

## 5. 間接ロゼット法による白血病細胞膜抗原の解析

中沢真平<sup>\*1</sup>, 森泰二郎<sup>\*1</sup>, 西野和良<sup>\*1</sup>  
杉田完爾<sup>\*1</sup>, 高根恵子<sup>\*2</sup>

### I. はじめに

小児白血病は形態学的にも臨床的にも heterogeneous な疾患であり、治療を行なう上で客観的な分類は不可欠である。小児急性リンパ性白血病 (ALL) は初発時年齢および白血球数から Standard Risk Group と High Risk Group に分類され、異なったプロトコルで治療されて来た。さらに近年免疫学的マーカーによる分類が行なわれる様になり、さらに詳細な分類が可能になり、臨床像ならびに治療との関連性が明らかになってきた<sup>1)</sup>。細胞膜マーカー解析には従来ヘテロ抗血清やロゼット法が用いられて来たが、最近ではモノクローナル抗体を利用した蛍光抗体法、あるいは FACS による解析がなされている。しかしながら、小児 ALL ではしばしば検体量が十分得られず、完全な解析が出来ない場合が多い。また蛍光抗体法や FACS による方法はかなりの設備を必要とし、一般病院で施行することは不可能である。この様な欠点に対し、間接ロゼット法は微量のサンプルで解析が可能であり、さらに光学顕微鏡で観察可能である点優れた方法と考えられる。

本稿では、培養細胞株ならびに新鮮白血病細胞を用いて行なった間接ロゼット法の検討、ならびに蛍光抗体法との比較結果について報告する。

### II. 材料ならびに方法

#### 1. 培養細胞株 (表1)

白血病培養細胞株のうち、Null, Pre-B 細胞

株5種 (KOPN-1, NALN-1, NALM-6, NALM-16, Reh), B細胞株9種 (KOPB-26, KOPB-Y1, KOBK-96, KOBK101, Raji, BALL-1, K81, RPMI 6410), T細胞株9種 (KOS-20, P30/Ohkubo, KOPT-K1, KOPT-4, KOPT-5, KOPT-6, MOLT-4, CCRF-CEM, CCRF-HSB-2) を用いた。これらの細胞株はすべて当教室で、10% FCS 添加 RPMI 1640 培養液で維持されている。それぞれの細胞の性格は表1にまとめた。

#### 2. 新鮮白血病細胞

小児急性リンパ性白血病 (ALL) 18例、うち5例は T-ALL, 13例は Common ALL 抗原陽性の Null-ALL, 対照として健康成人10例を用いた。患者あるいは健康成人末梢血より Hypaque-Ficoll 法で単核球層を分離し、洗浄後用いた。

#### 3. モノクローナル抗体

使用したモノクローナル抗体は表2に示した。T4, T8, T11, 12, B1, J5, MY4, MY7 は Coulter Clones 社より提供を受けた。Ia17 (KOR-Ia17)<sup>2)</sup>, N34 (KOR-N34)<sup>3)</sup> T49 (KOR-T49)<sup>4)</sup> は当教室で樹立したモノクローナル抗体である。

#### 4. 間接膜蛍光抗体法 (IF法)

標的細胞 $10^6$ 個に対しモノクローナル抗体 (最終反応濃度の4倍以上の濃度)  $100\mu\text{l}$  を加え、 $4^\circ\text{C}$ , 30分反応, 反応後 Phosphate buffer saline (PBS, pH7.4) で3回洗浄, そこへ FITC 標識家兎抗マウス IgG 抗体 (MBL 社製) を加え  $4^\circ\text{C}$ , 30分反応させた。反応終了後 PBS で洗浄, スライドグラスにマウントし, 落射型蛍光顕微鏡 (日本光学, Fluophot) で観察した。

