

ヒトB細胞型悪性リンパ腫に高度に関連する抗原

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: 平井, 洋 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9063

ヒト B細胞型悪性リンパ腫に高度に関連する抗原

金沢大学がん研究所病態生理部 (主任: 倉田自章教授)

平 井 洋

(昭和58年2月25日受付)

本論文の要旨は、第41回日本癌学会 (大阪, 1982) において発表した。

びまん性組織球性リンパ腫, 分化型リンパ球性リンパ腫, 慢性リンパ球性白血病を含むヒト B細胞型リンパ腫-白血病の不溶性抽出物をデオキシコール酸塩で可溶化し, 可溶化物を部分精製後モルモットに抗血清を作るために使用された。適当に吸収された抗血清から作成された F(ab')₂標品のあるものは, B細胞型のリンパ腫-白血病細胞株に共通する 1 抗原, 仮りに common B-lymphoma antigen; cBLA と呼ぶ, を生細胞膜免疫蛍光で証明できることがわかった。プレ B 型及び非 B 型リンパ腫-白血病細胞株, 正常リンパ球細胞株, 正常末梢リンパ球, 骨髄腫細胞株は陰性であった。cBLA は酵素免疫測定を利用して測定するとポリアクリルアミド電気泳動でプレアルブミンの泳動度を持ち, ゲル透過度約 31,000 の分子量をもつことがわかった。

Key words Antigen, B cell leukemia, B cell lymphoma, diffuse histiocytic lymphoma, Immunology.

腫瘍細胞における腫瘍特異 (あるいは高度関連) 抗原の存否は腫瘍の免疫学的診断・治療の上の重大な鍵である。そのような抗原の各種ヒト腫瘍における存在については以前は polyclonal な抗体, 最近では monoclonal な抗体を使用したデータが増加しつつあるけれどもまだ不明な領域が多い。悪性リンパ腫-白血病細胞については, 表面形質として多数のマーカーが知られてきているがそのほとんどが正常リンパ球抗原, とくに分化抗原である。その中で腫瘍特異性のありそうなものとしては common ALL antibody (CALLA)¹⁾ あるいは monoclonal な J-5²⁾ が認識する null 細胞型急性リンパ芽球性白血病 (null-cell acute lymphoblastic leukemia; 以下 null-ALL と略) の gp 100 分子関連抗原, NL 22 の null-ALL 細胞抗原, CALL³⁾ の T 細胞型急性リンパ芽球性白血病 (T-cell acute lymphoblastic leukemia) 細胞抗原, Ab 89⁴⁾ の B 細胞型リンパ腫 (B-cell lymphoma; 以下 B-L と略) 細胞抗原, 38・13⁵⁾ の一部のパーキット・リンパ腫 (Burkitt lymphoma; 以下 BL と略) 細胞抗原などをあげ得るけれども, それらの抗原系とくに B 細胞型腫瘍抗原の解明は遅れている。

著者は細網肉腫 (diffuse histiocytic lymphoma, 以下 DHL と略) を中心とする B 細胞型悪性リンパ腫-白血病の剖検材料から部分精製した抗原分画を用い, 異種抗血清を作製して適当な吸収を行い, 特異性を生細胞膜免疫蛍光法 (Living cell membrane immunofluorescence, 以下 LMIF と略) 及び Enzyme-linked immunosorbent assay (以下 ELISA と略) で検索した。その結果, B 細胞型悪性リンパ腫-白血病全体に関連して正常細胞には分布が認められない 1 抗原の存在を認め, 同抗原の分析を行った。この抗原を同定した抗体は polyclonal であるけれども臨床応用上の価値があり, 抗原のデータは monoclonal 抗体作製に基礎的な情報を与えるものと思われる。

材料及び方法

1. 材 料

DHL 3 例と diffuse well differentiated lymphoma (以下 WDL と略) 3 例の腸間膜腫瘍塊, 慢性リンパ性白血病 (chronic lymphocytic leukemia; 以下 CLL と略) 2 例の脾を用いた。いずれも B 細胞型のものを死後 3~8 時間の剖検時に入手した。胸腺は本学第一

An Antigen (s) Highly Associated with Human Malignant Lymphoma of B Cell Lineage. **Hiroshi Hirai**, Department of Pathophysiology, (Director: Prof. Y. Kurata), Cancer Research Institute, Kanazawa University.

