原 著 I

非ホジキンリンパ腫における細胞接着分子の検討

山口 佳子

福島県立医科大学病理学第一講座

(平成6年2月18日受付)
(平成6年5月13日受理)

The expression of cell adhesion molecules in non-Hodgkin's lymphomas

Yoshiko Yamaguchi

The First Department of Pathology, Fukushima Medical College

The expression of adhesion molecules of lymphoma cells were studied using immuno-histochemical and flow-cytometrical techniques on 187 cases with non-Hodgkin's lymphomas (NHL) of B and T cell origin. Cell adhesion molecules used in the study were as follows; LFA-1 (CD11a/18), ICAM-1 (CD54), CD44, LFA-3 (CD58), Leu8 and VLA-4 (CDw49d). The LFA-1 was more highly expressed in T cell lymphomas (44/53; 84%) than B cell lymphomas, (50/134; 37%). The expression of ICAM-1 was observed in 75 of 134 cases (56%) of B cell lymphomas and in 18 of 53 cases (34%) of T cell lymphomas. CD44 was highly expressed in both B (109/134; 81%) and T cell lymphomas (43/53; 83%). Based on bone marrow examination of 90 cases with B cell lymphomas, bone marrow involvement was observed in 4 of 6 cases (67%) with LFA-1 and without ICAM-1, in 11 of 21 cases (52%) with ICAM-1 and without LFA-1 and in 20 of 34 cases (59%) without ICAM-1 and LFA-1. On the other hand, only 4 of 29 cases (14%) with ICAM-1 and LFA-1 showed bone marrow involvement, which is markedly lower than above groups ($p < 0.05$). These results suggest that cell adhesion molecules might have a close relation to the extension of non-Hodgkin's lymphomas.

Key words: cell adhesion molecules, LFA-1, ICAM-1, non-Hodgkin's lymphomas, bone marrow involvement

は じ め に

近年, 細胞接着分子を介した細胞-細胞間, 細胞-

細胞外マトリックス蛋白における接着機構と機能発現が明らかとなり, 腫瘍, 炎症, 移植など多方面において細胞接着分子に関する研究が行われてい

る¹⁾。造血組織における細胞接着分子は、血液細胞の分化、リンパ球のリンパ組織へのホーミング²⁾、あるいは白血球の炎症部位への遊走に重要な役割を果たしている。

これら細胞接着分子のなかで leukocyte function-associated antigen(LFA)-1(CD11a/CD18)は、 α 鎖と β 鎖からなるヘテロダイマーでキラーT細胞の標的細胞に対するレセプターとして報告され、白血球のほぼすべてに発現している³⁾⁴⁾。一方、Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1(CD54)はLFA-1のリガンドのひとつで、リンパ球、単球、血管内皮細胞、線維芽細胞などに発現している^{5)~7)}。CD44はヒアルロン酸のレセプターとして知られるほか、リンパ球のホーミングレセプターとしても報告されている⁸⁾⁹⁾。LFA-3(CD58)はCD2のリガンドで、上皮細胞、結合組織、赤血球など広範囲に存在し、胸腺におけるT細胞分化に重要な役割を果たしていることが知られている¹⁰⁾。Leu8(LAM-1)はリンパ球上に存在する90kDaの糖蛋白で、リンパ節内の高内皮小静脈(HEV)を認識することからホーミングレセプターと考えられている¹¹⁾。さらに、Very late antigen(VLA)-4(CDw49d)はリンパ球、単球に発現し、リガンドとしてはFibronectin、活性化血管内皮細胞などにおけるVCAM-1が知られている¹²⁾。

LFA-1とICAM-1は白血球の血管内皮細胞への結合や、リンパ球の抗原特異的な細胞間相互作用などに¹³⁾、CD44、Leu8はリンパ球のホーミングに重要な役割を果たしていることが知られている。細胞接着分子は造血器腫瘍の転移と進展に関しても重要な因子と考えられ、非ホジキンリンパ腫の浸潤、転移あるいは白血化にも密接に関連するとみなされている¹⁴⁾¹⁵⁾。しかし、これら非ホジキンリンパ腫の白血化や骨髄浸潤における細胞接着分子の役割は、いまだ十分に明らかにされているとは云えない。そこで、著者はホジキンリンパ腫187例を用いて、リンパ腫細胞における細胞接着分子(LFA-1 α , LFA-1 β , ICAM-1, CD44, LFA-3, Leu8, VLA-4)の発現を免疫組織化学的染色並びにフローサイトメトリーで検索した。さらに、非ホジキンリンパ腫細胞の白血化や骨髄浸潤につき、細胞形態や組織型および細胞接着分子発現との関連を検討したのでこれについても報告する。

材料と方法

1. 材料

表1 検索症例

非ホジキンリンパ腫	187例
Bリンパ腫	134例
濾胞性リンパ腫	
中細胞型	9例
混合型	14例
大細胞型	8例
びまん性リンパ腫	
小細胞型	4例
中細胞型	27例
混合型	10例
大細胞型	53例
バーキット型	9例
Tリンパ腫	53例
中細胞型	4例
混合型	9例
大細胞型	14例
多形細胞型	6例
リンパ芽球型	13例
ATLL	7例

対象は、非ホジキンリンパ腫187例である(表1)。症例の内訳は濾胞性リンパ腫31例、びまん性Bリンパ腫103例、Tリンパ腫53例で、組織型はLSG分類¹⁶⁾に基づいて分類した。Tリンパ腫のうち、Adult T cell leukemia/ lymphoma(以下ATLL)はHTLV-I抗体陽性のものに限った。なお、バーキット型以外の症例は、すべて節性のものとした。

2. 方法

1) 臨床的事項

各症例の白血化、骨髄浸潤、肝・脾腫の有無および臨床病期を調査した。

白血化は、末梢血中に4000/ μ l以上のリンパ球が存在するか、あるいは5%以上の異型リンパ球が存在するもの¹⁷⁾とした。また、臨床病期はAnn Arbor分類¹⁸⁾に従って分類した。

2) 免疫組織化学的検討

新鮮生検材料は5mm立方程度に細切した後periodate-lysine-paraformaldehyde(以下PLP)固定し、OCTコンパウンドにて包埋後-80℃にて凍結保存した。使用時クリオスタットにて4 μ の凍結切片を作成し、Strept avidin-biotin complex(以下Strept ABC法)を用いて免疫染色を行った。すなわ

