

論文目録

氏名 村上賢二



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

学位論文の基礎となる学術論文

題目 The $\gamma\delta$ T cell population experimentally infected with bovine leukemia virus

著者名 Murakami K., Okada K., Amanuma H. and Aida Y.

学術雑誌名 Vet. Pathol. に発表・発表予定

(巻・号・頁) 印刷中 (. . ~)

発行年月 _____ 年 月

題目 Immunopathologic study and characterization of the phenotype of transformed cells in sheep with bovine leukemia virus-induced lymphosarcoma

著者名 Murakami K., Aida Y., Kageyama R., Numakunai S., Ohshima K., Okada K. and Ikawa Y.

学術雑誌名 Am. J. Vet. Res. に発表・発表予定

(巻・号・頁) 印刷中 (. . ~)

発行年月 _____ 年 月

既発表学術論文

題 目 Histopathology and distribution of cells harboring bovine leukemia virus (BLV) proviral sequences in ovine lymphosarcoma induced by BLV inoculation

著 者 名 Ohshima K., Aida Y., Kim J.-C., Okada K., Chiba T., Murakami K. and Ikawa Y.

学術雑誌名 J. Vet. Med. Sci. に発表・発表予定

(巻・号・頁) (53 · 2 · 191~199)

発行年月 1991年 月

題 目 Involvement of CD8⁺ T cells in delayed-type hypersensitivity responses against bovine leukemia virus (BLV) induced in sheep vaccinated with recombinant vaccinia virus expressing BLV envelope glycoprotein

著 者 名 Okada K., Ikeyama S., Ohishi K., Suzuki H., Sugimoto M., Chiba T., Murakami K., Davis W. C., Ohshima K. and Ikawa Y.

学術雑誌名 Vet. Pathol. に発表・発表予定

(巻・号・頁) (30 · · 104~110)

発行年月 1993年 月

題 目 Immunohistological study on bovine small intestine including gut
associated lymphoid tissue using monoclonal antibodies to WC1,
TCR1 and BoCD3

著 者 名 Okada K., Suzuki K., Murakami K. and Davis W. C.

学術雑誌名 Vet. Immunol. Immunopathol. に発表・発表予定

(巻・号・頁) 印刷中 (. . ~)

発行年月 _____ 年 月

題 目 Morphogenesis of compound melanosomes in melanoma cells of
gray horse

著 者 名 Ohmuro K., Okada K., Satoh A., Murakami K., Satake S., Asahina M.,
Numakunai S. and Ohshima K.

学術雑誌名 J. Vet. Med. Sci. に発表・発表予定

(巻・号・頁) (55 . 4 . 677~680)

発行年月 _____ 1993年 月

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

1993年

岐阜大学大学院
総合獣医学研究科
(岩手大学)

村上賢二

②

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

村 上 賢 二

目次

I. 緒言	1
II. 実験材料および実験方法	
1. 実験材料	2
2. 単クローン性抗体	3
3. 免疫蛍光染色およびフローサイトメトリー法	3
4. 組織学的および免疫組織学的検索	4
5. 各種単クローン性抗体陽性細胞率の算定	5
6. 免疫グロブリンパニング法によるB細胞およびT細胞の分画	6
7. サザンプロット解析	6
8. 血液および血清学的検索	6
III. 実験結果	
1. BLV感染健康羊から得られた浅頸リンパ節における組織学的および免疫組織学的所見	7
2. リンパ肉腫発症羊から得られた浅頸リンパ節における組織学的および免疫組織学的所見	8
3. BLV感染羊の浅頸リンパ節における $\gamma\delta$ T細胞の分布	10
4. サザンプロット解析	10
5. B細胞およびT細胞におけるBLVプロウイルスDNAの組み込み	11
6. フローサイトメトリー法	12
IV. 考察	12
V. 総括	18
謝辞	20
引用文献	21
図版ならびに付図説明	

本論文で用いられた略号

EBL	: 地方病性成牛型白血病
RNA	: リボ核酸
BLV	: 牛白血病ウイルス
PL	: 持続性リンパ球増多症
PBMC	: 末梢血単核細胞
MoAb	: 単クローン性抗体
FCS	: 牛胎児血清
PBS	: リン酸緩衝液
FITC	: フルオレスセインイソシアン酸
Ig	: 免疫グロブリン
NaN ₃	: アジ化ナトリウム
H-E	: ヘマトキシリン-エオジン
ABC	: アビチン・ビオチン・ペルオキシダーゼ・コンプレックス
DNA	: デオキシリボ核酸
HindIII	: <i>Haemophilus influenzae</i> Rd 由来の制限酵素
Sac I	: <i>Streptomyces achromogenes</i> 由来の制限酵素
EcoRI	: <i>Escherichia coli</i> RY 13 由来の制限酵素
Sal I	: <i>Streptomyces albus</i> G 由来の制限酵素
AtMC	: 異型単核細胞
MNC	: 単核細胞

リンパ球表面抗原

CD4	: ヘルパー T細胞表面抗原
CD5	: 一般 T細胞および一部 B細胞表面抗原
CD8	: 細胞抑制性/細胞障害性 T細胞表面抗原
γδTCR	: T細胞受容体γδ鎖
T19	: γδ T細胞表面抗原
sIgM	: 細胞表面免疫グロブリン M
B2	: B細胞特異抗原
MHC class II	: 主要組織適合抗原クラス II

1. 緒言

牛白血病は地方病性成牛型，散発性の仔牛型，胸腺型および皮膚型に分類される(17)．その中でも地方病性成牛型牛白血病(EBL)は，外因性のレトロウイルスに属するRNA，C型オンコルナウイルスである牛白血病ウイルス(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(19)．我が国における1984年の調査では約200頭発生している．抗体陽性率は1982年の調査で全国平均約5%で，東北地方においては陽性率が高く，約16%となっている(37)．したがって，EBLは乳・肉生産における大きな損失になっている．牛がBLVに感染すると，30-70%が持続性リンパ球増多症(PL)を伴い，10%以下がPLの有無にかかわらず長い潜伏期間の後，リンパ節をはじめ脾臓，心臓，消化管，泌尿生殖器，筋など全身にB細胞性リンパ肉腫がみられ，多中心性発育を示すものがほとんどである(11, 36, 42, 47)．また，EBLの初期病変は，全身のリンパ節にみられ，特に浅頸リンパ節はリンパ肉腫に冒され易いことが知られている(35, 38)．

羊のリンパ肉腫は自然発生例においてほとんど認められない．しかし，BLVは羊や山羊などの牛以外の動物種にも実験的に感染する(15)．BLV感染羊は，潜伏感染ではなく，B細胞における持続感染によってウイルス感染が確立し(1, 23)，牛に比べて短期間(1年から3年)に高率にリンパ肉腫を起こす(1, 10)．羊はPLの病態がみられないことから，PLがBLV感染の特徴的所見とはいえないと思われるが(41)，BLVに対する血清学および病理学的所見は牛の所見と類似している(15, 18, 38, 39)．また，羊は牛よりも安価でかつ飼育も容易であることから，EBLの有用な実験モデルであるといえる．さらに，BLVに近縁なレトロウイルスである成人T細胞白血病ウイルス(HTLV)(44)の研究モデルとしても有用であると考えられる．

近年、羊リンパ球分化分子を認識する単クローン性抗体(MoAb)が開発されつつある。本研究では、羊リンパ球表面抗原に対するMoAbと組織学的、免疫組織学的手法ならびにパニング法を用いて、BLV感染羊の浅頸リンパ節におけるリンパ肉腫の形成過程およびその免疫反応の解析ならびに末梢血単核細胞をBおよびT細胞に分画しBLVの含有の有無を検索し、さらにリンパ肉腫発症羊から得られた腫瘍化リンパ節における腫瘍細胞の表現型の同定を行った。

一方、羊および牛におけるリンパ組織はヒトおよびマウスのリンパ組織と著しく異なり、極めて多くのCD4⁻CD8⁻ "ダブルネガティブ" T細胞を含んでいる(25)。また、これらの細胞は、T細胞受容体(TCR) $\gamma\delta$ 鎖およびT19といわれるリンパ球表面抗原を発現していることも知られている(6, 14, 24, 27, 32)。 $\gamma\delta$ T細胞は脾臓およびリンパ節の洞の細胞が交通する部位に位置しており、それらは外因性細胞に対して細胞障害活性を持つことが知られている(25)。そこで、本研究はBLV感染羊の末梢血およびリンパ節における $\gamma\delta$ T細胞の役割を明らかにするために、 $\gamma\delta$ TCRおよびT19に対するMoAbを使用し、フローサイトメトリー法により末梢血単核細胞(PBMC)における細胞数を、また浅頸リンパ節における $\gamma\delta$ T細胞の分布を免疫組織学的手法を用いて検索した。

II. 実験材料および実験方法

1. 実験材料

Table 1および4に示したように、BLV抗体陰性6ヵ月齢の羊17頭(サフォーク種、コリデール種および雑種)に、BLV感染牛から得られた全血1.0mlを皮内接種し、BLV感染羊を作出した。対照群として3-4年間BLVを接種を

していない7頭の羊(コリデール種およびサフォーク種)を, 免疫組織学的検索に2頭, フローサイトメトリー法に5頭を用いた.

感染羊はBLV接種後, 次のように分類された. 臨床的に正常な羊に比較し血液学および臨床所見で差異が認められず, BLVプロウイルスがリンパ球ゲノムの様々な部位に組込まれているものをBLV感染健康羊, 異常な臨床所見と末梢血リンパ球数の増加および異常単核細胞数ならびにサザンブロット法を用いて末梢血リンパ球ゲノムの同一部位にBLVプロウイルスの組込みがみられるものをリンパ肉腫発症羊と判定した.

2. 単クローン性抗体

使用した羊リンパ球分化抗原に対するMoAbはTable 1, 2および4に示した. MoAb-17D (抗CD4) (26), MoAb-38-65 (抗CD8) (27), MoAb-ST-1(抗CD5) (5)は宮坂昌之博士(東京都臨床医学研究所)から分与を受けた. また, MoAb-pIg45A[抗表面免疫グロブリンM (sIgM)] (8), MoAb-BAQ44A (抗B細胞抗原-B2) (21)およびTH14B[抗主要組織適合抗原(MHC)クラスII] (8)はVeterinary Medical Research and Development社 (Pullman, WA, USA)より購入した. MoAb-86D (抗 $\gamma\delta$ TCR) (24)およびMoAb-197 (抗T 19抗原) (24, 32)はMackay C. R.博士(バーゼル免疫研究所, Basel, Switzerland)から分与を受けた.

3. 免疫蛍光染色およびフローサイトメトリー法

7頭のBLV感染健康羊および2頭のリンパ肉腫発症羊の血液からMiyasaka および Trnka (31)の方法によりPBMCを分画した. 1×10^6 のPBMCを最適濃度に希釈した単クローン性抗体中に4°Cで15分間反応させた後,

5% 牛胎児血清 (FCS) を含んだ燐酸緩衝液 (PBS) で3回洗浄した。その後、フルオレスセインイソチオシアン酸 (FITC) を抱合した山羊の抗マウス Ig(Fab')₂ (Zymed Laboratories Inc.) を用い4°C で15分間反応させた。PBMC は染色液 [1 µg/ml propidium iodide (Sigma), 0.1% NaN₃ および4% FCS/PBS] 中に懸濁し FACSscan システム (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Inc., Mountain, CA, USA) を用いてフローサイトメトリー法を行った。その際、データ解析は Consort 30 ソフトウェア (Becton Dickinson) を用いて Hewlett - Packard 社製コンピュータで行った。

4. 組織学的および免疫組織学的検索

BLV感染健康羊およびリンパ肉腫発症羊 (リンパ球数が20,000 /mm³以上) を放血殺し、詳細な肉眼的検索後、組織を10%中性緩衝ホルマリンに固定した。常法にしたがって、パラフィン包埋後薄切片を作製しヘマトキシリン・エオジン (H-E) 染色を施し組織学的検索に供した。それぞれの浅頸リンパ節は10 x 10 x 3 mmの大きさの3個の組織片とし、そのうちの1個は10%中性緩衝ホルマリンで固定後、常法にしたがってパラフィン包埋を行った。残りの2個の組織片は無固定のままプラスチック包埋皿に入れ、Tissue-Tek O.C.T. Compound (Miles Inc., Elkhart, IN, USA) で包埋し、液体窒素により急速凍結後、-80°C で保存し、免疫組織学的染色およびサザンブロット法に使用した。凍結組織をクリオスタットで厚さ約5 µmに薄切後、薄切片を0.05% poly-L-lysine水溶液で処理したスライドガラス上に伸展し、風乾後、5分間アセトン固定を行った。

免疫組織学的染色は Vectastain ABCキット (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) を用いてアビジン・ビオチン・ペルオキシターゼコ

ンプレックス(ABC)法で行った(4)。反応は全て湿潤箱内で行い、洗浄には全て0.05M Tris-HCl Buffer pH7.6を用いた。

凍結薄切片は2% 中性緩衝ホルマリン/1/15M PBS pH7.2で4分間後固定した。10分間の洗浄後、二次抗体に対するブロッッキングとして28倍希釈の正常馬血清および正常山羊血清で20分間前処理後、最適濃度に希釈したMoAbを室温で30分間反応させた。10分間2回の洗浄後、100倍希釈のビオチン化二次抗体を室温で30分間反応させ、その後、10分間2回洗浄した。続いて、ペルオキシダーゼ発色基質溶液(パーオキシダーゼ発色基質 No.SS01,協和メデックス)に室温で1分から3分間液浸し、発色させた。10分間洗浄後、飽和硫酸銅/0.05M Tris-HCl Buffer pH7.6に10分間液浸し、発色を増強させた。さらに、5分間洗浄後、メチルグリーン溶液で核の対比染色を行い、常法にしたがって、脱水・透徹後バルサムで封入した。ABC法による反応の特異性を確認する目的で一次抗体の代わりに100倍希釈の正常マウス血清を用いて対照とした。

5. 各種単クローン性抗体(MoAb)陽性細胞率の算定

凍結切片におけるMoAb陽性細胞率は、接眼および対物レンズをそれぞれ40および10倍を用いた光学顕微鏡(Olympus BHS, Tokyo)下で写真撮影範囲内(180 x 120 μm 平方)を一単位としてそれぞれの切片の皮質部、髄質部および腫瘍病変部から任意の異なる5ヵ所の部位を細胞を少なくとも200個数え、平均と標準偏差を求めた。また、Mann - Whitney U検定を用いて正常羊、BLV感染健康羊およびリンパ肉腫発症羊の3グループのMoAb陽性細胞率における有意差を求めた。

6. 免疫グロブリンパニング法によるBおよびT細胞の分画

BLV感染健康羊2頭およびリンパ肉腫発症羊1頭から末梢血単核細胞(PBMC)を分画(31)後, plasma/gelatin法(12)で単球を除去した. ウサギ抗羊IgG(H+L)で処理したプレートでパニング法(31)を行い, プレートに吸着した細胞表面免疫グロブリン陽性(sIg⁺)リンパ球と吸着しない(sIg⁻)リンパ球に分画し, BおよびT細胞に分画した. この結果, 吸着した細胞の99.4%は表面免疫グロブリンM(sIgM)をもっていた. また, 残りの細胞はT細胞であった.

7. サザンブロット解析

凍結組織片からのDNAの抽出はドデシル硫酸ナトリウム, フェノール・クロロフォルム法(30)によって行われた. B細胞またはT細胞からのDNAの抽出はHughesら(16)の方法で行われた. 得られた高分子量DNA(10 μg)をHindIIIまたはSac Iで完全消化し0.8%アガロースで電気泳動を行った. 電気泳動後, DNAをハイボンド-Nフィルター(Amersham, Buckinghamshire, UK)に転写し複製BLVプロウイルスDNA(43)をEcoRI/Sal Iで消化した³²Pで標識した6.8 kbのDNA断片をプローブとしてサザンブロット法を行った(46).

8. 血液および血清学的検索

BLV接種羊は定期的に頸静脈より採血し, その血液は赤血球および白血球数を測定し, また血液塗沫May-Giemsa染色標本を作製して, 白血球百分比を算定した. その際, リンパ球様細胞, 異型リンパ球, 白血病細胞を異型単核細胞(atypical mononuclear cell; AtMC)として算定した. また, AtMC

の他に、リンパ球、異型単核細胞、単球を単核細胞(mononuclear cell; MNC)として細胞数を算出した。得られた血清は、寒天ゲル内沈降反応によりBLV glycoprotein 60 (gp60)およびBLV internal protein 24 (p24)の抗原に対する抗体を検出した(34)。対照には病理組織学的に地方病性牛白血病と診断された牛の血清を用いた。その他、シンシチウムアッセイによりBLVの検出を行った(40)。

III. 実験結果

1. BLV感染健康羊から得られた浅頸リンパ節における組織学的および免疫組織学的所見

BLVによって誘発されたリンパ肉腫発症羊のリンパ節における初期病変の組織学的および免疫組織学的特徴を知るために、BLV感染健康羊3頭から得られた浅頸リンパ節を検索した(Table 2 および 3)。組織学的検索では、著しく肥厚した皮質部に胚中心を伴い肥大増数した濾胞が全例に認められた(Fig. 1)。円形核を持った小型細胞が濾胞辺縁帯に認められ、切れ込み核を持った中型から大型の細胞が胚中心に認められた(Fig. 2)。また、免疫組織学的検索でそれらの胚中心にはCD4⁺細胞がsIgMおよびMHC class IIを発現しているリンパ球が存在している部位と同部位に認められた(Fig. 3, 4 および 5)。反対に、B2⁺細胞は胚中心ではなく、濾胞辺縁帯に認められた(Fig. 6)。CD8⁺細胞は、肥大増数した濾胞の周囲にのみ認められた(Fig. 7)。さらに、CD5⁺細胞はCD4およびCD8の様なT細胞表面マーカータを持つ細胞を含んでいる部位と一致して認められた(Fig. 8)。MHC class II⁺細胞は、肥大増数した濾胞全域とリンパ洞に認められた(Fig. 5)。これらの例では、皮質部および髄質部におけるsIgM⁺細胞の割合はBLV抗体陰性正常羊と比

較して数的変化は認められなかったが、皮質部におけるCD4⁺細胞の割合はBLV抗体陰性で臨床的に正常な羊と比較して有意に増加していた(P<0.05)(Table 3).

