

原 著

牛白血病ウイルス感染牛における
リンパ系腫瘍の組織学的検討萩原晶代^{1)†} 齊藤守弘¹⁾ 石川義春²⁾ 門田耕一²⁾

1) 埼玉県食肉衛生検査センター (〒338-0001 さいたま市中央区上落合5-18-24)

2) 独農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所北海道支所 (〒062-0045 札幌市豊平区羊ヶ丘4)

(2013年7月9日受付・2013年11月25日受理)

要 約

59頭の牛白血病ウイルス (BLV) 感染牛においてリンパ系腫瘍を認め、病理組織学的、免疫組織化学的に調べた。56例はCD20とCD79aが陽性の多形型B細胞性リンパ腫で、細胞学的には多形性と異型性を特徴としていた。そのうちCD5の免疫染色が可能な54例では、すべての症例が陽性を示した。1例では胎子の皮下組織にも多形型のリンパ腫を認め、母牛のリンパ腫からの転移によるものと考えられた。残りの3例は前駆Bリンパ芽球性白血病、リンパ形質細胞様リンパ腫、 $\gamma\delta$ T細胞性リンパ腫と診断され、多形型リンパ腫とは細胞形態と免疫表現型が異なっていた。このような組織型は主にBLV陰性牛でみられ、ウイルスとは関係のない可能性が高い。本研究の結果より、牛のリンパ系腫瘍は組織学的、免疫組織化学的に明確な疾病単位に分類できることが示された。

—キーワード：牛白血病ウイルス，牛，地方病性白血病，免疫組織化学，散発性白血病。

日獣会誌 67, 199～203 (2014)

牛リンパ系腫瘍の大部分は組織学的にはリンパ腫であり、bovine leukosisを牛白血病と訳すと、組織学的な診断名である白血病leukemiaとの区別ができないため、本論文では牛白血症 (白血球の腫瘍) と記述した。同様に、牛白血病ウイルスはリンパ腫を引き起こすウイルスでリンパ性白血病とは無関係なので、牛白血症ウイルス (BLV) と記述した [1, 2]。

さて近年、牛白血症の摘発頭数が増加し、食肉衛生検査所において病理組織学的検査を実施する機会が多くなっている。ところが、その分類は免疫学が発展する以前に作られ、牛の年齢、腫瘍の形成部位、BLV感染の有無に基づいている [3]。したがって、牛白血症を地方病性 (成牛型) と散発性に分け、さらに後者を子牛型、胸腺型、皮膚型に分類しているにもかかわらず、各病型の細胞学的特徴は成書に記載されていない。Vernauら [4] は牛白血症を病理組織学的に分類しようと試みたが、各病型の特徴を明らかにするには至らず、人のリンパ腫分類を改変せずに適用するのは困難であった。そこで、人

の分類にとらわれることなく、細胞形態や免疫学的表現型に基づいて組織型を確立する試みが行われ、成牛型の大部分は多形型B細胞性リンパ腫であることが判明し [1, 2, 5, 6]、他の3つの病型や既存の病型には入らず分類不能とされた症例の診断や分類も可能となってきた [6, 7]。今回、食肉衛生検査センターにて収集し、成牛型とされた59症例を組織学的、免疫組織化学的に調べ、病理組織学的診断並びに分類を行ったので報告する。

材料及び方法

症例：と畜場に搬入された59頭の牛 (15カ月齢～17歳) に認められた白血症を調べた。症例1～55ではホルスタイン種が40例、黒毛和種が12例、交雑種が3例で、48例が雌で、残りは去勢であった。生体検査では10例に起立不能などの異常を認めた。肉眼的にはすべての症例でリンパ節の腫大を認め、37例では腹膜に多数の腫瘍があった。症例56～59については、表1に詳述した。

ウイルス学的検査：キット (QIAmp DNeasy Blood

† 連絡責任者：萩原晶代 (埼玉県食肉衛生検査センター)

