

# ヒト白血病性 null 細胞株に関する研究

## 第 I 編

### 急性リンパ性白血病患者よりの null 細胞株の培養樹立

財団法人積善会十全総合病院

駄場 崎 浩

(昭和55年2月5日受稿)

**Key words:** 急性リンパ性白血病,  
培養, Null 細胞株

#### 緒 言

リンパ球はその由来と機能的分化の過程で発現する細胞膜の表面形質により、胸腺由来のT細胞、骨髄由来のB細胞並びにT、B細胞の表面形質を有しないnull細胞にわけられるようになった。このようなT、B、null細胞の区分は、ヒトのリンパ増殖性疾患の腫瘍細胞にも応用され、これら疾患の本態解明に重要な手掛りを与えるものと期待されている。ヒト急性リンパ性白血病(ALL)についても表面形質の検索が多くの症例で検討されているが、ALLの大多数はnull細胞型ALLである<sup>1-3)</sup>。しかしながらnull細胞に関する研究はこれまでにほとんどなく、その生物学的特徴やT、B細胞との関係はいまだ明らかでない。これらの諸問題を解明するためにもnull細胞をin vitroで長期間培養することはきわめて重要である。著者はnull細胞型ALL患者の末梢白血球を培養し、患者白血病細胞由来と考えられるnull細胞株(NALL-1)を培養樹立することに成功し、種々の検索を加えたので報告する。

#### 症 例

患者は14才の男性で、生来健康であったが、1975年8月初旬に発熱、全身倦怠感、下痢をきたし、同年8月14日岡山大学附属病院に入院した。入院時血液検査にて末梢白血球数7,700、リンパ芽球48%で、ALLと診断され、直ちにneo-

carzinostatin (N), vincristine (V), prednisolone (P) の併用化学療法を受けた。NVPの化学療法2コースで完全寛解となり、さらにNVP1コース、NV2コースの強化療法終了後1975年10月2日退院した。退院後は外来通院にて、cyclophosphamide, 6-mercaptopurine, methotrexateによる維持療法を受けていたが、同年12月下旬再発をきたした。NVPにdaunorubicin (D), cytosine arabinoside (A)を併用した強力な化学療法を受けたが、著明な効果は認められず、持続性鼻出血、発熱、貧血をきたし、1976年3月16日再度岡山大学附属病院に入院した。再入院時血液検査では末梢白血球数188,000、リンパ芽球98%で、直ちにVADPの併用化学療法を受けた、しかし白血病細胞は頑固な抵抗性を示し、同年4月14日脳出血をきたし死亡した。

#### 実験材料及び実験方法

##### 1) 培養方法

1976年3月16日、患者からヘパリン処理の注射器にて10mlの末梢静脈血を採取した。採血時患者の末梢白血球数は188,000/mm<sup>3</sup>で、その98%がリンパ芽球(写真1)、2%がリンパ球であった。採血された血液は6%デキストランと5:1に混和し、37℃ふ卵器内に45分間垂直に静置し、上層の白血球に富む浮遊液を遠沈管に移し、10mM hepes buffer (Sigma製)と抗生物質(100 u penicillin/mlと100 µg streptomycin)を加えたRPMI 1640 (Flow Laboratories製)にて1