このように、BLVによって誘発されるリンパ肉腫の初期病変には、皮質部に胚中心を伴った多くの腫大した濾胞が認められ、その胚中心にはB2およびCD8を発現しない、sIgM, MHC class IIおよびCD4を発現する大型細胞および中型のリンパ球が認められた。

2. リンパ肉腫発症羊から得られた浅頸リンパ節における組織学的および免疫組織学的所見

BLV感染によって誘発されたリンパ肉腫における種々のリンパ球サブpopulationの分布を調べ、羊におけるBLVの標的細胞である腫瘍細胞の表現型を知るためにリンパ肉腫発症羊の浅頸リンパ節を用いて組織学的および免疫組織学的検索を行った(Table 2 および 3). H-E 染色切片では、リンパ肉腫発症羊全例で浅頸リンパ節の固有構造は、増殖する前リンパ球性腫瘍細胞によって完全に破壊され置換されていた(Fig. 9). これらの腫瘍細胞は大型または中型で、有糸分裂像は極めて多く認められた(Fig. 10). 免疫組織学的検索でリンパ肉腫発症羊5頭の内の4頭(L1, L2, L4 および L5)は、B細胞に対する細胞の反応性は、sIgM (平均81.6%, Fig. 12), B2 (平均71.4%, Fig. 13)およびMHC class II (平均87.2%, Fig. 14)で、それらの細胞は腫瘍化リンパ節全体に瀰漫性に分布していた。しかしながら、1頭の羊(L3)から得られた腫瘍組織は、B2およびMHC class IIに対する抗体に陽性を示したが(Table 2 および 3, Fig. 15), sIgMに対して陰性を示した(Table 2 および 3, Fig. 16). 一方、CD4 (Fig. 17), CD8 (Fig. 18)および

CD5 (Fig. 19 および 20)のT細胞表面マーカーは腫瘍化リンパ節に少数認められた。したがって、BLVによって誘発される腫瘍はCD5⁻B細胞由来の腫瘍であることが考えられる。

本研究における組織学的検索によって被膜下および梁柱付近に円形の正常リンパ球から構成される濾胞の萎縮が認められた(Fig. 11)。このような萎縮性濾胞に認められた正常細胞は、sIgM, B2およびMHC class IIに対する抗体に強陽性を示したが(Fig. 12, 13および14), CD4, CD8およびCD5に対する抗体には反応性が認められなかった(Fig. 17, 18および19)。一方、多くのCD8⁺細胞は萎縮した濾胞以外の腫瘍化リンパ節全域に広く散在していた(Fig. 18)。また、少数のCD4⁺細胞は散在性に認められ、特に萎縮した濾胞周囲に集簇巢が認められた(Fig. 17)。さらに、CD5⁺細胞は、CD4⁺細胞およびCD8⁺細胞がみられた部位に一致して認められた(Fig. 19)。腫瘍化リンパ節におけるCD4⁺細胞数およびCD5⁺細胞数はそれぞれ5.5%から22.5% (平均13.4±8.9%), 9.5%から19.3% (平均12.5±6.4%)で、BLV感染健康羊および臨床的に正常な羊に比較して有意に低下が認められた(P<0.05)、一方、CD8⁺細胞数は平均21.9±7.0%で、臨床的に正常な羊(平均23.9±3.3%)およびBLV感染健康羊(平均25.1±5.1%)と比較して有意差は認められなかった。さらに、CD4/CD8比は腫瘍部で平均0.6と臨床的に正常な羊の浅頸リンパ節(皮質部1.5, 髓質部0.9)およびBLV感染健康羊(皮質部1.8, 髓質部1.2)と比較して、有意に低下が認められた(P<0.05)。腫瘍組織中のCD4⁺およびCD8⁺細胞が正常または腫瘍化リンパ球であるか否かを調べるために、MoAbで免疫染色後、HE染色を行い再検索を施した。その結果、CD4⁺およびCD8⁺細胞はくびれの無い円形核を持つ小型細胞で形態学的に正常リンパ球に極めて類似しており、これらの細胞は非腫瘍性リ

ンパ球であると考えられた。

3. BLV感染羊の浅頸リンパ節における $\gamma\delta$ T細胞の分布

浅頸リンパ節における $\gamma\delta$ T細胞の分布を調べるためにMoAb-86Dを用いて免疫染色を行った結果 (Fig. 21, 22および 24), 2頭の臨床的に正常な羊では $\gamma\delta$ T細胞は皮質部の辺縁洞に著明に認められ, また皮質部の濾胞周囲にも散在性に認められた (Fig. 21). 臨床的に正常な羊における $\gamma\delta$ T細胞の割合は, 皮質部では $14 \pm 6.9\%$, 髄質部では $6.2 \pm 3.0\%$ であった. BLV感染健康羊2頭では, 組織学的に肥厚した皮質部に胚中心を伴った腫大濾胞の増生が認められ, $\gamma\delta$ T細胞は皮質部の辺縁洞に隣接して認められた. しかし, 腫大濾胞内には $\gamma\delta$ T細胞は認められなかった (Fig. 22). BLV感染健康羊の髄質における $\gamma\delta$ T細胞の割合は $5.3 \pm 1.5\%$ で, 臨床的に正常な羊の割合とほぼ同じであったが, 腫大濾胞の増生が存在する皮質部における $\gamma\delta$ T細胞の割合はそれぞれ 5.4 および 0.4% と臨床的に正常な羊と比較して有意に減少していた ($P < 0.05$).

リンパ肉腫発症羊5頭の浅頸リンパ節は, 高度の腫瘍細胞増殖によって固有構造が完全に消失しており, 少数の $\gamma\delta$ T細胞が完全に腫瘍化したリンパ節全域に広く散在性に認められた (Fig. 23). 腫瘍化リンパ節における $\gamma\delta$ T細胞の割合は $1.7 \pm 1.3\%$ であった. しかし, これらリンパ肉腫発症羊のうち1頭の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 (Fig. 24).

4. サザンブロット解析

Table 2に示したように, リンパ肉腫発症羊全例のリンパ節から得られた

DNAサンプルについてサザンブロット解析を行ったところ、2本の *Hind*III断片が検出されゲノムDNAの中の一カ所にのみBLVプロウイルスが組み込まれていることが示された。したがって、BLVによって誘発される腫瘍組織における腫瘍細胞はCD5⁻B細胞の単一性増殖を示し、CD5⁻CD4⁻CD8⁻B2⁺MHC class II⁺sIgM⁺細胞およびCD5⁻CD4⁻CD8⁻B2⁺MHC class II⁺sIgM⁻細胞の2種類存在することが明らかになった。

5. B細胞およびT細胞におけるBLVプロウイルスDNAの組み込み

BLVによって誘発されるリンパ肉腫の腫瘍細胞はT細胞由来ではなく、起源はCD5⁻B細胞であるという考えから、BおよびT細胞のどちらにBLVプロウイルスが組み込まれているかを検索した。BLV感染健康羊2頭 (A1 および A2) およびリンパ肉腫発症羊1頭 (L1) から得られたPBMCからBおよびT細胞をパニング法で精製し、各サンプルからDNAを抽出し *Sac* I で完全消化後、複製したBLVプロウイルスをプローブとして、細胞DNA中にBLVプロウイルスが組み込まれているか否かを検索した。制限酵素 *Sac* I はBLVのプロウイルスゲノムを5個の断片に切断し、ハイブリダイゼーション上で2つの内部プロウイルス断片(6.5 および 1.3 kb)を検出した(Fig. 25)。全例でsIgM⁻細胞分画にのみBLVプロウイルスゲノムの2つの内部断片が検出された(Fig. 25, Lane 1, 3 および 5)。パニング法で吸着しなかった分画から得られたDNA中(Fig. 25, Lane 2, 4 および 6)または正常リンパ球DNA (Fig. 25, Lane 7 および 8)にはプロウイルスは検出されなかった。この結果から、臨床症状を示さないBLV感染健康羊およびリンパ肉腫発症羊においてT細胞にではなく、B細胞にのみBLVが組み込まれていることが示された。

6. フローサイトメトリー法

臨床的に正常な羊, BLV感染健康羊およびリンパ肉腫発症羊における MoAb-86D, MoAb-197および MoAb-pIg45Aに対するPBMCの陽性率を Table 4に示した.

臨床的に正常な羊のPBMCにおけるsIgM⁺細胞の割合は約23.3%であった. 一方, BLV感染健康羊のsIgM⁺細胞の割合は約55.6%で, sIgM⁺細胞の割合および実数の両者に増加が認められた. また, リンパ肉腫発症羊のPBMCにおけるsIgM⁺細胞の割合は88.0および99.7%と増加していた.

BLV感染健康羊の $\gamma\delta$ TおよびT19⁺細胞の割合および実数は臨床的に正常な羊とほぼ同数であった. また, 2頭のリンパ肉腫発症羊では臨床的に正常な羊に比較して, $\gamma\delta$ TおよびT19⁺細胞の割合は減少していたが, それらの細胞を実数で比較すると臨床的に正常な羊と比較して有意差は認められなかった.

IV. 考 察

本研究によって, BLV感染羊におけるリンパ肉腫初期病変および腫瘍化リンパ組織における詳細な形態学的変化ならびにリンパ球サブポピュレーションの分布に関する新しい知見が得られた. さらに, BLVプロウイルスを持ち単一の増殖細胞からなるリンパ肉腫であると判定された発症羊5頭から得られた腫瘍化リンパ節を検索したところ, 5頭中4頭の腫瘍細胞はsIgM, B2およびMHC class IIを発現し, CD4, CD8およびCD5は発現していなかった. しかし, その中の1例の腫瘍細胞にはB2およびMHC class IIは陽性を示したが, sIgM, CD4, CD8およびCD5の発現が認められないものも存在した. 一方, CD4, CD8およびCD5を発現するリンパ球は少数のみリン

パ腫発症羊全例から得られた腫瘍組織中に散在性に認められたが、これらの細胞は形態学的に正常リンパ球であると思われた。BLVプロウイルスゲノムは、BLV感染健康羊およびリンパ腫発症羊のいずれにもT細胞ではなくB細胞にのみ検出された。これらのことより、BLVによって誘発される腫瘍化リンパ節における腫瘍細胞の表現型は、羊では $CD5^-CD4^-CD8^-B2^+$ MHC class II⁺sIgM⁺および $CD5^-CD4^-CD8^-B2^+$ MHC class II⁺sIgM⁻の2種類に分類でき、さらに両者は $CD5^-$ B細胞系統に属するものと思われた。

最近の著者による以下の実験結果は本研究における腫瘍細胞の免疫組織学的表現型に対し、より一層の裏付けを与えた。ひとつは、(a)リンパ球分化抗原に対するMoAbを用いた二重染色フローサイトメトリー法によって、リンパ肉腫発症羊の腫瘍組織では $CD5$ を発現していた。 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ および $\gamma\delta TCR^+$ のそれぞれの細胞は減少が認められたが、 $CD5^-sIgM^+$ 細胞はPBMCの85%を占めるに至った(未発表データ)。また、(b)リンパ肉腫発症羊のリンパ節についてフローサイトメトリー法で細胞分画後、BLV塩基配列を用いたpolymerase chain reaction (PCR)法を行ったところ、BLVプロウイルスは $CD5^+$ B細胞中からは検出されず、 $CD5^-$ B細胞からのみ検出された(未発表データ)。また、Aidaら(2)は明らかにBLVによって誘発した牛リンパ肉腫の腫瘍細胞は $CD5^+$ B細胞由来であることを示唆していた。それゆえに、腫瘍化するBLVの標的細胞は牛においては $CD5^+$ B細胞であり、反対に羊では $CD5^-$ B細胞であると思われる。

ヒトの非ホジキンリンパ腫は病変部のリンパ節における形態学的および細胞の特徴に基づいて濾胞性または瀰漫性型に分類されている(22, 29)。牛においては濾胞型リンパ肉腫は極めて稀であると報告されており(45, 49)、さらに、BLVによって誘発されたリンパ肉腫は瀰漫性型であると報告され

ている(17). BLV実験感染羊を用いた本研究では, リンパ肉腫初期病変と診断されたリンパ節には極めて肥厚した皮質に肥大增数した濾胞が多数認められた. 一方, リンパ肉腫発症羊では, リンパ節の組織はB細胞表面マーカーを持つ腫瘍細胞によって瀰漫性に置換されていた. したがって, BLV実験感染羊におけるリンパ肉腫形成における形態学的病理発生は, BLV感染羊は病気の程度が進行する間に, リンパ節の病変は濾胞性病変から瀰漫性病変へと移行する状況を示すものと考えられる.

一般に, 外来の抗原によって刺激を受けたリンパ節は, 腫大した胚中心を伴った反応性濾胞の肥大が認められる(20, 42). 本研究においてもBLV感染健康羊から得られたリンパ節中に腫大した胚中心を伴った肥大濾胞(sIgM⁺, CD4⁺, CD5⁺, MHC class II⁺)細胞が認められた. 多数のCD4⁺細胞は胚中心中のsIgM⁺細胞が存在する部位と同位置に認められた. これらの細胞の密接な位置関係は多くの活性化したリンパ組織中に認められるものと極めて似ているものと思われた. BLV感染健康羊から得られたリンパ節の腫大した濾胞を伴った皮質におけるCD4⁺細胞数は正常羊から得られたリンパ節に比較して増加していた(P<0.05). この結果は, Brandonら(7)が羊にBLVを実験感染させ, フローサイトメトリー法を用いてPBMCを検索したところ, 感染1ヵ月後にCD4⁺細胞の増加が認められたことと一致していた. また, BLV感染牛においてはリンパ節に濾胞性増生が認められ, 腫瘍細胞はリンパ節の髄洞に認められる(33, 35, 45). したがって, これらのことから, 腫瘍関連抗原を発現し抗原性が変異したBLV感染リンパ球ないし腫瘍細胞が末梢血循環からリンパ洞を介してリンパ節に流入することによって宿主がそれらに対して強い免疫反応を行っていることが示唆された. このように, BLV感染健康羊における濾胞の腫大は腫瘍性変化ではなく,

むしろ、BLV感染の初期段階における強力な免疫反応によるものであると
考えられた。

リンパ肉腫発症羊のリンパ節には小型の萎縮性瀘胞が梁柱および被膜下
付近に認められた。これらの瀘胞は主として円形の正常B細胞からなっ
ていた。非腫瘍性CD4⁺細胞はこれらの瀘胞の周囲に集簇して認められ、瀘胞
の周囲以外では散在性または少数巣状性に認められた。この萎縮性瀘胞お
よび周囲組織におけるCD4⁺細胞とB細胞の分布は、正常リンパ節皮質にお
ける瀘胞構造と一致していた。したがって、以下のようなBLV実験感染羊
におけるリンパ肉腫形成に関する新しい病理発生が考えられる。1) 腫瘍
細胞はBLV感染の初期段階においてリンパ節の髄洞に認められることから
(33, 35, 45)、増殖性腫瘍細胞はリンパ洞からリンパ組織に流入し安定する、
2) 腫大した瀘胞は、病気の末期段階において著しく増殖する腫瘍細胞の
圧迫によって萎縮する、3) 最終的にこれらの腫瘍細胞は被膜下および梁
柱付近に正常小型萎縮瀘胞のみを残してリンパ節組織を完全に置換する。

リンパ肉腫発症羊5頭中4頭(L1, L2, L4およびL5)から得られた浅頸リン
パ節における腫瘍細胞はB2, MHC class IIおよびsIgMに対するMoAbに陽性
を示した。しかし、1頭(L3)の腫瘍細胞のみはB2およびMHC class IIに陽
性を示したにもかかわらず、sIgMは陰性を示した。これらの結果より、腫
瘍細胞はB細胞であると思われた。Heeney および Valli (13)はEBLを発症
したBLV感染牛から得られた腫瘍細胞は成熟型B細胞性であると報告して
いる。また、彼ら(13)は腫瘍を形成するBLV感染細胞は、B細胞発生後期、
恐らくは免疫グロブリンアイソタイプ切り替え時期時期にある細胞である
ことを示唆している。さらに、Aidaら(3)は細胞表現型からEBLにおける
腫瘍細胞はsIgM⁺またはsIgM⁻の2つの成熟型B細胞に分類できると報告し