\* 1 慶応義塾大学医学部小児科学教室

\* 2 社会保険埼玉中央病院免疫研究室

表1 使用した培養細胞株

CELL LINES	ORIGIN	CATEGORY	E	sIg	cIg	T-Ag	Ia	CALLA	Myeloid-Ag
KOPN-1	ALL	Pre-B	-	-	+	-	+	+	-
NALM-1	CML	Pre-B	-	-	+	-	+	+	-
NALM-6	ALL	Pre-B	-	-	+	-	+	+	-
NALM-16	ALL	Null	-	-	-	-	+	+	-
Reh	ALL	Null	-	-	-	-	+	+	-
KOPB-26	ALL	Pre-B/B	-	+	+	-	+	+	-
KOPB-Y1	ALL	B	-	+	+	-	+	+	-
KOBK-96	BL	B	-	+	+	-	+	+	-
KOBK-101	BL	B	-	+	+	-	+	+	-
Raji	BL	B	-	+	+	-	+	-	-
BALL-1	ALL	B	-	+	+	-	+	+	-
K81	Normal	B	-	+	+	-	+	-	-
RPMI 6410	Normal	B	-	+	+	-	+	-	-
KOS-20	ALL	Pre-T(?)	-	-	(?)	+	+	+	-
P30/OHKUBO	ALL	Pre-T(?)	-	-	-	+	-	+	-
KOPT-K1	ALL	T	+	-	-	+	-	-	-
KOPT-4	ALL	T	-	-	-	+	-	-	-
KOPT-5	ALL	T	+	-	-	+	-	-	-
KOPT-6	ALL	T	+	-	-	+	-	-	-
MOLT-4	ALL	T	+	-	-	+	-	-	-
CCRF-CEM	ALL	T	-	-	-	+	-	-	-
CCRF-HSB-2	ALL	T	-	-	-	+	-	-	-
HL60	APL	Myeloid	-	-	-	-	-	-	+
KOPM-28	CML	Myeloid	-	-	-	-	+	-	+
KG-1	AML	Myeloid	-	-	-	-	+	-	+
ML-1	AML	Myeloid	-	-	-	-	+	-	+
U937	AMoL	Myeloid	-	-	-	-	+	-	+

BL : Burkitt's lymphoma leukemia

E : E-rosette forming cell, sIg : Surface immunoglobulins

cIg : Cytoplasmic mu chain, T-Ag : T-antigen, Ia : Ia like antigen

CALLA : Common ALL antigen.

表2 使用したモノクローナル抗体

T4	Coulter	Helper/Inducer T
T8	Coulter	Suppressor/Cytotoxic T
T11	Coulter	E-rosette forming cells
T49	Keio, Ped.	Pan T
I2	Coulter	Ia like
Ia17	Keio, Ped.	Ia like
B1	Coulter	Pan B
J5	Coulter	Common ALL antigen
N34	Keio, Ped.	Common ALL antigen
MY4	Coulter	Monocytes, Granulocytes
MY7	Coulter	Monocytes, Granulocytes

5. 指示細胞 (抗マウス IgG 抗体結合 Ox 赤血球) の作製

よく洗浄したウシ赤血球 (Ox red blood cells)  $10^9$  細胞に対しヤギ抗マウス IgG 抗体 ( $2 \text{ mg/ml}$ )  $100 \mu\text{l}$ , さらに 0.02% 塩化クロム ( $\text{CrCl}_3$ )  $200 \mu\text{l}$  を混合し, 室温で 30 分間反応

させた。反応終了後, 生食水で 3 回洗浄, 20% FCS 添加生食水で  $4^\circ\text{C}$ , overnight インキュベーション。Overnight インキュベーション後生食で洗浄, FCS (2%), gelatine (0.2%), glucose (0.5%) 添加 PBS に保存した。使用直前に生食で洗浄して用いた。

## 6. 間接ロゼット法の実際

本法の基本的な所は橘ら<sup>5)</sup>のマイクロテストプレート法によるT, Bリンパ球微量定量法に準じ

ている。方法は、分離した単核球 (10 cells/ml) 1-2  $\mu$ l を poly-L-lysine 処理マイクロテストプレート (Falcon #3034) の各穴に分注, 15

