

【短 報】 産業動物

B細胞モノクローナル増殖が証明された
牛伝染性リンパ腫のホルスタイン種乳牛の1症例

坂口 加奈^{1)*} 前澤 誠希^{1)**} 轉馬 創^{1)***} 渡邊 謙一¹⁾
堀内 雅之^{1)****} 古林与志安¹⁾ 永田 健樹²⁾ 小島 一優²⁾
チェンバーズ・ジェームズ²⁾ 内田 和幸²⁾ 猪熊 壽^{1)*****}

1) 帯広畜産大学獣医学研究部門 (〒080-8555 帯広市稲田町西2線11)

2) 東京大学大学院農学生命科学研究科 (〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1)

*現所属：北海道NOSAIオホーツク統括センター (〒099-0879 北海道北見市美園497-1)

**現所属：東京大学大学院農学生命科学研究科 OSG国際防疫獣医学講座 (〒113-8658 東京都文京区弥生1-1-1)

***現所属：家畜改良センター岩手牧場 (〒020-0123 岩手県盛岡市下厨川字穴口)

****現所属：株式会社 栄養・病理学研究所 (〒610-0231 京都府綴喜郡宇治田原町立川古池谷7-2)

*****現所属：東京大学大学院農学生命科学研究科 動物医療センター (〒113-8658 東京都文京区弥生1-1-1)

要 約

3歳7カ月齢のホルスタイン種乳牛が乳量減少を呈した。体表リンパ節腫大を認め骨盤腔内には複数の大小腫瘍を触知した。末梢血白血球数は198,300/ μ lで、分裂像を含む異型リンパ球が多数認められた。BLV抗体陽性であったため牛伝染性リンパ腫と診断され廃用となり、帯広畜産大学に搬入された。大学における追加検査として実施された腫大リンパ節の細胞診検査では、異型性の高い中大型リンパ球が88%認められた。また、血清LDH活性は4,990U/l、LDH-2および3分画はそれぞれ1,976U/lと692U/l、さらに血清TK活性は1,440U/lといずれも著増していた。免疫グロブリン重鎖遺伝子の再構成を利用したBリンパ球クローナリティ解析を実施したところ、末梢血はモノクローナルなBリンパ球の増殖であることが証明された。病理学的検査では全身のリンパ節腫大と主要臓器への腫瘍化したBリンパ球浸潤が認められ、本症例は牛伝染性リンパ腫であると確定診断された。Bリンパ球クローナリティ解析は末梢血の異常リンパ球出現を証明する手段として有効であり、牛伝染性リンパ腫の生前診断法のひとつとして有用と考えられた。

キーワード：牛伝染性リンパ腫、クローナリティ解析、腫瘍マーカー

-----北獣会誌 66, 000~000 (2022)

牛伝染性リンパ腫は牛伝染性リンパ腫ウイルス (Bovine Leukemia virus: BLV) の感染が原因によって生じるBリンパ球の悪性腫瘍である^[1,2]。その病態は全身の様々なリンパ組織が腫瘍性に増殖するものであるが、腫大リンパ節の部位や腫大程度は様々であり、周辺臓器の圧迫度合いや腫瘍が浸潤した臓器の障害によって臨床徴候も多様である^[1,2]。本疾患の臨床診断としては、一般的には末梢血リンパ球数増多と異常リンパ球 (腫瘍化したリンパ球) の検出、および腫大したリンパ節の細胞

診所見が用いられる^[1-3]。また、このほか、血清中LDH活性とそのアイソザイム分画の変化、および血清チミジンキナーゼ (thymidine kinase: TK) 活性の増加が腫瘍マーカーとして利用される^[3-8]。さらに医学および伴侶動物領域では、腫瘍化したBリンパ球のモノクローナル増殖を検出するための分子生物学的検査法 (クローナリティ解析) が診断に応用されている。近年、この方法は牛でも開発されたものの^[9,10]、臨床例での応用例は未だ多くない。今回、末梢血リンパ球増多症と体表リン

連絡責任者：猪熊 壽 東京大学大学院農学生命科学研究科 動物医療センター

〒113-8658 東京都文京区弥生1-1-1

TEL 03-5841-5421 FAX 03-5841-8012 E-mail: ainokuma@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