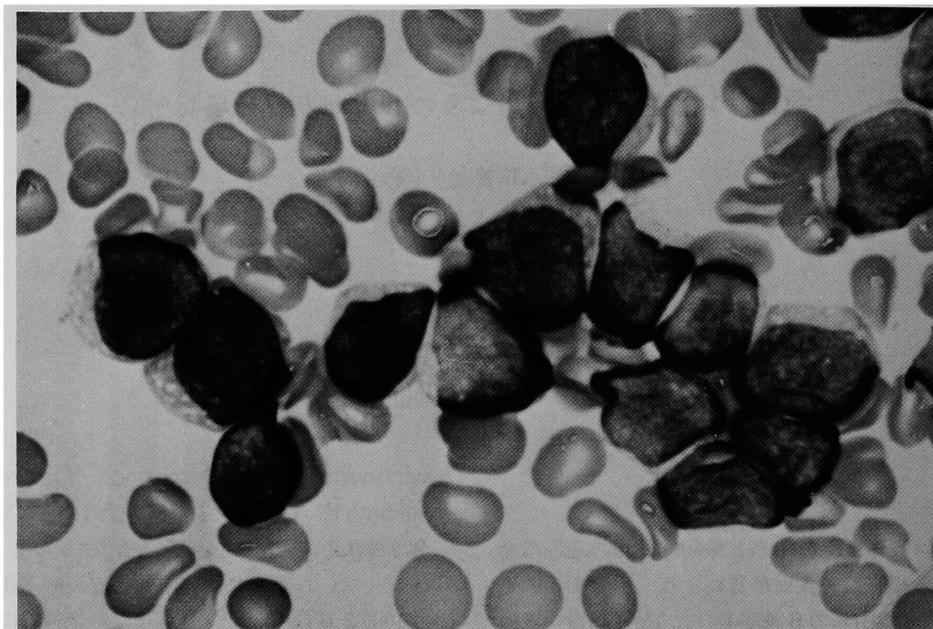


写真1 患者末梢血塗抹標本。多数のリンパ芽球を認める。1,200倍

回洗滌した。得られた白血球を培養液にて  $1 \times 10^7$  個/ml の濃度に浮遊させ、直径35mmのガラスシャーレに2.5mlずつ植え込み、37°Cの7.5%炭酸ガスふ卵器にて静置培養した。培養液には、RPMI 1640に20%胎児牛血清（GIBCO製）を加えたものとRPMI 1640に20%ヒト臍帯血清を加えたものの2種類を用いた。培養液は3~4日ごとに半量を更新し、細胞株樹立後は5~7日ごとに細胞の継代を行なった。

## 2) E, EA, EACロゼットおよび細胞表面免疫グロブリン (Ig)

これらの検索はいずれも Jondal と Klein<sup>4)</sup> の方法に準じて行なった。ヒツジ赤血球 (E) は Alsever 液中で4°Cに保存し、phosphate buffered saline (PBS) にて3回洗浄後検索に用いた。

家兎抗E抗体： $E5 \times 10^9$  個を計10回静注し、その1週間後に採血し、抗E抗体を得た。得られた抗E抗体をセファデックス G 200カラムクロマトグラフィーにてIgG (7S) 分画及びIgM (19S) 分画に分離した。それぞれEと37°C 1時間の反応で凝集を起こさない最少希釈濃度すなわち、IgG分画は400倍希釈でEAロゼットに、IgM分

画は20倍希釈でEACロゼットに使用した。

Eロゼット：被検細胞を  $4 \times 10^6$  /ml に胎児牛血清に浮遊させたものと、同じく1%Eの胎児牛血清浮遊液を0.1mlずつ等量混合し、500rpm 3分間遠沈後4°C 1時間反応させた。その後静かに再浮遊させ、その1滴をスライドグラスにとり400倍にて鏡検した。被検細胞を300個以上数え、Eが3個以上附着した細胞をEロゼット陽性と判定した。

EAロゼット：抗E抗体IgG分画(A)で5%Eを37°C 30分間反応させ(EA)、3回洗浄後1%Eとした。1%Eと  $4 \times 10^6$  /ml の被検細胞のPBS浮遊液を0.1mlずつ等量混合し、500rpm 3分間遠沈後37°C 30分間反応させ、Eロゼットと同様に陽性細胞を算定した。

EACロゼット：抗E抗体IgM分画(A)を5%Eに37°C 30分間反応させ、3回洗浄後、更に10倍希釈新鮮A系マウス血清(C)を等量加えて37°C 30分間 complement を反応させ(EAC)、PBSにて3回洗浄後1%EACと被検細胞  $4 \times 10^6$  /ml を0.1mlずつ等量混合し、500rpm 3分間遠沈後37°C 30分間反応させ、Eロゼットと同様

に陽性細胞を算定した。

細胞表面 Ig : FITC 標識ヤギ抗ヒト Ig ( $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\gamma$  鎖) は Hyland 製のものを使用した。被検細胞を PBS で 3 回洗浄後、 $4 \times 10^5$  個の細胞を 10 倍希釈の抗血清 0.3ml に浮遊させ、 $4^\circ\text{C}$  30 分間反応させた。ついで PBS にて 3 回洗浄後 50% グリセリン緩衝液で封入し、オリンパス蛍光顕微鏡(落射型)で観察した。細胞 300 個以上を数え、明らかに膜蛍光を発するものを陽性と判定した。