〒338-0001 さいたま市中央区上落合5-18-24

☎048-853-7871 FAX 048-853-7872

E-mail : hagiwara.akiyo@pref.saitama.lg.jp

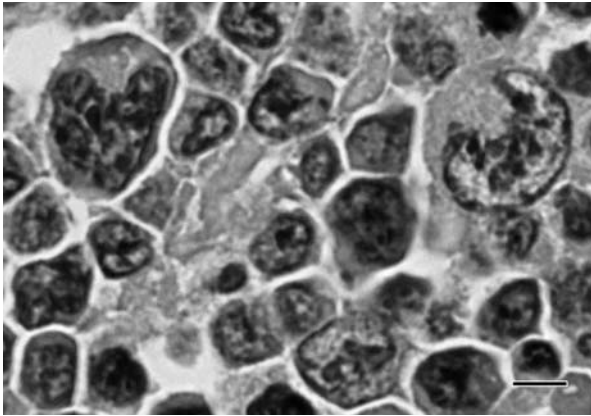


図1 症例24, 横隔膜の腫瘍
高度の異型性を示す大型腫瘍細胞が認められ, 核の輪郭が不整である (HE染色 Bar = 10 μ m)

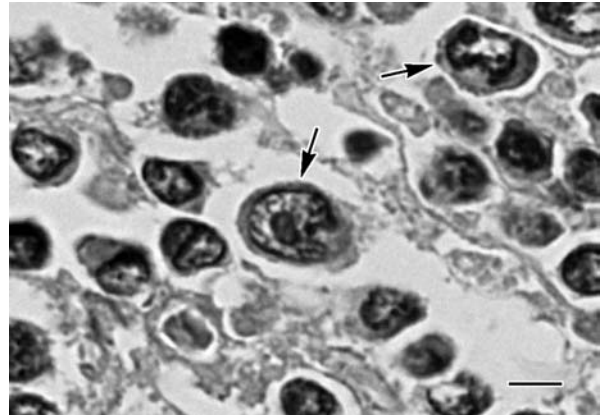


図2 症例56, 母牛の第一胃の腫瘍
中等度の異型性を示す大型腫瘍細胞 (矢印) が認められ, 核小体が目立つ (HE染色 Bar = 10 μ m)

表1 臨床所見と肉眼所見

症例 No.	品種	性別	月齢	生体所見	肉眼所見
56	H	F	124	病畜として搬入	腸間膜リンパ節の高度腫大. 腹膜に多数の腫瘍形成. 体表に多発性結節を有する胎子を認めた
57	J	C	30	著変なし	全身のリンパ節の腫大. 腸間膜リンパ節はやや腫大
58	F1	C	21	病畜として搬入	腸間膜リンパ節の高度腫大. 腹膜に多数の腫瘍形成. 肝臓と脾臓の高度腫大
59	H	F	72	病畜として搬入	腸間膜リンパ節の高度腫大. 腹膜に多数の腫瘍形成. 体表に多発性結節を有する胎子を認めた

H=ホルスタイン J=黒毛和種 F1=J×H
F=雌 C=去勢

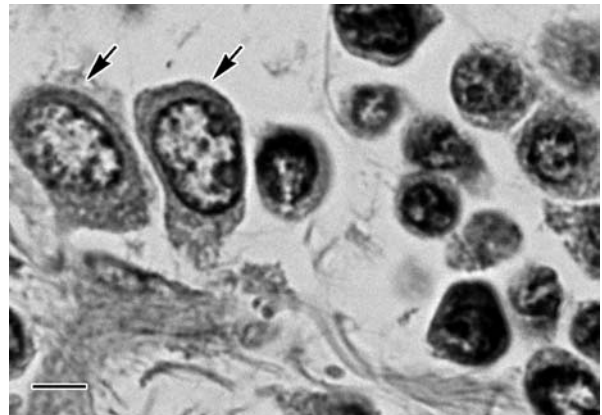


図3 症例56, 胎子の皮下組織
母牛の腫瘍 (図2) と同様に, 少数の大型腫瘍細胞 (矢印) が認められる (HE染色 Bar = 10 μ m)

& Tissue Kit, (株)キアゲン, 東京) を用いて血液からウイルスDNAを抽出し, Fechnerら [8] の報告に準じてBLV *env* 遺伝子 (*gp51*) の検出を試みた.