外科学教室より、扁桃腺は耳鼻咽喉科学教室より手術材料の御恵与を受けた。他の正常臓器はいずれも非癌患者の剖検(死後10時間以内)に際して入手した。腫瘍材料は一部をホルマリン固定・パラフィン切片・ヘマトキシリン-エオジン標本として病理組織学的診断を確かめ、残りの組織は直ちに -20°C に保存した。

LMIFの標的細胞として、確立された培養細胞株(Table 1参照)を使用した。それらの株は蕨和田潤博士(Roswell Park Memorial Institute, New York), 橋武彦教授(東北大, 抗癌菌研), 三好勇夫教授(高知医大), 滝口智夫博士(金沢医大), 阿部悦子博士(昭和大・歯学部)より御恵与を受けた。一部の株は(Flow Laboratory Inc., USA)より購入した。対照の正常リンパ球は健康人末梢血からメトリゾ酸ナトリウム溶液(Nyegaard & Co. A. S., Oslo, Norway)を使用して分離した。

2. 抗原分画の作製

1カ月~3年の凍結保存材料を融解し、倉田・岡田ら⁷⁻⁹⁾の方法で不溶性リポ蛋白分画("Pfr")を抽出・可溶性・ゲル濾過し、主混在成分であるアルブミンを除去するための操作を行って抗原分画を作製した。即ち、"Solution I"¹⁰⁾によるホモジネートを作り、順にガーゼ1, 2, 4, 8枚で濾過後、濾液を遠心して得た沈渣をSolution Iで再びホモジナイズして遠心する。沈渣を"Solution II"¹⁰⁾でホモジナイズし、遠心する操作を8回繰返す。最終沈渣("Pfr")を0.2%デオキシコール酸ナトリウムでホモジナイズしたのち24時間冷室で攪拌後遠心して上清を得る。沈渣を同様操作で2回抽出する。3回の抽出上清を合せて、約10倍量の冷アセトンに加え、 -20°C に1夜置き沈澱を得る。沈澱を集め、少量の0.01 M phosphate-buffered saline, pH 7.4, (以下PBSと略)にとかしてSephacryl S-4B (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden)のカラムに負荷し、PBSで溶出し、O.D.280 nmによる溶出パターン上のpass分画(欠如することもある)を捨て、低分子蛋白分画(low-molecular-weight protein fraction, 以下Pfrと略)を集め、以下(1), (2)のいずれかのaffinity chromatographyで混在するアルブミンまたは血清蛋白の除去を行った。(1) Blue Sepharose CL-6B (Pharmacia) 2 gを膨潤させ、 1.5×10 cmのカラムにつめ、20 mg 蛋白(Lowry法¹¹⁾)のPfrを負荷し、0.1 M 塩化カリウム-0.01 M トリス・塩酸緩衝液 pH 7.0で溶出するO.D.280 nmのピークをプールする。回収率は約70%。(2)抗ヒト血清家兎抗血清の硫酸アンモニウム33%飽和によるグロブリン分画100 mgをPBSで透析後、AH-Sepharose 4B (Pharmacia) 3 g(膨潤後9.6 ml)に結合させ¹²⁾、 1.5×10 cmのカラ

ムにつめて10 mg 蛋白のPfrを負荷し、PBSで溶出する。回収率50~60%。なお、抗ヒト血清家兎抗血清は成熟家兎背部皮下にヒト血清0.2 mlをFreund's complete adjuvant (以下FCAと略)で乳化して分割注射し、以後2週間隔で3回同様な注射を繰返し、最終注射後1週目に全採血して作製した。

抗原の収量は材料により変動するが、1例のWDLにおいて100 g(湿量)の腫瘍材料から脱アルブミンしたPfr 30~40 mgが得られた。

3. 抗血清の作製・吸収・処理

DHL 3例, WDL 2例, CLL 2例の抗原分画を別々に体重約400 gのモルモット1~2匹に注射した。DHLは脱アルブミンPfr 1 mgをFCAで乳化し肩甲骨下腔及び背部筋肉内に分割注射した。1週間隔で4回, 2週おいて1回同様な注射を行い、1週後に全採血した。WDL, CLLは脱アルブミンPfrを1回2 mg, FCAとともに2週間隔で4回注射し、1週後に採血した。

LMIFのために以下のような抗血清の吸収と抗体の処理を行った。抗血清1 mlあたり正常肝・脾・肺の25% (W/V) 3 M-KClまたはPBSホモジネート各0.4 ml, 胃癌・大腸癌のホモジネート各0.2 ml, 胸腺のホモジネート0.2 ml, 扁桃腺のホモジネート0.5 mlを加え、 37°C に1時間静置後冷室で18時間低速回転し、 4°C で $10,000 \times g$ 30分間遠心した。上清に再び同量の各ホモジネートを加え吸収操作を繰返し、得られた吸収抗血清に等量の0.2 M 酢酸ナトリウム溶液(塩酸でpH 4.5に補正)と pepsin (Worthington Co. Ltd., USA) 1 mgを加え、 37°C 20時間おいた。 4°C で $10,000 \times g$ 20分間遠心した上清にトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(結晶; 以下トリスと略)を加えてとかし、pHを約8.5に補正し、室温30分おいてからPBSに対し低温で透析した。Sephadex G-150 superfine (Pharmacia)のカラムでゲル濾過を行い、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ とFc fragmentを分離し¹³⁾、前者(始めのピーク)をプールしてMinicon B-15 (Amicon Corporation Scientific System Division, USA)あるいはCentriflow (Amicon)で1 ml(原抗血清量)に濃縮し、0.05%窒化ナトリウム存在下に 4°C に保存した。

