原 著 I

未熟Bリンパ球に特異性を示す単クローン 抗体の作製

中 村 直 哉

福島県立医科大学第1病理学教室

(1988年12月13日受付)
(1989年5月30日受理)

A new monoclonal antibody specific for human pre-B cell leukemia/lymphoma

Naoya Nakamura

First Department of Pathology, Fukushima Medical College 1-Hikarigaoka, Fukushima

A new monoclonal antibody, designated WH14 antibody (WH14 Ab), was produced by using non-T ALL cell line (HBL-3 cell line) as an immunogen.

HBL-3 cell line showed characteristics of the earliest B cell committed to B cell lineage [SIg⁻, CIg⁻, TdT⁺, Ia⁺, B4 (CD19)⁺, B1 (CD20)⁻, J5 (CD10⁻, IgH^R, TcR^G], HBL-3 cell line, according to the Nadler's or Foon's classification of non-T ALL, was representative for a pre-B cell of the Stage II.

SDS-PAGE analysis of immunoprecipitates and Western blotting analysis revealed that the antigen reacting with WH14 was of molecule of 30,000 daltons, Immunoglobulin isotype of WH14 Ab was IgG1.

In the normal hematopoietic tissue, the WH14 Ab reacted with a small number of monocytes (<30%) and granulocytes (<2%) in the peripheral blood, but neither with lymphocytes in the lymph nodes and tonsils nor thymocytes in the thymus.

WH14 Ab reacted with Non-T non-B cell ALL cell lines (REH) and pre-B cell line (HBL-3), but not with other B-cell leukemia/lymphoma cell lines and EBV-transformed B cell lines.

In addition, the WH14 Ab reacted with most non-T ALLs and B lymphoblastic lymphomas (SIg⁻, B4⁺, J5⁺) corresponding to pre-B cell derived neoplasm and some medium-sized cell lymphoma derived from intermediate-B cell, but not with other B-cell lymphoma.

WH14 Ab didn't react with all T-cell lymphomas including ATLL. These findings indicated that the WH14 Ab might recognize the cell surface determinant shared by immature B cells, especially pre-B cells in the B-cell lineage.

WH14 Ab is useful for the study to analyze the characterization and difference of B cells in immature stage.

Key words : Monoclonal antibody, pre-B cell leukemia/lymphoma B-cell lineage

はじめに

1975年, Köhler と Milstein ら¹⁾が細胞融合による単クローン抗体の作製に成功して以来, 血液細胞, 特にリンパ球表面抗原に対する多数の単クローン抗体が報告されている。これらの単クローン抗体は, 正常リンパ球, リンパ性白血病あるいは悪性リンパ腫との反応性により, 正常リンパ球の分化成熟段階が解析され, リンパ性白血病及び悪性リンパ腫の発生や免疫学的分類に多大の進歩をもたらした^{2)~5)}。

さらに, 近年, 単クローン抗体が認識する抗原の機能が, T細胞ばかりでなく, B細胞においても明らかにされてきている^{6)~8)}。また, 一部の単クローン抗体は白血病の治療にも応用⁹⁾され, 単クローン抗体に関する研究は飛躍的な発展を遂げてきている。

B細胞の分化成熟段階を解析するにあたり, B細胞分化成熟段階を広範囲に認識する単クローン抗体(抗Pan B抗原抗体, 以下Pan B抗体)は多数報告されているが, 個々の分化成熟段階にある細胞を特異的に認識する抗体は少なく, とりわけ未熟なB細胞に特異的に反応する単クローン抗体は極めて少ない¹⁰⁾。

今回, 著者は, 未熟なB細胞の性格を有する培養細胞株 HBL-3¹¹⁾を免疫源として, 未熟なB細胞由来の腫瘍を特異的に認識する新しい単クローン抗体 WH14 monoclonal antibody (以下WH14 Ab)を開発することに成功したので, その特異性について報告する。

材料と方法

1. 単クローン抗体の作製

1) 免疫方法

免疫源として培養細胞株 HBL-3¹¹⁾を用いた。BALB/C mouse(6~8w, ♀)に2週間隔で計3回, 0.5mlPBSに再浮遊させた HBL-3, 3×10^7 cellsを静注した。

2) 細胞融合

最終免疫後3日目に脾摘を行ない, マウス脾臓細胞を分離した。細胞融合は, Köhler と Milsteinの方法を改良した渡辺ら¹²⁾の方法に準じ, 50%ポリエチレングリコール1500 (BMY)を用いてマウス骨髄腫細胞株 P3NSI/1-Ag4-1(NS-1)と融合を行った。融合後, 細胞をhypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT)培地に浮遊させ, 96wellの microplate に分注した。

3) スクリーニング

各well中の培養上清を, 間接蛍光抗体法, もしくは混合受身凝集法 (MPHA)¹³⁾にてスクリーニングを行った。標的細胞として HBL-3(non-T ALL由来細胞株), Raji (バーキットリンパ腫由来細胞株)¹⁴⁾, HBL-1(びまん性大細胞型Bリンパ腫由来細胞株)¹⁵⁾の各培養細胞株細胞を使用し, HBL-3 cellsにのみ陽性を呈する培養上清を有するwellを選択した。

4) クローニング

96-well microtest plateを用いた限界希釈法¹²⁾にて2回, クローニングを行った。wellの選択には, リンパ球細胞毒試験(LCT)¹⁶⁾を用いた。培養上清を2倍連続希釈($\times 1, \times 2, \times 4, \times 8$)し, HBL-3 cellsを標的細胞として反応させ, 死細胞をcountし, その反応性から高い抗体価を有すると思われるものを選択した。

