



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on chicken lymphoma : establishment of an immunohistochemical diagnostic method for Marek' s disease and discovery of a novel lymphoma
Author(s)	KUROKAWA, Aoi; 黒川, 葵
Description	この博士論文の全文は利用可能日以降に公開されます。
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	乙第7232号
Issue Date	2025-12-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r7232
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/98677
Type	doctoral thesis
File Information	Aoi_KUROKAWA_abstract.pdf, 論文内容の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



学位論文内容の要旨
Abstract of the dissertation

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：黒川 葵

Name Aoi KUROKAWA

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

Study on chicken lymphoma:
establishment of an immunohistochemical diagnostic method for
Marek's disease and discovery of a novel lymphoma
(鶏リンパ腫の研究：マレック病の免疫組織化学的診断法の確立と
新規リンパ腫の発見)

鶏リンパ腫は、マレック病（Marek's disease, MD）、鶏白血病、細網内皮症の3種のウイルス誘発性腫瘍に分類される。このうち、MDはマレック病ウイルス（Marek's disease virus, MDV）によって引き起こされ、若鶏に多く発生するT細胞性リンパ腫である。MDの腫瘍細胞は通常、CD3⁺CD4⁺CD8⁻のヘルパーTリンパ球由来であり、がんタンパク質 Marek's disease virus-*EcoRI*-Q（Meq）を発現する。MeqはMDV特異的で、腫瘍細胞に一貫して発現するため、免疫組織化学による検出はMDの診断に有用とされる。しかし、ホルマリン固定パラフィン包埋切片に適した高感度かつ高い特異性を持つ抗体が存在しないため、免疫組織化学的診断法としての普及は限定的である。現在でもMDの診断は組織形態学的解析に依存することが多く、正確性に課題がある。また、腫瘍細胞がCD3⁺Tリンパ球由来であることを免疫組織化学により確認し、MDと診断する例もある。しかし、この方法ではMDVの関与を直接証明することはできず、腫瘍細胞の免疫表現型を明らかにしているに過ぎない。さらに、抗CD3抗体は鶏Tリンパ球に対する感度や特異性が十分に検証されないまま使用されることが多く、診断の信頼性に影響を及ぼしている。

一方、鶏白血病および細網内皮症は主に成鶏に発生するB細胞性リンパ腫であり、それぞれ鶏白血病ウイルス、細網内皮症ウイルスにより引き起こされる。鶏Bリンパ球の免疫組織化学的な同定法は標準化されていないため、鶏のB細胞性リンパ腫の診断は組織形態学的解析やCD3⁻を根拠に行われており、正確な診断は困難である。

本研究では、鶏リンパ球の免疫組織化学的同定法を確立し、T細胞性リンパ腫およびB細胞性リンパ腫の正確な鑑別法、ならびにMDの高精度な診断法の確立を目的として、解析および評価を実施した。

第I章では、市販の抗体21種類を用いて、ホルマリン固定後または亜鉛固定後のパラフィン包埋組織における鶏リンパ球への反応性を免疫組織化学により評価した。その結果、Tリンパ球および5種類のT細胞サブセット、さらにBリンパ球を免疫組織化学的に同定可能であることを確認した。感度および特異性の点で、とくに抗human CD3抗体(clone F7.2.38)はTリンパ球、抗chicken BAFF-R抗体(clone 2C4)はBリンパ球の検出に適することが示された。また、亜鉛固定パラフィン包埋切片では、ホルマリン固定では検出困難な抗原(CD4、TCR $\gamma\delta$ およびTCR α V β 1)の検出が可能であることが判明した。

第II章では、MDの診断に有用な抗Meqモノクローナル抗体を作出した。昆虫細胞—バキュロウイルス発現系を用いてMeq抗原を作製し、これをマウスに免疫することで、14種類の抗Meqモノクローナル抗体を得た。そのうち6種類がホルマリン固定パラフィン包埋切片でのMeq検出に適していることを、MSB-1細胞(MD由来細胞株)、MDV実験感染鶏および非感染鶏の組織を用いて確認した。さらに、1976年から2023年に国内で収集された野外の鶏リンパ腫104検体を対象に、免疫組織化学によるMeq検出の診断的有用性を検証した。単独のモノクローナル抗体によるMeq陽性症例の検出率が76~88%であったのに対し、3種類のモノクローナル抗体を混合した抗Meqカクテル抗体では99%の検出率を示し、最も高精度にMDを診断できることが判明した。また、これまでMDのリンパ腫は大小不同の腫瘍細胞で構成されると考えられてきたが、MD症例の約8%は鶏白血病と同じく均一な腫瘍細胞で構成されることが判明した。この結果は、組織形態学的解析のみでは鶏リンパ腫の診断が困難な場合があることを示しており、免疫組織化学的解析の重要性を裏付けるものである。

第III章では、これまでに報告されていない鶏の新規リンパ腫を発見した。本リンパ腫は、国内の1歳以上の複数品種の鶏において、合計23症例が確認された。肉眼的には既知のリンパ腫との鑑別は困難であるが、組織形態学的特徴は既知の鶏リンパ腫と異なり、小型で均一な腫瘍細胞で構成されていた。免疫表現型解析により、この腫瘍はCD3⁺CD4⁻CD8⁺の細胞傷害性Tリンパ球に由来し、Meqを発現しないことが判明した。さらに、ポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)と*in situ* hybridization法で*meq*遺伝子は検出されなかった。MDのリンパ腫は一般的にCD3⁺CD4⁺CD8⁻のヘルパーTリンパ球由来でMeqを発現することから、このリンパ腫はMDとは異なる疾病であると推定された。加えて、鶏に腫瘍を誘発する3種類のウイルス、鶏白血病ウイルス、細網内皮症ウイルスおよび牛伝染性リンパ腫ウイルスの関与が免疫組織化学とPCRにより検索されたが、いずれも否定された。疫学的解析では、新規リンパ腫の発生率は0.016%で、MDと誤診されている可能性が示唆された。現時点において、新規リンパ腫の診断には、とくにCD8⁺Meq⁻の免疫表現型を確認することが重要と考えられる。

本研究により、鶏リンパ球の免疫組織化学的同定法が確立され、T細胞性リンパ腫およびB細胞性リンパ腫の正確な鑑別が可能となった。また、MDの高精度な診断法の確立により、その効果的な制御に貢献できると考えられる。さらに、この診

断技術は新規疾患の発見にもつながり、鶏の T 細胞性リンパ腫を再定義する必要性を示した。今後は、新規リンパ腫の病態解明に加え、養鶏業界への影響評価が重要な課題となる。