図1 指示細胞 (抗マウス IgG 抗体結合ウシ赤血球) の作製方法

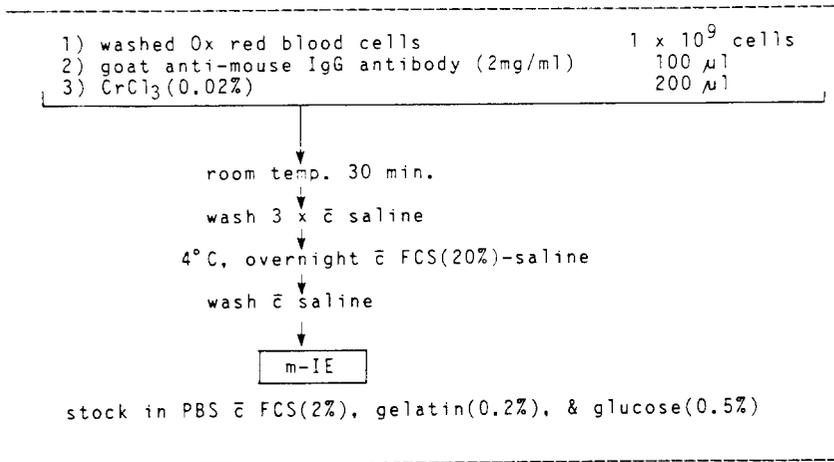
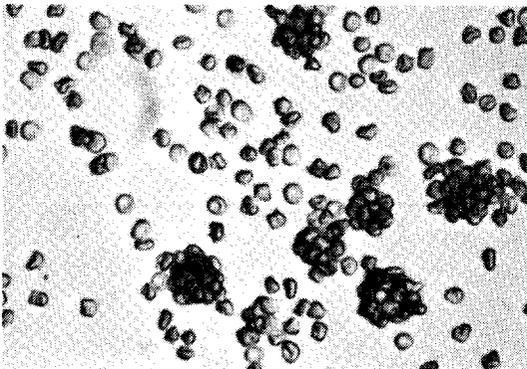
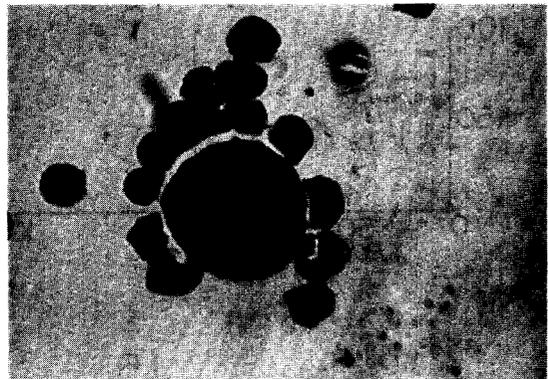


写真1 マイクロテストプレート上のロゼット形成細胞



分静置, そのあと FCS 5  $\mu$ l を各穴に加え, 30分静置した。次に各穴に希釈したモノクローナル抗体 10  $\mu$ l を加え, 37°C, 30分静置した。モノクローナル抗体の反応後, 各穴に P B S を加え洗浄した。洗浄後各穴に指示細胞 (5 x 10 cells/ml) 4  $\mu$ l 加え, 37°C, 30分反応させた。反応後マイクロテストプレートを反転, 洗浄し, さらに固定, 染色を行ない光学顕微鏡で観察を行なった。形成されたロゼットはT, B細胞測定時のロゼットと形態は同じである (写真1)。なおこの反応を

写真2 ロゼット形成細胞のスマア- (ギムザ染色)



ガラスチューブで行ない, スマア-を作製し, 実際にロゼットを形成している細胞の形態を見ることが出来る (写真2)。

## III. 結 果

### 1. 間接ロゼット法と蛍光抗体法の感度の比較

間接ロゼット法と蛍光抗体法をいろいろな濃度のモノクローナル抗体で比較すると, 間接ロゼット法で感度が高い印象を受けたが, T細胞株 K O P T-K I にモノクローナル抗体 K O R - T 49 を

図2 T-細胞株 縦軸は蛍光抗体法 (IF), 横軸は間接ロゼット法 (ROSETTE)