ELISA用にはLMIFで最も強くB-L細胞の膜染色をおこした1抗DHL抗血清 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 分画に更に40倍容量の扁桃腺・胸腺・肺の各ホモジネート, 20倍容量の肝ホモジネートを加え、 37°C 1時間静置 4°C 18時間回転の吸収を行った。その遠心上清に等量の0.2 M 酢酸ナトリウム(pH 4.5)を加えて室温30分おき、 $10,000 \times g$ 20分遠心、上清をとってトリスでpH 8.5とし、PBSで透析後PBS-Tween液(0.05% Tween 20を含むPBS)で一定濃度に稀釈した。

4. 免疫学的検査法

1) LMIF 法

培養細胞株(付着型は trypsin 処理で遊離細胞としたもの)を PBS で洗滌し、約 $50 \times g$ 3 分低温遠心して pack した約 5×10^6 個の細胞を含む $50 \mu\text{l}$ の PBS を遠心管に残し、予め氷冷した抗血清 $F(ab')_2$ 液 $50 \mu\text{l}$ を加え、 0°C 60 分反応させた。冷 PBS で 2 回洗滌し、FITC 標識抗モルモット IgG 家兎抗血清 (MBL 社) の 20 倍 PBS 稀釈液 $50 \mu\text{l}$ を加え、 0°C 30 分反応させた。冷 PBS で 2 回洗滌し、グリセリン-PBS で封入した。干渉フィルター 2 枚を備えたオリンパス蛍光顕微鏡 BH-RFL で観察・撮影した。60%以上の生細胞がリング状膜染色 (patching を含む) を示した場合を陽性、陽性細胞が 3%以下の場合を陰性と判定した。

2) ELISA 法 ELISA は peroxidase conjugated antiglobulins を使用した間接法によったが、Voller¹⁴⁾の操作を以下のように改変して実施した。96-well vinyl assay plates (Costar, USA) に 0.05 M 炭酸緩衝液 pH 9.6 で稀釈した抗原資料 $100 \mu\text{l}$ をまく。37°C 2 時間おき PBS-Tween 液で 3 回洗滌し、blocking 液 (1%ウシ血清アルブミンを含む PBS) を well あたり $175 \mu\text{l}$ 加え、37°C 2 時間後に PBS-Tween 液で 3 回洗滌する。適当に稀釈したモルモット抗血清 $F(ab')_2$ $100 \mu\text{l}$ を加えて 37°C 2 時間反応させ、PBS-Tween 液で 3 回洗滌する。peroxidase 標識抗モルモット IgG 家兎抗血清の IgG フラクシオン (金沢大、がん研、分子免疫部徳山春彦博士より恵与を受けた。646 μg の IgG にモル比 1:1.3 に peroxidase を山田・中根法¹⁵⁾で標識したもの。peroxidase は Grade I-C, Toyobo) を 0.5% ウシ血清アルブミンを含む PBS-Tween 液で 1,000 倍に稀釈した液 $100 \mu\text{l}$ を各 well にまき、37°C 2 時間静置後 PBS-Tween 液で 6 回洗滌する。

McIlvaine のリン酸-クエン酸 (アミノ酸自動分析用) 緩衝液 pH 4.8 で 1 回洗い、同緩衝液 10 ml・o-フェニレンジアミン 10 mg・30%過酸化水素水 $5 \mu\text{l}$ の混液 (用時新製) $150 \mu\text{l}$ を well に加え、室温 10 分放置する。各 well から $100 \mu\text{l}$ をとり 1 N 塩酸 1.2 ml を加え反応を止め、分光光度計 (日立 139 型) により O.D. 492 nm の吸光度を測定する。測定はすべて duplicate で行った。

5. 化学的検査法

1) ポリアクリルアミドゲル電気泳動

分析用ディスク電気泳動を 7.5%と 10%のポリアクリルアミドゲルカラムを使用して行った。分離ゲル pH 8.9, 重層ゲル pH 6.7, 溶媒をトリス・グリシン緩衝液 pH 8.3 として 4 mA/tube で泳動し、Coomassie brilliant blue R-250 で染色した。

スラブ電気泳動はスラブ・ディスク泳動装置 (Atto 社, SJ-1060 SDH) により 12.5%ポリアクリルアミドプレート ($128 \times 150 \times 2 \text{ mm}$) で行った。WDL, 脾、扁桃腺、胸腺の Pfr 10 mg に微量の bromphenol blue (以下 BPB と略) 液を加えて負荷し、トリス・グリシン緩衝液 pH 8.3 を溶媒として 40 mA 約 5 時間 (BPB の泳動距離 8 cm) 泳動した。BPB の泳動先端よりアルブミン帯 (着色) の下縁までのプレアルブミン域を 12 等分に、ついでアルブミン帯、アルブミン帯上縁より分離ゲルスラブ上端までの後アルブミン域を 6 等分にリボン状にゲルを切出し、各片をそれぞれ少量の PBS とともに透析用セロファンチューブに入れ、PBS に対し低温で 48 時間透析した。チューブ内容を 0.05 M 炭酸緩衝液 pH 9.6 で $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ に調整し、ELISA によりそれぞれの抗原活性を測定した。

2) 分子量測定 (ゲル透過法)

