

症例報告

ホルスタイン種育成牛にみられた体表リンパ節腫大を伴わない 牛伝染性リンパ腫の1症例

原田俊之¹⁾ 瀧口朝陽¹⁾ 永田健樹²⁾ 佐伯陽平²⁾ 前澤誠希³⁾
高橋 圭⁴⁾ チェンバーズ ジェームス⁴⁾ 内田和幸⁴⁾ 猪熊 壽^{2,3)}

¹⁾ ひので酪農業協同組合 (〒 311-1537 茨城県銚田市紅葉 960-10)

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

³⁾ 東京大学大学院農学生命科学研究科 OSG 国際防疫獣医学研究室
(〒 113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1)

⁴⁾ 東京大学大学院農学生命科学研究科 獣医病理学研究室
(〒 113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1)

連絡責任者氏名：猪熊 壽

連絡先：〒 113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1 東京大学大学院農学生命科学研究科
産業動物臨床学研究室 TEL: 03-5841-5421 FAX: 03-5841-8012
E-mail: ainokuma@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

【要 約】

20カ月齢のホルスタイン種育成牛が食欲不振を主訴に受診した。第9病日に眼球突出を認めリンパ腫を疑ったが、体表リンパ節の腫大はみられなかった。血液検査では異型リンパ球出現を伴うリンパ球増多症、および血清LDH活性と血清チミジンキナーゼ活性の高値を認めた。Bovine leukemia virus (BLV) プロウイルス量は2,795copies/DNA 10ngと著増しており、またinverse-PCRではBLVプロウイルスのモノクローナルな組込みが証明された。死後の病理解剖では眼窩内の軟部組織と乳頭周辺皮膚にそれぞれ腫瘤形成が認められ、頸部胸腺腫大が観察された。体腔内や主要臓器の附属リンパ節腫大はなかった。採取した腫瘤の病理組織学的検索では、Bリンパ球抗原陽性の中型から大型リンパ球のびまん性増殖が認められた。本症例は20カ月齢の育成牛に発症がみられたBLVが関与する牛伝染性リンパ腫と診断された。

キーワード：牛伝染性リンパ腫、ホルスタイン育成牛、inverse-PCR

牛伝染性リンパ腫はBovine leukemia virus (BLV) 感染により発症する悪性腫瘍で、通常3歳齢以上の牛で発症がみられる [1、2、10]。また、本症を疑う臨床所見としては体表や骨盤腔内のリンパ節腫大、異型リンパ球出現を伴うリンパ球増多症などがあげられる [1、2、10]。

これらの典型的な臨床徴候や検査所見がみられる場合には、臨床的に牛伝染性リンパ腫を疑うことは比較的容易であるが、みられない場合には疑診することも難しい。今回、20ヶ月齢のホルスタイン種育成牛において、眼球突出を認めたものの、体表と骨盤腔内のリンパ節腫大を認めず、また病理解剖でも体腔内に腫瘤を認めない牛伝染性リンパ腫症例に遭遇した。また、生前の診断としてインバースPCRを用いて

投稿：2022年2月23日

受理：2022年4月12日

ンパ球への BLV のモノクローナルな組込を証明することで BLV が関与する牛伝染性リンパ腫が示唆されたので、その概要を報告する。

症例は 20 ヶ月齢のホルスタイン種初妊育成牛で、食欲不振を主訴に受診した。約 2 ヶ月前に食欲不振、下痢及び発熱の病歴があったが、抗菌薬等の投与により状態は改善していた。その際に外部機関（株式会社江東微生物研究所、つくば市）に依頼した血液検査にてリンパ球増多 ($10,675 / \mu\ell$) および単球増多 ($19,215 / \mu\ell$) が報告されていたが、血液塗抹標本の観察は実施していなかった。初診時、呼吸促拍、喘鳴および流涎過多を認めたが、体表および骨盤腔内のリンパ節に増大は認められなかった。呼吸器感染症を疑い、抗菌薬を投与したところ臨床徴候は改善した。第 9 病日に再び食欲不振を呈したため診察したところ、体温 38.5°C 、心拍数 120/分、呼吸数 24 回/分で、喘鳴、発咳、流涎および右眼球突出が認められた（図 1）。体表および骨盤腔内のリンパ節に腫大は認められなかった。眼球突出と 2 カ月前の血液検査の結果から、鑑別診断としてリンパ腫を考慮し、第 13 病日に東京大学動物医療センター産業動物診療科にて自動血球計算機と血液塗抹標本の鏡

