

氏 名 (本 籍)	朝 比 奈 政 利 (静岡県)
学 位 の 種 類	博士 (獣医学)
学 位 記 番 号	獣医博甲第 3 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 9 年 3 月 1 4 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岩手大学
学 位 論 文 題 目	散発型ウシ白血病に関する免疫病理学的研究
審 査 委 員	主査 岩 手 大 学 教 授 岡 田 幸 助 副査 帯広畜産大学 助教授 石 黒 直 隆 副査 岩 手 大 学 教 授 小 林 晴 男 副査 東京農工大学 教 授 桐 生 啓 治 副査 岐 阜 大 学 教 授 柵 木 利 昭

論 文 の 内 容 の 要 旨

ウシ白血病には、ウシ白血病ウイルスが関与する地方病性ウシ白血病 (EBL) と原因不明とされている散発型ウシ白血病 (SBL) が存在する。SBL 腫瘍細胞は、免疫グロブリンの欠如より T 細胞由来とされてきたが、最近のリンパ球表面抗原の研究の進展により BoCD4⁺BoCD8⁺ T 細胞または幼若 pre-B 細胞由来であるとの報告がされた。また、BoCD2⁺BoCD4⁺BoCD8⁺ T 細胞で癌遺伝子 *c-myb* mRNA が発現していることが報告されている。そこで、散発型ウシ白血病の病理発生を明らかにするため、12 例の散発型ウシ白血病牛 (子牛型 4 例 SBL Nos. 1-4, 中間型 4 例 SBL Nos. 5-8, 胸腺型 4 例 SBL Nos. 9-12) および 5 例の地方病性ウシ白血病牛 (EBL Nos. 1-5) を病理組織学的および免疫組織学的に検索し、様々な表現型の腫瘍細胞について癌遺伝子 *c-myb* の発現を分子生物学的に解析した。

病理組織学的検索により、腫瘍細胞は 11 例が中型の大きさのリンパ球様細胞であり、1 例 (SBL No. 8) がやや大型核を有するリンパ芽球様細胞であった。子牛型では、リンパ節の多中心性腫瘍化が観察され、全例で肝臓、2 例で肺への腫瘍浸潤が認められた。中間型では、肉眼的には全身リンパ節は腫大していたが、組織学的には腫瘍細胞に置換されたものは一部であった。胸腺は 3 例において腫瘍細胞に置換されていた。また、全例で腎臓、2 例で肺への腫瘍浸潤が認められた。胸腺型では、全例で頸部胸腺の腫瘍化が認められた。また乳房への腫瘍浸潤が 3 例、肺への浸潤が 2 例で認められた。リンパ節の多中心性腫瘍化が認められたのは 1 例 (SBL No. 10) であった。EBL では 5 例中 4 例が第四胃および腹腔内リンパ節を主体とするいわゆる消化器型であった。また、心臓への腫瘍浸潤が全症例で認められた。

免疫組織学的検索により、腫瘍細胞はSBL Nos. 1-3, 5, 6では、BoCD5⁺sIgM⁺MHC class II⁺ B細胞であり、SBL Nos. 3, 6ではさらにB-B2陽性であった。SBL Nos. 4, 11, 12ではBoCD3⁺BoCD5⁺，SBL No. 7ではBoCD2⁺BoCD3⁺BoCD5⁺，SBL No. 8ではBoCD2⁺BoCD3⁺BoCD5⁺WC1-N2⁺，SBL No. 9ではBoCD2⁺BoCD3⁺，SBL No. 10ではBoCD2⁺BoCD3⁺BoCD8⁺ T細胞由来であった。

EBL Nos. 1-3の腫瘍細胞はBoCD5⁺MHC class II⁺B-B2⁺ B細胞であった。EBL Nos. 4, 5は、BoCD5⁺MHC class II⁺B-B2⁺であった。EBL No. 5では、さらにsIgM陽性であった。

癌遺伝子*c-myb*に対するノーザンハイブリダイゼーションおよび*c-myb* exon 9に対するRT-PCR解析には、SBL Nos. 3, 4, 8, 10-12およびEBL Nos. 1-5を用いた。ノーザンハイブリダイゼーションでは、SBL Nos. 4, 8, 10, 11において約4 kbの*c-myb* mRNAの存在が確認された。RT-PCR法によりSBL Nos. 3, 4, 8, 10, 11においてmRNAの存在が確認された。SBL No. 11では予想された産物より約150bp大きなPCR産物が確認された。SBL No. 12およびEBL No. 1-4では、*c-myb*の発現は確認されなかった。EBL No. 5では不明瞭ながらRT-PCR産物が確認された。