ち、一次抗体を4℃で一晩反応させた後、ビオチン化二次抗体、ついでStrept AB complexをそれぞれ37℃、30分間反応させた。各反応後切片はPBSで十分に洗浄された。発色はDAB溶液を用いた。発色後、メチルグリーンで核染色し検鏡した。免疫染色に用いた一次抗体は表2に示した。

腫瘍細胞における各細胞接着分子の発現を判定するため連続切片を作成し、Bリンパ腫では抗CD20(B1)抗体を、Tリンパ腫では抗CD3(Leu4)抗体を染色した。

2) フローサイトメトリー

生検リンパ節組織を細切後、ステンレスメッシュ上で擦りつぶして作製した単離細胞を、15% Dimethyl Sulfoxide 加胎子牛血清 (以下FCS) に浮遊し、液体窒素中で凍結保存した。使用時には、急速に解凍した後、10% FCS加RPMI1640培地にて2回洗浄した。この単離細胞を10%ヒトA B型血清加RPMI1640培地にて 1×10^7 /mlに調整した。この細胞浮遊液100 μ lに一次抗体を加え、4℃、30分間反応させた。その後、10% FCS加RPMI1640にて洗浄し、50倍希釈したFITC標識F(ab')₂分画ヤギ抗マウスIgG(TAGO, Inc. BURLINGAME, CA, USA)を加え4℃、30分間反応させた。10%正常マウス血清(CAPPEL, Organon Teknika Corp. West Chester PA)を加え4℃で15分反応させた後、B細胞、T細胞を認識するPE標識の各種単クローン抗体で4℃、30分間反応させた。各反応の間は十分に洗浄された。なお、コントロールとして、バーキットリンパ腫細胞株(HBL-5)を用いた。解析は、FACScan (Beckton Dickinson, USA)を用いた。

3) 統計学的処理

X²検定により有意差検定を行った。

結 果

1. 非ホジキンリンパ腫の白血化と骨髄浸潤 (図1)

1) Bリンパ腫

Bリンパ腫では134例中38例(28%)に白血化を認めた。濾胞性リンパ腫中細胞型(7例中3例; 43%), びまん性リンパ腫小細胞型(6例中5例; 83%), びまん性リンパ腫中細胞型(36例中18例; 50%)は比較的高率に白血化を示した。濾胞性リンパ腫大細胞型、バーキット型では白血化を認めなかった。濾胞性リンパ腫混合型(14例中2例; 14%), びまん性リンパ腫混合型(9例中1例; 13%), びまん性リンパ

表2 検索に用いた抗体

細胞接着分子関連		
抗 LFA-1 α	(CD11a)	BECTON DICKINSON
抗 LFA-1 β	(CD18)	BECTON DICKINSON
抗 ICAM-1	(CD54)	BECTON DICKINSON
抗 Leu44	(CD44)	BECTON DICKINSON
抗 LFA-3	(CD58)	IMMUNOTECH S. A.
抗 Leu8		BECTON DICKINSON
抗 VLA-4	(CDw49d)	IMMUNOTECH S. A.
B細胞関連		
抗 B 1	(CD20)	COULTER
抗 L26	(CD20)	DAKOPATTS
抗 B 4	(CD19)	COULTER
T細胞関連		
抗 Leu-1	(CD5)	BECTON DICKINSON
抗 Leu-2a	(CD8)	BECTON DICKINSON
抗 Leu-3a	(CD4)	BECTON DICKINSON
抗 Leu-4	(CD3)	BECTON DICKINSON
その他		
IgG		BEKTON DICKINSON
IgM		BEKTON DICKINSON
IgD		BEKTON DICKINSON
κ		BEKTON DICKINSON
λ		BEKTON DICKINSON
CALLA	(CD10)	BEKTON DICKINSON
DRC-1		DAKOPATTS
Ki-1	(CD30)	DAKOPATTS

腫大細胞型(49例中9例; 18%)では白血化の頻度が低かった。

骨髄浸潤は100例中42例(42%)に認められた。濾胞性リンパ腫中細胞型(9例中4例; 44%), 濾胞性リンパ腫混合型(9例中5例; 56%), びまん性リンパ腫小細胞型(4例中4例; 100%), びまん性リンパ腫中細胞型(23例中15例; 65%), およびバーキット型(5例中4例; 80%)は比較的高率に骨髄浸潤を示した(図5 a b c)。濾胞性リンパ腫大細胞型(5例中0例; 0%), びまん性リンパ腫混合型(4例中0例; 0%), びまん性リンパ腫大細胞型(41例中10例; 24%)では骨髄浸潤の頻度が低かった。胸水、腹水に異常細胞が認められたのは検索し得た34例中15例(44%)であった。肝腫は50例中28例(56%), 脾腫は19例中12例(63%)に認められた。

2) Tリンパ腫

図1 非ホジキンリンパ腫の進展と組織型 —白血化および骨髄浸潤—

Tリンパ腫では、49例中30例（61％）に白血化が認められた。びまん性リンパ腫リンパ芽球型（12例中12例；100％）、ATLL（6例中6例；100％）では全ての症例に白血化が認められた。びまん性リンパ腫混合型は8例中4例（50％）、びまん性リンパ腫大細胞型は13例中5例（38％）、びまん性リンパ腫中細胞型は4例中1例（25％）、およびびまん性多形細胞型は6例中2例（33％）にそれぞれ白血化が認められた。

骨髄浸潤は、39例中22例（56％）に認められた。びまん性リンパ腫リンパ芽球型（9例中8例；89％）は骨髄浸潤の頻度が高かった。ATLLは一般に骨髄浸潤が少ないとされるが、5例中4例（80％）に骨髄浸潤を示した。びまん性リンパ腫大細胞型は11例中6例（55％）、びまん性リンパ腫中細胞型は4例中2例（50％）、およびびまん性リンパ腫混合型は6例中2例（33％）にそれぞれ骨髄浸潤が認められた。びまん性リンパ腫多形細胞型は骨髄浸潤を示さなか