スラブゲルより抽出した抗原資料 (約 200 μg) を Sephacryl S-200 superfine (Pharmacia) のカラム ($90 \times 1.5 \text{ cm}$) に負荷し、0.1 M 塩化カリウム-0.05 M トリス・塩酸緩衝液 pH 7.5 を溶出液として、流速 13 ml/時間で下降法によるゲル透過を行った。1.8 ml づつ溶出液を分取し、各管の ELISA を行った。分子量マーカーとして Gel filtration calibration kits (Pharmacia) を使用した。

成 績

B-L 由来の培養細胞を標的細胞として各吸収抗血清の $F(ab')_2$ 標品で間接 LMIF 試験を行ってみると、抗 DHL 抗血清 3/3, 抗 WDL 抗血清 1/3, 抗 CLL 抗血清 1/2 がリング状の細胞膜染色を示したので、以後の実験には陽性を示す抗血清標品のみを使用した。各種培養細胞株についての成績は Table 1 に示す如くである。B 細胞型急性リンパ芽球性白血病 (B-cell acute lymphoblastic leukemia) 由来の BALL-1 (Fig.1 A) や BL 由来の Raji, Daudi (Fig.1 B), P 3 HR₁, Ramos 株, リンパ肉腫 (以下 LS と略) 由来の U-698-M (Fig.1 C) T. S., S. O. のような B 細胞型の悪性リンパ腫-白血病細胞株がすべて抗 DHL 抗血清 $F(ab')_2$ で陽性染色を示し、T 細胞型や non-T, non-B 型の悪性リンパ腫白血病細胞株、骨髄性や単球性の白血病に由来する細胞株 (Fig.1 D, 1 E), 正常リンパ球培養株は陰性である。なお、末梢血リンパ球も陽性を示すものはない (Fig.1 F)。抗 WDL 抗血清や抗 CLL 抗血清の $F(ab')_2$ は検査できた範囲内で抗 DHL 抗血清と同様の抗原分布を示した。なお、陽性とは少なくとも 60%以上の生細胞が陽性反応を示したもので、陰性とは陽性生細胞が 0~3%であったものである。その中間の陽性生

Table 1. Summary of living cell membrane immunofluorescence experiments

Target Cells		Antiserum*		
Cell line	Origin	Anti-DHL	Anti-WDL	Anti-CLL
T-cell leukemia line :				
MOLT 1-4F	T-ALL	-	nd	nd
CCRF-CEM	T-ALL	-	-	-
TALL-1	T-ALL	-	-	-
Matsubara	T-ALL	-	-	-
B-cell leukemia line :				
BALL-1	B-ALL	+	+	+
Raji	BL	+	+	+
Daudi	BL	+	nd	+
P ₃ HR ₁	BL	+	nd	+
Ramos	aBL	+	+	+
U-698M	LS	+	+	+
T.S.	LS	+	nd	nd
S.O.	LS	+	nd	nd
B-cell normal line :				
5 normal lines		-	-	-
Non-T, non-B cell line :				
NALL-1	N-ALL	-	-	-
Sasajima	N-ALL	-	nd	nd
Kumagaya	N-ALL	-	nd	nd
SU-DHL-1	DHL	-	-	-
U-937	DHL	-	-	-
Myeloma cell line :				
RPMI 8226	MM	-	-	-
Myelocytic leukemia cell line :				
HL-60	APL	-	nd	nd
Monocytic leukemia cell line :				
THP-1	MNL	-	-	-
Other cell line :				
IMR-32	NB	-	nd	nd

* F(ab')₂ of absorbed anti-lymphoma fraction antiserum.

Abbreviations: T-, B- or N-ALL, T-cell, B-cell or non-T, non-B cell type acute lymphoblastic leukemia; BL, African Burkitt's lymphoma; aBL American Burkitt's lymphoma; LS, lymphosarcoma, DHL; diffuse histiocytic lymphoma; MM, multiple myeloma; APL, acute promyelocytic leukemia; MNL, monocytic leukemia; NB, neuroblastoma; nd, not done.

を示した株は存在しなかった。

DHL の Pfr をスラブ電気泳動にかけ、ゲルプレートで前アルブミン域と後アルブミン域とにわけて PBS で抽出したものを反応陽性の抗血清 F(ab')₂ にそれぞれ 1 mg/ml に加え、37°C 1 時間おいて遠心した上清で LMIF を行ってみると、B-L 細胞の陽性染色は前アルブミン域抽出液による吸収では陰性化した。後アルブミン域抽出液による吸収ではほとんど変化しなかった。

7.5% あるいは 10% のポリアクリルアミドゲル・カラムによる分析用ディスク電気泳動を行うと、3 例の

DHL の脱アルブミン Pfr はいずれもプレアルブミン域に broad な 1 本のバンド (7.5% の場合 Rf=0.9±0.02, 10% の場合 0.75±0.02) を示し、他の部分には痕跡的なバンドしか認められなかった (Fig 2)。そこで、以後プレアルブミン領域に注目して分析を行った。12.5% のポリアクリルアミドゲルを使用してスラブ電気泳動を行ってみると DHL の Pfr は後アルブミン域には痕跡的なわずかのバンドを示すのみであったが、プレアルブミン域に 5~6 本のバンドを生じ、WDL, CLL, 扁桃腺、胸腺、脾の各 Pfr は後アルブミン域に多数のバンド、プレアルブミン域には濃度に差はあるが DHL と

