

症例報告

25 ヶ月齢黒毛和種肥育牛のリンパ球増多症を伴わない 地方病性牛伝染性リンパ腫

前澤誠希^{1,2)} 川上侑記¹⁾ 佐藤陽輔¹⁾ 菅生樹春³⁾ 渡邊謙一¹⁾
堀内雅之¹⁾ 松本高太郎^{1,2)} 古林与志安^{1,2)} 猪熊 壽⁴⁾

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

²⁾ 岐阜大学大学院臨床獣医学連合講座 (〒 058-1193 岐阜県岐阜市柳戸 1-1)

³⁾ 菅生家畜診療所 (〒 089-0242 北海道上川郡清水町字美蔓西 22 線 120)

⁴⁾ 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)

連絡責任者氏名：前澤 誠希

連絡先：〒 080-8555 北海道帯広市稲田町西 2 線 11 帯広畜産大学獣医学研究部門

TEL/FAX: 0155-49-5372

E-mail: obihiro_23035@yahoo.co.jp

【要 約】

25 ヶ月齢の黒毛和種肥育牛が成長不良を主訴に受診した。身体検査により、体表リンパ節の腫大が認められた。血液検査ではリンパ球数は正常範囲内であり、血液生化学検査では、乳酸脱水素酵素活性およびチミジンキナーゼ活性の高値が認められた。牛伝染性リンパ腫ウイルス (bovine leukemia virus: BLV) 遺伝子および BLV 抗体は陽性であった。病理学的検索では全身のリンパ節は腫大しており、病理組織学的に B 細胞性リンパ腫と診断された。PCR を用いた B 細胞遺伝子のクローナリティ解析では B 細胞のモノクローナルな増殖が確認され、inverse-PCR では BLV プロウイルスのバイクローナルな組み込みが認められた。以上の検査より、本症例は地方病性牛伝染性リンパ腫と診断された。

キーワード：早期発症、地方病性牛伝染性リンパ腫、inverse-PCR

緒言

地方病性牛伝染性リンパ腫 (enzootic bovine leukosis: EBL) は牛伝染性リンパ腫ウイルス (bovine leukemia virus: BLV) 感染によって B 細胞が腫瘍化する疾患であり [16]、その病態はその他の動物種では悪性リンパ腫と定義される [8]。BLV 感染牛は無症状キャリアとなり、3 年以上の潜伏期を経て、末梢血リンパ球増多症、様々なリンパ節の腫大およびそれに関連する臨床症状を発現するのが一般的である [16,

18]。しかし近年、3 歳齢未満の肥育牛における EBL 発症症例 [3, 20]、およびと畜場における若齢肥育牛の EBL 発生率の増加が報告されている [17]。今回、25 ヶ月齢黒毛和種肥育牛における、リンパ球増多症を伴わない EBL 発症症例に遭遇したためその概要を報告する。

症例

症例は黒毛和種肥育牛、去勢雄、25 ヶ月齢で、同居牛に比べて成長が悪いことを主訴に受診した。身体検査にて、体表リンパ節の腫大が認められ、牛伝染性リンパ腫が疑われたため、病性鑑定を目的に帯広畜産大学に搬入された。搬入

受理：2020年6月17日

時、体温 40.3℃、心拍数 108 回 / 分、呼吸数 84 回 / 分で、体高は目測で約 140 cm、活力は正常であった。耳下腺リンパ節、下顎リンパ節、浅頸リンパ節および腸骨下リンパ節が腫大しており、直腸検査にて複数の腫瘤を触知した。左腸骨下リンパ節の細針吸引検査 (fine needle aspiration: FNA) を行ったところ、明瞭な核小体を有する中型から大型の異型リンパ球が 84% 認められ、有糸分裂も散見された (図 1)。血液検査では、赤血球数 ($671 \times 10^4 / \mu\text{L}$)、白血球数 ($10,200 / \mu\text{L}$)、リンパ球数 ($3,978 / \mu\text{L}$) および血小板数 ($519 \times 10^4 / \mu\text{L}$) は正常範囲内であった [7]。血液生化学検査では、総乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase: LDH) 総

