

牛白血病診断事例の発生状況と免疫組織化学的染色による考察

家畜衛生試験場

○荒木美穂

牛白血病の発生は年々増加し、深刻な問題となっている。今回、病理組織検査にて確定診断した事例について、発生状況と診断方法についてまとめた。

【材料および方法(1)】

平成21年1月から平成26年7月までに病理組織検査を実施した85例について発生状況を調査した。まず、臨床症状、血液検査、抗体検査、病理組織検査等病性鑑定成績により牛白血病ウイルス(BLV)が関与する地方病性牛白血病(EBL)と、BLVが関与しない散発性牛白血病(SBL)、その他に分類し、発症年齢、血液性状、本病を疑う根拠となった事項等について調査した。

ここでEBLとSBLの分類について述べる。牛白血病は地方病性牛白血病EBLと散発性牛白血病SBLに分類される(表1)。EBLは牛白血病ウイルスBLVの感染によって起こるリンパ系組織の腫瘍で、一般に3歳以上の成牛で発症し成牛型とも呼ばれる。B-1細胞が腫瘍性に増殖し、さまざまな臨床症状を引き起こす。散発性牛白血病SBLは、原因不明のリンパ組織の腫瘍で、2歳以下の子牛に発生するB細胞またはT細胞由来のリンパ腫である子牛型、胸腺由来のT細胞による胸腺と全身性のリンパ腫である胸腺型、体表およびリンパ節にT細胞性リンパ腫が形成される皮膚型に分類される。また、これら3型に分類されないSBL症例が存在する。

表1 EBLとSBLの分類

EBLとSBLについて	
地方病性牛白血病 EBL	牛白血病ウイルス(BLV)によって起こるリンパ系組織の腫瘍 一般に3歳以上の成牛で発症 成牛型とも呼ばれる B細胞(CD5陽性:B-1細胞)が腫瘍性に増殖 BLV感染コントロールで防除可能
散発性牛白血病 SBL	原因不明のリンパ系組織の腫瘍 子牛型 : 2歳以下(主に6か月以下)、全身性リンパ腫 胸腺型 : 6~25か月、胸腺および全身性 T細胞性リンパ腫 皮膚型 : 2~4歳で好発、体表およびリンパ節のT細胞性リンパ腫 防除不可能

【結果(1)】

病性鑑定事例85例中81例、95%がEBLと診断された。SBLは3例で4%、その他は1例であった(図1)。

発症年齢は、EBL発症牛で0~2歳の若齢が16%、EBLの好発年齢とされる4~8歳が59%と半数以上を占めた。EBL以外の発症は、3歳、4歳、5歳、7歳の各1頭ずつであった(図2)。

白血球数は1200/μlから40万/μlを超える個体までばらつきがあったが、多くは5万/μl以下であった。発症年齢、EBL/SBL別、病変形成部位などとの関連はなかった。

