

# 慢性骨髄性白血病の免疫学的研究

## 第 二 編

### 体液性免疫の検討

岡山大学医学部第二内科教室（主任：平木繁教授）

陳 博 明

（昭和51年1月30日受稿）

#### 目 次

- I. 緒言
- II. 研究対象並びに実験方法
- III. 成績
- IV. 考案
- V. 結語

#### I. 緒 言

すでに周知のごとく生体の免疫機構は一般に体液性免疫応答 (Humoral Antibody Response) と細胞性免疫応答 (Cell-mediated Immune Response) に二大別される。前者はリンパ球系細胞のうちいわゆる B Cell によって合成される免疫グロブリン (抗体) が主に関与するシステムであり、後者は遅延型過敏反応、真菌やウイルスなどに対する感染防禦、腫瘍免疫 (免疫監視機構) や移植免疫などのいわゆる T Cell が主役をなすシステムであると解釈されている。一般に体液性免疫機構の障害に際しては血清中免疫グロブリンに異常が現われるが、一方 B Cell による抗体産生においても細胞性免疫に主役を演ずる T Cell が重要な調節的役割を果していることが近年明らかにされており、したがって細胞性免疫不全の存する場合には種々の程度に免疫グロブリンの産生異常も伴ってくるものと思われる。<sup>1)</sup> 著者はすでに慢性骨髄性白血病 (CML) 患者の細胞性免疫能<sup>2)</sup> を検索し、CML では細胞性免疫能の低下状態が存在する事を報告したが、この事は CML の体液性免疫能に対してもなんらかの影響を及ぼしているのではないかと思われる。本編では以上の様な観点に立ち主に CML の体液性免疫能に関し検討を行ったの

で報告する。

#### II. 研究対象並びに実験方法

##### 1) 対象

昭和50年2月より、同年9月までの当科外来患者及び入院患者のうち、CML に特有な臨床症状ならびに一般臨床検査成績を示し、確実に CML と診断された患者24例を対象として、以下の諸検査を施行した。

##### 2) 方法

(1) 血清蛋白分画 ( $\gamma$ -globulin) と免疫グロブリン。血清蛋白分画はセルローズアセテート膜電気泳動法により、免疫グロブリンについては Single radial diffusion 法を用いて定量した。

(2) Immune Adherence Hemagglutination Test (IAHA) 吉田<sup>3)</sup>らの方法に準じて検討した。尚抗原としては患者の末梢血白血球を用いた。その方法はまず分離した末梢血白血球を EDTA-GVB で2回洗浄し、その後  $1 \times 10^7$ /ml に調整した。対象患者血清は EDTA GVB で 1 : 1, 1 : 2, 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20, 1 : 50, 1 : 100, までの7段階に稀釈し、その0.1ml を用いた。実験の際にはまず  $1 \times 10^7$ /ml に調整した末梢血白血球0.1ml と稀釈した血清0.1ml を小試験にとり、30℃, 30分間恒温槽で振とうした。その後 EDTA-GVB で一回、GVB で2回洗浄したのち、最後に GVB を加えて0.2ml とした。つぎに 1/30 に稀釈した type AB, Rh<sup>+</sup>血清0.1ml を補体として加え、よく混じた後30℃15分間振とう、最後に  $4 \times 10^8$ /ml に調整した O 型ヒト赤血球の0.25ml を加え、30℃で15分振とうし、90分間静置したのち、Nishioka & Linscott<sup>4)</sup>の方法に準じて判定した。

(3) Lymphocytotoxicity Test

辻<sup>6</sup>らの方法に準じて行い、判定は全リンパ球100ケに対する trypan blue で染色される細胞の数で表現した。陽性の判定規準は Dassert<sup>7</sup>に準じて行った。すなわち30%以上染色されたものを陽性とし、Control に用いた細胞が20ケ以上染色された場合には再検した。被検血清1検体につき正常健康成人10例のリンパ球を反応させた。

III. 成 績

(1)血清蛋白分画 (γ-globulin) と免疫グロブリンの定量 (図1, 2)

まず19例について施行した血清蛋白分画中γ-globulin 分画の平均値は1.04 ± 0.20g/dl であった。

一方免疫グロブリンの平均値は IgG : 1463 ± 275 mg/dl IgA : 203 ± 74mg/dl, IgM : 182 ± 67mg/dl であった。両者共に正常人に比し有意差は認められなかった。

