

Characterization of Lymphoid Cells Expressing Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen (CALLA) in Bone Marrow from Non-Leukemic Patients

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8023

非白血病患者骨髄中に存在する Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen (CALLA) 陽性リンパ球様細胞の性状に関する研究

金沢大学医学部小児科学講座 (主任: 谷口 昂教授)

山 上 正 彦

(昭和63年2月18日受付)

正常成人, 正常小児 (骨髄移植提供者) 及び種々の血液疾患患者の骨髄中に存在する common acute lymphoblastic leukemia 抗原 (common ALL antigen, CALLA) 陽性細胞の性状について各種単クローン抗体とフロー・サイトメトリーを用いて検索した。骨髄リンパ球様細胞中に占める CALLA 陽性細胞の比率は正常小児では $35.6 \pm 12.6\%$ (平均値 \pm S.D.), 慢性良性好中球減少症の患児では $35.2 \pm 14.9\%$, 特発性血小板減小性紫斑病では $27.3 \pm 13.5\%$, 骨髄転移のない固形腫瘍では $32.9 \pm 6.9\%$ とそれぞれ高値を示した。それに対して再生不良性貧血の患児では $2.7 \pm 4.8\%$, 化学療法中の悪性腫瘍では $6.2 \pm 7.3\%$, 正常成人では $6.3 \pm 5.0\%$ と低値であった。CALLA 陽性率は維持療法を最近中止し造血再生がおこっている ALL の患者で有意に増加していた。同様の増加現象は骨髄移植を受けた ALL 及び再生不良性貧血の患者においても観察された。また CALLA 陽性率と年齢には有意の逆相関関係があった。これらのことから, CALLA 陽性率は骨髄の増殖活動性に影響するところの年齢, 薬剤投与のスケジュール, 疾患の種類などの因子によって変動することが推定された。Common ALL の白血球細胞の蛍光強度は平均 101.7 (mean channel number) であったのに対して, 正常 (非白血病性) の CALLA 陽性細胞の蛍光強度は平均 29.4 と弱かった。フロー・サイトメトリーを用いた二色解析によると CALLA 陽性細胞は B4, OKB2, HLA-DR, OKT10 が同時に陽性で一部の細胞は Leu16 も陽性であったが, B2, OKM1, OKT9, OKT11 は陰性であった。さらに抗ヒト IgM を用いた蛍光染色法により細胞質内 μ 鎖は EPICS C で分画した CALLA 陽性細胞の 10% に染色され, また terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) は免疫ペルオキシダーゼ染色法によって 20% の細胞に陽性に染色された。以上の結果により正常及び非白血病患者骨髄中に存在する CALLA 陽性細胞は B 前駆細胞から pre-B 細胞までの幅広い分化段階にある B 細胞系の細胞群に属しているということが推定された。

Key words CALLA, B progenitor cell, bone marrow, BMT, flow-cytometry, two-color analysis

Greaves らは初めて急性リンパ性白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL) 細胞で兔を免疫し抗血清を得た。その抗血清を用いた検索から, ALL 細胞に比較的広く共通する抗原として 95-100kD の分子量を持ち等電点 5.2 以下の単一の糖ペプチドが分離され

た。これがいわゆる common ALL 抗原 (common ALL antigen, CALLA) で, 小児の ALL 細胞の約 80% に発現しており CALLA 陽性の白血病 (common ALL) は T 細胞や B 細胞白血病に比べ比較的予後良好とされている。

Abbreviations: AML, acute myelogenous leukemia; AMoL, acute monocytic leukemia; ALL, acute lymphoblastic leukemia; Ara-C, cytarabine; BCGF, B cell growth factor; BM, bone marrow; BMT, bone marrow transplantation; CALLA, common acute lymphoblastic leukemia antigen; CD, cluster designation; CML, chronic myelogenous leukemia; CPA,

その後 Ritz ら²⁾により CALLA に対する単クローン抗体が作製され、フロー・サイトメリーの発達に伴って多くの研究がなされた。それによって CALLA は白血病細胞特異的な腫瘍抗原ではなく、一種の分化抗原としてさまざまな細胞に存在することが示された。一つは B 細胞の分化抗原として正常ヒト骨髄中の小リンパ球様細胞に発現されていること^{3)~7)}、また免疫ペルオキシダーゼ染色によって腎、小腸などの細胞にも CALLA 様の分子が存在すること⁸⁾、また最近では CALLA は成熟顆粒球、線維芽細胞にも発現していることが示されている^{9)~11)}。これらの中でもヒト B 細胞

の分化・増殖の場としての骨髄中の B 前駆細胞における CALLA 発現の態度は興味を持たれるところである。Clark ら⁴⁾は、正常成人の骨髄リンパ球中に占める CALLA 陽性細胞は、平均 7.2%、Ryan ら⁵⁾は正常成人では平均 4.5%、小児では 33.7%であったと報告している。しかし Ryan らの示した小児の骨髄は骨髄転移のない固形腫瘍や、顆粒球減少症などであり全く正常な小児とはいえない。そこで著者は正常骨髄として骨髄移植提供者を対照にして各種小児血液疾患患児の骨髄における CALLA 陽性細胞の分布に変化がないか検索した。また、フロー・サイトメリーを用いて行っ

Table 1. Analysis of CALLA on bone marrow cells

Diagnosis	No. of patients (No. of times*)	Age (years)	CALLA ⁺ cells % (mean ± S.D.)
Normal children	3 (3)	3, 5, 11	35.6 ± 12.6
adults	5 (5)	23~29	6.3 ± 5.0
Post BMT	5 (15)	2~13	23.0 ± 16.6
ALL			
During therapy	17 (32)	2~12	5.9 ± 7.0
Off therapy	9 (18)	6~16	28.4 ± 12.3
AML			
During therapy	4 (5)	6~13	16.5 ± 27.3
NHL			
During therapy	3 (5)	5~10	20.1 ± 24.8
Neuroblastoma			
Before therapy	2 (3)	0, 1	32.9 ± 8.4
During therapy	2 (2)	1, 2	6.3 ± 2.3
Wilm's tumor			
During therapy	2 (2)	2, 3	4.2 ± 4.5
Ewing's sarcoma			
During therapy	1 (1)	12	35.8
MDS			
During therapy	1 (1)	10	0.1
Osteogenic sarcoma			
Before therapy	1 (1)	15	10.1
Renal cell carcinoma			
Before therapy	1 (1)	15	16.5
Aplastic anemia	9 (14)	4~12	2.7 ± 4.8
Mild & moderate	2 (2)	9, 11	12.3 ± 6.8
Severe	7 (12)	4~12	1.1 ± 1.2
ITP	11 (11)	2~ 8	27.3 ± 13.5
Acute	9 (9)	2~ 6	31.2 ± 11.4
Chronic	2 (2)	4, 8	9.9 ± 6.6
Chronic benign neutropenia	6 (9)	0~ 2	35.2 ± 14.9

CALLA⁺, CALLA positive; BMT, bone marrow transplantation; ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myelogenous leukemia; NHL, non-Hodgkin lymphoma; MDS, myelodysplastic syndrome; ITP, idiopathic thrombocytopenic purpura.

