

氏 名 (本 籍)	吳 東 来 (中華人民共和国)
学 位 の 種 類	博士 (獣医学)
学 位 記 番 号	獣医博甲第 3 5 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	Study on Pathogenesis of Enzootic Bovine Leukosis
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

最近、B細胞はその解剖学的、機能的特徴およびFlow cytometryで検出された細胞表面マーカーによりB-1a、B-1bとconventional B細胞に分類されている。B-1a細胞はCD5とCD11b両方陽性で、B-1b細胞はCD5陰性、CD11b陽性を示すが、conventional B細胞はCD5とCD11bともに陰性である。ヒトの慢性リンパ性白血病の腫瘍細胞は大部分B-1a細胞から、ほんの一部分がB-1bから発生するが、ほとんどconventional B細胞から発生しない。しかし、地方病性牛白血病(EBL)の腫瘍細胞がどの種類B細胞から由来するのはまだ不明である。

一方、地方病性牛白血病の場合に脾臓がリンパ節とほぼ同じようによく腫瘍細胞に浸潤されるが、この時脾臓におけるリンパ球サブセットの変化および分布についてまだ不明である。

そこで、BLVによって誘発されたリンパ肉腫のphenotypeと細胞由来および脾臓におけるリンパ球サブセットの変化および分布を明らかにすることを目的として実験を行った。

EBLと診断された牛11頭と健康牛2頭を実験動物として使用した。EBL牛の末梢血、腫瘍組織、脾臓および健康牛の末梢血、リンパ節、脾臓を用いて、60%のパーコール比重遠心法によるリンパ球を分離し、anti-MHC class II, anti-B-B2, anti-sIgM, anti-IgG₁, anti-IgG₂, anti-λ light chain, anti-BoCD11b, anti-BoCD3, anti-BoCD4, anti-BoCD5 and biotinylated anti-BoCD5, anti-BoCD8, anti-WC1-N2, and anti-IL-2Rα単クローン性抗体を用いて、単および

二重染色を施してフローサイトメトリーにより解析した。同時に腫瘍組織の凍結切片を作製し、同様の抗体を用いて免疫組織学的に、ホルマリン固定材料をHE染色し病理組織学的にそれぞれ検索した。BLVプロウイルスゲノムを検出するために、腫瘍細胞のDNAを抽出し、BLVプロウイルスゲノムのpX regionをprimerとしてFirst amplificationにprimer A (7,781-7800)とB (8,083-8,102)を、second amplificationにprimer C (7,802-7821)とD (8,062-8,081)を使用し、nested double PCR法によって行った。EBL牛と健康牛の末梢血と脾臓におけるリンパ球サブセットの差異をone sample t-test (Stat View, Abacus, Inc., Berkeley, CA,)により解析した。

形態学的に11症例EBL牛の腫瘍細胞はいずれも円形から多形性を呈する核をもつ中型ないし大型のprolymphocyticなリンパ様細胞であった。免疫組織学染色の結果により全症例の腫瘍細胞がMHC class II陽性で、BoCD11b陽性を示した11症例の中の8症例が同時にBoCD5陽性を示した。BoCD11bとBoCD5両方陰性を呈する1症例があった。このほか9症例がB-B2陽性、8症例がIgG1陽性、7症例が λ light chain陽性を示した。sIgMを示すのはわずか1症例であった。全ての症例はBoCD3, BoCD4, BoCD8, WC1-N2およびIL-2R α 陰性であった。11症例の中に3症例のみが同じphenotypeを呈し、他の症例の間にphenotypeの差異を認めた。フローサイトメトリーの解析も同じ結果を示した。Nested double PCRにより全症例の腫瘍細胞のDNAの中にBLVプロウイルスゲノムが検出された。

3症例EBL牛の脾臓は正常な脾臓の組織構造とほぼ同じであるが、赤脾髄あるいは周辺帯において腫瘍細胞の散在性増殖が認められた。2症例の白脾髄が腫瘍細胞のび慢性増殖によって、圧迫され萎縮していることが認められた。いずれの症例においても腫瘍細胞の濾胞中心性増殖することが認められなかった。EBL牛脾臓中の $\gamma\delta$ Tリンパ球のパーセントが正常牛と比べれば、著しく低下し、形態学的に周辺帯において $\gamma\delta$ Tリンパ球が減少することが認められた。