パ節の腫大を呈した典型的な牛伝染性リンパ腫症例において、B細胞のモノクローナル増殖を証明したので、その概要を報告する。

症 例

症例は3歳7カ月齢のホルスタイン種乳牛で、1歳11カ月齢時初産後、人工授精をするも受胎せず、搾乳を継続していた個体である。10日ほど前から乳量が減少してきたことを主訴に診察依頼があった。初診時(第1病日)、症例は食欲を示すものの著しく消瘦しており、左右腸骨下リンパ節の腫大が認められた。また、直腸検査において複数の大小腫瘤を触知した。なお、当該牧場では1年前に同居牛に牛伝染性リンパ腫が発症していた。これらの所見から、症例が牛伝染性リンパ腫を発症していることを疑い、血液検査を実施したところ白血球数 $198,300/\mu\text{l}$ で、末梢血塗抹標本では分裂像を含む異型性を示すリンパ球がほとんどであった。BLV抗体は陽性であり、症例は家畜共済3号廃用事故と認定された後、第4病日に帯広畜産大学に搬入された。

搬入時検査では体温 41.0°C 、心拍 132 回/分、呼吸数 78 回/分で、著しい消瘦、浅頸および腸骨下リンパ節の腫大がみられた(図1、図2)。眼球はやや突出しており、茶褐色の水様便を排泄した。直腸検査を実施したところ、左右内腸骨リンパ節が手掌大に腫大していた他、子宮頸管右側および卵巢近傍に直径 $4\sim 5\text{ cm}$ の腫瘤が触知された。血液検査では貧血および著しいリンパ球増多症が認められた(表1)。血液塗抹標本の観察では強い異型性を呈する核をもつ大型リンパ球が多数認められた(図3)。血液化学検査ではASTとGGT活性の軽度増加に加えて、LDH活性の著増がみられた(表1)。腫瘍マー

表1. 血液および血液化学検査所見(第4病日、大学搬入時)

RBC	$4.30\times 10^6/\mu\text{l}$	AST	165 U/dl
Hb	8.4 g/dl	GGT	36 U/l
Ht	21.0%	LDH	4,940 U/l
MCV	48.8 fl	LDH-1	2,124 U/l
MCHC	40.0 g/dl	LDH-2	1,976 U/l
Platelet	$17.6\times 10^3/\mu\text{l}$	LDH-3	692 U/l
WBC	159,700/ μl	LDH-4	99 U/l
Sta	0/ μl (0%)	LDH-5	49 U/l
Seg	1,597/ μl (1%)	TK	1,440 U/l
Eos	0/ μl (0%)	TP	6.2 g/dl
Lym	158,103/ μl (99%)	Albumin	3.5 g/dl
Mon	0/ μl (0%)	A/G	1.30
		BUN	12.0 mg/dl

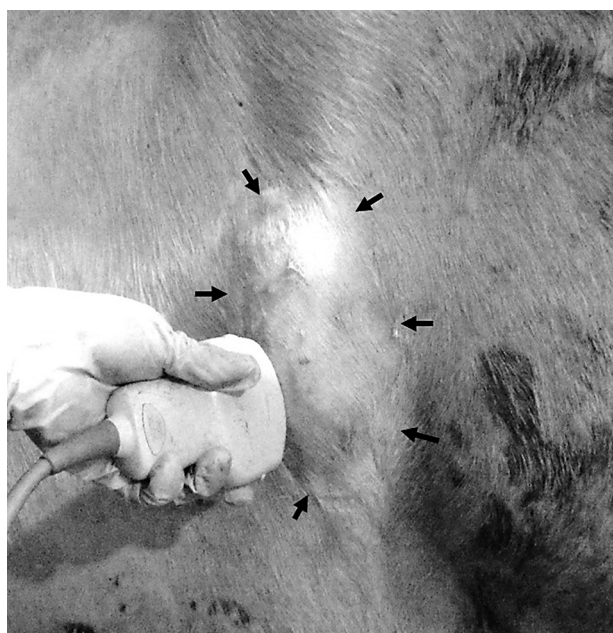


図2. 左腸骨下リンパ節の腫大(矢印)