活性値、LDH-2 活性値、LDH-3 活性値およびチミジンキナーゼ活性値の高値が認められた [9, 19]。病原学的検査として、nested polymerase chain reaction (PCR) を用いた BLV 特異遺伝子検査 [4] および牛白血病エライザキット (JNC, 東京) を用いた BLV 抗体検査を実施したところ、結果はどちらも陽性であった。

症例は搬入翌日に病理解剖に供された。全身のリンパ節 (下顎、浅頸、肺門、胃周囲、腸間膜、肝門、腎門、腸骨下、骨盤腔内、大動脈周囲および膝窩リンパ節) は最大 $20 \times 5 \times 5$ cm 大に腫大していた (図 2)。腫大リンパ節の断面は乳白色髓様で、一部で出血巣が認められた。

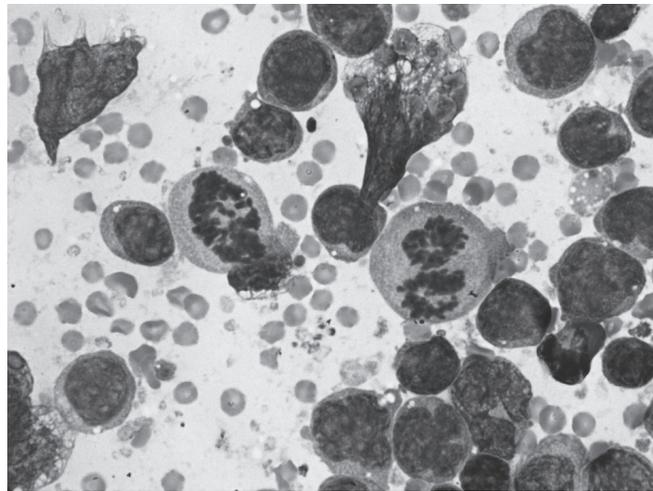


Fig. 1. Cytological finding of FNA of the left subiliac lymph node. The population is composed of large sized lymphoid cells that have finely stippled chromatin. Wright-Giemsa stain.

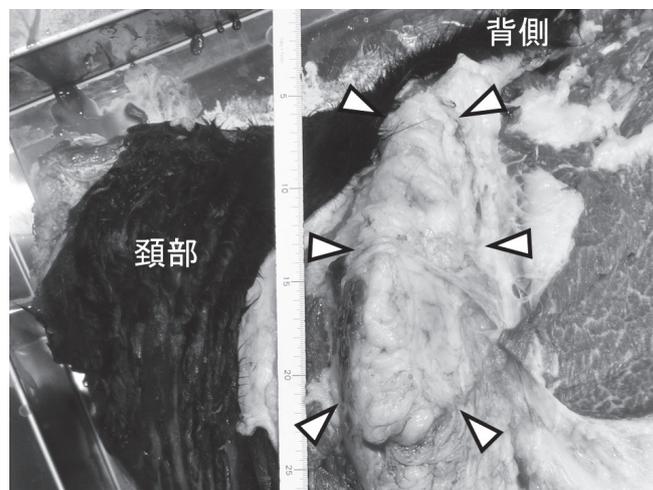


Fig. 2. Enlarged left superficial cervical lymph node (arrowheads).

また、第四胃周囲および腸間膜に脂肪壊死が認められた。検索した範囲では実質臓器に肉眼的異常は認められなかった。病理組織学的検索では、腫大リンパ節において、大型の核をもつ異型リンパ球様細胞のびまん性増殖が観察され、多数の核分裂像が認められた（図3）。実質臓器での腫瘍細胞の増殖は、検査を実施した範囲では認められなかった。免疫組織化学では、腫瘍細胞はB細胞マーカーであるBLA36陽性、T細胞マーカーであるCD3陰性であり（図4）、病理学的にB細胞性リンパ腫と診断された。

末梢血、左浅頸リンパ節よりFNAにて採材した組織および病理解剖時に採取した組織から抽出したDNAを用い、PCRによるB細胞遺伝子のクローナリティ検査（B-cell clonality PCR）[4, 6]を行ったところ、末梢血ではバンドが認められず、浅頸リンパ節由来の材料ではいずれも明瞭な1本のバンドが確認された（図5）。また、同じ検体を用いて、inverse-PCRによるBLVプロウイルス組込み部位のクローナリティ検査[12]を行ったところ、末梢血ではバンドが認められず、浅頸リンパ節由来の材料

