

地方病性牛白血病へ進行していた 持続性リンパ球増多症の一症例

竹田百合子¹⁾・高森広典²⁾・千葉直幸¹⁾・曾地雄一郎¹⁾・西 清志³⁾・小寺 文¹⁾

1) 宮城県仙台家畜保健衛生所

2) 宮城県農林水産部畜産課

3) 宮城県東部地方振興事務所畜産振興部

要 約

持続性リンパ球増多症 (PL) のウシ1頭 (ホルスタイン種) について、臨床症状および採血による経時的観察を9ヶ月間実施し、8歳5ヶ月で鑑定殺を行った。経時的観察ではBLVの標的細胞であるBリンパ球が増加したまま推移したが、臨床症状および血液検査結果に著変を認めず、生前では地方病性牛白血病 (EBL) 発症の確定診断に至らなかった。しかし、剖検では腫大していた乳房上リンパ節の免疫染色でCD20⁺、CD5⁺の多形型B細胞性リンパ腫を確認し、腫大していた深鼠径および乳房上リンパ節で他の臓器に比べBLV遺伝子量が多量に検出されたため、PLからEBLに進行していたと診断した。また、本症例との免疫状態を比較するため、BLV抗体陰性の同居牛 (2頭) および他農家のEBL発症牛 (4頭) の免疫細胞の測定と、末梢血樹状細胞 (DC) 割合の測定を試みた。本症例はCD8⁺T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、単球が増加し、未発症牛に近い免疫状態と推察された。DC割合は、同居牛と比較し本症例およびEBL発症牛 (4頭中3頭) で低い傾向を認めたものの、さらに例数を増加し検討が必要と思われた。今回は1症例であったが、野外症例のPL牛の病態を確認し、一般症状のないEBLをとらえることができた。

I 症例の概要

A農場は成牛50頭、育成牛22頭を飼養する酪農経営で、BLV抗体陽性率が41.4% (平成26年)、平成21年の検査で抗体陽性牛21頭中PL牛5頭 (平均リンパ球数: 11,540/ μ l) を確認しており、そのうちの1頭が今回の症例である。検査に供したウシは平成17年9月生まれのホルスタイン種 (雌) 1頭で、4歳 (平成21年) でBLV抗原・抗体ともに陽性、白血球数14,100/ μ l、リンパ球数11,400/ μ lのPL牛であった。7歳7ヵ月時 (平成25年) に白血球数23,600/ μ l、リンパ球数15,400/ μ lに増加し、左膝部の体表リンパ節の軽度腫脹を確認したが、一般症状などの悪化を含めた臨床症状は認めなかった。

II 材料及び方法

1. 経時的観察および剖検

PL牛1頭の経時的観察は9ヶ月間実施し、血液 (全血、ヘパリン血、EDTA血) を10回 (平成25年6月6日、7月8日、8月6日、8月27日、9月24日、10月22日、11月19日、12月17日、平成26年1月14日、2月25日) 採血した。その後、当該牛を8歳5ヵ月時に鑑定殺を行い、剖検した (平成26年2月27日)。

血液塗抹はメイギムザ染色を実施し、血球測定は全自動血球計数器MEK-6258 (日本光電)、血液生化学性状は富士ドライケム3000 (富士フィルム)、LDHアイソザイムはタイタンLDHアイソザイムキット (株式会社ヘレナ研究所) で測定した。

血清中チミジンキナーゼは5検体（平成25年6月6日、8月6日、10月22日、12月17日、平成26年2月25日採血分）をRadio enzyme Assayで外部依頼で測定した（株式会社SRL社）。

病理組織学的検査は剖検後、常法に従い標本作成後、H・E染色を実施した。免疫染色は動物衛生研究所へ依頼し、乳房上リンパ節について1次抗体（ヒトCD20、CD5）を用いて実施した。