5) 腹水化

クローニングで得られた融合細胞は, 3×10^7 cellsをブリステン注入後のBALB/C mouse(6~8w, ♀)の腹腔内に注入し, 腹水の型で採取した。これを1,000rpmで遠心し, 上清を得た。力価の検定として, 腹水を100倍から順次2倍連続希釈し, 標的細胞として HBL-3 cellsを用いて間接蛍光抗体法を行った。

2. WH14 Abの生化学的解析

1) WH14 Abのアイソタイプ

得られた単クローン抗体の免疫グロブリンのアイソタイプは, Ouchterlony法¹⁷⁾およびEIA法(American Qualex International Inc. mouse monoclonal sub-isotyping kit)にて検討した。

2) WH14 Abが認識する抗原の解析

HBL-3, 3×10^7 cellsをLysis buffer (0.5% NP40, 0.1% BSA, NET buffer) 1mlに再浮遊させ, 0℃にて30分間静置し, 次に4℃, 11×10^4 rpmにて25分間遠心して細胞膜を破壊, 沈渣を除去し, 膜抗原含有成分を得た。これを用いてSDS-PAGEを行い, acrylamide gelをWestern blotting法¹⁸⁾で解析し, WH14 Abが認識する抗原の同定を試みた。blottingには, マリソル社セミドライトランスブロッティング装置KS-8640を用い, immunostainはABC法で行った¹⁹⁾。また, ラジオアイソトープを使用した免疫沈降法にても検討した。即ち, 培養細胞株細胞 3×10^7 cellsを³⁵S-methionineでlabelingし, Lysis bufferを用いて, 上記と同様に標識膜抗

原を得た。免疫沈降は, protein A CL-4B sepharose を用い, Maeda らの方法²⁰⁾に準じた。これを用いて SDS-PAGE を行い, autoradiograph にて解析した。

3. WH14 Ab の特異性

1) 正常造血組織との反応性

ヘパリン採血された末梢血, 骨髓血など新鮮材料は, Ficoll-Hypaque 比重遠心法にて単核球²¹⁾を分離した。単球は高張食塩水法²²⁾を用いて, 好中球は赤血球をデキストランにより沈殿させ, その上清から percoll を用いた比重遠心分離法²³⁾で分離した。また, リンパ節は, 細切してメッシュを通して浮遊細胞とした。つぎに Fc receptor (FcR) を block するために 1 次反応前にヒト AB 型血清と反応させ, 更に 2 次抗体には Fc 部分を切断したものを用いて間接蛍光抗体法を行った。検体は反応後, FACScan (Becton Dickinson) もしくは落射式蛍光顕微鏡 (Zeiss) によって解析した。

また, 生検されたリンパ節, 扁桃組織などは, 1cm 角に細切して PLP 固定²⁴⁾を行い, -80℃ に凍結保存した。これを使用時, 薄切し, ABC 法もしくは PAP 法²⁵⁾にて免疫組織学的に検索した。

2) 培養細胞株との反応性

使用した培養細胞株は, ALL 由来細胞株 6 種 (HBL-3, REH, BALL-1, Molt-3, HSB-2, Hira-sawa²⁶⁾), B 細胞性リンパ腫由来細胞株 6 種 (HBL-1, HBL-2¹⁵⁾, Raji, TL-1, HBL-4²⁷⁾, HBL-5²⁷⁾), Epstein Barr Virus (EBV) により樹立された細胞株 2 種 (Ohnuma, Ishii), 骨髓系白血病由来細胞株 6 種 (KG-1, HL-60, THP-1, U937, K562, NISI) の計 20 種で, 1) と同様に間接蛍光抗体法で染色し, FACScan もしくは落射式蛍光顕微鏡にて解析し

た。

3) 各種白血病細胞との反応性

ヘパリン採血された末梢血, 骨髓血など新鮮材料は, 上記 1) のごとく染色し, FACScan もしくは落射式蛍光顕微鏡にて解析した。あるいは, clot にして PLP 固定を行い, 免疫組織学的に検索した。

4) 悪性リンパ腫及びその他の疾患との反応性

生検されたリンパ節及び腫瘍組織につき, 上記 1) と同様に間接蛍光抗体法, もしくは, 免疫組織学的に検索した。

結 果

1. 免疫源とした HBL-3 の性状¹¹⁾

HBL-3 は, non-T ALL (L1) の 9 歳女児の骨髓内白血病細胞から樹立された。HBL-3 の膜表面抗原, 遺伝子解析及び染色体分析の検索結果を Table 1 に示した。即ち, HBL-3 は, DR(+), B4(+), BA-1(+), TdT(+), J5(-), B1(-) を示し, T 細胞及び骨髓顆粒球・単球系を認識する抗体には陰性で, 遺伝子解析では, 免疫グロブリン H 鎖のみに再構成バンドが認められた。以上, HBL-3 は, 未熟な B 細胞の性状を示す細胞株である。

2. 単クローン抗体の作製

hybridoma の増殖が良好であった 98well についてスクリーニングを行った。HBL-3 のみに陽性を示した培養上清は 2 個のみであった。このうち, 1 個についてクローニングを行った。70 クローン中, LCT にて ×8 倍まで陽性となったものは 14 個であった。