図2 各組織型における LFA-1 陽性率

った。胸水、腹水に異常細胞が認められたのは検索し得た18例中10例 (56%) であった。肝腫は19例中12例 (63%), 脾腫は18例中13例 (72%) に認められた。

2. 免疫組織化学的検索

1) 正常ヒト扁桃組織における細胞接着分子の発現

LFA-1; 濾胞間領域のT細胞および胚中心のB細胞に発現していたが、マントル層のB細胞ではその発現は非常に弱かった。

ICAM-1; 胚中心のB細胞、血管内皮細胞および濾胞内樹状細胞に強く発現していたが、マントル層のB細胞ではその発現が非常に弱かった。

CD44; マントル層のB細胞、濾胞間領域のT細胞に発現していたが、胚中心の細胞ではその発現は非常に弱かった。

LFA-3; 胚中心細胞の胞体内に非常に弱い発現を示した。

Leu8; マントル層のB細胞に非常に弱い発現を示した。

2) 非ホジキンリンパ腫における細胞接着分子の発現 (図6, 7)

凍結切片における各細胞接着分子の発現は以下のように示された。

LFA-1 (図2); Tリンパ腫のLFA-1の発現率は、53例中44例 (83%) と高率であり、各組織型で

大きな差はみられなかった。一方Bリンパ腫では、134例中50例 (37%) とTリンパ腫に比して著しく低率であった。Bリンパ腫の組織型別では、とくにびまん性リンパ腫中細胞型 (27例中3例; 11%) とバーキット型 (9例中1例; 11%) でその発現が低率であった。なお、全症例を通じて、LFA-1 α 鎖と β 鎖の発現率に差はほとんど認められなかったが、LFA-1 β 鎖の発現が弱い傾向を示した。

ICAM-1 (図3); Bリンパ腫では134例中75例 (56%) に、Tリンパ腫では53例中18例 (34%) にそれぞれ陽性を示した。組織型別ではBリンパ腫のびまん性リンパ腫中細胞型 (27例中8例; 30%) とバーキット型 (9例中2例; 22%), Tリンパ腫のびまん性リンパ腫リンパ芽球型 (13例中1例; 8%) でICAM-1の発現率が低かった。

CD44 (図4); Bリンパ腫134例中109例 (81%), Tリンパ腫53例中44例 (83%) と高率にCD44を発現していたが、バーキット型では9例中3例 (33%) で、CD44の発現は低率であった。

なお、各組織型における各接着分子の陽性群と陰性群との間で、他の抗体 (表2) の発現に差異はなかった。

LFA-3, Leu8; LFA-3およびLeu8の発現はBリンパ腫、Tリンパ腫ともに極めて弱く、発現の頻度も低かった。

3. フローサイトメトリー (表3, 図8)

図3 各組織型における ICAM-1 陽性率

凍結切片上では、とくに小、中細胞型リンパ腫において、リンパ腫細胞と非腫瘍性リンパ球との鑑別がしばしば困難であった。そのため、著者は症例の一部をフローサイトメトリーで検討し、凍結切片上での判定と比較した。

まず、凍結切片で LFA-1 α 陽性と評価されていた症例 (症例 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14) は、フローサイトメトリーでの陽性細胞が 39% から 100% 存在し、陰性と評価されていた症例 (症例 3, 10, 11) においても陽性細胞が 11% から 21% 存在していた。同様に、ICAM-1 陽性と評価されていた症例 (症例 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 13) の陽性細胞は 66% から 100% 存在し、陰性と評価されていた症例 (症例 10, 11, 12, 14) においても陽性細胞が 3% から 17% 存在していた。さらに、CD44 陽性と評価されていた症例 (症例 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12) の陽性細胞は 43% から 100% 存在し、陰性と評価されていた症例 (症例 10, 11, 13, 14) の陽性細胞は 5% から 39% 存在していた。一方、LFA-3 では、症例 6 以外は凍結切片で陰性と評価されていたが、フローサイトメトリーで 80% 以上の陽性細胞が存在する症例が見られた (症例 5, 9)。LFA-3 の陽性率はバーキット型の 2 例とびまん性リンパ腫大細胞型の 1 例で非常に低かった (症例 8, 10, 11)。Leu8 は、凍結切片では症例 2 から症例 14 のすべてが陰性と評価されていたが、フローサイト

メトリーで 50% 以上の陽性細胞が存在する症例が見られた (症例 4, 5)。

免疫組織化学的染色法とフローサイトメトリーで求めたそれぞれの細胞接着分子の発現の評価を比較すると、LFA-1, ICAM-1, CD44 の各細胞接着分子発現の評価は免疫組織化学的染色でも可能であると判断された。しかし、LFA-3, Leu8 発現の評価は免疫組織化学的染色法では困難なことが少なくなく、フローサイトメトリーを用いた検索の併用が必要であると考えられた。なお、今回用いられた VLA-4 抗体は凍結切片に未反応のため、フローサイトメトリーのみでの検索を行った。

VLA-4 は濾胞性リンパ腫の一部 (症例 4, 5, 6, 7) に比較的高い陽性率を示した。

4. 非ホジキンリンパ腫の進展と細胞接着分子発現との関連について

1) B リンパ腫 (図 9)

ICAM-1 陰性例が ICAM-1 陽性例に比べて、白血化や骨髄浸潤を起こしやすい傾向を示し ($P < 0.05$)、同様に LFA-1 陰性例は、LFA-1 陽性例に比べ、白血化 ($P < 0.20$) や骨髄浸潤 ($P < 0.05$) を起こしやすい。LFA-1 と ICAM-1 の両細胞接着分子の発現と白血化ないし骨髄浸潤を検索すると、LFA-1 と ICAM-1 の両者が陰性、あるいはいずれか一方が陰性の症例は、両細胞接着分子が陽性のものに比較して高頻度に白血化と骨髄浸潤を示した。