しかしこれを採血した時期により寛解期群 (12例) と増悪期群 (7例) の2群にわけて検討すると、血清 γ-globulin は増悪期群7例で7.1~18.6%, 寛解期群12例で8.9~19.3%と有意差なく、免疫グロブリンは増悪期群12例で IgG 700~1500mg/dl, IgA 90~350mg/dl, IgM 90~280mg/dl, 寛解期群で各々1200~1800mg/dl 110~380mg/dl, 130~300mg/dl であり、寛解期群では IgG IgM がやや高値をとる傾向が示された。(図3)

(2) IAHA (図4, 5)

a) CML 患者の末梢血白血球を抗原とし、自家血清と反応させた場合

24症例中4例 (16.7%) が陽性であった。この場合抗原として用いた末梢血白血球の数との関係を検討すると、末梢血白血球数4万以上の場合は9例中3例 (33.3%) が陽性であり、末梢血白血球数4万以下の場合には15例中1例 (6.7%) のみ陽性であった。

急性転化4例についてはすべて陰性であった。

b) 正常人白血球を抗原とし CML 患者ならびに正常人血清と反応させた場合。

CML 患者の血清と反応させた場合は10例中1例陽性、正常人血清と反応させた場合は全例陰性であった。

c) 急性転化後の白血病細胞を抗原とし、自家並びに他家血清 (CML 非急転例) と反応させた場合。

急転に対する化学療法により一旦寛解した後再発

図1 Immunoglobulins level in CML

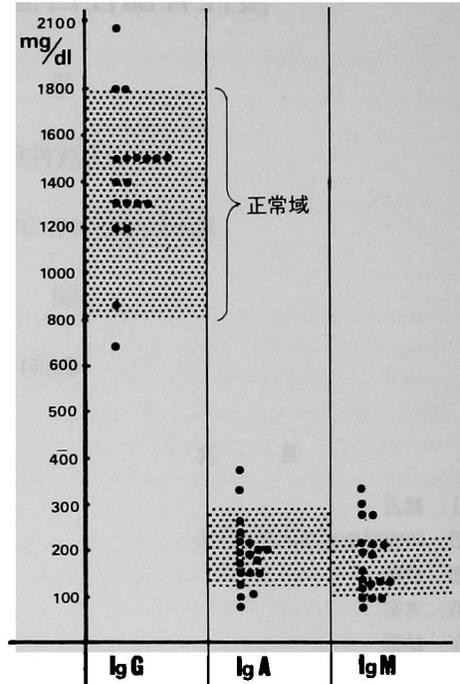
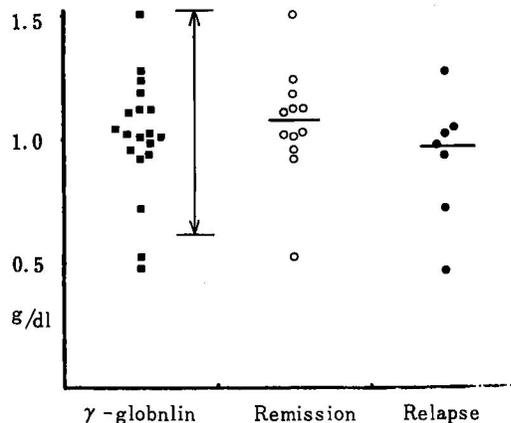


図2 Serum Protein (γ-globulin)



した2例の白血病細胞を抗原とし、自家血清並びに非急転例9例の他家血清と反応させた場合は全例陰性であった。

(3) Lymphocytotoxicity test

その結果は図6の如くで17例中12例 (70%) が陽性であった。尚17例について男女別に検討すると女性10例中9例 (90%), 男性7例中3例 (42.8%) が

