

短 報

牛における $\gamma\delta$ T細胞性リンパ腫2例の病理学的特徴

梅島典子^{1)†} 東海林 彰¹⁾ 木村政明¹⁾ 新堂美穂¹⁾
石川義春²⁾ 門田耕一²⁾

1) 十和田食肉衛生検査所 (〒034-0001 十和田市三本木野崎1-13)
2) 国研農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門北海道研究拠点
(〒062-0045 札幌市豊平区羊ヶ丘4)

(2018年7月16日受付・2019年1月8日受理)

要 約

2例のホルスタイン種雌牛にみられたリンパ腫につき、病理組織学的及び免疫組織化学的特徴について調べた。2例ともCD3、CD5及びWC1に陽性で、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) に陰性を示したことから、末梢の $\gamma\delta$ T細胞に由来する腫瘍と考えられた。症例1では、腫瘍細胞の核は円形ないし類円形で、大部分の細胞が細胞質内に好酸性顆粒を有し、 $\gamma\delta$ T細胞性リンパ腫、過剰顆粒型と診断された。一方、症例2では、腫瘍細胞は種々の大きさと高度の核形不整を呈し、従来の $\gamma\delta$ T細胞性リンパ腫とは細胞形態学的に異なっており、多形型 $\gamma\delta$ T細胞性リンパ腫と診断された。この腫瘍と多形型B細胞性リンパ腫を細胞形態のみで区別するのは比較的難しい場合があり、多形性を示す牛のリンパ腫の診断には免疫組織学的な鑑別が必要である。

——キーワード：牛白血病、 $\gamma\delta$ T細胞性リンパ腫、多形性、WC1。

-----日獣会誌 72, 361~365 (2019)

牛のB細胞性腫瘍の多くは、牛白血病ウイルス (BLV) と関連する地方病性 (成牛型) 白血病で、大部分の症例は多形性と異型性を細胞学的特徴とし、組織学的には多形型B細胞性リンパ腫と診断される [1]。一方、牛の年齢と腫瘍の形成部位に基づく従来の牛白血病分類では、子牛型の一部、胸腺型、皮膚型がT細胞由来の腫瘍だとされていた [2]。これらの腫瘍はT細胞性腫瘍の一部に過ぎず、T細胞性腫瘍の多くは末梢性 $\gamma\delta$ T細胞性リンパ腫で、細胞学的な特徴に基づき通常型、大細胞型、過剰顆粒型などの亜型に分類される [3, 4]。今回、過剰顆粒型と多形細胞型が認められたので、それらの組織学的特徴を報告する。

材料及び方法

症例1：12歳のホルスタイン種雌牛に、沈鬱と中程度の消瘦が認められ、右下顎リンパ節は腫大していた。

症例2：35カ月齢のホルスタイン種雌牛に、軽度の消瘦を認めた。左頬部 (耳下腺付近) は腫脹し、頭頸部

には、直径2cmの乳頭状結節が多発していた。

病理組織学的検査：組織を採材後、10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、パラフィンに包埋し、薄切、作製したパラフィン切片に、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色及びギムザ染色を実施した。さらに、ナフトールAS-Dクロロアセテートエステラーゼ (CAE) 染色も行った。

免疫組織化学的検査：パラフィン切片を用いて、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) 法による免疫染色を実施した。二次抗体以降の操作では、市販キット (ヒストファイン SAB-PO キット, (株)ニチレイバイオサイエンス, 東京) を使用した。一次抗体として、ヒトCD3 (Dako, Denmark, 希釈倍率/1:50)、ヒトCD5 (Fisher Thermo Scientific, U.S.A., 1:400)、ヒトCD20 (Spring Bioscience, U.S.A., 希釈済)、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) (Dako, Denmark, 1:20) に対するウサギポリクローナル抗体と、牛WC1

† 連絡責任者：梅島典子 (十和田食肉衛生検査所)

〒034-0001 十和田市三本木野崎1-13 ☎ 0176-22-1716 FAX 0176-22-5021
E-mail: n326umeshima@gmail.com

