

血清チミジンキナーゼ活性の測定により早期摘発した 地方病性牛白血病罹患牛の1例

坂本礼央¹⁾ 大林 哲²⁾ 古林与志安¹⁾ 松本高太郎¹⁾
石井三都夫¹⁾ 猪熊 壽^{1)†}

1) 帯広畜産大学畜産学部 (〒080-8555 帯広市稲田町西2線11)

2) 十勝農業共済組合 (〒089-1182 帯広市川西町基線59-28)

(2009年9月17日受付・2009年11月24日受理)

要 約

チミジンキナーゼはDNA合成に関わる酵素の一つであり、近年牛白血病の発症マーカーとして利用できることが報告されている。今回、牛白血病ウイルス汚染農場において、本酵素の活性を測定することにより、牛白血病罹患牛の早期摘発を試みた。その結果、臨床症状は示さなかったものの、地方病性牛白血病に罹患していた10歳9カ月齢のホルスタイン種雌牛を摘発できた。牛白血病ウイルス汚染牛群における本酵素活性の測定が、地方病性牛白血病罹患牛の早期摘発に臨床上有用であることが本研究により示唆された。

——キーワード：地方病性牛白血病，早期摘発，血清チミジンキナーゼ活性。

日獣会誌 63, 191～193 (2010)

牛白血病は牛白血病ウイルス (BLV) あるいは不特定の原因によりリンパ球が腫瘍化する病態である。典型的な所見として、体表リンパ節の腫脹および末梢血リンパ球数の異常増加がある [1]。これらの所見が顕著ではない罹患牛については診断が困難であり、病理解剖において初めて病変が検出されることもある [2]。人医領域および獣医小動物領域では、リンパ腫や骨髄性白血病などのリンパ造血系腫瘍の早期診断に有用な腫瘍マーカーとして、細胞分裂時のDNA合成に関与する細胞内酵素の一つである血清チミジンキナーゼ (STK) がある [3-5]。牛においても、STK活性の測定が牛白血病的診断として有用であることが示唆されている [6]。今回STK活性を測定し、BLV汚染農場における地方病性牛白血病罹患牛を早期摘発したので報告する。

症 例

症例は北海道十勝管内の農場で飼育されていた10歳9カ月齢のホルスタイン種雌牛である。平成19年11月に同居牛に地方病性牛白血病が発生したので、12月に6カ月齢以上の飼育牛133頭を対象に、血液検査および牛白血病診断用抗原 (社北里研究所，埼玉) を用いた寒天ゲル内沈降反応によるBLV抗体検査を行った (第1病日とする)。採血時に体表リンパ節の腫脹などの明らかな

異常を示す牛は認められなかったが、133頭中23頭にリンパ球増多症とBLV抗体が認められた。次いで、これら23頭のSTK活性値をradio-enzymatic assay法により測定したところ [6]、本症例のSTK活性値は18.0U/lであり、報告されているカットオフ値 (5.4U/l) [6] よりも高値を示した。平成20年1月 (第29病日)、本症例を改めて診察したところ、一般状態に異常は認められなかったものの、乳房上リンパ節および内腸骨リンパ節の腫大が認められたため、牛白血病的発症を疑い、病性鑑定のため第38病日に帯広畜産大学に搬入された。

表1 血液および血液生化学所見 (第38病日)

RBC	$5.68 \times 10^6 / \mu\text{l}$	γ GTP	37 U/l
Hb	10.0 g/ μl	CPK	373 U/l
PCV	29.0 %	Ca	8.1 mg/dl
Platelet	$310 \times 10^3 / \mu\text{l}$	P	3.8 mg/dl
WBC	20,800 / μl	Mg	2.1 mg/dl
Sta	208 / μl	TP	7.7 g/dl
Seg	8,112 / μl	LDH	4,700 U/l
Lym	11,440 / μl	LDH 1	888 U/l
Mon	1,040 / μl	LDH 2	1,598 U/l
Eos	0 / μl	LDH 3	1,490 U/l
BUN	9.8 mg/dl	LDH 4	564 U/l
AST	127 U/l	LDH 5	160 U/l
ALP	119 U/l		