ている。したがって、BLV実験感染リンパ肉腫発症羊における腫瘍細胞は異なった免疫グロブリンアイソタイプ、すなわち、L1,L2,L4およびL5の腫瘍細胞のようにsIgMを発現しているものと、L3のようにsIgM以外の免疫グロブリンを発現している成熟型B細胞が存在することが考えられた。

本研究において、Brandonら(7)が述べているように、非腫瘍性のCD8⁺細胞は萎縮した濾胞以外の部位全体に広く散在性に認められた。さらに、CD4⁺細胞数は、リンパ肉腫発症段階では著明な減少が認められたにもかかわらず、CD8⁺細胞数はリンパ肉腫発症段階まで正常値に近く維持されていた。また、リンパ肉腫発症羊の腫瘍化リンパ節におけるCD4/CD8比は、正常羊のリンパ節と比較して、有意に減少していた(P<0.05)。したがって、Dimmockら(9)が報告しているように、リンパ肉腫発症羊の腫瘍化リンパ節における大部分の細胞はB細胞であり、存在する少数のT細胞はCD4/CD8比が低い状態であった。一方、ヒトの慢性B細胞性白血病におけるCD8⁺細胞の増加を含む種々のT細胞の異常増殖が報告されている(48)。CD8⁺細胞は主に細胞抑制性または細胞障害性の機能を持つ細胞からなり、ヒトの慢性B細胞性白血病では病気の進行にたがって細胞障害性CD8⁺細胞数は多くなる(48)。したがって、CD8⁺T細胞はリンパ肉腫組織におけるBLV感染腫瘍細胞の増殖を障害する機能を有していることが示唆された。

抗 $\gamma\delta$ T細胞レセプターおよびT19抗原に対するMoAbを用いたフローサイトメトリー法によって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細胞の実数値は臨床的に正常な羊とほぼ同様であることが明らかになった。さらに、免疫組織学的検索によって以下のことが明らかになった。1) 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 $\gamma\delta$ T細胞が存在しない腫大した濾胞の増生によって減少がみられた。2) 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。3) また、リンパ肉腫発症羊1頭にのみの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。このように、BLV実験感染によって誘発された腫瘍化リンパ節において、 $\gamma\delta$ T細胞は、本来存在する梁柱および被膜下のリンパ洞隣接部からあたかも増殖する腫瘍細胞間に広がって存在することが明かとなった。

しかし、 $\gamma\delta$ T細胞のBLV感染腫瘍細胞に対する機能的意義については、さらなる研究が必要であると思われた。

V. 総括

牛白血病ウイルス(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。

BLV感染健康羊のリンパ節皮質部は高度に増生し、胚中心を伴った多数の腫大濾胞が認められた。それらの濾胞は、 $CD4^+T$ 、 $sIgM^+$ 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殖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が認められた。次に、BLV実験感染羊における $\gamma\delta T$ 細胞の役割を明らかにするために、PBMCおよび浅頸リンパ節における $\gamma\delta T$ 細胞数ならびに $\gamma\delta T$ 細胞の分布を検索した。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。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。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感染の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広がって行くことが明かとなった。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らかになった。

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示唆された。

謝 辞

本研究を終えるにあたり，研究遂行のため懇篤な指導と本論文を校閲下さいました岐阜大学連合獣医学研究科の岡田幸助教授，広瀬恒夫教授，坂本 司教授，桐生啓治教授，平井克哉教授および武脇 義教授に深甚の謝意を表します。

また，本研究に際し終始懇篤な指導と助言を頂きました大島寛一名誉教授，沼宮内 茂元助手および理化学研究所の間 陽子博士，東京医科歯科大学の井川洋二教授ならびに理化学研究所の天沼 宏博士に深謝いたします。

本研究に貴重な単クローン性抗体を提供して頂いた東京都臨床医学総合研究所の宮坂昌之博士ならびにバーゼル免疫研究所のMackay C. R. 博士に感謝いたします。

最後に，実験に際し多大な援助ならびに有益な御助言を下さいました岩手大学家畜病理学教室の御領政信助教授および教室員各位，理化学研究所の影山礼奈氏に感謝の意を表します。

引用文献

- 1) Aida, Y., Miyasaka, M., Okada, K., Onuma, M., Kogure, S., Suzuki, M., Minoprio, P., Levy, D. and Ikawa, Y. (1989). Further phenotypic characterization of target cells for bovine leukemia virus experimental infection in sheep. *Am. J. Vet. Res.* 50, 1946-1951.
- 2) Aida, Y., Okada, K. and Amanuma, H. (1993). Phenotype and ontogeny of cells carrying a tumor-associated antigen that is expressed on bovine leukemia virus-induced lymphosarcoma. *Cancer Res.* 53, 429-437.
- 3) Aida, Y., Onuma, M., Ogawa, Y., Mikami, T. and Izawa, T. (1985). Tumor-associated antigens on bovine leukemia virus-induced bovine lymphosarcoma identified by monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 45, 1174-1180.
- 4) Bergroth, V. (1983). Comparison of various immunohistochemical methods. *Histochemistry* 77, 177-184.
- 5) Beya, M. F. and Miyasaka, M. (1986). Studies of the differentiation of T lymphocytes in sheep. III. Preliminary characterization of an antigen recognized by two anti-panT-cell monoclonal antibodies. *Immunology* 58, 71-77.

- 6) Borst, J., Griend, R. J., Oostveen, J. W., Ang, S.L., Melief, C. J., Seidman, J. G. and Bolhuis, R. L. H. (1987). A T-cell receptor γ /CD3 complex found on cloned functional lymphocytes. *Nature* 325, 683-688.
- 7) Brandon, R. B., Gatei, M. H., Naif, H. M., Daniel, R. C. W. and Lavin, M. F. (1989). Observations on blood leucocytes and lymphocyte subsets in sheep infected with bovine leukaemia virus: A progressive study. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 23, 15-27.
- 8) Davis, W. C., Marusic, S., Lewin, H. A., Splitter, G. A., Perryman, L. E., McGuire, T. C. and Gorham, J. R. (1987). The development and analysis of species specific and cross reactive monoclonal antibodies to leukocyte differentiation antigens and antigens of the major histocompatibility complex for use in the study of the immune system in cattle and other species. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 15, 337-376.
- 9) Dimmock, C. K., Ward, W. H. and Trueman, K. F. (1990). Lymphocyte subpopulations in sheep with lymphosarcoma resulting from experimental infection with bovine leukaemia virus. *Immunol. Cell Biol.* 68, 45-49.
- 10) Djilali, S., Parodi, A. L., Levy, D. and Cockerell, G. L. (1987). Development of leukemia and lymphosarcoma induced by bovine

leukemia virus in sheep: A hematopathological study. *Leukemia* 1, 777-781.

- 11) Ferrer, J. F., Abt, D. A., Bhatt, D. M. and Marshak, R. R. (1974). Studies on the relationship between infection with bovine C-type virus, leukemia, and persistent lymphocytosis in cattle. *Cancer Res.* 34, 893-900.
- 12) Goddeeris, B. M., Baldwin, C. L., Ole-MoiYoi, O. and Morrison, W. J. (1986). Improved methods for purification and depletion of monocytes from bovine peripheral blood mononuclear cells: Functional evaluation of monocytes in responses to lectins. *J. Immunol. Methods* 89, 165-173.
- 13) Heeney, J. L. and Valli, V. E. O. (1990). Transformed phenotype of enzootic bovine lymphoma reflects differentiation-linked leukemogenesis. *Lab. Invest.* 62, 339-345.
- 14) Hein, W. R., Dudler, L., Beya, M. F., Marcuz, A. and Grossberger, D. (1989). T cell receptor gene expression in sheep: Differential usage of TcR1 in the periphery and thymus. *Eur. J. Immunol.* 19, 2297-2301.
- 15) Hoss, H. E. and Olson, C. (1974). Infectivity of bovine C-type (leukemia) virus for sheep and goats. *Am. J. Vet. Res.* 35, 633-637.

- 16) Hughes, S. H., Shank, P. R., Spector, D. H., Kung, H-J., Bishop, J. M., Vernus, H. E., Vogt, P. K. and Breitma, M. L. (1978).
Provirus of avian sarcoma virus are terminally redundant,
co-extensive with unintegrated linear DNA and integrated at many sites.
Cell 15, 1397 -1410.
- 17) International Committee on Bovine Leukosis (1968). Criteria for the
determination of the normal and leukotic state in cattle. J. Natl. Cancer.
Inst. 41, 243-263.
- 18) Kettmann, R., Mammerickx, M., Portetelle, D., Gregoire, D. and
Burny, A. (1984). Experimental infection of sheep and goat with bovine
leukemia virus: Localization of proviral information in the target cells.
Leukemia Res. 8, 937-944.
- 19) Kettmann, R., Portetelle, D., Mammerickx, M., Cleuter, Y., Dekegel,
D., Galoux, M., Ghysdael, J., Burny, A. and Chantrenne, H. (1976).
Bovine leukemia virus: An exogenous RNA oncogenic virus. Proc.
Natl. Acad. Sci. USA 73, 1014-1018.
- 20) Kosco, M. H., Szakal, A. K. and Tew, J. G. (1988). In vivo
obtained antigen presented by germinal center B cells to T cells in vitro.
J. Immunol. 140, 354-360.

- 21) Larsen, R. A., Monaghan, M. L., Park, Y. H., Hamilton, M. J., Ellis, J. A. and Davis, W. C. (1990). Identification and characterization of monoclonal antibodies reactive with bovine, caprine and ovine T-lymphocyte determinants by flow microfluorimetry. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 25, 195-208.
- 22) Lukes, R. J. and Collins, R. D. (1975). New approaches to the classification of the lymphoma. *Br. J. Cancer* 31(Supple 2), 1-28.
- 23) Lévy, D., Kettmann, R., Marchand, P., Dijali, S. and Parodi, A. L. (1987). Selective tropism of bovine leukemia virus (BLV) for surface immunoglobulin-bearing ovine B lymphocytes. *Leukemia* 1, 463-465.
- 24) Mackay, C. R., Beya, M. F. and Matzinger, P. (1989). $\gamma\delta$ T cells express a unique surface molecule appearing late during thymic development. *Eur. J. Immunol.* 19, 1477-1483.
- 25) Mackay, C. R. and Hein, W. R. (1989). A large proportion of bovine T cells express the $\gamma\delta$ T cell receptor and show a distinct tissue distribution and surface phenotype. *Int. Immunol.* 1, 540-545.
- 26) Mackay, C. R., Hein, W. R., Brown, M. H. and Matzinger, P. (1988). Unusual expression of CD2 in sheep: Implications for T cell interactions. *Eur. J. Immunol.* 18, 1681-1688.

- 27) Mackay, C. R., Maddox, J. F. and Brondon, M. R. (1986). Three distinct subpopulations of sheep T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 16, 19-25.
- 28) Mammerickx, M., Portetelle, D. and Burny, A. (1981). Experimental cross-transmissions of bovine leukemia virus (BLV) between several animal species. *Zbl. Vet. Med. B* 28, 69-81.
- 29) Mann, R. B., Jaffe, E. S., Berard, C. W. (1979). Malignant lymphomas - A conceptual understanding of morphologic diversity - A review. *Am. J. Pathol.* 94, 105-192.
- 30) McKnight, G. S. (1978). The induction of ovalbumin and conalbumin mRNA by estrogen and progesterone in chick oviduct explant cultures. *Cell* 14, 403-413.
- 31) Miyasaka, M. and Trnka, Z. (1985). Sheep as an experimental model for immunology: Immunological techniques in vitro and in vivo. *In* : Lefkovits, I. and Pernis, B. [eds.] *Immunological Methods*, Vol 3, pp. 403-423. Academic Press, New York.
- 32) McClure, S. J., Hein, w. R., Yamaguchi, K., Dudler, L., Beya, M.-F. and Miyasaka, M. (1989). Ontogeny, morphology and tissue

distribution of a unique subset of CD4⁺CD8⁻ sheep T lymphocytes.

Immunol. Cell Biol. 67, 215-221.

- 33) Ohshima, K., Aida, Y., Kim, J. C., Okada, L., Chiba, T., Murakami, K. and Ikawa, Y. (1991). Histopathology and distribution of cells harboring bovine leukemia virus (BLV) proviral sequences in ovine lymphosarcoma induced by BLV inoculation. J. Vet. Med. Sci. 53, 191-199.
- 34) Ohshima, K., Miura, S., Numakunai, S., Yasuda, Y., Takahashi, K., Izawa, F., Ozai, Y. and Omi, K. (1978). Precipitating antibody against internal viral antigen from C-type bovine leukemia virus. Jpn. J. Vet. Sci. 40, 87-91.
- 35) Ohshima, K., Sato, S. and Okada, K. (1982). A pathologic study on initial lesions of enzootic bovine leukosis. Jpn. J. Vet. Sci. 44, 249-257.
- 36) 大島寛一, 高桑一雄, 水野善夫, 吉川 堯 (1986). 牛白血病の概念. *In*:牛白血病診断便覧, pp.5-10. 日本獣医師会, 東京.
- 37) 大島寛一, 高桑一雄, 水野善夫, 吉川 堯 (1986). 我が国における牛白血病の発生状況等について. *In*:牛白血病診断便覧, pp.76-79. 日本獣医師会, 東京.

- 38) Olson, C. (1974). Bovine lymphosarcoma (leukemia) - A synopsis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 165, 630-632.
- 39) Olson, C. and Baumgartener, L. E. (1976). Pathology of lymphosarcoma in sheep induced with bovine leukemia virus. *Cancer Res.* 36, 2365-2373.
- 40) Onuma, M., Watarai, S., Sonoda, M., Mikami, T. and Izawa, T. (1980). Detection of bovine leukemia virus by syncytium assay. *Can. J. Comp. Med. Sci.* 44, 289-293.
- 41) Rogers, R. J., Chung, Y. S., and Dimmock, C. K. (1984). Development of lymphosarcoma in sheep after inoculation with bovine leukosis virus. *Aust. Vet. J.* 61, 196-197.
- 42) Rook, G. (1989). Cell-mediated immune response. *In: Ivan, R., Brostoff, J. and Male, D. [eds.] Immunology*, pp. 9.1-9.14. Gower Medical Publishing, London.
- 43) Sagata, N., Ogawa, Y., Kawamura, J., Onuma, M., Izawa, H. and Ikawa, Y. (1983). Molecular cloning of bovine leukemia virus DNA integrated into the bovine tumor cell genome. *Gene* 26, 1-10.

- 44) Sagata, N., Yasunaga, T., Tsuzuku-Kawamura, J., Onishi, K., Ogawa, Y., and Ikawa, Y. (1985). Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: Its evolutionary relationship to other retrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82, 677-681.
- 45) Smith, H. A. (1965). The pathology of malignant lymphoma in cattle. A study of 1113 cases. *Pathol. Vet.* 2, 68-93.
- 46) Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences in prolymphocytic leukemia. *Br. J. Haematol.* 40, 68-93.
- 47) Takashima, I., Olson, C., Driscoll, D. M. and Baumgartener, L. E. (1977). B-lymphocytes and T-lymphocytes in three types of bovine lymphosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 59, 1205-1209.
- 48) Terstappen, L. W. M. M., De Grooth, B. G., Van Berkel, W., Ten Napel, C. H. H. and Greve, J. (1988). Abnormal distribution of CD8 subpopulatin in B-chronic lymphocytic leukaemia identified by flow cyotmetry. *Leukemia Res.* 12, 551-557.
- 49) Vernau, W., Valli, V. E. O., Dukes, T. W., Jacobs, R. M., Soukri, M. and Heeney, J. L. (1992). Classification of 1,198 Cases of bovine lymphoma using the national cancer institute working formulation for human non-Hodgkin's lymphomas. *Vet. Pathol.* 29, 183-195.

Table 1. Characteristics of bovine leukemia virus (BLV)-infected sheep

Sheep	Breed	Sex	Age at BLV inoculation (month)	Age at slaughter (years)	Antibodies to BLV*		BLV†	Terminal blood cell count/ml			Necropsy and histologic diagnosis
					gp60	p24		Leukocytes	MNC	AtMC	
A1	Cr	F	6	5	+	-	+	7,300	3,360	150	Initial lesion of lymphosarcoma
A2	Su	F	6	5	+	-	+	10,400	5,150	470	Initial lesion of lymphosarcoma
A3	Su	M	6	7	+	-	+	14,900	3,800	220	Initial lesion of lymphosarcoma
L1	Su	F	6	4	+	+	ND	111,300	108,000	101,700	Lymphosarcoma
L2	Su	M	6	6	+	-	+	26,900	20,400	10,500	Lymphosarcoma
L3	Su	M	6	4	+	+	+	482,000	477,200	436,200	Lymphosarcoma
L4	Su	M	6	6	+	-	+	67,600	62,500	48,000	Lymphosarcoma
L5	Co	M	6	4	+	-	+	300,000	295,200	288,600	Lymphosarcoma

* BLV antibody was detected by an immunodiffusion test (- = negative; + = positive results).

† BLV was detected by the syncytium assay (ND = not done).

MNC = Mononuclear cells; AtMC = atypical mononuclear cells; Co = Corridale; Cr = cross-breed; Su = Suffolk; F = female; M = male.

