

pocH-100iV Diffを用いた 血液疾患の鑑別および治療推移

高橋 義明

ペットクリニックハレルヤ 平和本部：福岡市南区平和 1-30-63 (〒 815-0071)

要 旨

元気・食欲の低下を主訴に来院した犬と猫の2症例に対して、シスメックス社製の多項目自動血球計数装置 pocH-100iV Diffによる血球計算を実施したところ、貧血、血小板減少症、顕著な白血球増多症が認められた。骨髓検査をはじめとする各種臨床検査を行い、急性リンパ性白血病と診断し多剤併用化学療法を実施した2症例の概要を報告する。

キーワード 急性リンパ性白血病, 猫, 犬, pocH-100iV Diff

はじめに

近年、検査機器の進歩に伴い、医学領域と同様に獣医学領域においても自動血球計数器が血球計算の主流となっている。それにより赤血球系(RBC, HCT, Hb, MCV, MCHC)、白血球系(WBC)、血小板系(PLT)の測定が容易に行われるだけでなく、機種によっては白血球細胞の大まかな百分比を計算する機器も広く普及し始めている。当院ではシスメックス社製の多項目自動血球計数装置 pocH-100iV Diff(以下、pocH-100iV Diff)を導入し、日常診療の中で必要不可欠な検査機器の一つとなっている。今回は、pocH-100iV Diffを用いた血球計算により異常を発見したことを発端に診断へ導くことができた急性リンパ性白血病の犬と猫の2症例を紹介する。

急性リンパ性白血病(acute lymphoid leukemia; 以下 ALL)は、分化・成熟能を失ったリンパ球系の未分化な芽球が骨髓を原発としてクローン性に増殖する造血器悪性腫瘍であり、急速進行性に悪化する致死性疾患である。犬では発生がまれであり、発生機序も明らかになっていない。一般的に化学療法を実施しても長期間の生存は困難であり、予後は極めて悪く

症例の多くは数日から数ヶ月以内に死亡する^{1~4)}。猫では、症例の大部分が猫白血病ウイルス(FeLV)陽性であることから、FeLV感染とALL発症とは因果関係があると考えられており、化学療法により延命効果は期待できるものの完治困難で予後不良な疾患である。

本稿では、元気・食欲の低下を主訴に来院したゴールデンレトリバーと雑種猫に対して血球計算を実施したところ、貧血、血小板減少症、顕著な白血球増多症が認められたため、骨髓検査をはじめとする各種臨床検査を行い、ALLと診断し多剤併用化学療法を実施した2症例の概要を報告する。

症例 1 (犬)

プロフィール：ゴールデンレトリバー，避妊雌，
12歳1ヵ月齢
予防歴：混合ワクチン接種 (+)，フィラリア予防 (+)
既往歴：8歳1ヵ月齢時に子宮蓄膿症のため，当院
にて卵巣子宮切除術を実施
主 訴：1週間前からの元気・食欲の低下

1. 臨床検査

1) 初診時一般身体検査所見

体重 30.8kg, BCS 3/5, 体温 39.3℃. 可視粘膜
はやや蒼白で，体表リンパ節（下顎，浅頸，ソ径，

膝窩）の軽度な腫大が認められた（1.6～3.2cm）.
また，腹部触診にて脾臓の腫大が触知された.

2) 血液検査所見

CBCでは，中等度の非再生性貧血（PCV 22%）と
血小板減少症（ $72 \times 10^3/\mu\text{L}$ ）が認められた. 白血
球数は $311,000/\mu\text{L}$ と顕著に増加していた. 血液化
学検査では，Glu と Alb の軽度な低下と ALP3 を中
心とする ALP の顕著な上昇が認められた. また，
LDH は上昇しアイソザイムでは 3 型が優位なパ
ターンであった. 血清チミジンキナーゼ活性を測
定したところ，377.0 U/L（基準値 6 U/L 以下）と
顕著に上昇していた（表 1）.

表 1. 初診時血液検査所見

RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	3.00	TP (g/dL)	6.4
PCV (%)	22	Alb (g/dL)	2.0
Hb (g/dL)	10.0	AST (U/L)	60
MCV (fL)	73.3	ALT (U/L)	<10
MCHC (g/dL)	45.5	ALP (U/L)	3534
Ret (%)	0.1	γ -GTP (U/L)	4
RPI	0.02	TBil (mg/dL)	<0.2
WBC ($/\mu\text{L}$)	311,000	TCho (mg/dL)	180
Band-N	311	Glu (mg/dL)	69
Seg-N	5598	BUN (mg/dL)	10
Lym	313,41	Cre (mg/dL)	1.2
Mon	311	Ca (mg/dL)	9.5
Eos	3421	P (mg/dL)	3.7
Blast cell	270,018	Fe ($\mu\text{g/dL}$)	82
Plat ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	72	TIBC ($\mu\text{g/dL}$)	230
Na (mmol/L)	149	Tf-S (%)	35.6
K (mmol/L)	4.1	LDH (U/L)	999
Cl (mmol/L)	119	LDH 1 (%)	2.0
PT (sec)	7.2	LDH 2 (%)	9.6
APTT (sec)	35.0	LDH 3 (%)	31.2
Fib (mg/dL)	280	LDH 4 (%)	26.1
チミジンキナーゼ (U/L)	377.0	LDH 5 (%)	31.1