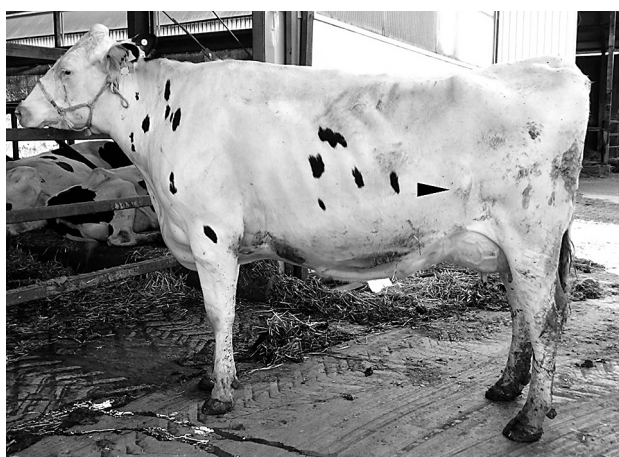


図1. 症例の外貌(第4病日、大学搬入時)
症例は消瘦が著しく体表リンパ節の腫大が認められた(矢頭: 左腸骨下リンパ節)

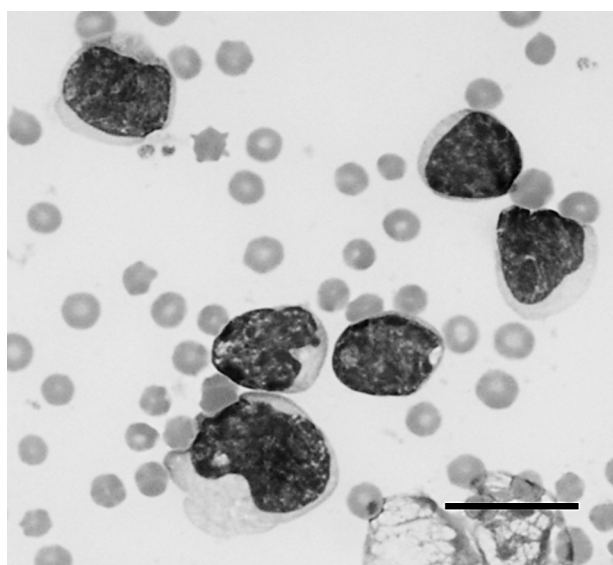


図3. 血液塗抹標本ギムザ染色像 Bar=10 μm
強い異型性を示す核をもつ大型のリンパ球が多数認められた

カーとしての、LDHアイソザイム解析では全ての分画で高値がみられ、血清TK活性も著しく高値を示した(表1)。

腫大した左腸骨下リンパ節を21G針で穿刺し、細胞診を行ったところ、末梢血にみられたのと同様の強い異型性を持つリンパ球が優勢であった。小リンパ球(リンパ球の核の直径が赤血球の直径2個分未満)12%、中リンパ球(同2個分)50%、大リンパ球(同2個分以上)38%であり(図4)、牛リンパ腫の細胞診診断基準である中