腹水化した抗体の力価は, 間接蛍光抗体法で検定し, ×1600 までは良好な陽性像が得られたが, ×3200 からは輝度は減退した。

Table 1-A Immunological characteristics of HBL-3

SIg	-	Leu 1	(CD 5)	-	Leu M1	(CD 15)	-
CIg	-	Leu 2a	(CD 8)	-	MY 4	(CD 14)	-
C3 receptor	-	Leu 3a	(CD 4)	-	MY 7	(CD 13)	-
Fcγ receptor	-	Leu 4	(CD 3)	-	MY 9	(CD 33)	-
HLA-DR	+	Leu 5b	(CD 2)	-			
J5 (CD 10)	-	Leu 6	(CD 1)	-	IL-2R	(CD 25)	-
B4 (CD 19)	+	Leu 7		-	TdT		+
B1 (CD 20)	-	Leu 8		-			
B2 (CD 21)	-	Leu 9	(CD 7)	-			
BA1 (CD 24)	+	Leu 11	(CD 16)	-			

+ : positive, - : negative

Table 1-B Rearrangement of the Gene for Immunoglobulin and Beta chain of T-cell Receptor in HBL-3 cell line by southern blotting

	Eco R1	BamH1
IgH (JH)	R	R
IgL (J κ)	G	G
TCR β (C β 1)	G	G

R : rearrangement G : germ line

Table 1-C Karyotype of HBL-3 cell line

46 XX, -9,t(3;9)(p24;p21), +der(9)t(1;9)(q23;p13)

3. WH14 の生化学的特性 (Figure 1)

Western blotting の結果では, WH14 Ab は, 28—30 kilodalton(kd)の抗原と反応した。さらに, ³⁵S-methionine を用いた解析でも WH14 Ab は 28—30kd の抗原を沈降させた。

また, WH14 Ab の免疫グロブリンアイソタイプは IgG1 であった。

4. WH14 Ab の正常造血組織との反応性 (Table 2)

血液細胞との反応性では, WH14 Ab は血小板, 単球の一部に反応するが, リンパ球および顆粒球にはほとんど反応しなかった。骨髓血では, 約 2% の細胞に陽性を示した。扁桃組織及びリンパ節の免疫組織学的検索では, WH14 Ab は胚中心の間質に網状に染色されたが, 胚中心細胞と暗殻層細胞, 濾胞間細胞には染色されなかった。脾臓組織及び胸腺組織にも陽性細胞はほとんど認められなかったが, 一部の形質細胞に陽性を示した。

5. WH14 Ab の培養細胞株との反応性 (Table 3)

1) non-T non-B 細胞及び B 細胞性培養細胞株との反応性: WH14 Ab は, 免疫源である HBL-3 にはほぼ 100% 陽性を示した。common ALL の性格を示す REH には約 50% に陽性で, 膜表面免疫グロブリン(以下 SIg)陽性 ALL である BALL-1 には陰性であった。さらに, パーキットリンパ腫細胞株 4 種, 大細胞型 B リンパ腫細胞株 2 種, EBV(+)細胞株 2 種にはすべて陰性であった。

2) T 細胞性培養細胞株との反応性: WH14 Ab は, Hirasawa (Leu6⁺, leu1⁺, Leu4⁺, Leu2a⁺, Leu3a⁺)²⁶⁾ および HSB-2 には陰性であったが, Molt-3 には陽性を示した。

3) 骨髓顆粒球系及び単球系培養細胞株との反応

ANALYSIS OF WH14 ANTIBODY FOR MEMBRANE PROTEINS OF HBL-3 BY WESTERN BLOTTING

Figure 1A Analysis of WH 14 antibody for membrane proteins of HBL-3 by Western blotting and ABC method (left) Sample reacted with anti-HLA-DR(28 kd and 36 kd). Anti-HLA-DR was purchased from Becton-Dickinson, USA. (right) Sample reacted with WH14 Ab. arrow-head position of 28-30kd

Figure 1B SDS - PAGE analysis of WH14 antigen from ^{35}S - methionine labeled THP - 1 cell membrane. Reduced immunoprecipitate with anti-WH14 is shown. arrow-head position of 28-30Kd

Table 2 Reactivity of WH 14 antibody with various lymphoid and hematopoietic system*¹

	examined cases	positive rate(%) ^{*2}
peripheral blood	4	
mononuclear cells		1.1±1.1
monocytes		20.8±5.7
granulocytes		1.1±0.4
platelets		(+) ^{*3}
bone marrow cells	3	2.08±1.1
Thymus cells	1 ^{*4}	< 1
Tonsil cells	3	< 3

*¹Binding of WH 14 Ab assayed by indirect immunofluorescence.

*²Percentage of positive cells by immunofluorescence in individual cases (mean±standard deviation).

*³Some fluorescence cells visible on microscopy.

*⁴A case of thymic hyperplasia.

Table 3 Reactivity of WH 14 antibody with cultured cell lines*¹

	cell lines	WH14
non-T cell ALL	HBL-3	†
	REH	+
B-ALL	BALL-1	—
Burkitt's lymphoma	RAJI	—
	TL-1	—
	HBL-4	—
	HBL-5	—
B-lymphoma (large cell)	HBL-1	—
	HBL-2	—
EBV-transformed	OHNUMA	—
	ISHII	—
T-ALL	MOLT-3	†
	HSB-2	—
	Hirasawa	—
myeloid	KG-1	—
	HL-60	±
erythroid	K562	—
	NISI ^{*2}	—
monocytoid	THP-1	†
	U937	—

*¹Reactivity of WH14 Ab with cultured cell lines by indirect immunofluorescence.

† : most of cells were positive.

+ : a partial reactivity(see Figure 2).

± : weak positive(≤20% of cells)

— : most of cells were negative.

*²A cell line of NISI was provided by H.Kambayashi M.D.