### 3) EBNA の検索

Reedman と Klein<sup>5)</sup> の蛍光抗体補体法の変法により行なった。細胞の塗抹標本を一晩乾燥後、四塩化炭素で室温にて 15 分間固定し、まず非動化した EBNA 陽性血清と EBNA 陰性血清に補体 (EBNA 陰性血清の非動化していない血清) を混じたもの (いずれも最終濃度 10 倍希釈) を  $37^\circ\text{C}$  30 分間反応させた。次いで balanced salt solution (BSS) で洗浄後抗ヒト  $\beta_{1c}/\beta_{1A}$  ヤギ FITC 標識抗体 (40 倍希釈) を  $37^\circ\text{C}$  30 分間作用させた。再び BSS で洗浄後 50% グリセリン緩衝液を滴下し、カバーガラスをかぶせてオリンパス蛍光顕微鏡 (落射型) で観察した。コントロールとして Raji 細胞と MOLT 細胞を用いた。

### 4) 電子顕微鏡観察

培養細胞を 10 分間 2,000 回転で遠沈し、cell pellet を作り、2.5% グルタルアルデヒドで 1 時間固定した後、1% オスミウム酸で 30 分間固定した。ついでエチルアルコール系列で脱水し、プロピレンオキサイドを経てエボン 812 に包埋した。LKB ウルトラトームを用いてガラスナイフで超薄切片を作成し、酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛で重染色を施し、Hitachi HS-8 型電子顕微鏡で観察した。

### 5) 染色体分析

染色体分析は Moorhead ら<sup>6)</sup> の方法に準じて行なった。培養シャーレにコルヒチン (1r/ml) を加え、60 分間作用させた後 0.9% クエン酸ソーダにより低調処理を行ない、メタノールと氷酢酸の等量混合液により固定し、細胞をスライドガラスに滴下し、乾燥後ギムザ染色を行ない、顕微鏡写真撮影により染色体分析した。つぎに Kajiji ら<sup>7)</sup> の方法により banding による染色体分析を行なった。すなわち前述の方法で作成した

ギムザ染色標本につき写真撮影した後標本を脱色し、トリプシン処理を行ない、再びギムザ染色して鏡検した。

## 結 果

### 1) ヒト白血病性 null 細胞株 (NALL-1) の樹立とその形態

RPMI 1640 に 20% 胎児牛血清を加えた培養液に浮遊させた培養細胞は徐々に変性し、14 日目にはほとんど生細胞は認められなかった。一方 RPMI 1640 に 20% ヒト臍帯血清を加えた培養液に浮遊させた培養細胞は 7 日目には生細胞率が 50% となったが、その後漸次増加し、培養開始後 18 日目に最初の継代を行なった。その後は安定した増殖を示し、現在培養 30 ヶ月、120 代に及んでいる。細胞株 (NALL-1) 樹立後は RPMI 1640 に 20% 胎児牛血清を加えた培養液内でもよく増殖し、現在は RPMI 1640 に 15% の胎児牛血清を加えた培養液中にて維持されている。NALL-1 細胞は細胞塊を形成することなく、浮遊状態で増殖し、大多数がほぼ球形を示した (写真 2)。NALL-1 細胞の倍加時間は RPMI 1640 に 20% 胎児牛血清を加えた培養液内では 72 時間であった。May-Grunwald-Giemsa 染色標本上、NALL-1 細胞の直径は  $12 \sim 24 \mu$  (平均  $16.8 \mu$ ) で、形態学的にはリンパ芽球様で、患者末梢血中の白血病細胞 (写真 1) に類似し、細胞質に乏しく、大きなほぼ円形の核と 1 ~ 数個の著明な核小体を有し、少数のものに胞体内に小空胞が認められた (写真 3)。