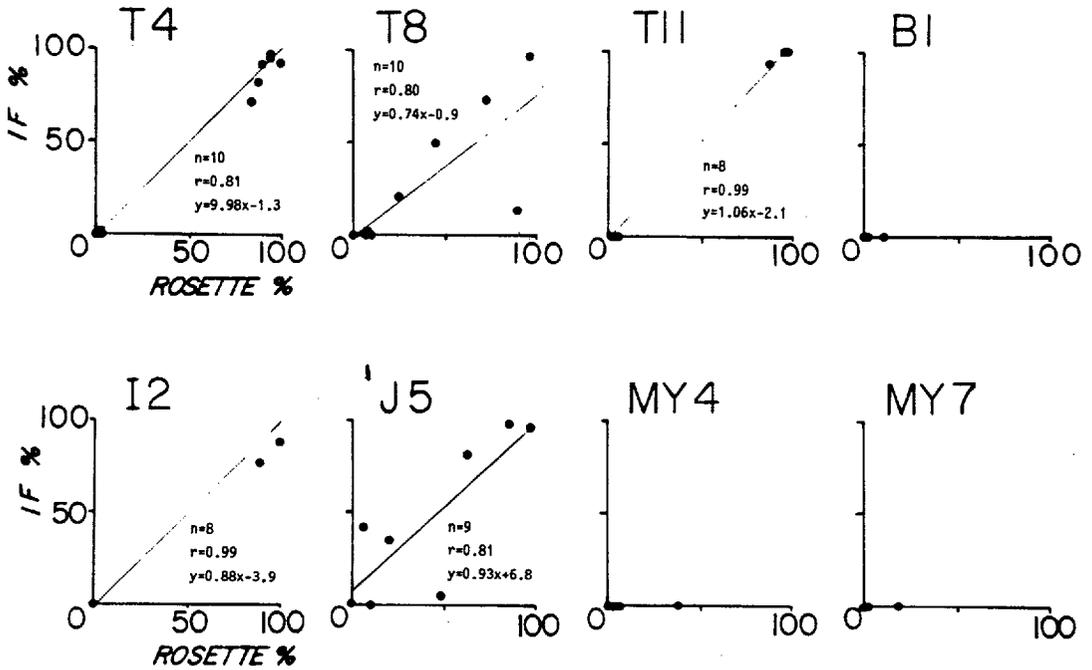
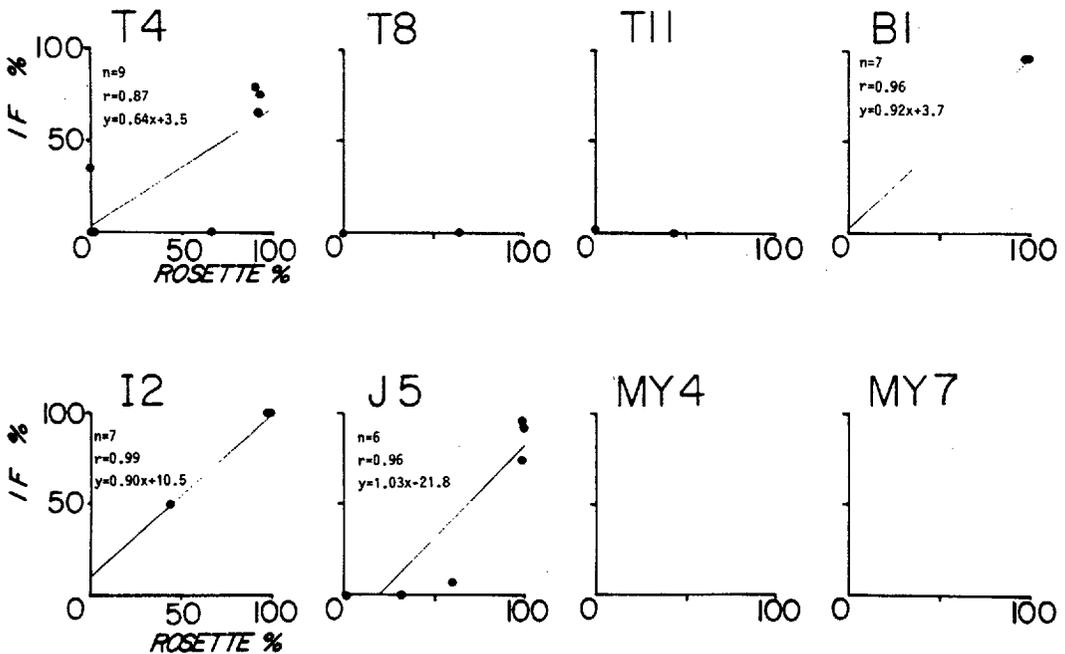


図3 B-細胞株



用い、各濃度での差をみたところ、両者に明らかな差を認めなかった。

2. 培養細胞株に対する反応性の比較

1) T-細胞株 (図2)