*total times of tests.

cyclophosphamide; FACS, fluorescence activated cell sorter; FBS, fetal bovine serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; GVHD, graft vs host disease; ³H-TdR, tritiated thymidine; ITP, idiopathic thrombocytopenic purpura; MDS, myelodysplastic syndrome;

た抗 CALLA 抗体とそれ以外の各種単クローン抗体との二種解析により, CALLA 陽性細胞の分化段階について考察するとともに, 各種マイトゲンに対する反応性を検討し, この細胞の増加に関与する因子や, その免疫学的意義について考察を加えた。

対象および方法

1. 対 象

正常対照として小児は骨髄移植提供者 3 名, 成人は健康人 5 名を用いた。血液疾患患者は 1985 年 1 月より 1987 年 12 月までに金沢大学附属病院及び石川県立中央病院に外来通院又は入院中の患者 82 名を用いた。悪性腫瘍の寛解中で, 主に vincristin, doxorubicin, cyclophosphamide (CPA), prednisone などによる化学療法を継続中の患者 30 名は, うち急性リンパ性白血病 (ALL) 17 名, 急性骨髄性白血病 (AML) 4 名, 非ホジキンリンパ腫 (NHL) 3 名, 神経芽細胞腫 2 名, ウィルムス腫瘍 2 名, ユーイング肉腫 1 名, 骨髄異形成症候群 1 名であった。その他, 化学療法を開始前かつ骨髄転移のない固形腫瘍の患者 4 名 (神経芽細胞腫 2 名, 骨肉腫 1 名, 腎細胞癌 1 名), 化学療法を終了後

の患者 9 名 (ALL 9 名), 再生不良性貧血患者 9 名 (うち重症 7 名, 軽症 2 名), 特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) 11 名, 慢性良好好中球減少症 6 名であった。また, 骨髄移植後の患者は ALL 2 名, 急性単球形白血病 (AMoL) 1 名, 慢性骨髄性白血病 (CML) 1 名, 再生不良性貧血 1 名の計 5 名であった (表 1)。

尚, 骨髄移植は Thomas ら¹²⁾¹³⁾の方法に準じて, 白血病に対しては CPA 60 mg/kg × 2 + 全身放射線照射 10~12Gy (1 回あるいは 4 分割) かまたはそれに cytarabine (Ara-C) 2 g/m² × 4 を追加した前処置を施行した後 HLA 一致兄弟より移植した。再生不良性貧血に対しては CPA 50 mg/kg × 4 全身リンパ節照射 7Gy を前処置として行い HLA 一致兄弟より移植した。移植後は移植片対宿主病 (graft vs host disease, GVHD) の予防に methotrexate または ciclosporin を投与した。どの患者にも症度分類¹⁴⁾¹⁵⁾ II 以上の GVHD は見られなかった。

II. 骨髄細胞の分離

腸骨または胸骨より骨髄穿刺針とヘパリン加注射器にて骨髄液約 3 ml を吸引し, 直ちにリン酸緩衝液生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS) にて 10

Table 2. Monoclonal antibodies used in this study

MoAb	CD	Specificity	Source	Ref.
OKT9		Thymocytes, Activated lymphocytes, Transferrin receptor	Ortho	15
OKT10		Thymocytes, Activated lymphocytes, BM TdT positive cells, B cells	Ortho	16
OKT11	CD 2	E-rosette receptor	Ortho	17
B1	CD20	B cells, Pre-B cells	Coulter	18
anti Leu 16	CD20	B cells, Pre-B cells	B-D	
B2	CD21	B cells	Coulter	19
B4	CD19	B cells, Pre-B cells, Common ALL	Coulter	20
OKB2		B cells, Granulocytes, Pre-B cells, Common ALL	Ortho	21
OKB-cALLa	CD10	Common ALL, Pre-B cells	Ortho	
OKM1		C3bi receptor	Ortho	22
anti HLA-DR		B cells, Pre-B cells, Common ALL, Monocytes, Activated lymphocytes	B-D	23

MoAb, monoclonal antibody; CD, cluster designation, as defined by the Second International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens; Ref., reference; Ortho, Ortho Diagnostic Systems Inc, Raritan, NJ; Coulter, Coulter Immunology, Hialeah, FL.; B-D, Becton-Dickinson Immunocytometry systems, Mountain View, CA.

NHL, non-Hodgkin lymphoma; PBS, phosphate buffered saline; PE, phycoerythrin; PWM, pokeweed mitogen; SAC, Staphylococcus aureus Cowan I; TdT, terminal deoxynucleotidyl transferase; TPA, 12-O-tetradecaonylphorbol 13-acetate.

倍希釈し、Ficoll-Hypaque Lymphoprep (Nyegaard & Co., Oslo, Norway) に重層し、冷却遠心器にて 4°C 400 g 30 分間遠心した。中間層をとり PBS にて 3 回洗浄し、L-グルタミン (0.3 mg/ml)、ペニシリン (200 U/ml)、ゲンタマイシン (10 µg/ml)、HEPES 緩衝液 (0.02 M, GIBCO, Grand Island, NY), を含む RPMI1640 培地 (GIBCO) に浮遊した。

III. 単クローン抗体による蛍光染色法

CALLA に対する単クローン抗体として fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識 OKB-cALLa (Ortho Diagnostic System Inc.) を用いた。その他に用いた単クローン抗体は OKT9, OKT10, OKT11, OKB2, OKM1 (以上 Ortho), B1, B2, B4 (以上 Coulter Immunology), 抗 Leu16, 抗 HLA-DR (以上 Becton-Dickinson Immunocytometry Systems) を用いた。それらの抗体は認識する細胞表面抗原を表 2 に示す。分離した単核細胞を浮遊した検体 0.1 ml に対して単クローン抗体 2.5 µl を加え、4°C, 30 分静置した。FITC の標識されていない一次抗体の場合は、アジドナトリウム添加 PBS (PBSA) にて 2 回洗浄後、二次抗体として蛍光標識抗マウス・ヤギ抗体 (Cappel Lab. Inc. Cochranville, PA) を 2.5 µl 加え再び 4°C, 30 分静置した。その後 1 回のみ洗浄して下記のごとく解析した。

IV. 2 種の単クローン抗体による二重染色法

染色に用いる 2 種の抗体がそれぞれ FITC と phycoerythrin (PE) で標識されている場合は、それぞれの抗体を同時に加えて 4°C, 30 分静置した。PE 標識の抗体がない場合は PE で染色したい抗体 (精製抗体) を一次抗体として用い、二次抗体としてビオチン標識抗マウス・ヤギ抗体 (Tago, Inc. Burlingame, CA), さらに三次抗体として PE 標識ストレプトアビジン (Streptavidin, Beckton Dickinson) を用いた。三次抗体を加える際に同時に他方の FITC 標識抗体も加えた。

V. 測定及び細胞分画法

測定にはフロー・サイトメリー-SPECTRUM III (Ortho) を用い、細胞の大きさ (forward scatter), 直角散乱光 (right scatter) は末梢血リンパ球と同様の領域に設定して解析した。2 色解析には FCM データ解析プログラム (DS-1, Ortho) を用いた。また陽性細胞の分画には fluorescence activated cell sorter (FACS) である EPICS C (Coulter electronics, Hialeah, FL) を用いた²⁴⁾。分画した CALLA 陽性細胞は Cytospin 2 (Shandon Southern Products Ltd. England) を用いてスライド標本を作製した。May-Grünwald-Giemsa 染色にて細胞の形態を観察した。

VI. TdT 染色法

スライド標本を 4°C メタノールで 30 分間固定し PBS で 5 分間洗浄後冷風乾燥した。非特異的結合を防ぐために 10% ヤギ血清 15 µl を添加後ウサギ抗 TdT 抗体 (Bethesda Research Lab. Life Technologies, Inc. Gaithersburg, MD) 15 µl をのせ湿潤箱中に室温 30 分間静置した。PBS にて 5 分間ずつ 3 回洗浄後 0.1% H₂O₂ 添加 PBS にて室温 15 分間反応させた。さらに PBS で 3 回洗浄後 Hsu ら²⁵⁾ の開発した ABC 法によりビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG (Vector Lab. Inc. Burlingame, CA) を 15 µl のせ室温 30 分間湿潤箱にて静置。PBS にて 3 回洗浄後アビチン・ペルオキシダーゼ複合物 (Vector Inc.) 15 µl をのせ室温 30 分間静置した。PBS にて 3 回洗浄後 3-Amino-9-ethyl-carbasole (AECZ, Aldrich Chemical Company, Inc. Milwaukee, WI), H₂O₂, トリス緩衝液にて発色させた。最後にカラッチ・ヘマトキシリン (武藤化学) にて 10 分間後染色を行った。