† 連絡責任者：猪熊 壽 (帯広畜産大学畜産学部)

〒080-8555 帯広市稲田町西2線11 ☎・FAX 0155-49-5370 E-mail: inokuma@obihiro.ac.jp

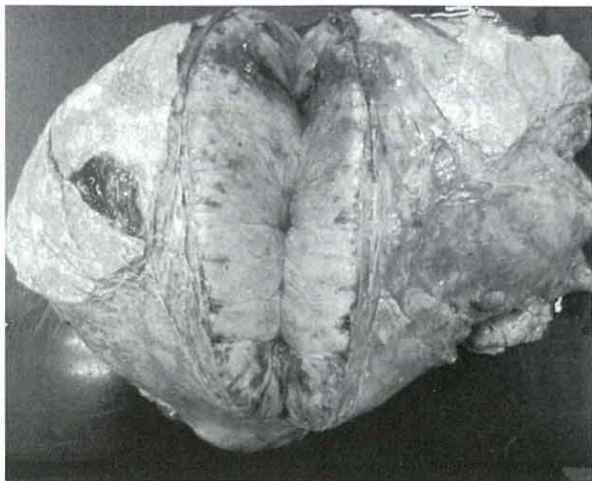


図1 20×20×30cmに腫大した右乳房上リンパ節

搬入時は体温38.7℃、心拍数80回/分、呼吸数20回/分であり、乳房上リンパ節および内腸骨リンパ節の著明な腫大が認められた。血液検査では好中球数とリンパ球数の増加の他、正球性正色素性貧血が認められた(表1)。血液塗抹標本では、23%のリンパ球が異型性を有していた。血液生化学検査では、LDHの顕著な増加とCPKの軽度上昇が認められた(表1)。LDHアイソザイム絶対値では、全アイソザイムが高値を示していた(表1)。STK活性値を再度測定したところ、41.0U/lと第1病日よりも高値を示していた。さらに、乳房上リンパ節の針生検の結果、リンパ球の核分裂像が散見された。

病 理 所 見

第44病日にキシラジン(スキルペン2%注射液、(株)インターベット、茨城)とチアミラルナトリウム(イソゾール、日医工(株)、富山)を用いた深麻酔下で、飽和塩化カリウム溶液の急速静脈内投与により安楽殺した。病理解剖では、乳房上リンパ節(右:20×20×30cm、左:8×8×15cm)、内腸骨リンパ節(右:40×30×10cm、左:5×5×10cm)、および右腸骨下リンパ節(5×5×1cm)の腫大が認められた。乳房上リンパ節の断面は高度に膨隆し、大部分が暗赤色出血部や桃褐色の壊死部からなり、一部に乳白色～淡黄色の髄様組織を認めた(図1)。右第8肋骨表面に直径4cmの腫瘤があり、心臓表面には10×5×1cmと3×3×1cmの腫瘤を認め、これら腫瘤の断面は白色髄様であった。右心房心筋内において、一部が外表面に隆起する直径2cmの境界明瞭な白色腫瘤を認めた。組織検索では、これらリンパ節および腫瘤において、種々の量の好酸性細胞質を有する大小不同のリンパ様細胞がびまん性に増殖していた(図2)。腫瘍細胞の核は、クロマチンが増量し、類円形から不整形で陥凹を持つものや明瞭な核仁を有するものが比較的多く、核分裂像も散見された。