### 2) 電子顕微鏡観察

NALL-1 細胞の多くのものは類円形を示し、核は大きく、小さな切れ込みが少数のものに認められた。狭い細胞質には多数のリボソームとや、大型のミトコンドリアが少数存在し、時に 1 ~ 数個の脂肪顆粒が見られた (写真 4)。多くのミトコンドリアには数個のミトコンドリア内顆粒が認められた。その他ゴルジ体や粗面小胞体が少数存在した。ウイルス様粒子は認められなかった。

### 3) 表面形質

患者末梢血リンパ芽球は E ロゼット形成能を欠き、かつ細胞表面 Ig 陰性であった。

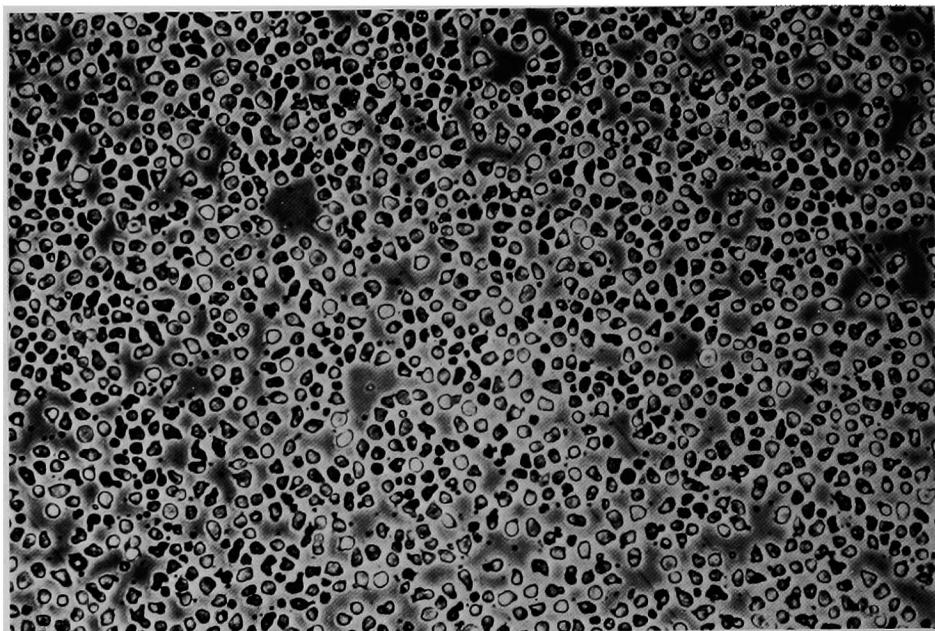


写真2 NALL-1株の位相差像。浮遊状態で増殖し、細胞集塊を形成しない。150倍

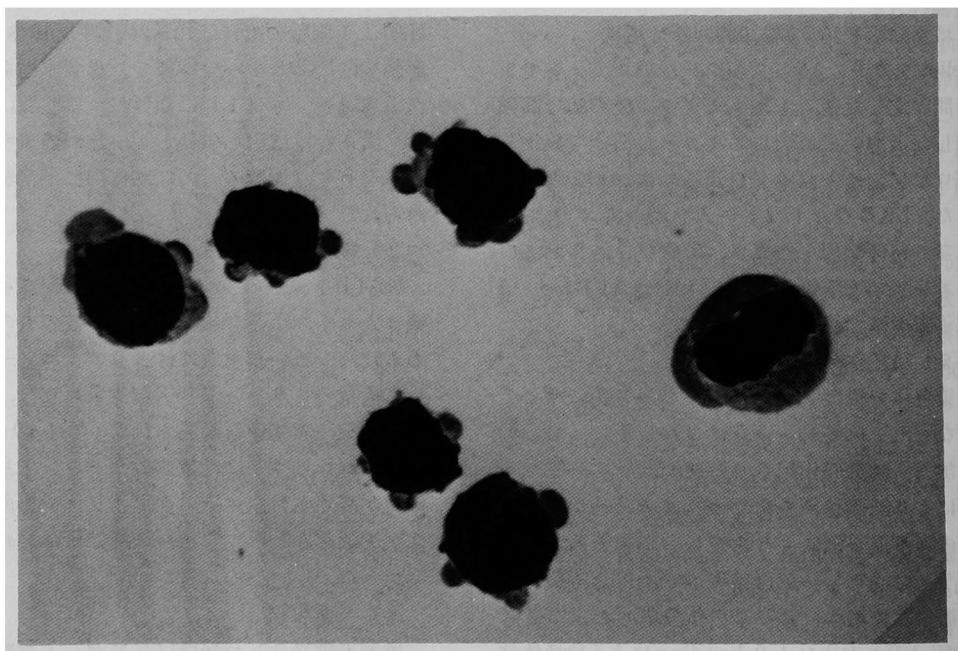


写真3 NALL-1細胞の塗沫標本。1,200倍

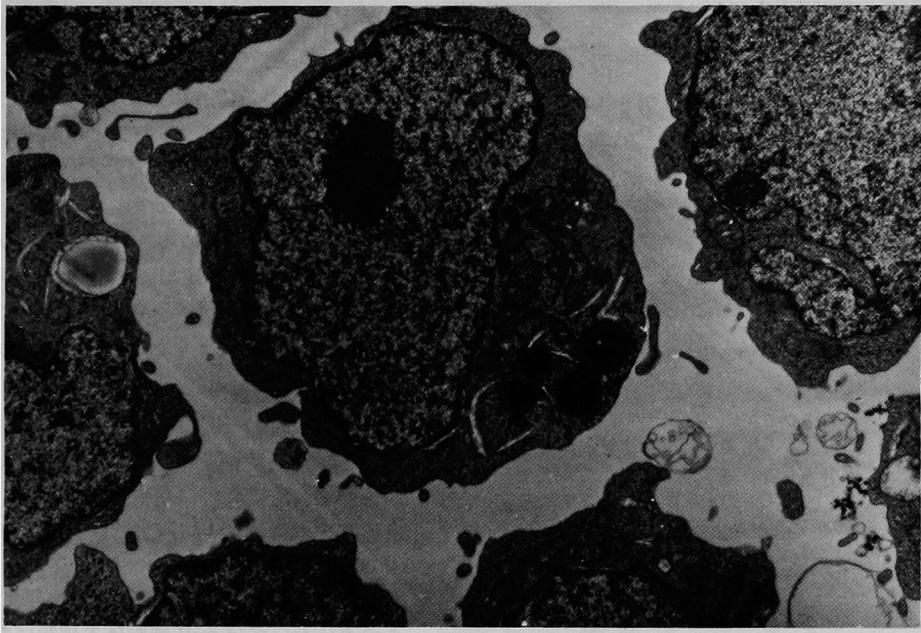


写真4 NALL-1細胞の電顕像。核小体が著明で、少数のミトコンドリアと脂肪顆粒が存在する。7,500倍