VII. 細胞質内 µ 鎖の染色法

TdT 染色と同様にスライド標本を作製し、Kearny ら²⁶⁾ の方法と同様に、空気乾燥後 5% 酢酸 95% エタノールにて -20°C 20 分間静置し固定した。PBS にて洗浄後、FITC 標識抗ヒト IgM (Tago, Inc.) 20 倍希釈液を 0.1 ml のせ湿潤箱にて 30 分静置した。洗浄後 50% グリセリンにて封入し蛍光顕微鏡下にて観察した。

VIII. 骨髄及び末梢血単核球の各種マイトゲンに対する反応性

1 × 10⁵ 個の被検細胞を 10% 牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS, GIBCO) 加 RPMI1640 培養液 0.2 ml に浮遊し、マイクロプレート (No. 3042, Falcon Plastic, Oxnard, CA) を使用して培養した。マイトゲンはあらかじめ検定を行い、5 倍希釈のポークウイードマイトゲン (pokeweed mitogen, PWM, GIBCO) を 10 µl/ml, 又は 100 倍希釈の黄色ブドウ球菌コーワン I 株 (Staphylococcus aureus Cowan I 株, SAC, Meloy Lab. Springfield, VA) 10 µl/ml を使用し、5% CO₂ インキューベーターで 37°C 120 時間培養を行った。培養停止 24 時間前に tritiated thymidine (³H-TdR) を 1 µCi/ml 加え、細胞内への取り込みを液体シンチレーションカウンターにて測定した。培養はすべてトリプルで行った。

IX. 統計学的検定法

得られた成績はすべて平均値 ± 標準偏差で示した。2 群の平均値の差の検定には各群の正規分布を確認できない為、Wilcoxon の順位和検定を用いた。同様に 2 群間の相関の検定には Spearman 相関係数を用いた。

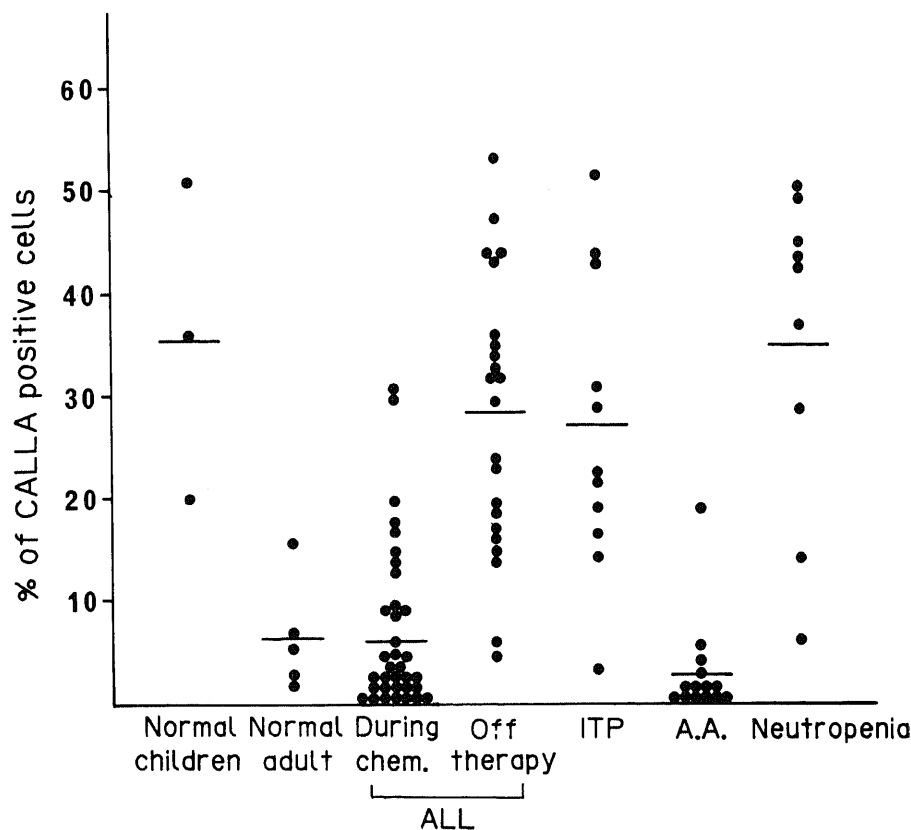


Fig. 1. The percentage of CALLA positive cells in bone marrow cells. Eight bone marrow samples were obtained from 3 normal children who were donors for bone marrow transplantation and from 5 adult volunteers after informed consents. Bar indicates mean for each group. chem., chemotherapy; A. A., aplastic anemia.

成 績

1. 正常及び各疾患における CALLA 陽性細胞の比率

表 1 及び図 1 に示すように、正常小児では $35.6 \pm 12.6\%$ (平均値 \pm S.D.), 正常成人では $6.3 \pm 5.0\%$ で両者間には有意差が認められた ($p < 0.05$). 各疾患別においては、ALL の化学療法中の患者では $5.9 \pm 7.0\%$ 、治療終了後の患者では $28.4 \pm 12.3\%$ と終了後に有意の上昇が見られた ($p < 0.01$). AML で寛解中の患者では $16.5 \pm 27.3\%$, NHL の寛解中の患者では $20.1 \pm 24.8\%$ で個体間にばらつきが見られたが、抗癌剤投与開始数日間ではほとんど 0% に近く、薬剤間歇投与の患児では、クール開始直前で高い傾向が見られた。固形腫瘍では初診時の治療開始前、治療開始後と比較すると、治療前では正常小児とほぼ同様であった。再生不良性貧血では重症例は全例 5% 以下であった

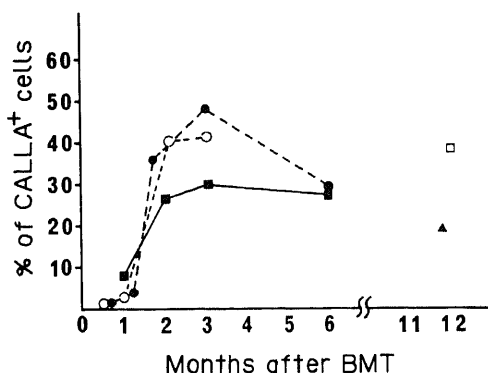


Fig. 2. Recovery of CALLA positive cells after bone marrow transplantation. ■—■, 12 years old patient with ALL; ●.....●, 2 years old patient with ALL; ○.....○, 9 years old patient with A. A.; □, 10 years old patient with CML; ▲, 3 years old patient with AMoL.

が、軽症から重症化した例では 19.0%から 0.3%へと著明な減少が認められた。ITP では $27.3 \pm 13.5\%$ で正常小児とほぼ同率であったが、そのうち急性の患者では $31.2 \pm 11.4\%$ 、慢性の患者では $9.9 \pm 6.6\%$ であり急性の患者の方が有意に高かった ($p < 0.05$)。慢性良性好中球減少症では $35.2 \pm 14.9\%$ で正常小児とほぼ同様であった。

II. 骨髄移植後の患者における CALLA 陽性細胞の増加

骨髄移植後の患者骨髄中の CALLA 陽性細胞は移植後 1 ヶ月までは 5%以下であったが、移植後 1 ヶ月頃を過ぎて急激に増加し移植後 3 ヶ月には 40%にまで達した (図 2)。移植後 1 年を経過した AMoL、CML の 2 例はそれぞれ 19.2%、38.0%であった。

