

Null-cell 白血病細胞株 (NALL-1) の 抗原性に関する研究

第 1 編

リンパ球と白血病細胞混合培養による検討

岡山大学医学部第二内科学教室 (主任: 木村郁郎教授)

宇 野 順 三 郎

Key words: Mixed lymphocyte culture,
acute lymphocytic leukemia,
Null-cell 白血病細胞株

緒 言

急性リンパ球性白血病 (ALL) は、その表面マーカーにより、T-, B- 及び null-cell ALL の3種類に区分され、種々の方法によりそれぞれの subgroup の有する抗原性が病因論的並びに臨床的立場より研究されている。我々の教室で株化に成功した T-, B-, 及び null-cell ALL 細胞株 (TALL-1¹⁾, BALL-1²⁾, NALL-1³⁾) は、それぞれ表面形質の異なる3種類の白血病細胞に由来する株細胞であり、この方面の研究に重要な材料を提供するものである。

mixed lymphocyte culture (MLC) における刺激性については、T-cell ALL 株細胞はその刺激性を欠き、一方 B-cell ALL 株細胞は強い刺激性を有することが報告されているが⁴⁾⁻⁷⁾, null-cell ALL 株細胞については検討されていない。本実験は、ALLの大多数を示める null-cell ALL

細胞の抗原解析を目的とし、白血病性 null-, T-, B-cell 株細胞の MLC 刺激性をそれぞれの株細胞の有する諸性格と比較検討した。

材料並びに方法

1. 培養株細胞 (刺激細胞)

用いた白血病細胞株は non-T, non-B (null-cell) ALL 細胞由来の NALL-1³⁾, T-cell ALL 細胞由来の TALL-1¹⁾ 及び B-cell ALL 細胞由来の BALL-1²⁾ の3系である。対照として正常人末梢リンパ球由来の RPMI1788⁸⁾, 正常人臍帯血リンパ球を Epstein-Barr virus (EBV) で transform し株化した CB-LCL 及び EBV 陰性日本人 Burkitt リンパ腫細胞株 JBL を用いた。これらの株細胞は全て CO₂ ふらん器中で、20% 胎児牛血清を含む RPMI1640 培養液で培養し、実験には対数増殖期の細胞を用いた。

2. 正常人末梢リンパ球 (反応細胞)

6名の正常人よりヘパリン加静脈血を採取し、Ficoll-Conray法¹⁰⁾にてリンパ球を分離、RPMI 1640にて3回洗浄後、10%胎児牛血清を含むRPMI1640培養液に $2 \times 10^5/ml$ の濃度に浮遊させ使用した。

3. MLC

方法は Paulyら⁵⁾の方法に準じておこなった。即ち、培養株細胞(刺激細胞)をmitomycin C $25 \mu g/ml$ で $37^\circ C$, 30分処理し、洗浄後、10%胎児牛血清加RPMI1640で $1.5 \times 10^6/ml$ の細胞浮遊液とし、 $1.5 \times 10 cm$ の試験管に $0.4 ml$ ずつ分注した。反応細胞として正常人末梢リンパ球浮遊液($2 \times 10^6/ml$)をそれぞれ $3 ml$ ずつ加えた。反応細胞と刺激細胞の混合比は、最大反応を起こすと報告されている1対1のみでおこなった。対照として反応細胞に培養液(10%胎児牛血清加RPMI1640) $0.4 ml$ のみを加えたもの、反応細胞にphytohemagglutinin M(PHA-M, DIFCO Detroit)を最終濃度1/100に加えたもの、刺激細胞に培養液 $3 ml$ を加えたものを用いた。反応は $7.5\% CO_2$ ふらん器にて6日間培養後、各試験管に 3H -thymidine (specific activity, $2.0 Ci/m mole$, The Radiochemical center, Amersham) $1 \mu Ci$ を加え、さらに24時間培養後、液体scintillation counterにてdpmを測定した。全ての実験は、triplicateでおこなった。結果は正常人リンパ球の幼若化反応(3H -thymidineの取り込み)を以下の式により刺激束数(S.I.)として表わした。

$$S.I. = \frac{\text{混合培養のdpm-mitomycin C} \\ \text{処理刺激細胞のみのdpm}}{\text{反応リンパ球のみのdpm}}$$