NALL-1細胞の表面形質の検索は細胞株樹立後隔月に6回行なったが、患者末梢血リンパ芽球と同様にEロゼット形成能および細胞表面Igは共に陰性であった。EACレセプターは数% (1~8.1%)のNALL-1細胞に認められたが、EAレセプターは証明されなかった。

#### 4) EBNA

NALL-1細胞につきEBNAの有無を反復検索したが、いずれの細胞も常に陰性であった。一方、Raji細胞とMOLT細胞をコントロールとして用いたが、EBVゲノム陽性のRaji細胞はEBNA陽性を呈し、EBVゲノム陰性のMOLT細胞はEBNA陰性であった。従ってNALL-1細胞のEBVゲノムは陰性であると言える。

#### 5) 染色体分析

培養開始後7ヶ月目に50個の核板について染色体分析を行なった。染色体数は40~44本の範囲にあり、モードは43であった。

Giemsa-banding法により、小さい1本のマーカー染色体とX、Y染色体の欠損を認めた(写

真5)、その他複雑なbanding異常が存在した。患者の末梢血リンパ芽球についても染色体分析を行なったが、3個の分析可能な核板が得られ、これらすべては43本の染色体を有し、上述のマーカー染色体も存在し、NALL-1細胞と患者の白血病細胞との共通な染色体異常が見出された。