3) 血液塗抹所見

中型から大型の円形細胞の出現を認めた。出現している円形細胞は、核クロマチン結節に乏しい類円形核と好塩基性の狭い細胞質を有していた。一部の細胞にはアズール顆粒が認められた(図1)。細胞化学染色では、ペルオキシダーゼ染色陰性、非特異的エステラーゼ染色陰性を示し、形態学的にリンパ芽球と判断した。

4) X線検査所見

胸部X線検査では特に異常は認められなかったが、腹部X線検査では肝臓および脾臓の腫大が認められた(図2)。

5) 腹部超音波検査所見

肝臓および脾臓のびまん性の腫大と腰下リンパ節の軽度な腫大が認められた。

6) 体表リンパ節の細胞診所見

末梢血と同様の芽球細胞の増加が認められた。また、小リンパ球、形質細胞、好中球、好酸球、肥満細胞を少数認めた(図3)。

7) 脾臓の細胞診所見

末梢血と同様の芽球細胞の増加が認められた。また、形質細胞、赤芽球、巨核球を少数認めた(図4)。

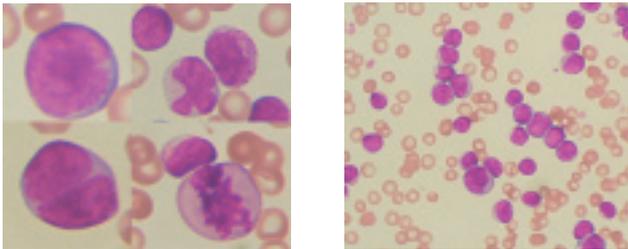


図1. 初診時血液塗抹所見 (May-Giemda stain)

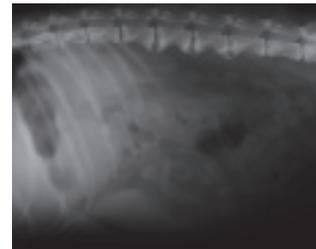


図2. 腹部X線検査所見

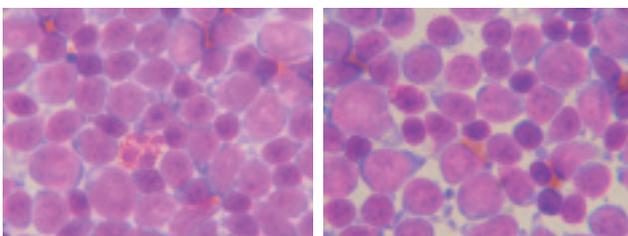


図3. リンパ節の細胞診所見 (May-Giemsa stain)

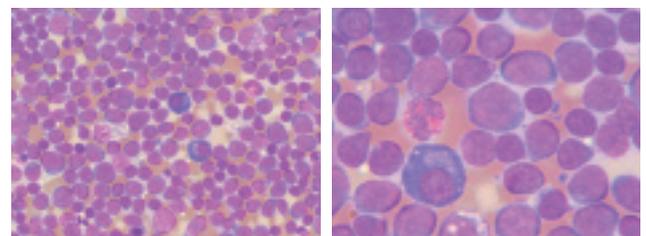


図4. 脾臓の細胞診所見 (May-Giemsa stain)

8) 骨髄検査所見

細胞充実性は過形成髄。大部分を末梢血と同様の中～大型の芽球細胞によって占められ、芽球比率はANCの90%であり、本来の造血細胞である骨髄球系、赤芽球系、巨核球系細胞は殆ど認められなかった(図5)。細胞化学染色では、芽球細胞はペルオキシダーゼ染色陰性、非特異的エステラーゼ染色陰性を示した(図6)。