縦軸に蛍光抗体法 (IF法)、横軸に間接ロゼット法 (ROSETTE) のそれぞれの結果を%で

図4 Pre-B ならびにNull 細胞株

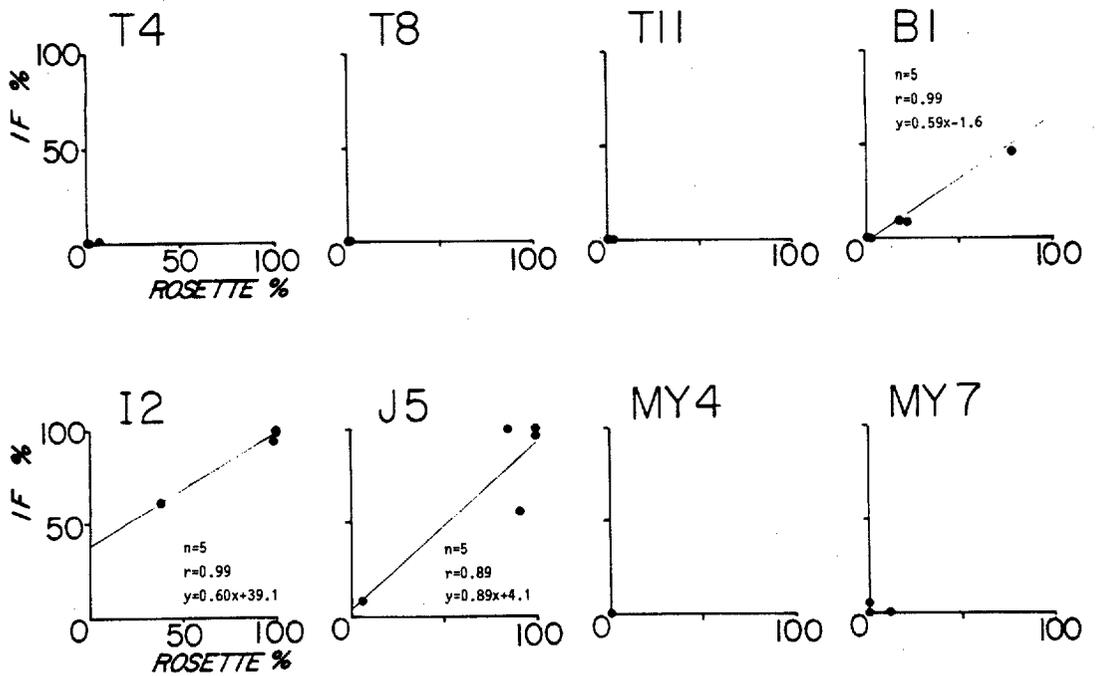
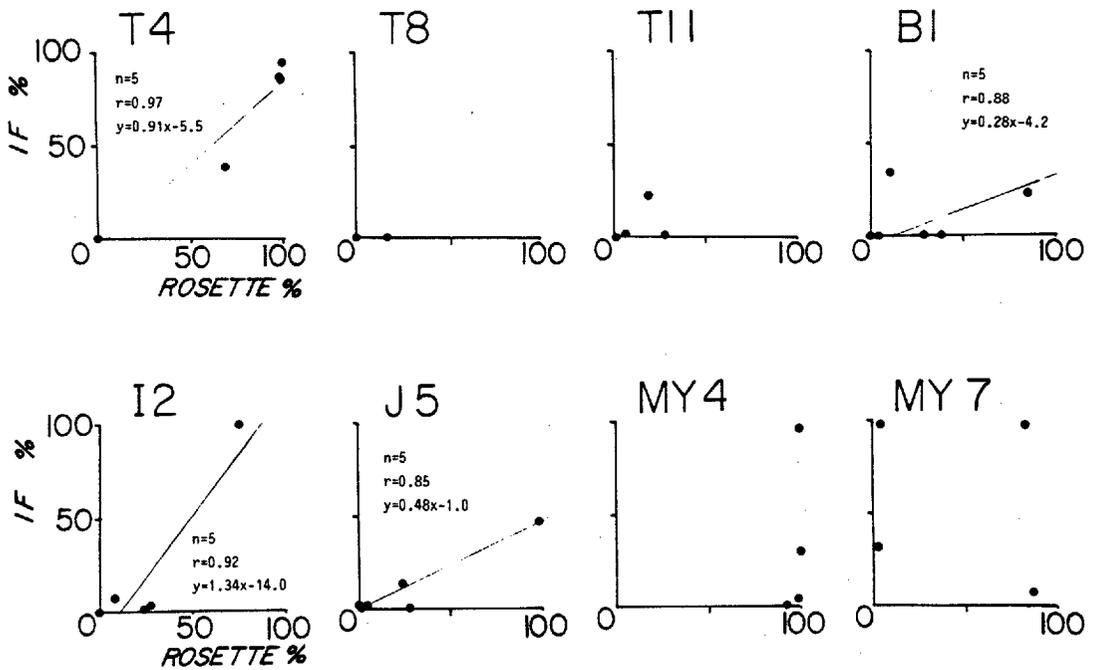