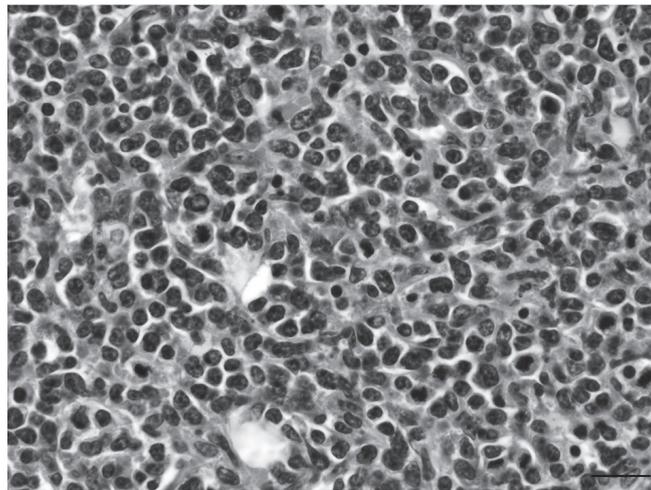


Fig. 3. Histopathology of superficial cervical lymph nodes. Diffusely proliferation of neoplastic lymphoid cells was observed. Hematoxylin and eosin stain. Bar = 20 μ m.

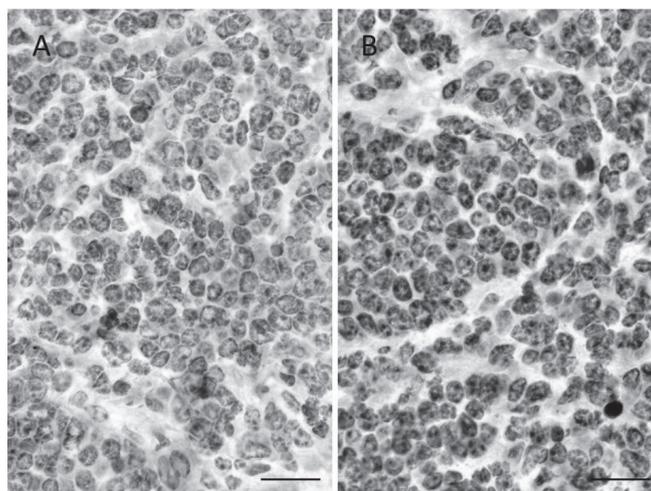


Fig. 4. Immunohistochemistry of superficial cervical lymph node. Neoplastic cells were immunopositive for BLA-36 (A) and negative for CD3 (B). Mayer's hematoxylin counterstain. Bar = 20 μ m.

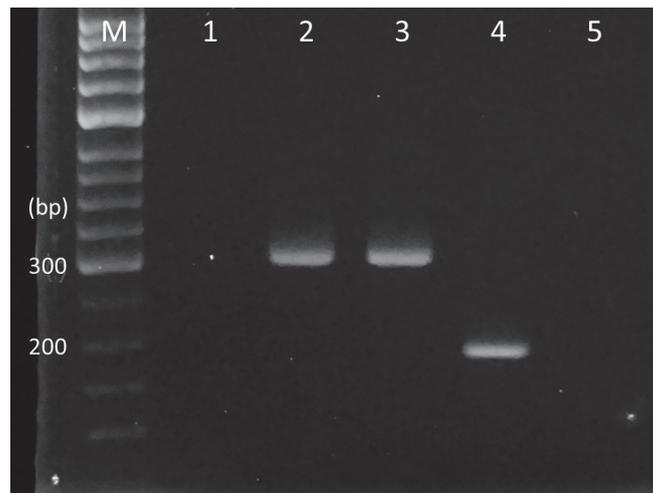


Fig. 5. Result of PCR analysis for immunoglobulin heavy chain gene clonality. Lane 1: blood; Lane 2: FNA; Lane 3: lymph node; Lane 4: positive control (typical EBL); Lane 5: negative control (DW); M: molecular weight marker.