9) 免疫染色

骨髄塗抹標本にて、T細胞性マーカーとして

CD3抗体、B細胞性マーカーとしてCD79a抗体による免疫染色を実施したところ、芽球細胞は両染色とも陰性を示した(図7)。

10) PCRリンパ球クローナリティー解析

骨髄液を材料に2つの検査会社に依頼したが、2社ともクローン性は確認されなかった(図8)。

2. 診断

以上の各種臨床検査所見より、本症例をALLと診断した。免疫学的表現型としてはnon-T, non-Bが疑われた。

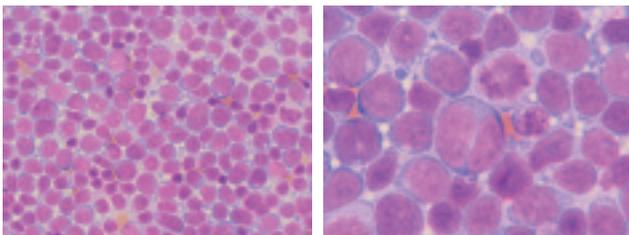
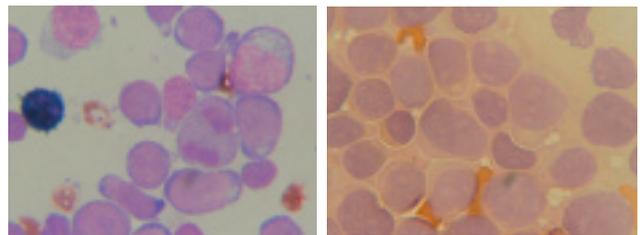


図5. 骨髄塗抹所見 (May-Giemsa stain)



ペルオキシダーゼ染色 α-naphthyl butyrate 染色

図6. 骨髄塗抹所見 (細胞化学染色)

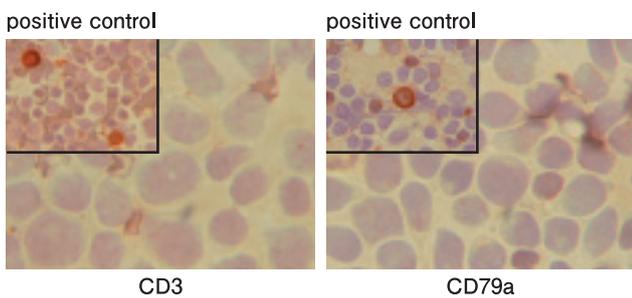


図7. 骨髄塗抹所見 (immunological stain)

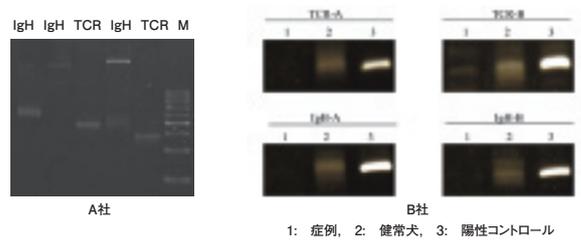


図8. リンパ球クローナリティー解析

3. 治療および経過

一般状態改善のため、第1病日より入院による輸液を開始するとともに抗生物質（セファゾリン）とプレドニゾロン（PDL 2mg/kg SC）を投与し、第2病日にはL-アスパラギナーゼ（L-Asp 400KU/kg SC）を投与した。第3病日にはビンクリスチン（VCR 0.7mg/m² IV）を投与し、第4病日には一般状態の改善が認められたため退院とした。第10病日には白血病細胞は顕著に減少し、白血球数は正常化、シクロホスファミド（CPM 250mg/m² IV）を投与した。第17病日、白血病細胞は認められず、LDH値は460IU/Lに低下し、血清チミジンキナーゼ活性も5.1 U/Lと基

準値内に低下した。しかし、PCV16%と貧血が進行したため全血輸血300ccを実施し、L-アスパラギナーゼとビンクリスチンを投与した。第22病日、血小板数は上昇したが食欲が低下し、PCV20%だったため再び全血輸血200ccを実施した。第25病日、好中球の増加を伴う白血球増多症が認められたが、PCV29%、血小板数263×10³/μLと改善が認められた。骨髓検査を実施したところ、白血病細胞の消失および血球3系統の正常な造血が確認され、完全寛解と判断した（図9）。しかし、徐々に一般状態が悪化し、第27病日に死亡した（図10）。