性：WH14 Ab は、HL-60 の一部に弱陽性を示したが、KG-1 には陰性を示した。単球系細胞株では THP-1 に陽性、U937 に陰性を示した。また、骨髄巨核球系細胞株 2 種には陰性を示した。

6. WH14 Ab の各種白血病との反応性 (Table 4 and 5)

non T-ALL では11例中10例に陽性を示した。AML では、M4、M5 の一部に陽性を示した。CML -blastic crisis では、lymphoid 及び monocytoid crisis に陽性を示した。

7. WH14 Ab と悪性リンパ腫及びその他の疾患との反応性 (Table 6)

Analysis of WH 14 antibody with cultured cell lines by FACScan

Figure 2 FACS can Analysis of human cultured cell lines with WH 14 Ab were done by indirect immunofluorescence

Most of HBL-3 cells react with WH14 Ab and REH cells show a partial reactivity.

Raji cells show negative reaction.

Table 4 Reactivity of WH 14 antibody against various type of leukemias

non-T ALL	10/11	
AML	4/14	
M1		0/6
M4		2/4
M5		2/3
M6		0/1
CML-BC	2/5	
lymphoid		1/1
myeloid		0/3
monocytoid		1/1

Binding of WH14 Ab with leukemias were assayed by indirect immunofluorescence or immunostaining (positive cases/tested cases).

Positive reactivity was defined as $\geq 30\%$ specific fluorescence cells by indirect immunofluorescence or staining of surface of lymphoma/leukemia cells by immunostaining.

B細胞性悪性リンパ腫では、WH14 Abは、リンパ芽球型と中細胞型の一部に陽性を示したが、小細胞型、混合型、大細胞型、パーキット型、形質細胞腫のいずれにも陰性であった。T細胞性悪性リンパ腫では、ATLLの3例（全例が混合型）を含む計15例全ての症例に陰性となった。Hodgkin病では、WH14 Abは、B細胞およびT細胞関連抗原に対する抗体に陽性を示さないHodgkin細胞（Reed-Sternberg細胞、以下RS細胞）には陰性であったが、Pan B細胞に対する抗体（B4, B1）に陽性を示したRS細胞に陽性となった。また、胸腺腫とリンパ節転移癌、神経芽細胞腫、褐色細胞腫には陰性であった。

考 察

B細胞系の分化成熟段階のうち、未熟なB細胞を特異的に認識する単クローン抗体は極めて少なく¹⁰⁾、その開発が必要とされていた。今回、未熟なB細胞の性格(SIg⁻, Clg⁻, B1⁻, B4⁺, J5⁻, DR⁺)を有する培養細胞株 HBL-3を用いて、新しい単クローン抗体 WH14 Abを開発した。

免疫源とした HBL-3 細胞株は、Nadler ら²⁸⁾による non-T ALL の分類では stage II に、下山ら²⁹⁾の分類によれば Lymphoid stem cell leukemia に相当する未熟なB細胞由来の細胞株であると考えられる。non-T ALL 細胞株の報告は幾つかみられる

Table 5 Cell surface characteristics of non-T ALL

No.	WH14	I a	B4 (CD19)	J5 (CD10)	B1 (CD20)	Cμ	Leu 1 (CD 5)	MY7 (CD13)
1	+	+	+	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	-	-	ND	-
3	+	+	-	+	-	-	-	-
4	-	+	ND	ND	ND	-	ND	ND
5	+	+	+	+	-	+	ND	ND
6	+	+	+	+	+	-	ND	ND
7	+	+	+	+	+	+	ND	ND
8	+	+	+	+	+	ND	-	ND
9	+	+	+	+	+	+	-	-
10	+	+	+	+	+	ND	ND	-
11	+	+	ND	ND	ND	+	ND	ND

Criteria for + and - reactivity were same as in table 4.

Table 6 Reactivity of WH 14 antibody with Malignant lymphomas and others
(positive cases/examined cases)

1) B-cell type non-Hodgkin's lymphoma	
Diffuse lymphoblastic(SIg ⁻ B4 ⁺ J5 ⁺ B1 ⁻)	1 / 1
Diffuse small lymphocytic 0/2 plasmacytoid 0/2	0 / 4
Follicular medium	0 / 2
Diffuse medium	2 / 5
Follicular mixed	0 / 2
Diffuse mixed	0 / 3
Mantle zone lymphoma	0 / 1
Diffuse large large 0/13 immunoblastic 0/3	0 / 16
Burkitt's lymphoma	0 / 3
Plasmacytoma	0 / 1
2) T-cell type non-Hodgkin's lymphoma	
Diffuse lymphoblastic	0 / 5
Diffuse medium	0 / 1
Diffuse mixed	0 / 5
Diffuse large large 0/1 clear cell type 0/1	0 / 2
Diffuse pleomorphic	0 / 2
3) Hodgkin's disease	
B1 ⁻ Leu4 ⁻ RS-cells	0 / 3
B1 ⁺ B4 ⁺ RS-cells	2 / 2
4) Others	
thymoma	0 / 2
neuroblastoma	0 / 1
Pheochromocytoma	0 / 1

Criteria for + and - reactivity were same as in table 4.