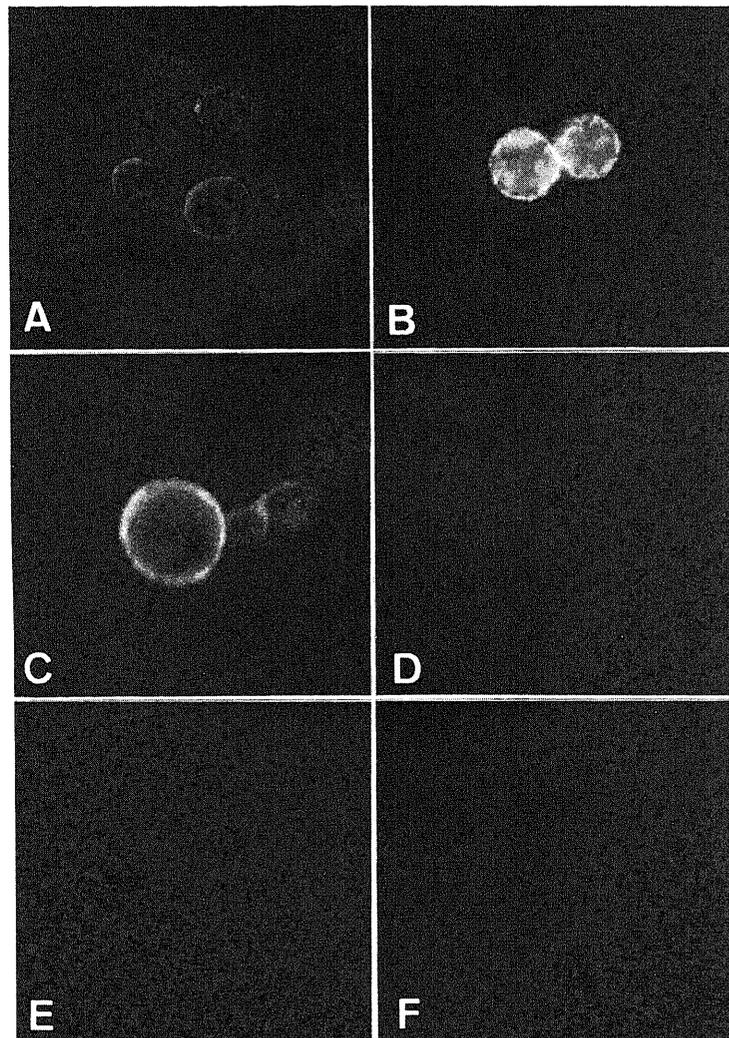


Fig. 1. Living cell membrane immunofluorescence. Lymphoma-leukemia cell lines and peripheral lymphocytes were incubated with $F(ab')_2$ preparation of anti-diffuse histiocytic lymphoma (DHL) antiserum for 1 hr at 0°C , followed by fluorescein-conjugated rabbit anti-guinea pig IgG for 30 min at 0°C . $\times 600$. A: BALL-1, uniform or patchy rings. B: Daudi, patchy rings. C: U-698 M, uniform or patchy rings. D: TALL-1, negative. E: NALL-1, negative. F: peripheral lymphocytes, negative.

同様な位置に5~6本のバンドを示した。ついで、泳動したゲルプレートから切出した細片の抽出液についてELISAを行い、Fig. 3のようなパターンを得た。WDLでは泳動先端から7~9番目(No.7~9)の抽出液に活性の主ピークがあり、10番目(No.10)及びアルブミン帯(Alb)にもそれぞれ小ピークがある。そこで、それぞれのNo.7~9の抽出溶液の蛋白濃度を一定に補正したのち各濃度における抗原活性を測定した。Fig.4のよ

うにWDLでは $1\mu\text{g/ml}$ 附近から蛋白量の増加につれて活性の上昇が認められたが、扁桃腺、胸腺、脾には $30\mu\text{g/ml}$ でも活性が見られなかった。

WDLのプレアルブミン域(No.7~9)抽出液及びマーカー蛋白をSephacryl S-200カラムでゲル濾過し、溶出液の抗原活性をELISAで測定してFig.5のようなパターンを得た。マーカー蛋白の溶出位置から計算すると抗原分子量として約31,000の値が得られた。

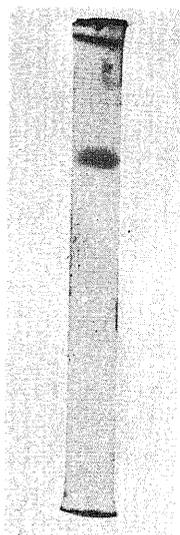


Fig. 2. Analytical polyacrylamide gel (10%) electrophoresis of the partially purified extract from a DHL.