図4 各組織型におけるCD44陽性率

LFA-1 陰性, ICAM-1 陽性例で白血化を示した群を除くと ($P < 0.20$), LFA-1 と ICAM-1 の両者あるいは ICAM-1 が陰性の群と両接着分子が陽性の群とは統計学的に有意であった ($P < 0.05$)。さらに, CD44 陽性例では, 若干白血化と骨髄浸潤を起こしやすい傾向が認められたが, 統計学的に有意差は得られなかった。LFA-1 陰性例では, 肝腫, 脾腫はそれぞれ28例中19例 (68%), 29例中21例 (72%) に認められ, LFA-1 陽性例では肝腫, 脾腫ともに14例中6例 (43%) に認めた。ICAM-1 陰性例では, 肝腫, 脾腫はそれぞれ21例中13例 (62%), 21例中14例 (67%) に認められ, ICAM-1 陽性例ではそれぞれ21例中12例 (57%), 22例中13例に認めた。LFA-1, ICAM-1 いずれも陰性例に多い傾向を認めたが, 有意差は得られなかった。

Leu8 および LFA-3 は B, T リンパ腫ともに発現率が低く, 進展との関連ははっきりしなかった。VLA-4 はフローサイトメトリーで13例の検索を行った。骨髄浸潤あるいは白血化を示した症例の VLA-4 陽性率の平均はそれぞれ48%と60%で, 骨髄浸潤あるいは白血化を示さなかった症例の場合はそれぞれ47%と46%であった。

2) T リンパ腫 (表4)

T リンパ腫では, ほとんどの症例で LFA-1 の発現を認めた。とくに LFA-1 陽性例は高頻度に白血化, 骨髄浸潤を起こした。また, ICAM-1 陰性例は

陽性例に比較して骨髄浸潤を起こしやすい傾向を示したが ($P < 0.05$), 白血化では有意差はなかった。LFA-1, ICAM-1 の両者あるいは一方が陰性の症例と, LFA-1, ICAM-1 の両者が陽性の症例とを比較すると, 白血化, 骨髄浸潤の頻度にはほとんど差をみなかった。胸水, 腹水への異常細胞の出現, 肝・脾腫の頻度と接着分子との関連は明らかでなかった。

考 察

著者は非ホジキンリンパ腫の各組織型における細胞接着分子の発現を, 免疫組織化学的に, 一部はフローサイトメトリーによって検索した。とくに, リンパ腫の各組織型における細胞接着分子の発現と白血化, 骨髄浸潤との関連について考察する。

1. 非ホジキンリンパ腫の組織型と白血化又は骨髄浸潤について

Mckenna らは, B リンパ腫の骨髄浸潤は濾胞性リンパ腫中細胞型 (39例中21例; 54%) に多く, びまん性リンパ腫中細胞型 (78例中28例; 36%), びまん性リンパ腫大細胞型 (30例中4例; 13%) では比較的少ない¹⁹⁾と報告した。さらに Carol ら²⁰⁾は濾胞性リンパ腫の骨髄浸潤は, 中細胞型で50%以上, 混合型では30~50%にみられたと報告した。著者の検索結果でも濾胞性リンパ腫中細胞型では44%, 濾胞性リンパ腫混合型では56%に骨髄浸潤が認められた

表3 フローサイトメトリーにおける各抗体の陽性率(%)

症例番号	LFA-1 α	ICAM-1	CD44	LFA-3	Leu8	VLA-4
1 扁桃B細胞	87	51	72	39	16	36
Bリンパ腫						
2 濾胞性リンパ腫中細胞型	60	89	43	41	11	87
3 濾胞性リンパ腫混合型	21	70	100	17	11	41
4 濾胞性リンパ腫混合型	82	90	100	45	53	73
5 濾胞性リンパ腫混合型	39	92	100	91	53	96
6 濾胞性リンパ腫大細胞型	100	81	100	98	29	57
7 濾胞性リンパ腫大細胞型	95	93	99	13	14	75
8 びまん性リンパ腫大細胞型	100	100	83	1	6	12
9 びまん性リンパ腫大細胞型	81	67	76	80	12	71
10 びまん性リンパ腫パーキット型	18	3	7	2	1	36
11 びまん性リンパ腫パーキット型	11	17	5	1	1	15
Tリンパ腫						
12 びまん性リンパ腫リンパ芽球型	97	6	87	8	15	48
13 びまん性リンパ腫大細胞型	99	66	39	54	23	55
14 びまん性リンパ腫大細胞型	100	6	37	11	12	56

—は凍結切片で陽性と判定された症例

表4 Tリンパ腫における骨髓浸潤、白血化と細胞接着分子の発現

	骨髓浸潤		白血化	
	BM(+)No./test	No.(%)	LC(+)No./test	No.(%)
LFA-1(CD11a/18)				
(+)	17/27	(63)	25/41	(61)
(-)	2/7	(29)	4/6	(67)
ICAM-1(CD54)				
(+)	4/12	(33)	7/14	(50)
(-)	15/22	(68)	22/33	(67)
CD44				
(+)	16/29	(55)	26/40	(65)
(-)	3/5	(60)	3/7	(43)

+；大部分のリンパ腫細胞に陽性か弱陽性 -；大部分のリンパ腫細胞に陰性。
BM(+)No./test No.；骨髓浸潤のみられた症例数/骨髓浸潤の有無を検索された症例数
LC(+)No./test No.；白血化のみられた症例数/白血化の有無を検索された症例数

ことから、濾胞性リンパ腫の骨髓浸潤は比較的高率にみられ、MckennaらおよびCarolらの報告とはほぼ一致している。さらに、Bリンパ腫の白血化、骨髓浸潤の頻度を細胞の大きさでみると、濾胞性リンパ腫、びまん性リンパ腫ともに細胞が小型のものほど（小細胞型および中細胞型）白血化、骨髓浸潤が

起こりやすい傾向を示した（ $p < 0.05$ ）。非ホジキンリンパ腫のWorking formulationの悪性度分類²¹⁾では、濾胞性リンパ腫中細胞型、混合型および、びまん性リンパ腫小細胞型はLow grade malignancyに、びまん性リンパ腫中細胞型はIntermediate grade malignancyにそれぞれ分類される

図5 a

図5 b

図5 c

図5 濾胞性リンパ腫中細胞型

(a)リンパ節：腫瘍細胞は濾胞様構造を形成し増殖する。(HE, x30)

(b)骨髄：リンパ腫細胞のびまん性浸潤を認める。(HE, x155)

(c)骨髄：リンパ腫細胞はL26に陽性を示す。(L26, ABC法, x155)

図6 びまん性リンパ腫中細胞型 (B細胞型)