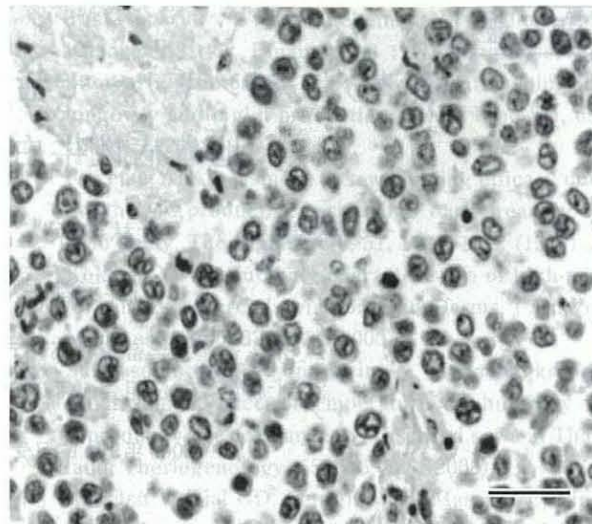


図2 右乳房上リンパ節における病理組織学的所見(HE染色, Bar = 30μm)。種々の量の好酸性細胞質を有する大小不同のリンパ様細胞がびまん性に増殖している。腫瘍細胞の核はクロマチン含量に富み、類円形で陥凹を持つものや明瞭な核仁を有するものが比較的多く、核分裂像も散見される。

パラフィン切片を利用した免疫染色(ENVISION+ポリマー法、ダコ・ジャパン(株)、東京)により、腫瘍細胞はT細胞マーカーであるCD3ウサギポリクローナル抗体(ダコ・ジャパン(株)、東京)に染まらず、B細胞マーカーであるBLA-36マウスモノクローナル抗体(Bio-genesis, U.S.A.)で染まった。

考 察

本症例は終始一般状態の異常を示さず、第1病日においては健常牛と考えられていた。しかし、BLV抗体陽性でリンパ球数が増加し、さらにSTK活性の高値が認められたことから、地方病性牛白血病に罹患していたことが示唆された。今回の研究により、STK活性の測定は、地方病性牛白血病発症牛の早期摘発のためのスクリーニング検査法として、臨床的に有用であることが示唆された。

第1病日の採血時に異常所見が得られた可能性がある。しかし、STK活性は悪性リンパ腫の腫瘍量や細胞増殖率を反映するので[7]、牛白血病の初期のステージである第1病日においてはまだ活性値が比較的低く、体表リンパ節への腫瘍細胞の浸潤の程度も軽く、リンパ節の腫大などの所見が得られなかったと考えられた。

針生検によるリンパ節の細胞診は特異度および陽性的中率が高く、体表リンパ節の腫大が認められる牛白血病症例では有用な確定診断法の一つである。しかし、その感度は38%から67%であり[8]、体表リンパ節の腫瘍を伴わない症例では適用が困難である[2]。牛白血病の補助的診断法としては、総LDHとLDHアイソザイムの

測定があげられる。地方病性牛白血病では総LDHやLDH2およびLDH3が高値を示すとの報告があるが[9], LDHは他の疾患でも高値を示すため, 地方病性牛白血病に特異的なものではなく[10], 判定が困難なことが多い。本症例においても, すべてのLDHアイソザイムが高値を示していた(表1)。BLV感染牛のうち地方病性牛白血病的発症に至るものは0.1%から10%であるが[11], BLV抗体検査は地方病性牛白血病的診断法の一つとして広く用いられている[5]。さらに近年, 牛白血病発症牛の95%の症例がカットオフ値(5.4U/l)よりも高いSTK活性を示すことが報告されている[6]。したがって, 従来から用いられている診断法に, STK活性の測定を加えることにより, さらに精度の高い診断が地方病性牛白血病的発症初期に行えると考えられた。

今後は, STK活性の測定方法やスクリーニング検査法としての臨床的有用性をさらに検証することにより, 牛白血病罹患牛をより早期に摘発し得ることを確証し, BLVの清浄化へ向けた取り組みに応用する必要がある。

本症例報告の一部は帯広畜産大学と十勝農業共済組合の共同研究として実施された。また本症例報告の一部は(社)畜産技術協会委託研究開発事業の援助を受けている。症例の臨床・病理学的検索に協力いただいた帯広畜産大学松井高峯, 舟戸慎吾, 田川道人の各氏に深謝する。