4. 培養細胞の諸性格の検索

a) E-, EAC-rosette 形成能

Jondal と Klein の方法¹¹⁾に準じ、T-cell マーカーとしてE-rosette, B-cell マーカーとして、EAC-rosette 形成能を検討した。E-rosetteには洗浄羊赤血球を、EAC-rosette には牛赤血球に家兎抗牛赤血球 IgM 抗体および新鮮マウス血清(補体)を反応させindicator cellとして用いた。

b) 細胞表面 immunoglobulin (sIg)

膜蛍光抗体間接法にて検討した。即ち培養細胞をphosphate buffered saline (PBS)で洗浄

後、FITC 標識ヤギ抗人immunoglobulin (Hayland, Los Angeles)を $4^\circ C$, 30分反応させ、落射型蛍光顕微鏡で観察した。以下蛍光抗体法の観察には全て落射型蛍光顕微鏡を使用した。

c) EBV-associated nuclear antigen(EBNA)

Reedman と Klein の蛍光抗体補体法¹²⁾によりおこなった。細胞塗沫標本を1晩乾燥後、4塩化炭素で室温にて15分間固定し、まず非働化したEBNA陽性血清と非働化していないEBNA陰性血清(補体)を混じたもの(いずれも最終濃度10倍希釈)を $37^\circ C$ 30分反応させた。次いでbalanced salt solution (BSS)で洗浄後FITC標識抗ヒトB_{1c}/B_{1a}抗体(40倍希釈, ヘキストジャパン, 東京)を $37^\circ C$ 30分間作用させ、観察した。

d) 人 thymus-leukemia antigen(HTLA)¹³⁾

と B-cell 株細胞共通抗原(B-LCLA)¹⁴⁾

家兎抗HTLA血清及び家兎抗B-LCLA血清は、坪田らの作製したものを使用し、膜蛍光抗体間接法により判定した。抗HTLA血清は家兎抗MOLT-4 (T-cell ALL株細胞)血清を、B-cell株細胞と末梢リンパ球で吸収し作製したもので、thymocyte, T-cell ALL細胞と反応するが、末梢T-, B-cellとは反応しない。抗B-LCLA血清は家兎抗B-411-4 (正常B-cell株細胞)血清をT-cell株細胞で吸収し作製したもので、B-cell株細胞、慢性リンパ球性白血病(CLL)細胞、null-cell ALL細胞、B-cellと反応するが、T-cell, T-cell ALL細胞、T-cell ALL株細胞とは反応しないものである。2次抗血清は、FITC標識ヤギ抗家兎IgG (Hyland, Los Angeles)を用い、抗原抗体反応は全て $4^\circ C$, 30分おこなった。

e) Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)

NALL-1, TALL-1及びBALL-1細胞につき、自治医科大学の高久、佐々木両博士により検索された。

結 果

1) MLC

正常人リンパ球に対するnull-cell ALL株細胞(NALL-1), T-cell ALL株細胞(TALL-1)及び4系のB-cell株細胞(BALL-1, JBL, RPMI

Table 1. Blastogenic response of normal lymphocytes to lymphoid cell lines

Stimulators	Donors for responding lymphocytes	Stimulation index
TALL-1	TT	3.2
	IT	1.7
	KK	2.1
	AT	1.4
	JU	0.9
NALL-1	TT	27.6
	IT	50.0
	KK	28.8
	AT	36.2
	JU	30.6
BALL-1	TT	21.5
	IT	22.1
	KK	28.6
	AT	34.6
	JU	33.6
JBL	TT	41.9
	KK	18.9
	AT	28.9
	JU	54.7
	KT	16.2
RPMI 1788	TT	43.9
	AT	18.3
	JU	14.6
	KT	37.7
CB-LCL	IT	51.3
	KK	29.0
PHA-M	TT	165.0
	IT	48.0
	KK	50.9
	AT	16.4
	JU	34.6
	KT	18.7

1788, CB-LCL) の one way MLC における刺激性並びに用いた正常リンパ球の PHA-M に対する反応性は, Table 1 に示す通りである。

NALL-1細胞は5名の正常人リンパ球をそれぞれ刺激指数 (S.I.) 27.6, 50.0, 28.8, 36.2, 30.6 と刺激し, MLC における刺激能を有する結果を得た。この S.I. は PHA-M のそれに比しやや低値であるが, B-cell 株細胞の S.I. と有意の差を認めず, NALL-1細胞には B-cell 株細胞とほぼ同等に, 強い MLC 刺激抗原が存在することが示された。一方, B-cell 株細胞はそれぞれその由来を異にするが, その由来に関係なく, 検討した4系は全てほぼ同等の刺激性を有していた。TALL-1細胞の S.I. はそれぞれ 3.2, 1.7, 2.1, 1.4, 0.9, 1.0 と低値であり, この細胞が MLC 刺激抗原を欠如している可能性が示された。