Table 2. Immunohistologic features of superficial cervical lymph nodes from BLV-infected sheep

Sheep	Genomic integration of provirus	Histologic findings	Reactivities of MoAb (Specificity)																				
			Pg45A (anti-IgM)			BAQ44A (anti-B2)			TH14B (anti-MHC II)			17D (anti-CD4)			38-65 (anti-CD8)			ST-1 (anti-CD5)					
			F	PF	Me S	F	PF	Me S	F	PF	Me S	F	PF	Me S	F	PF	Me S	F	PF	Me S			
Normal			F	PF	Me S	F	PF	Me S	F	PF	Me S	F	PF	Me S	F	PF	Me S	F	PF	Me S			
N1	-†, -‡	Normal	++	+	+	+	-	±	++	+	+	±	++	+	-	++	+	±	++	+			
N2	ND, ND	Normal	++	+	+	+	-	++	++	+	+	±	++	+	-	++	+	±	++	+			
BLV-infected but healthy			F	GC	PF	Me S	F	GC	PF	Me S	F	GC	PF	Me S	F	GC	PF	Me S	F	GC	PF	Me S	
A1	+, smear	Hyperplastic and hypertrophic follicles	+	++	±	±	++	±	+	++	+	+	±	++	+	±	++	+	±	++	+		
A2	++, smear	Hyperplastic and hypertrophic follicles	+	++	±	±	++	±	+	++	+	+	±	++	+	±	++	+	±	++	+		
A3	++, smear	Hyperplastic and hypertrophic follicles	+	++	+	+	++	-	+	++	+	+	±	++	+	±	++	+	±	++	±		
Lymphosarcoma			F	PF	N	F	PF	N	F	PF	N	F	PF	N	F	PF	N	F	PF	N			
L1	ND, ND	Lymphosarcoma	√	√	++	√	√	+	√	√	+++	√	√	+	√	√	+	√	√	+	√	√	+
L2	+++; 2 fragments	Lymphosarcoma	++	-	++	++	-	+	++	-	++	±	+	+	-	+	+	±	+	+	±	+	+
L3	+++; 2 fragments	Lymphosarcoma	++	-	-	++	±	±	++	±	++	±	+	±	-	±	+	±	+	±	±	+	±
L4	+++; 2 fragments	Lymphosarcoma	√	√	++	√	√	+++	√	√	+++	√	√	±	√	√	±	√	√	±	√	√	±
L5	+++; 2 fragments	Lymphosarcoma	√	√	++	√	√	+++	√	√	+++	√	√	±	√	√	±	√	√	±	√	√	±

Extracted DNA from lymph nodes were digested with either *Sac* I or *Hind*III and subjected to Southern blot analysis, using the ³²P-labeled 6.8-kb *Eco*RI/*Sac* I fragment of a provirus clone as probe. †DNA was digested with *Sac* I and 2 inner fragments of integrated BLV proviruses were detected by hybridization. Intensity of hybridized inner fragments is indicate. - = None; + = slight; ++ = moderate; +++ = marked. ‡DNA was digested with *Hind*III, which cuts once within the viral genome. Smear indicated that provirus was integrated at many sites in the genomic DNA; 2 fragments indicate that BLV provirus was integrated at 1 site. MoAb=monoclonal antibody; F= Follicle; PF= perfollicular area; Me= medulla; S= sinus; GC= Germinal center; N= neoplastic area. - = None; ± = a few; + = slight; ++ = moderate; +++ = markedly positive. √ = Follicles were not seen.

Table 3. Reactivities of various MoAb with superficial cervical lymph nodes from BLV-free clinically normal and BLV-infected sheep

Sheep	Proportion of cells that reacted positively with MoAb (%)													
	P1g45A (anti-IgM)		BAQ44A (anti-B2)		TH14B (anti-MHC II)		17D (anti-CD4)		38-65 (anti-CD8)		ST-1 (anti-CD5)			
	C	Me	C	Me	C	Me	C	Me	C	Me	C	Me		
Clinically Normal														
N1	32.5±6.7	18.3±1.0	22.3±8.7	11.0±6.1	51.0±3.0	42.5± 7.8	38.3±1.6	23.3±1.5	21.8±0.6	27.0±3.5	62.6±6.5	21.7±5.3		
N2	34.8±6.0	17.5±3.9	27.2±6.5	5.2±1.9	53.7±6.0	21.5± 2.8	35.3±2.8	19.0±1.0	26.0±3.8	23.2±2.8	64.2±4.7	17.9±2.5		
Mean±S.D.	33.7±5.9	17.9±2.6	24.8±7.4	8.1±5.1	52.3±4.5	32.0±12.6	36.8±2.6	21.7±2.6	23.9±3.3	25.1±3.5	63.4±5.1	19.8±4.2		
BLV-infected but healthy														
A1	23.3±3.8	15.7±5.6	32.0±3.0	18.7±2.3	49.8±19.1	26.5±5.4	43.8±8.1	19.7±2.4	30.0±3.3	24.8±1.2	46.0±6.9	22.0±1.0		
A2	39.2±12.3	13.8±6.0	24.0±4.5	5.3±2.1	39.7± 3.0	21.7±5.9	42.0±6.2	22.0±1.3	20.2±3.7	14.3±0.6	28.3±5.4	20.8±1.0		
A3	31.0±1.3	15.8±4.0	25.1±4.5	14.5±1.7	43.3± 6.5	17.8±1.6	46.5±2.2	17.2±0.8	25.2±2.8	12.8±2.3	34.2±2.1	10.0±3.9		
Mean±S.D.	31.2±9.4	15.1±4.7	27.0±5.1	12.8±6.2	44.3±11.1	22.0±5.6	44.1±5.6	19.6±2.5	25.1±5.1	17.3±5.8	36.2±9.0	17.6±6.1		
Lymphosarcoma														
L1	67.5±7.1		55.0± 9.0		86.2±6.8		19.8±11.3		28.5±4.8		19.3± 5.1			
L2	78.7±2.0		52.5± 3.1		80.2±5.5		22.5±10.8		28.8±4.2		16.0±1.3			
L3	7.3±5.9		40.9±15.0		84.7±5.6		12.2± 1.0		21.3±6.8		9.8±1.5			
L4	90.2±1.5		94.2± 1.6		92.4±0.3		5.5± 1.7		15.3±3.8		19.0±5.1			
L5	90.0±0.6		83.7± 8.7		89.8±1.3		8.8± 3.7		17.3±4.1		9.5±3.1			
Mean±S.D.	63.0±34.5		64.9±22.6		86.6±5.9		13.4± 8.9		21.9±7.0		12.5±6.4			

*The proportion of cells with positive reactions for MoAb in sheep with lymphosarcoma was counted in all tumorous areas except small follicles. C=Cortex; Me=medulla; N=neoplastic lesion.

Table 4. Flow-cytometric analysis of the reactivities of monoclonal antibodies with peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from sheep*

Sheep (number)	Total number of PBMC/mm ³ of blood	Proportion (%) and actual number of cells reactive with MoAb					
		$\gamma\delta$ TCR		T19		sIgM	
		%	Number [†]	%	Number [†]	%	Number [†]
BLV-free normal (5)	4,174 \pm 504	6.7 \pm 4.7	280 \pm 24	5.9 \pm 3.3	246 \pm 17	23.3 \pm 3.3	1,056 \pm 17
BLV-infected but healthy (7)	4,141 \pm 857	5.7 \pm 4.1	236 \pm 35	5.0 \pm 3.6	207 \pm 31	55.6 \pm 14.3	2,302 \pm 123
Lymphosarcoma (2)							
L1	46,250	0.1	46	< 0.1	< 46	88.0	40,700
L2	288,600	0.2	577	0.1	289	99.7	287,734

*Values are presented as mean \pm SD.

[†]Number of MoAb-positive cells per mm³ blood.



Fig. 1 BLV感染健康羊 浅頸リンパ節
リンパ濾胞は胚中心を伴って肥大増生が認められる。
H-E染色. ×80.

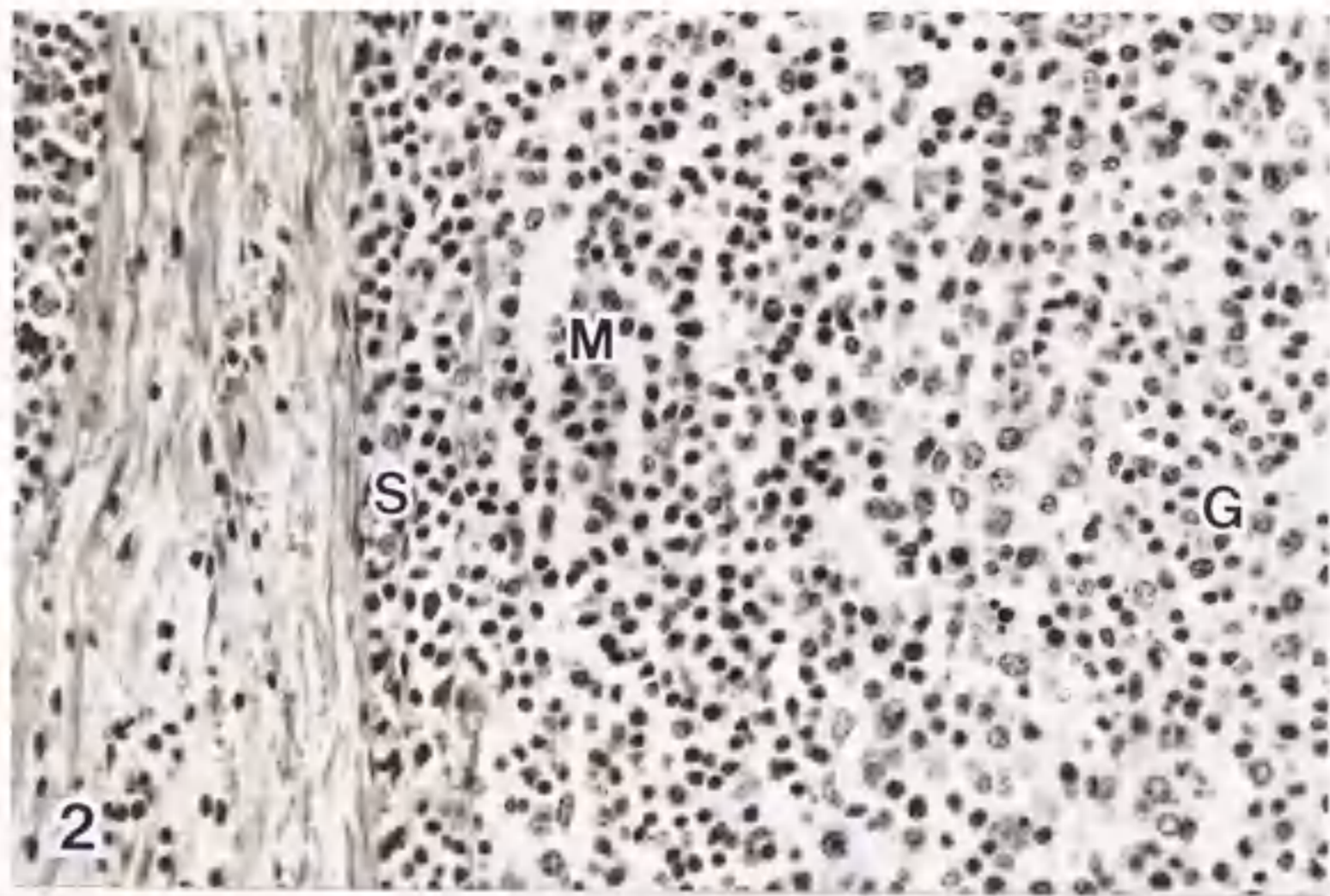


Fig. 2 Fig. 1の拡大像。
リンパ濾胞のマントル層(M)および辺縁洞(S)には円形核を
持った小型リンパ球が認められる。また、リンパ濾胞胚中
心(G)にはくびれ核を持った中型から大型リンパ球が認め
られる。H-E染色. ×400.

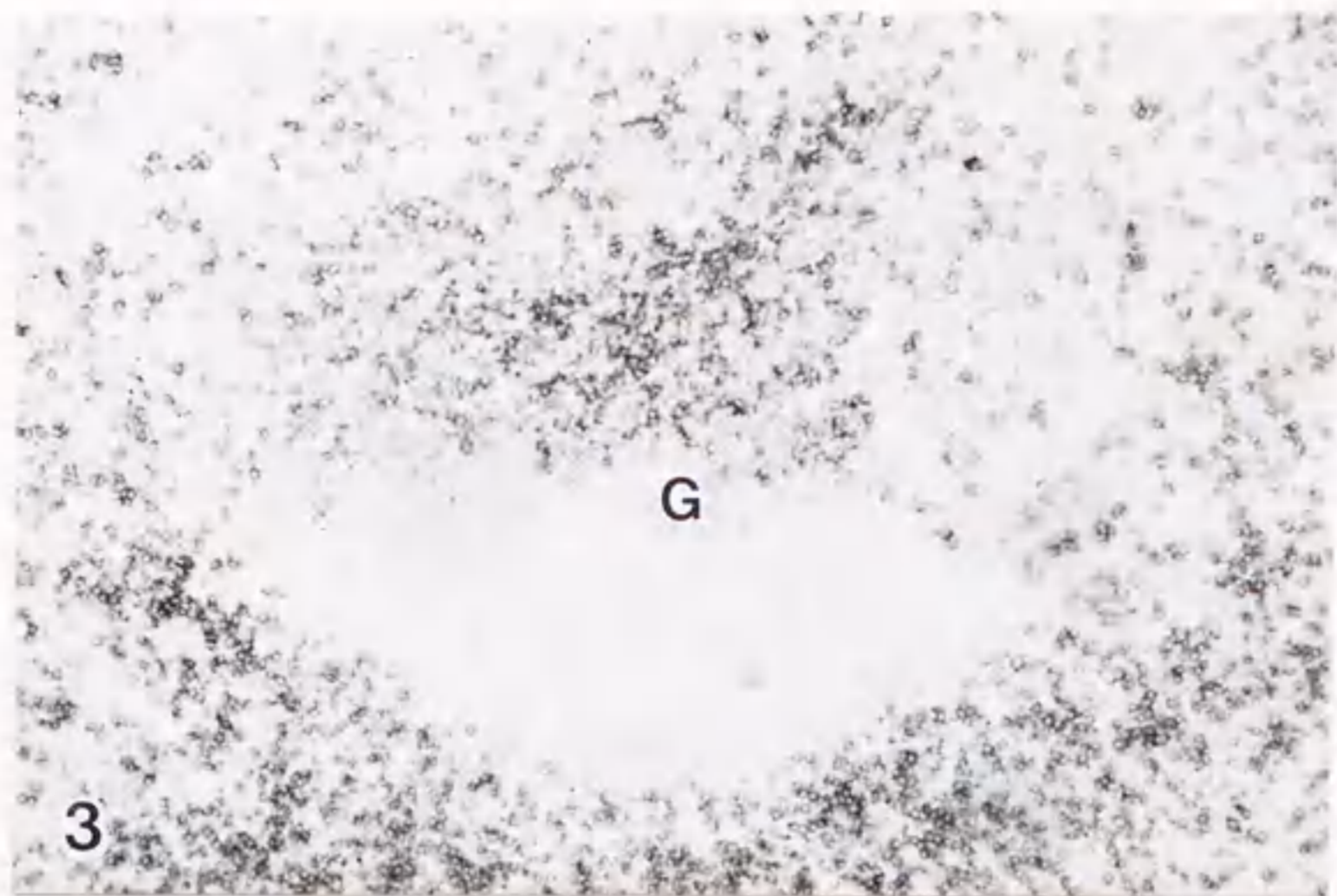


Fig. 3 BLV感染健康羊 浅頸リンパ節 凍結切片
 腫大したリンパ濾胞の胚中心(G)および濾胞周囲に多数の
 CD4陽性細胞が認められる. ABC染色 (MoAb: 17D).
 ×132.