病理組織学的検査: 採取した組織を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した後, パラフィンに包埋した. 薄切された切片には, ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施し, 一部の切片にはギムザ染色を実施した.

免疫組織化学的検査: パラフィン切片に, ストレプトアビジン・ビオチン化ペルオキシダーゼ複合体 (SAB) 法を適用した. 二次抗体以降の操作では, キット (株)ニチレイ, 東京) を用いた. 症例56~59では, 一次抗体として, ヒトCD3 ϵ (ダコ・ジャパン(株), 東京, 希釈倍率/1:50), ヒトCD5 (Thermo Scientific, U.S.A.,

1:100), ヒトCD20 (Spring Bioscience, U.S.A., 希釈倍率), 牛ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) (ダコ・ジャパン(株), 東京, 1:20), ヒト免疫グロブリンの κ 鎖 (Bethyl, U.S.A., 1:1600), λ 鎖 (Bethyl, U.S.A., 1:1600), 牛免疫グロブリンの μ 鎖 (Bethyl, U.S.A., 1:1600), α 鎖 (Bethyl, U.S.A., 1:1600) に対する兔血清, γ 鎖 (Bethyl, 1:1600) に対する羊血清, 牛WC1 (AbD Serotec, U.K., 1:4), ヒトCD79a (ダコ・ジャパン(株), 東京, 1:25) に対するマウスモノクローナル抗体を用いた. 抗原性の賦活化のために, 一次抗体の使用前にCD5, WC1, TdT, CD79aの染色では電子レンジを用いた加熱処理を実施し, 重鎖とCD3 ϵ の染色ではペプシンを用いた蛋白分解酵素処理を行った. 症例1~55では, CD3 ϵ , CD5, CD20, CD79aのみを調べた.

成 績

ウイルス学的所見: すべての症例でBLV遺伝子が検

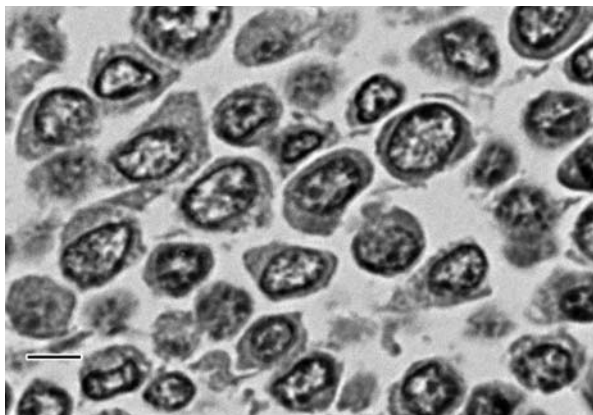


図4 症例57, 腸骨下リンパ節
大きさにばらつきがあるが, 小型核小体と繊細な核網を特徴とする腫瘍細胞が単調に増殖している (HE 染色 Bar = 10 μ m)

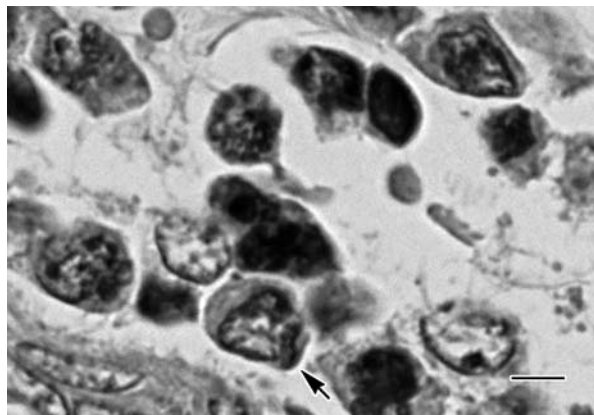


図6 症例59, 腸の腫瘍
固定不良のために核の輪郭が不規則に見えるが, 矢印で示すような類円形核を有する大型細胞がこの腫瘍の特徴である (HE 染色 Bar = 10 μ m)