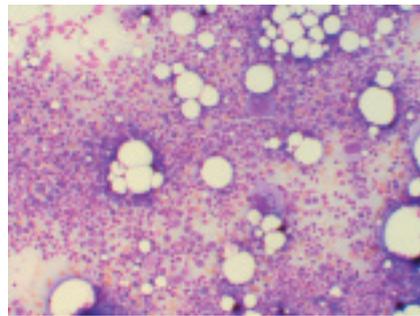


図9. 第25病日骨髓塗抹所見（May-Giemsa stain）

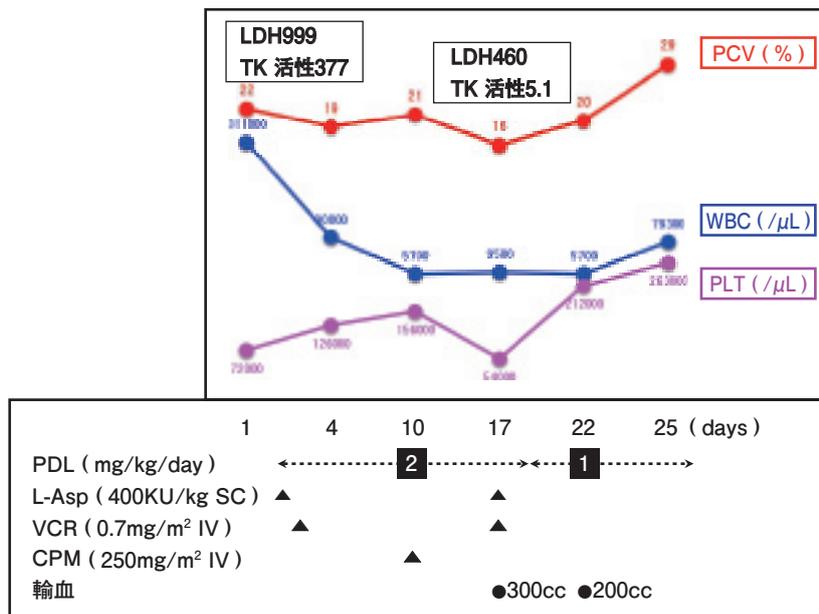


図10. 治療経過

症例 2 (猫)

プロフィール：雑種猫，去勢雄，4 歳齢
 予防歴：3 種混合ワクチン接種 (+)
 既往歴：4 ヶ月齢時に伝染性鼻気管炎，これ以降は慢性鼻炎を呈していた
 主 訴：2 日前からの元気・食欲の低下

1. 臨床検査

1) 初診時一般身体検査所見

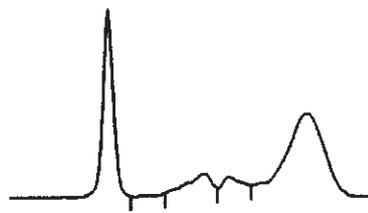
体重 3.3kg, BCS 2/5, 体温 40.3°C. 可視粘膜はやや蒼白で，下顎リンパ節の軽度な腫大が認められた。また，腹部触診にて脾臓の腫大が触知された。

2) 血液検査所見

血液サンプルは自己凝集を示し，CBC では，中等度の非再生性貧血 (PCV 24%) と血小板減少症 ($41 \times 10^3/\mu\text{L}$) が認められた。白血球数は $150,000/\mu\text{L}$ と顕著に増加していた。血液化学検査では，TP と Glu の軽度な上昇と TIBC の低下が認められた。また，LDH は上昇しアイソザイムでは 1 型および 2 型の上昇が認められた。蛋白分画では， γ グロブリンの上昇が認められたがポリクローナルであった。ウイルス検査では，猫白血病ウイルス (FeLV) 陽性，猫エイズウイルス (FIV) 陰性であった (表 2)。

表 2. 初診時血液検査所見

RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	4.94	TP (g/dL)	8.0
PCV (%)	24	Alb (g/dL)	2.6
Hb (g/dL)	10.0	AST (U/L)	32
MCV (fL)	48.6	ALT (U/L)	52
MCHC (g/dL)	41.7	TBil (mg/dL)	<0.2
Ret (%)	0.1	TCho (mg/dL)	57
RPI	0.03	Glu (mg/dL)	161
WBC ($/\mu\text{L}$)	150,000	BUN (mg/dL)	23
Band-N	0	Fe ($\mu\text{g/dL}$)	73
Seg-N	5,250	TIBC ($\mu\text{g/dL}$)	210
Lym (異常リンパ球含む)	144,600	Tf-S (%)	34.8
Mon	150	LDH (U/L)	854
Plat ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	41	LDH 1 (%)	19.4
Na (mmol/L)	149	LDH 2 (%)	22.8
K (mmol/L)	3.9	LDH 3 (%)	25.4
Cl (mmol/L)	124	LDH 4 (%)	23.4
FeLV	(+)	LDH 5 (%)	9.0
FIV	(-)		
		蛋白分画	
		アルブミン	32.7%
		α 1 グロブリン	1.0%
		α 2 グロブリン	9.7%
		β グロブリン	6.7%
		γ グロブリン	49.9%
		A/G 比	0.49