III. 正常及び非白血病患者骨髄細胞の CALLA 陽性率と年齢との関係

表 1 及び図 1 に示した比較的正常小児と近い CALLA 陽性率を示した疾患のうち ITP、慢性良性好

中球減少症、治療終了後の ALL を選び、それぞれの疾患患者と正常小児、正常成人の個々の CALLA 陽性率を年齢別に検討した。図 3 に示すように、

$$y = 36.1 - 1.17x \quad (r = -0.58)$$

y, CALLA 陽性率; x, 年齢

と、年齢と CALLA 陽性率の間には有意の負の相関を認めた ($p < 0.01$)。

IV. 正常骨髄細胞の CALLA と白血病細胞の CALLA の比較

Common ALL の白血病細胞と正常小児及び各種血液疾患に見られる正常 (非白血病性) の CALLA 陽性細胞を SPECTRUM III にてその蛍光強度を linear scale で比較した。白血病細胞以外の CALLA 陽性細胞はほとんどが蛍光強度が弱く mean channel は 29.4 ± 3.5 (平均値 \pm S.D.) であった。それに対して初発 ALL 患者 8 例について測定したところ白血病細胞の CALLA 強度は、30.5 と弱かった 1 例を除いて非常に強く 101.7 ± 26.4 であった。正常及び白血病の代表

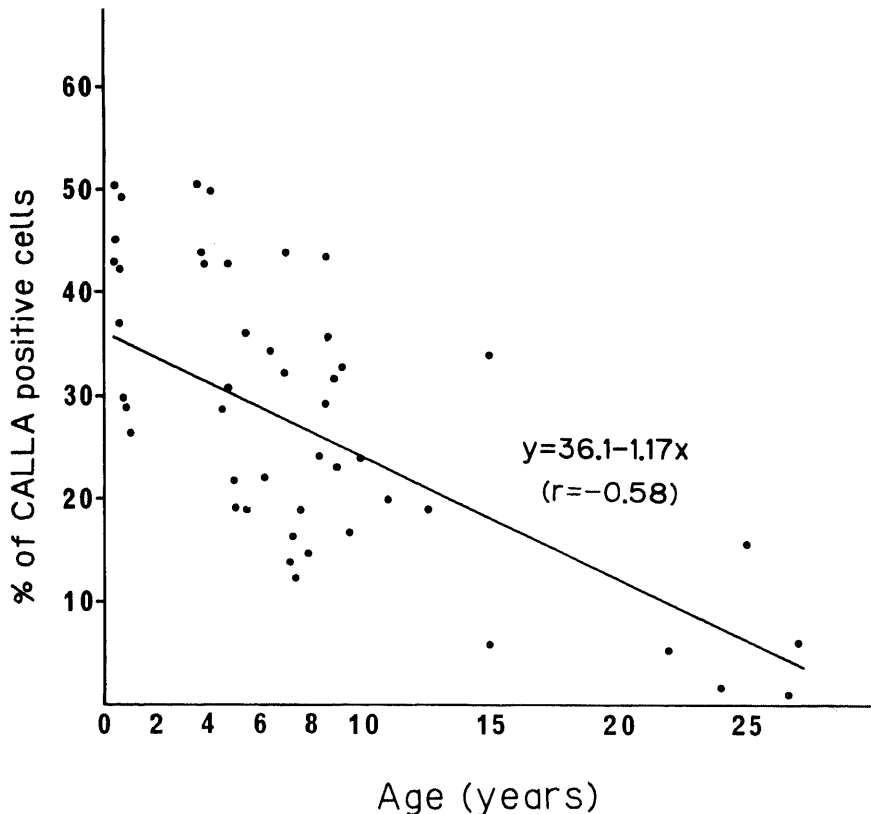


Fig. 3. Correlation between age and percentage of CALLA positive cells in bone marrow. Each point represents the data from patients with off-therapy ALL, ITP, chronic benign neutropenia and from normal volunteers.

例1例づつのヒストグラムを図4A, Bに示した。

V. 正常 CALLA 陽性細胞の二色解析

CALLA 陽性細胞が同時にどのような表面抗原を持つか検索するために OKB-cALLa とそれ以外の数種の単クローン抗体との二色解析を試みた (図5)。この二色解析により CALLA 陽性細胞は, B4, OKB2, HLA-DR, OKT10 のそれぞれの陽性細胞群の中にすべて含まれた。Leu16 は CALLA 強度のかなり弱い陽性細胞の一部に弱く陽性でありこの例においては CALLA⁺ Leu16⁻ が 36.3% に対して CALLA⁺ Leu16⁺ は 2.2% にしづなかつた。CALLA⁻ Leu16⁺ は 7.1% であった。他の例においても CALLA⁺ Leu16⁺ は $3.5 \pm 1.2\%$ (平均値 \pm S. D.) という比率であった。CALLA 陽性細胞と B2, OKT9, OKM1, OKT11 の陽性細胞は完全に別の群を成し, 両者が同時に陽性の細胞はなかつた。

VI. CALLA 陽性細胞の EPICS C による単離

EPICS C により分画した CALLA 陽性細胞と陰性細胞を SPECTRUM III にて再検した (図 4C, D)。陽性として分画した細胞群の CALLA 陽性率は 95.6% で、陰性群の CALLA 陽性率は 5.8% であった。それぞれのスライド標本を May-Grünwald-Giemsa 法にて染色した。図 6 に示されているように CALLA 陽性細胞の大多数は小型リンパ球の形態を示し、胞体は好塩基性であった。少数の大型のリンパ芽球様細胞も混在していた。それに対して CALLA 陰性細胞は単球や未熟な顆粒球などが多く含まれていた。

VII. TdT 及び細胞質内 μ 鎖の染色性

CALLA 陽性細胞のスライド標本では小型のリンパ球様細胞のうち平均 20% に TdT が陽性に染色された。大型の細胞には TdT は染色されなかつた。細胞質内 μ 鎖は CALLA 陽性細胞のうち平均 10% に陽性で

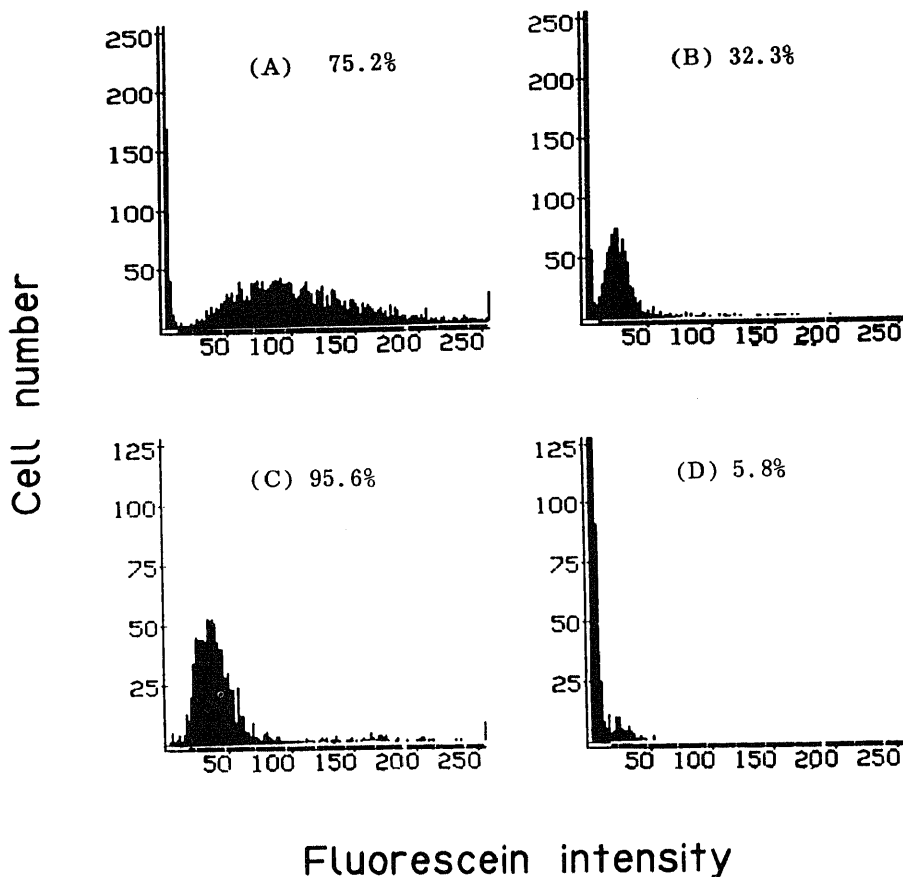


Fig. 4. Flowcytometric analysis of CALLA positive cells: (A) common ALL cells, (B) normal bone marrow cells, (C) sorted CALLA⁺ cells, and (D) sorted CALLA⁻ cells. Channel number of CALLA intensity by linear scale was 108.0 ± 49.8 (mean \pm S.D.) (A) and 30.9 ± 21.5 (B).