Table 7 Human B cell differentiation and related malignancies.^{5,28)}

B-cell associated marker with WH 14

	lymphoid stem cell	progenitor B	pre B	early B	intermediate B	mature B	plasma- cytoidB	plasma cell
		non-T	ALL(stage)	BL	MZL	FL, DL		MM
	non-T ALL stage	I	II	III	IV	CLL, SL		
IgH								
L								
TdT								
SIg								
CIg								
Ia								
B4 (CD19)								
J5 (CD10)								
B1 (CD20)								
B2 (CD21)								
(CD 9)								
T10 (CD38)								
N6								
WH14								

ALL; Acute lymphoblastic leukemia BL; Burkitt's lymphoma MZL; Mantle zone lymphoma
 FL; Follicular lymphoma DL; Diffuse lymphoma MM; Multiple myeloma
 CLL; Chronic lymphocytic leukemia SL: Small cell lymphoma

が^{30)~34)}, その多くは J5 陽性の common ALL であり, 本細胞株のような性格を有する細胞株の樹立は文献上まだ報告をみていない。

WH14 Ab は, アイソタイプは IgG1 で, 28—30Kd の抗原を認識すると考えられる。

WH14 Ab は, 正常造血組織では, 血小板および単球の一部に陽性を示すが, リンパ節, 脾, 胸腺には陽性細胞はほとんど認められず, リンパ球および顆粒球にはほとんど陽性を示さないと考えられる。

non-T non-B 細胞, および B 細胞性腫瘍との反応性では, WH14 Ab は pre B 細胞由来 (Stage II ~ Stage IV)²⁸⁾と考えられた non-T non-B ALL には陽性であるが, early B 細胞由来の B-ALL 細胞株には陰性となった。また, 悪性リンパ腫では, リンパ芽球型および中細胞型の一部のみに陽性を示した。

リンパ芽球型は, 一般には T 細胞由来とされているが³⁵⁾³⁶⁾, 近年, non-T non-B 細胞, あるいは B 細胞のマーカーを有する症例の報告がなされており, リンパ芽球型の heterogeneity が明らかにされている³⁷⁾。今回, WH14 Ab に陽性となったリンパ芽球型の症例では, 病変がリンパ節に限られており, common ALL と同じ分化抗原を示す pre B 細胞から発生したものと考えられる。

中細胞型に対しては 7 例中 2 例に陽性の症例を認

Figure 3 No reactivity of WH14 Ab with normal tonsillar cells

Figure 4 Malignant lymphoma, diffuse lymphoblastic type (lymph node)

(4A)H.E.

(4B)Lymphoma cells(Ia⁺, B4⁺, J5⁺, B1⁻) positive for WH14 Ab.

めた。この2症例は、SIg(μ^+ , δ^+ or $-$)B1(+)B4(+)でさらにIL-2Rにも陽性を示した。WH14 Abが陽性となったSIg陽性の症例は、この2症例のみであり、WH14 Abは、intermediate Bの一部を認識するのも知れない。しかし、early B細胞由来と考えられているパーキット型には陰性で、また小細胞型、混合型、大細胞型(免疫芽球型を含む)にもすべて陰性であることから、WH14 Abは、intermediate B細胞の大部分とmature B細胞に由来する腫瘍、形質細胞性腫瘍を認識しないと考えられる。

以上、WH14 Abは、Foonら⁵⁾のB細胞分化成熟段階に従えば、pre B細胞(Stage II~Stage IV)に由来する未だSIgを発現していない未熟なB細胞に主として陽性となり、SIgを有するearly Bからmature Bにはほとんど陽性を示さないことが明

らかとなった。

T細胞では、培養細胞株Molt-3にのみ陽性を示した。しかし、胸腺細胞にはほとんど陽性を示さず、また、common thymocyte由来と考えられたリンパ芽球型には全く陰性であった。さらに、末梢型のT細胞性リンパ腫には検索したかぎりの全ての症例に陰性であった。Molt-3もLeu-4は陰性であり、現在までの検索では、T cell receptor β の産生蛋白であるCD3を発現したもの³⁸⁾には少なくとも陰性を示すと考えられる。さらに、Ki-1(CD30)やIL-2R(CD25)に陽性となる症例³⁹⁾にも陰性であり、活性化T細胞も認識しない可能性が高い。しかし、未熟なT細胞に関しては検索が不十分でありさらに検討が必要である。

WH14 Abは、正常顆粒球および顆粒球系腫瘍に

Figure 5 non-T cell ALL (bone marrow clot)
 (5A) H.E.
 (5B) Leukemic cells (Ia^+ , $B4^-$, $J5^+$, $B1^-$) positive for WH14 Ab.

は陰性であるが、末梢血単球と単球性の培養細胞株及び白血病細胞に一部陽性となった。この反応は、AB型血清でFcRをblockし、さらにFcを切断した2次抗体を用いての反応であり、FcRによる非特異的反応とは明らかに異なる。WH14 Abが単球系の細胞株に一部陽性を示すのみであれば、この腫瘍細胞株細胞に異常なgeneの発現によりリンパ球系抗原が出現したもの⁴⁰⁾と考えられるが、WH14 Abが末梢血単球をも認識することから、白血病細胞はその発生段階のマーカーを有しているとするGreavesら⁴¹⁾の考え方に従えば、WH14 Abがリンパ球と一部の単球に共通する抗原を認識するものとみなされる。

Hodgkin病では、RS細胞の一部に陽性を示した。RS細胞の細胞起源に関しては、諸説があり、現在の

ところ完全な一致をみていない⁴²⁾⁴³⁾。今回、WH14 Abは明らかなT細胞、B細胞のマーカーを示さないRS細胞には陰性となったが、 $B1^+B4^+SIg^-$ を示すRS細胞⁴⁴⁾のみに陽性を示した。B1, B4は比較的特異的にB細胞を認識するPan B抗体⁴⁵⁾⁴⁶⁾と考えられ、B1, B4陽性のRS細胞にWH14 Abが陽性となったことは、B細胞マーカーを示すRS細胞の細胞起源を考える上で非常に興味ある所見と考えられる。

Workshopにおいて決定された1-45のcluster of differentiation (CD number)^{47)~49)}のうち、未熟なB細胞に認められるものとしてCD9, 10, 19, 24, 38などがあげられる。このうち、CD19, CD24に対する抗体は、pre B細胞を含み、B細胞を幅広く認識するPan B抗体である。CD9は、B細胞と顆粒

Figure 6 Hodgkin's disease, mixed cellularity type (lymph node)

(6A) H.E.