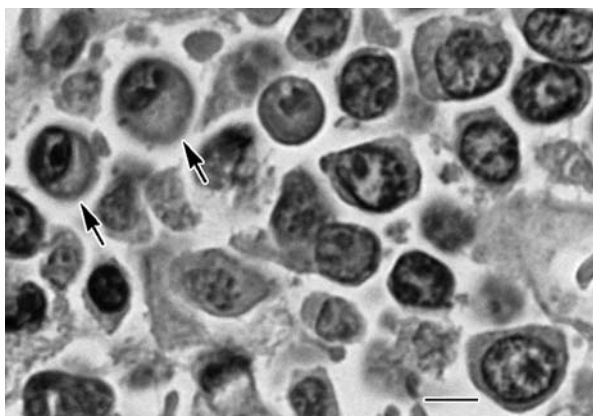


図5 症例58, 第三胃の腫瘍
リンパ球様細胞と形質細胞への分化を示す細胞 (矢印) が混在している (HE 染色 Bar = 10 μ m)

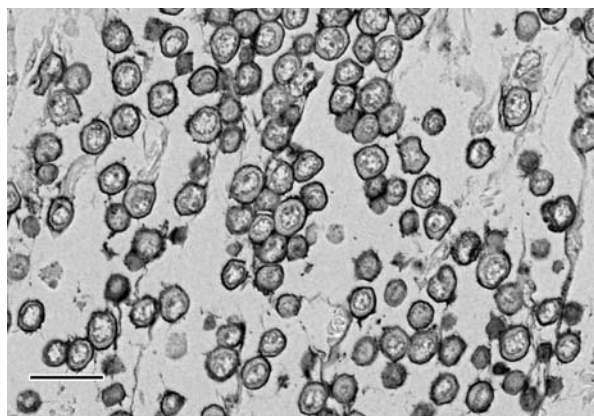


図7 症例56, 胎子の皮下組織
主に細胞膜がCD20で陽性反応を示している (免疫染色, Bar = 20 μ m)

出され, 症例56では胎子にもBLV遺伝子を認めた。

病理組織学的所見:すべての症例の肉眼的病変部において, 高度の腫瘍細胞の増殖が確認された。多形型と診断した症例1~56では, 腫瘍細胞は高度~中等度の多形性, 異型性を示していた (図1)。症例56の胎子の皮下組織では, 腫瘍細胞は中等度の多形性, 異型性を示し, 母牛の腫瘍細胞とよく似ていた (図2, 3)。症例57の肺では, 毛細血管内に多数の腫瘍細胞を認めた。グリソン鞘への腫瘍細胞の浸潤は軽度であったが, 類洞や赤脾髄にはかなりの数の腫瘍細胞がみられた。腫瘍細胞の大きさにばらつきがみられたが, 核は円形~楕円形で, クロマチン網は繊細で均等に分布し, 核小体は目立たなかった (図4)。症例58のリンパ球様細胞は大型~中型で, 核の輪郭はときどき軽度に不整であった。クロマチンの凝集は軽度で, 核小体は中型~小型であった。細胞質の広さは中等度が多く, ときに豊富な細胞質を有する形質細胞様細胞が認められたが, 核の性状はリンパ球様細胞

