

症例報告

白血球増多と体表リンパ節の腫大を示さない 成牛型白血病の黒毛和種 2 症例

木野内久美¹⁾ 瀧奥健吾¹⁾ 大塚浩通¹⁾ 今内 寛²⁾ 朴 天鎬¹⁾ 渡辺大作¹⁾ 及川正明¹⁾

1) 〒034-8628 青森県十和田市東23番町35-1 北里大学獣医学部

2) 〒060-0818 北海道札幌市北区北18条西9丁目 北海道大学大学院獣医学研究科

*連絡担当者：木野内久美

(〒034-8628 青森県十和田市東23番町35-1)

TEL 0176-23-4371 FAX 0176-23-8703

v04036d@st.kitasato-u.ac.jp

【要約】

貧血を主訴とする成牛型白血病を発症した黒毛和種成牛の2症例が来院した。両症例とも著しい貧血を呈したが、体表リンパ節の腫脹は不明瞭であり、PCR法によりBLVウイルスが検出された。血液検査においてヘマトクリット値の低下がみられたが、白血球の増多は認められなかった。血液生化学検査においては両症例ともチミジンキナーゼ活性が高値を示し、症例2では血糖値、AST活性、 γ GT活性ならびにBUNが上昇した。末梢血白血球ポピュレーションでは、CD3⁺、CD4⁺およびCD8⁺T細胞数が低かった。1症例では白単核球中のB細胞を示すMHC class II⁺CD14⁻細胞割合が高く、血液塗抹中においても異型リンパ球が確認された。このことから、成牛型白血病の発症牛であっても、末梢血白血球数の増多が観察されない症例では、白血球ポピュレーションの解析やチミジンキナーゼ活性の測定が腫瘍性変化を評価する一助となる検査であることが示唆された。

【キーワード；成牛型白血病、チミジンキナーゼ活性、白血球ポピュレーション】

【緒論】

成牛型白血病は全身性の悪性リンパ肉腫を主徴とする疾病で、牛リンパ肉腫bovine lympho sarcomaともいわれ、牛白血病ウイルス (bovine leukemia virus : BLV) による地方病型と原因不明の散発型に分けられる[4]。地方病型は牛に最も多くみられるリンパ系細胞の腫瘍性疾患である。BLVの感染経路としてはウイルス汚染血液の輸血、注射器具や直腸検査時の手袋の使いまわしなどの人為的な伝播の他、アブによる機械的伝播、BLV感染母牛からの初乳を介した感染があるとされる[4]。BLV感染発症牛の臨床症状としては、全身のリンパ節の腫脹、貧血、心機能の低下や出血性の下痢、さらに末梢血異型リンパ球の増加、LDHの上昇などの所見が観察されることが多い。国内の成牛型白血病の発症頭数は年々増加しているが、最近では典型的な白血病における臨床所見や血液所見が得られず、解剖によって初めて診断される例も増えており[8]、BLV感染の生前診断をする上で多様な所見の理解が必要である。今回、成牛型白血病で一般的に認められる臨床所見が観察されなかったBLV感染成牛2症例に遭遇し、血液検査に加えて末梢血白血球ポピュレーションを観察したのでその概要を報

告する。

[症例]

症例1は、6歳3ヵ月齢の黒毛和種繁殖雌牛で妊娠8ヵ月であった。食欲不振と重度貧血を主訴とした。来院時、可視粘膜は蒼白で心悸亢進が認められた。症例2は、4歳4ヵ月の黒毛和種繁殖雌牛、妊娠8ヵ月で、発熱と食欲不振を主訴とした。来院時、体温40.0度、心拍92回/分であり、可視粘膜蒼白、全身に発汗が認められた (Table 1, 2)。両症例とも明瞭な体表リンパ節と骨盤腔内のリンパ節の腫脹は観察されなかった。

血液検査はHt、RBC、WBC(自動血球測定器)、単核球、自動分析装置を用いて血漿蛋白(ビュレット法)、アルブミン(BCP法)、血糖 (Gluc-DH・UK法)、BUN(UV法)、Cre(ヤッフエ法)、総コレステロール(酵素法)、LDH(SFBC法)ならびにCPK(GSCC法)の測定を実施した。またチミジンキナーゼ(TK)活性はラジオイムノアッセイ法により測定した。末梢血白血球ポピュレーションの解析はフローサイトメトリー法により、さらに確定診断としてnested-PCR法による末梢血中からのBLV遺伝子の検出を試みた。