(6B) WH14 Ab reacted with RS-cells ($B1^+$, $B4^+$, SIg^-), but not with small lymphocytes around RS-cells.

(6C) Positive reaction of RS-cells for anti-B1 (CD20).

球, 単球, 血小板に存在する。CD9 に対する抗体は, B細胞性腫瘍においては未熟な段階が認識され, non-T non-B ALL の90%に陽性となるが, B-CLLの一部(35%)を始め, バーキット型リンパ腫を含むBリンパ腫の一部にも陽性となり, WH14 Abに比べて認識するB細胞の成熟段階の範囲は広い。

CD10 は, common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) とよばれ, ALL に比較的特異であると考えられていたが⁵⁰⁾⁵¹⁾, 現在では, 正常な

未熟リンパ球, リンパ組織の胚中心細胞, 顆粒球, さらには, 腎糸球体, 近位尿管, 胎児小腸など広くその抗原が分布していることが明らかにされている⁵²⁾。また, CD10 に対する抗体は, 悪性リンパ腫ではバーキット型リンパ腫と濾胞性リンパ腫に陽性となり, WH14 Ab とは全く異なる。

抗 CD38 抗体は, B 細胞と T 細胞, 形質細胞などに陽性となり, B 細胞では, 未熟な段階と形質細胞の 2 極性に陽性となる。胸腺細胞を免疫源として作成された OKT 10⁵³⁾は, 胸腺細胞の 95% 以上に陽性で, さらに, バーキット由来細胞株にも一部陽性となることから, CD38 に対する抗体は WH14 Ab とは異なった特異性を有すると考えられ, さらに認識する抗原の分子量も異なる。

以上の如く, WH14 Ab は未熟な B 細胞の分化成熟段階をより特異的に認識し, さらに従来の単クローン抗体とは異なり, バーキット型リンパ腫及びバーキット型リンパ腫細胞株を認識しない。この点から, WH14 Ab は未熟な B 細胞由来の腫瘍を同定するだけでなく, バーキットリンパ腫の同定及びその細胞帰属を考える上で有用な所見と考えられる。

また, Ueda ら⁵⁴⁾が開発した NL-22 は, non-T ALL16 例中 12 例に比較的特異性を示し, 他の T-ALL, AML, B-CLL 等に全く陰性を示すが, 認識する抗原の分子量など詳細は不明で, WH14 Ab との異同を明らかにすることは出来なかった。

造血器以外では, 神経芽細胞腫細胞株から作製された単クローン抗体が, ALL に陽性になることが報告された⁵⁵⁾⁵⁶⁾。一方, pre-B 細胞株を免疫源として作成された抗 CALLA 抗体が神経芽細胞腫に陽性⁵⁷⁾となり, ALL 細胞と神経芽細胞腫とに共通の抗原が存在することが示唆されている。しかし, WH14 Ab は, 神経芽細胞腫には陰性であったことから, WH14 抗原は神経芽細胞腫が有する抗原とは異なるものと考えられる。

以上, WH14 Ab は, 種々の段階の pre B 細胞 (Stage II ~ Stage IV) を認識することから, B 細胞を同定する他の単クローン抗体と併用することにより, 比較的未熟な分化成熟段階の B 細胞を同定するのに非常に有用な抗体と考えられた。

結 語

著者は, 未熟な B 細胞培養細胞株 HBL-3 を免疫源として新しい単クローン抗体 WH14 Ab を開発し, 正常組織, 培養細胞株, 各種の白血病および悪

性リンパ腫との反応性を検討した。

(1) WH14 Ab は, アイスタイプ IgG1 で, リンパ球の膜表面抗原に対する解析では, 28-30Kd の抗原を認識する。

(2) 正常造血組織では, 血小板および単球の一部に陽性となるが, リンパ球および顆粒球には陰性である。

(3) WH14 Ab は, 培養細胞株, 白血病及び悪性リンパ腫の解析では, B 細胞においては, 比較的未熟な段階に発生した腫瘍に陽性を示す。すなわち, pre B 細胞に由来する腫瘍には陽性を示すが, バーキットリンパ腫を含む early B 細胞から plasma 細胞に由来する他のリンパ腫には全く陰性である。

(4) WH14 Ab は, B 細胞を認識する他の抗体との併用により, 未熟な分化成熟段階の B 細胞を同定するのに非常に有用であるのみならず, B 細胞性を呈する Reed-Sternberg 巨細胞にも陽性で, この巨細胞の由来を考える上でも重要なものとみなされた。

稿を終えるにあたり, 御親切なご指導と御校閲を賜りました若狭治毅教授に深甚の謝意を表します。また, 終始, ご指導, ご助言をいただきました阿部正文助教授に深謝いたします。さらに, ご指導をいただきました埼玉大学医療センター輸血部・前田平生助教授, 福島医大輸血部・大戸斉助教授, 神林裕行博士に感謝します。並びに, 貴重な症例を快くご提供くださいました筑波大学・森尚義助教授, 太田綜合病院病理・佐久間秀夫部長, 磐城綜合病院内科・斎敏明先生に感謝いたします。また, 染色体分析は, 京都大学第 1 内科・福原資郎博士, 遺伝子解析は, 三重大学第 2 内科・北堅吉助教授, 川上恵基博士にご協力をいただきました。ありがとうございました。

最後に, ご援助をいただきました福島医大第一病理学教室の諸先輩を始めとする皆様方に感謝します。さらに本研究にご協力いただいた伊藤多恵夫, 佐藤美知子, 佐々木義和, 半谷美和子氏に感謝します。