と似ていた (図5)。症例59の腫瘍細胞は大型で, 円形~類円形核を有していた (図6)。

免疫組織化学的所見:症例1~56では腫瘍細胞がCD20とCD79aで陽性であった (図7)。症例28, 29では正常のTリンパ球がCD5染色で染まらないため固定不良と判断したが, その他の症例ではCD5が陽性であった。症例56では胎子の腫瘍も母牛のそれと同じ染色性を示した。症例57の腫瘍細胞はCD20, CD79a, TdTが陽性で, 症例58ではCD20, CD79a, CD5が陽性で, 一部の腫瘍細胞の細胞質内には γ 鎖と λ 鎖に対する陽性像が認められた (図8)。症例59ではCD3とWC1が陽性に染まった (図9)。症例56~59の詳細な結果と組織診断名を表2に示した。

考 察

BLV陽性の成牛に腫瘍が発生した場合, 多くは成牛型白血病と診断される。しかし, BLVに起因するリン

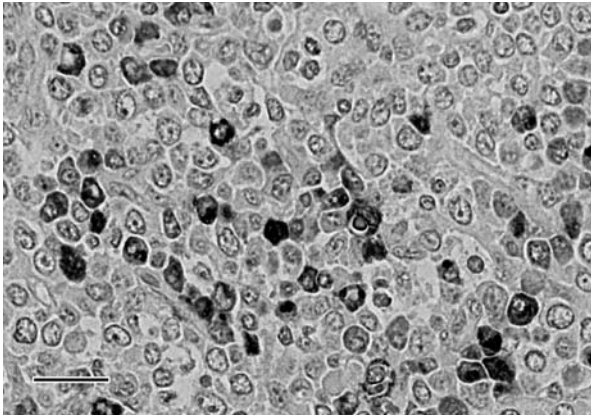


図8 症例58, 第三胃の腫瘍
腫瘍性形質細胞の細胞質はλ鎖陽性である (免疫染色 Bar = 20μm)

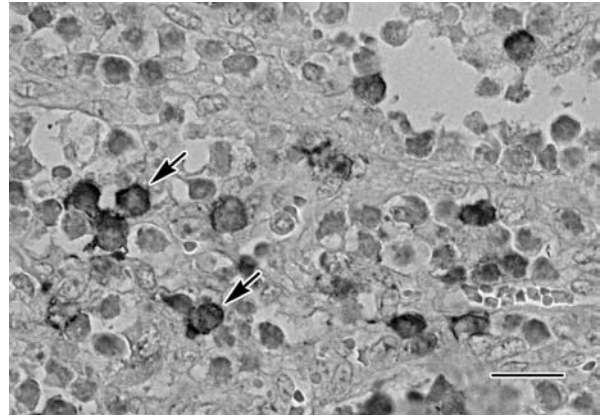


図9 症例59, 腸の腫瘍
WC1染色により細胞膜が陽性に染まっている腫瘍細胞 (矢印) が散見される (免疫染色 Bar = 10μm)

表2 免疫組織化学的所見と組織学的診断

症例No.	CD20	CD79a	λ	κ	μ	γ	α	CD5	CD3	WC1	TdT	診断
56	++	++	-	-	-	-	-	+	-	-	-	多形型B細胞性リンパ腫
57	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	前駆Bリンパ芽球性白血病
58	++	++	+	-	-	+	-	+	-	-	-	リンパ形質細胞様リンパ腫
59	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+	-	γδT細胞性リンパ腫