BLV遺伝子量の測定は、経時的観察では末梢白血球について、剖検後は白血球、臓器14検体（皮膚、胸腺、肝、脾、腎、心、肺、扁桃、子宮、卵巣、大脳、胸髄、脊髄周囲脂肪組織、視神経）、リンパ節22検体（右耳下腺、右下顎、腋窩、左右浅頸、左右腸骨下、左右乳房上、膝窩、肝門、脾門、腎門、気管気管支、縦隔、空腸、回腸、回盲部、内腸骨、左右膝部体表、深鼠径）計37検体を材料として、qPCRを実施した。（使用キット：牛白血病ウイルス検出用CY415/510（TAKARA）、機器：ABI7500（Applied Biosystems））

白血球ポピュレーションは東北大学へ測定依頼し、フローサイトメトリー（機器：ファックスキャリバー、バクトン・デッキンソン）による細胞表面抗原検査（CD21、CH138A、CD14、CD3）を実施した。

2. 免疫細胞の測定

本症例との免疫状態を比較するため、BLV抗体陰性の同居牛および他農家のEBL発症牛の免疫細胞及びDC割合の測定を試みた。

材料は、牛7頭の血液（全血、ヘパリン血、EDTA血）で、本症例1頭、同じA農場でBLV抗体陰性の同居牛2頭、他農場のEBLと診断した発症牛4頭である（表1）。本症例は10回、同居牛2頭は5回、EBL牛は1回採血を実施し、平均値を結果に用いた。なお、EBL牛No.3については血液塗抹像で小型ピロプラズマ原虫の寄生を認めた。

白血球ポピュレーションおよびT細胞サブセットは、東北大学へ測定依頼し、フローサイトメトリーによる細胞表面抗原検査（CD21、CH138A、CD14、CD3、CD4、CD8、TCR1-N2）を実施した。

表1 免疫細胞の測定材料

| No | 検体名 | 区分 | 農場 | 品種 | 年齢 | 白血球数/ μ l | 採血回数 |
|----|------|-----------------|----|----|-----|---------------|------|
| 1 | 本症例 | PL→EBL | | ホル | 8歳 | 21,200 | 10 |
| 2 | 同居牛1 | BLV陰性 健康 | A | ホル | 4歳 | 7,480 | 5 |
| 3 | 同居牛2 | | | ホル | 3歳 | 5,800 | 5 |
| 4 | EBL1 | EBL発症 | B | 黒毛 | 7歳 | 89,600 | 1 |
| 5 | EBL2 | EBL発症 | C | 黒毛 | 6歳 | 109,600 | 1 |
| 6 | EBL3 | EBL発症 小型ピロ感染 | D | 黒毛 | 12歳 | 24,900 | 1 |
| 7 | EBL4 | EBL発症 | E | 黒毛 | 8歳 | 382,000 | 1 |

末梢血中樹状細胞（DC）割合の測定は東北大学へ測定依頼し、Miyazawaら⁵⁾の方法を用いて、新鮮なヘパリン血約40mlより末梢血単核細胞（PBMC）を分離し、磁気細胞分離法によりT細胞（CD3）、B細胞（B-B2）、単球（CD14）を除去後、フローサイトメトリーを実施した。CD11cおよびCD172a両方が陽性の細胞をDCとし、PBMC（CD3⁻B-B2⁻CD14⁻）中のCD11c⁺CD172a⁺細胞の割合（%）で示した。

III 結果

1. 経時的観察および剖検

9ヶ月間の経時的観察では臨床症状の食欲不振や消瘦などの異常なく、体表リンパ節の軽度腫脹も著変を認めなかった。血液検査では末梢血中白血球数は21,200±992（平均値±標準偏差）/ μ l、リンパ球数は12,600±1,181/ μ l、LDHは1,047±159U/L、ASTは88±11U/L、LDH2と3の合計は40.1±0.9%で推移した。血清中チミジンキナーゼは2.0±0.8U/Lを示し、基準値（5.4U/L）⁷⁾以下であった。末梢血BLV遺伝子量は4,406±447 copies/100ngDNAで推移した。白血球ポピュレーションの割合はCD21⁺細胞（B細胞）45.6±3.9%、CD3⁺細胞（T細胞）13.8±2.1%、CH138A⁺細胞（顆粒球）34.7±4.0%、CD14⁺細胞（単球）6.0±0.9%を示し、B細胞の増加を認めた（図1）。