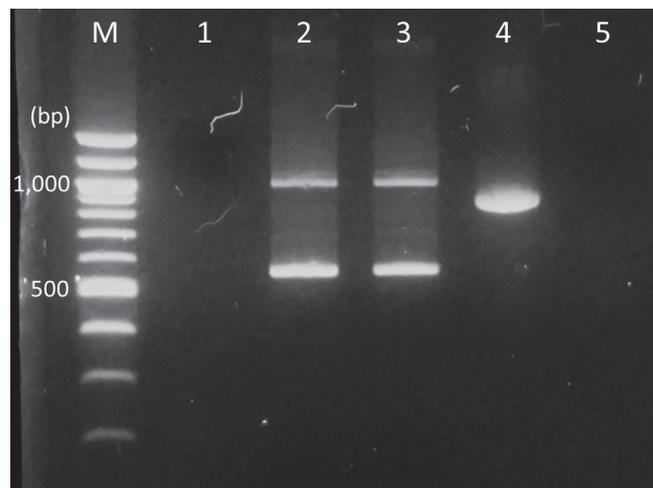


Fig. 6. Result of inverse-PCR. Lane 1: blood; Lane 2: FNA; Lane 3: lymph node; Lane 4: positive control (typical EBL); Lane 5: negative control (DW); M: molecular weight marker.

ではいずれも明瞭な2本のバンドが認められた(図6)。

考察

本症例はリンパ球増多症が認められなかったものの、身体検査、FNAによる細胞診および血液生化学検査より臨床的に牛伝染性リンパ腫と診断された。加えて、病理学的検索により、B細胞性リンパ腫と診断された。本症例は25ヵ月齢であり、BLV遺伝子および抗体が陽性であったが、EBLは一般的に3歳齢以上の

牛で発症するとされていること [16]、およびBLV感染の散発性牛伝染性リンパ腫症例が報告されていること [1] より、臨床および病理学的検索のみではEBLと確定できなかった。

B細胞は、分化の過程において免疫グロブリン遺伝子の再構成を行うことで、抗原認識の多様性を獲得している。免疫グロブリン重鎖(immunoglobulin heavy chain: IgH) 遺伝子は、可変領域であるV、DおよびJ領域をコードする遺伝子、およびそれに続く定常領域をコードするC遺伝子によって構成される [15]。DNA

の再編成の際、任意の V、D および J 遺伝子が選択されるため、その組み合わせ数は膨大であるが、B 細胞がモノクローナルな増殖をしている B 細胞性リンパ腫細胞では、単一の組み合わせとなる [15]。そのため、IgH 遺伝子の可変領域を PCR で増幅すると腫瘍化 B 細胞集団では、一定の長さの PCR 産物が形成され、電気泳動により明瞭なバンドがみられる。一方、非腫瘍化 B 細胞集団では、様々な長さの PCR 産物が形成され、電気泳動像はスメア状となる。本症例はリンパ節を材料とした B-cell clonality PCR により、明瞭な 1 本のバンドが認められたことから、リンパ節における B 細胞のモノクローナルな腫瘍性増殖が示唆された。

EBL 発症牛では、腫瘍化 B 細胞における BLV プロウイルスの組込み部位は 1 ないし複数個所の特定部位に集中している [3-5, 10-13]。一方、非 EBL 発症牛では BLV プロウイルスは様々な部位に組み込まれる [11]。そのため、サザンブロットや inverse-PCR を用いた BLV プロウイルス組込み部位のクローナリティ解析は、EBL の診断法の 1 つとして用いられる [3, 4, 10, 13]。本症例はリンパ節を材料にした inverse-PCR により明瞭な 2 本のバンドが認められた。このことは、リンパ節中の腫瘍細胞に BLV プロウイルスがバイクローナルに組み込まれていることを示しており、本症例が EBL であることを支持する。以上の検査より、本症例は 25 ヶ月齢と若齢牛ではあったものの、最終的に EBL と診断された。