++ : 多くが陽性 + : 少数が陽性 - : 陰性

パ腫の発症率は低い場合、腫瘍に罹患した牛にBLVの感染を認めても、その腫瘍の原因がウイルスとは断定できない。実際、BLVとは関係のない腫瘍が陽性牛に発生しており、リンパ形質細胞様リンパ腫、前駆Tリンパ芽球性白血病、γδT細胞性リンパ腫の報告がある [2, 5, 6, 9]。したがって、成牛型の報告は多いものの、組織学的な診断が実施されていないため、BLVとは無関係な症例が含まれている可能性を排除できない。さらに、ほぼすべての牛がBLV陽性である濃厚汚染地帯においては、さまざまな腫瘍が成牛型と診断される恐れがある。白血病におけるレトロウイルスの関与を証明するためには、プロウイルスが腫瘍細胞のDNAに単クローン性に組み込まれていることをサザン法により証明すればよいが、組織学的根拠のない従来の病型とサザン法の結果を関連付けることは難しく、Jacobsら [10] の試みはうまくいかなかった。BLVと原因学的に関係のあるリンパ腫のほとんどは、多形性と異型性を特徴とする多形型B細胞性リンパ腫である [2]。高度の多形性を示す症例では、腫瘍細胞の大きさや形態が変化に富み [2]、従来の大きさのみに基づく単純な組織学的分類 [11] では対応できないが、多形型の含まれる今回の分類により診断は容易であった。さらに、免疫組織化学的にCD20, CD79a, CD5が陽性で、B-1細胞由来であることが確認された [1, 2, 6]。症例56では胎子の皮膚にも多形型リンパ腫が認められ、母牛の腫瘍細胞が胎盤を経て子牛

に移行した可能性が高い [12]。

症例57～59では腫瘍細胞の多形性や異型性は目立たず、多形型B細胞性リンパ腫とは異なった組織型であるとみなされた。症例57ではCD20, CD79a, TdTが陽性で、未熟なB細胞の腫瘍であった。肺の毛細血管内や赤脾髄に多数の腫瘍細胞を認めたため、前駆リンパ芽球性白血病と診断した [6]。症例58では一部の腫瘍細胞はCD20, CD79a, CD5だけでなく細胞質内IgG (λ) も陽性で、リンパ形質細胞様リンパ腫の特徴を有していた [2, 9]。症例59ではCD3とWC1が陽性で、γδT細胞性リンパ腫と診断できた。これらの症例と細胞学的、免疫学的に同じ特徴を有する腫瘍は、主にBLV陰性牛に認められており [6, 9, 13]、おそらくBLV陽性牛に散発性の腫瘍が起こったものと考えられる。症例59では採材はされていないが胎子の皮膚に多発性腫瘍が認められ、症例56と同様に母牛からの転移の可能性が考えられた。

今回の研究では、BLV陽性症例を4つの組織型に分類することができた。従来の成牛型や子牛型などの病名は複数の疾患単位を含む疾患群名に過ぎず、臨床段階の診断名としては妥当であっても、組織学的所見に基づく診断名ではないため、今後その分類の再整理が必要と考えられる。