3) 血液塗抹所見

小リンパ球に混じって中型からやや大型の円形細胞の出現を認めた。出現している円形細胞は、核クロマチン結節に乏しい類円形核と好塩基性の狭い細胞質を有していた(図 11)。細胞化学染色では、ペルオキシダーゼ染色陰性、非特異的エステラーゼ染色陰性を示し、形態学的にリンパ芽球と判断した。

4) X線検査所見

胸部X線検査では右肺前葉の不透過性の亢進が見られ、腹部X線検査では脾臓の腫大と消化管内のガス貯留が認められた(図 12, 13)。

5) 腹部超音波検査所見

脾臓のびまん性の腫大が認められ、脾臓のエコーレベルは均一であった。

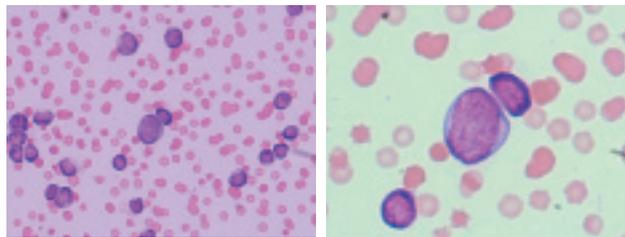


図 11. 初診時血液塗抹所見 (May-Giemsa stain)

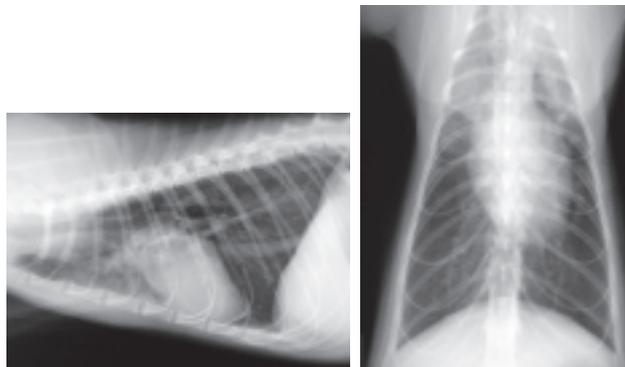


図 12. X線検査所見

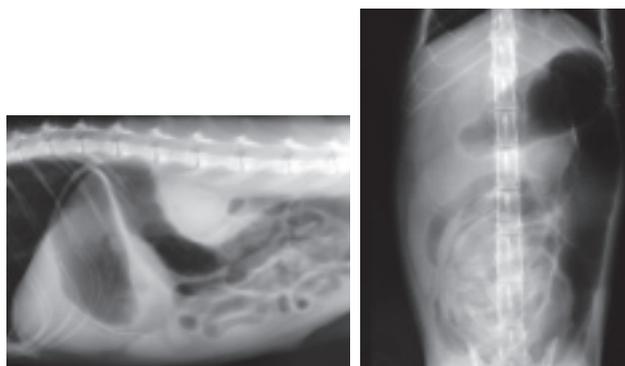


図 13. X線検査所見

6) 下顎リンパ節の細胞診所見

末梢血と同様の芽球細胞の増加と分裂像が散見された。また、小リンパ球、形質細胞を少数認め、単核細胞による赤血球の貪食像が散見された (図 14)。

7) 脾臓の細胞診所見

末梢血と同様の芽球細胞の増加が認められた (図 15)。

8) 骨髄検査所見

細胞充実性は過形成髄。大部分を末梢血と同様の中～やや大型の芽球細胞によって占められ、芽球比率はANCの90%であり、顆粒球系細胞をごく少数認めるも、赤芽球系および巨核球系細胞は殆ど認められなかった (図 16)。細胞化学染色では、芽球細胞はペルオキシダーゼ染色陰性、非特異的エステラーゼ染色陰性を示した (図 17)。

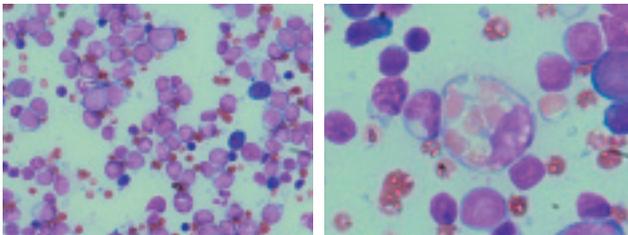


図 14. リンパ節の細胞診所見 (May-Giemsa stain)

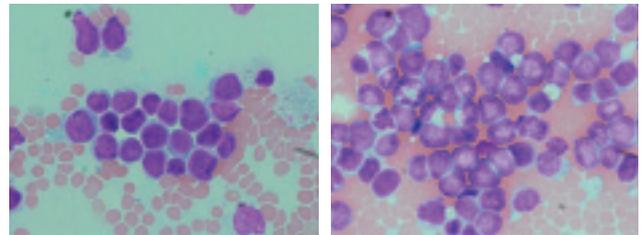


図 15. 脾臓の細胞診所見 (May-Giemsa stain)