血液生化学所見においては、両症例ともTK活性が高値を示した。症例1では、低Alb血症をともなった低蛋白血症が認められた。症例2ではAST、 γ GT、T-Bil、BUN、Creの軽度の上昇およびTC値とA/G比の著しい低下が認められたものの、その他の項目に共通する異常所見は確認できなかった (Table 3)。

両症例ともRBC、HbおよびHt値の著しい低下が認められ、血液塗抹では異型リンパ球が確認されたが、リンパ球実数の上昇は観察されなかった (Table 4)。末梢血白血球ポピュレーションにおいては、両症例とも

CD3⁺、CD4⁺およびCD8⁺T細胞数が低く、また症例2のMHC class II⁺CD14-B細胞ならびにCD14⁺細胞数が低値であった (Table 5)。尚、2頭の供験牛の末梢血のウイルス診断では双方とも陽性であった。

症例1は第7病日朝に呼吸速迫、膈からの多量の粘液の排出を示し、同日午前中に分娩したが胎仔は既に死亡していた。第8病日から黒色の硬化便の排出がみられるようになり、アシドーシスおよび貧血の改善の目的に輸血および輸液療法を開始した。第13病日から呼吸速迫となり、第14病日には体温が低下し、四肢の硬直ならびに痙攣を呈し死亡した。症例2は第2病日から努力性呼吸及び陽性頸静脈拍動がみられ、排尿時には背湾姿勢や怒責を繰り返した。尿検査では潜血、蛋白の析出が見られた。また、同日から3日間輸血を行った。第5病日に呼吸困難を呈して死亡した。

剖検の結果、症例1では腸骨下、腸間膜、縦隔、左右腎内リンパ節が腫瘍細胞に置換されていた。腹水、胸水貯留し、肝臓は腫大していた。第四胃壁は腫瘍細胞の浸潤により肥厚し、粘膜面には多数の潰瘍が見られた。十二指腸には腫瘍によるマスが多数みられ、盲腸では漿膜面に潰瘍が散在していた。また心臓は心嚢水が貯留し、心内膜、心筋内に腫瘍細胞が浸潤していた。また症例2では、腸間膜リンパ節の腫大、腹腔内リンパ節の多くで腫瘍化がみられた。第四胃内には大量の血餅が貯留しており、粘膜面には点状出血、潰瘍が多数認められ、噴門部に白色腫瘤が認められた。心臓は黄色の心嚢水が貯留し、表面に腫瘍巣がみられた。病理組織像では全身の諸臓器の組織に腫瘍細胞の浸潤がみられた (Table1~5、Fig1.2)。

Table 1 供試牛の概要

	症例 1	症例 2
稟告	食欲不振、重度貧血	食欲不振、発熱
品種	黒毛和種	黒毛和種
性別	雌	雌
年齢	6歳3ヵ月	4歳4ヵ月
その他	妊娠8ヵ月	妊娠8ヵ月

Table 2 来院時の臨床所見

	症例 1	症例 2
体表リンパ節の腫脹	—	—
骨盤腔内リンパ節の腫脹	+	+
心機能異常	+	+
眼球突出	—	—
食欲不振	+	+
下痢	—	—
貧血	++	++
リンパ球増多	+	—
異型リンパの出現	+	+
BLV遺伝子の検出	+	+

++；明瞭、+；所見あり

；所見なし

Table 3 血液生化学検査所見

	症例 1	症例 2
TP (g/dl)	4.5	7.3
ALB (g/dl)	2.3	2.7
A/G	1.05	0.59
Glu (mg/dl)	62	114
TC (mg/dl)	72	27
AST (IU/L)	85	190
γGT (IU/L)	17	213
Tbil (mg/dl)	0.3	1.2
Dbil (mg/dl)	0.04	0.32
LDH (IU/L)	1387	2043
TK (IU/L)	53	160
CPK (IU/L)	146	117
BUN (mg/dl)	18.1	48.6
Cre (mg/dl)	2.02	3.24
iP (mg/dl)	6.6	6.1
Ca (mg/dl)	8.2	8.9
Mg (mg/dl)	1.79	1.14