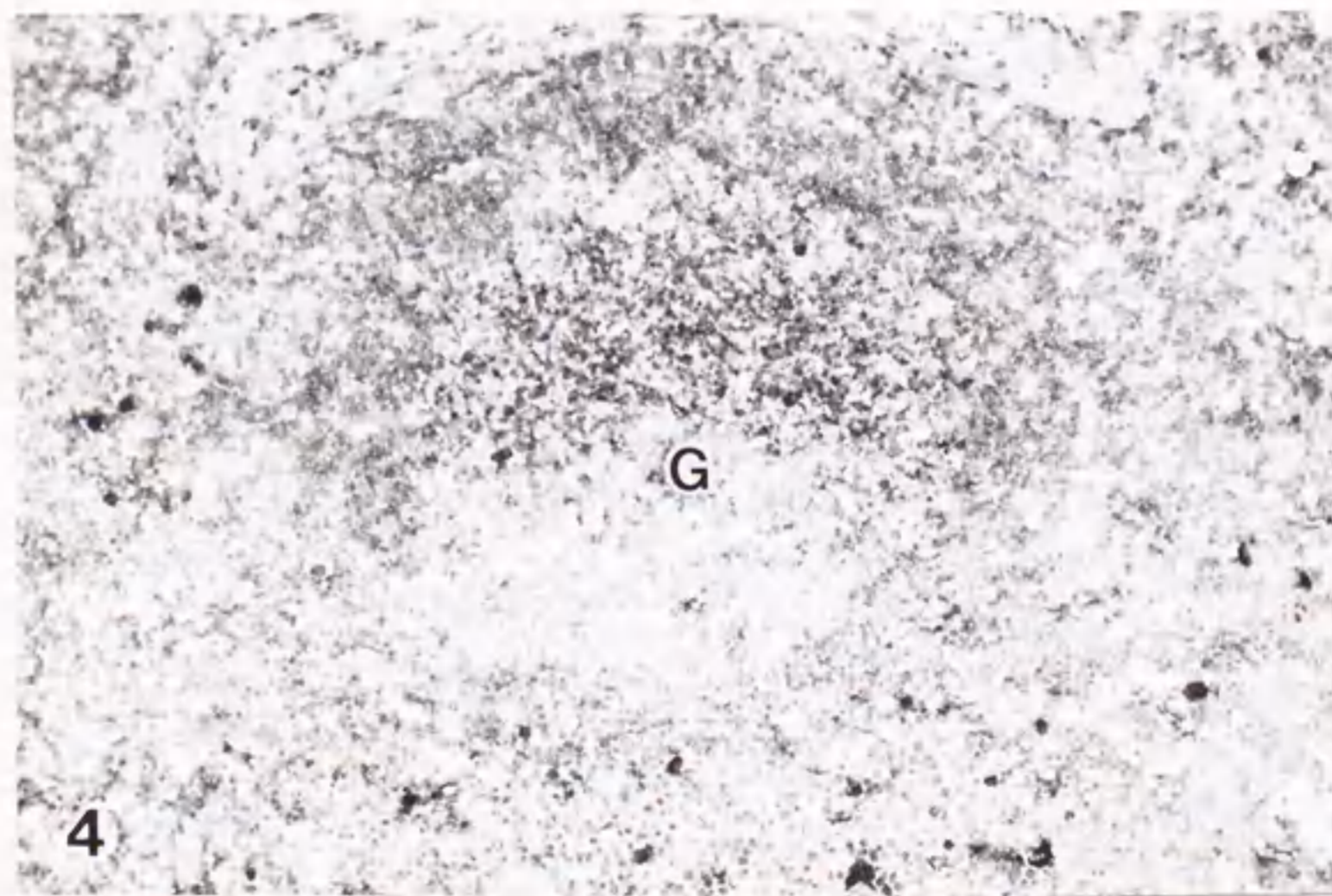


Fig. 4 BLV感染健康羊 浅頸リンパ節 Fig. 3の凍結連続切片
 腫大したリンパ濾胞の胚中心(G)および濾胞周囲に多数の
 sIgM陽性細胞が認められる. ABC染色 (MoAb: pIg45A).
 ×132.

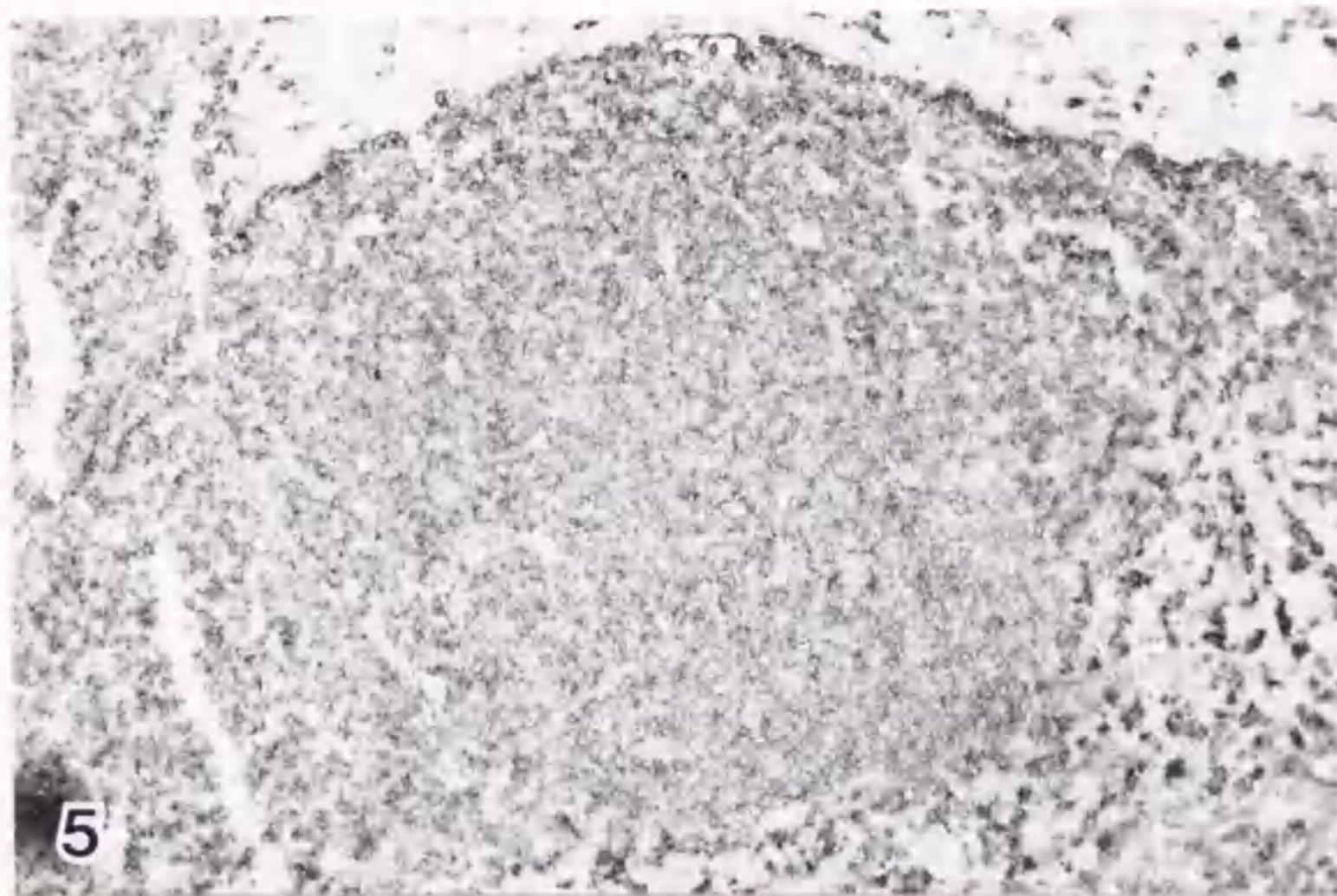


Fig. 5 BLV感染健康羊 浅頸リンパ節 Fig. 3の凍結連続切片
腫大したリンパ濾胞全域および被膜下洞にMHC class II陽
性細胞が認められる. ABC染色 (MoAb: TH14B). $\times 132$.

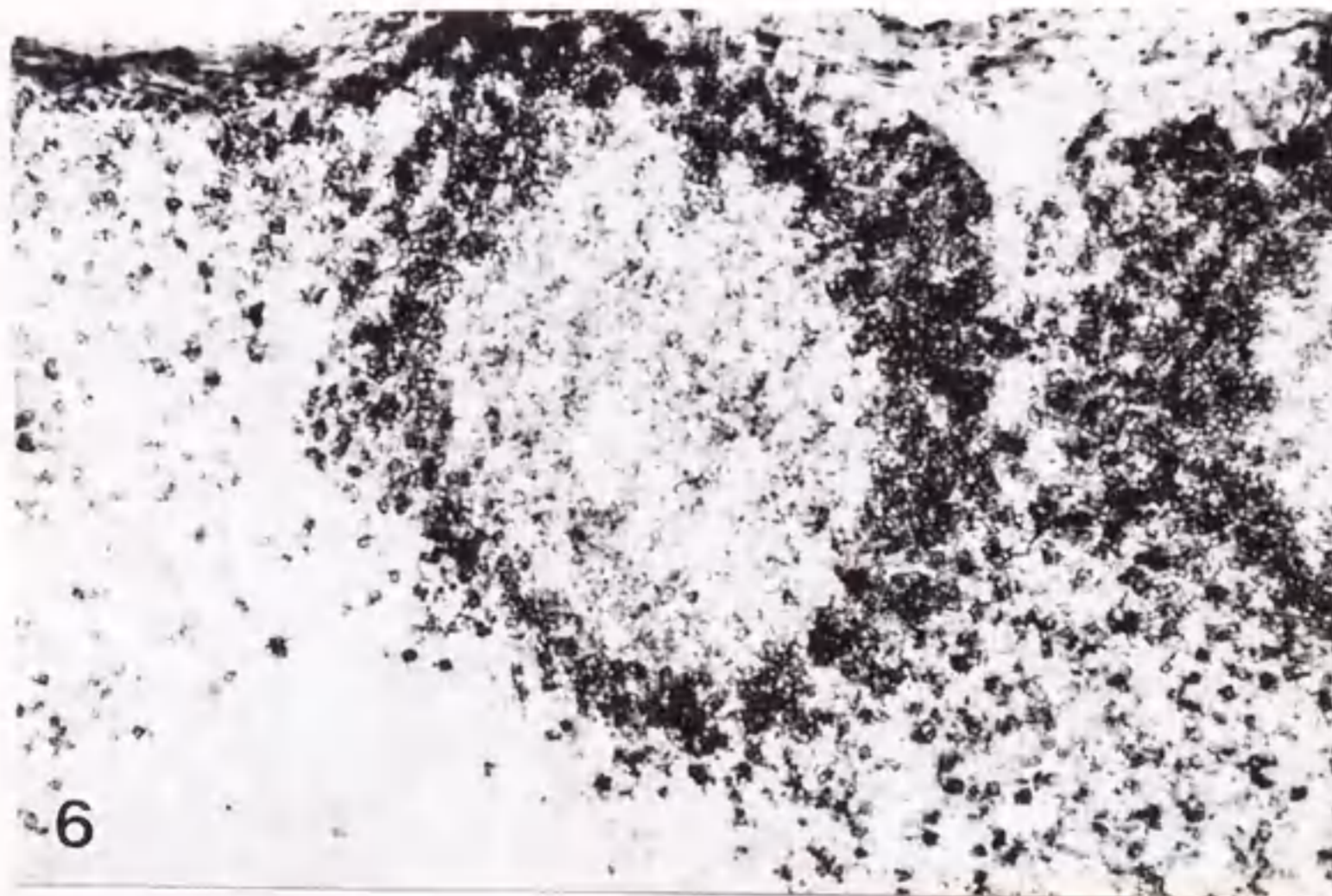


Fig. 6 BLV感染健康羊 浅頸リンパ節 Fig. 3の凍結連続切片
腫大したリンパ濾胞, 特に辺縁帯および被膜下洞にB2陽性
細胞が認められる. ABC染色 (MoAb: BAQ44A). $\times 132$.



Fig. 7 BLV感染健康羊 浅頸リンパ節 Fig. 3の凍結連続切片
 CD8陽性細胞は腫大した濾胞内には認められないが、濾胞
 周囲に多数の陽性細胞が認められる。ABC染色 (MoAb:
 36-65). $\times 132$.

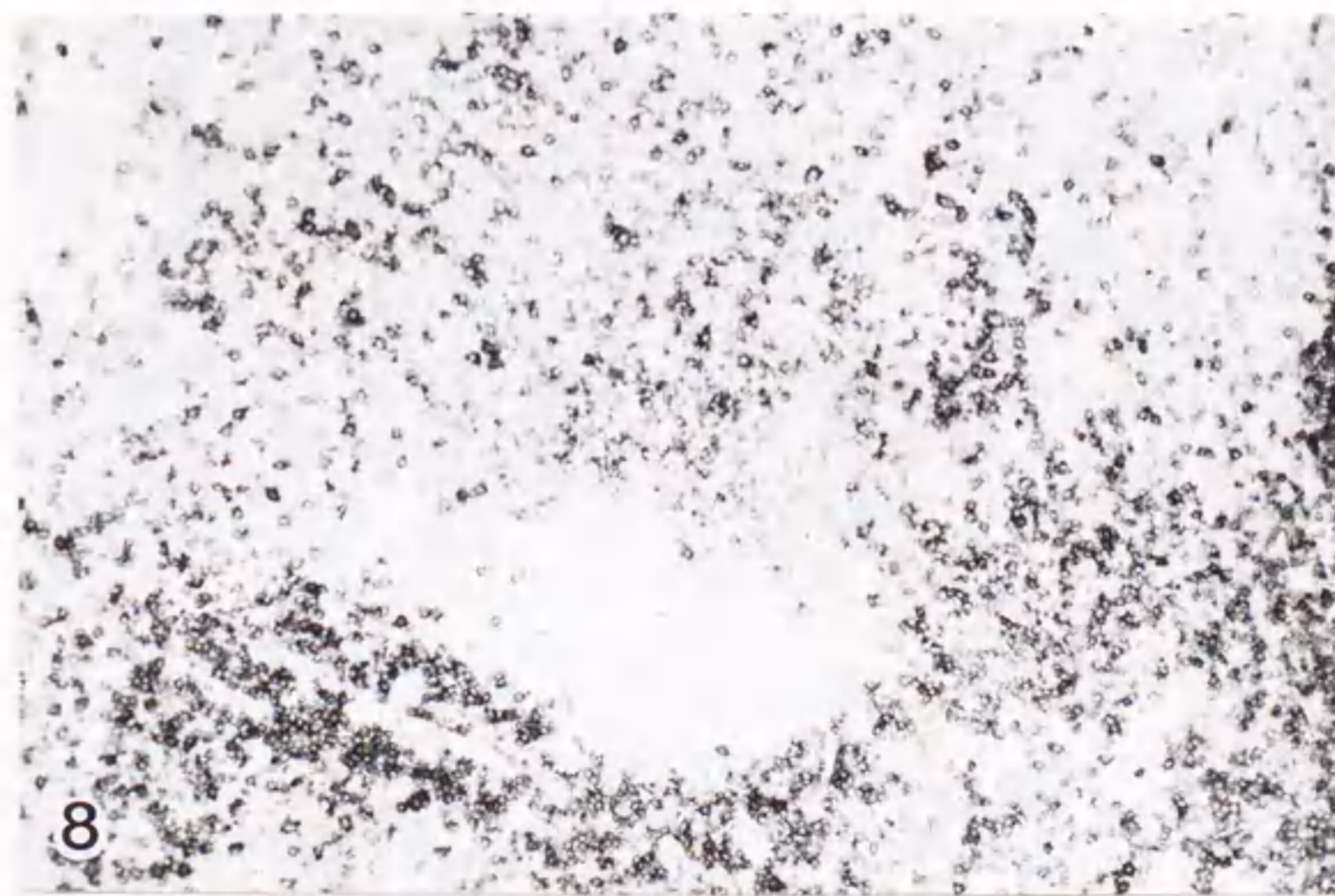


Fig. 8 BLV感染健康羊 浅頸リンパ節 Fig. 3の凍結連続切片
 腫大したリンパ濾胞の胚中心、辺縁帯および濾胞周囲に
 CD5陽性細胞が認められる。ABC染色 (MoAb: ST-1).
 $\times 132$.

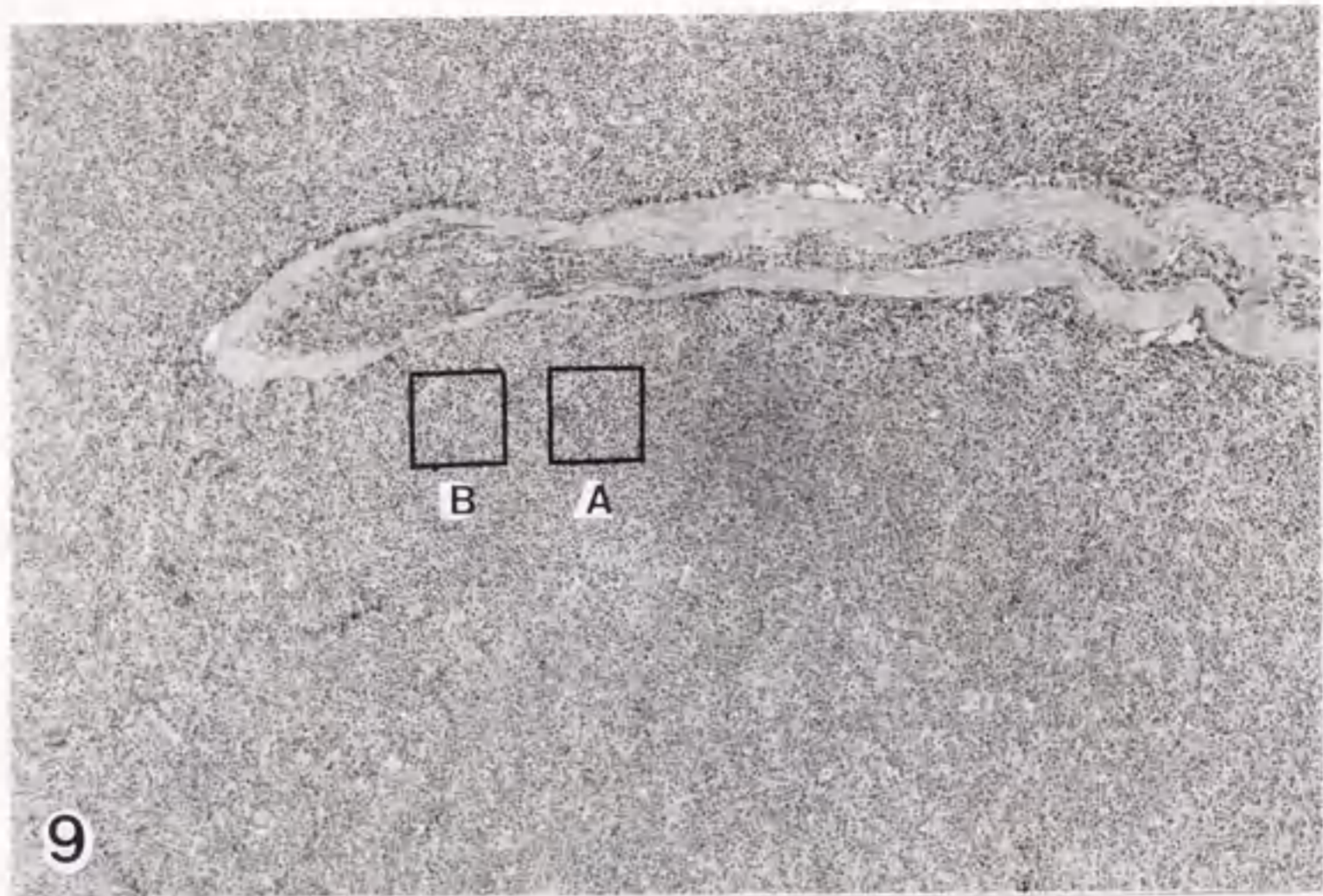


Fig. 9 リンパ肉腫発症羊 浅頸リンパ節
 増殖する腫瘍細胞で組織の固有構造は完全に置換している。
 H-E染色. ×80.