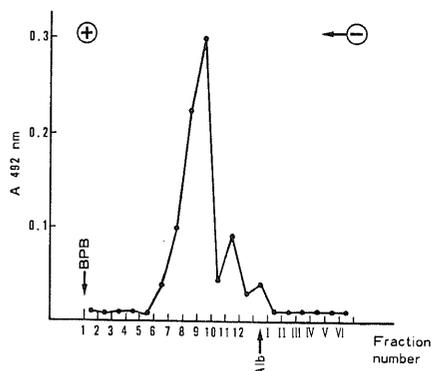


Fig. 3. Polyacrylamide (12.5%) gel electrophoresis of the partially purified extract of a well differentiated lymphocytic lymphoma (WDL). The antigenic activity of 0.25 μ g protein of the extract was assayed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with the $F(ab')_2$ preparation of an absorbed anti-DHL antiserum (1:400). BPB, bromphenol blue. Alb, albumin.

考 察

以上の実験成績から、B細胞型悪性リンパ腫—白血球細胞に広く分布する少くとも1つの prealbumin 泳動度をもつ細胞膜抗原があり、末梢成熟リンパ球やB細胞型腫瘍以外の細胞にそれは存在しないように見える。この抗原はB細胞型腫瘍の中でも分化度が pre-B (B0) 段階の NALL-1 ほか数株は (-), immature B (B1) 段階の BL 株や BALL-1, mature B (B2)

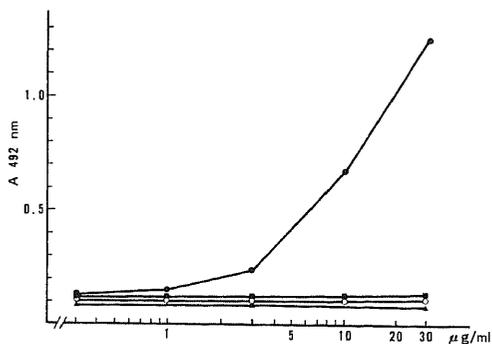


Fig. 4. Sample dilution curves obtained by ELISA with the $F(ab')_2$ preparation of an absorbed anti-DHL antiserum (1:800): (●) WDL, (■) spleen, (○) tonsil, (▲) thymus.

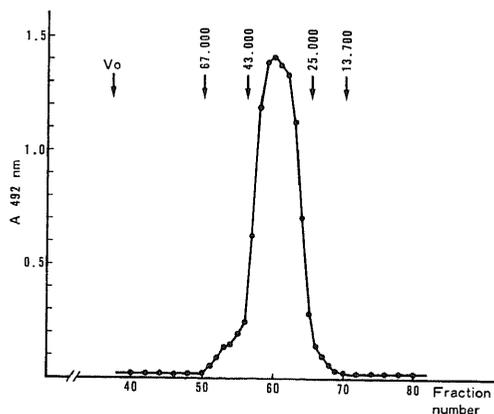


Fig. 5. Gel exclusion chromatography (Sephacryl S-200; 90 \times 1.5 cm) of a WDL sample (200 μ g). Flow rate: 13.0 ml/hr; fraction volume: 1.8 ml. Molecular weight markers used to calibrate the column: blue dextran; bovine serum albumin, 67,000; ovalbumin, 43,000; α -chymotrypsinogen A, 25,000; ribonuclease A, 13,700.

腫瘍である DHL, WDL, CLL は (+) であるが、同じ mature B (B2) の成熟リンパ球培養株と形質細胞型 (B3) の骨髄腫株は (-) であることから、immature B (B1) と mature B (B2) の腫瘍に広く出現する腫瘍高度関連抗原であると思われる。そこでこの抗原を仮りに“common B-L antigen (cBLA)”と呼ぶことにする。cBLA は異種抗血清で存在が暗示されている白血病関連抗原^{16)~18)}とはそれらが急性骨髄性白血病 (AML) に出現する点で異っている。最近 monoclonal 抗体によって認識された B細胞型腫瘍の抗原として B1¹⁹⁾, B2²⁰⁾や抗体 P1153-3²¹⁾, HC11A²²⁾, BA-1²³⁾, BA-2²⁴⁾, HLB-1²⁵⁾, HLB-2²⁵⁾の各標的抗原などが知られているが、これらはいずれも正常B細胞の分化抗原