引用文献

- [1] Murayama S, Sato K, Ikehata T, Wada Y, Ishikawa Y, Kadota K : Cytologic and immunophenotypic investigation of lymphohematopoietic neoplasms in cattle, *Jpn Agric Res Quart*, 45, 225-231 (2011)
- [2] Iwama Y, Inomata T, Ishikawa Y, Kadota K : Cytology of B cell lymphomas in cattle infected with bovine leukosis virus, *Jpn Agric Res Quart*, 47, 103-107 (2013)
- [3] Theilen GH, Madewell BR : Bovine, *Veterinary Cancer Medicine*, Theilen GH, Madewell BR, eds, 2nd ed, 408-430, Lea & Febiger, Philadelphia (1987)
- [4] Vernau W, Valli VE, Dukes TW, Jacobs RM, Shoukri M, Heeney JL : Classification of 1,198 cases of bovine lymphoma using the National Cancer Institute Working Formulation for human non-Hodgkin's lymphomas, *Vet Pathol*, 29, 183-195 (1992)
- [5] Abe Y, Shoji H, Ota K, Takahashi M, Katsuragi K, Takeda Y, Nakamura K, Ishikawa Y, Kadota K : Immunohistochemical study of lymphomas of abdominal cavity origin in two cows with bovine leukemia virus, *Jpn Agric Res Quart*, 41, 153-156 (2007)
- [6] Kagawa Y, Tomita K, Nakatani H, Sato K, Wada Y, Ishikawa Y, Kadota K : Immunohistochemical characterization of five types of lymphoid neoplasms in calves, *Jpn Agric Res Quart*, 43, 239-245 (2009)
- [7] Ito M, Kubo M, Takayama H, Ishikawa Y, Kadota K : Cytologic variants of $\gamma\delta$ T cell lymphoma in cattle, *J Vet Med Sci*, 73, 399-402 (2011)
- [8] Fechner H, Blankenstein P, Looman AC, Elwert J, Geue L, Albrecht C, Kurg A, Beier D, Marquardt O, Ebner D : Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle, *Virology*, 237, 261-269 (1997)
- [9] Honda H, Ishikawa Y, Kadota K : Lymphoplasmacytoid lymphoma in a cow, *J Vet Med Sci*, 71, 673-676 (2009)
- [10] Jacobs RM, Song Z, Poon H, Heeney JL, Taylor JA, Jefferson B, Vernau W, Valli VE : Proviral detection and serology in bovine leukemia virus-exposed normal cattle and cattle with lymphoma, *Can J Vet Res*, 56, 339-348 (1992)
- [11] Yin SA, Makara M, Pan Y, Ishiguro H, Ikeda M, Numakunai S, Goryo M, Okada K : Relation between phenotype of tumor cells and clinicopathology in bovine leukosis, *J Vet Med Sci*, 65, 599-606 (2003)
- [12] Ohshima K, Takahashi K, Okada K, Numakunai S, Kagawa Y, Minamino K : A pathologic study on fetuses and placentas from cows affected with enzootic bovine leukosis with reference to transplacental infection of bovine leukemia virus, *Jpn J Vet Sci*, 44, 479-488 (1982)
- [13] Tanaka H, Takai H, Sato K, Ishikawa Y, Shibahara T, Kadota K : Nodal, uterine and meningeal $\gamma\delta$ T-cell lymphomas in cattle, *J Vet Med A*, 50, 447-451 (2003)

A Histological Study of Lymphoid Neoplasms in Cattle Infected with Bovine Leukosis Virus

Akiyo HAGIWARA^{1)†}, Morihiro SAITO¹⁾, Yoshiharu ISHIKAWA²⁾ and Koichi KADOTA²⁾

1) *Saitama Prefecture Meat Inspection Center, 5-18-24 Kamiochiai, Chuo-ku, Saitama, 338-0001, Japan*

2) *Hokkaido Research Station, National Institute of Animal Health, 4 Hitsujigaoka, Toyohira, Sapporo, 062-0045, Japan*

SUMMARY

Lymphoid neoplasms, which were found in 59 cattle infected with bovine leukosis virus (BLV), were examined through histology and immunohistochemistry. Fifty-six cases were found to have CD20- and CD79a-positive pleomorphic B-cell lymphoma, characterized by cytological pleomorphism and atypia. Tissue sections suitable for CD5 immunostaining were obtained from 54 cases, all of which were found to be positive for this marker. In one case of a pregnant cow, the fetus had pleomorphic lymphoma lesions in the subcutis. This was interpreted as resulting from a metastasis of the maternal lymphoma. The remaining three cases, which were diagnosed as precursor B-lymphoblastic leukemia, lymphoplasmacytoid lymphoma and $\gamma\delta$ T-cell lymphoma, were distinct from the pleomorphic lymphoma in cytology and immunophenotype. Because such histological types are chiefly observed in BLV-negative cattle, these cases were presumably not associated with BLV. The present study indicates that bovine lymphoid neoplasms are classifiable into histologically and immunohistochemically discrete disease entities.

— Key words : bovine leukosis virus, cattle, enzootic leukosis, immunohistochemistry, sporadic leukosis.

† Correspondence to : Akiyo HAGIWARA (*Saitama Prefecture Meat Inspection Center*)

5-18-24 Kamiochiai, Chuo-ku, Saitama, 338-0001, Japan

TEL 048-853-7871 FAX 048-853-7872 E-mail : hagiwara.akiyo@pref.saitama.lg.jp

— *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 67, 199 ~ 203 (2014)