

原著論文

## 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

田川道人<sup>1)</sup> 堀内雅之<sup>2)</sup> 松本高太郎<sup>1)</sup> 古林与志安<sup>2)</sup> 古岡秀文<sup>2)</sup> 猪熊 壽<sup>1\*)</sup>

1) 帯広畜産大学 臨床獣医学研究部門

2) 帯広畜産大学 基礎獣医学研究部門

\*連絡担当者：猪熊 壽

〒080-8555 帯広市稲田町西2線11

TEL：0155-49-5370 FAX：0155-49-5370

E-mail：inokuma@obihiro.ac.jp

### [要約]

牛白血病牛の腫大リンパ節7検体（牛白血病群）、非腫瘍性疾患牛のうち、近傍に炎症性疾患のある腫大リンパ節6検体（反応性腫大群）および近傍に炎症のない正常リンパ節8検体（正常群）の細胞診塗抹標本を用いて、細胞構成比率に基づいた診断基準が牛白血病に適応可能かどうかを検討した。その結果、正常群（ $3.0 \pm 1.0\%$ ）、反応性腫大群（ $10.8 \pm 3.2\%$ ）と比較し、牛白血病群（ $89.0 \pm 6.1\%$ ）において大、中リンパ球の顕著な増加が確認され、牛白血病群の全ての検体で“大、中リンパ球を合わせた大型リンパ球の割合が50%以上”を満たした。また、核分裂像は、牛白血病群（ $9.6 \pm 6.5/5$  HPF）は反応性腫大群（ $3.5 \pm 3.1/5$  HPF）、正常群（ $0.0 \pm 0.0/5$  HPF）と比較し増加していたが、反応性腫大群において、牛白血病群で観察された核分裂像の下限を超える例が6検体中2検体存在した。体表リンパ節の腫大が特徴的な牛白血病症例において、細胞構成比率に基づいた診断基準は有用であると思われた。

**キーワード：**核分裂、リンパ節、細胞診、細胞構成比率、牛白血病

### [緒言]

牛白血病とは全身性のリンパ節腫脹およびリンパ球増多症等を主徴とする牛に最も一般的な腫瘍性疾患であり、牛白血病ウイルスに起因する地方病型と原因が不明である散發型に大別される [13, 14]。診断は白血病による臨床症状に加え、体表リンパ節腫大とその組織生検所見、末梢血液中の異型リンパ球増加、牛白血病ウイルス抗体検査等による [13, 14]。しかしながら、腫大したリンパ節や腫瘍細胞の臓器浸潤による多彩な臨床症状は非特異的であり、末梢血液中に出現する腫瘍性リンパ球と反応性に増加した異型リンパ球を鑑別することは容易ではない

[3, 16]。また、牛白血病ウイルス抗体の検出においても、発症の有無を鑑別することはできない [16]。

小動物のリンパ腫診断も身体検査および血液検査に加え、画像診断等が行われるが、とくに細胞診は、簡便、安価で迅速に診断可能であることから、最も重要な診断ツールのひとつと位置付けられている [7, 9]。細胞診において、固形腫瘍では細胞の異型度をもとに診断を行うのに対し、リンパ節の細胞診では、腫瘍化したリンパ球と正常なリンパ球の区別は困難であることから、出現する細胞の構成比率をもとに診断が下される [6, 7]。一方、牛においてもリンパ節の細胞診は行われているものの [16]、その細胞構成比率は不明であり、炎症との鑑別や診断基準は明確ではない [10]。そこで今回、

受理：2014年1月21日

細胞診により白血病発症牛のリンパ節細胞構成を明らかにし、細胞構成比率に基づいたリンパ腫診断基準が牛白血病に適応可能かどうか検討した。

### [材料と方法]

材料は2011年6月～2013年8月に帯広畜産大学に搬入された牛白血病牛7頭の腫大リンパ節7検体(牛白血病群)、非腫瘍性疾患牛14頭のうち、近傍に炎症性疾患のある腫大リンパ節6検体(反応性腫大群)、近傍に炎症のない正常リンパ節8検体(正常群)を用いた(表1)。細胞診塗抹標本は、腫大した体表リンパ節に対しては21G針を経皮的に複数回穿刺し、スライドガラスに吹き付け、腫大のないリンパ節もしくは体腔内のリンパ節に対しては病理解剖時にリンパ節断面よりメス刃を用い搔破し作製し