B-1aおよびB-1b細胞は健康牛の末梢血と脾臓の中に存在することがNaessensら(1992)により証明されているが、申請者の研究によってもB-1a細胞が末梢血、脾臓およびリンパ節の中に存在することを認めた。Schwartzら(1994)はBLVに感染された牛の末梢血中のCD5⁺B細胞とCD5⁻B細胞からBLVプロウイルスを検出した。本研究においても全症例のリンパ肉腫のDNAの中に組み込まれることを証明した。そこで、BLVに誘発されたリンパ肉腫は異なったB細胞系、即ち、B-1a細胞、B-1b細胞およびconventional B細胞から由来するが、おもにB-1細胞から由来であることが示唆された。その原因はB-1細胞が自己再生と長命の性質を持っており、BLVに長期間に持続性感染されているため、conventional B細胞より癌化されやすいと考えられた。

最近、 $\gamma\delta$ Tリンパ球がin vivo造血系統の腫瘍に対して、自然的な免疫力を持つことが証明されているが、今回の研究結果はEBL末期段階に $\gamma\delta$ Tリンパ球が抑制されることを示唆した。脾臓において濾胞中心性の腫瘍性増殖が認められなかったことによって、腫瘍細胞は転移してきたものと考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

ウシ白血病はウシ白血病ウイルスに起因するB細胞リンパ腫である。最近、B細胞はその解剖学的、機能的特徴およびFlow cytometryで検出された細胞表面マーカーによりB-1a, B-1bとconventional B細胞の3種類に分類されている。しかし、地方病性牛白血病(EBL)の腫瘍細胞がどの種類B細胞から由来するのはまだ不明である。

一方、地方病性牛白血病の場合に脾臓がリンパ節とほぼ同じようによく腫瘍細胞に浸潤されるが、この時脾臓におけるリンパ球サブセットの変化および分布についてまだ不明である。

そこで、BLVによって誘発されたリンパ肉腫のphenotypeと細胞由来および脾臓におけるリンパ球サブセットの変化および分布を明らかにすることを目的として実験を行った。

EBLと診断された牛11頭と健康牛2頭を実験動物として使用した。EBL牛の末梢血、腫瘍組織、脾臓および健康牛の末梢血、リンパ節、脾臓を用いて、60%のパーコール比重遠心法によるリンパ球を分離し、anti-MHC class II、anti-B-B2、anti-sIgM、anti-IgG1、anti-IgG2、anti- λ light chain、anti-BoCD11b、anti-BoCD3、anti-BoCD4、anti-BoCD5 およびbiotinylated anti-BoCD5、anti-BoCD8、anti-WC1-N2並びにanti-IL-2Ra単クローン性抗体を用いて、単および二重染色を施してフローサイトメトリーにより解析した。同時に腫瘍組織の凍結切片を作製し、同様の抗体を用いて免疫組織学的に検索した。BLVプロウイルスゲノムの検出を、腫瘍細胞のDNAを抽出し、BLVプロウイルスゲノムのpX regionをprimerとして、nested double PCR法によって行った。EBL牛と健康牛の末梢血と脾臓におけるリンパ球サブセットの差異をone sample t-testにより解析した。

形態学的に11症例EBL牛の腫瘍細胞はいずれも円形から多形性を呈する核をもつ中型ないし大型のpolymorphicなリンパ様細胞であった。免疫組織学染色の結果、B-1a細胞から由来するもの8例、B-1b細胞2例およびconventional B細胞1例であった。このほか9症例がB-B2陽性、8症例がIgG1陽性、7症例が λ light chain陽性を示した。sIgMを示すのはわずか1症例であった。全ての症例はBoCD3、BoCD4、BoCD8、WC1-N2およびIL-2Ra陰性であった。11症例の中に3症例のみが同じphenotypeを呈し、他の症例の間にphenotypeの差異を認めた。フローサイトメトリーの解析も同じ結果を示した。Nested double PCRにより全症例の腫瘍細胞のDNAの中にBLVプロウイルスゲノムが検出された。

3症例のEBL牛の脾臓では組織構造は正常牛とほぼ同じであるが、赤脾髄あるいは周辺帯において腫瘍細胞の散在性増殖が認められた。2症例の白脾髄では腫瘍細胞のび慢性増殖によって、圧迫され萎縮していた。いずれの症例においても腫瘍細胞の濾胞性増殖は認められなかった。EBL牛脾臓中の $\gamma\delta$ Tリンパ球のパーセントが正常牛と比べて、著しく低下し、形態学的に周辺帯において $\gamma\delta$ Tリンパ球が減少していた。

以上、申請者の研究により地方病性ウシ白血病は主にB-1a細胞から由来するが、その他のB細胞から発生する場合もある。また発症牛では $\gamma\delta$ Tリンパ球のパーセントが正常牛と比べて、著しく低下し、腫瘍免疫が低下していることが示唆された。

以上について、審査委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。