

# Double PAP 法による細胞質内 $\mu$ 鎖の検出 —Pre-B-ALL の診断—

中 沢 真 平    杉 田 完 爾  
西 野 和 良    森        泰 二 郎    (慶応大学小児科)

## I 緒言

小児の急性リンパ芽球性白血病 (ALL) は、そのマーカー発現のパターンより、T-cell type, B-cell type, non T. non B-cell type に分類されてきた。このうち、75%以上を non T, non B-cell type が占め、Eロゼット(-)、表面免疫グロブリン(-)、T抗原(-)のため、null-ALL と呼ばれてきた。

1978年 Vogler らが、null-ALL の中に、細胞質内  $\mu$  鎖 (C $\mu$ ) が検出される pre-B-cell type が存在すると報告して以来、pre-B-ALL に対する関心が高まりつつある。

C $\mu$  の検出には、従来、直接蛍光抗体法が用いられてきたが、微量な C $\mu$  の検出法としてはかならずしも鋭敏な方法とは言えず、判定の難しい場合も多いとされている。

本研究では、peroxidase-Antiperoxidase (PAP) 法を繰り返す double PAP 法を用いて各種 cell lines の C $\mu$  の検出を試みた。また、null-ALL の患者から得られた新鮮白血病細胞についても、同様に C $\mu$  の検出を行ない、pre-B-ALL の診断を試みた。

## II 材料ならびに方法

### 1. 材料

#### (1) 培養細胞株 (cell lines)

normal B cell lines 4種, Burkitt cell lines 4種, null cell lines 7種, T cell lines 2種, myeloid cell lines 1種を用いた。

#### (2) 新鮮白血病細胞

common ALL 抗原(+), Ia 様抗原(+)の小児ALL 30例の芽球を用いた。年齢は4ヶ月より14才、性別は男子17例、女子13例であった。

### 2. 方法

#### (1) cell smear の作製

培養細胞株、新鮮白血病細胞とも、10% fetal calf serum (FCS) 添加 phosphate bu-

ffered saline (PBS) に浮遊させ、スライドガラス上に塗抹した。

## (2) 細胞質内 $\mu$ 鎖の検出

### ① double PAP 法の原理

PAP 法の原理は図 1 に示した。第一抗体であるヒト目標抗原に対するウサギ抗血清は、第二抗体であるブタ抗ウサギ抗血清をブリッジとして、ウサギ PAP complex と結合する。ウサギ PAP complex は、horseradish peroxidase とウサギ抗 peroxidase 抗血清の soluble complex であり、抗原は peroxidase で特異的に標識され、peroxidase 染色によって抗原の有無と存在部位を検出する。

本研究では、微量な  $C\mu$  を検出するため、PAP 法の高感度をさらに増幅することを目的として、図 2 に示す double PAP 法を用いた。すなわち、PAP complex に再度第二抗体を反応させ、さらに PAP complex を反応させた後に、peroxidase 染色を行なった。

### ② double PAP 法の手順

具体的方法を表 1 に示した。非特異的吸着を最少にするため、第一抗体をできるだけ低濃度とし、反応時間を延長した点に特徴がある。

## III 結果

### 1. 培養細胞株 (cell lines)

T cell lines (KOPT-K1, MOLT-4), myeloid cell line (HL 60) は陰性であった。B cell lines の結果を表 2 に示した。normal B cell lines のうち、IgG 産生株である RPMI 6410 は陰性で、他の IgM 産生株は陽性であった。同様に Burkitt cell lines のうち IgG-Burkitt とされる Rael は陰性であったが、他の 3 株は陽性であった。

null cell lines の結果を表 3 に示した。NALL-1 は陰性であった。Reh, NALM-16 は陰性であることが多かったが、数回の検索で弱陽性を示す事があり、pre-B-cell lines の可能性がある。NALM-1, NALM-6, KOPN-1, KOPN-K は、明らかに陽性で、pre-B-cell lines と決定できた。