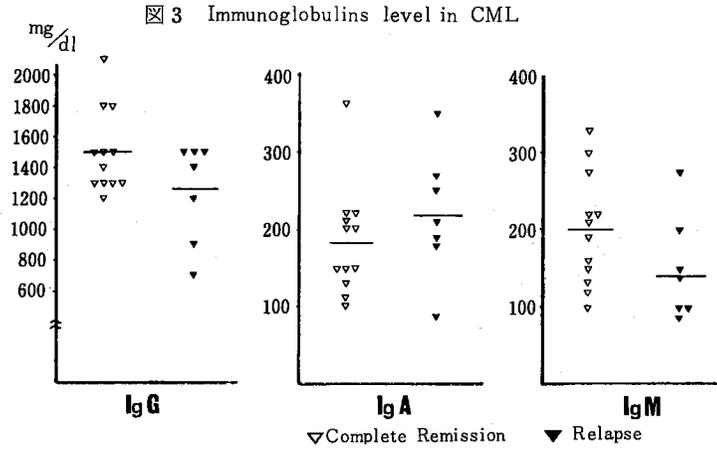


図4 Auto-antibodies to leukemic cells detected by IAHA

No.	Case	Age	Sex	Blood type	WBC $\times 10^4$	B. M. $\times 10^4$	Antibody titer/ml
1	F. T	39	f	A	9.7	58.1	(-)
2	U. N	29	m	B	15.2	102.2	(-)
3	N. Y	40	m	A	12.8	56.0	(-)
4	N. M	36	m	A	31.9	52.6	(-)
5	K. D	62	f	A	23.2	45.0	50×
6	K. M	55	m	AB	7.9	49.4	(-)
7	H. D	70	m	A	6.9	42.0	(-)
8	K. S	58	f	B	18.3		500×
9	S. M	27	f	A	4.3	17.2	20×
10	U. N	29	m	B	0.46		(-)
11	T. U	29	m	A	2.7	36.0	(-)
12	N. Y★	40	m	A	0.83		(-)
13	N. M	36	m	A	0.91	23.9	(-)
14	K. D★	62	f	A	0.93	1.7	(-)
15	K. Z	41	f	B	0.21	18.5	(-)
16	M. K★	25	m	A	0.32	26.6	(-)
17	T. I★	62	f	O	0.35	5.2	(-)
18	A. M	35	f	O	0.89		(-)
19	Y. K	15	m	B	1.38	67.9	50×
20	Y. M	44	m	A	3.29	82.5	(-)
21	S. K	40	m	A	0.45	12.9	(-)
22	T. T	35	f	A	0.86	8.6	(-)
23	I. T	59	f	A	0.93	94.8	(-)
24	T. U	59	f	A	3.10	38.6	(-)

★: Blast crisis

- WBC  $> 4 \times 10^4$       No 1 ~ 9      positive % 3/9 = 33.3%
- WBC  $< 4 \times 10^4$       No 10 ~ 24      positive % 1/15 = 6.6%

図5 A) Incidence of anti-leukemic leukocyte antibody (IAHA)

	Cases	Positive	Percentage	Antibody titre
Before B. C.	9	3	33.3	20-500×
After B. C.	4	0	0	

B. C. = blast crisis

図5 B) IAHA to cross matching

Serum	Leukocyte	Cases	Positive
CML	Normal	10	1
Normals	Normal	7	0

陽性であった。これを臨床病期別にみると寛解期13例中8例(61.5%),増悪期4例中4例(100%)が陽性であった。又対照とした健康成人血清10例ではCytotoxic Antibodyは1例も認められなかった。

#### IV. 考 案

CMLの体液性免疫については、これまで血清タンパク分画、免疫グロブリンなどの非特異性免疫<sup>8)</sup>の変化、又Lymphocytotoxicity Test<sup>10) 11)</sup>とIAHA<sup>4) 12) 9)</sup>などの特異的免疫についての報告がごく少数みられるが、体系的な報告はすくなく、特に細胞性免疫と体液性免疫の相関を検討し、CMLにおけ

図6 Cytotoxicity in CML sera

cases	+	++	+++	positivo	
				tested cell	%
1 I. T.	1			1/10	10
2 T. T.	1	1		2/10	20
3 T. U.	1			1/10	10
4 K. S.					0
5 Y. M.	2			2/10	20
6 K. C.	1			1/10	10
7 S. S.					0
8 N. M.					0
9 K. M.	3			3/10	30
10 A. M.	1	1		2/10	20
11 T. I.	1			1/10	10
12 Y. K.	1			1/10	10
13 T. K.					0
14 H. T. a.					0
15 U. N.	1			1/10	10
16 K. D.		1	1	2/10	20
17 H. T. b.		1		1/10	10
sera $\bar{c}$ lymphocytotoxins in CML :				12/17	70%
Control :				0/10	0%