若齢牛における EBL 発症に関与する要因として、BLV プロウイルス組込み部位 [5]、BLV の子宮内感染 [14] および BLV 株の違い [2] が報告されている。本症例においてもこれらの要因が関与している可能性が考えられたが、これらの検索は行っておらず、本症例の EBL 発症要因は不明である。

本症例ではリンパ球増多症が認められず、末梢血を用いた B-cell clonality PCR および inverse-PCR においてバンドが認められなかった。一方、リンパ節由来の材料を用いた B-cell clonality PCR および inverse-PCR にて明瞭なバンドが認められた。したがって、腫瘍細胞は主にリンパ節などのリンパ系組織で増殖をしており、末梢血中に腫瘍細胞はほとんど存在して

いなかったと考えられる。また、腫瘍細胞の血行性転移が起こらなかったために、病理学的検索において実質臓器に腫瘍細胞が認められなかったと考えられた。EBL の病態は悪性リンパ腫であり [8]、EBL 症例では必ずしも末梢血中の腫瘍化リンパ球出現を伴わないことを再認識した。

本症例は発育不良を主訴に受診しているが、発育不良の原因となり得る下痢や肺炎などの既往歴は無く、身体検査においてもリンパ節腫大および直腸検査にて腫瘤を触知したこと以外の異常は認められなかった。加えて、病理学的検索においてリンパ節腫大および腹腔内の脂肪壊死以外に著変は認められなかった。このことから、発育遅延はリンパ系組織における腫瘍細胞増殖による栄養不良が関係しているものと考えられた。また、第四胃周囲および腸間膜に認められた脂肪壊死による消化管機能の抑制も、食欲低下を引き起こし、ひいては発育不良の一因であったと考えられた。

本症例はリンパ球増多症が認められなかったが、体表リンパ節腫大が認められ、FNA 検査により牛伝染性リンパ腫と判定するのは比較的容易であった。牛伝染性リンパ腫を疑ったもののリンパ球増多症が認められない症例に遭遇したとき、体表リンパ節の FNA 検査を行うことが牛伝染性リンパ腫の診断に有用であると再確認した。加えて、FNA より採材した組織を用いた B-cell clonality PCR および inverse-PCR を行うことで EBL であると診断することができた。リンパ球増多症を伴わない EBL 症例では、リンパ節由来の材料を用いた B-cell clonality PCR および inverse-PCR が有用であると考えられた。

謝辞

本研究の一部は JSPS 科研費 20H03142 および 20J10567 の助成を受けたものです。

引用文献

- [1] Duncan, R. B., Scarratt, W. K. and Buehring, G. C. 2005. J. Vet. Diagn. Invest. 17: 190-194.
- [2] Inoue, E., Matsumura, K., Soma, N., Hirasawa, S., Wakimoto, M., Arakaki, Y., Yoshida, T., Osawa, Y. and Okazaki, K. 2013. Vet. Microbiol. 167: 364-371.
- [3] 前澤誠希, 嘉陽静香, 三浦沙織, 小熊圭祐, 泉