剖検時の外貌所見では、右浅頸と左膝部の体表リンパ節の軽度腫大を認めた。剖検所見では、一部のリンパ節に最大12cmの腫大を認めたが、その他臓器には肉眼所見は認めなかった（図2）。組織所見では、左乳房上リンパ節に出血壊死およびリンパ球様異型細胞の腫瘍性増殖を認めた。免

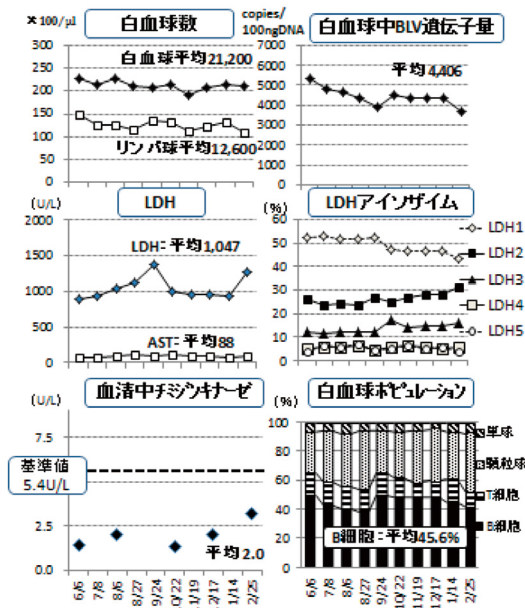


図1 経時的観察結果



| リンパ節 | 剖検時の大きさ(cm) |
|------|------------------------|
| 左乳房上 | 12×9 |
| 深鼠径 | 左10×6 右7.5×5 |
| 左腋部 | ①2×2.5 ②1.5×1.5 ③1.5×1 |
| 右浅頸 | ①3×2 ②1.5×1 |
| 右腸骨下 | 3.5×1.5 |

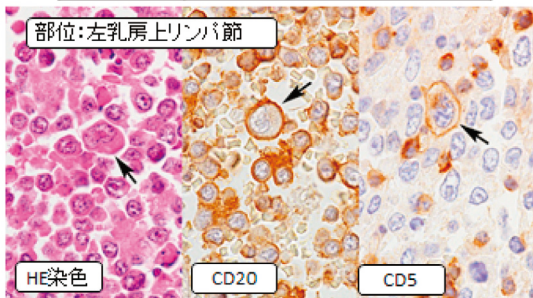


図2 病理組織学的検査結果

疫染色でCD20 (B細胞全般)、CD5 (B1a細胞) が共に陽性であったことから、多形型B細胞性リンパ腫と診断した。剖検時の血液検査では、白血球数 $18,900/\mu\text{l}$ 、赤血球数 $671 \times 10^4/\mu\text{l}$ 、Hb 11.2g/dl、Ht37.7%、白血球百分比ではリンパ球比80% (異型11%) を認め、LDHは1,210U/L、うちLDH1 : 40.5%、LDH2 : 29.4%、LDH3 : 18.2%、LDH4 : 7.3%、LDH5 : 4.6%を示し、LDH2と3の軽度

上昇を認めた。その他の項目は著変を認めなかった。(TP:7.6、Alb:3.8g/dl、BUN:17.7、Glu:85、T-Cho:276mg/dl、AST:100、 γ GTP:28、CPK:169U/L) 剖検後のBLV遺伝子量検査では37検体中36検体からBLV遺伝子を検出した(視神経は検出限界以下)(図3)。白血球は3,698、臓器は0~402、リンパ節は52~5,994 copies/100ng DNAであり、肉眼所見のなかった臓器の遺伝子量は低く、著しく腫大していた深鼠径リンパ節と左乳房上リンパ節で多量に検出された(それぞれ5,994、4,620 copies/100ng DNA)。