る免疫機構をその両者からみたものは全くないようである。すでに著者は第一編において、CMLの細胞性免疫能を検討し、未治療または増悪期においてはその低下が存在する事を認め報告しているが、体液性免疫能に対してもこの事が何等かの影響を及ぼしているか否か、そしてCMLにおいても細胞性免

疫と体液性免疫は異った機序で成立するのか極めて興味ある問題と思われる。

以上の観点から本論ではCML患者の血清蛋白の $\gamma$ -globulin分画、免疫グロブリン、IAHA、Lymphocytotoxicity Testを検討したが、血清 $\gamma$ -globulin分画は図1に示すごとくで、正常人に比し有意の変化は認められなかった。この事は免疫グロブリンについても同様であり、CMLにおいては非特異的体液性免疫の成立は細胞性免疫とは異った機序で成立するのではないかと思われる。

CMLの患者血清中に tumor Cell に対する特異的な antibody が存在することは Dore<sup>11)</sup> (1967), Mathé<sup>12)</sup> (1970) らにより Cytotoxicity test, Immunofluorescence test, Complement fixation test, Immune adherence test などにより証明されているが、著者はCMLにおける特異的抗体について検索する為に、吉田<sup>9)</sup> らにより開発され、さらにより一層感度が高いとされている IAHA を用いてこの検索を行った。その結果24例中陽性例は4例であった。これを末梢白血球数4万以上についてみると9例中3例(33.3%), 4万以下の場合には15例中1例(6.7%)となり、陽性率には末梢白血球数が関係することが示唆された。井沢<sup>13)</sup> ら (1974), Carmen<sup>15)</sup> ら (1975) はCML患者の白血病細胞についても直接蛍光抗体法<sup>14)</sup> やI標識オートラジオグラフィ法によって、抗血清が骨髓芽球、前骨髓球、骨髓球などの病的細胞と思われる細胞に結合するのを証明し、CMLの白血病細胞における特異抗原は未成熟細胞の表面に存在することを示唆した。これは著者がCML患者の白血球数4万以上の場合の白血球を抗原とした時、即ち後骨髓球以上の未成熟細胞が30%以上を占めた場合には特異抗原をもった白血病細胞が多いので、陽性率も高いのであると考えれば、その成績は一致する、一方吉田ら、G. Danieli らはCMLのIAHAの陽性率が50%を示したと報告しているが、かれらの抗原は治療前CML患者の白血球を用いている。即ち特異抗原をもった白血病細胞が非常に多いので、陽性率が著者の成績より高値を示したものと考えられる。

又CMLはその末期像としてほとんど大部分急性転化をたどる事は周知のごとくであり、この病態の推移におけるCML特異抗原の消長も興味ある問題と思われる。今回喜多嶋らのCML早期診断基準<sup>16)</sup> による急性転化未治療例については4例IAHAで検討したが、自家血清との間に反応は認められなかった。

又急転後化学療法により一旦寛解し、再び再燃してきた時の白血病細胞に対しても陰性であった。これは急転後は白血病細胞の抗原性も幾分変化することを示唆しているものと考えられる。

次に Cytotoxic antibody が出現するということの説明としていくつかの仮説<sup>21)</sup>が立てられている、即ちリンパ球と微生物或いは Virus との間の共通の膜抗原の存在による交叉反応あるいは全く非特異的免疫反応の副産物であるとも考えられている。著者はこれを検討した結果17例中12例が陽性であった。これまでリンパ球に対する Cytotoxic activity をもった抗体の存在は動物では以前から知られていた<sup>22)</sup>。ヒトでは同様の抗体が妊婦あるいは輸血と妊娠の既往歴がある人の血清中に存在することが Terasaki<sup>23)</sup>ら、Walford<sup>24)</sup>らによって認められた。今回の CML においても、女性では10例中9例(妊娠の既往歴8例、そのうち輸血の既往歴1例)(90%)が陽性であり、男性では7例中3例(42%)(1例輸血の既往歴があった)が陽性で、男女間に差のある事は否定できない、しかし一般の妊婦血清中では16~47%が陽性である事と比較すると CML 女性例90%の陽性率は有意に高い値であり、又この9例の血清はいずれも妊娠後2年以上経過した症例を採血して用いた。一方臨床病期別に分けると、寛解期群13例中8例、増悪期群は4例中4例が陽性という事実は IAHA と同じように、CML の病態の推移に(増悪期、寛解期、急転期)関係あると云う可能性も否定できない。