に属し、末梢血リンパ球に出現したり、non-T, non-B型急性リンパ性白血病や神経芽細胞腫にも出現する点でcBLAと異っている。B細胞型リンパ系腫瘍特異抗原の可能性をもつものとしてAb 89⁵⁾、38・13⁶⁾、抗Y 29/55²⁶⁾などの標的抗原を一応あげ得るが、Ab 89の抗原はBL細胞には出現せず、38・13の抗原はCLLやLSに出現しない点でcBLAと区別できる。抗Y 29/55の抗原は非循環性(固着性)リンパ球の抗原と考えられているが、腫瘍分布にcBLAと類似性があるので今後抗原の性状を比較する必要がある。

cBLAの分子量は約31,000で、BA-1抗原(M.W. 65,000)、BA-2抗原(M.W. 24,000)、Ab 89抗原(M.W. 75,000)とは異なり、Ia抗原のポリペプチド(M.W. 30,000)²⁷⁾、B-1(M.W. 30,000)に近い。しかし、この抗原がIa抗原やB-1と構造上類似性をもつか否かはわからない。なお、cBLAはHL-A、-B、-Cを欠くDaudi株に出現し、多数の正常人末梢血リンパ球には出現しないことから組織適合抗原とのかかわりは否定できる。また、その分布や分子量から見ると既知の腫瘍関連抗原(CEA、 α -フェト蛋白、フェリチンなど)とも関係はない。しかし、このような腫瘍特異性があるように思われる抗原が正常細胞にも微量に存在する可能性は、本実験のように高度吸収を行った polyclonal 抗体を使用している以上、決定的に否定しきれない。ただ、その可能性は残るにしてもこの抗原・抗体系は臨床的な価値をもちそうである。材料的な制約から常に一定力価の異種抗血清を作ることは困難だから、そのためにはこの抗原に対する monoclonal 抗体の作製が必須であろう。それを作る試みは現在進行中である。

結 論

B細胞型DHL, WDL, CLLの剖検材料から部分精製抗原分画を抽出し、モルモット抗血清を作製した。抗血清を適当に吸収した後F(ab')₂抗体を作製してLMIFとELISAにより反応する抗原の分布やその性質について検索した。

1) 抗原はB細胞型悪性リンパ腫—白血病の中、immature B (B1)段階の腫瘍細胞株の細胞膜及びmature B (B2)段階の腫瘍DHL, WDL, CLLに存在するが、正常成熟リンパ球及びその培養株に存在せず、pre-B (B0)段階の腫瘍細胞株や形質細胞(B3)段階の腫瘍細胞株あるいはT細胞系、non-T, non-B細胞系、骨髄球系、単球系その他の腫瘍細胞株にも存在しない。この抗原を仮りに“cBLA”と名付けた。

2) 抗原はプレアルブミンの泳動度をもち、分子量は約31,000であった。

この抗原がB1, B2段階の悪性リンパ性腫瘍に

commonな腫瘍特異抗原であることについてのより厳しい検討が今後の課題である。

稿を終るに臨み、御指導・御校閲戴いた倉田自章教授ならびに本研究の機会をお与え下さった恩師関本博教授に深謝するとともに終始指導・御教示を戴いたがん研究所病態生理部岡田取司助教授、佐藤信生博士、清水弘子助手、分子免疫部、徳山春彦博士、御協力を戴いた病態生理部教室員各位に心より感謝申し上げます。また貴重な剖検材料を御恵与下さった河村洋一博士(石川県立中央病院)、渡辺駿七郎博士(国立金沢病院検査科)、武川昭男教授(金沢医科大学病理)、中西功夫助教授(金沢大・医・病理)ならびに培養細胞株を心よく御恵与下さいました諸大学の先生方に深くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Pesando, J. M., Ritz, J., Levine, H., Terhorst, C., Lazarus, H. & Schlossman, S. F.: Human leukemia-associated antigen: relation to a family of surface glycoproteins. *J. Immunol.*, 124, 2794-2799 (1980).
- 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) Ueda, R., Tanimoto, M., Takahashi, T., Ogata, S., Nishida, K., Nanikawa, R., Nishizuka, Y. & Ota, K.: Serological analysis of cell surface antigens of null cell acute lymphocytic leukemia by mouse monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 79, 4386-4390 (1982).
- 4) Deng, C. T., Terasaki, P., Chia, J. & Billing, R.: Monoclonal antibody specific for human T acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* i, 10-11 (1982).
- 5) Nadler, L. M., Stashenko, P., Hardy, R. & Schlossman, S. F.: A monoclonal antibody defining a lymphoma-associated antigen in man. *J. Immunol.*, 125, 570-577 (1980).
- 6) Wiels, J., Fellous, M. & Tursz, T.: Monoclonal antibody against a Burkitt lymphoma-associated antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78, 6485-6488 (1981).
- 7) Kurata, Y., Watanabe, Y., Okada, S. & Fukuyama, Y.: Immunological studies of insoluble lipoproteins. II. On the salivary gland-characteristic antigens. *Int. Arch. Allergy*, 35, 392-401 (1969).
- 8) Okada, S., Itaya, K. & Kurata, Y.: Identification of a tumor-specific antigen in the insoluble