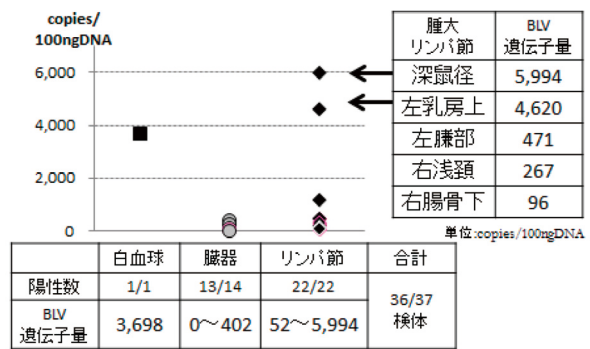


図3 BLV遺伝子量検査結果

2. 免疫細胞の測定

白血球ポピュレーションでは本症例は同居牛と比較し白血球中のすべての細胞が有意に増加を認め、特にCD21⁺B細胞が増加していた(平均9,668/ μl)。EBL牛4頭中3頭は使用した一次抗体陰性の細胞(CD21⁻CD3⁻CD14⁻CH138⁻細胞)が71.0~92.7%を占め、CD21抗体では検出されないB細胞を多数認めた。また本症例とEBL牛3頭はCD14⁺細胞(単球)が多い傾向を認めた(表2)。

表2 免疫細胞の測定結果

| | 本症例 | 同居牛1 | 同居牛2 | EBL1 | EBL2 | EBL3 | EBL4 |
|--|------------|-----------|-----------|---------------|-----------------|--------|-----------------|
| 総白血球数 | 212.2±9.4* | 74.8±7.7* | 58.0±6.7b | 896 | 1,096 | 249 | 3,820 |
| CD21 ⁺ | 96.7±8.1* | 8.2±2.2* | 5.3±0.5* | 8.8 | 6.4 | 204.7 | 1,009.2 |
| CD3 ⁺ | 29.4±5.3* | 18.6±4.4* | 7.7±0.7* | 8.6 | 19.6 | 12.9 | 32.5 |
| CD14 ⁺ | 12.7±2.3* | 6.9±1.1* | 5.6±1.3* | 27.3 | 21.5 | 6.1 | 26.0 |
| CH138 ⁺ | 73.5±8.5* | 41.2±7.3* | 39.4±7.8* | 27.8 | 32.6 | 25.4 | 40.5 |
| CD21 ⁻ CD3 ⁻ CD14 ⁻ CH138 ⁻ (細胞の割合%) | | | | 823.5 (91.9%) | 1,016.0 (92.7%) | 0 (0%) | 2,711.8 (71.0%) |
| CD4 ⁺ | 17.1±5.4* | 11.6±2.8 | 3.2±0.9* | 5.4 | 11.2 | 8.0 | 16.8 |
| CD8 ⁺ | 16.8±5.9* | 3.7±1.2* | 3.5±0.9* | 2.0 | 6.1 | 4.4 | 11.6 |
| TCR1-N2 | 6.7±1.7* | 3.1±0.4* | 0.9±0.4* | 0.8 | 1.6 | 1.2 | 2.2 |

* 複数回採血した本症例と同居牛のみそれぞれ比較 異符号間でp<0.05 で有意差あり

T細胞サブセットは、本症例は同居牛と比較しCD8⁺T細胞（主にキラー T細胞）とTCR1-N2⁺細胞（ γ δ +T細胞）の有意な増加を認めたが、EBL牛4頭は増加傾向を認めなかった。

末梢血のT細胞、B細胞、単球を除いたPBMC中のDC割合は、本症例は同居牛と比較して有意に低かった（0.67±0.34%）（図4）。EBL牛4頭中3頭も、DC割合が低い傾向を認めた。