### 考 察

従来悪性疾患患者のみならず正常人の骨髄あるいは末梢血からも多数のリンパ芽球様細胞株の樹立が報告されている<sup>8,9)</sup>。しかし、例外的な一部の細胞株を除き、細胞形態、増殖態度、B細胞の表面形質、EBVゲノムの存在および正常染色体構成を有する点等共通した特徴を有しており、これら細胞株は正常B細胞がEBVによりtransformされた結果培養樹立したものと考えられている<sup>9)</sup>。今回著者がALL患者末梢血より培養樹立したNALL-1株は次の事項より患者白血病細胞に由来しているものと考えられる。i) EBVゲノムを有しない、ii) NALL-1細胞は患者白血病細胞と同様にT又はB細胞の表面形質

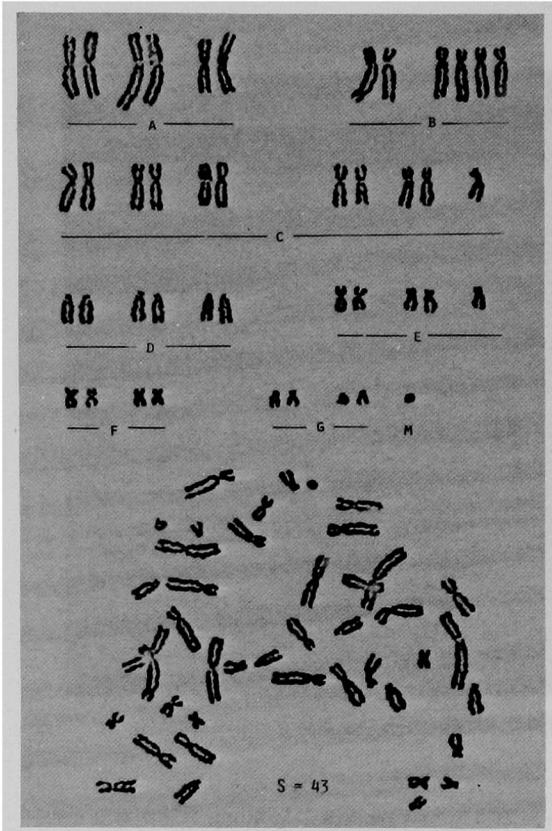


写真5 NALL-1株の核型。染色体数のモードは43本で、生染色体を欠き、1本のマーカー染色体(M)を有す。

を持たない。iii) NALL-1細胞は染色体異常を有し、同じ染色体異常が培養前の患者白血病細胞にも見出されている。iv) NALL-1細胞の倍加時間は72時間で、これまでに報告されているヒト白血病細胞の生体内における倍加時間(50~70時間)<sup>10)</sup>にはほぼ一致する。v) NALL-1細胞と患者白血病細胞は形態学的に類似している。

以上より NALL-1細胞はこれまで多数報告されている前述のEBV陽性リンパ芽球様細胞株と全く異なり、白血病性 null 細胞株といえる。近年になって、ようやく ALL 患者<sup>11-18)</sup>、や骨髄性白血病患者<sup>19-22)</sup>より白血病性細胞株が数株樹立されているが、今日なお白血病細胞を長期間培養することは容易なことではなく、ALL患者より白血病性 null 細胞株を樹立したとの報告は現在まで数少ない<sup>14-16)</sup>。最近 Minowada ら<sup>23)</sup>は3才の女兒患者で急性転化をきたした慢性骨

髄性白血病患者より白血病性 non T/non B 細胞株の樹立を報告しているが、この細胞株は Ph<sup>1</sup>染色体が陽性であり、NALL-1株とは明らかに異なっている。

ALLの大多数は null 細胞型であるが<sup>1-3)</sup>、null 細胞の細胞起原や T、B細胞との関係は未だ十分に解明されていない。Davis<sup>24)</sup>は stem cell に由来する null 細胞が分化し、TあるいはB細胞になると推論している。Fu ら<sup>25)</sup>は null 細胞型 ALL 4例に HL-B alloantigen を証明し、これら ALL を B細胞由来と考えている。また Chess ら<sup>26)</sup>はヒト末梢血より column-immunoabsorbent chromatography と E rosette-depletion technique を用いて分離された null 細胞の大多数が培養3日目までに細胞表面 Ig が陽性になったと報告している。一方、Minowada らは T および null 細胞型 ALL の全例に terminal deoxynucleotidyl transferase の高い活性を、また B細胞型 ALL では低い活性を見出しており、この点においては null 細胞は T細胞に類似し、B細胞とは異なることを意味している。NALL-1細胞は培養樹立後30ヶ月を経過しているが、現在まで Eロゼット形成能および表面 Ig は共に全く陰性であり、TあるいはB細胞への分化は認められていない。