2) 培養細胞の性格

用いた6系の培養株細胞の E-rosette 形成能, EAC-rosette 形成能, sIg 陽性細胞率, EBNA の有無, 抗 HTLA 及び抗 B-LCLA 血清に対する反応性並びに TdT 活性の測定結果を表2に示した。

E-rosette 陽性率は TALL-1 細胞で 68%, NALL-1 細胞で 0%, 4 系の B-cell 株細胞も全て 0% であった。一方, EAC-rosette 陽性細胞は,

Table 2. Properties of lymphoid cell lines

	E	EAC	sIg	EBNA*	HTLA**	B-LCLA***	TdT****	Cell origin
TALL-1	+	-	-	-	+	-	high	E ⁺ -sIg ⁻ ALL
NALL-1	-	-	-	-	-	+	high	E ⁻ -sIg ⁻ ALL
BALL-1	-	-	+	-	-	+	low	E ⁻ -sIg ⁺ ALL
JBL	-	-	+	-	-	+	ND	Japanese Burkitt lymphoma
RPMI 1788	-	+	+	+	-	+	ND	normal peripheral lymphocytes
CB-LCL	-	+	+	+	-	+	ND	normal cord leukocytes

* Epstein-Barr virus determined nuclear antigen

** Human thymus-leukemia antigen (13)

*** Human B-lymphoid cell line common antigens (14)

**** Terminal deoxynucleotidyl transferase

B-cell 株細胞の中、腫瘍細胞由来でない RPMI 1788 と CB-LCL にそれぞれ 68, 67% 認めたが、B-cell ALL 株細胞 (BALL-1), Burkitt リンパ腫株細胞 (JBL) ではともに 0% であった。NALL-1, TALL-1 細胞にはいずれも EAC-rosette 形成を認めなかった。

細胞表面 immunoglobulin (sIg) は、NALL-1, TALL-1 細胞とともに陰性、一方、B-cell 株細胞の 4 系 (BALL-1, JBL, RPMI1788, CB-LCL) には、それぞれ 96, 65, 66, 70% の sIg 陽性細胞が認められた。

EBV-associated nuclear antigen (EBNA) は、3 種類の白血病細胞株 (TALL-1, NALL-1, BALL-1) 及び Burkitt リンパ腫株細胞 (JBL) で認められず、RPMI1788 と CB-LCL では陽性であった。

HTLA 及び B-LCLA の検索では、TALL-1 細胞は HTLA 陽性、B-LCLA 陰性であったが、これとは逆に、NALL-1 と 4 系の B-cell 株細胞は、全て B-LCLA 陽性で、HTLA は陰性であった。

TdT 活性は、TALL-1 と NALL-1 細胞に高値であり、BALL-1 細胞は低値であった。

考 察

ALL の 80% を占めると言われている¹⁵⁾ null-ALL 細胞の抗原解析を目的として、教室で樹立された null-cell ALL 細胞株 (NALL-1) の one way MLC における抗原性を検討した。その結果、NALL-1 細胞は、4 種の由来を異にする B-cell 株細胞とほぼ同等の強い MLC 刺激性を有していた。一方、T-cell ALL 株細胞 (TALL-1) には他の報告^{4)~7)} 同様 MLC 刺激性を認めなかった。この結果より、NALL-1 細胞は、B-cell 株細胞と共通な MLC に関連する抗原 (MLC 刺激抗原) を保有し、TALL-1 細胞はこれを欠如しているものと考えられる。

T-cell 株細胞が MLC 刺激性を欠如している理由として、白血病化の過程で MLC 刺激抗原を失うためだとする考えもあるが⁴⁾、今回検討した NALL-1 及び 4 種の B-cell 株細胞の内、NALL-1, BALL-1 は白血病細胞であり、他の 3 種は非白血病細胞であるが、その間に刺激性の有

意な差を認めなかった。このことは、T-cell ALL 株細胞の MLC 刺激性の欠如が白血病化と無関係であることを示している。TALL-1 細胞が MLC 刺激抗原を欠き、B-cell 株細胞がその由来に関係なくこの抗原を保有していたことは、すでに報告されているように、正常末梢 T-cell は MLC 刺激性を欠き、正常末梢 B-cell はこれを保有する¹⁶⁾ という T-、B-cell の固有の性格を反映しているものと考えられる。同様に、NALL-1 細胞が、MLC 刺激抗原を有していたことは、正常 null-cell の固有の性格を反映している可能性が推測される。