(AbD Serotec, U.K., 1:4), ヒト CD79a (Dako, Denmark, 1:25), 細胞増殖核抗原 (PCNA) (BioGenex, U.S.A., 希釈済) に対するマウスモノクローナル抗体を用いた。CD3, CD5, WC1, TdT, CD79a, PCNA の染色では, 抗原性の賦活化のために, 一次抗体の使用前に電子レンジによる加熱処理を施した。

ウイルス学的検査: DNA 抽出キット (QIAamp DNA Blood & Tissue kit, Qiagen, Germany) を用いて, いくつかの臓器から DNA を抽出し, ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法により BLV プロウイルスの有無を調べた [5]。

結 果

症例1の肉眼的所見: 脾臓及び肝臓が高度に腫大し, 左心室の心筋内には直径 2cm の白色結節がみられた。全身のリンパ節に高度な腫大が認められた。右下顎及び左膈部リンパ節では, 断面は乳白色髄様で, 縦隔, 内側腸骨, 腎及び肝リンパ節は断面にて出血が種々の程度にみられた。腸間膜リンパ節も腫大していたが, 断面は正常の範囲にあった。

病理組織学的所見: 脾臓は腫瘍組織により占められ, 正常のリンパ組織はわずかに残存していた。肝臓では類洞内に腫瘍細胞が多数浸潤し, 肝細胞間や拡張したディッセ腔内にもまれに認められた (図 1A, 図 1B)。腎臓及び子宮の血管内にも腫瘍細胞が認められた。右下顎, 左膈部及び縦隔リンパ節はほぼ完全に腫瘍により置換され, 腎及び内側腸骨リンパ節には腫瘍細胞が高度に浸潤増殖していた。腸間膜リンパ節では, リンパ洞内に比較的多数の腫瘍細胞がみられた。心臓では, 結節性病変の中心部に腫瘍細胞がび漫性に分布し, 周囲の心筋組織の間質へ樹枝状に浸潤していた。腫瘍細胞は, 大型～中型で, 円形または類円形の核を有し, 核小体は中型または小型で, クロマチンの凝集は軽度であった。細胞質は豊富で, 大部分の腫瘍細胞には好酸性の顆粒が認められた (図 1C)。この顆粒は, CAE 染色で陰性, あるいはごく弱く陽性であった。核分裂像は比較的豊富であった。

免疫組織化学的所見: 腫瘍細胞は, ほぼすべてが CD3 陽性で (図 1D), PCNA にも多くの腫瘍細胞が強陽性反応を示した。CD5 (図 1E) 及び WC1 (図 1F) にも, しばしば陽性であった。CD20 及び CD79a 免疫染色により, リンパ組織では B 細胞や形質細胞が残存していることが明らかとなった。一方, 心臓等の非リンパ組織の病変では B 細胞や形質細胞の浸潤は乏しかった。