次に NALL-1株の樹立が RPMI 1640 にヒト臍帯血清を加えた培養液内においてのみ成功し、RPMI 1640 に胎児牛血清を加えた培養液内ではすみやかに変性したことは注目に値する。このことはヒト臍帯血清中にこの種の白血病細胞が *in vitro* での持続的増殖を開始するに必要ななんらかの物質を含んでいる可能性を示唆している。

NALL-1株は null 細胞の細胞学的特徴を解明するのに役立つばかりでなく、白血病抗原等の免疫学的研究および抗白血病剤のスクリーニング等に大いに有用であると考えられる。

## ま と め

14才の急性リンパ性白血病患者の末梢血より白血病性 null 細胞株(NALL-1)を培養樹立した。NALL-1細胞はTおよびB細胞の表面形質を持たず、また EBV ゲノムは陰性であった。

NALL-1 細胞は細胞集塊を形成することなく浮遊状態で増殖し、倍加時間は72時間であった。形態学的には白血病細胞に類似し、胞体は狭く、核はほぼ円形で大きく、1～数個の著明な核小体が認められた。染色体構成は hypodiploid で、1本の小さいマーカー染色体が認められたが、同じ染色体異常が培養前の白血病細胞にも見出された。以上より NALL-1 株は従来多数報告さ

れている EBV 陽性リンパ芽球様細胞株と異なり、患者白血病細胞に由来した白血病性 null細胞株と考えられる。

稿を終えるにあたり、御指導いただいた木村郁郎教授、三好勇夫講師、平木俊吉博士ならびに染色体分析について御指導いただいた本学癌研病理増地広助教授に深謝いたします。

## 文 献

1. 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.
2. Brouet, J.C., Valensi, F., Daniel, M.-T., Flandrin, G., Preud'homme, J.-L., and Seligmann, M.: Immunological classification of acute lymphoblastic leukemias: Evaluation of its clinical significance in a hundred patients. *Br. J. Haematol.* **33**, 319—328, 1976.
3. Belpomme, D., and Mathé, G.: Clinical significance and prognostic value of the T-B immunological classification of human primary acute lymphoid leukemias. *Lancet* **1**, 555—558, 1977.
4. Jondal, M., and Klein, G.: Surface markers on human B and T lymphocytes. II. Presence of Epstein-Barr virus receptors on B lymphocytes. *J. Exp. Med.* **138**, 1365—1378, 1973.
5. Reedman, 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.
6. Moorhead, P.S., Nowell, P.C., Mellman, W.J., Battips, D.M., and Hungerford, D.A.: Chromosome preparation of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* **20**, 613—616, 1960.
7. Kajii, T., Ohama, K., Avirachan, S., and Avirachan, T.T.: Trypsin banding of Giemsa-stained chromosomes. *Lancet* **II**, 1311—1322, 1972.
8. Moore, G.E., and Minowada, J.: Human hematopoietic cell lines: A progress report. In *Femic Cells in Vitro*, ed. P. Farnes, Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 100—114, 1969.
9. Moore, G.E.: Cultured human lymphocytes. *J. Surg. Oncol.* **4**, 320—358, 1972.
10. Saunders, E.F., Lampkin, B.C., and Mauer, A.M.: Variation of proliferative activity in leukemic cell populations of patients with acute leukemia. *J. Clin. Invest.* **46**, 1356—1363, 1967.
11. Kaplan, J., Shope, T.C., and Peterson, W.D.: Epstein-Barr virus-negative human malignant T-cell lines. *J. Exp. Med.* **139**, 1070—1076, 1974.
12. Minowada, J. and Moore, G.E.: T-lymphocyte cell lines derived from patients with acute lymphoblastic leukemia. In *Cooperative Leukemia Research*, ed. Y. Ito and R.M. Dutcher, University of Tokyo Karger, Basel, pp. 251—261, 1975.
13. Hiraki, S., Miyoshi, I., Masuji, H., Kubonishi, I., Matsuda, Y., Nakayama, T., Kishimoto, H., Chen, P., and Kimura, I.: Establishment of an Epstein-Barr virusdetermined nuclear antigen-negative human B cell line from acute lymphoblastic leukemia. *J. Natl. Cancer Inst.* **59**, 93—94, 1977.
14. Rosenfeld, C., Gauthier, A., Choquet, C., Venuat, A.M., Kayibanda, B., Greaves, M.F.: Phenotypic Cha-