次に、MLC 刺激抗原と今回検討した各種細胞形質の関係を考察する。今回の実験結果より MLC 刺激抗原は、NALL-1 細胞と B-cell 株細胞に存在し、TALL-1 細胞には存在しない抗原である。TALL-1 細胞のみに認められた E-rosette receptor, HTLA 及び TALL-1 と NALL-1 細胞に高値であり BALL-1 細胞に低値であった TdT はいずれも MLC 刺激抗原とは考えにくい。一方、B-cell の性格として知られている complement (EAC-rosette) receptor, sIg, EBNA も MLC 刺激性の認められた B-cell 株細胞の全てには証明されなかったため、いずれも MLC 刺激抗原とは無関係である。

B-cell 株細胞共通抗原 (B-LCLA) は、抗 B-cell 株細胞血清を T-cell 株細胞で充分吸収した抗血清で検出される抗原であり、B-cell 株細胞、末梢血 B-cell, CLL 細胞及び null-cell ALL 細胞に証明される。今回検討した NALL-1 細胞は、この B-LCLA が陽性であり、fresh leukemia null-cell が B-cell 抗原をもつという報告^{17)~19)} と矛盾しない。以上の結果は、NALL-1 細胞に証明された MLC 刺激抗原がこの B-cell 株細胞共通抗原と同一である可能性を示唆している。

近年 Minowada ら²⁰⁾ は、慢性骨髄性白血病の急転細胞由来の Ph¹-染色体陽性でかつ ALL 特異抗原を有する null-cell 株細胞 (NALM-1) を樹立し、この細胞も NALL-1 と同様に MLC 刺激抗原を保有していることを報告した²⁰⁾。しかしながら現在まで fresh leukemia null-cell に MLC 刺激抗原が存在するか否かについては、なお一定の結果が得られていない²¹⁾。今回の NALL-1

細胞が MLC 刺激抗原を有しているという実験結果は、この株細胞の由来した leukemia null-cell が B-cell 同様 MLC 刺激抗原、即ちマウスの Ia 抗原様抗原を保有している可能性を強く示唆しているものと考えられる。

を得た。この刺激抗原は complement receptor, sIg, EBNA, TdT 及び株細胞が腫瘍か否かに関係なく、マウスの Ia 抗原類似の抗原と考えられた。以上の結果は null-ALL 細胞に Ia 様抗原が存在する可能性を示している。

結 論

Null-cell All 細胞株(NALL-1) の one-way MLC 刺激性を検討し、NALL-1 細胞は B-cell ALL 細胞株 (BALL-1) 並びに他の B-cell 株細胞同様 MLC 刺激抗原を有しているという結果

本論文を撰筆するにあたり、御懇意なる御指導ならびに御校閲を賜った恩師木村郁郎教授に深甚の謝意を表します。また終始御懇篤なる御指導を賜った三好勇夫講師、坪田輝彦博士に深謝します。

文 献

1. Hiraki, S., Miyoshi, I., Kubonishi, I., Matsuda, Y., Nakayama, T., Kishimoto, H., Machida, K., Masuji, H. and Kimura, I.: Establishment of a T-cell line from human lymphosarcoma. *Gann* 69, 115—78, 1978.
2. Hiraki, S., Miyoshi, I., Masuji, H., Kubonishi, I., Matsuda, Y., Nakayama, T., Kishimoto, H., Chen, P. and Kimura, I.: Establishment of an Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen-negative human B-cell line from acute lymphoblastic leukemia. *J. Natl. Cancer. Inst.* 59, 93—94, 1977.
3. Hiraki, S., Miyoshi, I., Kubonishi, I., Matsuda, Y., Nakayama, T., Kishimoto, H. and Masuji, H.: Human leukemic "null" cell line (NALL-1) *Cancer* 40, 2131—2135, 1977.
4. Royston, I., Graze, P.R. and Pitts, R.B.: Failure of cultured human T-cell lymphoid lines to stimulate in mixed leukocyte culture. *J. Natl. Cancer. Inst.* 53, 361—366, 1974.
5. Pauly, J.L., Minowada, J., Han, T. and Moore, G.E.: Disparity of mixed lymphocyte reactivity to cultured cells of human T and B lymphoid lines. *J. Natl. Cancer. Inst.* 54, 557—561, 1975.
6. Han, T.: Blastogenic response of normal lymphocytes to cultured lymphoid cells and non-lymphoid neoplastic cells. *Immunology* 23, 355—359, 1972.
7. Weksler, M.E.: Lymphocyte transformation induced by Autologous cells. *J. Immunol.* 116, 310—314, 1976.
8. Tsubota, T., Minowada, J. and Pressman, D.: Reaction of T-lymphoid and B-lymphoid cell lines with rabbit antisera against these lines. *J. Natl. Cancer. Inst.* 59, 399—404, 1977.
9. Miyoshi, I., Hiraki, S., Kubonishi, I., Matsuda, Y., Kishimoto, H., Nakayama, T., Tanaka, T., Masuji, H. and Kimura, I.: Establishment of an Epstein-Barr virus-negative B-cell lymphoma line from a Japanese Burkitt's lymphoma and its serial passage in Hamsters. *Cancer* 40, 2999—3003, 1975.
10. 辻 公美: "免疫実験操作法, I. 日本免疫学会編" pp. 265, 91, 71.
11. Jondal, M. and Klein, G.: Surface markers on human B and T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 138, 1365—1378, 1973.
12. Reedman, B.M. and Klein, G.: Cellular localization of an Epstein-Barr virus (EBV)-associated complement-fixing antigen in producer and non-producer lymphoblastoid cell lines. *Int. J. Cancer* 11, 499—520, 1973.
13. Tsubota, T., Minowada, J., Nakazawa, S., Sinks, L.F., Han, T., Higby, R.J. and Pressman, D.: Correlation of surface markers of cells of human lymphatic leukemias with disease type. *J. Natl. Cancer. Inst.*