### 2. 新鮮白血球細胞

小児 null-ALL 30 例中、 $C\mu$  陽性で、pre-B-ALL と診断できたのは、7 例 23.3 % であった。pre-B-ALL 7 例を表 4 に示した。男子 3 例、女子 4 例で性差は認められなかった。年齢は 2 才から 13 才であった。検査時の白血球数は  $20,000/\text{mm}^3$  以上 4 例で白血球増多例が多かったが、 $C\mu$  陰性例でも白血球増多例が多く、有意の差は認められなかった。

pre-B-ALL と診断された 7 例は、全例初回治療で完全寛解に入っているが、症例 1



## 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



### 緒言

小児の急性リンパ芽球性白血病(ALL)は、そのマーカー発現のパターンより、T-cell type, B-cell type, non T. non B-cell type に分類されてきた。このうち、75%以上を non T, non B-cell type が占め、E ロゼット(-), 表面免疫グロブリン(-), T 抗原(-)のため、null-ALL と呼ばれてきた。

1978 年 Vogler らが、null-ALL の中に、細胞質内  $\mu$  鎖( $C\mu$ )が検出される pre-B-cell type が存在すると報告して以来、pre-B-ALL に対する関心が高まりつつある。 $C\mu$  の検出には、従来、直接蛍光抗体法が用いられてきたが、微量な  $C\mu$  の検出法としてはかならずしも鋭敏な方法とは言えず、判定の難しい場合も多いとされている。

本研究では、peroxidase-Antiperoxidase(PAP)法を繰り返す double PAP 法を用いて各種 cell lines の  $C\mu$  の検出を試みた。また、null-ALL の患者から得られた新鮮白血病細胞についても、同様に  $C\mu$  の検出を行ない、pre-B-ALL の診断を試みた。

2, 3, 4, 6 の計5例は, 1年以内に再発しており, このうち症例3を除く4例が2年以内に死亡している。

#### IV 考按

double PAP 法を用いて, 各種 cell lines の  $C\mu$  検出を行ない, IgM 産生株の normal B cell lines, 表面 IgM 陽性の Burkitt cell lines とともに明らかに  $C\mu$  を検出できた。また, null cell lines でも7株中4株において, 明らかに  $C\mu$  を検出し, pre-B-cell lines の存在を証明できた。

さらに, null-ALL 30例中7例23.3%に  $C\mu$  を検出し, null-ALL には, pre-B-ALL が含まれている事が確認された。また, その頻度は Vogler, Brouet らの報告と近似していた。

以上より, double PAP 法は,  $C\mu$  の検出法として, 高感度かつ確実であり, 有用と思われた。

pre-B-ALL と診断された症例は, 早期再発, 早期死亡が多い可能性が示唆されたが,  $C\mu$  検索の対象となった症例が白血球増多例が多かったためかもしれず, さらに症例を増して検討を加えていかねばならないと思われる。

