

氏 名 (本 籍)	村 上 賢 二 (千葉県)
学 位 の 種 類	博士 (獣医学)
学 位 記 番 号	獣医博甲第 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 6 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	牛白血病ウイルスによる羊の実験的リンパ肉腫 に関する免疫組織学的研究
審 査 委 員	主査 岩 手 大 学 教 授 岡 田 幸 助 副査 岩 手 大 学 教 授 坂 本 司 副査 帯広畜産大学 教 授 広 瀬 恒 夫 副査 東京農工大学 教 授 桐 生 啓 治 副査 岐 阜 大 学 教 授 武 脇 義 副査 岐 阜 大 学 教 授 平 井 克 哉

論 文 の 内 容 の 要 旨

牛白血病は地方病性成牛型、散発性の子牛型、胸腺型および皮膚型に分類される。その中でも地方病性成牛型牛白血病(EBL)は牛白血病ウイルス(BLV)によって起こる牛の遅発性リンパ増殖性腫瘍疾患である。BLVによる羊のリンパ肉腫は、野外ではほとんど認められないが、実験感染では容易に感染し、牛に比較し短期間で高率にリンパ肉腫を起こす。また、牛と同様BLVの標的細胞はB細胞であると考えられている。

著者は、BLV実験感染羊のリンパ肉腫発症における病理発生を明かにするために、BLV感染健康羊およびリンパ肉腫発症羊から得られた浅頸リンパ節および末梢血単核細胞(PBMC)を各種リンパ球に対する単クローン性抗体(MoAb)を用いた免疫組織学的検索、サザンブロット解析およびフローサイトメトリー法により行った。

材料としてはBLV実験感染羊17頭から得られたPBMCおよび浅頸リンパ節を用いた。BLV感染後、それらの病気の進行状態は血液学的所見、臨床的所見およびサザンブロット法を用いたBLVプロウイルスの検索により判定された。対照としてはBLV非感染正常羊7頭のPBMCおよび浅頸リンパ節を用いた。リンパ節における細胞構成は凍結切片を作製し、T細胞表面マーカー(CD5, CD4, CD8, $\gamma\delta$ TCR, T19)およびB細胞表面マーカー(B2, sIgM, MHC class II)に対するMoAbを用いて、免疫組織学的染色を施し検索した。フローサイトメトリー法は血液よりPBMCを分画後、上記のMoAbを用いて免疫蛍光染色を行った。BLV感

染の有無および病気の進行状態の判定は、寒天ゲル内免疫沈降法による抗BLV抗体検索およびサザンブロット法によるBLVプロウイルスの検出により判定した。

BLV感染健康羊におけるリンパ節皮質部には、多くの腫大濾胞が認められ、これらの濾胞は $CD4^+$ T細胞と $sIgM^+$ およびMHC class II $^+$ B細胞からなっていた。BLV感染健康羊の皮質部における $CD4^+$ T細胞の割合は正常羊およびリンパ肉腫発症羊に比較して有意に増加していた($P<0.05$)。リンパ肉腫発症羊のリンパ節は増生した腫瘍細胞に完全に置換されていたが、正常B細胞表面マーカーを持つ小型の萎縮性濾胞が梁柱および被膜下付近に認められた。腫瘍細胞は、 $CD5^-CD4^-CD8^-B2^+$ MHC class II $^+$ $sIgM^+$ のと $CD5^-CD4^-CD8^-B2^+$ MHC class II $^+$ $sIgM^-$ の2つのタイプが存在した。

$CD8^+$ T細胞は萎縮濾胞以外の腫瘍組織全域に散在性に浸潤しており、 $CD4^+$ T細胞は萎縮した濾胞周囲に集簇して認められた。

BLV感染健康羊およびリンパ肉腫発症羊から得られたPBMC中の $\gamma\delta$ T細胞の実数値は正常羊と同様であった。さらに、BLV感染健康羊の浅頸リンパ節皮質部における $\gamma\delta$ T細胞の割合は腫大濾胞の増生によって減少がみられた。リンパ肉腫発症羊の腫瘍化リンパ節では、 $\gamma\delta$ T細胞は腫瘍細胞間全域に散在性に認められた。しかし、リンパ肉腫発症羊1頭にのみ腫瘍化リンパ節の一部に $\gamma\delta$ T細胞の集簇巣が認められた。BLV感染健康羊およびリンパ肉腫発症羊のB細胞にのみBLVプロウイルスの組み込みが認められ、T細胞には認められなかった。

BLV実験感染羊におけるリンパ肉腫形成の病理発生は、1) 腫瘍細胞はBLV感染初期段階においてリンパ節リンパ洞からリンパ組織に流入後定着し、2) 皮質部における反応性腫大濾胞は病気の末期段階において著しく増殖する $CD5^-$ B細胞由来の腫瘍細胞の圧力によって萎縮し、3) 最終的に腫瘍細胞は被膜下および梁柱付近に正常小型萎縮濾胞のみを残してリンパ節組織を完全に置換すると考えられた。腫瘍化リンパ節における $\gamma\delta$ T細胞は、本来存在するリンパ洞隣接部から増殖する腫瘍細胞に押され、それら腫瘍細胞間に拡がって行くことが明かになった。このように、感染羊の病気の状態が進行する間に、リンパ節病変は濾胞性から瀰漫性病変へと移行するものと考えられた。さらに、腫瘍細胞には $CD5^-CD4^-CD8^-B2^+$ MHC class II $^+$ $sIgM^+$ と $CD5^-CD4^-CD8^-B2^+$ MHC class II $^+$ $sIgM^-$ の2つのタイプが存在することが明かになった。