あったが、なかでも比較的大型の細胞に多く染色された。

VIII. マイトゲンに対する反応性

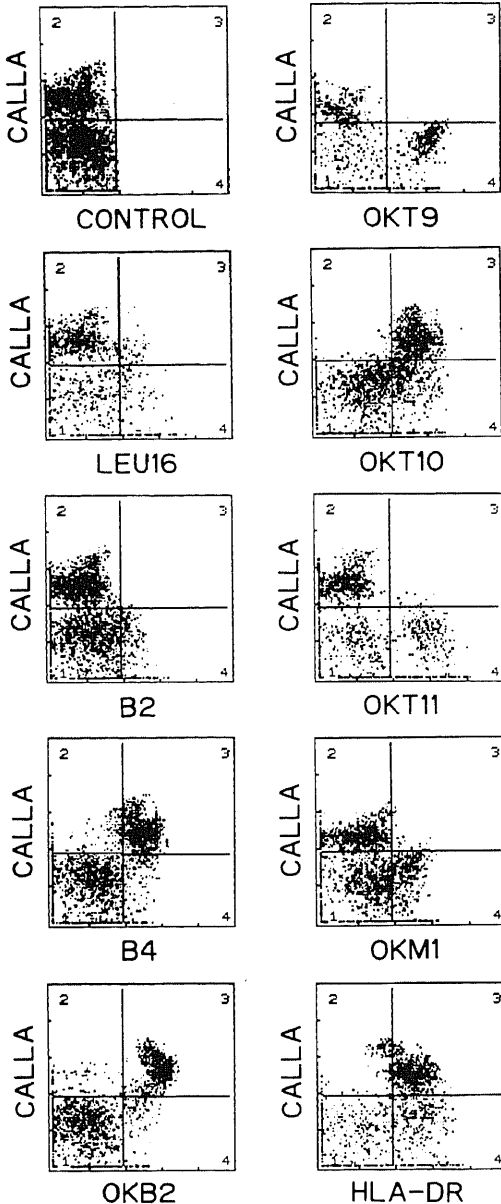


Fig. 5. Correlated expression of CALLA and other cell surface antigens on bone marrow cells of a BMT donor. Bone marrow cells were double-stained with fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated OKB-cALLa and phycoerythrin (PE) conjugated Leu16, B2, OKT11, HLA-DR or non-conjugated monoclonal antibodies (control ascites, B4, OKB2, OKT9, OKT10, OKM1).

EPICS C によって分画した CALLA 陽性細胞のマイトゲンにたいする ^3H -TdR の取り込みを表 3 に示す。対照として非分画骨髓単核細胞及び成人末梢血単核細胞を用いた。非分画骨髓細胞および CALLA 陰性細胞はマイトゲン非添加においても ^3H -TdR の取り込みは高値でマイトゲン添加によっても著明な変化は認められなかった。CALLA 陽性細胞はマイトゲンの添加、非添加にかかわらず ^3H -TdR の取り込みは低値であった。

考 案

正常骨髓に発生する CALLA 陽性のリンパ球様細胞はヒトにおいて認識できる最も未熟な B 細胞であるため、また common ALL の細胞と表現型が非常に類似しているため興味をもたれるところである。これらの細胞は小児の骨髓や様々な胎生の組織中に有意に数多く存在していることはすでに知られているが、著者はまず小児の血液疾患の種類によってその比率がどのように変化しているか検索した。その結果、全くの正常小児である骨髓移植提供者と血液疾患の中で小児慢性良性好中球減少症、ITP、未治療の骨髓転移のない固形腫瘍では骨髓リンパ領域中の CALLA 陽性細胞は 20~50% と高値を示したのに対して再生不良性貧血では 5% 以下と低値であった。また化学療法中の患者に比して 3 年間の治療を終了した患者で CALLA 陽性細胞が有意に増加していること、骨髓移植患者では移植後 1 ヶ月より急激に増加していることなどより Greaves ら²⁷⁾ が記載したのと同様、増殖中あるいは回復中の骨髓に CALLA 陽性細胞が増加していることが明らかとなった。また、これら高値をとった正常小児及び各疾患患児の CALLA 陽性率を年齢別に比較したところ年齢と CALLA 陽性率の間に $r = -0.58$ で有意な負の相関関係が認められた。以上のことから骨髓中の CALLA 陽性細胞の比率は年齢、薬剤投与スケジュール、疾患の種類など骨髓の増殖状態に関与する因子によって影響を受けていることが推定された。

次にこの小児に増加している CALLA (CD10) 陽性細胞はどの系統の細胞であるか確かめるため数種の単クローン抗体を用いて二色解析を試みた。その結果、CALLA 陽性細胞は B 細胞であることを決定する B4 (CD19) が陽性、B 細胞に表現される HLA-DR、OKB2 も陽性であり、活性化抗原である OKT10 も陽性であった。それに対して、成熟 B 細胞に表現される B2 (CD21)、単球、顆粒球に表現される OKM1、トランスフェリンセプターである OKT9、全ての T 細胞に染色される OKT11 (CD2) はすべて陰性であった。よって CALLA 陽性細胞は顆粒球、単球、赤芽球系の細胞

とは明らかに異なり、またリンパ球の中でも T 細胞や成熟 B 細胞とも異なる幼若 B 細胞であると推論された。一方、Leu16 (CD20) が一部陽性であること、さらに細胞質内 μ 鎖も一部の CALLA 陽性細胞に認められたことから未熟な B リンパ球の中に成熟 B 細胞に近い細胞群を含んでいると考えられた。Ryan ら⁹⁾は CALLA 陽性細胞を二色解析を行うにあたって蛍光強度の強弱によって 2 つの亜群に区分し、成熟段階によって強度の強い方は TdT 陽性で未熟な群、強度の弱い方は B1 陽性でより成熟している群であろうと推定している。PWM, SAC などのマイトゲンは成熟 B 細胞に反応するとされているが、今回著者の分画した正常 CALLA 陽性細胞がこれらのマイトゲンに全く反応しなかったことは、正常 CALLA 陽性細胞の成熟度を示す一つの指標となると思われる。Clark ら¹⁾は骨髄の B 細胞の大部分を CALLA 陽性細胞が占めるので骨髄 B 細胞は幼若であろうと言っている一方、彼らは細胞を分離せずに検索したため、リンパ球領域に顆粒球系細胞や、間質細胞、線維芽細胞などが入ってきたために、CALLA 陽性率が高値となったのかもしれないと述べている。しかし著者の二色解析ではリンパ球以外の細胞の混入の可能性はほぼ否定することができた。

著者の検索した例では正常の CALLA 陽性細胞は、どの例においても蛍光強度の弱い細胞が 90% 以上を

占めていた。多くの白血球細胞は蛍光強度が強く、この差は腫瘍細胞による抗原密度の変化なのか細胞のより未熟な段階にあるためなのか現在のところ分かっていない。しかしごく最近著者は蛍光強度の弱い common ALL を 1 例経験しているので後者の可能性の方が高いのではないかと考えられる。以上のことから推察される B 細胞の分化過程を図 7 A に示す^{28)~31)}。すなわち、TdT 陽性のリンパ芽球が B 細胞抗原である CD19 を発現し、分化に従って CD10 が強陽性に現れ、次に CD10 の減少と TdT の消失に変わって CD20、細胞質内 μ 鎖と順に出現し、最後に表面免疫グロブリンと CD21 が発現されるというものである。この分化模式図に基づいて考察すると、今回著者が分画、解析した正常骨髄の CALLA (CD10) 陽性細胞は TdT 陽性細胞から細胞質内 μ 鎖の出現している pre-B 細胞の段階までの幅を持った異質性 (heterogeneity) のある集団であることが推察される。それに対して common ALL の細胞については、Ryan ら³²⁾が TdT, B1 (CD20) の表現が正常な B 細胞の成熟過程とは異なり、TdT が陽性でありつづけ、B1 は細胞質内 μ 鎖の消失、発現とは一致しないという図 7B のような分化過程を提案している。