図5 骨髓, 単球系細胞株



表わした。T-細胞株ではT4, T8, T11, I2, J5で両方法が良く相関した。

2) B-細胞株 (図3)  
B細胞株ではB1, I2, J5で良い相関を認め

図6 E-ロゼット形成とT11モノクローナル抗体の反応性の比較

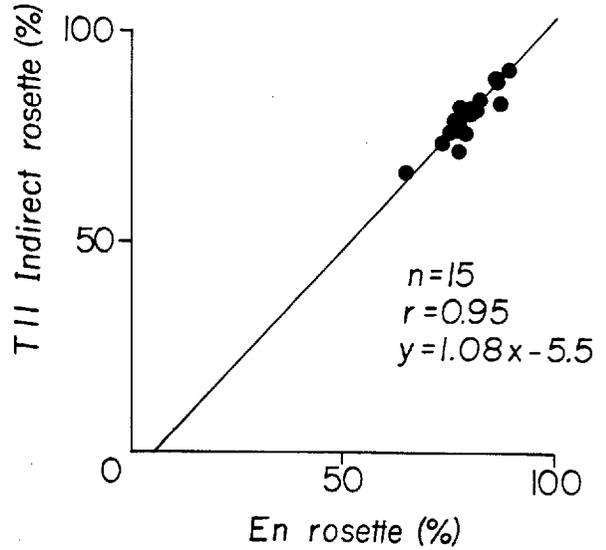
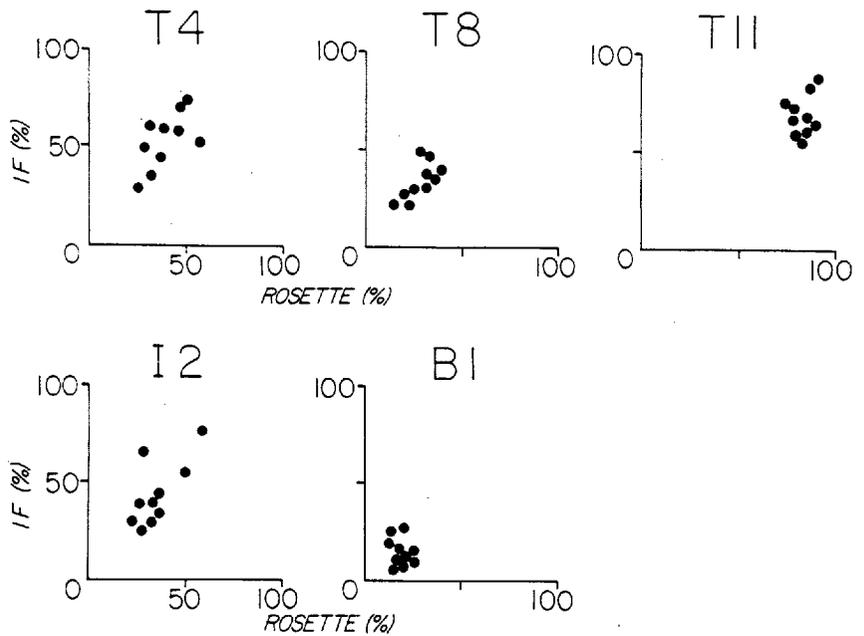


図7 末梢血リンパ球 (健康成人)