腫瘍組織内において、細胞障害性を持つ $CD8^+$ Tおよびナチュラルキラー様活性を持つ $\gamma\delta$ T細胞がみられたことから、宿主の免疫反応がリンパ肉腫の段階においても維持され、それらの細胞により腫瘍細胞に対する細胞性免疫が働いている可能性が示唆された。

以上のように、BLV実験感染羊におけるリンパ肉腫形成の病理発生に新しい知見が得られた。

審 査 結 果 の 要 旨

牛白血病は地方病性成牛型、散发性の子牛型、胸腺型および皮膚型に分類される。その中でも地方病性成牛型牛白血病(EBL)は牛白血病ウイルス(BLV)によって起こる牛の遅発性リンパ増殖性腫瘍疾患である。BLVによる羊のリンパ肉腫は、野外ではほとんど認められないが、実験感染では容易に感染し、牛に比較し短期間で高率にリンパ肉腫を起こす。また、牛と同様BLVの標的細胞はB細胞であると考えられている。

著者は、BLV実験感染羊のリンパ肉腫発症における病理発生を明らかにするために、BLV感染健康羊およびリンパ肉腫発症羊から得られた浅頸リンパ節および末梢血単核細胞(PBMC)を各種リンパ球に対する単クローン性抗体(MoAb)を用いた免疫組織学的検索、サザンブロット解析およびフローサイトメトリー法により行った。

材料としてはBLV実験感染羊17頭から得られたPBMCおよび浅頸リンパ節を用いた。BLV感染後、それらの病気の進行状態は血液学的所見、臨床的所見およびサザンブロット法を用いたBLVプロウイルスの検索により判定された。対照としてはBLV非感染正常羊7頭のPBMCおよび浅頸リンパ節を用いた。リンパ節における細胞構成は凍結切片を作製し、T細胞表面マーカー(CD5, CD4, CD8, $\gamma\delta$ TCR, T19)およびB細胞表面マーカー(B2, sIgM, MHC class II)に対するMoAbを用いて、免疫組織学的染色を施し検索した。

BLV感染健康羊におけるリンパ節皮質部には、多くの腫大濾胞が認められ、これらの濾胞はCD4⁺T細胞とsIgM⁺およびMHC class II⁺B細胞からなっていた。BLV感染健康羊の皮質部におけるCD4⁺T細胞の割合は正常羊およびリンパ肉腫発症羊に比較して有意に増加していた(P<0.05)。リンパ肉腫発症羊のリンパ節は増生した腫瘍細胞に完全に置換されていたが、正常B細胞表面マーカーを持つ小型の萎縮性濾胞が梁柱および被膜下付近に認められた。腫瘍細胞は、CD5⁻CD4⁻CD8⁻B2⁺MHC class II⁺sIgM⁺のとCD5⁻CD4⁻CD8⁻B2⁺MHC class II⁺sIgM⁻の2つのタイプが存在した。CD8⁺T細胞は萎縮濾胞以外の腫瘍組織全域に散在性に浸潤しており、CD4⁺T細胞は萎縮した濾胞周囲に集簇して認められた。BLV感染健康羊およびリンパ肉腫発症羊から得られたPBMC中の $\gamma\delta$ T細胞の実数値は正常羊と同様であった。リンパ肉腫発症羊の腫瘍化リンパ節では、 $\gamma\delta$ T細胞は腫瘍細胞間全域に散在性に認められた。しかし、リンパ肉腫発症羊1頭にのみ腫瘍化リンパ節の一部に $\gamma\delta$ T細胞の集簇巣が認められた。BLV感染健康羊およびリンパ肉腫発症羊のB細胞にのみBLVプロウイルスの組み込みが認められ、T細胞には認められなかった。BLV実験感染羊におけるリンパ肉腫形成の病理発生は、1) 腫瘍細胞はBLV感染初期段階においてリンパ節リンパ洞からリンパ組織に流入後定着し、2) 皮質部における反応性腫大濾胞は病気の末期段階においてCD5⁻B細胞由来の腫瘍細胞の増殖によって萎縮し、3) 最終的に腫瘍細胞は被膜下および梁柱付近に正常小型萎縮濾胞のみを残してリンパ節組織を完全に置換すると考えられた。このように、感染羊の病気の状態が進行する間に、リンパ節病変は濾胞性から瀰漫性病変へと移行するものと考えられた。さらに、腫瘍細胞にはCD5⁻CD4⁻CD8⁻B2⁺MHC class II⁺sIgM⁺とCD5⁻CD4⁻CD8⁻B2⁺MHC class II⁺sIgM⁻の2つのタイプが存在することが明かになった。腫瘍組織内において、CD8⁺Tおよび $\gamma\delta$ T細胞がみられたことから、宿主の免疫反応がリンパ肉腫の段階においても維持され、それらの細胞により腫瘍細胞に対する細胞性免疫が働いている可能性が示唆された。

以上のように、BLV実験感染羊におけるリンパ肉腫形成の病理発生に新しい知見が得られた。

平成6年1月20日における学位論文審査会および提出論文、ならびに既発表論文(学位論文の基礎となる学術論文2編、その他既発表学術論文4編)を6人の学位論文審査員が慎重審議した結果、岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文としてふさわしいことを認めた。