- (a) 中型の腫瘍細胞がびまん性に増殖し、腫瘍細胞は類円形ないしくびれた核を有し、胞体に乏しい。(HE, x410)
- (b) 腫瘍細胞は LFA-1 α に陰性である。(抗 LFA-1 α , ABC 法, x310)
- (c) 腫瘍細胞は ICAM-1 に陰性である。(抗 ICAM-1, ABC 法, x310)
- (d) 腫瘍細胞は CD44 に陽性である。(抗 CD 44, ABC 法, x310)

が、いずれの組織型も比較的高率に骨髄浸潤を示した。一方、びまん性リンパ腫大細胞型は Intermediate ~ High grade malignancy に分類されるが、白血化、骨髄浸潤は比較的少なかった。このことは、Bリンパ腫における白血化と骨髄浸潤は、必ずしも細胞学的な悪性度とは関係しないことを示している。

Tリンパ腫はBリンパ腫よりも高頻度に白血化 ($p < 0.05$)、骨髄浸潤、肝・脾腫を示し、さらに胸

水、腹水への異常細胞の出現も高頻度であった。白血化、骨髄浸潤は、リンパ芽球型と ATLL に高率であった。その他の細胞型においても比較的高率に白血化と骨髄浸潤がみられたが、細胞の大きさとの関係は必ずしも明らかではなかった。

2. 非ホジキンリンパ腫における細胞接着分子の発現について

1) Bリンパ腫

Bリンパ腫はBリンパ球の分化、成熟の各段階か

図7 びまん性リンパ腫大細胞型 (B細胞型)

- (a)大型の腫瘍細胞はびまん性に増殖している。(HE, x410)
- (b)腫瘍細胞は LFA-1 α に陽性である。(抗 LFA-1 α , ABC 法, x410)
- (c)腫瘍細胞は ICAM-1 に陽性である。(抗 ICAM-1, ABC 法, x410)
- (d)腫瘍細胞は CD44 に陰性である。(抗 CD44, ABC 法, x410)

ら発生するとされ, pre-follicle center cell 由来 (mantle 層リンパ球由来), follicle center cell 由来 (胚中心細胞由来), post-follicle center cell 由来に大別される²²⁾。Stauder ら¹⁷⁾は非ホジキンリンパ腫のなかで follicle center cell 由来のリンパ腫は LFA-1 と ICAM-1 に陽性を示すことが多いとされる。著者の検索でも胚中心由来と考えられている濾胞性リンパ腫, びまん性リンパ腫混合型, びまん性リンパ腫大細胞型は, 比較的高率に LFA-1, ICAM-1 を発現していた。一般に, リンパ性白血病では B

細胞の分化段階における LFA-1, ICAM-1 の発現に差異があるとされる¹³⁾²³⁾。B リンパ腫においても, びまん性リンパ腫中細胞型の多くはマントル層リンパ球由来とされ²²⁾, LFA-1, ICAM-1 の発現の頻度は低かった。このことは, びまん性中細胞型リンパ腫細胞が濾胞胚中心細胞由来とは異なり, マントル層リンパ球の性状を反映しており, 同部からの組織発生を支持すると考えられた。CD44 は胚中心細胞に発現の弱い傾向があったが, リンパ腫ではバーキット型以外の組織型で高頻度の発現を認めた。バー

図8 濾胞性リンパ腫混合型(症例3)でのフローサイトメトリー: FITC 標識の各細胞接着分子に対する抗体と PE 標識した抗 CD20 抗体による two color analysis (CD20⁺. LFA-1⁺: 21%. CD20⁺. ICAM-1⁺: 70%. CD20⁺. CD44⁺: 100%. CD20⁺. LFA-3⁺: 17%. CD20⁺. Leu8⁺: 11%. CD20⁺. VLA-4⁺: 41%.)

キット型リンパ腫の発生母地については, early B 段階とする考えが一般的であるが, 結論は得られていない²²⁾. 今回の検索では各細胞接着分子の発現は

極めて低率であり他の報告^{24)~26)}においても同様の結果が得られている。細胞接着分子の発現の低さはバーキットリンパ腫の一つの特徴とも考えられる。

図9 Bリンパ腫の進展と接着分子の発現

細胞接着分子の発現状態からみると, early B段階由来が支持されるが, パーキット型リンパ腫の c-myc 遺伝子発現が, LFA-1 分子の down regulation に関与するとの報告²⁵⁾もあり興味ある点である。

2) Tリンパ腫

Inghiami らはTリンパ腫の29例の全てに LFA-1 の発現をみたと報告しており²⁷⁾, 他の報告例でも Bリンパ腫に比較してTリンパ腫は LFA-1 を高率に発現している²⁸⁾。Tリンパ腫に LFA-1 の発現率が高いのは, 元来T細胞がB細胞よりも LFA-1 発現の強度が高いためと考えられている²⁹⁾。一方, Tリンパ腫における ICAM-1 の発現に関する報告は少なく, Michele らの検索したリンパ芽球型の3例は全て陰性³⁰⁾で, 他の報告¹⁷⁾においてもBリンパ腫に比較してTリンパ腫における発現は低率とされている。著者の検索ではBリンパ腫の陽性例が56%であったのに対し, Tリンパ腫は34%であった。このことは, 正常リンパ組織のTリンパ球が ICAM-1 をほとんど発現していないことを反映しているためと考えられた。各組織型間の細胞接着分子の発現の頻度は類似しており, それらの間で大きな差はみられなかった。

3. 非ホジキンリンパ腫の進展と接着分子発現について

ヒトリンパ球の膜表面には LFA-1 とそのリガンドである ICAM-1 および ICAM-2, CD2 と, そのリガンドである LFA-3, そして CD44, Leu8, VLA-

4 など多数の細胞接着分子が知られるようになった。これらの細胞接着分子を介したリンパ球同志, またはリンパ球-間質細胞, リンパ球-血管内皮細胞, およびリンパ球-細胞外基質などの細胞間相互作用がリンパ球の分化, 増殖や活性化, 組織分布さらには腫瘍の進展などに関与している³¹⁾と考えられている。