た。T8, T11, MY4, MY7では両方法で反応は認められなかった。一部のB細胞株でT4に反応を認めたが、この理由は不明であった。

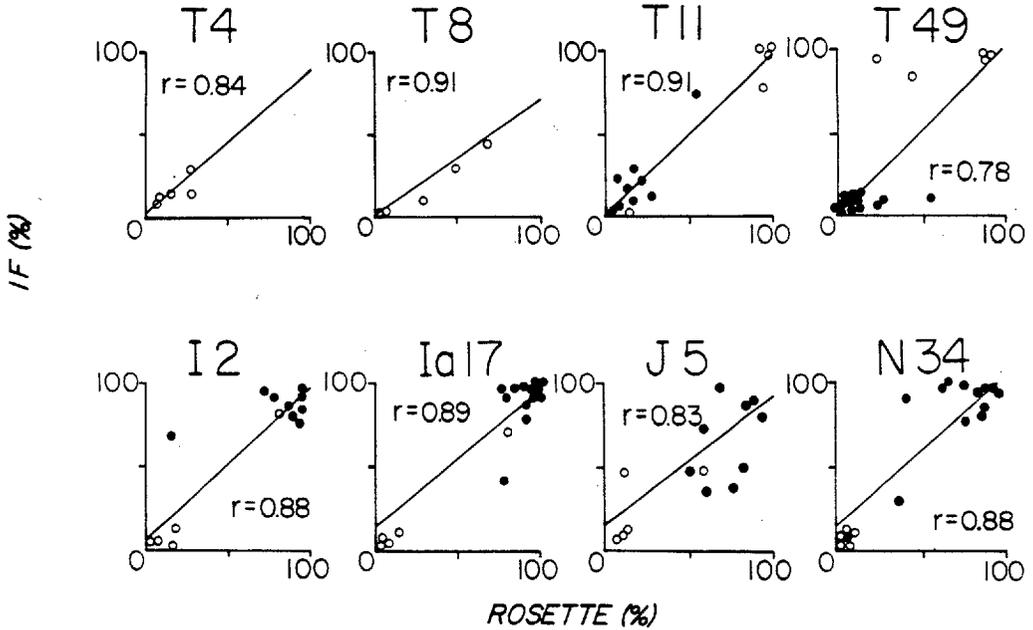
3) Pre-B およびNull細胞株 (図4)

Pre-B およびNull細胞株5種では、B1, I2, J5に対して両方法の値は良く一致した。他のモノクローナル抗体では反応は認められなかった。

4) 骨髄単球系細胞株 (図5)

骨髄単球系細胞株5種で比較した結果は図5に示したごとく相関は明らかでなかった。骨髄単球系細胞株はFc-receptorを発現しているものが多く、今回の検討条件では、どちらの方法が優れているか明らかでなかった。

図8 新鮮白血病細胞 T-ALL 5例(○印), Null-ALL 13例(●印)



### 3. 末梢血リンパ球に対する反応

モノクローナル抗体 (T11) の反応性と E-Ro sette を比較した結果は図6に示した。T11は E-Rosette Receptor に対する抗体であり、両者は非常に良好な相関性を示した。他のモノクローナル抗体による間接ロゼット法と蛍光抗体法の比較では図7の様な散布図となった。すべての値が点に集積する傾向があるため、相関係数、回帰直線は得られなかったが、散布図から見るかぎり両方法の値がよく相関することが想像された。

### 4. 新鮮白血病細胞に対する反応性 (図8)

T-ALL 5例, Null-ALL 13例について両方法で調べた結果は図8に示した。相関係数 0.78-0.91で散布図に示すごとくよく一致した。

## IV. 考 察

近年、白血病の治療を行なう上で免疫学的マーカーによる分類は不可欠となってきた。大多数の白血病治療研究グループでは、急性リンパ性白血病を T-ALL, B-ALL, Null (Common) ALL の3群に分けて、異なったプロトコールで治療する傾向にある。またモノクローナル抗体の確立により、診断のための抗体パネルもある程度確立さ

れて来た。しかしながら、小児急性リンパ性白血病ではしばしばサンプルとなる細胞が十分得られず、膜抗原マーカー解析が不可能なことが多い。著者らの経験では、依頼された検体総数の15%は、従来の蛍光抗体法で検索不能であった。このような細胞数不足の隘路に対し、今回検討した間接ロゼット法は解決の糸口となると思われる。

間接ロゼット法の原理は、標的細胞と反応したモノクローナル抗体と、ウシ赤血球と結合させた抗マウス IgG 抗体が反応し、標的細胞とウシ赤血球とのロゼット形成より反応を見る方法である。本法の特徴は、ウシ赤血球に塩化クロムでブロードに反応する抗マウス IgG 抗体を結合させた指示細胞を、マイクロテストプレート上で反応させた点である。塩化クロムによる抗体の結合はよく知られており、いろいろな方面に利用されている<sup>6),7),8)</sup>。従来の方法では非特異的な反応が強く出たため、20% FCS 添加生食で overnight インキュベーションすることで、非特異的の反応をおさえた。また、結合させるヤギ抗マウス IgG 抗体の選択にも十分考慮した。マイクロテストプレートを利用した点は、T, B細胞微量定量法が一般化しており、比較的慣れたテクニックで、ロゼット形成を