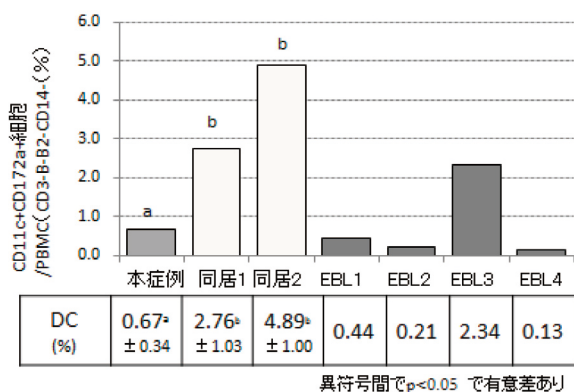


図4 DC割合の測定結果

IV まとめ及び考察

牛白血病は疫学のおよび臨床病理学的所見から、散発性牛白血病と地方病性牛白血病（EBL）に分類され、EBLは牛白血病ウイルス（BLV）の感染が原因とされている⁸⁾。BLVに感染牛の20～30%の牛が持続性リンパ球増多症（PL）となり、数ヶ月から数年後に0.1～5%がEBLを発症する⁹⁾ことが知られており、今回我々はPL牛からEBL発症の転機を確認することを目的に、PL牛1頭についての詳細な検査を実施した。

本症例は4歳時にPL牛と確認し、約4年後に体表リンパ節の軽度腫脹を認めた。白血病の診断基準のひとつのECの鍵¹¹⁾では真症であり、BLVの標的細胞であるBリンパ球の増加、白血病で上昇するとされるLDH2とLDH3²⁾は軽度上昇を認め、EBLの発症が疑われた。しかしその他の異常値は認めず、臨床症状の悪化がないことから、9ヶ月間の経時的観察ではEBL発症の確定診断に至らなかった。剖検により、多形型B細胞性リンパ腫を確認し、腫大したリンパ節において他の臓器に比べBLV遺伝子量が

多量に検出されたことから、BLVの関与によりPLからリンパ腫へ進行していたと判断し、総合的にEBLと診断した。

本症例は一見健康牛と変わりなく、腫瘍部位が限局的であり、細胞の逸脱酵素であるLDHの著増はなく、腫瘍細胞の分裂が盛んなときに増加するとされるチミジンキナーゼが基準値以下であったことから、EBL初期の可能性が考えられた。

EBL発症には白血病抵抗性遺伝子などの遺伝的要因が関与するとの報告¹⁾や、牛の免疫状態の関与が報告されている^{3,4)}。本症例の免疫状態の測定を実施したところ、CD8⁺T細胞と γ δ T細胞、単球の増加を認めた。柿沼ら⁴⁾はEBL未発症のBLV感染牛群の免疫状態として、CD8⁺T細胞や γ δ T細胞、単球を中心とした免疫応答の可能性を報告している。Lundbergら⁶⁾は感染していても病態が進まない牛では γ δ T細胞が抗ウイルス作用を発揮することを報告している。これらから、本症例が高く免疫応答をしていた可能性があり、未発症牛に近い免疫状態が示唆された。

一方、伊澤ら³⁾は、黒毛和種において、EBL発症群はBLV抗体陰性群に比べ、単核球、単球の増加、 γ δ T細胞の減少を報告している。本症例のBリンパ球、単球の増加はEBL発症牛の特徴と一致したものの、 γ δ T細胞は減少していなかった。また、本症例のB細胞がCD21⁺B細胞つまり成熟B細胞で構成されていたことから、いずれもEBL初期の可能性を裏付けると推察された。なお、EBL牛4頭は成熟B細胞（CD21⁺）の割合は様々で、既報同様、単球の増加（3頭）と γ δ T細胞が少ない傾向を認めた。