LFA-1 と ICAM-1 発現の頻度とリンパ腫の進展との関連についての報告は現在まで必ずしも多いものではない。LFA-1 は低悪性度群のリンパ腫に比して, 高悪性度群で発現が低頻度ないし低率であるとされているが¹⁷⁾²⁹⁾, リンパ腫の進展との関連は示されていない。これに対し, ICAM-1 の陰性例で白血化あるいは骨髄浸潤が有意に高いとする報告はあるが¹⁷⁾³²⁾, LFA-1 と ICAM-1 の両者を検討した報告例はまだみられていない。著者の検索では, Bリンパ腫の骨髄浸潤は ICAM-1 陽性例に比べて陰性例に多く, また LFA-1 陽性例より陰性例に多い傾向がみられた ($P < 0.05$)。白血化は ICAM-1 陰性例に高頻度で ($P < 0.05$), LFA-1 陰性例においてもその傾向がみられたが, 統計学的に有意の差は得られなかった ($P < 0.20$)。LFA-1 と ICAM-1 の発現をみると, LFA-1 と ICAM-1 の両者が陰性およびどちらか一方が陰性の症例は, 両者が陽性の症例に比して, 高率に骨髄浸潤を認め ($P < 0.05$), 白血化傾向も同様であった ($P < 0.20$)。Wawryk ら³³⁾は, LFA-1 と ICAM-1 両者の発現した腫瘍細胞株では細胞

が凝集して増殖するが、その凝集傾向は抗 LFA-1 抗体あるいは抗 ICAM-1 抗体によって阻害されることを示し、LFA-1 および ICAM-1 分子が腫瘍細胞間の結合に関係していることを明らかにした。つまり、LFA-1 と ICAM-1 両者の発現はリンパ腫細胞間の結合を増していることになる。逆に、LFA-1 と ICAM-1 の両者あるいはどちらか一方の発現低下または消失は、リンパ腫細胞間の結合が起こりにくい状態と推測される。なお、ある種の上皮性腫瘍においては、腫瘍細胞どうしの結合にかかわる細胞接着分子の発現低下が、腫瘍細胞の原発巣からの遊離に関与するひとつの因子と考えられている。E-カドヘリンはカルシウムイオンに依存して働く細胞間の接着分子として同定されたが³⁴⁾、Frixen らは E-カドヘリンの発現能を失ったヒトの膀胱癌、乳癌などに由来する癌細胞は強い侵襲性を示すことを報告した³⁵⁾。B リンパ腫においても腫瘍細胞間の接着分子の発現の低下ないし消失する所見は、B リンパ腫細胞のより広汎な進展に関与しているものと推測される。

さらに、B リンパ腫の病巣内では腫瘍細胞間のみならず、腫瘍細胞と間質細胞、細胞外基質蛋白および種々の程度に残存する正常リンパ球との接着もリンパ腫細胞の組織への定着に関与していると考えられる。リンパ腫の病巣内に残存する正常の T リンパ球は LFA-1 分子を発現しており、B リンパ腫細胞における ICAM-1 分子の発現が低下ないし消失すると、正常 T リンパ球との結合も低下すると推測される。このことはリンパ節の病巣内に限れば、リンパ腫細胞の遊離化に関与していると推測された。一方、リンパ腫細胞と間質細胞、細胞外基質蛋白との関連についての検索は十分ではなく今後の課題として残された。

CD44 抗原はホーミングレセプターのほか、細胞外基質のヒアルロン酸に対するレセプターとしても知られ³⁶⁾、各種腫瘍における CD44 とその転移能との関連が研究されている。Horst らは CD44 の発現したリンパ腫例は広範な臓器浸潤を示したと報告した³⁷⁾³⁸⁾が、Jalkanen らは CD44 抗原の発現の有無のみならず、腫瘍細胞の増殖能をも検討することによってその進展に有意差が得られる³⁹⁾としている。著者の検索では CD44 抗原の発現した B リンパ腫では、白血化と骨髄浸潤がともに若干高率であったが、有意差は認められなかった。一方、バーキット型の多くの例では CD44 の発現はなく、広汎な浸潤を示

すバーキット型の生物学的性状とは一致しなかった。バーキット型における細胞接着分子の発現についてはいくつかの報告があり^{24)~26)}、LFA-1、ICAM-1、LFA-3 の発現低下による cytotoxic T cell への感受性低下や腫瘍細胞間結合能の低下が指摘されている。また、CD44 においても発現消失ないし低下することにより免疫応答を受けにくい環境となるとされている⁴⁰⁾。このため、バーキット型の広汎な浸潤は、増殖力が他の組織型に比較して高いこと⁴¹⁾に加え、各細胞接着分子の発現低下も関与していることが示唆される。LFA-3 については Marc Billaud らによりバーキット型における発現低下が報告された。フローサイトメトリーによる著者の検索では、LFA-3 の発現低下はバーキット型の 2 例のほか、濾胞性リンパ腫大細胞型の 1 例とびまん性リンパ腫大細胞型の 1 例にみられた。Leu8 は、ホーミングレセプターと考えられ、リンパ球の活性化刺激によって Leu8 の喪失をきたす¹¹⁾とされている。著者の検索では、LFA-3 および Leu8 の発現とリンパ腫の進展との関連は見出されなかった。

VLA-4 は Fibronectin、活性化血管内皮細胞などにおける VCAM-1 をリガンドとしている¹²⁾。Freedman らは胚中心の B 細胞に VLA-4 の発現がみられ、胚中心細胞との結合は濾胞内樹状細胞上に発現されている VCAM-1 による⁴²⁾とし、濾胞性リンパ腫の増殖様式に VLA-4/VCAM-1 の接着機構が関与している可能性を示唆している。また、Miyake らは、preB 細胞の分化には骨髄間質に接着することが必要であり、その接着は VLA-4 を介して行われる⁴³⁾と報告している。さらに、Makrynikola らは、Pre-B acute lymphoblastic leukemia において、その骨髄間質への接着は、VLA-4 と骨髄間質に存在する Fibronectin との接着が重要であると報告した⁴⁴⁾。今回の検索では非ホジキンリンパ腫 13 例について VLA-4 の発現を検索したが、骨髄浸潤、白血化との関連は見いだされなかった。

