

## 8 牛伝染性リンパ腫の発症判断に関する一考察

○小山 朗子 高野 真帆 八町 慶史

### 要 約

令和3年に農場で摘発された牛伝染性リンパ腫3例と、発症判定を実施した4例のホルスタイン種の病性鑑定を実施した。発症牛は解剖所見、病理組織所見において全身のリンパ節が腫瘍化する典型例であり、巨大な腫瘍の存在する位置により、眼球突出や頸静脈怒張、下痢などの多様な症状がみられた。血液検査成績では、異型リンパ球比率や異型リンパ球数は多く、牛伝染性リンパ腫ウイルスプロウイルス量も多かった。また、乳酸脱水素酵素(LDH)総活性値や分画2、3の活性値が上昇し、こちらも典型例と考えられた。3例中2例でリンパ球数の減少がみられ、全身状態の悪化した症例では判定に注意を要する。発症判定事例では、ウイルス感染陰性であった1例と、LDHが正常であった3例の発症を否定した。今後も、比較的安価で短時間に検査可能なLDHやLDHアイソザイム分画を検査法として採用し、その他臨床学的所見と総合的に発症判定を実施する。

牛伝染性リンパ腫(BL)の一つである地方病性牛伝染リンパ腫(EBL)は牛伝染性リンパ腫ウイルス(BLV)の感染によって引き起こされる牛の伝染性疾病である。BLV感染牛の60%以上は無症状であり、約30%がBリンパ球増多症(PL)牛となり、リンパ肉腫が引き起こされるものは数%と言われている<sup>1)</sup>。EBL発症か否かの判定は、診療や飼養の予後判断に用いられ、全部廃棄となるためBLのと場出荷を中止することは農場の経済的損失を防ぐことにつながる。BL発症を疑わせる所見として、BLV感染、PL、末梢血への異型リンパ球出現、体表リンパ節腫大あるいは腹腔・骨盤腔内の腫瘍形成があげられる。しかし、体内にリンパ肉腫を持ちながら血液像に変化を示さない症例の報告があり、病態の多様性から生前診断は難しいとされている。近年、血清中の乳酸脱水素酵素(LDH)はEBL発症

マーカーとして有用と報告があり<sup>2)3)4)</sup>、総活性値の上昇やLDH2及びLDH3分画の増加によるBLの生前診断を当所でも実施している。今回は令和3年に農場で摘発されたBL3例と、BL発症判定を実施した4例の病性鑑定の概要について報告する。

### 材料及び方法

材料は農場で摘発され当所に搬入後剖検をしたBL発症3例及び血液検査によるBL判定を実施した4例で、いずれもホルスタイン種。

血清LDH総活性値は、臨床化学分析装置(富士ドライケム7000V、富士フィルム(株)、神奈川)にて測定した。LDHアイソザイム分画は、血清をLDH値が800U/Lになるように生理食塩水で希釈後、電気泳動法(クイックジェル用手法用器具、J672電気泳動QGIPキット、(株)ヘレナ研究所、埼

玉)により測定した。農場抗体陽性率は、直近の家畜伝染病予防法第5条の定期検査の余剰血清を用いたBLV抗体検査による陽性率を示す。その他の検査方法は表1に示すとおり。

表1 検査項目及び方法

・血液検査	白血球数、リンパ球数測定 EDTA処理後全血を自動血球計数器(MEK-6450セルタクα、日本光電、東京)で測定
・異型リンパ球	血液塗抹標本をメイ・ギムザ染色後鏡検
・BLV抗体検査	ELISA法(牛白血病エライザキット、JNC、東京)
・BLVプロウイルス量	全血を塩化アンモニウムで溶血処理後、抽出キット(Deasy Blood&Tissue kit、藤井アゲン、東京)によりDNAを抽出し、リアルタイムPCR(Cycleave法(Cycleave PCR Reaction Mix SP及び牛白血病ウイルス検出用Probe/Primer/Positive control、タカラバイオ株式会社)@Multiplex法(牛白血病ウイルス検出キット、タカラバイオ株式会社、東京)
・病理学的検査	剖検後、各臓器を約10%中性緩衝ホルマリンにより固定後、常法に従いパラフィン包埋、薄切後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い鏡検

## 成績

発症牛の概要を表2に示す。年齢はいずれも4歳以上であった。稟告や診断書記載事項として、体表や直腸検査での腫瘍の触知、眼球突出や食欲低下、起立不能等の全身状態の悪化が認められた。また、いずれも農場抗体陽性率の高い農場で飼養され、BLV抗体は陽性であった。