検を行ったところ、異型リンパ球割合の増加を伴うリンパ球増多症が認められた（表 1 および図 2）。また、血清生化学検査を外部機関（株式会社江東微生物研究所）に依頼して実施し、LDH とチミジンキナーゼ（Thymidine kinase: TK）活性の高値を認めた（表 2）。同じく牛伝染性リンパ腫マーカーとされている LDH アイソザイムを [9]、同じ機関に依頼して解析したところ、LDH 分画 2 および 3 の上昇はみられなかった（表 2）。病原学的検査として BLV プロウイルス量を real-time PCR（ウシ白血病ウイルス検出キット、タカラバイオ、草津市）によって定量したところ、 $2,795 \text{ copies}/10\text{ng DNA}$ と著増していた。B リンパ球の免疫グロブリン重鎖再構成を利用したクローン性解析 [8] では、末梢血 B リンパ球のモノクローナル増殖は確認できなかったが、inverse-PCR による BLV プロウイルス組込み部位のクローン性解析 [6] では BLV プロウイルスのゲノムへのモノクローナルな組込みが証明された（図 3）。

症例牛は第 24 病日に死亡し、2 日後に病理解剖に供された。眼窩内の軟部組織および乳頭周囲の皮膚にそれぞれ腫瘤形成が認められ、ま



図 1 第 9 病日の症例外貌。右眼の突出と角膜の損傷が認められた（矢頭）。体表および骨盤腔内のリンパ節腫大はみられなかった。

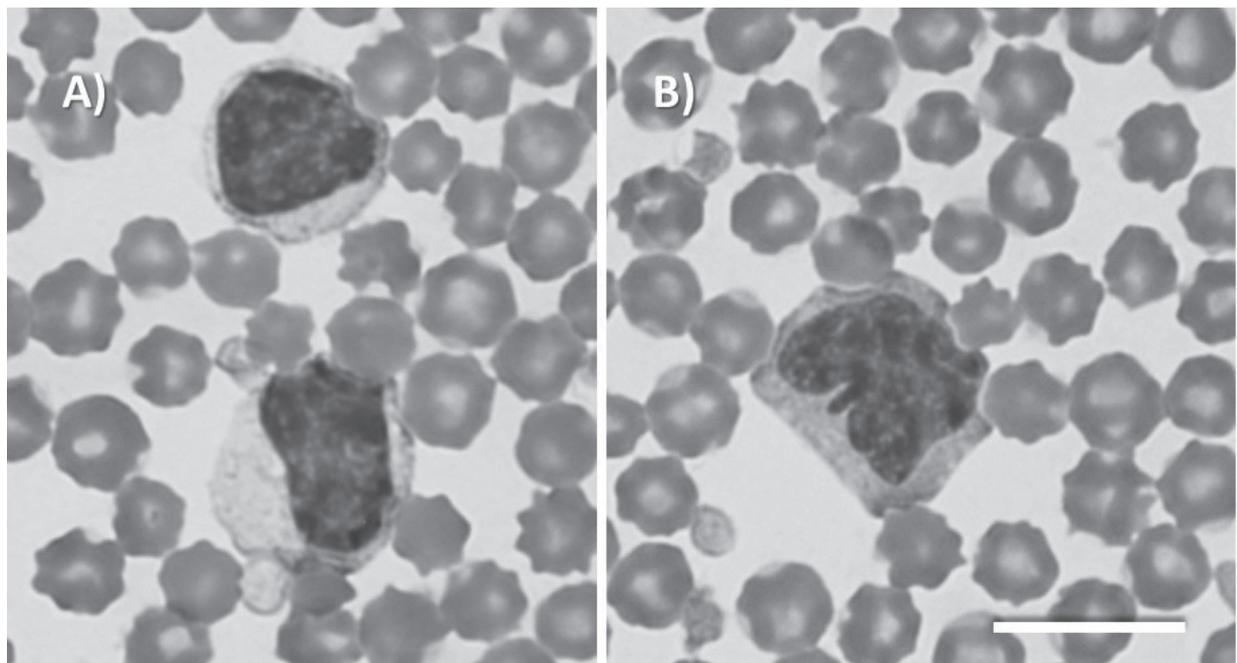


図2 第13病日の末梢血塗抹標本所見（ギムザ染色、×1000）。中型～やや大型でクロマチン網工が凝集した核を有する異型リンパ球が増加している。A) 下のリンパ球は細胞質が広く、単球に類似する。B) 核の不整形が顕著である。Bar=10 μ m

表1 血液および血液生化学検査（第13病日）