SBL腫瘍細胞は、免疫組織学的検索によりBoCD4⁺BoCD8⁺ T細胞由来もしくはBoCD5⁺sIgM⁺ B細胞由来であった。SBL No. 10はBoCD4⁺BoCD8⁺ T細胞であったが、BoCD8 single positive細胞は、T細胞分化においてBoCD4⁺BoCD8⁺ T細胞の後に出現する幼若T細胞であることが知られており、SBL腫瘍細胞はいずれも幼若細胞であることが明らかとなり、EBL腫瘍細胞と異なっていた。

癌遺伝子*c-myb*は未分化造血系細胞で高頻度に発現し、分化に伴いその発現は低下することが知られている。検索したSBLの6例中5例においてその発現が確認され、EBLと比較してSBLに特異的に発現していることが示唆された。また、SBL No. 11では*c-Myb*自身の負の制御ドメインとして知られているexon 9に変異があり、*c-myb*転写の上昇が推察された。*c-myb*の発現は、SBL腫瘍細胞が幼若細胞であることと関連する事が推察された。*c-myb*発現は以前に報告されたBoCD2⁺BoCD4⁺BoCD8⁺細胞のみでなく、さらに成熟したBoCD8 single positive細胞においても観察されており、*c-myb*発現がSBL腫瘍発生のどの段階でどのように関与しているかさらに検討する必要がある。

以上のことから、SBL腫瘍細胞のphenotypeの同定とそれらにおける癌遺伝子*c-myb*の発現を証明し、SBL腫瘍発生に重要な知見を明らかとした。

審 査 結 果 の 要 旨

ウシ白血病には地方病性ウシ白血病と散発型ウシ白血病ウシ白血病がある。前者はウシ白血病ウイルスに因ることが確立している。一方、散発型ウシ白血病には子牛型、胸腺型および皮膚型が含まれるがその病因は明かでない。また子牛型と胸腺型は境界が明確でなく、現実には両者の病変の共存する中間型も存在し、その分類が混乱している。申請者は散発型ウシ白血病の病理発生を明らかにするために、皮膚型を除く12例の散発型ウシ白血病および5例の地方病性ウシ白血病について病理組織学的および免疫組織学的に検索し、その表現型を明らかにした。次いでそれらの腫瘍細胞について癌遺伝子*c-myb*の発現を分子生物学的に解析した。*c-myb*は未分化造血系細胞に高頻度に発現する癌遺伝子である。

材料として子牛型4例、中間型4例、胸腺型4例および地方病性ウシ白血病5例を用いた。子牛型の全例にリンパ節の多中心性腫瘍化が、胸腺型の全例に胸部胸腺の腫瘍化が認められた。病理組織学的に中間型の1例が大型のリンパ芽球様細胞であった以外は、中型のリンパ様細胞で形態学的に区別は困難であった。免疫組織学的検索には、凍結切片について9種類のリンパ球表面分化抗原に対するモノクローナル抗体(BoCD2, BoCD3, BoCD4, BoCD5, BoCD8, WC1-N2, B-B2, MHC class II, sIgM)を用い、アビジンビオチン複合法で検索した。また一部の材料についてはフローサイトメトリーによる検索も行った。

免疫組織学的検索により、子牛型の全例と中間型の2例はCD5陰性のconventional B細胞(BoCD5⁺sIgM⁺MHC classII⁺)由来であり、地方病性ウシ白血病が主にB-1a細胞(BoCD5⁺CD11b⁺sIgM⁺MHC classII⁺)であるのに対して対照的であった。他の中間型2例と胸腺型4例はT細胞(BoCD2⁺BoCD3⁺BoCD5⁺)由来であった。うち中間型の1例はWC1-N2陽性の $\gamma\delta$ T細胞由来であった。胸腺型の1例はCD8単陽性(シングルポジティブ)のT細胞由来であつが、その他はCD4, CD8両陰性(ダブルネガティブ)のT細胞由来であった。

分子生物学的に癌遺伝子の検索としては*c-myb*に対するノーザンハイブリダイゼーション法および*c-myb* exon 9に対するRT-PCR法を行った。ノーザンハイブリダイゼーション法では検索した子牛型および胸腺型の6例中4例に約4kbの*c-myb* mRNAの存在が確認された。RT-PCR検索の結果、検索した6例中5例に*c-myb*のmRNAが検出されたが、地方病性ウシ白血病4例からは検出されず、1例では不明瞭であった。また胸腺型の1例では exon 9の変異が検出された。このexon 9は*c-Myb*自身の負の制御ドメインとして知られており、*c-myb*転写の上昇が示唆された。*c-myb*がダブルネガティブのT細胞に発現することは既に知られているが、今回さらに成熟したCD8シングルポジティブのT細胞に検出されたことは新知見である。*c-myb*が散発型ウシ白血病の腫瘍発生とどのように関係しているかは、今後さらに検討されなければならないが、重要な発見である。

以上申請者の発見した知見は散発型ウシ白血病の病理発生を考える上で重要な寄与をした。

以上について、審査員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。