ウイルス学的所見: 脾臓では, BLV に対する PCR が陽性であったが, 心臓の腫瘍性結節部では陰性であった。

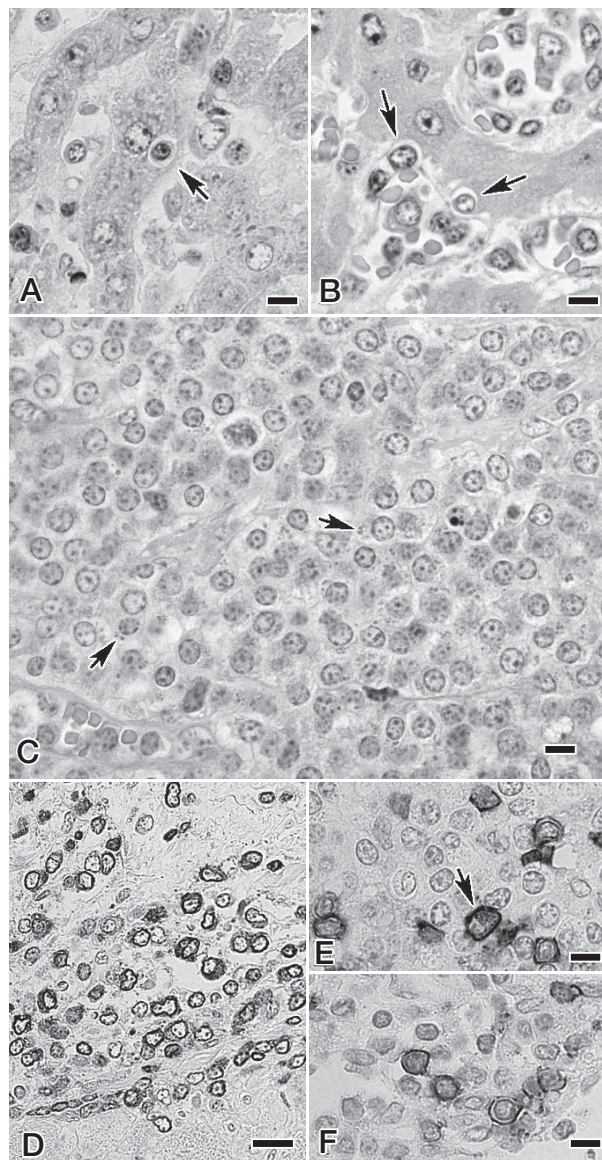


図1 症例1

- A: 肝臓. 肝細胞間には1個の腫瘍細胞がみられる (矢印) (ギムザ染色 Bar=5 μ m).
- B: 肝臓. ディッセ腔内には腫瘍細胞が認められ, 肝細胞にめり込んでいるようにみえる (矢印) (ギムザ染色 Bar=5 μ m).
- C: 下顎リンパ節. 腫瘍細胞は大きさが比較的均一で, 核は円形～類円形でしばしば偏在し, 細胞質内には顆粒が観察される (ギムザ染色 Bar=5 μ m).
- D: 心臓. CD3 陽性腫瘍細胞が心筋層内に浸潤している (免疫染色 Bar=10 μ m).
- E: 下顎リンパ節. CD5 陽性の腫瘍細胞がしばしば認められ, 矢印で示すような偏在核を持つ細胞もある (免疫染色 Bar=5 μ m).
- F: 腎リンパ節. WC1 陽性腫瘍細胞が認められる (免疫染色 Bar=5 μ m).

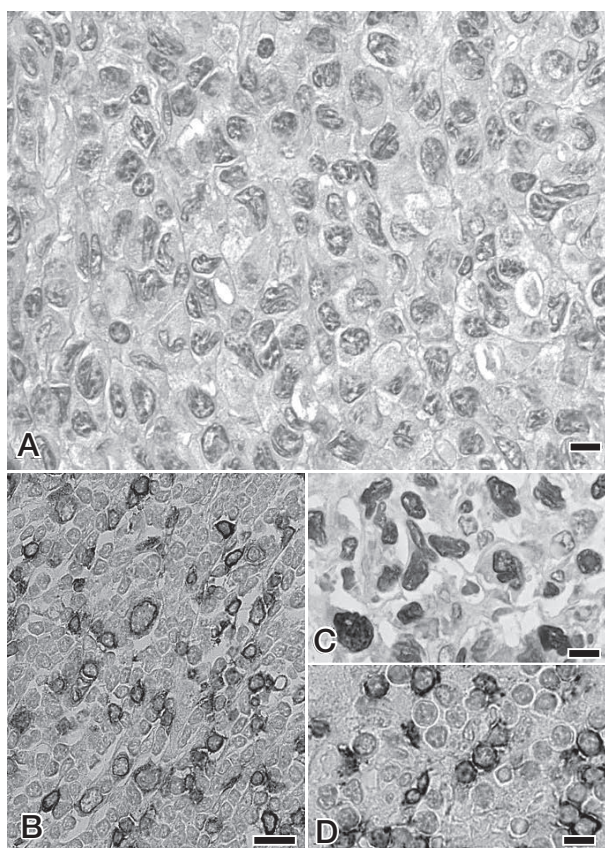


図2 症例2

- A: 耳下リンパ節. 腫瘍細胞は深く複雑な切れ込みを特徴とする脳回状核を有する (HE染色 Bar=5 μ m).
- B: 右膝部リンパ節. さまざまな大きさのCD3陽性腫瘍細胞が認められる. 正常のB細胞は陰性である. (免疫染色 Bar=10 μ m).
- C: 脾臓. 腫瘍細胞の多くは, 核がPCNA強陽性である (免疫染色 Bar=5 μ m).
- D: 右膝部リンパ節. 異型性の強くない腫瘍細胞の方が, WC1染色で陽性に染まる傾向にある (免疫染色 Bar=5 μ m).