RBC	792 × 10 ⁶ / μ l	Total Protein	7.5 g/dl
Hb	12.2 g/dl	Albumin	3.4 g/dl
PCV	34.1 %	A/G	0.83
Platelet	28.9 × 10 ⁴ / μ l	NEFA	1.36 mM
WBC	18,100 / μ l	Total cholesterol	136 mg/dl
Sta	0 / μ l	BUN	6.7 mg/dl
Seg	3,620 / μ l	AST	75 U/l
Lym	14,118 / μ l	CK	80 U/l
Mon	0 / μ l		
Eos	362 / μ l		

表2 腫瘍マーカーとしての血清LDH活性、LDHアイソザイムおよびチミジンキナーゼ活性値

		基準値 (U/l)	文献
LDH	1,454 U/l	1,445	9
LDH-1	881 U/l	360 - 751	9
LDH-2	362 U/l	187 - 390	9
LDH-3	179 U/l	10 - 260	9
LDH-4	26 U/l	42 - 87	9
LDH-5	6 U/l	48 - 101	9
Thymidine kinase	13.2 U/l	< 5.4	14

た頸部胸腺相当部の腫大も観察されたが(図4-6)、体表、体腔内および主要臓器に附属するリンパ節の腫大はみられなかった。遺体は腐敗が進行しており、組織学的検査に供することができたのは眼球後部と皮膚腫瘍のみであったが、いずれの組織でも中～大型の異型性に富むリンパ球のびまん性増殖が認められた(図7、

8)。さらに、Bリンパ球抗原に対するモノクローナル抗体(anti-B lymphocyte antigen (BLA36) Clone A27-42、BioGenex、Fremont、U.S.A)を用いた免疫染色により増殖細胞が陽性を示したことから、腫瘍細胞はBリンパ球と診断された(図7、8)。