さて悪性腫瘍の化学療法中の患者では骨髄中の CALLA 陽性細胞は著明に減少していたが、治療終了後に急激に回復してくることが認められた。この過程

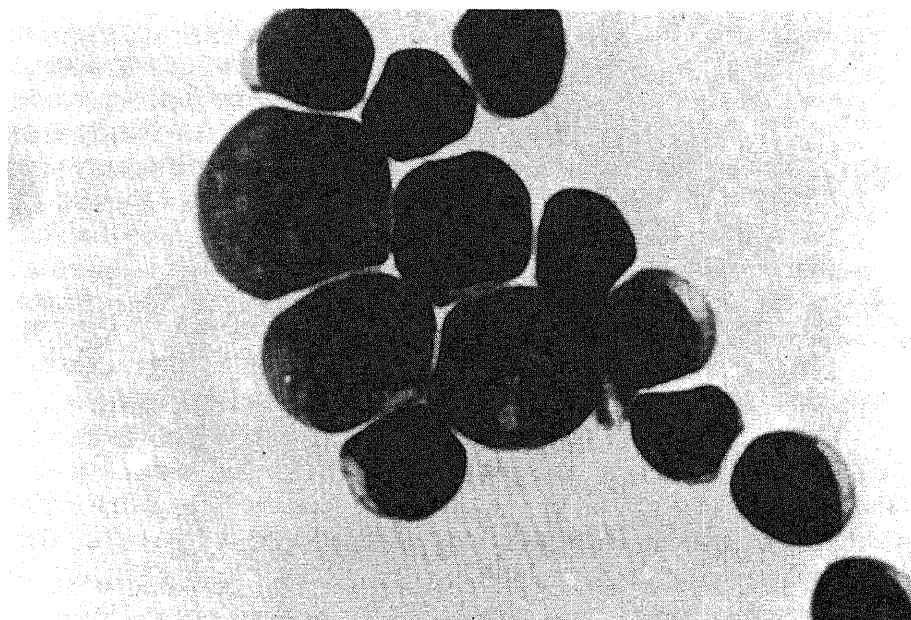


Fig. 6. The morphological appearance of sorted CALLA positive cells. Cytospined cells were stained by May-Grünwald-Giemsa (Original magnification $\times 1000$).

Table 3. Mitogen responsiveness of bone marrow CALLA positive cells

Exp.	Sample	Medium (CPM)	SAC (CPM)	PWM (CPM)
Exp. 1.	BM 1.			
	MNC	9878	7345	10551
	CALLA ⁺	830	951	N.D.
	CALLA ⁻	2519	10139	N.D.
	BM 2.			
	MNC	8941	9430	12338
Exp. 2.	PBL 1.	1768	5586	18262
	BM 1.			
	MNC	6352	7989	13965
	CALLA ⁺	482	388	400
	CALLA ⁻	3091	8716	11553
	BM 2.			
Exp. 3.	MNC	11746	7983	25823
	PBL 1.	650	1989	10524
	PBL 2.	4511	5721	32747
	BM 1.			
	MNC	19233	21916	6368
	PBL 1.	650	1989	10524
Exp. 4.	PBL 2.	4188	15523	26573
	BM 1.			
	MNC	24021	18145	12264
Exp. 4.	PBL 1.	2428	3014	13492
	PBL 2.	2529	2548	13492

Bone marrow cells (10^5) and control peripheral blood lymphocytes were plated in 96 micro-wells, and were incubated with SAC (10^{-4} vol/vol) or PWM (1:500) in 37°C 5% CO₂ for 5 days. At 24 hours before harvest, 1 μ Ci ³H-TdR was added, and the uptake of ³H-TdR was measured. The data are expressed as mean counts for triplicate cultures. Exp., experiment; SAC, Staphylococcus aureus Cowan I; PWM, pokeweed mitogen; CPM, count per minute; BM, bone marrow; MNC, mononuclear cells; CALLA⁺, sorted CALLA positive cells; CALLA⁻, sorted CALLA negative cells; N.D., not done; PBL, peripheral blood lymphocytes.

で骨髓と末梢血ではどのような変化が起こっているのかそれぞれの材料よりリンパ球を分離し、免疫学的に検索した。それによれば化学療法中は T 細胞系は末梢血、骨髓ともに比率の相対的増加とマイトゲンに対する反応性の軽度低下のみであったのに対し、B 細胞系は比率、反応性ともに著明な低下を示したが、治療終了後にはすみやかに正常域に回復していた。Hitzig ら³³⁾、Rapson ら³⁴⁾、Layward ら³⁵⁾、Suzuki³⁶⁾も同様の結果を報告している。骨髓移植後の免疫状態については Witherspoon ら³⁷⁾が移植後早期の患者 B 細胞は正常 T 細胞によっても免疫グロブリン産生を刺激されず、一方患者 T 細胞は正常 B 細胞の免疫グロブリン産生を刺激しないばかりか正常 T 細胞と正常 B 細胞の培養下においての免疫グロブリン産生を抑制することを報告している。このように、移植後の患者では免疫グロブリン産生が極度に抑制されていることから feed back system により B 細胞系が賦活化され B 前駆細胞が急激に増加することとなるも考えられる。化学療法においても同様に末梢血、骨髓における B 細胞が抑制を受け比率、反応性が低下するが、化学療法終了にともない一気に B 前駆細胞及び B 細胞が増加するのであろう。

最後にこの CALLA 陽性細胞を成熟した B 細胞に分化誘導する物質や増殖を調節する物質を明らかにすることが急務だが、現在のところ白血病細胞においては Nadler ら³⁸⁾は 12-O-tetradecaonylphorbol 13-acetate (TPA) とリンパ球培養上清 (lymphocyte conditioned medium, LCM) で B1 陰性、細胞質内 μ 鎖陰性の cALL から B1 と細胞質内 μ 鎖を誘導できたと報告している。Wörmann ら³⁹⁾は低分子 B 細胞増殖因子 (B cell growth factor, BCGF) が B 前駆細胞白血病細胞の増殖を誘導すると報告しているし、

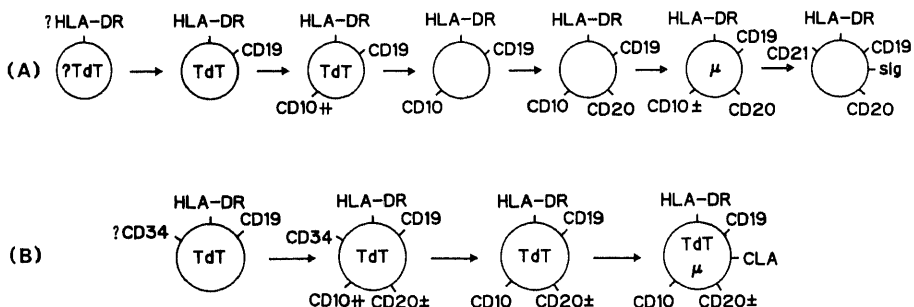


Fig. 7. Schematic representations of B cell differentiation. (A) normal B cell differentiation. (B) B cell lineage ALL. CD34, monoclonal antibody against immature leukocytes; CLA, common leukocyte antigen; slg, surface immunoglobulin.