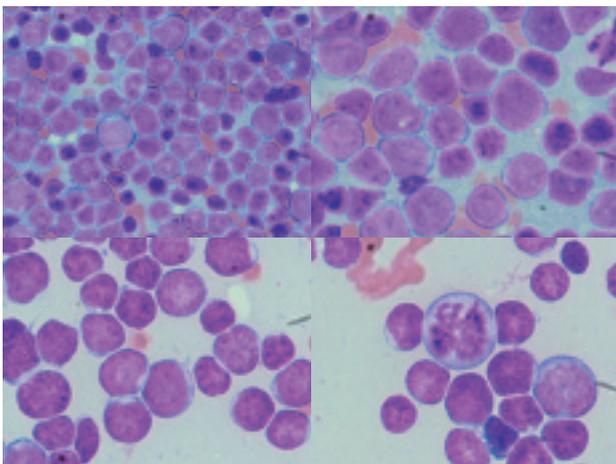
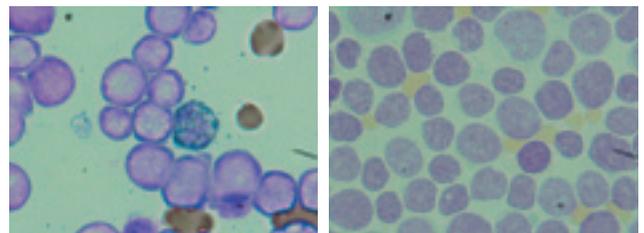


図 16. 骨髄塗抹所見 (May-Giemsa stain)



ペルオキシダーゼ染色 α-naphthyl butyrate 染色

図 17. 骨髄塗抹所見 (細胞化学染色)

9) 細胞表面マーカー検索

末梢血より単核球を分離し、フローサイトメトリー法による細胞表面マーカー検索を実施したところ、CD5, CD18, MHC II, IgG を発現するモノクローナルな細胞集団が検出され、B 細胞系であることが示唆された(表3)。

2. 診断

以上の各種臨床検査所見より、本症例を ALL と診断し、免疫学的表現型としては B 細胞性と判断した。免疫介在性溶血性貧血の併発も起こしていると思われる。

3. 治療および経過

一般状態改善のため、第 1 病日より入院による輸液を開始するとともに抗生物質(セファゾリン, エンロフロキサシン), 顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF 2 μg/kg SC), エリスロポエチン(EPO 100U/kg SC), プレドニゾロン(PDL 2mg/kg SC)の投与を開始した。第 3 病日には、PCV15%と低下し

たため全血輸血 60cc を実施し、第 4 病日にはビンクリスチン(VCR 0.5mg/m²IV)を投与した。第 5 病日、白血球数の減少と食欲の改善が認められた。第 6 病日には白血病細胞の著減が見られ白血球数が 5800/μL と正常化したため退院とした。しかし、第 16 病日には再び白血病細胞の増加による顕著な白血球増多が見られたため、ビンクリスチンを投与し、第 17 病日にはドキソルビシン(DXR 1mg/kg IV)を投与した。第 29 病日、一般状態は良好でビンクリスチンを投与した。しかし、第 34 病日、食欲の減少が見られ、PCV20%と貧血も認められた。第 35 病日に全血輸血 60cc を実施し、第 36 病日にビンクリスチン、第 37 病日にドキソルビシンを投与した。その後、一般状態は一時的に改善したが第 49 病日に食欲廃絶が見られ、血液検査で腎パネルの上昇(BUN 158mg/dL, Cre 4.0 mg/dL)が認められた。腹部 X 線検査にて両側の腎臓の腫大が認められ、fine needle aspiration (FNA)にて白血病細胞の浸潤が確認された。入院による輸液を開始し、第 50 病日には Percutaneous Endoscopic Gastrostomy (PEG)による胃ろ

表3. 細胞表面マーカー検索における陽性率

マーカー		陽性細胞率	マーカー		陽性細胞率
CD4	陰性	3.70%	CD22	陰性	23.12%
CD5	陽性	76.44%	MHC II	陽性	72.33%
CD8 α	陰性	6.08%	CD25	陰性	6.62%
CD11b	陰性	13.33%	IgG	陽性	98.39%
CD18	陽性	63.62%	IgM	陽性	67.73%
CD21	陰性	14.22%			

うカテーテルを設置した。第 52 病日、全血輸血 60cc を実施し、ビンクリスチンを投与した。第 54 病日、BUN 72mg/dL, Cre 1.6 mg/dL と改善を示したものの、第 58 病日に死亡した(図 18)。