本症例は異型リンパ球の出現を伴うリンパ球

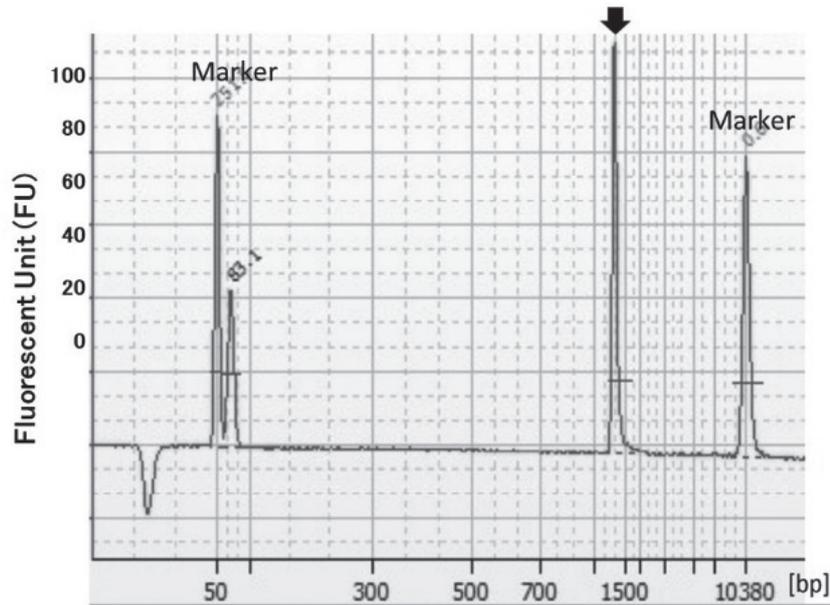


図3 第13病日の末梢血ゲノムDNAをテンプレートとしたインバースPCR泳動像。1,400 bp付近にモノクローナルな増殖が認められる(矢印)。

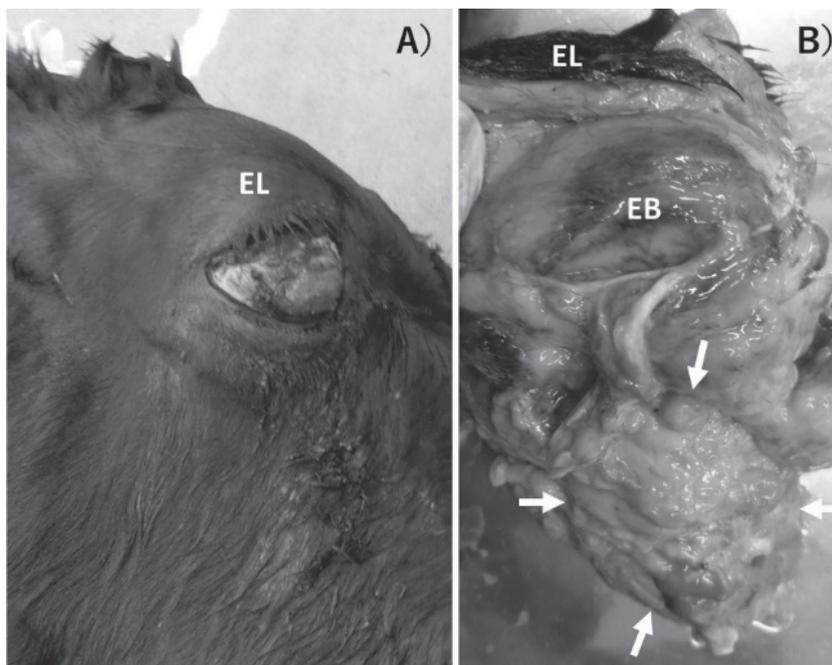


図4 A) 病理解剖時、右眼の眼球突出が認められる。EL:眼瞼。B) 眼球(EB)とその尾側腫瘍(矢印)を取り出した外観。

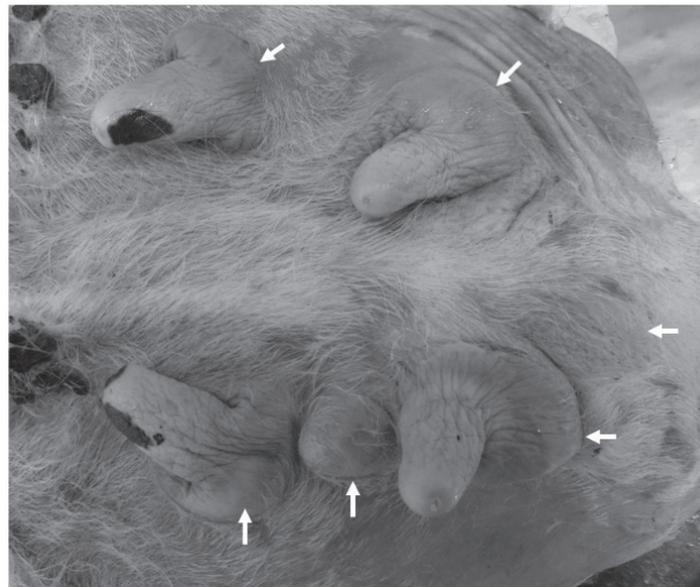


図5 病理解剖時に認められた乳頭周辺の皮膚結節 (矢印)。

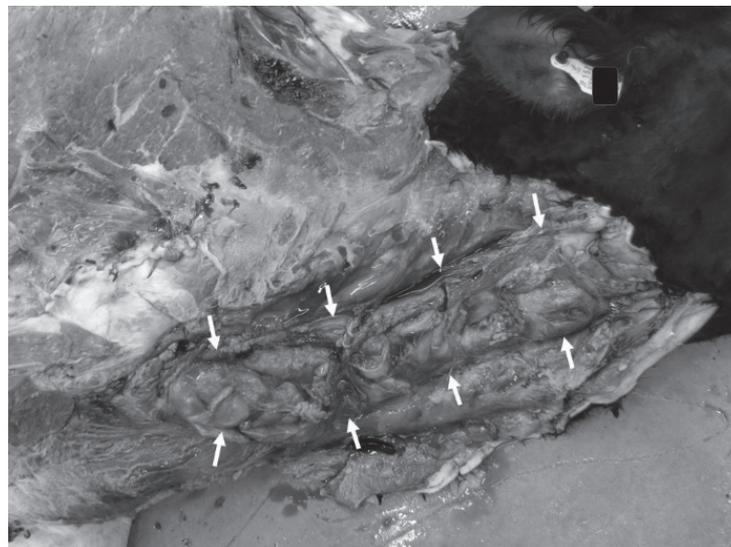


図6 病理解剖時、頸部胸腺相当部にみられた腫瘤 (矢印)。

増多症と右眼球突出、および血清 LDH と TK 活性高値を認めたことから牛伝染性リンパ腫を疑ったが [1、2、10、13]、若齢であり、体表と骨盤腔内のリンパ節腫大がみられないことから生前診断に苦慮した。しかしながら、BLV provirus 量の著増およびインバース PCR により BLV プロウイルスの牛ゲノム内へのモノクローナルな組込みが証明されたことから、BLV が関与する牛伝染性リンパ腫の発症が強く示唆された。本症例は病理組織学的検索結果とも併せて最終的に牛伝染性リンパ腫と診断された。

インバース PCR は複数の牛 B リンパ球ゲノム内の同一箇所にも BLV プロウイルスが組込ま

れる場合に、モノクローナルなバンドが認められることで腫瘍細胞のモノクローナル増殖を証明する検査法であり [6]、これまでも牛伝染性リンパ腫の補助診断として利用されている [7]。いっぽう、今回もう一つのクローナル解析法である B リンパ球の免疫グロブリン重鎖再構成を利用した PCR ではモノクローナル増殖が証明できなかったが、これは本法の感度が 68.6 % と不完全であることに起因すると思われた [8]。今回のように複数のクローナル解析法を組み合わせることで、B リンパ球のモノクローナル増殖の検出感度を高めることが期待できる。