Uckun ら⁴⁰⁾も B 前駆細胞白血病細胞は低分子 BCGF, 高分子 BCGF のレセプターをもっていてそれらの添加培養によって *in vitro* コロニー形成や ³H-TdR のとりこみの増加が見られ, 増殖を刺激することはつきとめたが, 表面マーカーの変化などの分化を誘導することは確認できなかったと報告している。また Landreth ら⁴¹⁾は周期性好中球減少症の尿には B リンパ球の産生を調節する因子を含んでいると報告している。一方また Hokeland ら²⁷⁾は胎児骨髄細胞に TPA と LCM を添加培養して CALLA 陽性細胞を成熟させることができたことと報告している。著者は正常骨髄の CALLA 陽性細胞にインターロイキン 2, インターロイキン 3, TPA, 周期性好中球減少症の尿などを添加培養し表面抗原の変化や ³H-TdR の取り込みを測定したが特に分化誘導, 増殖を刺激する因子を明らかにすることはできなかった。おそらくこれらの因子の至適濃度の検討や他の成長因子, 例えば低分子 BCGF などを含む多因子の同時添加などのさらなる工夫が必要であろうと思われる。

結 論

正常成人, 正常小児 (骨髄移植提供者), 種々の血液疾患患者の骨髄細胞における CALLA 陽性細胞の性状について単クローン抗体とフロー・サイトメトリーを用いて検索し, 以下の結論を得た。

1. 骨髄リンパ球様細胞中に占める CALLA 陽性細胞の比率は正常小児, 慢性良性好中球減少症, 特発性血小板減少性紫斑病, 骨髄転移のない固形腫瘍では 20%~50% の高値を示した。それに対して再生不良性貧血, 化学療法中の悪性腫瘍, 正常成人ではほとんどが 10% 以下と低値であった。

2. CALLA 陽性率は維持療法を最近中止した ALL の患者や骨髄移植を受けた ALL 及び再生不良性貧血の患者において急激な増加が観察された。

3. Common ALL の白血病細胞の蛍光強度は強かったのに対して, 正常の CALLA 陽性細胞は弱い蛍光を示した。

4. フロー・サイトメトリーを用いた二色解析によると CALLA (CD10) 陽性細胞は B4 (CD19), HLA-DR, OKT10 が同時に陽性で一部の細胞は Leu16 (CD20) も陽性であったが, B2 (CD21), OKM1, OKT9, OKT11 (CD2) は陰性であった。

5. 細胞質内 μ 鎖は EPICS-C で分画した CALLA 陽性細胞の 10% に染色され, TdT は 20% に陽性であった。

これらのことから, 骨髄細胞中の CALLA 陽性細胞は骨髄の増殖活動性に影響するところの年齢, 薬剤投

与スケジュール, 疾患の種類などの因子によって変動することが推定される。また正常骨髄中の CALLA 陽性細胞は B 前駆細胞から, pre-B 細胞までの比較的広い分化段階にある B 細胞系統に属していると思われた。

謝 辞

稿を終えるに臨み, 研究の御指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部小児科谷口昂教授に深甚なる謝意を表します。

また, 直接御指導頂きました小泉晶一先生, 関秀俊先生はじめ終始研究に御協力頂きました小児科血液グループ, 免疫グループの諸兄並びに教室員の皆様に深謝致します。

なお, 本論文の要旨は, 第 29 回日本小児血液学会総会 (1987) において発表した。また, 本研究の一部は文部省科学研究費補助金奨励研究 (A) 課題番号 6277060 に拠った。

文 献

- 1) Greaves, M. F., Brown, G., Rapson, N. T. & Lister, T. A.: Antisera to acute lymphoblastic leukemia cells. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **4**, 67-84 (1975).
- 2) Ritz, J., Pesando, J. M., Notis-McConarty, J., Lazarus, H. & Schlossman, S. F.: A monoclonal antibody to human acute lymphoblastic leukemia antigen. *Nature*, **283**, 583-585 (1980).
- 3) Greaves, M. F., Hariri, G., Newman, R. A., Sutherland, D. R., Ritter, M. A. & Ritz, J.: Selective expression of the common acute lymphoblastic leukemia (gp100) antigen on immature lymphoid cells and their malignant counterparts. *Blood*, **61**, 628-639 (1983).
- 4) Clark, P., Normansell, D. E., Innes, D. J. & Hess, C. E.: Lymphocyte subsets in normal bone marrow. *Blood*, **67**, 1600-1606 (1986).
- 5) Ryan, D., Kossover, S., Mitchell, S. Frantz, C., Hennessy, L. & Cohen, H.: Subpopulations of common acute lymphoblastic leukemia antigen-positive lymphoid cells in normal bone marrow identified by hematopoietic differentiation antigens. *Blood*, **68**, 417-425 (1986).
- 6) Ritz, J., Nadler, L. M., Bhan, A. K., Notis-McConarty, J., Pesando, J. M. & Schlossman, S. F.: Expression of common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) by lymphomas of B-cell and T-cell lineage. *Blood*, **58**, 648-652 (1981).
- 7) Hokeland, P., Nadler, L. M., Griffin, J. D., Schlossman, S. F. & Ritz, J.: Purification of

common acute lymphoblastic leukemia antigen positive cells from normal human bone marrow. *Blood*, **64**, 662-666 (1984).

8) Metzger, R. S., Borowitz, M. J., Jones, N. H. & Dowell, B. L.: Distribution of common acute lymphoblastic leukemia antigen in nonhematopoietic tissues. *J. Exp. Med.*, **154**, 1249-1254 (1981).

9) Pesando, J. M., Tomaselli, K. J., Lazarus, H. & Schlossman, S. F.: Distribution and modulation of a human leukemia-associated antigen (CALLA). *J. Immunol.*, **131**, 2038-2045 (1983).

10) Cossman, J., Neckers, L. M., Leonard, W. J. & Greene, W. C.: Polymorphonuclear neutrophils express the common acute lymphoblastic leukemia antigen. *J. Exp. Med.*, **157**, 1064-1069 (1983).

11) Broun, M. P., Martin, P. J., Ledbetter, J. A. & Hansen, J. A.: Granulocytes and cultured human fibroblasts express common acute lymphoblastic leukemia-associated antigens. *Blood*, **61**, 718-725 (1983).

12) Thomas, E. D., Storb, R., Clift, R. A., Fefer, A., Johnson, F. L., Neiman, P. E., Lerner, K. G., Glucksberg, H. & Buckner, C. D.: Bone-marrow transplantation (First of two parts). *N. Eng. J. Med.*, **292**, 832-843 (1975).

13) Thomas, E. D., Storb, R., Clift, R. A., Fefer, A., Johnson, F. L., Neiman, P. E., Lerner, K. G., Glucksberg, H. & Buckner, C. D.: Bone-marrow transplantation (Second of two parts). *N. Eng. J. Med.*, **292**, 895-902 (1975).

14) Glucksberg, H., Storb, R., Fefer, A., Buckner, C. D., Neiman, P. E., Clift, R. A., Lerner, K. G. & Thomas, E. D.: Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched siblings donors. *Transplantation*, **18**, 295-304 (1974).

15) Sutherland, R., Delia, D., Schneider, C., Newman, R., Kemshead, J. & Greaves, M.: Ubiquitous cell-surface glycoprotein on tumor cells is proliferation-associated receptor for transferrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 4515-4519 (1981).

16) Janossy, G., Thomas, J. A., Goldstein, G. & Bollum, F. J.: 'Ciba Foundation Symposium 84' (J. H. Humphrey, ed.), p193-213, Pitman Medical, London. (1981).

17) Ip, S. H., Rittershaus, C. W., Struzziero, C.

C., Hoxie, J. A., Hoffman, R. A., Healey, K. W. & Lifter, J.: Evaluation of E-rosetting human lymphocytes with OKT11 and other monoclonal antibodies. *Blood*, **60**, 795-799 (1982).

18) Mittler, R. S., Talle, M. A., Carpenter, K., Rao, P. E. & Goldstein, G.: Generation and characterization of monoclonal antibodies reactive with human B lymphocytes. *J. Immunol.*, **131**, 1754-1761 (1983).

19) Stashenko, P., Nadler, L. M., Hardy, R. & Schlossman, S. F.: Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J. Immunol.*, **125**, 1678-1685 (1980).