細胞性免疫の主役の一つは、体液性免疫に対して補助、調整などの役割も果しているといわれているが、著者は第一編 CML の細胞性免疫能について検討した結果、細胞性免疫は低下状態にあるという結論を得た。今回得られた CML の体液性免疫に対する知見を加えると、自己免疫病、高グロブリン血症<sup>21)</sup>などの免疫学的疾患と同様に、その病態発生の機序が次のように推察される。即ちこれらの CML の細胞性免疫の低下ということを背景に、Suppressor T Cell の機能の欠落によって B Cell の機能の異常昂揚をきたし、白血病細胞の特異抗原に対して抗体を産生し、ついに IAHA と Cytotoxic antibody 等の抗体が証明されたではないかと考えられる。

## V. 結 語

今回 CML の免疫能、特に体液性免疫の状態を知る目的で、当教室に入院した CML 24例を対象とし

その血清蛋白の  $\gamma$ -globulin 分画、免疫グロブリン量の測定、IAHA 試験、Cytotoxicity test などを行い、以下の成績を得た。

1) 血清蛋白  $\gamma$ -globulin 分画ならびに免疫グロブリン量

a) CML 19例(寛解期例12例、増悪期例7例)の血清蛋白  $\gamma$ -globulin 分画の平均値  $1.04 \pm 0.20$ g/dl、免疫グロブリン量の平均値は IgG,  $1463 \pm 275$ mg/dl, IgA,  $203 \pm 74$ mg/dl, IgM,  $182 \pm 67$ mg/dl であり、いずれも正常人に比し有意差は認められなかった。

b) 同一症例を増悪期群および寛解期群に分ち、血清  $\gamma$ -globulin 分画および免疫グロブリン量を比較するに、血清  $\gamma$ -globulin 分画は増悪期群7例で7.1~18.6%、寛解期群12例で8.9~19.3%で両群間に有意差なかったが、一方免疫グロブリン量は増悪期群12例で、それぞれ IgG 700~1500mg/dl, IgA 90~350mg/dl, IgM 90~280mg/dl、寛解期群でそれぞれ1200~1800mg/dl, 110~380mg/dl 130~300mg/dl であった、すなわち寛解期群では IgG および IgM が  $\gamma$  高値を示した。

2) IAHA では CML 24症例中4例に陽性が認められた。

a) これを末梢白血球数4万以上と4万以下の2群に分つと前者では9例中3例(33.3%)、後者では15例中1例(6.7%)が陽性であった、即ち IAHA の陽性率は末梢白血球数の多い症例に高い傾向が示された。

b) 急性転化4例の IAHA は全例陰性であった。

c) 急性転化後化学療法により一旦軽快し、再び再燃した2例の末梢白血病細胞を抗原とし、自家並びに他家(CML)血清との間で IAHA を行なった結果は全例陰性であった。

3) Lymphocytotoxicity test は CML 17例中12例(70%)において陽性であった。又これを男女別に検討すると男性7例中3例(42%)、女性10例中9例(90%)であり、女性 CML 例に高い陽性率が示された。