近年、医学および伴侶動物領域では末梢血中

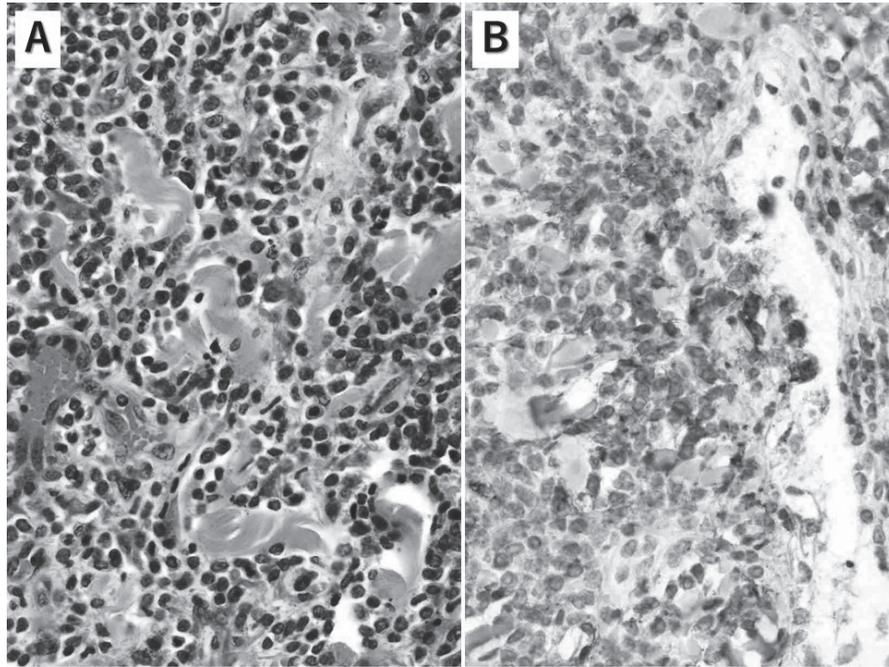


図7 眼球後部腫瘍の (A) HE 染色像、および (B) 免疫組織化学所見。ほとんど全ての腫瘍細胞はBLA36染色陽性であった (×400)。

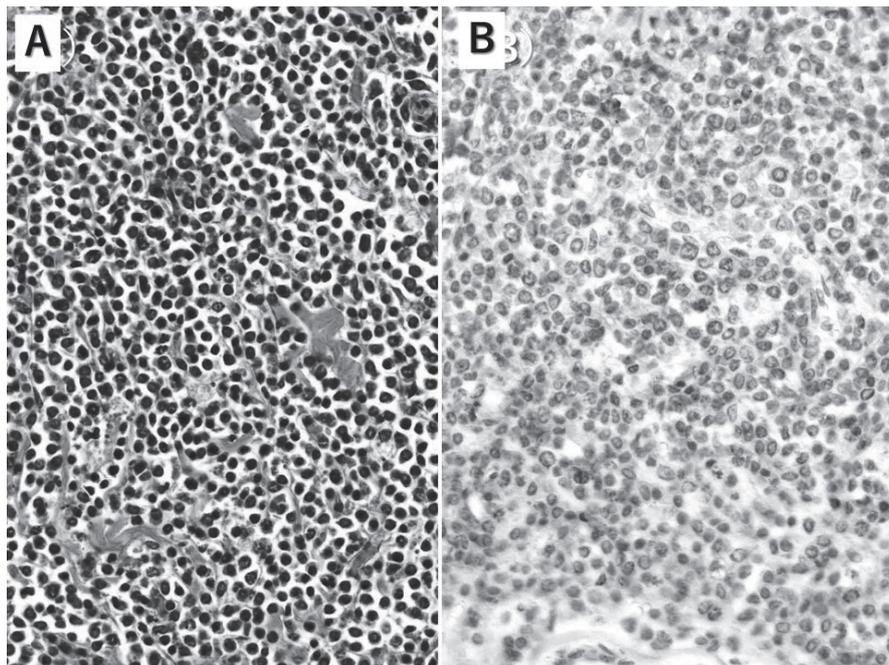


図8 皮膚結節の免疫組織化学所見。(A) HE 染色像、および (B) 免疫組織化学所見。ほとんど全ての腫瘍細胞はBLA36染色陽性であった (×400)。

に出現する腫瘍化リンパ球を「異常リンパ球」として、抗原刺激に反応して形態が変化した反応性リンパ球（異型リンパ球）と区別している [4]。本症例においても末梢血リンパ球のモノクローナル増殖が示唆されたことから、末梢血塗抹で認められた形態異常を伴うリンパ球は、