症例2の肉眼的所見: 両耳下, 左下顎, 右腋窩, 右膝部, 縦隔, 肝及び内側腸骨リンパ節の腫脹が認められた. 脾臓では, 実質に0.5~3cm大の白色結節が散見された. これらのリンパ節や結節の断面は乳白色髄様で膨隆がみられた.

病理組織学的所見: 耳下リンパ節はほぼ完全に腫瘍細胞によって置換され, 内側腸骨リンパ節には腫瘍細胞の高度浸潤増殖が認められた. その他の腫大したリンパ節における腫瘍の浸潤増殖の程度は, 左下顎, 右膝部及び肝の各リンパ節が中等度, 縦隔リンパ節が軽度~中等度, 右腋窩リンパ節が軽度であった. リンパ節における腫瘍細胞の分布には偏りがあり, 正常のリンパ組織が残存している部位では, 腫瘍細胞は傍皮質領域への浸潤を示した. 脾臓の結節性病変は腫瘍細胞の浸潤増殖から

成っていたが, 結節以外の部位では腫瘍細胞の浸潤は乏しかった. 腫瘍細胞は大小種々の大きさで, 核は不整形が多く, 著しく不規則な核 (nuclear convolution) がしばしば認められ (図2A), 核小体は目立たず, クロマチンの軽度な凝集がみられた. 細胞質は比較的豊富で, 一部の細胞において微細な好酸性顆粒がみられた. 核分裂像はまれに観察された. 腫瘍細胞間には繊細な膠原線維がしばしば形成され, 間質が強い線維化を示す領域への連続的移行がみられた. 頭頸部に認められた結節は, 扁平上皮及び線維芽細胞の増生から成る乳頭腫で, 上皮の表層部に核内封入体が認められた.

免疫組織化学的所見: 症例1と同様の染色結果が得られたが (図2B, 2C), WC1陽性像は核不整の程度が軽い小型の細胞におもにみられた (図2D).

ウイルス学的所見: 脾臓と耳下リンパ節のPCR検査で, BLVプロウイルス遺伝子は検出されなかった.

考 察

症例1では, 腫瘍細胞は細胞質内CD3 (T細胞及びNK細胞のマーカー), CD5 (T細胞とB1細胞), WC1 ($\gamma\delta$ T細胞)が陽性で, B細胞のマーカー及びTdT (未熟なリンパ球)が陰性であった. 腫瘍細胞の細胞質内に好酸性顆粒が認められたため, $\gamma\delta$ T細胞性リンパ腫, 過剰顆粒型と診断した [4]. 過剰顆粒型や通常型 [6, 7]では, 上皮向性がさまざまなタイプの上皮においてみられることがあり, 症例1では肝細胞間またはディッセ腔内に腫瘍細胞が存在していた. これは肝細胞索における上皮向性と考えられ, 猫のナチュラルキラー (NK) 様T細胞性リンパ腫でも観察されたことがある [8]. 類症鑑別としては, 牛のNK様T細胞性リンパ腫があげられるが, この腫瘍ではWC1は陰性で, 腫瘍細胞や顆粒のサイズはより大型で, CAE染色は明瞭に陽性である [9].