た。塗抹標本は風乾、メタノール固定の後、ライトギムザ染色(ライト染色液、ギムザ染色液、武藤化学、東京)またはヘマカラー染色(Hemacolor<sup>®</sup> staining kit, Merck, Germany)を行い、封入後、光学顕微鏡下で細胞を分類した。リンパ球は赤血球の大きさにより小リンパ球(リンパ球の核の直径が赤血球の直径2個分未満)、中リンパ球(同2個分)、大リンパ球(同2個分以上)とし[11]、200細胞計測し細胞構成比率を算出した(図1)。また、高倍率視野(400倍;HPF)における核分裂像を5視野計測した。なお、細胞の観察は核濃縮や裸核、膨化、破壊など変性の強い部位を除外し行った。各群間の比較には、Kruskal-Wallis検定およびSteel-Dwass法による多重比較検定を用い、*p*値が0.05以下を有意差ありと判定した。

Table 1. Sample information and characteristics of each groups

No.	Group	Sampling region	Breed	Age	Disease	BLV antibody	Total lymphocytes
1	BL	Subiliac LN	HF	4Y	EBL *	+	54782
2	BL	Subiliac LN	HF	2Y	EBL *	+	21248
3	BL	Inguinal LN	HF	9Y	EBL *	+	4662
4	BL	Mandibular LN	HF	4Y	Not classification	-	2491
5	BL	Mandibular LN	JB	2Y	EBL *	+	43890
6	BL	Subiliac LN	HF	3Y	Skin *	-	2025
7	BL	Subiliac LN	HF	6Y	EBL *	+ <sup>a)</sup>	6314
8	RLN	Neck <sup>a)</sup>	HF	3Y	Enteritis	-	—
9	RLN	Inguinal LN	HF	6Y	Mastitis	+	—
10	RLN	Inguinal LN	HF	6Y	Mastitis	-	—
11	RLN	Superficial cervical LN	HF	1M	Arthritis	-	—
12	RLN	Inguinal LN	HF	2Y	Mastitis	NE	—
13	RLN	Tracheobronchial LN	HF	6M	Pneumonia	NE	—
14	NLN	ND	HF	2M	Spinal deformity	-	—
15	NLN	ND	HF	7D	Meningocele	-	—
16	NLN	Inguinal LN	HF	3Y	Endometritis	+	—
17	NLN	Superficial cervical LN	HF	6M	Weakness	-	—
18	NLN	Superficial cervical LN	HF	7M	VSD	-	—
19	NLN	Superficial cervical LN	HF	5Y	Hemopericardium	NE	—
20	NLN	Popliteal LN	HF	9M	Pituitary abscess	NE	—
21	NLN	Superficial cervical LN	HF	2M	Tympanitis	NE	—

BL: bovine leukemia, RLN: reactive lymph node, NLN: normal lymph node, LN: lymph node, HF: Holstein-Friesian, JB: Japanese Black, BLV: bovine leukemia virus, EBL: enzootic bovine leukemia, VSD: ventricular septal defect, NE: not examined, ND: no data, Y: year, M: month, D: day. Total lymphocytes in bold are lymphocytosis ( $/\mu\text{l}$ ).

<sup>a)</sup>: sampling from a lymph node which existed subcutaneously in neck.

<sup>b)</sup>: examined by PCR.

\*: multicentric lymphadenopathy.

[結果]

細胞構成は正常群では小リンパ球 $96.7 \pm 1.6\%$  (平均 $\pm$ SD)、中リンパ球 $2.3 \pm 0.7\%$ 、大リンパ球 $0.7 \pm 0.5\%$ であり、好中球、形質細胞がごく軽度に観察された。反応性腫大群は正常群と比較し、小リンパ球 ( $86.6 \pm 4.6\%$ ) の低下と、中リンパ球 ( $6.7 \pm 1.9\%$ )、大リンパ球 ( $4.2 \pm 2.8\%$ ) の増加がみられ、好中球、形質細胞も増加していた。一方、牛白血病群では大リンパ球 ( $64.1 \pm 24.7\%$ )、中リンパ球 ( $24.8 \pm 22.9\%$ ) が著増しており、小リンパ球 ( $10.3 \pm 6.6\%$ ) は低下していた。また、形質細胞は観察されず、好中球、マクロファージもごく軽度であった (図1、表2)。なお、各群の構成比において年齢による相違は認められなかった。