- racterisation of a unique non-T, non-B acute lymphoblastic leukemia cell line. *Nature* **267**, 841—843, 1977.
15. Schneider, U., Schwenk, H.-U. and Bronkamm, G.: Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed nonHodgkin lymphoma. *Int. J. Cancer* **19**, 621—626, 1977.
  16. Lazarus, H., Barell, E.F., Krishan, A., Livingston, D.M., Harris, K., Schlossman, S.F. and Chess, L.: Characterization of a unique cell line (LAZ 221) from human acute lymphocytic ("null" cell) leukemia. *Cancer Res.* **38**, 1362—1367, 1978.
  17. 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—118, 1978 )
  18. Morikawa, S., Tatsumi, E., Baba, M., Harada, T. and Yasuhira, K.: Two E-rosette-forming lymphoid cell lines. *Int. J. Cancer* **21**, 166—170, 1978.
  19. Gallagher, R.E., Salahuddin, S.Z., Hall, W.T., McCredie, K. and Gallo, R.: Growth and differentiation in culture of leukemic lymphocytes from a patient with acute myelogenous leukemia and reidentification of type-C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 4137—4141, 1975.
  20. Lozzio, C. and Lozzio, B.B.: Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* **45**, 321—334, 1975.
  21. Collins, S.J., Gallo, R.C. and Gallagher, R.E.: Continuous growth and differentiation of human myeloid leukemic cells in suspension culture. *Nature* **270**, 347—349, 1977.
  22. Koefler, H.P. and Golde, D.W.: Acute myelogenous leukemia: A human cell line responsive to colony-stimulating activity. *Science* **200**, 1153—1154, 1978.
  23. Minowada, J., Tsubota, T., Greaves, M.F. and Walter, T.R.: A non T/non B human leukemic cell line (NALM): Establishment and the presence of leukemia associated antigens. *J. Natl. Cancer Inst.* **59**, 83—87, 1977.
  24. Davis, S.: Hypothesis: Differentiation of the human lymphoid stem based on cell surface markers. *Blood* **45**, 871—880, 1975.
  25. Fu, S.M., Winchester, R.J. and Kunkel, H.G.: The occurrence of the HL-B alloantigens on the cells of unclassified acute lymphoblastic leukemias. *J. Exp. Med.* **143**, 1334—1338, 1975.
  26. Chess, L., Levine, H., MacDermott, R.P. and Schlossman, S.F.: Immunologic functions of isolated human lymphocyte subpopulations. VI. Further characterization of the surface Ig negative, E rosette negative (null cell) subset. *J. Immunol.* **115**, 1483—1487, 1975.

**Studies on a human leukemic null cell line**  
**Part I. Establishment of a human leukemic null cell line**

**Hiroshi DABASAKI**

Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. I. Kimura)

A new cell line (NALL-1) was established *in vitro* from the peripheral blood of a patient with acute lymphoblastic leukemia (ALL). NALL-1 cells had neither properties of T and B cells nor Epstein-Barr virus (EBV). Many characteristics of the NALL-1 line were distinct from those of numerous EBV-positive lymphoblastoid cell lines previously established. The NALL-1 line grew as single-cell suspension cultures with a doubling time of 72 hours and consisted of primitive lymphoid cells with large nuclei, prominent nucleoli and scanty cytoplasm. Chromosome analysis of NALL-1 cells revealed a hypodiploid karyotype with a minute marker chromosome. NALL-1 cells are considered to have originated from the donor's leukemic cells on the basis of their cytoplasmic, morphologic and functional features.