Table 4 血液一般検査の所見

	症例 1	症例 2
RBC ($10^4/\mu\text{l}$)	231	255
Hb (g/dl)	4.4	3.9
Ht (%)	14	12
WBC ($10^2/\mu\text{l}$)	78	40
Band (%)	3	2
Seg (%)	48.5	16.0
Lymp (%)	28.0	72.0
Mono (%)	7.0	8.0
Eosin (%)	1.0	0.0
Baso (%)	0.0	0.0
異型 (%)	12.5	2.0

Table 5 末梢白血球ポピュレーション

	症例 1	症例 2
顆粒球	3365.8	760.7
単核球	4434.2	3239.3
CD3 ⁺	385.3	647.9
CD4 ⁺	188.5	465.5
CD8 ⁺	59.9	142.2
MHC class II ⁺ CD14 ⁻	2634.4	240.2
CD14 ⁺	1108.6	119.5



Fig.1 Neoplastic lymph node near the diaphragm of case 2

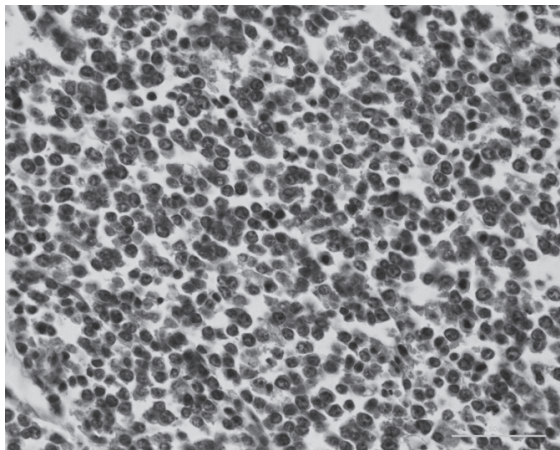


Fig.2 Lung histological section of case 2

表 5 末梢白血球ポピュレーション

	症例 1	症例 2
顆粒球	3365.8	760.7
単核球	4434.2	3239.3
CD3 ⁺	385.3	647.9
CD4 ⁺	188.5	465.5
CD8 ⁺	59.9	142.2
MHC class II ⁺ CD14 ⁻	2634.4	240.2
CD14 ⁺	1108.6	119.5

※単位は (cell / μ l)

【考察】

今回観察した2頭の症例において、成牛型白血病にしばしば観察される末梢リンパ球の増多や体表リンパ節の腫脹などの所見を得なかった。また、BLVが感染し増加するB細胞についても、両症例とも明瞭な増加を認めなかった。しかし症例1では単核球中のB細胞を示すMHC class II⁺CD14⁻細胞割合が高く、血液塗抹中においても異型リンパ球が確認された。Lewinら[6]は、BLV感染牛における末梢血B細胞数の増多が末梢血白血球数に影響することでリンパ球増多に至っている症例では、リンパ球中のB細胞の割合が70%以上観察されることもあるとしている。またOhshimaら[9]は、成牛型牛白血病と診断した94症例中3症例では末梢血リンパ球増多、末梢血中への異型リンパ球の浸潤をほとんど認めない症例であったと報告

している。症例1はリンパ球増多が認められなかったものの成牛型白血病の所見に類似した様相であり、血液中への強い腫瘍細胞の浸潤を認めない型の成牛型白血病であったと考えられる。一方、症例2では血液塗抹中に異型リンパ球が観察されたが、白血球実数が増多せず、さらに単核中のMHC class II⁺CD14⁻細胞割合は上昇していなかった。吉野ら[16]は、白血病を造血細胞による腫瘍性疾患であると提唱し、その腫瘍化の場が骨髓を中心として臓器を系統的に侵襲するため、リンパ節の腫瘍は勿論、末梢血にリンパ球系細胞が腫瘍性に出現しない事例もある事を述べている。特に骨髄性白血病では末梢血において腫瘍細胞を認めない事例があり[16]、BLVの検出がされた症例2において、BLV感染とは別に骨髄性白血病を発症した可能性があり、症例2は症例1とは異なる白血病であった可能性は否定できない。