本研究は一部, 厚生省がん助成金 61-2 (白川班) および文部省科学研究費 63010035 (白川班) によって。

なお, 本論文の一部は, 第 47 回癌学会総会 (東京) にて報告した。

文 献

- 1) Köhler G and Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497, 1975
- 2) Greaves MF and Lanossy G: Pattern of gene expression and the cellular origins of human leukemia. *Biophys. Acta* 516: 193, 1978
- 3) Foon KA, Schroff RW and Gale RP: Surface markers on leukemia and lymphoma cells: Recent advances. *Blood* 60: 1, 1982
- 4) Anderson KC, Bates MP, Slaughenhaupt BC, Pinkus GS, Schlossman SF and Nadler LM: Expression of human B cell-associated antigen on leukemia and lymphoma: A model of human B cell differentiation. *Blood* 63: 1424-1433, 1984
- 5) Foon KA and Todd III RF: Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood* 68: 1-31, 1986
- 6) 平野俊夫: B細胞増殖分化を誘導するインターロイキンの性状と機能. *臨床免疫* 19: 106-114, 1987
- 7) Clark ED, Shu G and Ledbetter JA: Role of the Bp35 cell surface polypeptide in human B-cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 1766-1770, 1985
- 8) Clark ED and Ledbetter JA: Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 4494-4498, 1986
- 9) 浦部昌夫: Dr. Levy らによるモノクローナル抗体を用いる造血器腫瘍の治療. *Oncologia* 13: 122-123, 1985
- 10) 上田龍三, 太田和雄, 高橋利忠, 須知泰山: 白血病細胞の解析. 特に Null-ALL 関連抗原を中心にして. *臨床免疫* 14: 182-189, 1982
- 11) Abe M, Nakamura N, Fukuhara S, Kawakami K, Kita K, Kinoshita T, Ohsato T and Wakasa H: A newly established human acute lymphoblastic leukemia cell line with characteristics of the earliest B cell in B cell maturation. *Blood* (submitted)
- 12) 渡辺武, 海津務: 効率よくハイブリドーマを確立するポリエチレングリコールによる細胞融合法. *免疫実験操作法Ⅸ*: 2963-2967, 1980
- 13) Shibata Y, Juji T, Nishizawa Y, Sakamoto H and Ozawa N: Detection of platelet antibodies by a newly developed mixed agglutination with platelets. *Vox Sang.* 41: 25-31, 1981
- 14) Puluertaft RJ: Cytology of Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1: 238-240, 1964
- 15) Abe M, Nozawa Y, Wakasa H, Ohno H and Fukuhara S: Characterization and comparison of two newly establishment Epstein Barr virus-negative lymphoma B-cell lines. *Cancer* 61: 483-490, 1988
- 16) 白倉良太他: Microdroplet lymphocyte cytotoxicity test. *免疫実験操作法* 368-377, 1973
- 17) Ouchterlony O and Nilson LA: Immuno-diffusion and immunoelectrophoresis, in Weir DM (ed): *Handbook of Experimental Immunology*. Oxford, Blackwell Scientific Publication. 191, 1978
- 18) Towbin H, Staehelin T and Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354, 1979
- 19) Hsu SM, Raine L and Fanger H: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577-580, 1981
- 20) Maeda H, Hirata R, Okuyama M, Thompson A and Toyama H: Two-dimensional gel analysis of a second family of class II molecules by polymorphic HLA-DR4, 5 and w9 monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 132: 2478-2484, 1984
- 21) Böyum A: Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand J Clin Lab (suppl)* 27: 1-89, 1968
- 22) Recalde, HR: A simple method of obtaining monocytes in suspension. *J. Immunol. Methods* 69, 71-77, 1984
- 23) Gutierrez C, Bernabe RR, Vega J, Kreiser M: Purification of human T and B cells by a discontinuous density gradient of percoll. *J Immunol Method* 29: 57-63, 1979