核分裂像は、牛白血病群 ( $9.6 \pm 6.5/5$  HPF)、反応性腫大群 ( $3.5 \pm 3.1/5$  HPF) で観察され、正常群では観察されなかった (図2)。牛白血病群、反応性腫大群はともに正常群と比較し有意 ( $p < 0.01$ ) に高値であったが、牛白血病群と反応性腫大群の間に有意差はみられなかった (図2)。なお、全ての症例は病理解剖に供され、組織学的に診断が確定された。また、白血病群の7頭中6頭は体表、体腔内を含む全身諸リンパ節にリンパ肉腫の浸潤が観察された。

[考察]

リンパ節の細胞診は非常に簡便であることから、人医療および小動物獣医療において広く用いられている [6, 9]。また、組織構造の破壊

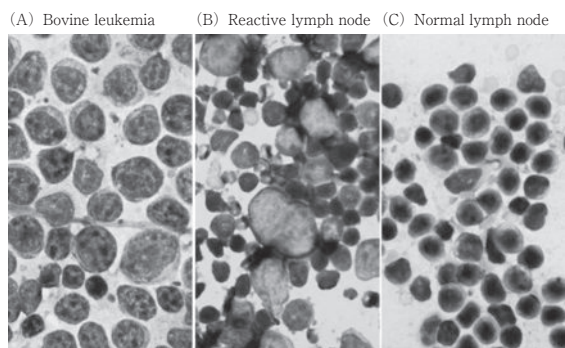


Fig. 1. Cytological findings of each lymph node smear.

(A) Bovine leukemia obtained from sample No. 1. (B) Reactive lymph node obtained from sample No. 10. (C) Normal lymph node obtained from sample No. 16. (Hemacolor<sup>®</sup> staining, original magnification  $\times 1000$ )

Table 2. Comparison of cell constitution ratio of lymph node among each groups

	Bovine leukemia (n=7)	Reactive LN (n=6)	Normal LN (n=8)
Lymphocyte			
Small	$10.3 \pm 6.6^{**}$	$86.6 \pm 4.6^{**}$	$96.7 \pm 1.6^{**}$
Medium	$24.8 \pm 22.9$	$6.7 \pm 1.9^{**}$	$2.3 \pm 0.7^{**}$
Large	$64.1 \pm 24.7^{**}$	$4.2 \pm 2.8^{**}$	$0.7 \pm 0.5^{**}$
L+M	$89.0 \pm 6.1^{**}$	$10.8 \pm 3.2^{**}$	$3.0 \pm 1.0^{**}$
Neutrophil	$0.5 \pm 0.8$	$2.0 \pm 3.9$	$0.1 \pm 0.2$
Macrophage	$0.1 \pm 0.2$	$0.2 \pm 0.3$	$0.0 \pm 0.0$
Plasma cell	$0.0 \pm 0.0$	$1.5 \pm 2.6$	$0.1 \pm 0.2$

LN: lymph node.

L+M: large and medium lymphocytes.

\*\* :  $p < 0.01$  (significant differences between the same symbols)

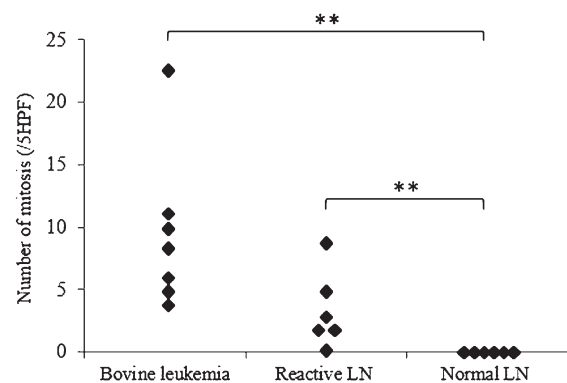


Fig. 2. Comparison of the number of mitosis among each groups.