以上、リンパ腫の各細胞接着分子の発現、さらにリンパ腫の進展と細胞接着分子との関連について考察を加えた。しかし、今回検索した細胞接着分子の種類は限られており、しかもリンパ腫細胞のみを対象にしたものであり、リンパ腫細胞の白血化、骨髄浸潤に関しては、間質細胞および細胞外基質との相互作用も重要であると考えられる。さらに、細胞接着分子の発現に対するサイトカインの影響についても多数論じられており^{47)~49)}、今後の研究の蓄積が望

まれる。

ま と め

非ホジキンリンパ腫における細胞接着分子の発現とその進展（白血化，骨髓浸潤）については次のように要約される。

1. 濾胞性リンパ腫およびびまん性Bリンパ腫は細胞形態学的に小型から中型が主体を占める症例ほど高率に白血化と骨髓浸潤を示し，細胞の大きさが一つの重要な要素と考えられた。しかし，白血化と骨髓浸潤は細胞学的な悪性度分類とは必ずしも一致しなかった。

2. LFA-1はTリンパ腫では，53例中44例（83％）と大部分の症例が陽性を示したが，Bリンパ腫では134例中50例（37％）と低率であった。

3. ICAM-1はBリンパ腫では134例中75例（56％）に陽性を示し，Tリンパ腫では，53例中18例（34％）とBリンパ腫よりやや低率であった。

4. CD44はびまん性リンパ腫バーキット型以外の組織型では高率に発現を認め，T，Bリンパ腫ともほぼ同率であった。

5. Bリンパ腫では，ICAM-1分子，LFA-1分子

の両者あるいはどちらか一方の発現低下ないし消失はリンパ腫の白血化，骨髓浸潤に関与することが示唆された。

6. びまん性リンパ腫バーキット型では各細胞接着分子の発現が極めて低率であり，その広範な進展を考えるうえで興味深い所見である。

7. CD44，LFA3，Leu8，VLA-4の発現と白血化，骨髓浸潤との関連ははっきりしなかった。

謝 辞

稿を終えるに当たり，ご懇切なご指導，ご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。同時に終始ご指導，ご助言を頂きました阿部正文助教授に深謝致します。また，限りないご援助を頂きました福島県立医科大学病理学第一講座教室員ならびに技術員の皆様に厚くお礼申し上げます。

本論文の要旨は，第32回日本網内系学会総会（1992年，宇都宮），第82回病理学会総会（1993年，東京）第52回日本癌学会総会（1993年，仙台）で発表した。

本研究の一部は文部省科学研究費，一般研究A（02404029）による。

文

- 1) 接着分子とその臨床的意義，最新医学 46(12)：5-108
- 2) Stamper HB and Woodruff JJ: Lymphocyte homing into lymph nodes: in vitro demonstration of the selective affinity of recirculation lymphocytes for high-endothelial venules. *J Exp Med* 144: 828-833 1976
- 3) Davignon D, Martz E, Reynolds T, Kurzinger K and Springer T: Lymphocyte function-associated antigen 1(LFA-1): A surface antigen distinct from Lyt-2, 3 that participates in T lymphocyte-mediated killing. *Proc Acad Sci USA* 78: 4535-4539 1981
- 4) Springer T, Davignon D, Kurzinger K, Martz E and Sanchez-Madrid F: LFA-1 and Lyt-2, 3 molecules associated with T-lymphocyte-mediated killing: and Mac-1, an LFA-1 homologue associated with complement receptor function. *Immunol Rev* 68: 111-135 1982
- 5) Rothlein R, Dustin M, Marlin S, Springer T: A

献

- human intercellular adhesion molecule(ICAM-1) distinct from LFA-1. *J Immunol* 137: 1270-1274 1986
- 6) Makgoba M, Sanders M, Ginther L, Gugel E, Dustin M, Springer T, Shaw S: Functional evidence that intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) is a ligand for LFA-1 in cytotoxic T cell recognition. *Eur J Immunol* 18: 637-640 1988
- 7) Dustin M, Springer T: Lymphocyte function-associated antigen-1(LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J Cell Biol* 107: 321-331 1988
- 8) Jalkanen S, Jalkanen M, Bargatze R, Tammi M, Butcher EC: Biochemical properties of glycoproteins involved in lymphocyte recognition of high endothelial venules in man. *J Immunol* 141: 1615-1623 1988
- 9) Picker L, De los Toyos J, Telen M, Hynes B,