妊娠末期における健康な成牛のCD3⁺T細胞数ならびにMHC classII⁺CD14⁻B細胞数が $10 \times 10^2 / \mu$ l以上存在することから[10]、両症例とも低T細胞血症であることが示唆され、BLV感染牛では末梢血T細胞が減少するとしてGateiら[1]の報告と類似した。T細胞数の減少は免疫機能の低下を疑う所見であり、本症例の免疫機能に異常があったものと示唆された。ヒトのB細胞が腫瘍性増殖する慢性リンパ性白血病においても、T細胞が減少し免疫抑制が観察されることから[5]、今回の両症例とも末期の白血病であり、T細胞機能の低下があった事が疑われる。

成牛型白血病は白血球の悪性腫瘍であるためLDH活性が上昇しやすく[3, 15]、身体検査や血液検査などと併用し成牛型白血病の診断に用いられることがあるが、今回の2頭の症例ではLDH活性の明瞭な上昇は見られなかった。一方、チミジンキナーゼはDNA合成に関与する酵素であり、悪性リンパ腫の腫瘍量や細胞増殖

率を反映する[11]。TK活性は、ヒトでは白血病やリンパ腫などの腫瘍性疾患の病態の評価のために有用とされている[2]。獣医領域ではイヌにおける造血器腫瘍の診断、治療効果の判定に有用であることが報告され[7]、最近では牛の白血病の診断においても応用できることが報告されている[12, 13]。この報告ではウシにおけるTK活性の基準値は5.4U/L未満とされているが、本症はこの基準値を大きく上回っており、白血病の病状を反映した変化であったことが示唆された。

来院時の臨床所見において、両症例からは成牛型白血病に典型的な臨床所見である体表リンパ節あるいは骨盤腔周辺リンパ節の腫脹は認められなかった。リンパ節の腫瘍性変化は全身のリンパ節が腫瘍化して腫大する症例だけでなく、一部のリンパ節に腫瘍性変化が集中して触診などにより異常が判断できるようになるまで進行する症例も多く、本症例のように腫瘍性変化が内部臓器の所属リンパ節に限局的に存在することもある[14]。成牛型白血病では腫瘍性変化が集中した臓器における機能不全によって病態は様々であることが示唆され、本症のように骨髄への腫瘍細胞の浸潤により造血障害に起因したことが疑われる重度の貧血が観察されることもある[16]。このことから成牛型白血病の所見として、体表リンパ節の腫脹、白血球数の上昇や異型リンパ球数の観察、あるいは末梢血液B細胞の増多は特徴的で必須の所見とは言い難い。今回の結果から、成牛型白血病の病状の評価として末梢血白血球ポピュレーションの解析に加え、TK活性測定が有効であると考えられ、触知できない内臓臓器の所属リンパ節の種大の診断方法が今後の課題であると示唆される。

【引用文献】

- [1] Gatei, M. H., Brandon, R. B., Naif, H. M., McLennan, M. W., Daniel, R. C. and Lavin, M. F. 1989. Changes in B cell and T cell subsets in bovine leukaemia virus-infected cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 23:139-147.
- [2] Gronowitz, J. S., Hagberg, H., Kallander, C. F. and Simonsson, B. 1983. The use of serum deoxythymidine kinase as a prognostic marker, and in the monitoring of patients with non - Hodgkin' s lymphoma. *Br. J. Cancer* 47:487-495.
- [3] Ishihara, K., Ohtani, T., Kitagawa, H. and Onuma M 1980. Clinical studies on bovine leukemia in Japanese black cattle Ⅲ. Serum lactate dehydrogenase activity and its isoenzyme pattern in groups of leukemic cattle and those negative or positive for antibody against bovine leukemia virus. *Jpn. J. Vet. Sci.* 42:289-295.
- [4] 川村清市、内藤善久、前出吉光 監修. 2007. 獣医内科学大動物編, 文永堂出版, 208-209.
- [5] Kvasnicka, J., Kruzík, P., Cmunt, E. and Neurwrtová, R.. 1994. Lymphocyte subpopulations determined by flow cytometry in chronic type B lymphatic leukemia *Cas. Lek. Cesk.* 133:506-510.
- [6] Lewin, H. A., Wu, M. C., Nolan, T. J. and Stewart, J. A. 1988. Peripheral B lymphocyte percentage as an indicator of subclinical progression