- fraction of human nephroblastoma. *Eur. J. Cancer*, **15**, 1085-1093 (1979).
- 9) Okada, S., Kurata, Y., Kitagawa, K. & Ookawa, M.: Demonstration and preliminary characterization of an antigen in the insoluble extracts of human transitional cell carcinoma. *Eur. J. Cancer*, **15**, 1085-1093 (1980).
- 10) Smith, J. T., Funckes, A. J., Barak, A. J. & Thomas, L. E.: Cellular lipoproteins I. The insoluble lipoprotein of whole liver cells. *Exp. Cell Res.*, **13**, 96-102 (1957).
- 11) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 12) Cambiaso, C. L., Goffinet, A., Vaerman, J. P. & Heremans, J. F.: Glutaraldehyde-activated amino-hexyl derivative of Sepharose 4 B as a new versatile immunoabsorbent. *Immunochemistry*, **12**, 273-278 (1975).
- 13) Stanworth, D. R. & Turner, M. W.: Immunochemical analysis of immunoglobulins and their subunits, p 10.16-10.18. In D. M. Weir (ed.), *Immunochemistry*, 2nd. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1973.
- 14) Voller, A. & Bidwell, D. E.: Enzyme-immunoassays for antibodies in measles, cytomegalovirus infections and after rubella vaccination. *J. Exp. Path.*, **57**, 243-247 (1976).
- 15) 山田剛太郎・中根一穂: 免疫操作実験法 (日本免疫学会編), 第6版, 1835-1844頁, 日本免疫学会, 金沢, 1977.
- 16) Mann, D. L., Rogentine, G. N., Halterman, R. & Leventhal, B.: Detection of an antigen associated with acute leukemia. *Science*, **174**, 1136-1137 (1971).
- 17) Billing, R. & Terasaki, P. I.: Human leukemia antigen. I. Production and characterization of antisera. *J. Natl. Cancer Inst.*, **53**, 1635-1638 (1974).
- 18) Durantez, A., Zigelboim, J. & Gale, R. P.: Leukemia-associated antigens detected by heterologous antisera. *J. Natl. Cancer Inst.*, **56**, 1217-1219 (1976).
- 19) Stashenko, P., Nadler, L. H., 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., Agthoven, A., Terhorst, C. & Schlossman, S. F.: Characterization of a human B cell-specific antigen (B 2) distinct from B 1. *J. Immunol.*, **126**, 1941-1947 (1981).
- 21) Kennet, R. H. & Gilbert, F.: Hybrid myelomas producing antibodies against a human neuroblastoma antigen present on fetal brain. *Science*, **203**, 1120-1121 (1979).
- 22) Brooks, D. A., Beckman, I., Bradley, J., McNamara, P. J. & Thomas, M. E.: Human lymphocyte markers defined by antibodies derived from somatic cell hybrids. I. A hybridoma secreting antibody against a marker specific for human B lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.*, **39**, 477-485 (1980).
- 23) Abramson, C. S., Kersey, J. H. & Lebien, T. W.: A monoclonal antibody (BA-1) reactive with cells of human B lymphocyte lineage. *J. Immunol.*, **126**, 83-88 (1981).
- 24) Kersey, J. H., Lebien, T. W., Abramson, C. S., Newman, R., Sutherland, R. & Greaves, M. F.: p 24: a human leukemia-associated and lymphohemopoietic progenitor cell surface structure identified with monoclonal antibody. *J. Exp. Med.*, **153**, 726-731 (1981).
- 25) Kikuchi, K., Ishii, Y. & Koshiba, H.: Lymphocyte differentiation and malignant lymphoma. *Acta Haematol. Jpn.*, **44**, 1384-1394 (1981).
- 26) Forster, H. K., Gudat, F. G., Girard, M., Albrecht, R., Schmidt, J., Ludwig, C. & Obrecht, J.: Monoclonal antibody against a membrane antigen characterizing leukemic human B-lymphocytes. *Cancer Res.*, **42**, 1927-1934 (1982).
- 27) Humphreys, D. J., Mann, D. L., Parham, P., Schlossman, S. F. & Strominger, J. L.: Isolation and immunologic characterization of a human B-lymphocyte-specific, cell surface antigen. *J. Exp. Med.*, **144**, 98-112 (1976).

An Antigen(s) Highly Associated with Human Malignant Lymphoma of B Cell Lineage
Hiroshi Hirai, Department of Pathophysiology, Cancer Research Institute, Kanazawa University,
Kanazawa, 920 – J. Juzen Med. Soc., 92, 296–304 (1983)

Key words: Antigen, B cell leukemia, B cell lymphoma, Diffuse histiocytic lymphoma,
Immunology

Abstract

Insoluble extracts of human B-cell type lymphoma-leukemias, including diffuse histiocytic lymphoma, well differentiated lymphocytic lymphoma, and chronic lymphocytic lymphoma, were solubilized by deoxycholate. The soluble products, after partial purification, were used to prepare antisera in guinea pigs. Some of the F(ab')₂ preparations from the antisera absorbed with homogenates of liver, spleen, lung, thymus, tonsil, gastric cancer, and colon cancer were found to detect an antigen(s) common to lymphoma-leukemia cell lines of B cell lineage, provisionally termed common B-lymphoma antigen (cBLA), by living cell membrane immunofluorescence. The cBLA was not detected in pre-B as well as non-B type lymphoma-leukemia cell lines, normal lymphocytic cell lines, and normal peripheral blood cells. This antigen, when estimated by the aid of enzyme-linked immunosorbent assay, showed a prealbumin mobility in polyacrylamide gel electrophoresis and an apparent mol. wt. of 31, 000 on gel filtration.