見ることが出来ると考えたからである。また、微量のサンプルで検索が可能であり、使用するモノクローナル抗体も少量ですむ利点もある。間接ロゼット法では、抗体濃度は蛍光抗体法での濃度の1/100-1/200で可能とする報告もあるが、著者らの検討では等濃度から1/20くらいが適切と考えられる。

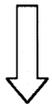
間接ロゼット法と蛍光抗体法を比較した結果は、両者の値は良く相関しており、抗原マーカーの解析に十分利用出来ることを示した。骨髄単球系白血球細胞の解析には、若干の問題が残っているが、急性リンパ性白血病の分類には、蛍光抗体法と遜色ないと考えられる。

本法の問題点は、ウシ赤血球と結合させた抗マウスIgG抗体とaffinityが強いモノクローナル抗体しか検索に使用出来ない、すなわちIgGタイプモノクローナル抗体しか使用出来ない点である。著者らは抗マウスIgM抗体の結合も試みているが、かならずしも良好な結果は得られていない。また、IgGタイプモノクローナル抗体に広く反応する抗マウスIgG抗体の入手も容易ではない。

今後さらに症例を増やし検討し、さらに一般病院レベルでの検査法として確立する必要のある方法と思われる。

## § 文 献

- 1) 中澤真平, 森泰二郎: 小児白血病の免疫学的マーカーによる分類とその臨床的意義. 小児科, 25: 75-86, 1984.
- 2) 高根恵子, 中澤真平, 森泰二郎, 西野和良: Leukemic cell line (KOPN-K) によるモノクローナル抗体作製の試み; I, 抗Ia様抗原. 第23回日本臨床血液学会総会抄録, 190, 1981.
- 3) 中澤真平, 森泰二郎, 高根恵子, 西野和良: Leukemic cell line (KOPN-K) によるモノクローナル抗体作製の試み; II, 抗Common ALL抗原. 第23回日本臨床血液学会総会抄録, 191, 1981.
- 4) 高根恵子, 森泰二郎, 西野和良, 中澤真平: Leukemic Cell Line (KOPT-K1) による抗Tモノクローナル抗体作製の試み. 第24回日本臨床血液学会総会抄録集, 431, 1982.
- 5) 橋 武彦: T, B細胞算定のためのロゼット形成試験. 臨床検査, 23: 651-659, 1979.
- 6) Jandl, J.H., Simmons, R.L.: The agglutination and sensitization of red cells by metallic cations; Interactions between multivalent metals and the red-cell membrane. Brit. J. Haemat., 3: 19-38, 1957.
- 7) Coombs, R.R.A., et al: Comparison of the direct antiglobulin rosetting reaction with the mixed antiglobulin rosetting reaction for the detection of immunoglobulin on lymphocytes. J. Immunol. Meth., 18: 45-54, 1977.
- 8) Ling, N.R. et al: Use of antibody-coated red cells for the sensitive detection of antigen and in rosette tests for cell bearing surface immuno-globulins. J. Immunol. Meth., 18: 55-62, 1977.
- 9) 園田 啓, 高田 肇, 入 久巳: テラサキプレートを用いた間接モノクローナル抗体ロゼット法 (IMAR法) によるT細胞サブセットの検討. 臨床検査, 28: 587-591, 1984.



## 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



### 1.はじめに

小児白血病は形態学的にも臨床的にも hetero-geneous な疾患であり,治療を行なう上で客観的な分類は不可欠である。小児急性リンパ性白血病(ALL)は初発時年齢および白血球数から Standard Risk Group と High Risk Group に分類され,異なったプロトコールで治療されて来た。さらに近年免疫学的マーカーによる分類が行なわれる様になり,さらに詳細な分類が可能になり,臨床像ならびに治療との関連性が明らかになってきた 1)。細胞膜マーカー解析には従来ヘテロ抗血清やロゼット法が用いられて来たが,最近ではモノクローナル抗体を利用した蛍光抗体法,あるいは FACS による解析がなされている。しかしながら,小児 ALL ではしばしば検体量が十分得られず,完全な解析が出来ない場合が多い。また蛍光抗体法や FACS による方法はかなりの設備を必要とし,一般病院で施行することは不可能である。この様な欠点に対し,間接ロゼット法は微量のサンプルで解析が可能であり,さらに光学顕微鏡で観察可能である点優れた方法と考えられる。

本稿では,培養細胞株ならびに新鮮白血病細胞を用いて行なった間接ロゼット法の検討,ならびに蛍光抗体法との比較結果について報告する。