- of bovine leukemia virus infection. J. Dairy Sci. 71:2526-2534.
- [7] Nakamura, N., Momoi, Y., Watari, T., Yoshino, T., Tujimoto, H. and Hasegawa, A. 1997. Plasma Thymidine Kinase Activity in Dogs with Lymphoma and Leukemia. J.Vet. Med.Sci. 59:957-960
- [8] 岡田幸助 2008. 牛白血病の病理発生から見た拡大防止対策 家畜診療55: 101-106
- [9] Ohshima, K., Ozai, Y., Okada, K. and Numakunai, S. 1980. Pathological Studies on Aleukemic Case of Bovine Leukosis. Jpn. J. vet. Sci. 42:297-309.
- [10] Ohtsuka, H., Uematsu, M., Saruyama, Y., Ono, M., Kohiruimaki, M., Ando, T. and Kawamura, S. 2009. Age-related alterations in peripheral leukocyte population of healthy Holstein dairy cows during the pre-calving period. J. Vet. Med. Sci. 71:1121-1124.
- [11] Rehn, S., Gronowitz, J. S., Kallander, C. F., Sundstrom, C. and Glimelius, B. 1995. Deoxythymidine kinase in the tumorcells and serum of patients with non Hodgkin' slymphoma. Br. J. Cancer 71:1099-1105.
- [12] Sakamoto, L., Obayashi, T., Matsumoto, K., Kobayashi, Y. and Inokuma, H. 2009. Serum thymidine kinase activity as a useful marker for bovine leukosis. J. Vet. Diag. Invest. 21: 871-874.
- [13] 坂本礼央、大林 哲、古林与志安、松本高太郎、石井三都夫、猪熊 壽. 2010. 血清チミジンキナーゼ活性の測定により摘発した牛白血病発症牛の1 症例. 日獣会誌. (in press)
- [14] 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 2008. 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 61:936-939.
- [15] Yasutomi Y, Takahashi K, Kurosawa T, Sonoda M and Onuma M. 1987. Early diagnosis of enzootic bovine leukosis. Jpn .J.Vet. Sci, 49:957-963.
- [16] 吉野知男、谷山弘行、岡田洋之 1997. 牛白血病の疾病学的輪郭と疾病学的問題点 家畜診療 40: 3-11.

Two Cases of Bovine Leukemia Disease without Leukocytosis and Enlargement of Body Surface Lymph Nodes in Japanese Black Cattle

Kumi Kinouchi¹⁾, Kengo Takioku¹⁾, Hiromichi Ohtsuka¹⁾, Satoru Kon-nai²⁾,

Tenko Baku¹⁾, Daisaku Watanabe¹⁾, Masa-aki Oikawa¹⁾

School of Veterinary Medicine, Kitasato University

(35-1 Higashi 23 bancho Towada Aomori 034-8628)

Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University

(kita 18 jo nishi 9 chome Sapporo, Hokkaido 060-0818)

ABSTRACT

Two cases in bovine leukemia disease of Japanese Black cattle that observed marked anemia were encountered. Although bovine leukemia virus was detected by PCR in both cases, we could not observed enlargement of body surface lymph nodes. Hematocrit values decreased, but leukocytosis was not found in both cattle. In biochemical findings, higher thymidine kinase activity showed in both, and the levels of glucose, AST, γ -GT, and BUN increased in case 2. Peripheral CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T cells were lower, but marked changes in numbers of B cells and monocyte were not found. There were cases with development of bovine leukemia disease that were no-increased peripheral B cell number, and it seemed to useful of thymidine kinase activity to evaluate degree of illness of this disease.

【Key Words : Bovine Leukemia Disease, Leukocyte Population, Thymidine Kinase Activity】