表2 農場で摘発された牛伝染性リンパ腫

症例	①	②	③
品種	ホルスタイン種	ホルスタイン種	ホルスタイン種
年齢	7歳4ヵ月	4歳5ヵ月	6歳2ヵ月
稟告・診断書	・2週間前より食欲低下 ・頸静脈の膨張 ・眼球突出	・3ヵ月前より直腸検査にて子宮に腫瘍を触知、エコーにてソフトボール大腫瘍 ・4日前に起立不能	・食欲不振 ・産後検査にて腫瘍触知 ・体表に腫瘍発露 ・下痢
農場抗体陽性率(%)	73.5	81.8	53.3
BLV抗体	陽性	陽性	陽性
外貌所見	・胸蓋浮腫	・体表に腫瘍触知	・右眼球突出

症例①(図1)は外貌で消瘦、頸静脈怒張、胸水浮腫、左右眼球の突出、浅鼠径リンパ節の腫脹が認められた。剖検では、体表及び内臓のリンパ節を含む、全身のリンパ節で腫大が認められ、断面は白色から暗赤色髓様で膨隆していた。左右の腎盂に

腫瘍が確認され、左腎は周囲を腫瘍が囲み実質が圧迫されていた。心臓には白色結節の多発し、心筋の白色化がみられ、大静脈から右心室にかけて最大16cm×10cm大の腫瘍が存在した。眼球の尾側に直径10cmの腫瘍が存在した。

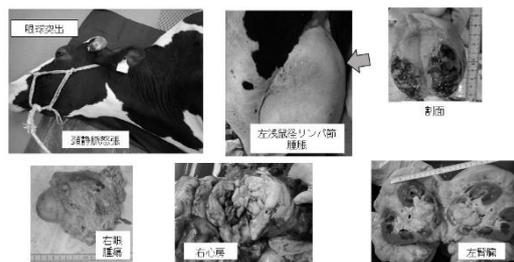


図1 症例①の剖検写真

症例②(図2)は、起立不能であった。剖検では、浅頸リンパ節や浅鼠径リンパ節をはじめとする全身リンパ節の腫大が認められた。子宮は壁の断面が乳白色で高度に厚みを増し、子宮全体が巨大であった。腎臓には1cm大の白斑が散発し、脾臓の著しい腫大が認められた。右心耳に白色結節が認められ、右心の心筋の一部が白色化していた。乳房の断面にて腫瘍による赤色斑が散発し、浅鼠径リンパ節が腫大していた。起立不能の原因は不明であった。

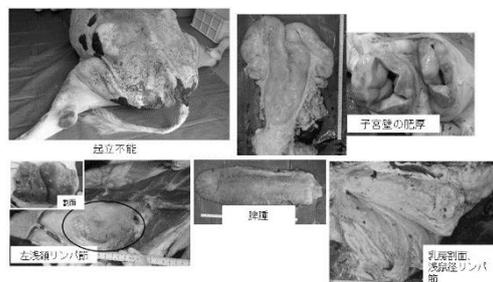


図2 症例②の剖検写真

症例③(図3)は頸部から腹部にかけての体表に直径2~6cmの腫瘍が多数確認さ

れた。また、下痢便により後肢全体が汚染していた。剖検では全身のリンパ節が腫瘍化していたが、特に腫大が顕著なリンパ節は腸骨下、浅鼠径、腰、内側・外側腸骨リンパであった。また、内側腸骨リンパ節は断面で淡黄色を呈し脆く顆粒状であった。消化管では、背側第四胃周囲リンパ節が板状に硬結腫大、空腸起始部のリンパ節の腫瘍化により腸間膜が板状に硬結腫大していた。心臓は、心耳及び心筋に白色結節が多発していた。



図3 症例③の剖検写真

病理組織学的に白色の腫瘍は、中型から大型のリンパ球様の腫瘍細胞が充満していた。腫瘍細胞の核は大小不同で、異型核を有する細胞が認められた。肉眼的に赤色の部位は赤血球の吸収が多く、黄色を呈する症例③の内側腸骨リンパ節では壊死が広範囲に認められた(図4)。

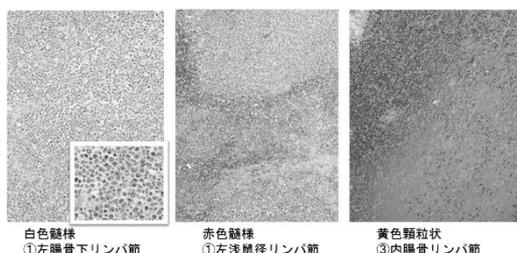


図4 腫瘍の病理組織写真

発症牛の血液検査成績は、症例①のリンパ球数はECの鍵正常であったが、症例②

③はECの鍵真症でありPLであった。異型リンパ球比率や異型リンパ球数は上昇し、BLVプロウイルス量は多かった(表3)。また、LDH総活性値、LDH2+3の活性値は文献<sup>2)3)</sup>で設定された基準値を超え、上昇していた(表4)。LDHの分画波形は、症例①③は2、3分画割合が大きくBL典型であったが、起立不能であった②はLDH5の割合が大きく、2+3の割合は正常であった(図5)。