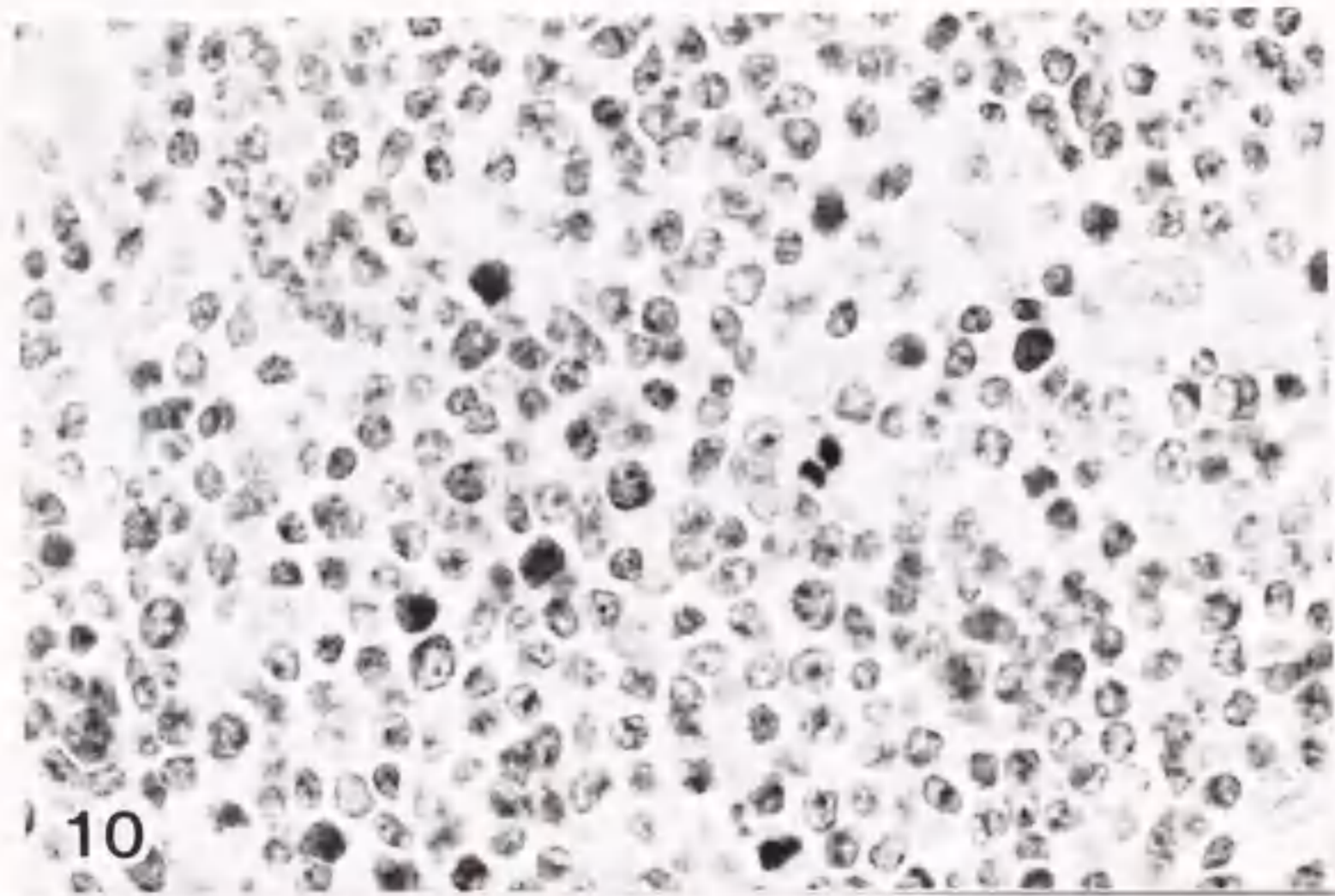


Fig. 10 リンパ肉腫発症羊 浅頸リンパ節
 Fig. 9における範囲(B)の拡大像. 中型の前リンパ球性腫瘍
 細胞が増殖している. また, 有糸分裂像が認められる.
 H-E染色. ×800.

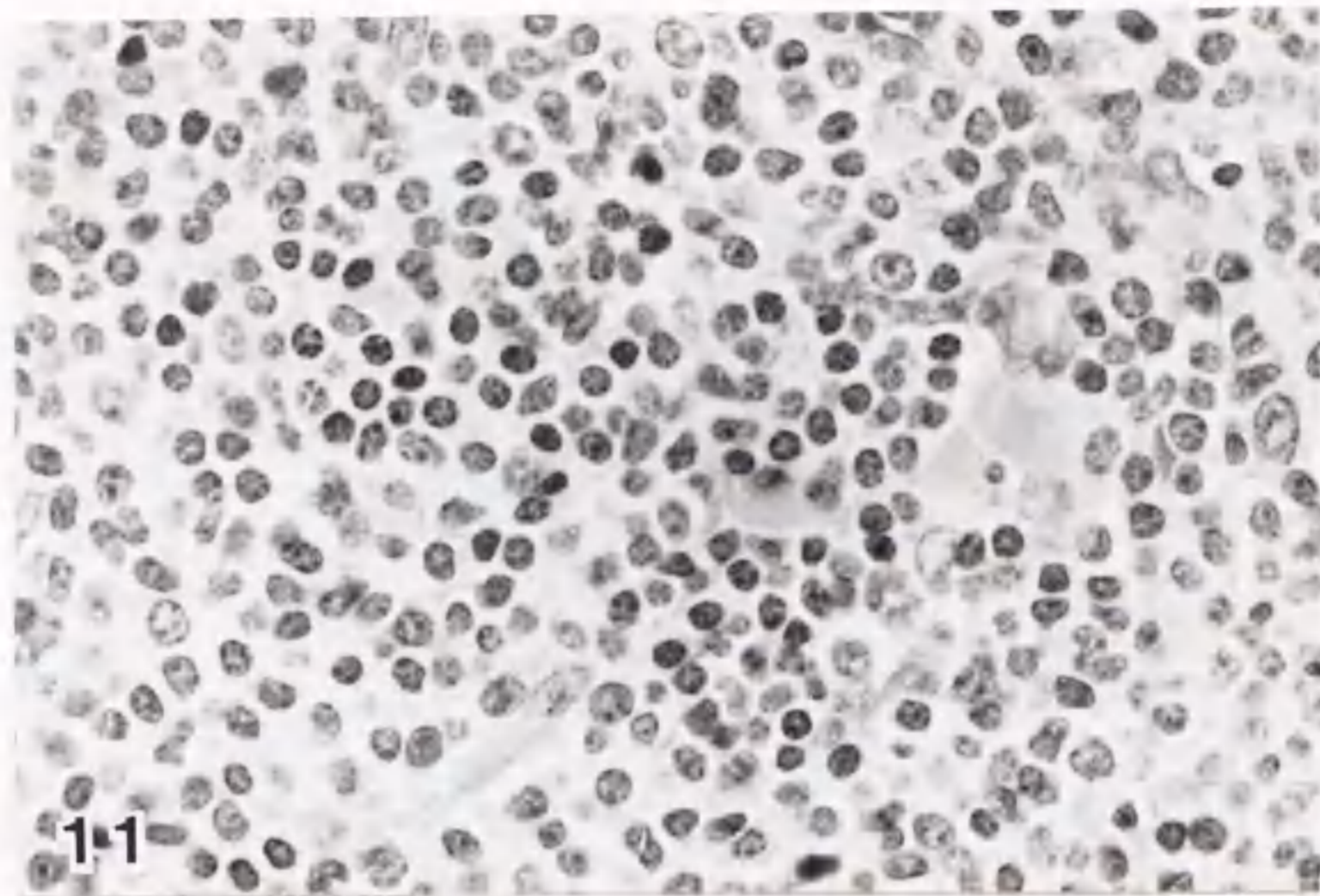


Fig. 11 リンパ肉腫発症羊 浅頸リンパ節

Fig. 9における範囲(A)の拡大像. 小型萎縮性濾胞である円形核を持った小型リンパ球の集簇巣が認められる. 周囲に不整核を持った中型の前リンパ球性腫瘍細胞が増殖しており, それらは正常小型リンパ球と明らかに区別することができる. H-E染色. $\times 800$.

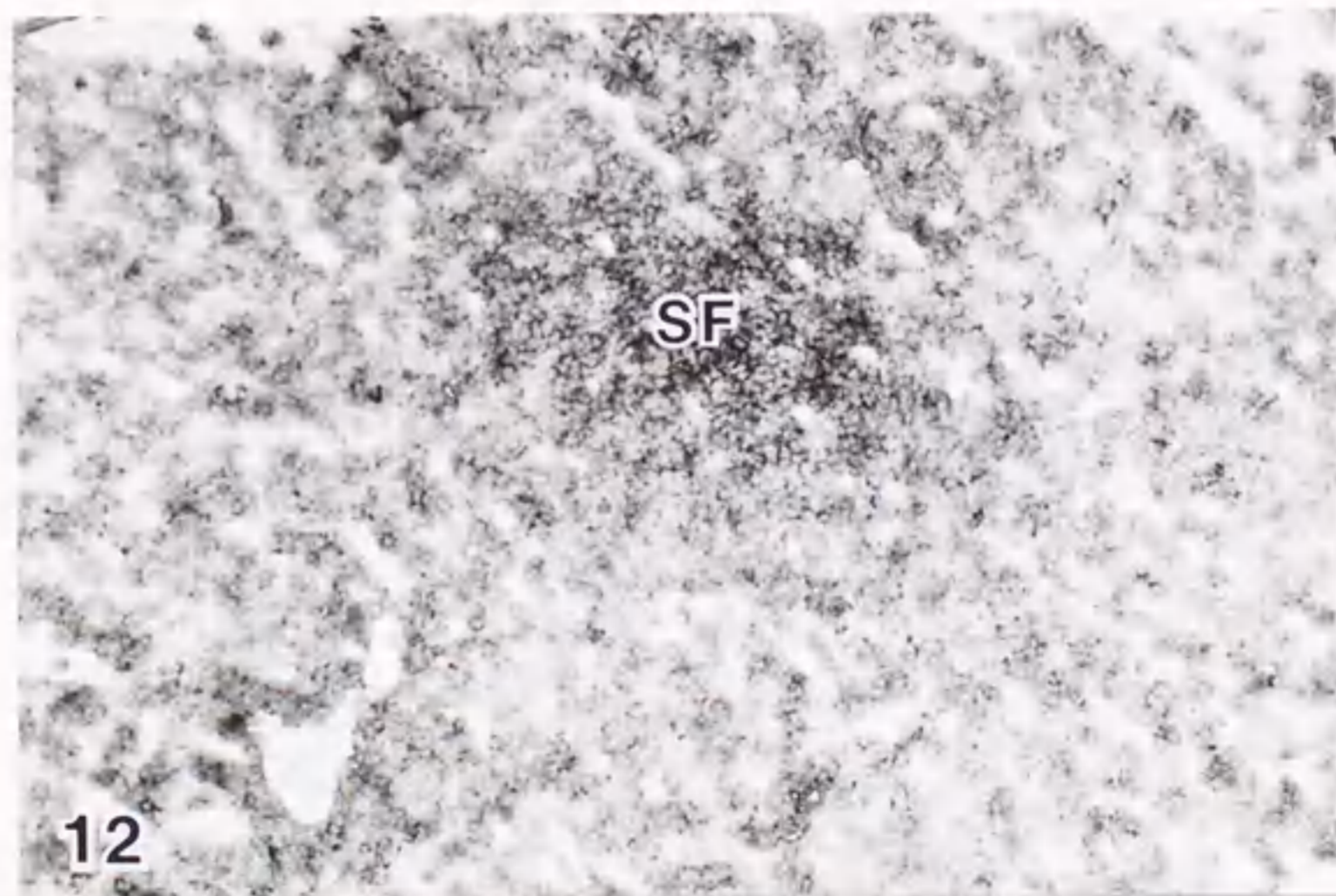


Fig. 12 リンパ肉腫発症羊 浅頸リンパ節 Fig. 11の凍結連続切片
 ほとんどは腫瘍細胞はsIgM陽性を示している. 萎縮した小型濾胞(SF)は著しくsIgM陽性を示す. ABC染色 (MoAb: pIg45A). $\times 132$

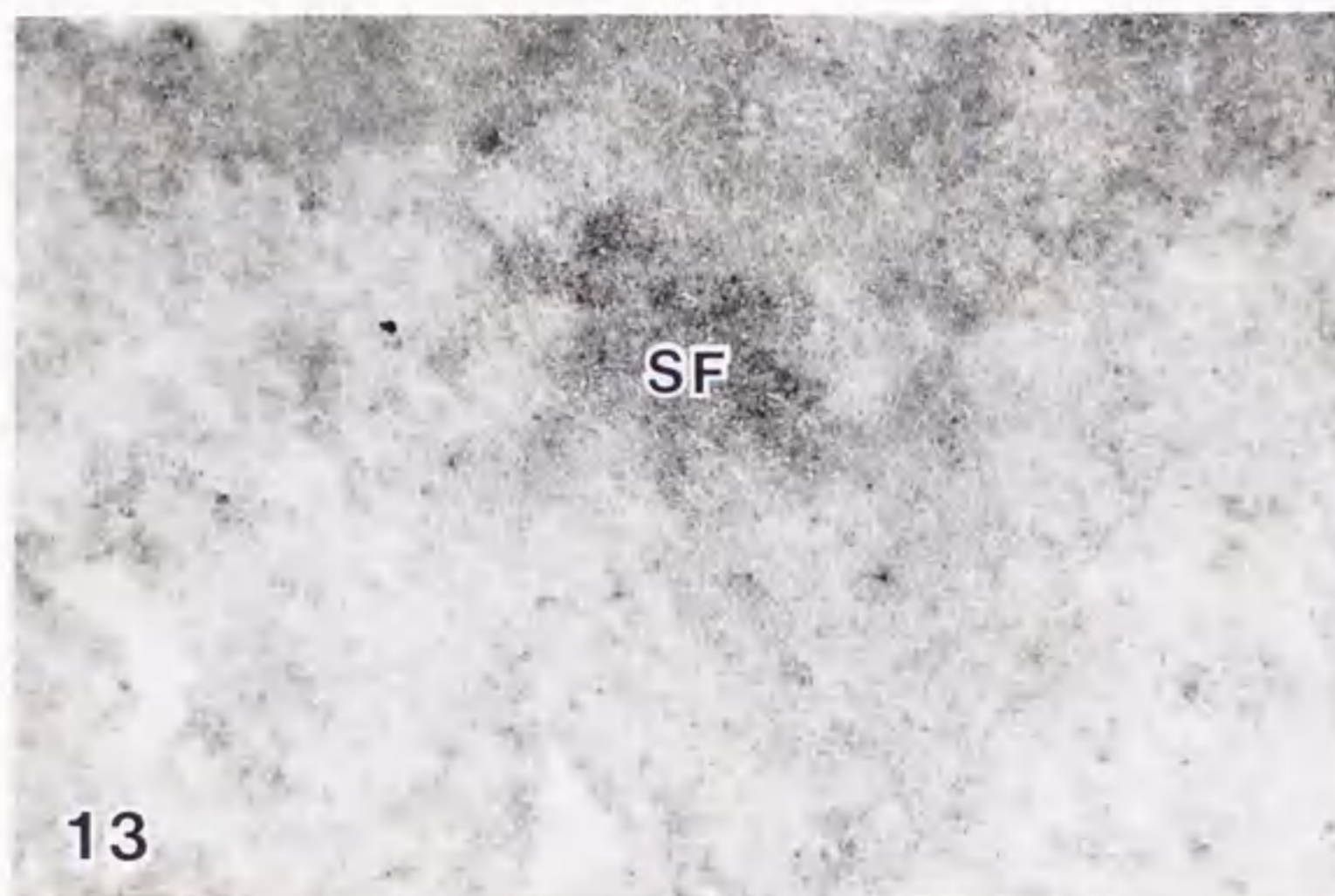


Fig. 13 リンパ肉腫発症羊 浅頸リンパ節 Fig. 11の凍結連続切片
腫瘍組織は瀰漫性にB2中等度陽性を示し、特に小型濾胞
(SF)は著しい陽性を示す。しかし、小型濾胞周囲領域はB2
陰性を示す。ABC染色 (MoAb: BAQ44A). ×132.