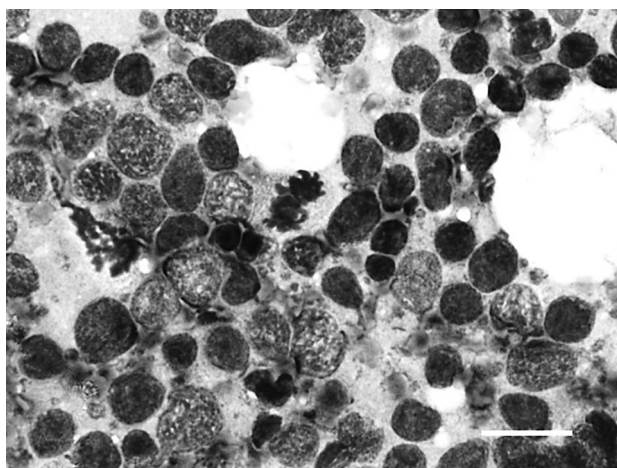


図4. 左腸骨下リンパ節細胞診所見

ギムザ染色 Bar=10μm
分裂像を含む強い異型性を持つリンパ球が優勢であり、中・大リンパ球は88%認められた

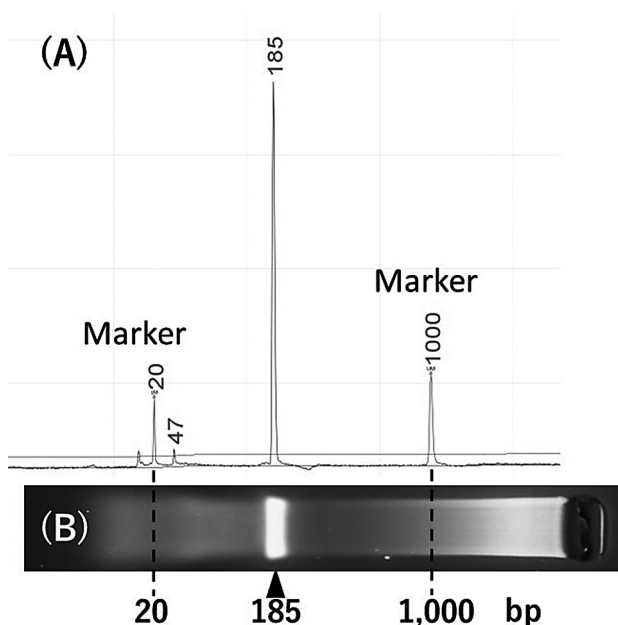


図5. 免疫グロブリンの重鎖(H鎖)の遺伝子再構成を利用した末梢血Bリンパ球のクローナル解析

(A) キャピラリー電気泳動像

(B) 2%アガーゲル電気泳動像

どちらも185bpに明瞭なモノクローナルバンドが認められた(矢頭)

リンパ球+大リンパ球の割合が50%を超えていた[11]。

末梢血から抽出したDNA中のBLVプロウイルス量をキット(ウシ白血球ウイルス検出キット: TaKaRa、滋賀)を用いて、測定したところ、1,276 copies/10 ng DNAと著増していた。またクローナリティ解析は、免疫グロブリン重鎖(H鎖)の遺伝子再構成を利用したPCRをMaezawaらの方法[9]により実施した。すなわち、免疫グロブリン重鎖(Immunoglobulin heavy chain: IgH)可変領域を増幅するプライマーセット(BoVHF1: 5'-AGC CCT GAA ATC CCG GCT CA-3'/BoVHR1: 5'-TCC AGG AGT CCT TGG CCC CA-3')を用いて、末梢血DNAをテンプレートとしたPCRを実施し、そのPCR産物をキャピラリー電気泳動装置(Qsep 1-Lite Bio-Fragment Analyzer: Bioptronic Inc.、台湾)および2%アガロースゲル電気泳動により解析した。いずれの方法でも本症例の末梢血由来DNAは明瞭な単一バンドを呈し、リンパ球のモノクローナルな増殖と判定された(図5)。

病理学的検査所見

症例は第6病日に安楽死処置後、病理解剖に供された。全身のリンパ節(浅頸、膝窩、乳房上、腸骨下、内腸骨、肺門)が顕著に腫大していた。腫大したリンパ節断面は乳白色髄様であり、固有構造は置換されていた。同様の乳白色髄様を呈する腫瘍性病変は腎臓、心臓、子宮、硬膜下、下垂体前葉に認められた。腫大リンパ節の病理組

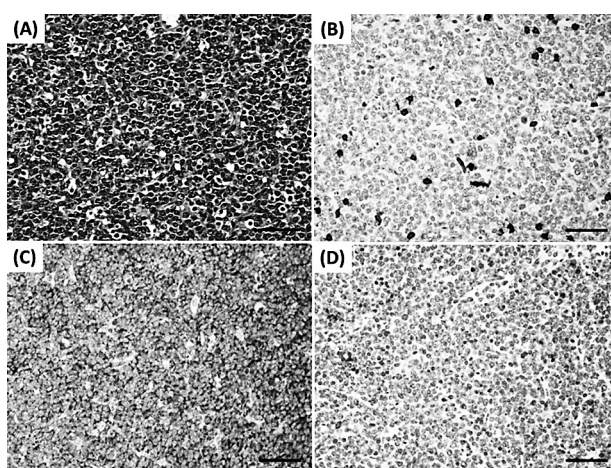


図6. 左腸骨下リンパ節の病理組織学的検査所見

Bar=50 μm

(A) HE染色では異型性を示す中～大型の独立円形細胞が増殖しており、リンパ腫と診断された腫大リンパ節の免疫染色検査では、(B) CD3陰性、(C) CD20陽性および(D) BLA36陽性を呈し、腫瘍細胞はBリンパ球と診断された

組織学的検査では、異型性を示す中～大型の独立円形細胞が増殖しており、リンパ腫と診断された。また、腫大リンパ節の免疫染色検査では、増殖した腫瘍細胞はTリンパ球表面マーカーであるCD3には陰性であったが、Bリンパ球表面マーカーであるCD20とBLA36に対しては陽性を呈し、Bリンパ球と診断された(図5)。