医学領域および伴侶動物でいうところの異常リンパ球であったと思われる。

一般に BLV が関与する牛伝染性リンパ腫の発症年齢は、3 歳齢以上であり、臨床徴候としては全身のリンパ節腫大とそれに伴う各種臓器の機能障害がみられることが多い [1、2、10]。

また、臨床検査所見では、リンパ球増多症と末梢血への異型リンパ球の出現、LDH および TK 活性値の高値が特徴的にみられる [1、2、5、9、10、13]。本症例の場合、食欲不振など非特異的徴候が主であったことに加えて、20 カ月齢と若齢であり、体表リンパ節と骨盤腔内リンパ節の腫大を認めなかったため、眼球突出を呈するまで臨床的にリンパ腫を想定していなかった。しかし、初診 2 カ月前の血液検査では、末梢血中のリンパ球と単球の著しい増多が検査センターから報告されていた。当該検査センターでは自動血球計算機を用いて白血球百分比を含めた血液検査を実施しているため、大型化した腫瘍化リンパ球が単球と認識され、単球増多として報告された可能性も考えられた。この時点でリンパ腫を鑑別診断リストにあげ、末梢血塗抹標本の精査とともに、LDH および TK 活性を解析していれば、早期にリンパ腫の診断に繋がったと思われる。大動物領域では血液塗抹標本の作製と評価を含めた血液検査を外部の臨床検査機関に委託することが多いが、リンパ球増多症や単球増多症を呈した症例、あるいはリンパ腫を疑う症例の場合には、血液塗抹標本を自ら作製し、観察・評価することが必要であろうと思われる [4]。

本症例は BLV が発症に関与した若齢発症牛伝染性リンパ腫と診断されたが、同時に乳頭周辺皮膚への腫瘍浸潤と胸腺腫大も認められた。病理解剖までに腐敗が進行したため、腫大胸腺相当部の病理組織学的検索は実施できなかった。しかし、腫瘍化した B リンパ球が胸腺に浸潤した症例はこれまでも報告されており [3]、本症例の腫大胸腺にも腫瘍が浸潤していた可能性は否定できない。生前には胸腺の腫大には気づけなかったが、呼吸促迫、喘鳴、流涎などの臨床徴候は胸腺腫大による気道や食道の圧迫が原因であったと思われる。一般に BLV が発症に関与する牛伝染性リンパ腫症例における病変分布は多中心性のリンパ腫腫大を示すことが多いが [1、2、10]、リンパ節腫大がみられず、皮膚や胸腺へ腫瘍細胞が浸潤した症例の報告は少ない。本症例は病変分布においても、通常の牛伝染性リンパ腫とは異なる症例であった。現

在、牛のリンパ腫の臨床病型は年齢（成牛型と子牛型）および病変部位（皮膚型と胸腺型）が混在した分類体系であり、混乱が生じやすい [1、2]。牛のリンパ腫についても、伴侶動物や医学領域で用いられている WHO 分類に準拠する分類法 [11、12]、あるいは腫瘍病変の解剖学的分布に基づく分類に統一するなど、臨床分類の体系的整理が必要と思われた。