症例2においても, 症例1と同じ免疫学的表現型が認められた. しかし, 従来の $\gamma\delta$ T細胞性リンパ腫では, 円形~類円形を有する比較的均一な大型細胞 (ただし, 中型細胞が混在する症例もある) が認められるのに対し, 症例2では, 腫瘍細胞の大きさは種々で, ヒトの菌状息肉症 [10]にみられるような高度な核形不整を伴っていた. これは今までに報告のない組織型と考えられ, 多形型 $\gamma\delta$ T細胞性リンパ腫と診断された. CD20, CD79a及びCD5が陽性となる牛の多形型B細胞性リンパ腫も, 多形性と異型性を細胞学的特徴とするが, その程度は症例によってさまざまで, 高度の多形性と異型性を示す症例でも, 核不整の程度は症例2よりも軽い傾向にあり (単純な切れ込み cleavage や分葉を示す細胞が多い), 細胞によってさまざまである [1, 11].

一方, 症例2ではどの細胞においても, 核の特徴が比

較的類似していた。猿のT細胞性白血病ウイルス関連リンパ腫や豚の $\gamma\delta$ T細胞性リンパ腫でも、かなりの核不整 (convolution) が報告されているが、今回の症例とは異なり、核小体がしばしば大型である [12, 13]。人では非肝脾 $\gamma\delta$ T細胞性リンパ腫において、多形性が認められることが多いが、細胞形態学的特徴はさまざまである [14]。

WC1は牛や豚の $\gamma\delta$ T細胞の優れたマーカーであるが、WC1陰性の $\gamma\delta$ T細胞性腫瘍が存在し得るので、WC1陰性所見は $\alpha\beta$ T細胞性腫瘍という診断の根拠にはならない [12, 15]。症例によっては陽性腫瘍細胞の数が少ないことがあり、正常のWC1陽性リンパ球との鑑別が問題となる。今回は、どちらの症例においても、形態学的に腫瘍細胞と診断した細胞が陽性反応を示した。

人の $\gamma\delta$ T細胞性腫瘍の発生は比較的新で、原発巣も特定の臓器に偏るが [16]、牛ではさまざまな部位に発生し [17]、皮膚や管腔臓器に浸潤して、表皮向性または上皮向性病変を形成する [6, 7]。腫瘍による脾臓の完全な置換や肝類洞内における比較的多数の腫瘍細胞の存在は、症例1は白血化した状態にあることを示す [4]。

一方、症例2では腫瘍性病変の局在や間質の線維化があり、症例1よりも白血化しにくい症例と考えられるが、病期の違いを反映している可能性も残る。牛の $\gamma\delta$ T細胞性リンパ腫の発生はまれではなく、腫瘍組織の体内分布や細胞形態も多彩で、これは正常な牛の体内では $\gamma\delta$ T細胞の数が多く、おそらくさまざまな機能を有する $\gamma\delta$ T細胞が存在していることを反映していると推察された [3]。このような $\gamma\delta$ T細胞性リンパ腫の多様性は牛に特有なものと考えられ、人や犬のリンパ系腫瘍の分類はあまり参考にならないと考える (正常な $\gamma\delta$ T細胞の比率は $\alpha\beta$ T細胞よりもはるかに低く、その腫瘍の発生頻度も低い)。

BLVがまん延している地域では、BLV感染牛にリンパ系腫瘍が発生しても、必ずしもBLVに起因するとは限らない [1]。今回は、症例1の心臓腫瘍ではBLV陰性で、組織学的には腫瘍性T細胞が大部分を占めていたため、腫瘍細胞にはウイルスの感染がなかったと考えた。一方、脾臓ではBLV陽性で、脾臓に残存した正常Bリンパ球がウイルスに感染している可能性が示唆された。腫瘍細胞とウイルスの関係については、今後さらに症例を積み、検討する必要がある。

引用文献

[1] 萩原晶代, 斉藤守弘, 石川義春, 門田耕一: 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, 日獣会誌, 67, 199-203 (2014)