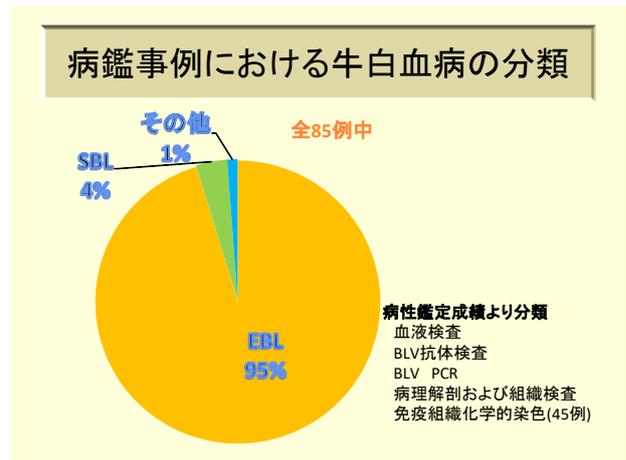


図1 病鑑事例における牛白血病の分類

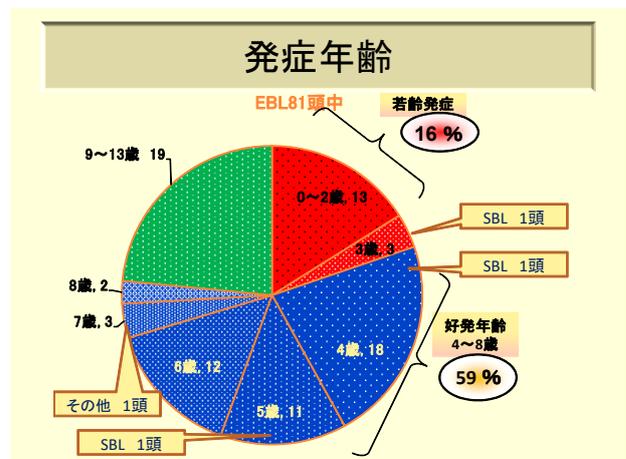


図2 発症年齢

本病を疑う根拠となった事項については、表 2 の通り、臨床検査、血液検査、体内病変、病理検査の 4 つに分類した。結果は全 85 例について、臨床症状が 39 %、血液検査が 5 %で、生前に本病を強く疑えた症例はあわせて 44 %、体内病変が 47 %、病理検査が 9 %であわせて 56 %であり、死後初めて本病を疑った症例が過半数を占めた(図 4)。

表 2 牛白血病を根拠となった事項(分類)

牛白血病を疑う根拠となった事項	
① 臨床検査	体表リンパ節腫脹 眼球突出 直検で腫瘤 など
② 血液検査	BLV抗体検査陽性で 白血球数著増 または リンパ球比著増 (10万/ μ l \leq)
③ 体内病変	解剖で体内に腫瘤多発 胃・子宮の白色硬結、脾腫 など
④ 病理検査	解剖で著変なく、病理組織検査でリンパ腫



牛白血病を疑う根拠となった事項[結果]

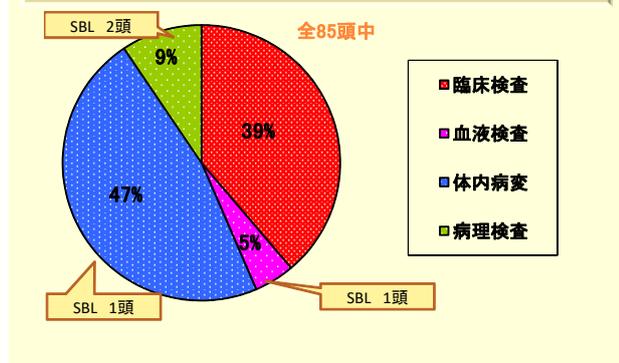


図 4 牛白血病を疑う根拠となった事項(結果)

臨床症状については表 3 に示した。症状はさまざま多岐にわたり、起立不能を示す個体が多かった。

表 3 臨床症状

臨床症状	(重複項目あり) (頭)
起立不能、ナックルなど	28
直検で腫瘤	17
体表リンパ節腫大	15
眼球突出	14
便の異常(硬結、黒色便)	8
一般症状のみ	9
嘔吐	5
他に胃症状 腹囲膨満、ガス貯留、嚥下障害など	6
急死	5
貧血	2
死産・流産・繁殖障害	3

その他に、黄疸、背弯姿勢、排尿困難、不整脈、頸部伸長、各1頭

【材料および方法(2)】

平成 22 年 1 月から平成 26 年 7 月までに病理組織検査を実施した 45 例について、リンパ球系マーカーを用いた免疫組織化学的染色(IHC)を実施した。マーカーは CD3、CD79 α 、CD5、CD20、TdT を用い、抗原賦活化条件等は表の通りで、ポリマー法により実施した。

表 4 材料および方法(2)(IHC)

材料および方法(2)	
平成22年～平成26年 当場で病理組織検査を実施した45例	
リンパ球系マーカーを用いた免疫組織化学的染色(IHC)	
一次抗体:	
	抗ヒトCD3マウスモノクローナル抗体(CD3)(Dako)
	抗ヒトCD79 α マウスモノクローナル抗体(CD79 α)(Dako)
	抗ヒトCD5ウサギポリクローナル抗体(CD5)(SBS)
	抗ヒトCD20ウサギポリクローナル抗体(CD20)(ABR)
	抗TdTウサギポリクローナル抗体(TdT)(Dako)
ポリマー法(ニチレイ)	
抗原賦活化条件、希釈倍率、反応時間	
CD3、CD79 α	: 熱処理(pH9.0)、50倍希釈、4 $^{\circ}$ C一晚
CD5	: 熱処理(pH9.0)、100倍希釈、4 $^{\circ}$ C一晚
CD20	: 未処理、300倍希釈、4 $^{\circ}$ C一晚
TdT	: 熱処理(pH9.0)、20倍希釈、4 $^{\circ}$ C一晚

