塗抹標本から上皮間葉転換を検出するための多重蛍光抗体法 (multiple fluorescent ICC; MFICC) の開発を行い、組織標本における免疫組織化学 (immunohistochemistry; IHC) の結果と比較・検討を行った。

鹿児島大学共同獣医学部附属動物病院で、外科的に摘出されたイヌ (n = 22) およびネコ (n = 9) から得た上皮系腫瘍組織より細胞診標本を作製した。採取した塗抹標本は速やかに風乾し、使用するまでは -30°C で凍結保存した。標本作製後の腫瘍組織は速やかに病理組織学的検査に供された。本研究では、上皮間葉転換の上皮系マーカーとして E-カドヘリン、間葉系マーカーとしてビメンチンを検出のターゲットとした。マウスモノクローナル抗 E-カドヘリンおよびウサギモノクローナル抗ビメンチン抗体を使用して ICC および IHC を行った。ICC は MFICC 法を用いた。IHC は標準的な酵素抗体法 (ポリマー法) で行った。結果として、IHC では、症例の 51.6% (イヌでは 8/22、ネコでは 8/9) が上皮間葉転換を示した。MFICC では、イヌでは組織標本で上皮間葉転換を認めた症例の 62.5% (5/8) で上皮間葉転換を検出できた。ネコでは、症例の 100% (8/8) で上皮間葉転換を MFICC で検出できた。細胞診標本における上皮間葉転換の検出は組織標本と同等に高い感度、特異度を示した。一方、細胞診標本での上皮間葉転換の発現と転移との関連性をフィッシャーの正確確立検定により統計学的に評価したところ、有意な関連性は認められなかった。

以上の検索により、本章では一枚の細胞診塗抹標本から上皮間葉転換を検出できる細胞診多重蛍光抗体法を開発することができた。上皮間葉転換と転移の間に明らかな統計学的関連性は認められなかったが、この点については腫瘍の種類や動物種の違いによって今後更なる解析が必要になると考えられた。細胞診標本によって上皮間葉転換を検出できる本法の臨床的な実用性および有用性は高いと考えられ、イヌとネコの悪性上皮系腫瘍疾患における臨床的挙動を予測する非侵襲的手法として期待できる。

上記の様に、本研究では伴侶動物における細胞診の診断精度向上のための新規検査法の開発を目的として、AgNOR 染色および上皮間葉転換を検出する細胞診多重蛍光抗体法の開発とその有用性について検討を行った。今回開発した方法は、いずれも腫瘍の悪性度、浸潤・転移など腫瘍の臨床的挙動を客観的に評価できる非侵襲的で実用性の高い診断ツールになり得ると考えられる。本研究は、適正な手法で実験が行われており、客観性のある科学的なデータが多く集積されていた。得られたデータは統計学的手法を用いて正しく解析されており、結果の意味するところも最新の文献を多数引用しながら適切に考察されていた。

以上により、本論文は博士 (獣医学) の学位論文に十分に値すると判断した。