- [2] 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)
- [3] 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)
- [4] Naitou K, Ishikawa Y, Kadota K: Hypergranular $\gamma\delta$ T-cell lymphoma in a heifer, JARQ-Jpn Agr Res Q, 41, 79-83 (2007)
- [5] 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)
- [6] Kadota K, Wada Y, Ishikawa Y, Shibahara T: $\gamma\delta$ T-cell lymphoma with tropism for various types of epithelium in a cow, J Comp Pathol, 124, 308-312 (2001)
- [7] Sato K, Shibahara T, Kadota K: $\gamma\delta$ T-cell lymphoma in a cow, Aust Vet J, 80, 705-707 (2002)
- [8] Ezura K, Ezura K, Nomura I, Takahashi T, Shibahara T, Kadota K: Natural killer-like T cell lymphoma in a cat, Vet Rec, 154, 268-270 (2004)
- [9] Nozaki S, Sasaki K, Ando M, Kadota K: Natural killer-like T-cell lymphoma in a calf, J Comp Pathol, 135, 47-51 (2006)
- [10] Lennert K, Feller AC: T-cell lymphomas, Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas, 2nd ed, 165-261, Springer-Verlag, Berlin (1992)
- [11] Iwama Y, Inomata T, Ishikawa Y, Kadota K: Cytology of B cell lymphomas in cattle infected with bovine leukosis virus, JARQ-Jpn Agr Res Q, 47, 103-107 (2013)
- [12] Ogiwara K, Ohba T, Takai H, Ishikawa Y, Kadota K: Lymphoid neoplasms in swine, J Vet Med Sci, 74, 149-154 (2012)
- [13] Sato Y, Matsuura S, Kadota K, Miyazawa I: T-cell lymphoma in a savanna monkey (*Ceropithecus aethiops*) probably related to simian T-cell leukemia virus infection, J Vet Med Sci, 61, 49-52 (1999)
- [14] Vega F, Medeiros LJ, Gaulard P: Hepatosplenic and other $\gamma\delta$ T-cell lymphomas, Am J Clin Pathol, 127, 869-880 (2007)
- [15] Otrocka-Domagala I, Procajlo Z, Pazdzior K, Gesek M, Rotkiewicz T, Szweda W: Immunohistochemical profile of multicentric cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma with generalised lymphadenopathy in a Holstein-Friesian cow: a case report, Vet Med-Czech, 57, 251-257 (2012)
- [16] 山口素子, 中村栄男: 肝脾T細胞リンパ腫, 新WHO分類による白血病・リンパ系腫瘍の病態学, 木崎昌弘, 押味和夫編, 219-220, 中外医学社, 東京 (2004)
- [17] 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)

Histopathological Features of Gamma-delta T-cell Lymphoma in Two Cows

Noriko UMESHIMA^{1)†}, Akira TOKAIRIN¹⁾, Masaaki KIMURA¹⁾, Miho SHINDO¹⁾,
Yoshiharu ISHIKAWA²⁾ and Koichi KADOTA²⁾

1) *Towada Meat Inspection Center, 1-13 Nozaki, Sanbongi, Towada, 034-0001, Japan*

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

SUMMARY

The histopathological and immunohistochemical features of lymphoma in two Holstein cows were studied. Histologically, both cases received a diagnosis of peripheral gamma-delta T-cell lymphoma, based on positive results for CD3, CD5, and WC1, and negative results for terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT). In case one, the neoplastic cells had round to oval nuclei, most of which contained cytoplasmic eosinophilic granules, and a diagnosis of gamma-delta T-cell lymphoma, hypergranular variant was made. In contrast, in case two, the neoplastic cells showing variation in cell size and marked nuclear irregularity (convolution) were cytologically distinct from those in previously reported histological subtypes of gamma-delta T-cell lymphoma, and a diagnosis of pleomorphic gamma-delta T-cell lymphoma was made. Because this lymphoma is relatively difficult to distinguish cytologically from pleomorphic B cell lymphoma, immunohistochemistry is required for differential diagnosis. —Key words : bovine leukosis, gamma-delta T-cell lymphoma, pleomorphism, WC1.

† *Correspondence to : Noriko UMESHIMA (Towada Meat Inspection Center)*

1-13 Nozaki, Sanbongi, Towada, 034-0001, Japan

TEL 0176-22-1716 FAX 0176-22-5021 E-mail : n326umeshima@gmail.com

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 72, 361 ~ 365 (2019)