表3 発症牛の血液検査成績

項目	単位	①	②	③
白血球数	/ $\mu$ L	10,000	24,000	17,200
リンパ球数	/ $\mu$ L	4,500	13,200	8,800
ECの鍵		正常	真症	真症
リンパ球割合	%	45.0	55.2	51.1
異型リンパ球比率	%	26	33.3	60
異型リンパ球数	/ $\mu$ L	2,600	7,992	10,320
BLVプロウイルス量	①法	44.84	84.69	
	②法			46.83

表4 発症牛のLDH検査成績

項目	単位	①	②	③	基準値 引用文献 <sup>2)3)</sup> より
LDH総活性値	U/L	2,370	5,575	2,547	1,280-1,445
LDH2+3活性値	U/L	1,413	1,271	1,446	601-744.3
LDH2+3割合	%	49.9	22.8	56.8	47.5

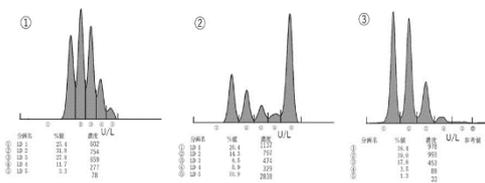


図5 発症牛のLDH分画

症例①は、発症前にも血液検査(図6)を実施しており、43~66カ月齢のリンパ球数は1万/ $\mu$ Lを超えPLを示したが、発症

後は正常であった。BLV プロウイルス量は発症前後で大きな変化はなく、LDH 総活性値は発症前の 1,000U/L 程度から発症後は上昇していることが分かった。また、症例③では解剖 4 日前のリンパ球数や BLV プロウイルス量は解剖時では 3 分の 1 以下に低下し、そのため EC の鍵真症であったリンパ球数は正常となった(図 7)。症例①や③の白血球やリンパ球の減数は、腫瘍化の進行により全身状態が悪化したためと考えられた。

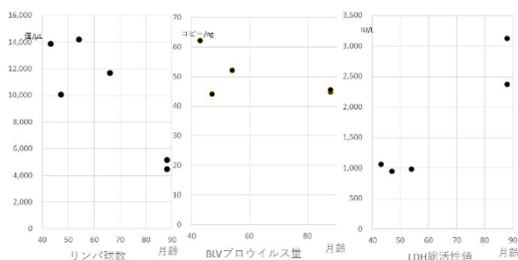


図6 症例①の血液検査成績の推移



図7 症例②の血液検査成績

次に、BL 発症判定を実施した 4 事例を表 5 で示す。症例④は若齢であり、農場飼養牛の抗体陽性率は低く、BLV 抗体陰性であり、BLV プロウイルス量が検出限界以下であった。症例⑤⑥⑦は 3 歳齢以上で、⑤は眼球の突出の稟告があり、BLV 感染は陽性で、BLV プロウイルス量は⑤⑦は高く、⑥は低かった。血液検査成績を表 6 で示す。数値の横に矢印のある項目は正常範囲よ

り上昇しており、発症を肯定する所見である。④は PL であり、異型リンパ球数や LDH 総活性値及び分画 2+3 活性値は発症を肯定したが、BLV 感染が否定されたため、BL 発症と判定しなかった。症例⑤⑥⑦はリンパ球や異型リンパ球比率に BL を肯定する所見が認められたが、LDH 総活性値及び分画 2+3 活性値は正常であったため、発症を否定した。また、症例④～⑦は LDH 分画の波形に異常が認められなかった(図 8)。判定実施後、症例⑤はと畜場へ出荷され BL の摘発はなく、症例④⑥⑦は飼養を継続中である。

表5 牛伝染リンパ腫発症判定事例

症例	単位	④	⑤	⑥	⑦
品種		ホルスタイン種	ホルスタイン種	ホルスタイン種	ホルスタイン種
年齢		1歳11カ月	7歳2カ月	3歳11カ月	4歳1カ月
稟告		・分娩後体調不良 ・頸部に腫瘍	・分娩後体調不良	・眼球の突出	・子宮の腫瘍の稟知
農場抗体陽性率(%)		5.6	29	66.7	81.8
BLV抗体		陰性	陽性	陽性	陽性
BLVプロウイルス量	①法 コピー/μL ②法 %	検出限界以下	96.3	1.57	119.73

表6 発症判定牛の血液検査成績

項目	単位	④	⑤	⑥	⑦
リンパ球数	/μL	37,300 ↑	8,400 ↑	2,200	22,000 ↑
ECの鍵		真症	真症	正常	真症
異型リンパ球比率	%	3.7	17.6 ↑	6 ↑	0
異型リンパ球数		1,796 ↑	2,077 ↑	372	0
LDH総活性値	U/L	2,011 ↑	849	1,017	1,095
LDH2+3活性値	U/L	895 ↑	309	368	455
LDH2+3割合	%	45	36.4	36	41.6