考 察

医学領域における急性白血病的分類は、1976 年に提唱された細胞形態学に基礎を置く FAB 分類によってほぼ統一され、診断方法が実施容易なことから広く普及した。しかし、ALL においてはリンパ球系の基本的な分類である T 細胞、B 細胞を形態学的に区別できないことなどが問題として残っていた。そこで 1999 年に、形態学に加え、染色体・遺伝子特性、免疫学的表現型、臨床徴候などの組み合わせで定義され、造血器・リンパ系腫瘍全体を対象とした包括的な新 WHO 分類が提唱され、普及しつつある⁵⁾。一方、獣医学領域における急性白血病的分類はヒトの FAB 分類を元に Jain らによって提唱されているが⁶⁾、現在は細胞表面抗原検索や PCR による遺伝子特性解析により ALL は B 細胞、T 細胞などの細分類が可能となりつつある^{1, 4, 7~11, 14)}。

症例 1 では、白血球数の著増を認め、末梢血およ

び骨髄において芽球細胞の顕著な増殖が認められたことから急性白血病的診断がなされた。白血病的細胞の由来特定のために、細胞化学染色、PCR によるリンパ球クローナリティー解析、免疫染色を実施したが、リンパ球クローナリティー解析ではクローン性は確認されず、免疫染色では CD3 および CD79a はともに陰性を示した。しかし、細胞化学染色において、ペルオキシダーゼ染色陰性、非特異的エステラーゼ染色陰性を示したことと白血病的細胞の形態学的所見からリンパ系と判断し、ALL と診断し、免疫学的表現型としては non-T, non-B を疑った。症例 2 では、症例 1 と同様に白血球数の著増を認め、末梢血および骨髄において芽球細胞の顕著な増殖が認められたことから急性白血病的診断がなされた。細胞化学染色、フローサイトメトリー法による細胞表面マーカー検索を実施したところ、白血病的細胞の由来は B 細胞と考えられ、B 細胞性 ALL と診断した。

ヒトの急性白血病的では、白血病的細胞の増殖に伴って LDH 値の上昇が認められ、アイソザイムでは LDH2 と LDH3 が上昇することが知られており、白血病的細胞の減少とともに LDH 値は低下する傾向にある。また、血清チミジンキナーゼ活性も急性白血病的、骨髄異形成症候群、リンパ腫、慢性白血病的、多発性

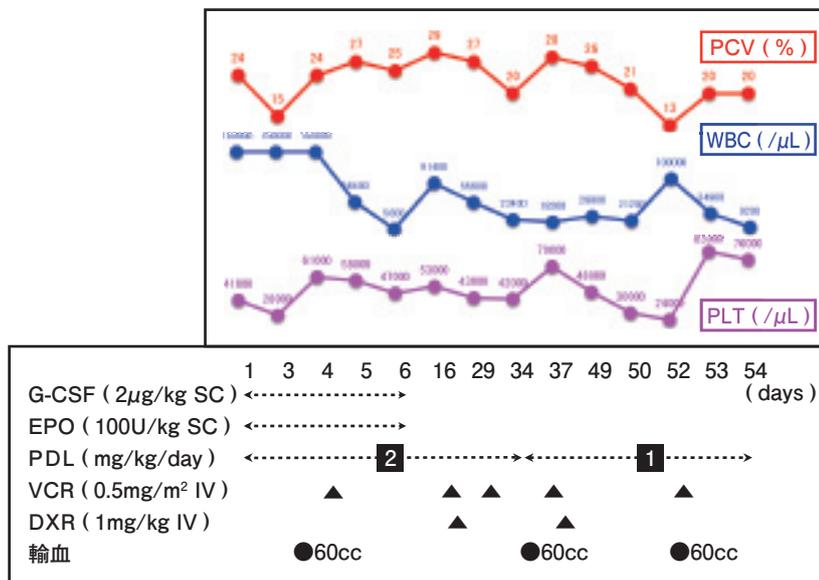


図 18. 治療経過

骨髓腫などにおいて上昇することが知られており、これら腫瘍量や細胞増殖率を反映していることから腫瘍マーカーとして有用な検査となっている。近年、犬においても血清チミジンキナーゼ活性の造血器腫瘍マーカーとしての有用性が報告されている^{12, 13)}。症例1では、初診時に血液検査でLDH3の上昇を伴うLDH値の上昇および血清チミジンキナーゼ活性の上昇が認められたが、プレドニゾロン、L-アスパラギナーゼ、ビンクリスチン、シクロホスファミドによる多剤併用化学療法を実施したところ、第17病日には末梢血から白血病細胞が消失するとともにLDH値は低下し、アインザイムパターンも正常化、血清チミジンキナーゼ活性は基準値内に低下したことから、LDH値や血清チミジンキナーゼ活性は、犬のALLにおいて腫瘍マーカーとして有用であると考えられた。