- Butcher E. Monoclonal anti-bodies against the CD44 (In(Lu)-related p80) , and Pgp-1 antigens in man recognize the Hermes class of lymphocyte homing receptors. *J Immunol* 142(6):2046-2051 1989
- 10) Sanchez-Madrid F, Krensky AM, Ware CF, Robbins E, Strominger JL, Burakoff SJ & Springer TA: Three distinct antigens associated with human T-lymphocyte-mediated cytotoxicity: LFA-1, LFA-2 and LFA-3. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 7489-7493 1982
 - 11) Tedder T, Penta A, Levine H, Freedman A: Expression of the human lymphocyte adhesion molecule, LAM-1. Identity with the TQ1 and Leu-8 differentiation antigens. *J Immunol* 144(2):532-540
 - 12) Osborn L, Hession C, Tizard R: Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocyte. *Cell* 59:1203-1211 1989
 - 13) 玉谷卓也 宮坂昌之: LFA-1-ICAM-1 接着経路の機能的調節機構 実験医学 9(4)318-334 1991
 - 14) Hardy CL, Omoto E, Tavassoli M: Characterization of membrane homing receptors in two cloned murine hemopoietic progenitor cell lines. *J Clin Invest* 83:904-911 1989
 - 15) 白川茂 榊屋正浩 北堅吉 大野敏之 三輪啓志: 造血器腫瘍と接着分子発現. 最新医学 46(12):2407-2415
 - 16) 小島瑞 飯島宗一 花岡正男 須知泰山編: 新分類による悪性リンパ腫アトラス 文光堂 東京 1981
 - 17) Stauder R, Greil R, Schulz F, Thaler J, Gattlinger C, Ractaskiewicz T, Dierich MP and Huber H: Expression of leucocyte function-associated antigen-1 and 7F7-antigen, an adhesion molecule -1(ICAM-1) in non Hodgkin lymphomas and leukaemias, possible influence on growth pattern and leukaemic behaviour. *Clin exp Immunol* 77:234-238 1989
 - 18) Carbone PP, Kaplan HS: Report of the committee on Hodgkin disease staging classification. *Cancer Res* 31:1860-1861 1971
 - 19) McKenna RW, Bloomfield CD, Brunning RD: Nodular lymphoma: Bone marrow and Blood manifestations. *Cancer* 36:428-440 1975
 - 20) Carol S: "Good Risk" Non-Hodgkin Lymphomas: Approaches to Management. *Seminars in Hematology*. 20:25-33 1983
 - 21) The non-Hodgkin's lymphoma pathologic classification project: National cancer institute sponsored study of classification of non-Hodgkin's lymphomas - summary and description of a Working formulation for clinical usage. *Cancer* 49:2112-2135 1982
 - 22) 若狭治毅: Bリンパ腫-組織発生, 増殖および進展-日病会誌 79(2):49-71 1990
 - 23) Boyd AW, Dunn SM, Fecondo JV, Culvenor JG, Dhrsen U, Burns GF, Wawryk SO: Regulation of Expression of a Human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) during lymphohematopoietic differentiation. *Blood* 73(7):1896-1903 1989
 - 24) Gregoly CD, Murray RJ, Edwards CF, Richinson AB: Down regulation of cell adhesion molecules LFA-3 and ICAM-1 in E. B virus-positive Burkitt's lymphoma underlies tumor cell escape from virus-specific T cell surveillance. *J Exp Med* 167:1811-1824 1988
 - 25) Patarroya M, Prieto J, Ernberg I and Gahmberg CG: Absence or low expression of leukocyte adhesion molecules CD11a and CD18 on Burkitt's lymphoma cells. *Int J Cancer* 41:901-907 1988
 - 26) Billaud M, Rousset F, Calender M, Aubey JP, Laisse V and Lenoir GM: Low expression of lymphocyte function-associated antigen(LFA)-1 and LFA-3 adhesion molecules is a common trait in Burkitt's lymphoma associated with and not associated with Epstein-Barr virus. *Blood* 75(9):1827-1833 1990
 - 27) Inghirami G, Wiecezrorek R, Zhu B, Dalla-Favera R and Knowles D: Differential expression of LFA-1 molecules in non-Hodgkin's lymphoma and lymphoid leukemia. *Blood* 72:1431-1434 1988
 - 28) Medeiros L, Weiss L, Picker L, Clayberger C, Horning S, Krensky A and Warnke R: Expression of LFA-1 in Non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer* 63:255-259 1989
 - 29) 星田義彦: 悪性リンパ腫における LFA-1 分子発現の免疫組織学的検討. 日本網内系学会誌 31(4):83-93 1991
 - 30) Michele M, Antonio P, Antonio C, Vittorina Z,

- Annunziata G, Giuseppe M, Dora C, Alfonso C, Felicetto FLuigi DV and Soldano F: Differential expression of CD54/ Intercellular Adhesion Molecule-1 in myeloid leukemias and in lymphoproliferative disorders. *Blood* 76(4):783-790 1990
- 31) 八木田秀雄: 免疫細胞の接着分子. 感染, 炎症. 免疫 19: 129-163 1989
- 32) Itami M, Takenouchi T, Tamaru J, Harigaya K, Mikata A: Expression of functional molecules in Non-Hodgkin's Lymphoma. *Acta Pathol Jpn* 41(4):277-285 1991
- 33) Wawryk SO, Novotny JR Wicks IP, Wilkinson D, Maher D, Salvaris E, Welch K, Fecondo J, Boyd AW: The role of the LFA-1/ICAM-1 interaction in human leukocyte homing and adhesion. *Immunological Review* 108:135-161 1989
- 34) Tkeichi M, The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* 102:639-655 1988
- 35) Frixen UH, Behrens J, Sachs M: E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cell. *J Cell Biol* 113: 173-185 1991
- 36) Aruffo A, Stamenkovic L, Melnick M, Underhill CB, Seed B: CD44 is the cell surface receptor for Hyaluronate. *Cell* 61:1303-1313 1990
- 37) Horst E, Meijer C, Radaszkiewicz T, Ossekoppele G, Krieken J and Pals S: Adhesion molecules in the prognosis of diffuse large cell lymphoma: Expression of a lymphocyte homing receptor(CD44), LFA-1(CD11a/18) and ICAM-1(CD54). *Leukemia* 4:595-599 1990
- 38) Pals ST, Horst E, Ossekoppele GJ, Figdor CG, Scheper RJ and Meijer CJLM: Expression of lymphocyte homing receptor as a mechanism of dissemination in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 73(4):885-888 1989
- 39) Jalkanen S, Joensuu H, Klommi P: Prognostic value of lymphocyte homing receptor and S phase fraction in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 75:1549-1556 1990
- 40) Huet S, Groux H, Caillou B, Valentin H, Prieur A, Bernard A: CD44 contributes to T cell activation. *J Immunol* 143:798-801 1989
- 41) 富永邦彦: 非ホジキンリンパ腫の核DNA量と増殖分画に関する研究. 日本網内系学会誌27(3): 39-51 昭和62年
- 42) Freedman AS, Munro JM, Rice GE, Bevilacqua MP, Morimoto C, McIntyre BW, Rhynhart K, Pober JS and Nadler LM: *Science* 249:1030-1033 1990
- 43) Miyake K, Weissman IL, Greenberger JS: Evidence for a role of integrin VLA-4 in lymphohemopoiesis. *J Exp Med* 173:599-607 1991
- 44) Vicki Makrynikola and Kenneth F. Brads tock: Adhesion of Precursor-B Acute Lymphoblastic Leukemia Cells to Bone Marrow Stromal Proteins. *Leukemia* 7(1):86-92 1993
- 45) Elliott MJ, Vadas MA, Cleland LG, IL-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulate two distinct phases of adhesion in human monocytes. *J Immunol* 145:167-176 1990
- 46) Griffin JD, Sportini O, Ernst TJ: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines regulate surface expression of leukocyte adhesion molecule-1 on human neutrophils, monocytes and their precursors. *J Immunol* 145:576-584 1990
- 47) Chior YH, Cai JP, Johnson K: Lymphocyte adhesion to cultured Peyer's patch high endothelial venule cells is mediated by organ-specific homing receptors and can be regulated by cytokines *J Immunol* 145:3669-3677 1990