考 察

本症例は削瘦と乳量減少を呈したBLV陽性牛に、著しいリンパ球増多症と体表リンパ節腫大が認められ、生前に牛伝染性リンパ腫と診断された典型的な牛伝染性リンパ腫症例であった。本症例はBLVプロウイルス量の著増を示しており、安楽死後の病理学的検査においても体表のみならず体腔内の多中心的なリンパ節腫大、および腫瘍化Bリンパ球の主要臓器への浸潤が認められ、牛伝染性リンパ腫であることが確認された。

牛伝染性リンパ腫の生前診断については、家畜共済事務取扱要領に廃用要件が明記されており、「一般臨床症状を伴うものであって次の基準のいずれかを満たしたものとす。なお、アの基準による場合は、原則として抗体検査またはPCR法の結果を参考にして疫学的な検討を加えて慎重に取り扱うこと。(ア) 体表若しくは体腔内のリンパ節の複数の腫大または胸腺の腫大が認められ、かつ、血液検査において異型リンパ球数が末梢リンパ球数の5%以上認められるもの、または腫大リンパ節の生体組織学的検査において多数の異型リンパ球が認められるもの、(イ) 血液検査において末梢リンパ球数が12,000個/mm³以上認められ、かつ、抗体検査またはPCR法の結果陽性のもの」と規定されている。本症例は臨床現場における検査で(ア)(イ)のどちらの基準をも満たしており、牛伝染性リンパ腫と診断されて大学に搬入されたものである。

しかし、実際の症例では生前に上記基準を満たすものばかりではない。リンパ球増多症や体表リンパ節腫大を呈することのない、いわゆる非典型的な牛伝染性リンパ腫症例も多く、食肉検査、あるいは安楽死後の病理学的検査で確定する症例が報告されている^[12-14]。このため、リンパ腫の補助診断法として、血清LDHやLDHアイソザイム解析、あるいはTK活性の測定が利用されている^[5-8]。本症例でも血清LDH活性、LDH-2および3分画、およびTK活性のいずれもが高値を示し、これらの検査項目が牛伝染性リンパ腫の診断に有用であることが再確認された。

また、上記診断基準のうち牛における異型リンパ球の

定義は明確にされておらず、主観的であいまいな部分が残っている。リンパ球は腫瘍化していなくても、各種抗原刺激により異型性を呈し、「反応性リンパ球」と呼ばれる形態変化を示すことが知られている^[15]。医学領域では腫瘍化リンパ球は「異常リンパ球」と呼ばれ、「反応性リンパ球」と区別されている^[16]。今回、Bリンパ球のIgH遺伝子再構成を利用したPCRを用いてクローナリティ解析を実施したところ、本症例由来DNAは単一バンドを示し、増加した末梢血リンパ球がBリンパ球のモノクローナル増殖であることが証明された。モノクローナル増殖は、腫瘍性増殖を意味しているため、本症例の末梢血リンパ球は腫瘍化した「異常リンパ球」であることが示された。クローナリティ検査は末梢血に出現した異型度の高いリンパ球が「異常リンパ球」であることを客観的に示す手段として有用と考えられた。しかしながら、今回用いた検査法が腫瘍化したBリンパ球を検出する感度は約70%と報告されており^[9]、本検査陰性が必ずしもリンパ腫を否定することにならない点に留意する必要がある。また、牛の造血器腫瘍としてはBリンパ球腫瘍である牛伝染性リンパ腫に遭遇する機会が多いが、Tリンパ球性のリンパ腫や骨髄性白血病の発生も報告されている^[17-19]。リンパ腫を疑うものの、クローナリティ解析によりBリンパ球のモノクローナルな増殖が確認できない場合、検査系の感度が低くて陰性を示している可能性に加えて、Bリンパ球以外の腫瘍であることも想定して、骨髄検査や免疫組織化学検査を追加して診断を進める必要があると考えられる。

本研究の一部は科研費20H03142により実施された。貴重な症例をご提供いただきました十勝NOSAIの獣医師各位に深謝します。

引用文献

- [1] Angelos JA, Thurmond MC: Bovine lymphoma. *In*: Larrge Animal Internal Medicine, 5th ed. (Smith, BP. ed.), 1070-1073, Elsevier, St. Louis (2015)
- [2] Constable PD, Hinchcliff KW, Done SH: Veterinary Medicine, A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses, 11th, 785-794, Elsevier, St. Louis (2017)
- [3] 猪熊 壽: 牛伝染性リンパ腫の臨床診断、臨床獣医、印刷中 (2022)
- [4] 猪熊 壽: 異常リンパ球の検出による牛伝染性リンパ腫の臨床診断-鑑別のポイントとクローナリティ解析、家畜診療、69、71-81 (2022)