以上の結果を総括すると、CML の体液性免疫能は細胞性免疫能に比し比較的正常に近く保持されているが急性転化時には低下するに至るものと考えられる。

終りにご指導ご校閲を賜った恩師平木潔教授、喜多嶋講師に深謝致します。

## 参 考 文 献

- 1) 矢田純一：Tリンパ球とBリンパ球，中外医学社，東京P. 73～116，1975.
- 2) Creares, M. F., Owen, J. J. T. and Mc Raff: T and B lymphocytes, Excerpta Medica, American Elsevier. pub. compa. New York. P. 149—169, 1974.
- 3) 陳博明：慢性骨髓性白血病の免疫学的研究，第一編：細胞性免疫の検討，印刷中.
- 4) Takata, O. Yashida, and Kuniyuki Imai: Autoantibody to human leukemic cell, membrane as detected by immune adherence, *Rev. Eurp. 'etu des clin., Et. Biol.*, **15** : 61—65, 1970.
- 5) Nishika, K. and Linscott, W. O.: Components of guinea pig complement. I, separating of a serum fraction essential for immune hemolysis and immune adherence, *J. Exp. Med.* **118** : 767, 1963.
- 6) 辻公美：白血球と血小板の型，臨床検査，**16** : 1241—1247, 1972.
- 7) 橋本信也，鈴木啓司，佐々木勝久，斎藤裕千，前納宏章，田中弘文，阿部正和：膠原病患者血清中のLymphocytotoxin について，臨床免疫，**6** : 257—262, 1974.
- 8) Sokal, J. E., Aungst, C. W. and Grade, J. T.: Immunotherapy in well controlled chronic myelocytic leukemia. *New York. State, J. of Med.*, **15** : 1180—1185, 1973.
- 9) Danieli, G., Montroni, M. and Magelli, L.: Immune reactions in chronic myeloid leukemia., *Haematologica (Pavia)*, **57** : 697—707, 1972.
- 10) Dickson, A.: Lymphocytotoxins in leukemia., *Brit. Med. J.*, **4** : 209, 1972.
- 11) Dore', J. F., Motta, K. and Marholer, L.: New antigens in human leukemia cells and antibody in the serum of leukemic patient. *Lancet*, **2** : 1396, 1967.
- 12) 小林博，橋武彦編集：腫瘍免疫学，朝倉書店，東京P. 221—222, 1974.
- 13) Mathe, G.: Immunological treatment of leukemias. *Brit. Med. J.* **4** : 487—488, 1970.
- 14) 井沢道，桜井実，筒井孟：小児白血病患者の免疫療法，臨床免疫，**6** : 1015—1020, 1974.
- 15) Carmen, B. L. and Bismarck, B. L.: Human chronic myelogenous leukemia, cell-line with positive philadelphia chromosome. *Blood*, **45** : 321—334, 1975.
- 16) 喜多嶋康一：慢性白血病の化学療法，才19回日本医学会総会，シンポジウム S—11，造血器腫瘍の化学療法，P 88, 1975.
- 17) Lymphocytotoxin. *Lancet II* : 1169, 1970.
- 18) Amos, D. B. and Gorer, P. A.: An antibody, response to skin homografts in mice. *Brit. J. Exp. Patho.*, **35** : 203, 1954.
- 19) Terasaki, P. I. and Mottironi, V. D.: Cytotoxins in disease II. *New Eng. J. Med.*, **283** : 724, 1970.
- 20) Walford, R. L. and Gallagher, R.: Serologic typing of human lymphocytes with immune serum obtained after homografting. *Science*, **144** : 868, 1964.
- 21) 多田富雄：Suppressor T Cell 代謝，臨時増刊号，免疫，**12** : 553—563, 1975.
- 22) 矢野啓介，山名征三，大藤真：膠原病におけるリンパ球，臨床免疫，**7** : 475—485, 1975.

**Immunological studies on chronic myelogenous leukemia**  
**Part II. Humoral immunity in chronic myelogenous leukemia**

by

**Po-min CHEN**

The 2nd Dept. of Internal Medicine, Okayama University Medical School, Japan

(Director Prof. Kiyoshi Hiraki)

To study the humoral reactivity in chronic myelogenous leukemia (CML), the author examined immunoglobuline levels, immune adherence hemagglutination test (IAHA) and lymphocytotoxicity test on the 24 patients admitted to our clinic.

The following data were obtained:

1) The 19 patients, whose serum immunoglobuline levels were examined, were all within normal range with mean values of IgA  $203 \pm 74$ mg/dl, IgG  $1463 \pm 275$ mg/dl and IgM  $182 \pm 67$ mg/dl.

2) IAHA was positive in 4 of 24 patients (16.7%) and the reactivity was correlated with the number of peripheral leukemic cells used as antigen; it was positive in 3 of 9 patients (33.3%) with leukemic cells over  $4 \times 10^4/\mu$  l, but in only one of 15 patients (6.7%) with leukemic cells below  $4 \times 10^4/\mu$  l. The IAHA test was also correlated with the disease state; none of 4 patients (0%) during blastic crisis of CML showed a positive reaction to their own leukemic cells.

3) Sera from 12 of 17 patients (70.6%) showed a positive lymphocytotoxicity to normal lymphocytes. In its correlation with the disease state, it was positive in 8 of 13 patients (61.5%) during remission and in all the patients (100%) during relapse.

From these results it could be concluded that humoral immunity in CML is not so impaired through the clinical course except for blastic crisis.