謝辞 本研究の一部は科研費 20J10567 および 20H03142 により実施された。

引用文献

- [1] Angelos, J. A., Thurmond, M. C. 2015. Large Animal Internal Medicine, 5th ed. Elsevier, St. Louis. pp760-769.
- [2] Constable, P. D., Hinchcliff, K. W., Done, S. H., Grunberg, W. 2017. Veterinary Medicine, 11th ed. Elsevier, St. Louis. pp785-794.
- [3] Hishamnuri, W. N. A. D., Nakagun, S., Maezawa, M., Sakaguchi, K., Akiyama, N., Watanabe, K., Horiuchi, N., Kobayashi, K., Inokuma, H. 2019. J. Vet. Diagn. Invest. 31: 852-855.
- [4] 猪熊 壽. 2022. 家畜診療 69: 71-81.
- [5] Ishihara, K., Ohtani, K., Kitagawa, H., Onuma, M. 1980. Jpn. J. Vet. Sci. 42: 289-295.
- [6] Maezawa, M., Sakaguchi, K., Tanaka, Y., Watanabe, K., Kobayashi, Y., Inokuma, H. 2021. Comp. Clin. Pathol. 30: 711-714.
- [7] Maezawa, M., Watanabe, K., Horiuchi, N., Matsumoto, K., Kobayashi, K., Inokuma, H. 2018. Jpn. J. Vet. Res. 66: 209-213.
- [8] Maezawa, M., Watanabe, K., Matsumoto, K., Horiuchi, N., Kobayashi, Y., Inokuma, H. 2020. J. Vet. Med. Sci. 82: 61-63.
- [9] 三浦沙織, 猪熊 壽. 2015. 産業動物臨床医誌. 6: 149-153.
- [10] Peek S. F., Buczinski, S. 2018. Rebhun's Diseases of Dairy Cattle, 3rd ed. Elsevier, St. Louis. pp. 760-769.
- [11] Sabattini, E., Bacci, F., Sagramoso, C., Pileri, S. A. 2008. Pathologica. 102: 83-87.
- [12] 坂井祐介, 上塚浩司, 中山裕之. 2008. 日獣会誌. 61: 543-548.
- [13] Tawfeeq, M. M., Miura, S., Horiuchi, N., Kobayashi, Y., Furuoka, H., Inokuma, H. 2013. J. Vet. Med. Sci. 75: 1167-1172.
- [14] Sakamoto, L., Ohbaashi, T., Matsumoto, K., Kobayashi, K., Inokuma, H. 2009. J. Vet. Diagn. Invest. 21: 871-874.

Clinical case of enzootic bovine leukosis without lymphadenopathy in a Holstein heifer

Toshiyuki Harada¹⁾ Asahi Takiguchi¹⁾ Tatsuki Nagata²⁾ Yohei Saeki²⁾ Masaki Maezawa³⁾
Kei Takahashi⁴⁾ James K. Chambers⁴⁾ Kazuyuki Uchida⁴⁾ Hisashi Inokuma^{2, 3)}

¹⁾ Veterinary Clinic of Hinode Dairy Cooperative Association. Momiji, Hokota, Ibaraki 311-1537, Japan

²⁾ Laboratory of Farm Animal Medicine, Graduate School of Agriculture and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

³⁾ Laboratory of OSG Veterinary Science for Global Disease Management, Graduate School of Agriculture and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

⁴⁾ Laboratory of Veterinary Pathology, Graduate School of Agriculture and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

Corresponding to: Hisashi Inokuma

Laboratory of Farm Animal Medicine, Graduate School of Agriculture and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan TEL: +81-03-5841-5421, FAX: +81-3-5841-8012, E-mail: ainokuma@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

[Abstract]

A 20-month-old Holstein heifer was presented with anorexia. On Day 9, exophthalmos was observed and lymphoma was suspected, but swelling of surface lymph nodes was not observed. Complete blood count showed lymphocytosis with atypical lymphocytes, and high serum LDH and thymidine kinase activities were recorded. The amount of bovine leukemia virus (BLV) provirus was significantly increased to 2,795 copies / DNA 10 ng, and inverse-PCR demonstrated monoclonal integration of BLV provirus. Necropsy revealed mass formation in the soft tissues of posterior orbit and the skin around the papilla, and swelling of the cervical thymus. There was no lymphadenopathy in the body cavity or major organs. Histopathological examination of the mass lesions revealed diffuse proliferation of BLA36-positive middle to large-sized lymphocytes. This case was diagnosed as enzootic bovine leukosis related to BLV infection found in a Holstein heifer.

Keywords: enzootic bovine leukosis, Holstein heifer, inverse-PCR