- [5] Sakamoto L, Obayashi T, Matsumoto K, Kobayashi Y, Inokuma H: Serum thymidine kinase activity as a useful marker for bovine leukosis, *J Vet Diagn Invest*, 21, 871-874 (2009)
- [6] Tawfeeq MM, Miura S, Kobayashi Y, Furuoka H, Inokuma H: Utility of serum thymidine kinase activity measurements for cases of bovine leukosis with difficult clinical diagnoses, *J Vet Med Sci*, 75, 1213-1217 (2013)
- [7] 三浦沙織、猪熊 壽: 地方病性牛白血病発症マーカーとしての乳酸脱水素酵素活性の評価、*産業動物臨床医誌*、6、149-153 (2016)
- [8] Konishi M, Kobayashi S, Tokunaga T, Chiba Y, Tsutsui T, Arai S, Kameyama K, Yamamoto Y: Simultaneous evaluation of diagnostic marker utility for enzootic bovine leukosis, *BMC Vet Res*, 15: doi. org/10.1186/s12917-019-2158-4 (2019)
- [9] Maezawa M, Watanabe K, Horiuchi N, Matsumoto K, Kobayashi Y, Inokuma H: Molecular diagnosis of bovine B-cell lymphoma using PCR for immunoglobulin heavy chain gene, *J Vet Med Sci*, 82, 61-63 (2020)
- [10] Takezawa S, Maezawa M, Tsuzuku S, Kakakami J, Oouchi Y, Inokuma H: Abnormal clonalities of B-lymphocytes in bovine leukemia virus-infected cattle with persistent lymphocytosis, *J Vet Med Sci*, 83, 1928-1932 (2021)
- [11] 田川道人、堀内雅之、松本高太郎、古林与志安、古岡秀文、猪熊 壽: リンパ節生検材料の細胞構成比率に基づいた牛白血病診断基準の検討、*家畜感染症誌*、3、83-87 (2014)
- [12] 田川道人、下田 崇、富樫義彦、渡辺由紀、古林与志安、古岡秀文、石井三都夫、猪熊 壽: 非典型的牛白血病のホルスタイン種乳牛3症例、*日獣会誌*、61、936-940 (2008)
- [13] 坂口加奈、前澤誠希、田中佑典、互野佑香、上沢彩、渡邊謙一、堀内雅之、古林与志安、猪熊 壽: 体表リンパ節腫大と骨盤腔内腫瘤の認められない地方病性牛白血病ホルスタイン種乳牛の1症例、*産業動物臨床医誌*、8、227-230 (2017)
- [14] 宗村佳子、小川 仁、杉山恵美、藤川 浩、村上賢二: 東京都におけると畜牛の地方病性牛白血病発生状況と牛白血病ウイルス浸潤状況、*日獣会誌*、67、523-527 (2014)
- [15] Harvey JW: Lymphocytes, *Veterinary Hematology, A diagnostic guide and color atlas*, 156-164, Elsevier Saunders, St. Louis (2012)
- [16] 勝田逸郎: 白血球系の基礎知識、*ビジュアル臨床血液形態学 改訂第4版*、39-62、南江堂、東京(2021)
- [17] Maezawa M, Akiyama N, Tagawa M, Watanabe K, Matsumoto K, Furuoka H, Inokuma H: A clinical case of acute myelomonocytic leukemia in a Holstein cow, *J Vet Med Sci*, 83, 819-823 (2021)
- [18] Maezawa M, Nakamichi A, Akiyama N, Tagawa M, Watanabe K, Kobayashi Y, Inokuma H: Acute myelomonocytic leukemia negative for alpha-naphthyl acetate esterase stain in a Holstein cow, *J Vet Med Sci*, 83, 1643-1647 (2021)
- [19] Itoh M, Kobu M, Takayama H, Ihiskawa Y, Kadoda K: Cytologic variants of $\gamma \delta$ T cell lymphoma in cattle, *J Vet Med Sci*, 73, 399-402 (2011)