ここでリンパ球マーカーについて述べる。B 細胞には B-1 細胞と B-2 細胞があり、正常個体では B-2 細胞が大多数を占める。それぞれの B 細胞は CD5 の有無で B-1 と B-2 に区別する。EBL では CD5 陽性の B-1 細胞が腫瘍性に増殖する。一方 T 細胞では、B 細胞にある CD79 α 、CD20 はなく、CD3、CD5 を持ち、これにより B 細胞と T 細胞を区別する。またリンパ腫では、成熟リンパ球だけでなく未熟なリンパ球が増

殖していることもあり、その場合は TdT を持つ。これらのマーカーの有無で、それぞれの細胞を区別する。

【結果(2)】

実施 45 頭中 37 頭で CD79 α 陽性、CD3 陰性、1 頭で CD20 陽性、CD3 陰性となり、B 細胞性と判断し EBL と診断した。また 2 頭で CD3 陽性、CD5 陽性、CD79 α 陰性となり、うち 1 頭を T 細胞性の SBL、1 頭を組織所見、その他のマーカー検索から組織球肉腫疑いとした。さらに 5 頭でこれら 4 つのマーカーがいずれも染まらず、病理組織所見とその他の病性鑑定成績により 4 頭を EBL、1 頭を SBL と診断した。

表 5 に IHC を実施した 45 例の中から 7 例を示す。症例 1 は、病変形成部位等から典型的 EBL と思われたが CD79 α が陰性、一方 CD20 陽性となり B 細胞性と判断し EBL と診断した。症例 2 は 5 ヶ月齢の若齢牛で BLV に感染しており、CD79 α、CD20、さらに CD5 陽性で B-1 細胞と判断し EBL と診断した。症例 3 は BLV に感染し発症年齢も好発年齢の 5 歳であったが、CD79 α 陰性、CD5 陽性、CD3 陽性となり T 細胞と判断し、BLV 感染牛の T 細胞性 SBL と診断した。症例 4 は BLV 感染牛であったが、CD5 陽性、CD3 陽性、その他実施した CD68 陽性、組織所見等から組織球肉腫疑いとした。症例 5、6 は IHC の結果いずれも陰性であったが、病変形成部位などから EBL と診断した。症例 7 は BLV 非感染個体で、IHC の結果いずれも陰性で、由来不明の SBL と診断した。

れ、胎内または生後早い時期での感染の増加が懸念された。本病を疑う根拠となった事項では、過半数が解剖実施後の体内病変と病理組織検査であり、臨床現場での予後判定の難しさが示唆された。これまで発生状況、BLV 抗体検査などから EBL と診断されていた事例が、IHC により SBL であることが正確に診断された事例があり、正確な診断には IHC が必要であった。

現在、沖縄県では早期母子感染のコントロールによる EBL 若齢発症牛の防除対策を重点的に実施している。特に若齢発症牛の診断では、B-1 細胞の増殖を証明する必要がある、IHC は必要不可欠な検査ツールであると考ええる。

【謝辞】

最後に、各種免疫組織化学的染色についてご指導・ご助言いただいた動物衛生研究所北海道支所の門田先生に深謝する。

表 5 IHC 検査成績

IHC検査成績										
症例	年齢	リンパ球数*	BLV抗体他	CD79a	CD20	CD5	CD3	TdT	判定	
1	12歳	1,444	256 ≤	-	+	NT	-	-	EBL	
2	5ヵ月	26,790	4096 ≤	+	+	+	-	-	EBL	
3	5歳	1,696	256 ≤	-	NT	+	+	-	SBL	
4	7歳	2,332	PCR+	-	NT	+	+	-	他**	
5	12歳	NT	1024	-	NT	-	-	NT	EBL	
6	4歳	6,228	256 ≤	-	NT	-	-	NT	EBL	
7	4歳	1,200	<2	-	NT	-	-	-	SBL	

* 個/μL
** その他のマーカーで陽性、組織球肉腫(疑い)

【まとめと考察】

今回の調査の結果、病性鑑定を実施した症例の大部分 95 % が EBL であった。また発症まで長期間を要すると考えられる EBL の若齢での発症が多数確認さ