(\*\* shows significant differences ( $p < 0.01$ ). LN: lymph node)

や細胞異型の評価が困難であることから、細胞診によるリンパ腫の診断は採取された細胞の構成比率が重要となる [7]。通常、リンパ節の細胞診では刺入された針が皮質、リンパ濾胞、傍皮質、髄質を貫くため、均一ではない細胞集団が得られる [6]。反応性過形成のリンパ節では、炎症性刺激によってリンパ濾胞は増大し、胚中心由来の中～大型リンパ球の割合が増加し [6, 7]、リンパ腫では腫瘍細胞の増殖によりリンパ節構造が破壊され、採取された細胞は単一形態のリンパ系細胞が優位となる [6]。

牛白血病の診断において、牛の腫大した体表リンパ節に針吸引検査を行った報告 [16] では、感度 41 ~ 53%、特異性 100%であり、コア生検よりも特異的であったとされるが、実際に細胞診が用いられることは稀である。その要因として、牛では屋外での診療が基本であることや、炎症性に腫大したリンパ節との鑑別が困難であ

ること [10]、さらに、小動物で一般的に用いられる細胞の構成比率をもとにした診断基準がこれまで検討されていないことに起因する。犬猫のリンパ腫診断では、“大、中リンパ球を合わせた大型リンパ球の割合が50%以上”という基準が一般に用いられており、そのほとんどで大型リンパ球が80%を超えるとされるが [2, 6, 7]、牛においてこの診断基準が適応可能かどうかはこれまで評価されていない。

今回、細胞診を用いて各病態における細胞構成比率を計測したところ、牛白血病群では大、中リンパ球を合わせた大型リンパ球の割合が全ての検体で80%を超えており、また反応性腫大群、正常群の大型リンパ球の割合は最大で16%と、50%を超えるものは存在しなかった。よってリンパ節の構成細胞比率をもとにした診断基準である“大、中リンパ球を合わせた大型リンパ球の割合が50%以上”は、牛においても適応可能であると思われた。しかしながら、犬猫ではリンパ腫発症の初期段階において大型リンパ球が50%未満となることや、反応性であっても20%以上出現する可能性が指摘されている [6]。牛においても症例の病態によりこのような所見が得られる可能性があることから、その場合、臨床所見や各種腫瘍マーカー [16] を用いるなど、総合的な判断が必要になるものと思われた。また、反応性リンパ節では形質細胞の増加がみられる場合があるとされ [6]、今回用いた反応性腫大群6例においても形質細胞が出現している例が3例存在した。反応性腫大群の1例において好中球の増加 (10%) が観察され、化膿性リンパ節炎であると思われた。

牛白血病群の核分裂像は反応性腫大群と比較し増加していたものの、有意な差は認められなかった。また、反応性腫大群の6検体中5検体で核分裂像が観察されており、牛白血病群で観察された核分裂像の下限 (4/5 HPF) を超える例が2検体存在した (9 および 5/5 HPF)。犬猫のリンパ腫における核分裂像は、腫瘍の分化度 (High grade, Low grade) を判断するひとつの指標であり [7, 11]、腫瘍化の判断には用いない。組織学的にも反応性に腫大したリンパ組織内では核分裂像が散見されることが知られており [4]、核分裂像の増加は牛白血病診断の一助となり得るが、核分裂像の有無を牛白血病

の診断根拠とすべきではないと思われた。

今回用いた牛白血病群は地方病型が5検体、皮膚型が1検体、分類不能型が1検体であったが、いずれも体表リンパ節の腫脹を特徴としていた。近年、体表リンパ節の腫大が見られない非典型的な牛白血病症例が報告されている [12]。その場合、生前の細胞診は適応とはならないが、中心部の壊死により細胞がうまく採取できない場合や、血液混入により評価が困難なもの [5] を除き、体表リンパ節の腫大が特徴的な牛白血病症例において、細胞診を用いた診断法は極めて有用であると思われた。今回検討できなかったが、子牛型や胸腺型牛白血病においても、腫大した体表リンパ節や胸水の細胞診において大型リンパ球の増加が報告されていることから [1, 15]、今後、様々なタイプの牛白血病症例を加え更なる検討が必要と思われた。