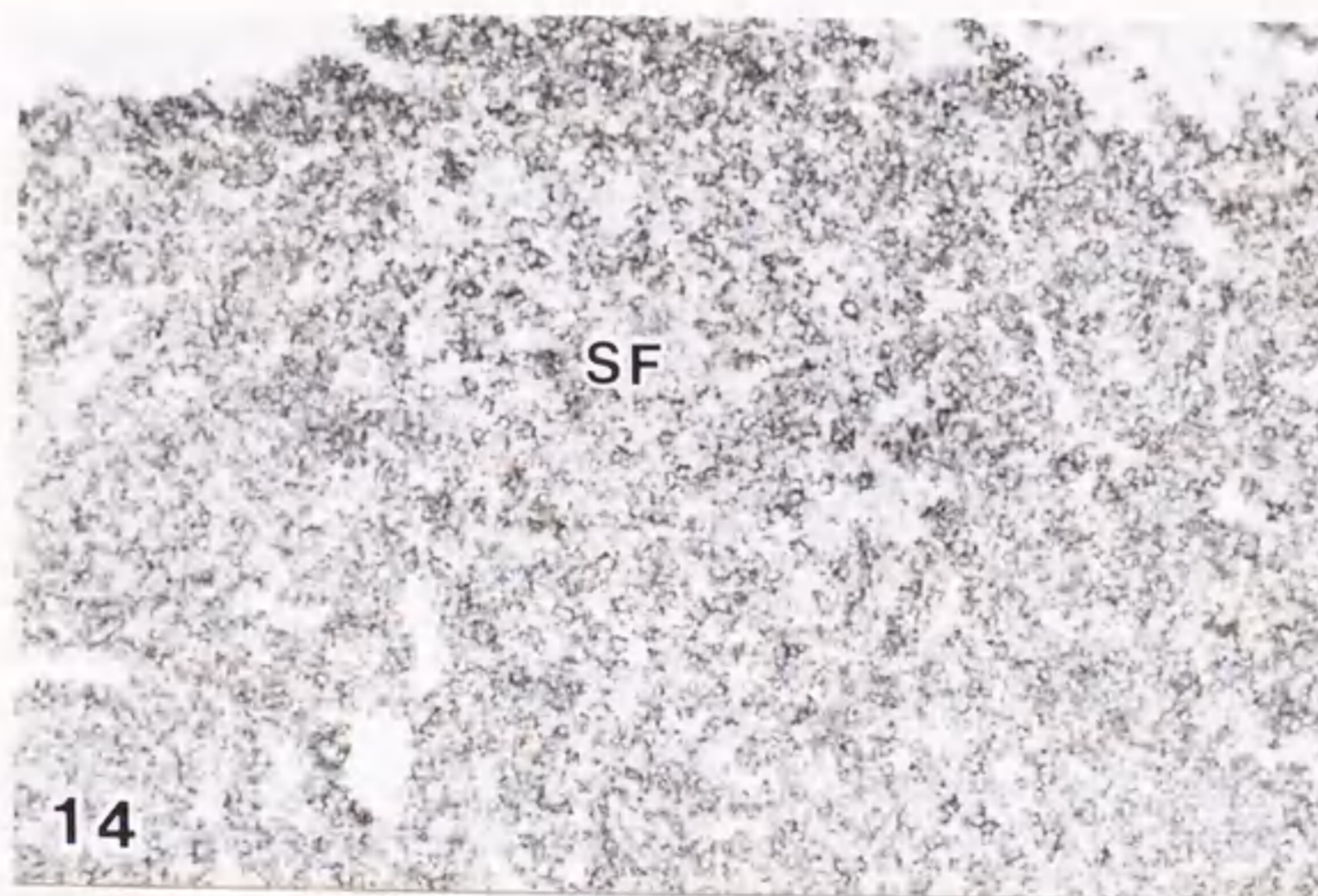


Fig. 14 リンパ肉腫発症羊 浅頸リンパ節 Fig. 11の凍結連続切片
小型濾胞(SF)および腫瘍細胞はMHC class II陽性を示す。
しかし、小型濾胞周囲領域はMHC class II陰性を示す。
ABC染色 (MoAb: TH14B). ×132.

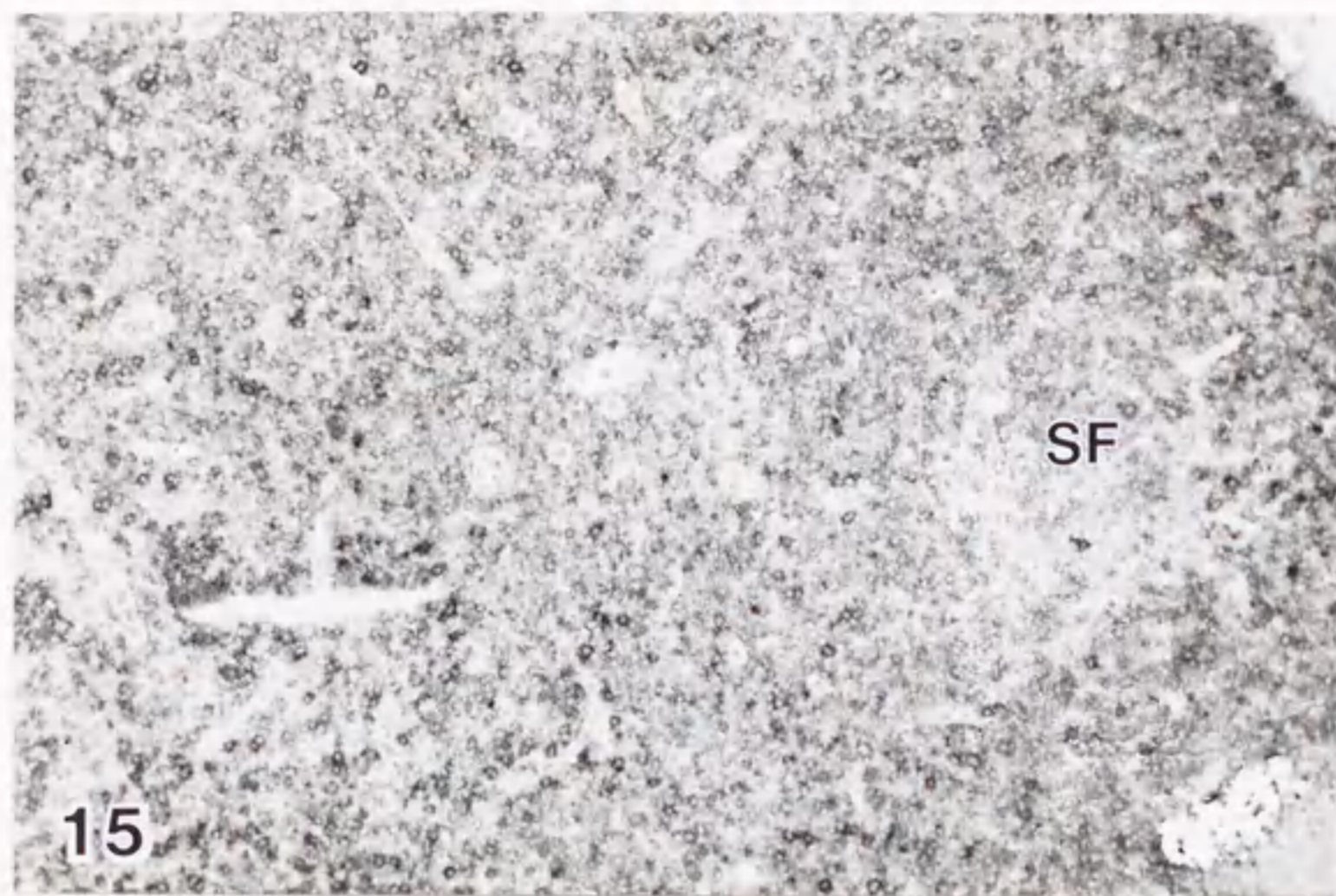


Fig. 15 リンパ肉腫発症羊 (L3) 浅頸リンパ節 凍結切片
腫瘍細胞はMHC class II陽性を示す. ABC染色 (MoAb:
TH14B). ×132



Fig. 16 リンパ肉腫発症羊 (L3) 浅頸リンパ節 Fig. 15の凍結連
続切片 小型濾胞(SF)は著しくsIgM陽性を示すが, 腫瘍細
胞はsIgM陰性を示す. ABC染色 (MoAb: pIg45A). ×132.

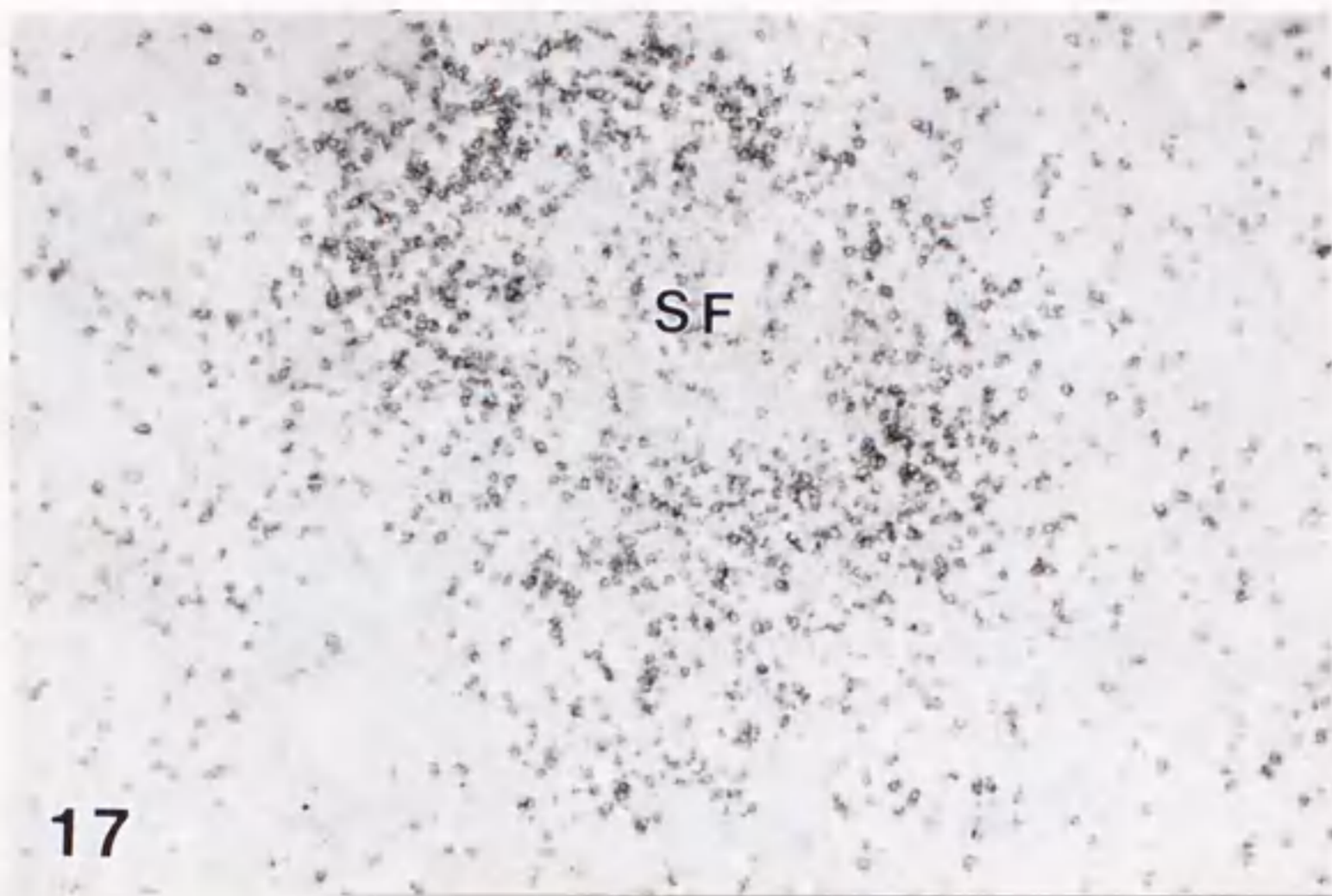


Fig. 17 リンパ肉腫発症羊 浅頸リンパ節 Fig. 11の凍結連続切片
 小型濾胞(SF)周囲にCD4陽性細胞の集簇層および小型濾胞
 内に散在性にCD4陽性細胞が認められる. ABC染色
 (MoAb: 17D). ×132.

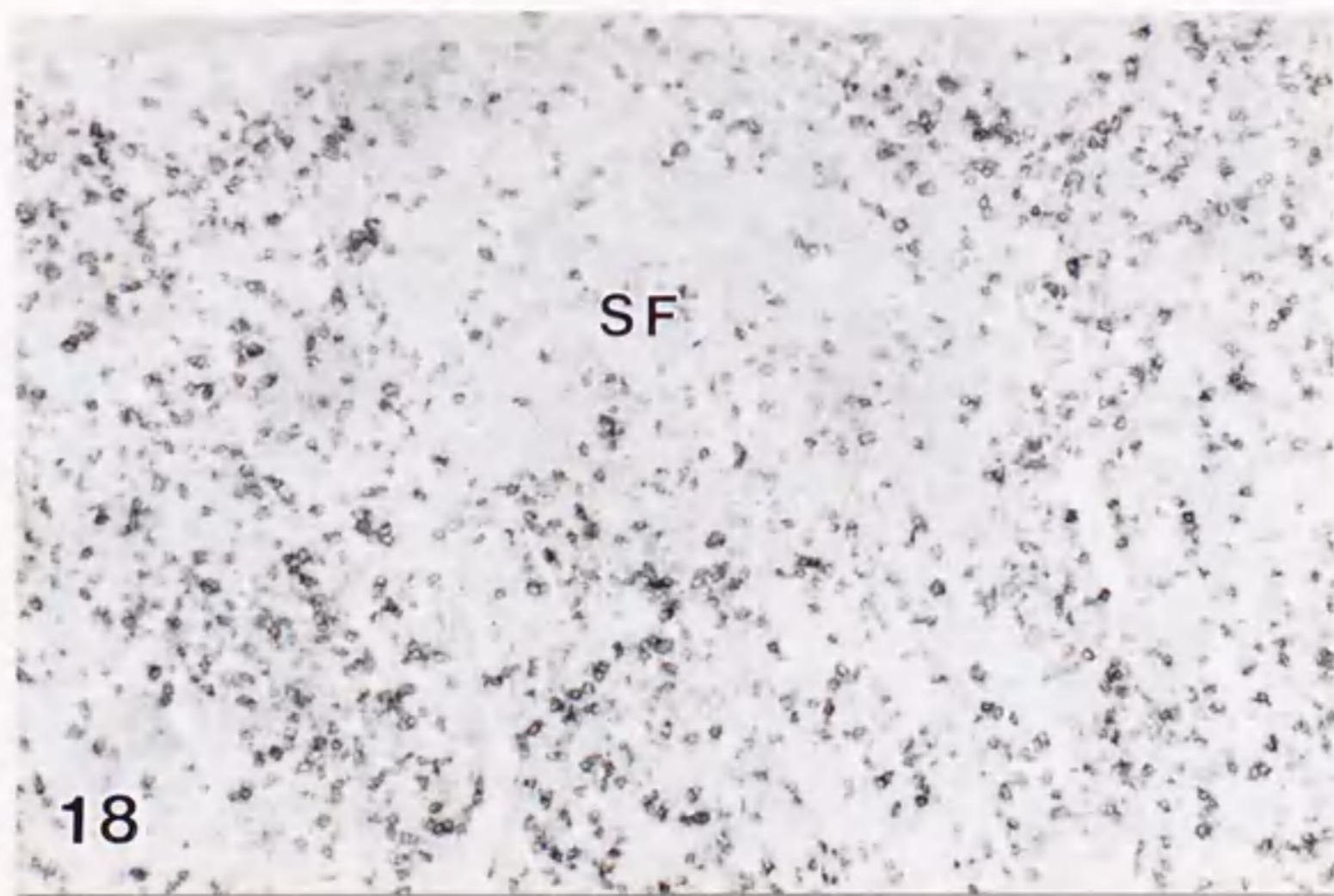


Fig. 18 リンパ肉腫発症羊 浅頸リンパ節 Fig. 11の凍結連続切片
 多数のCD8陽性細胞が腫瘍細胞間に認められる. 小型濾胞
 (SF)内にも少数CD8陽性細胞が認められる. ABC染色
 (MoAb: 38-65). ×132.