今回新たな試みとして、ウシの末梢血DC割合の測定を実施した。DCは、1973年に発見された細胞⁹⁾で、成熟DCはMHCクラスIIを発現し、T細胞への強い抗原提示能を持つ¹⁰⁾。ヒトや小動物の臨床ではがんの免疫療法として注目されているが、ウシにおいては報告が少ない。近年確立されたウシの末梢血DC割合の測定⁵⁾を実施したところ、本症例とEBL牛4頭中3頭において、同居牛と比較しDCが低い傾向を認めた。ヒトのDCは末梢組織で異物等を取り込み後、所属リンパ節へ移動するとの報告¹⁰⁾もあり、今回の結果が牛における新たな知見となる

可能性が示唆されたが、更に例数を増加し検討が必要である。なお、EBL牛No.3については、小型ピロプラズマ原虫の寄生を認め、それがDC割合に影響した可能性も否定できない。

今回、1症例ではあるが、野外症例のPL牛の病態を確認し、一般症状のないEBLをとらえることができた。また、ウシのDCの研究は今後発展すると思われる、今回の測定はその足がかりのひとつとなり、調査の積み重ねにより、EBL発症の機構解析と早期診断へつながることを期待したい。

V 謝 辞

検査にご協力いただいた東北大学大学院農学研究科応用生命科学専攻動物機能科学講座機能形態学分野 麻生久教授、浦川めぐみ研究員および国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構、動物衛生研究所寒地酪農衛生研究領域北海道支所 門田耕一上席研究員に深謝します。

引用文献

- 1) 間陽子: MHCをマーカーとした牛白血病抵抗性牛作出に向けた育種戦略.動物遺伝育種研究. 36, 9-19 (2008)
- 2) Ishihara, K., Ohtani, T., Kitagawa, H., and Onuma, M.: Clinical studies on bovine leukemia in Japanese Black cattle. III. Serum lactate dehydrogenase activity and its isoenzyme pattern in groups of cattle affected by bovine leukemia and with negative or positive antibodies against bovine leukemia virus. Jpn. J. Vet. Sci., 42, 289-295 (1980).
- 3) 伊澤智宏, 田中健一郎, 柿沼清市ほか: 牛白血病ウイルスに感染した黒毛和種牛の免疫状態.日獣会誌. 67, 328-332 (2014).
- 4) 柿沼清市, 大塚浩通, 大前佳穂里ほか: 牛白血病ウイルス感染搾乳牛における末梢白血球ポピュレーション.日獣会誌. 64, 375-380 (2011).
- 5) Miyazawa,K., Aso,H., Honda,M., et al.: Identification of bovine dendritic cell phenotype from bovine peripheral blood. Res Vet Sci, 81, 40-45 (2006).
- 6) Lundberg,P,Splitter GA: $\gamma \delta (+)$ T-Lymphocyte cytotoxicity against envelope-expressing target cells is unique to the alymphocytic state of bovine leukemia virus infection in the natural host. J Virol, 74, 8299-8306 (2000).
- 7) Sakamoto,L., Ohbayashi,T., Matsumoto,K., et al.: Serum thymidine kinase activity as a useful marker for bovine leucosis. J Vet Diagn Invest, 21, 871-784 (2009).
- 8) 清水悠紀臣, 鹿江雅光, 田淵清ほか: 獣医伝染病学第5版. 近代出版. 101-103 (1999).
- 9) Steinman,R.M.,Corn,Z.A.,: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice.I. Morphology, quantitation,tissue distribution. J Exp Med, 137, 1142-1162 (1973).
- 10) 矢田純一: 医系免疫学. 中外医学社, 273 (2001).
- 11) 安田純夫, 村上大蔵: 新版獣医内科学. 文永堂出版, 620 (1988).

平成28年度 東北獣医師会大会 獣医学術東北地区学会(三学会)

日 時 : 平成28年10月4日(火)～5日(水)

場 所 : メトロポリタン仙台