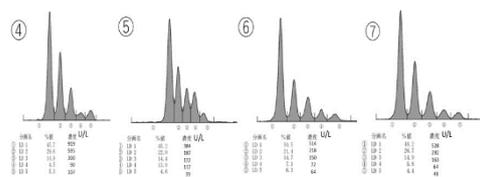


図8 発症判定牛のLDH分画

## 考 察

今回、症状、解剖所見、病理組織学的に典型的な BL 発症 3 例の病性鑑定を実施した。症例①では眼球尾側の腫瘤が眼球突出につながり、右心の腫瘤により頸静脈の怒張が引き起こされ、症例③では腸間膜リンパ節の腫瘍化により腸の動きが低下し下痢に至ったと推察された。EBL の病態は多様であり、腫瘤の形成部位に関連した臨床症状が認められる<sup>1)</sup>と言われており、今回の発症牛も巨大腫瘤の位置により多様な症状を呈していた。外貌所見で 3 例に共通して確認されたのは浅鼠径リンパ節の腫大であり、当該リンパ節を覆う皮膚は薄いため触知しやすく、農場での生前診断に役立つと考えられた。

血液検査成績では、白血球 100 分比により、末梢血中の腫瘍細胞が 5%、1,000 個/ $\mu$ L 以上のものは牛白血病発症牛とみて間違いはないと言われており、今回の発症牛はその基準をはるかに超える数値であった。ただし、ホルスタイン種における異型リンパ球比率は診断精度が低いとする報告<sup>2)</sup>がある。そのため発症判定事例の症例⑤では異型リンパ球比率、異型リンパ球数ともに上昇していたが、発症と判定しなかった。

今回の症例①③では全身状態の悪化によると考えられる、白血球やリンパ球の減数が認められたが、農場で摘発される事例は、一般に病勢が進行していると考えられるので、状態の悪化により各血液データが変動する可能性を判定の際に考慮する必要がある。

生体の諸臓器に存在する LDH は、5 種のアイソザイムを持ち、臓器特異性の高い電

気泳動パターンを呈す。三浦らは LDH 総活性値、分画 2、分画 3 の正常上限値を設定し、EBL ではその全てを超える割合が高いことから、LDH 活性とアイソザイム分画の解析が発症の診断に有用と報告している<sup>2)</sup>。佐久間らは、宮城県の検査成績からホルスタイン種での発症牛検出効果の高い検査として、LDH 総活性値測定、LDH2+3 分画和測定、LDH2+3 活性値測定をあげている<sup>3)</sup>。今回の EBL 発症牛①～③はいずれも LDH 正常上限値を超えており、LDH 正常上限値を超えていなかった症例⑤～⑦の発症を否定した。LDH 分画では、症例②は LDH5 の割合が高く、LDH2+3 の割合が相対的に小さい結果であったが、それは起立不能により LDH5 を含む骨格筋が損傷されたことによると考えられた。分画割合は、他の臓器損傷によって影響を受けるため、臨床症状や生化学の LDH 以外の項目の上昇を確認し判定に生かしていく。

BL 生前診断の一助となる生化学所見として LDH の他に、シアル酸濃度の上昇、IgM 値の減少やチミジンキナーゼ活性の上昇が挙げられる。血清チミジンキナーゼ活性は EBL 発症診断として、感度や特異度が LDH よりも高いとの報告<sup>4)</sup>がある。臨床現場では、予後判断の迅速性を求められるため、当所では今後も比較的安価で短時間に検査可能な LDH を検査法として採用し、その他臨床学的所見と総合的に発症判定を実施する。そして、これらの検査成績の蓄積により、生前診断の精度向上に努めていく。

## 引用文献

1) 芳賀猛：7. 牛白血病. 牛病学〈第 3 版〉, 明石博臣ほか編, 227-230, 近代出版, 東京

(2013)

2) 三浦沙織, 猪熊壽: 地方病性牛白血病発症マーカーとしての乳酸脱水素酵素活性の評価, 産業動物臨床医誌, 6(4):149-153(2016)

3) 佐久間晶子, 高橋幸治: 統計学的解析を用いた品種差における地方病性牛白血病診断手法の有用性の検討, 平成 30 年度宮城県家畜保健衛生業績発表会集録, 42-46(2018)

4) Konishi M, Kobayashi S, Tokunaga T, Chiba Y, Tsutsui T, Arai S, Kameyama K, Yamamoto T: Simultaneous evaluation of diagnostic marker utility for enzootic bovine leucosis, BMC Veterinary

Research, 15, 406 (2019), (online), (<http://doi.org/10.1186/s12917-019-2158-4>)