- 對 博, 堀内雅之, 古林与志安, 古岡秀文, 猪熊 壽. 2016. 産業動物臨床医誌, 6: 161-164.
- [4] Maezawa, M., Watanabe, K., Horiuchi, N., Matsumoto, K., Kobayashi, Y. and Inokuma, H. 2018. Jpn. J. Vet. Res. 66: 209-213.
- [5] Maezawa, M. and Inokuma, H. 2020. Arch. Virol. 165: 179-183.
- [6] Maezawa, M., Watanabe, K., Horiuchi, N., Matsumoto, K., Kobayashi, Y. and Inokuma, H. 2020. J. Vet. Med. Sci. 82: 61-63.
- [7] Mekata, H., Yamamoto, M., Kirino, Y., Sekiguchi, S., Konnai, S., Horii, Y. and Norimine, J. 2018. J. Vet. Med. Sci. 80: 316-319.
- [8] Miller, J. M. and Van der Maaten, M. J. 1982. J. Dairy Sci. 65: 2194-2203.
- [9] 三浦沙織, 猪熊 壽. 2015. 産業動物臨床医誌. 6: 149-153.
- [10] Miura, S., Horiuchi, N., Matsumoto, K., Kobayashi, Y., Kawazu, S. and Inokuma, H. 2015. J. Vet. Med. Sci. 77: 883-887.
- [11] Miyasaka, T., Oguma, K. and Sentsui, H. 2015. Arch. Virol. 160: 39-46.
- [12] Murakami, H., Yamada, T., Suzuki, M., Nakahara, Y., Suzuki, K. and Sentsui, H. 2011. Virus Res. 156: 107-112.
- [13] Oguma, K., Suzuki, M. and Sentsui, H. 2017. Virus Res. 233: 120-124.
- [14] Sajiki, Y., Konnai, S., Nishimori, A., Okagawa, T., Maekawa, N., Goto, S., Nagano, M., Kohara, J., Kitano, N., Takahashi, T., Tajima, M., Mekata, H., Horii, Y., Murata, S. and Ohashi, K. 2017. J. Vet. Med. Sci. 79: 2036-2039.
- [15] Schatz, D. G., Oettinger, M. A. and Schlissel, M. S. 1992. Annu. Rev. Immunol. 10: 359-383.
- [16] Smith, B. P. 2015. Large Animal Internal Medicine. 5th ed. CV Mosby company, St. Louis
- [17] 宗村佳子, 小川 仁, 杉山恵美, 藤川 浩, 村上賢二. 2014. 日獣会誌. 67: 523-528.
- [18] 田島譽士. 2002. 牛白血病. 主要症状を基礎にした牛の臨床. (前出吉光, 小岩政照 監修). DAIRYMAN, 北海道, pp 614-618.
- [19] Tawfeeq, M. M., Miura, S., Horiuchi, N., Kobayashi, Y., Furuoka, H. and Inokuma, H. 2013. J. Vet. Med. Sci. 75: 1167-1172.
- [20] 若槻拓司, 杉山 定, 高岡重沙子, 橋田明彦, 水上智秋, 廣瀬友理, 門田耕一, 竹嶋伸之輔, 間 陽子. 2019. 日獣会誌. 72: 608-613.

A clinical case of enzootic bovine leukosis without lymphocytosis in a 25-month-old Japanese black beef cattle

Masaki Maezawa^{1,2)}, Yuki Kawakami¹⁾, Yosuke Satou¹⁾, Kiharu Sugo³⁾, Ken-ichi Watanabe¹⁾
Noriyuki Horiuchi¹⁾, Kotaro Matsumoto^{1,2)}, Yoshiyasu Kobayashi^{1,2)}, Hisashi Inokuma⁴⁾

¹⁾Department of Veterinary Science, Obihiro University of Agriculture & Veterinary Medicine, Inada, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan

²⁾United Graduate School of Veterinary Sciences, Gifu University, 1-1, Yanagido, Gifu 501-1193, Japan

³⁾Sugo Animal Hospital, Biman, Shimizu, Kamikawa, Hokkaido 089-0242, Japan

⁴⁾Veterinary Medical Center, Graduate School of Agriculture and Life Science, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

Corresponding to: Masaki Maezawa

Department of Veterinary Medicine, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada, Obihiro, Hokkaido, 080-8555, Japan

TEL/FAX: 0155-49-5372

E-mail: obihiro_23035@yahoo.co.jp

[Abstract]

A 25-month-old Japanese black beef cattle was presented with a chief complaint of poor growth. Physical examination revealed enlarged superficial lymph nodes. Hematology examination showed no lymphocytosis. Serum biochemical findings included elevated lactate dehydrogenase activity and thymidine kinase activity. Nested polymerase chain reaction (PCR) for bovine leukemia virus (BLV) and antibody against BLV were both positive. At autopsy, generalized swelling of lymph nodes was observed. Histopathological analysis revealed diffuse proliferation of large round neoplastic cells that were positive for BLA-36, and negative for CD3. Monoclonal growth of B-cells was confirmed by B-cell clonality test. Inverse-PCR demonstrated biclonal integration of BLV proviral DNA in the host genome. Based on these findings, it was diagnosed with enzootic bovine leukosis occurred in young fattening cattle.

Keywords: early onset, enzootic bovine leukosis, inverse-PCR