症例1における化学療法に対する反応性は良く、完全寛解に導入できたことで比較的スムーズに造血が回復したことを考えると第27病日に死亡したことは残念な結果であった。剖検を実施できなかったため死因は不明だが、好中球の増加を伴う白血球増多症が認められたことから感染症などの可能性が考えられた。急性白血病においては、化学療法とともに濃厚な支持療法が必要不可欠であることをあらためて実感した症例であった。症例2においては、化学療法に対してある程度の反応性が見られたものの完全寛解には至らず、長期生存の可能性が低くなった状況に加えて白血病細胞の腎臓への浸潤が起きたことで死期が早まったと思われる。

結 語

両症例ともに、初診時の症状は元気・食欲の低下という非特異的的症状であったため血液検査を実施した。血球計算において貧血、血小板減少症、顕著な白血球増多症が認められたことを発端に各種臨床検査を実施することでALLの診断に至ったことを考えると、日常的に行われる血液検査の重要性を改めて認識する機会であった。

参 考 文 献

- 1) Adams J et al. Acute B cell lymphoblastic leukaemia in a 12-week-old greyhound. *J Small Anim Pract.* 2004; **45** (11): 553-557
- 2) Matus RE, Leifer CE, MacEwen EG. Acute lymphoblastic leukemia in the dog: a review of 30 cases. *J Am Vet Med Assoc.* 1983; **183** (8): 859-862
- 3) 宮本忠 他. 急性リンパ芽球性白血病に合併した全身性カンジタ症の犬の1例. *日本獣医師会雑誌.* 2001; **54** (8): 629-632
- 4) 高橋朋子 他. イヌの大顆粒性Tリンパ球性白血病の悪性転化の1例. *J Vet Med Sci.* 2007; **69** (6): 677-681
- 5) 村上博和, 大野竜三 編. 新しい診断と治療のABC36. 急性白血病; 形質細胞性白血病. 大阪: 最新医学社; 2006. 227-236
- 6) Jain NC et al. Proposed criteria for classification of acute myeloid leukemia in dogs and cats. *Vet Clin Pathol.* 1991; **20** (3): 63-82
- 7) Ponce F et al. High-grade canine T-cell lymphoma/leukemia with plasmacytoid morphology: a clinical pathological study of nine cases. *J Vet Diagn Invest.* 2003; **15** (4): 330-337
- 8) Vernau KM et al. Acute B-cell lymphoblastic leukemia with meningeal metastasis causing primary neurologic dysfunction in a dog. *J Vet Intern Med.* 2000; **14** (1): 110-115
- 9) Vernau W, Moore PF. An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999; **69** (2-4): 145-164
- 10) Wilkerson MJ et al. Lineage differentiation of canine lymphoma/leukemias and aberrant expression of CD molecules. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005; **106** (3-4): 179-196
- 11) Weiss DJ. Flow cytometric and immunophenotypic evaluation of acute lymphocytic leukemia in dog bone marrow. *J Vet Intern Med.* 2001; **15** (6): 589-594
- 12) von Euler H et al. Serum Thymidine Kinase Activity in Dogs with Malignant Lymphoma: A Potent Marker for Prognosis and Monitoring the Disease. *J Vet Intern Med.* 2004; **18** (5): 696-702
- 13) 中村倫子 他. イヌのリンパ腫・白血病症例におけるチミジンキナーゼ活性(短報). *J Vet Med Sci.* 1997; **59** (10): 957-960
- 14) Presley RH, Mackin A, Vernau W. Lymphoid Leukemia in Dogs. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 2006; **28** (12): 831-849

Diagnosis of the Blood Disease with pocH-100*iV Diff* and Course of Treatment

Yoshiaki TAKAHASHI

Pet Clinic HALLELUYA, 1-30-63 Heiwa, Minami-ku, Fukuoka 815-0071

SUMMARY

Two cases of a dog and a cat presented with depression and anorexia. Blood counts performed with the automated hematology analyzer pocH-100*iV Diff* (Sysmex) showed anemia, thrombocytopenia, and remarkable leucocytosis. Additional laboratory testing included a bone marrow aspirate, the dog and the cat were diagnosed with acute lymphoid leukemia.

Both cases of acute lymphoid leukemia were treated with combination chemotherapy.

Key Words Acute Lymphoid Leukemia, Cat, Dog, pocH-100*iV Diff*