- 59, 339—404, 1977.
14. Tsubota, T., Minowada, J. and Pressman, D.: Reaction of T-lymphoid and B-lymphoid cell lines with rabbit antisera against these lines. *J. Natl. Cancer. Inst.* 59, 399—404, 1977.
 15. Borella, L. and Sen, L.: E receptors on blasts from untreated acute lymphocytic leukemia (ALL). comparison of temperature dependence of E-rosettes formed by normal and leukemic lymphoid cells. *J. Immunol.* 114, 187—190, 1975.
 16. Lohrmann, H.P., Novikovs, L. and Graw, R.G.: Stimulatory capacity of human T and B lymphocytes in the mixed leucocyte culture. *Nature* 250, 144—147, 1974.
 17. Kadin, M.E. and Billing, R.J.: Immunofluorescent method for positive identification of null-cell type acute lymphocytic leukemias: use of heterologous antiserum. *Blood* 50, 771—782, 1977.
 18. Sullivan, A.K., Jerry, L.M., Rowden, G. and Shea, M.: Expression of a B-lymphocyte antigen in chronic lymphocytic and other leukemias. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 8, 64—72, 1977.
 19. Shlossmann, S.F., Humphreys, R.E. and Stronminger, J.L.: Distribution of Ia-like molecules on the surface of normal and leukemic human cells. *Immunology* 73, 1288—1292, 1976.
 20. Han, T., Dadey, B. and Minowada, J.: Stimulating capacity of fresh and cultured human leukemic lymphoid and myeloid cells in "one-way" mixed lymphocyte reaction. *Immunology* 33, 543—551, 1977.
 21. Melief, C.J., Shweitzer, M., Zeylemarker, W.P., Verhagen, E.H. and Eijsvoogel, V.P.: Some immunological properties of lymphoid cells from patients with acute lymphatic leukemia (ALL) *Clin. Exp. Immunol.* 15, 131—142, 1973.

Studies on antigens of a leukemic null-cell line (NALL-1).

I. Stimulatory capacity in mixed lymphocyte culture

Junzaburo UNO

The Second Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director: Prof. Ikuro Kimura)

A one-way mixed lymphocyte reaction between lymphocytes from normal human donors and mitomycin C-treated cells from a human leukemic null-cell line (NALL-1) was investigated. Human leukemic T-cell and B-cell lines, an Epstein-Barr virus (EBV)-negative Japanese Burkitt's lymphoma line, and two EBV-positive normal B-cell lines were studied in parallel. Normal lymphocytes were stimulated significantly by the cultured null-and B-cells but not by the cultured T-cells. The stimulatory capacity of this null-cell line was approximately equal to that of the leukemic, lymphoma, and normal B-cell lines, and was unrelated to the presence of complement receptor, surface immunoglobulin, EBV-associated nuclear antigen, terminal deoxynucleotidyl transferase or the origin of the cell lines. These results suggest that not only leukemic B-cells but also leukemic null-cells have stimulatory determinants in mixed lymphocyte culture.