- 24) McLean IW and Nakane PK: Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative: a new fixative for immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem* 22: 1077-1083, 1974
- 25) 佐藤雄一, 渡辺昌, 黒木将仁, 猪野義典, 後藤政広, 下里幸雄: 組織内Tリンパ球サブセットの同定法について, *病理と臨床* 1: 151-163, 1983
- 26) 未発表
- 27) Abe M, Ono N, Hojo H, Wakasa H, Fukuhara S, Kinoshita T and Osato T: Establishment and characterization of EBV negative and EBV-positive Burkitt lymphoma cell lines (HBL-4 and HBL-5 cell lines). *癌学会総会記事* 304, 1988
- 28) Nadler LM, Korsmeyer SJ, Anderson KC, Boyd AW, Slaughenhaupt B, Park E, Jensen J, Coral F, Mayer RJ, Sallen SE, Ritz J and Schlossman SF: B cell origin of non T cell acute lymphoblastic leukemia. A model for discrete stages of neoplastic and normal pre-B cell differentiation. *J. clin. Invest* 74: 332-340, 1984
- 29) Shimoyama M: Monoclonal antibodies and immunodiagnosis of leukemia and lymphoma. *Acta. Haematol. Jpn.* 48: 1711-1730, 1985
- 30) 中沢真平, 金子恵子, 佐々木道子, 恒松由紀子, 小出亮, 榎本康弘, 渡辺昌: "Null" leukemic line-樹立株とその性状-*臨血* 20: 189, 1978
- 31) Hurwitz R, Hozier J, LeBien T, Minowada J, Gali-Peczalska K, Kubonishi I and Kersy J: Characterization of a leukemic cell line of the pre-B phenotype. *Int J Cancer* 23: 174-180, 1979
- 32) Smith RG, Dev VG and Shannon WA Jr: Characterization of a novel human pre-B leukemia cell line. *J immunol* 126: 596-602: 1981
- 33) McCune JM and Fc SM: Ig biosynthesis in a human pre-B cell line. *J Immunol* 127: 2609-2611, 1981
- 34) 西野和良他: Non-Burkitt's type B-ALL 患児末梢血より樹立された白血病細胞株 KOPB-26 の性状. *Acta Hematol JPN* 49: 1047-1057, 1986
- 35) Barcos MP and Lukes RJ: Malignant lymphoma of convoluted lymphocytes: A new entity of possible T cell type in Sinkes LF & Godden JO (Eds.): *Conflicts in childhood cancer: An evaluation of current management proceedings*. New York Alan R. Liss pp.147-178. 1975
- 36) Suchi T, Tajima K, Nanba K, Wakasa H, Mikata A, Kikuchi M, Mori S, Watanabe S, Mohri H, Shamoto M, Harigaya K, Itagaki T, Matsuda M, Kirini Y, Yakagi K and Fukunaga S: Some problem on the histopathological diagnosis of Non-Hodgkin's lymphoma-A proposal for a New type-*Acta Pathol Jpn.* 29: 755-766, 1979
- 37) Kaneko Y, Variakolis D, Kluuskens L and Rowley JD: Lymphoblastic lymphoma: Cytogenetic, Pathologic, and immunologic studies. *Int. J. Cancer* 30: 273-279, 1982
- 38) Royer HD, Acuto O, Fabbi M, Tozard R, Ramachandraw K, Swart JE and Reinherz EL: Genes encoding the T β subunit of the antigen/MHC receptor undergo rearrangement during intrathymic ontogeny prior to surface T3-Ti expression. *Cell* 39: 261-266, 1984
- 39) 中村直哉, 瀬上秀雄, 阿部正文, 若狭治毅, 川口隆憲: Ki-1 陽性を示した ATLA(+)T-cell lymphoma の 1 例. *日網会誌* 27: 175-180, 1987
- 40) Smith LJ, Curtis JE, Messner HA, Senn JS, Furthmayr H and McCulloch EA: Lineage infidelity in acute leukemia. *Blood* 61: 1138-1145, 1983
- 41) Greaves MF: "Target cells", cellular phenotypes, and lineage fidelity in human leukemia. *J. Cell. Physiol* 113-125, 1982
- 42) 和知栄子: Hodgkin 病の免疫組織学的及び免疫電子顕微鏡的研究. 特に Reed-Sternberg 細胞について. *日網会誌* 27: 143-157, 1987
- 43) Stein H, Gerdes J, Lenke H and Mason DY: Evidence of Sternberg-Reed cells being derived from activated lymphocytes. *Haematology and blood transfusion* 29: 441-445, 1985
- 44) Wachi E, Nakamura N, Abe M and Wakasa H: The immunohistochemical and immuno-electron microscopic study. B1-positive Reed-Sternberg cells. *Arch Pathol Lab Med* (submitted)
- 45) Nadler LM, Anderson KC, Marti G, et al: B4, a human B lymphocyte-associated antigen expressed on normal, mitogen-activated, and malignant B lymphocytes. *J. Immunol.* 131: 244, 1983
- 46) 大川洋二, 野々山恵章, 水口淳一, 高瀬浩造, 高木秀二, 稲田誠, 矢田純一, 河敬也: 分化抗原による白血病細胞の分類と分化抗原の抗原特異性の検討. *臨血* 28: 1-8, 1987

- 47) Leucocyte Typing (eds., Bernard A, Bousmell L, Dausset J, Milstein C and Schlossman SF), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1984
- 48) Leucocyte Typing II (eds., Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM and Bernstein ID), Springer-Verlag, New-York, 1986
- 49) Leucocyte Typing III (eds. McMichael A et al), Oxford University Press, Oxford, 1987
- 50) Greaves MF, Brown G, Repson NT and Lister TA: Antisera to acute lymphoblastic leukemia cells. Clin Immunol Immunopathol 14:67-84, 1975
- 51) Ritz J, Pesando LM, Notis-McConarty J et al: A monoclonal antibody to human acute lymphoblastic leukemia antigen. Nature 283:583, 1980
- 52) 石本浩市, 藤本純一郎, 秦順一: 新たに確立された Common ALL 抗原に対するモノクローナル抗体の解析. 日血会誌51: 885-892, 1988
- 53) Terhost C, van Agthoven A, Leclair K, Snow P, Reinherz EL and Schlossman SF: Biochemical studies of human thymocyte cell surface antigens T6, T9 and T10. Cell 23:771, 1981
- 54) Ueda R, Tanimoto M, Takahashi T, Ogata S, Nisida K, Namikawa R, Nishizuka Y, Ota K: Serological analysis of cell surface antigen of null cell acute lymphocyte leukemia by mouse monoclonal antibodies. Proc Natl Acad Sci USA 79:4386-4390, 1982
- 55) Kennet RH and Gilbert F: Hybrid myelomas producing antibodies against a human neuroblastoma antigen present on fetal brain. Science, 203:1120, 1979
- 56) Greaves MF, Verbi W and Kennet R: A monoclonal antibody identifying a cell surface antigen shared by common acute lymphoblastic leukemias and B lineage cells. Blood 56:1141, 1980
- 57) 森泰二郎: Pre-B細胞性白血病細胞株による抗 common ALL 抗原抗 Ia 様抗原モノクローナル抗体の作製. 日小児会誌89: 2501-2512, 1985