#### [引用文献]

1. Alexander, A. N., Constable, P. D., Meier, W. A., French, R. A., Morin, D. E., Lowry, J. E., Hoffman, W. E. 1996. Clinical and immunohistochemical characterization of thymic lymphosarcoma in a heifer. *J. Vet. Intern. Med.* 10: 275-278.
2. Cowell, R. L., Dorsey, K. E., Meinkoth, J. H. 2003. Lymph node cytology. *Vet. Clin. Small Anim.* 33: 47-67.
3. Harvey, J. W. 2012. *Veterinary hematology: a diagnostic guide and color atlas.* Elsevier, St. Louis.
4. 林俊春. 2007. 脾臓のリンパ濾胞の反応性変化 (日本獣医病理学会編) 動物病理カラーアトラス. 文永堂出版, 東京, pp26.
5. 猪熊壽. 2010. 牛白血病臨床診断のピットフォールと発症牛早期診断の試み. *家畜診療.* 57: 137-143.
6. Messick, J. B. 2008. The lymph nodes. *In* Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat (Cowell, R. L., Tyler, R. D., Meinkoth, J. H. DeNicola, D. B. eds.), pp179-192, CV Mosby company, St. Louis.
7. 酒井洋樹. 2009. 小動物における細胞診の初歩の初歩. チクサン出版社, 東京, pp120-131.
8. Sakamoto, L., Ohbayashi, T., Matsumoto, K., Kobayashi, Y., Inokuma, H. 2009. Serum thymidine kinase activity as a useful marker for bovine leukosis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 21: 871-



- 874.
9. Sapierzyński, R., Micuń, J., Jagielski, D., Jurka, P. 2010. Cytopathology of canine lymphomas (100 cases). *Pol. J. Vet. Sci.* 13: 653-659.
  10. Smith, B. P. 2009. Large animal internal medicine. 4th ed. CV Mosby company, St. Louis.
  11. Sözmen, M., Tasca, S., Carli, E., De Lorenzi, D., Furlanello, T., Caldin, M. 2005. Use of fine needle aspirates and flow cytometry for the diagnosis, classification, and immunophenotyping of canine lymphomas. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17: 323-329.
  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. 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: 936-940.
  13. 田島誉士. 2002. 白血病 (前出吉光, 小岩政照編) 主要症状を基礎にした牛の臨床. デーリイマン社, 札幌, pp614-618.
  14. 田島誉士. 2005. 牛の白血病 (川村清市・内藤善久・前出吉光監修) 獣医内科学—大動物編. 文永堂出版, 東京, pp208-209.
  15. Tawfeeq, M. M., Miura, S., Nakanishi, Y., Sugimoto, K., Kobayashi, Y., Furuoka, H., Inokuma, H. 2012. Calf form bovine leukosis with lameness in a Holstein heifer. *J. Vet. Med. Sci.* 74: 1225-1228.
  16. Washburn, K. E., Streeter, R. N., Lehenbauer, T. W., Snider, T. A., Rezabek, G. B., Ritchey, J. W., Meinkoth, J. H., Allison, R. W., Rizzi, T. E., Boileau, M. J. 2007. Comparison of core needle biopsy and fine-needle aspiration of enlarged peripheral lymph nodes for antemortem diagnosis of enzootic bovine lymphosarcoma in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 230: 228-232.

### Evaluation of diagnostic criteria of bovine leukemia based on the cell constitution ratio of lymph node biopsy materials

Michihito Tagawa<sup>1)</sup>, Noriyuki Horiuchi<sup>2)</sup>, Kotaro Matsumoto<sup>1)</sup>,  
Yoshiyasu Kobayashi<sup>2)</sup>, Hidefumi Furuoka<sup>2)</sup>, Hisashi Inokuma<sup>1)</sup>

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

2) Department of Basic Veterinary Medicine, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

#### [Abstract]

Smear samples obtained from enlarged lymph node of bovine leukemia (n = 7), reactive lymph nodes (n = 6) and normal lymph nodes (n = 8) were examined whether diagnostic criteria based on the cell constitution ratio were adaptive. The remarkable increase of large and middle lymphocytes was observed in the bovine leukemia group ( $89.0 \pm 6.1\%$ ) compared with the reactive ( $10.8 \pm 3.2\%$ ) and normal lymph node ( $3.0 \pm 1.0\%$ ) groups. The bovine leukemia group ( $9.6 \pm 6.5/5$  HPF) had higher number of mitosis than reactive ( $3.5 \pm 3.1/5$  HPF) and normal lymph node ( $0.0 \pm 0.0/5$  HPF) groups. However, 2 samples among 6 reactive lymph nodes exceeded the lower limit of mitosis observed in bovine leukemia group. It was thought that the diagnostic criteria for bovine leukemia based on the cell constitution ratio was useful.

**Key words:** Bovine Leukemia, Cell Constitution Ratio, Cytology, Lymph Node, Mitosis