引用文献

- [1] Reed VI: Enzootic bovine leukosis, *Can Vet J*, 22, 95-102 (1981)
- [2] 田川道人, 下田 嵩, 富樫義彦, 渡辺由紀, 古林与志安, 古岡秀文, 石井三都夫, 猪熊 壽: 非典型的牛白血病的ホルスタイン種乳牛3症例, *日獣会誌*, 61, 5 (2008)
- [3] Gronowicz JS, Hagberg H, Kallander CF, Simonsson B: The use of serum deoxythymidine kinase as a prognostic marker, and in the monitoring of patients with non-Hodgkin's lymphoma, *Br J Cancer*, 47, 487-495 (1983)
- [4] Nakamura N, Momoi Y, Watari T, Yoshino T, Tsujimoto H, Hasegawa A: Plasma thymidine kinase activity in dogs with lymphoma and leukemia, *J Vet Med Sci*, 59, 957-960 (1997)
- [5] Yasutomi Y, Takahashi K, Kurosawa T, Sonoda M, Onuma M: Early diagnosis of enzootic bovine leukosis, *Jpn J Vet Sci*, 49, 957-963 (1987)
- [6] Sakamoto L, Ohbayashi T, Matsumoto K, Kobayashi Y, Inokuma H: Serum thymidine kinase activity as a useful marker for bovine leukosis, *J Vet Diagn Invest*, 21, 871-874 (2009)
- [7] Rehn S, Gronowicz JS, Kallander C, Sundstrom C, Glimelius B: Deoxythymidine kinase in the tumour cells and serum of patients with non-Hodgkin lymphomas, *Br J Cancer*, 71, 1099-1105 (1995)
- [8] Washburn KE, Streeter RN, Lehenbauer TW, Snider TA, Rezabek GB, Ritchey JW, Meinkoth JH, Allison RW, Rizzi TE, Boileau MJ: Comparison of core needle biopsy and fine-needle aspiration of enlarged peripheral lymph nodes for antemortem diagnosis of enzootic bovine lymphosarcoma in cattle, *J Am Vet Med Assoc*, 230, 228-232 (2007)
- [9] Ishihara K, Ohtani T, Kitagawa H, Onuma M: Clinical studies on bovine leukemia in Japanese black cattle. III. Serum lactate dehydrogenase activity and its isoenzyme pattern in groups of leukemic cattle and those negative or positive for antibody against bovine leukemia virus, *Jpn J Vet Sci*, 42, 289-295 (1980)
- [10] Keller P: Lactate dehydrogenase isoenzymes in normal bovine serum and during experimental liver and muscle damage, *Res Vet Sci*, 17, 49-58 (1974)
- [11] Schwartz I, Levy D: Pathobiology of bovine leukemia virus, *Vet Res*, 25, 521-536 (1994)

Early Detection of Enzootic Bovine Leukosis through Measurement of Serum Thymidine Kinase Activity

Leo SAKAMOTO*, Tetsu OHBAYASHI, Yoshiyasu KOBAYASHI, Kotaro MATSUMOTO, Mitsuo ISHII and Hisashi INOKUMA†

* Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada, Obihiro, 080-8555, Japan

SUMMARY

Thymidine kinase is an enzyme related to DNA synthesis. Recently, serum thymidine kinase (STK) activity has been reported as a useful marker of bovine leukosis. In an effort to achieve earlier detection of enzootic bovine leukosis (EBL), we measured STK activity in cows at a farm tainted by bovine leukemia virus (BLV). We found that a Holstein cow aged 10 years and 9 months without any clinical symptoms showed higher STK activity, and the cow was diagnosed as having EBL. Evaluation of STK activity in a herd contaminated with BLV is clinically useful for early detection of EBL.

— Key words: early case detection, enzootic bovine leukosis, serum thymidine kinase activity.

† Correspondence to: Hisashi INOKUMA (Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

Inada, Obihiro, 080-8555, Japan TEL · FAX 0155-49-5370 E-mail: inokuma@obihiro.ac.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 63, 191~193 (2010)