図1

### PAP method

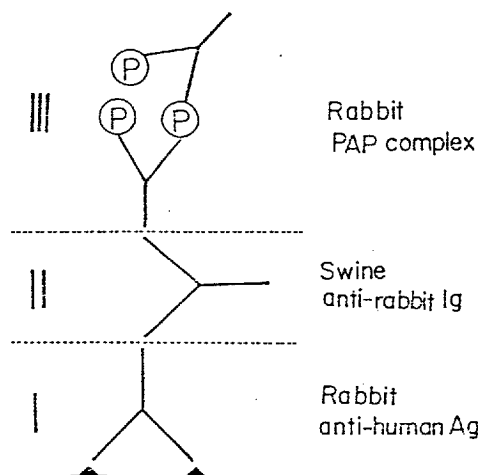


图 2

## DOUBLE PAP METHOD

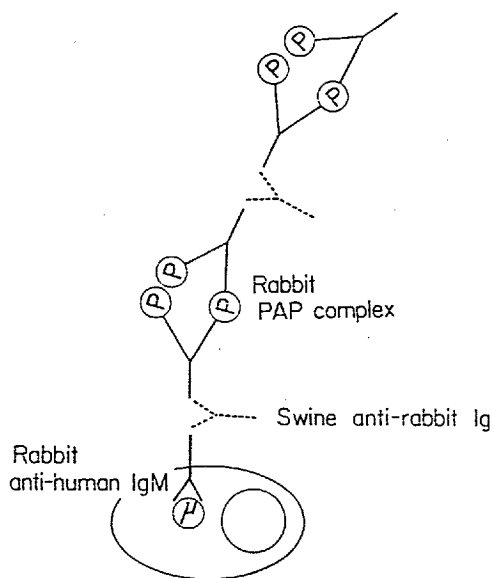


表 1

### PROCEDURE OF DOUBLE PAP METHOD

1. Fixation in 0.3%  $H_2O_2$ -methanol for 30 min. at r.t.
2. 5% normal swine serum for 30 min. at r.t.
3. Rabbit anti-human IgM diluted 1:3000 for 48 hr. at 4°C
4. Swine anti-rabbit Ig diluted 1:150 for 30 min. at r.t.
5. Rabbit PAP complex diluted 1:50 for 30 min. at r.t.
6. Repeat of step 4
7. Repeat of step 5
8. Peroxidase staining  
(0.05% 3-3'DAB, 0.01%  $H_2O_2$  in 0.05M Tris-HCl, pH 7.4)

表 2

CYTOPLASMIC  $\mu$  CHAIN DETECTED BY DOUBLE PAP METHOD  
IN B CELL LINES

normal B cell lines	
K 81	+
K 113	+
K 115	+
RPMI 6410	-
Burkitt cell lines	
Raji	+
KOBK-96	+
KOBK-101	+
Rae1	-

表 3

CYTOPLASMIC  $\mu$  CHAIN DETECTED BY DOUBLE PAP METHOD  
IN "NON-T, NON-B" CELL LINES

NALL-1	-
Reh	-/+
NALM-16	-/+
NALM-1	+
NALM-6	+
KOPN-1	+
KOPN-K	+

表4

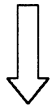
## HEMATOLOGICAL DATA ON PATIENTS WITH PRE-B-CELL LEUKEMIA

case (no.)	sex	age (yr.)	WBC (/cmm)	blood lymphoblasts (%)
1.	M	2	11700	68.3
2.	F	13	8400	25.0
3.	F	9	21500	98.0
4.	M	5	72600	91.6
5.	M	2	35700	87.5
6.	F	1	298000	99.5
7.	F	7	9700	47.5



## 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



### 緒言

小児の急性リンパ芽球性白血病(ALL)は,そのマーカー発現のパターンより,T-cell type,B-cell type,non T. non B-cell type に分類されてきた。このうち,75%以上を non T,non B-cell type が占め,Eロゼット(-),表面免疫グロブリン(-),T抗原(-)のため,null-ALLと呼ばれてきた。

1978年 Vogler らが,null-ALLの中に,細胞質内 $\mu$ 鎖( $C\mu$ )が検出される pre-B-cell typeが存在すると報告して以来,pre-B-ALLに対する関心が高まりつつある。 $C\mu$ の検出には,従来,直接蛍光抗体法が用いられてきたが,微量な $C\mu$ の検出法としてはかならずしも鋭敏な方法とは言えず,判定の難しい場合も多いとされている。

本研究では,peroxidase-Antiperoxidase(PAP)法を繰り返す double PAP法を用いて各種 cell lines の $C\mu$ の検出を試みた。また,null-ALLの患者から得られた新鮮白血病細胞についても,同様に $C\mu$ の検出を行ない,pre-B-ALLの診断を試みた。