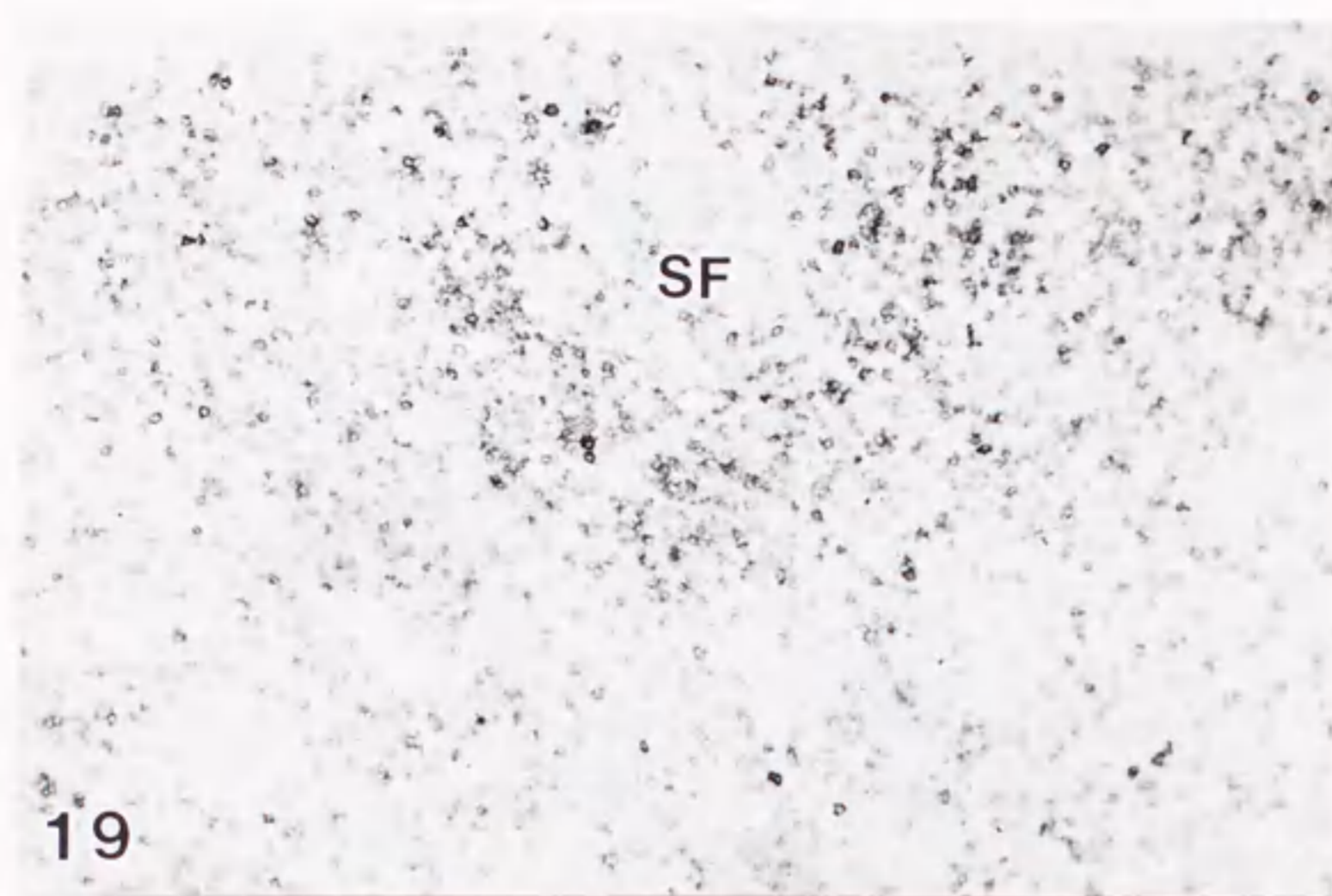


Fig. 19 リンパ肉腫発症羊 浅頸リンパ節 Fig. 11の凍結連続切片
 小型濾胞周囲にCD5陽性細胞の集簇巣および腫瘍細胞間に
 CD5陽性細胞が散在性に認められる. ABC染色 (MoAb:
 ST-1). ×132.



Fig. 20 リンパ肉腫発症羊 浅頸リンパ節 Fig. 10の凍結連続切片
 小型濾胞から離れた腫瘍組織ではCD5陽性細胞は散在性に
 認められる. ABC染色 (MoAb: ST-1). ×132.

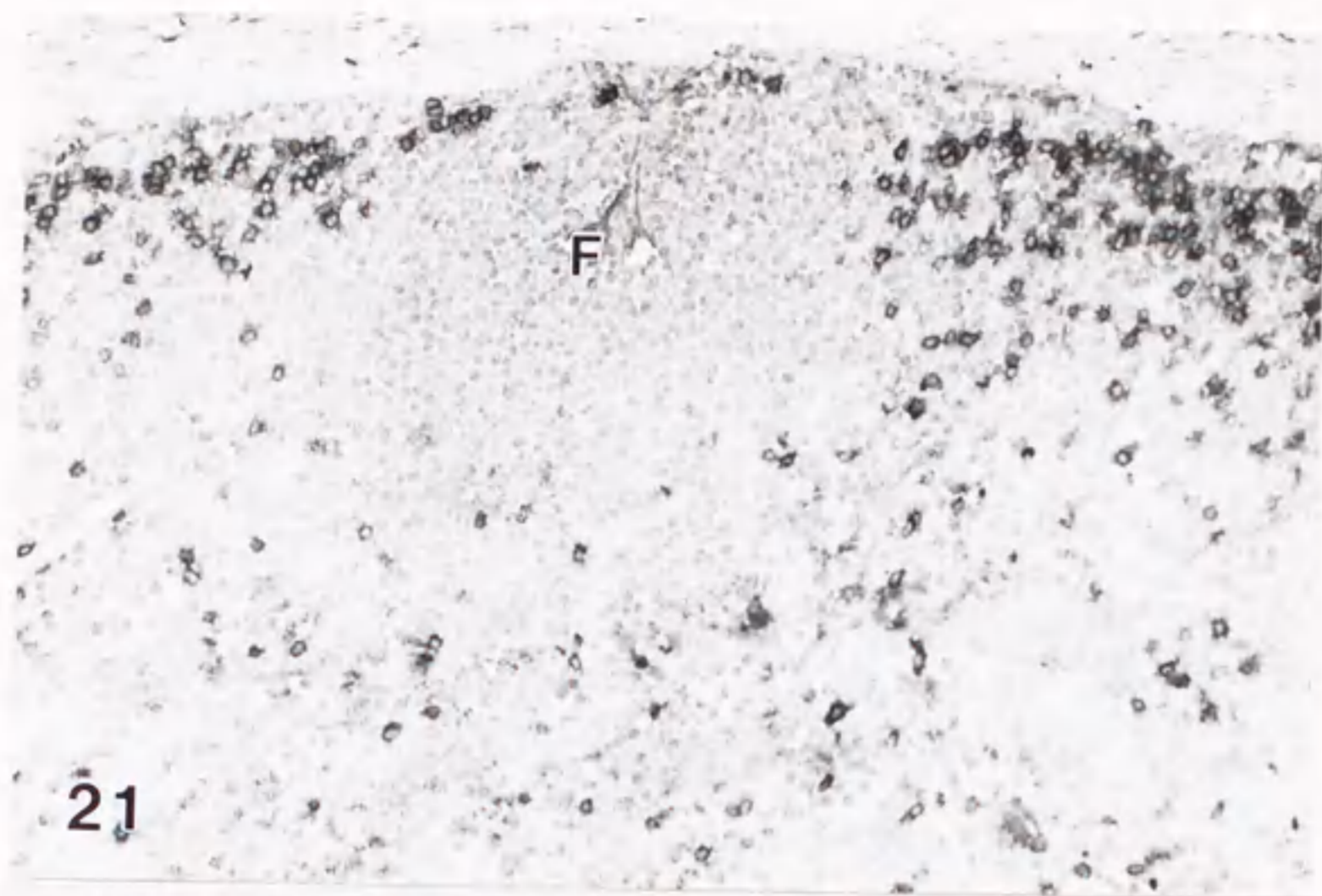


Fig. 21 BLV非感染正常羊 浅頸リンパ節 凍結切片
 $\gamma\delta$ T細胞は濾胞(F)周囲および辺縁洞に存在し、濾胞内には認められない。ABC染色 (MoAb: 86D). $\times 200$.



Fig. 22 BLV感染健康羊 浅頸リンパ節 凍結切片
 皮質部には腫大した濾胞が見られ、 $\gamma\delta$ T細胞は腫大した濾胞の周囲に認められる。ABC染色 (MoAb: 86D). $\times 200$.



Fig. 23 リンパ肉腫発症羊 浅頸リンパ節 凍結切片
リンパ節の固有構造は完全に消失し, $\gamma\delta$ T細胞は腫瘍細胞
間に散在性に認められる. ABC染色 (MoAb: 86D). $\times 200$.

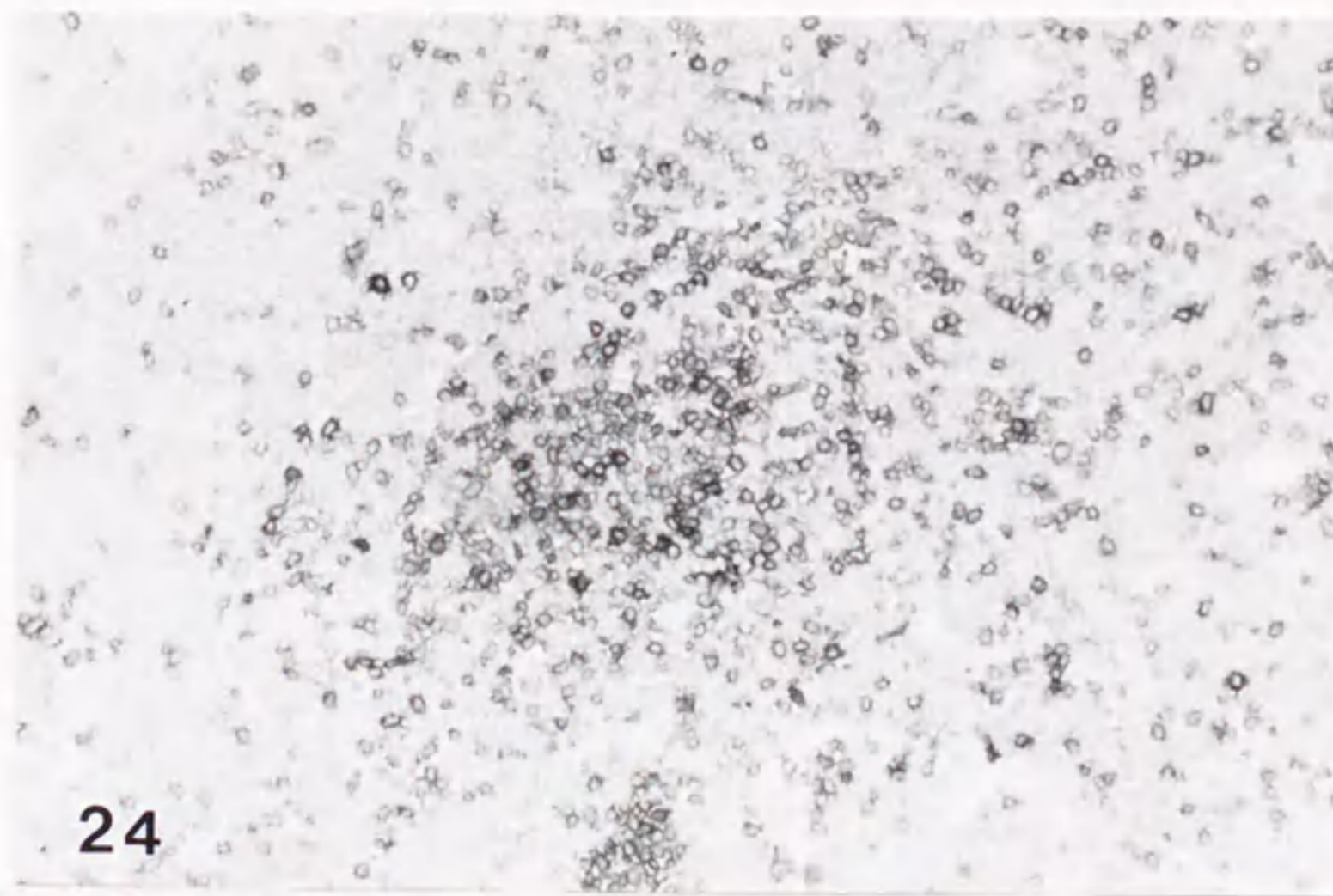


Fig. 24 リンパ肉腫発症羊 浅頸リンパ節 凍結切片
腫瘍細胞間に $\gamma\delta$ T細胞の集簇巣が認められる. ABC染色
(MoAb: 86D). $\times 200$.

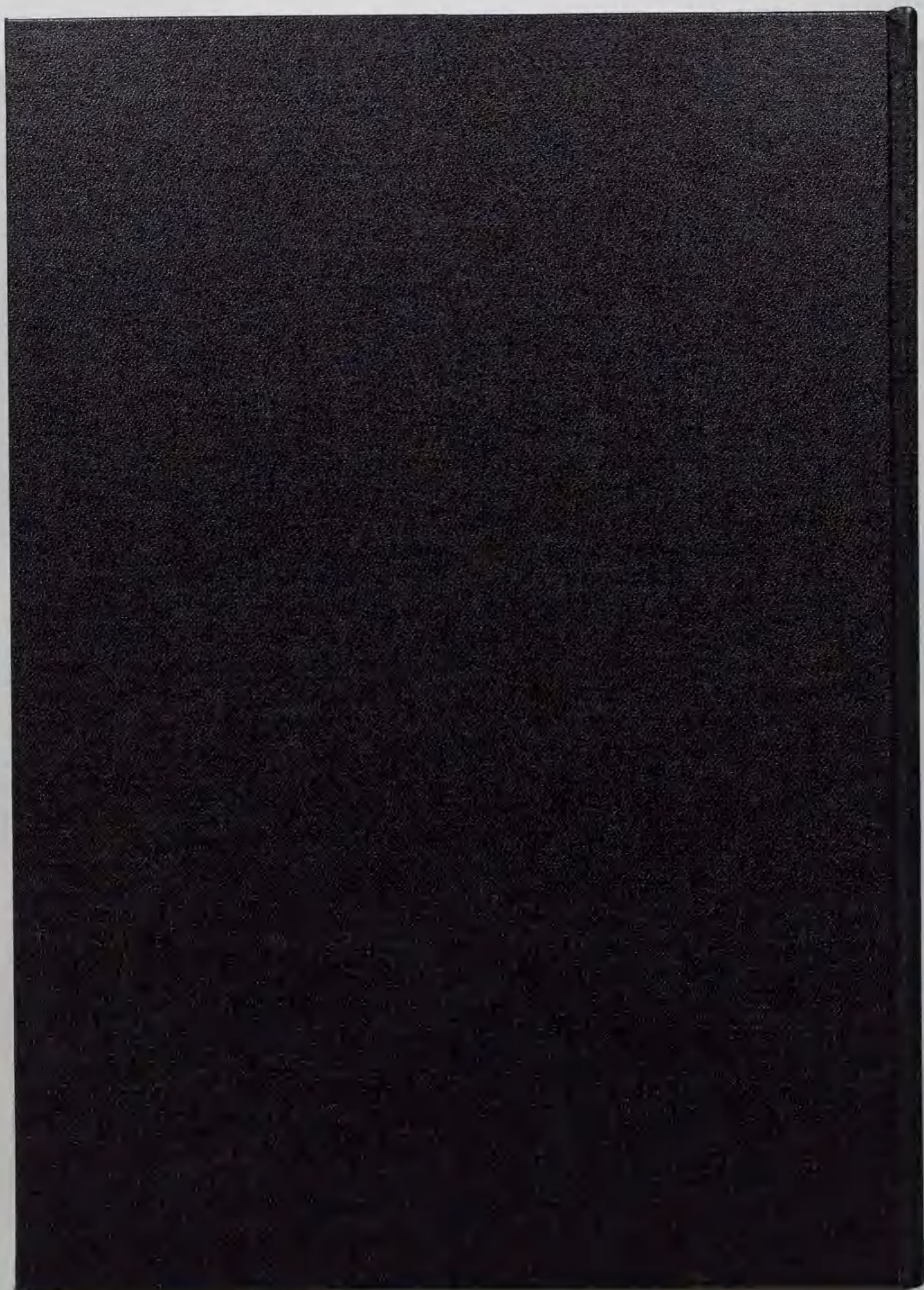
Fig. 25 パニング法による末梢血単核細胞におけるBLVプロウイルスの検出

BLV感染健康羊，リンパ肉腫発症羊およびBLV非感染正常羊より末梢血単核細胞を分画し単核球を取り除いたものから 10^7 個のB細胞およびT細胞をパニング法によって分離した．各サンプルより細胞DNAを抽出しSac Iで完全消化後，EcoRI/Sal Iで切り出した複製BLVクローン断片を ^{32}P でラベルしたものをプローブとしてサザンブロット解析を行った．

Lane 1; BLV感染健康羊A1のB細胞，Lane 2; BLV感染健康羊A1のT細胞，Lane 3; BLV感染健康羊A3のB細胞，Lane 4; BLV感染健康羊A3のT細胞，Lane 5; リンパ肉腫発症羊L1のB細胞，Lane 6; リンパ肉腫発症羊L1のT細胞，Lane 7; BLV非感染正常羊のB細胞，Lane 8; BLV非感染正常羊のT細胞．

ハイブリダイゼーションでLanes 1, 3および5においてBLVプロウイルスが6.5 kbおよび1.3 kbの断片として観察できる．サイズマーカーとして λ DNAをHindIIIで消化したものを使用した．





Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black
[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