20) Nadler, L. M., Stashenko, P., Hardy, R., van Agthoven, A., Terhorst, C. & Schlossman, S. F.: Characterization of a human B cell-specific antigen (B2) distinct from B1. *J. Immunol.*, **126**, 1941-1947 (1981).

21) Nadler, L. M., Anderson, K. C., Marti, G., Bates, M. P., Park, E., Daley, J. F. & Schlossman, S. F.: B4, a human B lymphocyte-associated antigen expressed on normal, mitogen activated, and malignant B lymphocytes. *J. Immunol.*, **131**, 244-250 (1983).

22) Breard, J., Reinherz, E. L., Kung, P. C., Goldstein, G. & Schlossman, S. F.: A monoclonal antibody reactive with human peripheral blood monocytes. *J. Immunol.*, **124**, 1943-1948 (1980).

23) Banks, P. M., Caron, L. & Morgan, T. W.: Application of monoclonal hybridoma antibodies to imprint preparations of lymphoid tissue for the identification of immunologic cell types. *Am. J. Clin. Path.*, **78**, 266 (abstr.) (1982).

24) Seki, H., Ueno, Y., Taga, K., Matsuda, A., Miyawaki, T. & Taniguchi, N.: Mode of in vivo augmentation of natural killer cell activity by recombinant human interleukin-2: A comparative study of Leu-11⁺ and Leu-11⁻ cell population in cord blood and adult peripheral blood. *J. Immunol.*, **135**, 2351-2356 (1985).

25) Hsu, S. M., Reine, L. & Fanger, H.: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase technique: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. & Cytochem.*, **29**, 577-580 (1981).

26) Kearney, J. F. & Lawton, A. R.: B lympho-

- cyte differentiation induced by lypopolysaccharide. I. Generation of cells synthesizing four major immunoglobulin classes. *J. Immunol.*, **115**, 671-676 (1975).
- 27) Greaves, M. & Janossy, G.: Patterns of gene expression and the cellular origins of human leukemias. *Biochem. Biophys. Acta*, **516**, 193-230 (1978).
- 28) Hokeland, P., Ritz, J., Schlossman, S. F. & Nadler, L. M.: Orderly expression of B cell antigens during the in vitro differentiation of nonmalignant human pre-B cells. *J. Immunol.*, **135**, 1746-1751 (1985).
- 29) Anderson, K. C., Bates, M. P., Slaughenhaupt, B. L., Pinkus, G. S., Schlossman, S. F. & Nadler, L. M.: Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: A model of human B cell differentiation. *Blood*, **63**, 1424-1433 (1984).
- 30) Kincade, P. W. & Phillips, R. A.: B lymphocyte development. *Fed. Proc.*, **44**, 2874-2881 (1985).
- 31) Janossy, G., Bollum, F. J., Bradstock, K. F., McMichael, A., Rapson, N. & Greaves, M. F.: Terminal transferase-positive human bone marrow cells exhibit the antigenic phenotype of common acute lymphoblastic leukemia. *J. Immunol.*, **123**, 1525-1529 (1979).
- 32) Ryan, D. H., Chapple, C. W., Kossover, S. A., Sandberg, A. A. & Cohen, H. J.: Phenotypic similarities and differences between CALLA-positive acute lymphoblastic leukemia cells and normal marrow CALLA-positive B cell precursors. *Blood*, **70**, 814-821 (1987).
- 33) Hitzig, W. H., Plüss, H. J., Joller, P., Pilgrim, U., Tacier-Eugster, H. & Jacob, M.: Studies on the immune status of children with acute lymphocytic leukemia: II. In remission with and without cytostatic treatment. *Clin. Exp. Immunol.*, **26**, 414-418 (1976).
- 34) Rapson, N. T., Cornbleet, M. A., Chessells, J. M., Bennett, A. J. & Hardisty, R. M.: Immunosuppression and serious infections in children with acute lymphoblastic leukemia: A comparison of three chemotherapy regimens. *Brit. J. Haematol.*, **45**, 41-52 (1980).
- 35) Layward, L., Levinski, R. J. & Butler, M.: Long-term abnormalities in T and B lymphocyte function in children following treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Brit. J. Haematol.*, **49**, 251-258 (1981).
- 36) Suzuki, M.: Lymphocyte functions of child patients with ALL (acute lymphoblastic leukemia) in remission. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **14**, 31-40 (1984).
- 37) Witherspoon, R. P., Lum, G., Storb, R. & Thomas, D.: In vitro regulation of immunoglobulin synthesis after human marrow transplantation. II. Deficient T and non-T lymphocyte function within 3-4 months of allogeneic, syngeneic, or autologous marrow grafting for hematologic malignancy. *Blood*, **59**, 844-850 (1982).
- 38) Nadler, L. M., Ritz, J., Bates, M. P. & Park, E. D.: Induction of human B cell antigens in non-T cell acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Invest.*, **70**, 433-442 (1982).
- 39) Wörmann, B., Mehta, S. R., Maizel, A. L. & LeBien, T. W.: Low molecular weight B cell growth factor induces proliferation of human B cell precursor acute lymphoblastic leukemias. *Blood*, **70**, 132-138 (1987).
- 40) Uckun, F. M., Fauci, A. S., Heerema, N. A., Song, C. W., Mehta, S. R., Gajl-Peczalska, K., Chandan, M. & Ambrus, J. L.: B-cell growth factor receptor expression and B-cell growth factor response of leukemic B cell precursors and B lineage lymphoid progenitor cells. *Blood*, **70**, 1020-1034 (1987).
- 41) Landreth, K. S., Engelhard, D., Beare, M. H., Kincade, P. W., Kapoor, N. & Good, R. A.: Regulation of human B lymphopoiesis: Effect of a urinary activity associated with cyclic neutropenia. *J. Immunol.*, **134**, 2305-2309 (1985).

Characterization of Lymphoid Cells Expressing Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen (CALLA) in Bone Marrow from Non-Leukemic Patients Masahiko Yamagami, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 97, 303—316 (1988)

Key words : CALLA, B progenitor cell, bone marrow, BMT, flow-cytometry, two-color analysis

Abstract

Non-leukemic cells expressing common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA⁺) in bone marrow (BM) were characterized by flow-cytometric analysis in this study. BM samples were obtained from adult volunteers, normal children and patients with various hematological diseases. The percentage of CALLA⁺ cells in BM lymphoid cells was high in normal children ($35.6 \pm 12.6\%$, mean \pm S.D.), and in patients with chronic benign neutropenia (35.2 ± 14.9), idiopathic thrombocytopenic purpura (27.3 ± 13.5) and solid tumor without BM metastasis (32.9 ± 6.9). In contrast, the relative proportion of CALLA⁺ cells in BM was low in aplastic anemia (2.7 ± 4.8), malignancy during chemotherapy (6.2 ± 7.3) and normal adults (6.3 ± 5.0). The percentage of CALLA⁺ cells was also significantly increased in patients with ALL who recently stopped maintenance chemotherapy and were undergoing hemopoietic regeneration. A similar finding was also obtained from children who had been transplanted with BM. These results suggest that the relative proportion of BM CALLA⁺ cells seems to be closely correlated with age, therapy schedule and various hematological disorders which influence the proliferating activity of BM. The CALLA intensity of normal BM cells was expressed as 29.4 mean channel number, while that of common ALL leukemic cells was 101.7. Two-color analysis with flow-cytometry demonstrated that CALLA⁺ cells co-expressed B4, OKB2, HLA-DR, OKT10 and partially Leu16 antigens, but they were negative for B2, OKM1, OKT9 and OKT11 antigens. Additionally, cytoplasmic μ -chain was expressed in about 10% of sorted CALLA⁺ cells, and approximately 20% of these cells was positively stained for terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT). These results indicate that non-leukemic CALLA⁺ cells in BM belong to the B cell lineage cells with relatively wide differentiation stages from B cell progenitors to pre-B cells.