

Hairy cell leukemia に関する研究

第 2 編

特異抗血清の作製とその反応性

岡山大学医学部第二内科 (主任: 木村郁郎教授)

正 田 隆 雄

(昭和55年12月9日受稿)

Key words : hairy cell leukemia, 免疫

結 言

白血球細胞に対する異種抗血清の作製方法については従来種々の工夫がなされているが、¹¹⁻⁷⁾ 免疫細胞と吸収細胞との組織適合抗原が異なるため、その抗血清が白血球細胞関連抗原を認識しているか否かについては尚議論のあるところである。1977年 Kaplan らは autologous の T 細胞株と B 細胞株に対する抗血清を両細胞株で reciprocal に吸収することにより、B リンパ球抗原と T リンパ球抗原を明瞭に区別した^{8),9)}。著者は同一 hairy cell leukemia (以下 HCL と略) 患者より HCL 細胞株である ZK-H と正常 B 細胞株である ZK-N を培養樹立し、ZK-H に対する家兎抗血清を ZK-N で吸収することにより、HCL に対して特異性の高い抗血清を得ることに成功した。また、ZK-H に対する家兎抗血清を他の白血病患者の細胞で吸収したものと比較検討も行い、認識される白血球細胞関連抗原について考察を加えた。従来、抗血清は白血球細胞の病因解明^{10),11)}、あるいは正常細胞と白血球細胞の間の幅広い共通抗原性の検討のため^{7),12)} 等に応用されてきたが、今回著者は抗血清を用いて白血球特異抗原の有無について検討を加えた。

材料および方法

患者細胞

ヘパリンを加えて採取した骨髓および末梢血より Ficoll-Conray により細胞を分離し、phos-

phate-buffered saline (PBS) で3回洗った後、抗血清との反応に用いた。一部の実験ではあらかじめ液体窒素中(-180℃)に凍結保存されていた細胞を37℃温水中で急速に融解した後PBSで3回洗浄し用いた。凍結保存細胞のviabilityは70%以上であった。

培養細胞株

用いた血液細胞株は計24系で、その由来と細胞タイプは表1に示す如くである。未発表の細胞株中 F₁₇ は京都大学第一内科の巽英二博士より、NALM-18とML-1は Roswell Park Memorial Institute の Dr. Minowada より、また T-54 は北海道大学癌研究所の高田賢三博士より供与を受け、その他は私達の研究室で樹立したものである。第1編³²⁾で述べた如く、ZK-HはHCL患者由来 HCL 細胞株で当科において樹立した。また、RI, PR は UCLA の Golde らにより樹立された HCL 細胞株である¹⁵⁾。

抗血清作製方法

まず 2×10^7 個 (viability 50%) の ZK-H 細胞を家兎に静注し、2週目に 1×10^7 個 (viability 50%) の ZK-H 細胞でブースターを行い、3週目に採血し血清を分離した。血清は56℃30分間非働化した。この抗血清を No.109 と名づけ、次のように吸収した。すなわち PBS にて10倍希釈した血清 5 cc を 4.5×10^8 個の ZK-N 細胞 (0.5 cc) により4℃120分吸収し、さらにこの吸収血清 0.5 cc を ZK-N 細胞 0.5 cc にて4℃120分吸収して得られたものを最終的に用いた。種々の細胞との反応性は最終血清をさらに4倍に希釈して最

終濃度40倍にて検討した。このようにして得られた抗血清をNo.109 N₂とし、-20℃冷凍庫中で保存した。

chronic lymphocytic leukemia (以下CLLと略) 細胞吸収抗血清の作製

前述の方法で得られた非吸収血清原液 No.109 を容積比1:1にて正常脾細胞により4℃120分吸収した後、PBSで10倍希釈し、CLL細胞で容積比1:1にて4℃120分の吸収を2度繰り返し、さらにPBSで4倍希釈して用いた。このようにして得られた血清を抗血清No.109 SC₂とした。

CLL細胞過剰吸収抗血清の作製

PBSにて10倍希釈した抗血清No.109, 5ccを4.5×10⁸個のZK-N細胞(0.5cc)により4℃120分吸収し、さらにこの血清1ccをCLL細胞1cc(2.5×10⁹個)にて4℃120分吸収した。このようにして得られた血清を抗血清No.109 NCとした。さらにNo.109 NCを同一CLL細胞1ccにて4℃120分吸収した。このようにして得られた血清をNo.109 NC₂とした。

抗血清と細胞との反応

まず被検細胞1×10⁶個と抗血清0.1ccを4℃30分反応させ、PBSにて2回洗浄した後、FITC標識山羊抗家兔ガンマグロブリン血清(ペーリング社製品、PBSにて10~20倍に希釈したもの)を4℃30分反応させ、PBSにて2回洗浄した。その後、ホウ砂グリセリンとPBSを1:1に混合したものに細胞を懸濁し、スライドグラスに1滴落とし、カバーグラスをかけ、蛍光顕微鏡(BH-RFL)にて200個以上の細胞をかぞえ、表面膜蛍光陽性細胞の%を算出した。対照として抗血清を加えずにFITC標識山羊抗家兔ガンマグロブリン血清のみを反応させた。

吸収試験

i) 抗血清No.109 N₂を2倍希釈したもの0.4ccに対し、ZK-H細胞2×10⁷個の割合で4℃120分吸収した。

ii) 抗血清No.109 N₂を2倍希釈したもの0.4ccに対し、ZK-H細胞が由来した患者の白血病細胞3×10⁷個の割合で4℃120分吸収した。

結 果

1) 抗血清のZK-H細胞との反応性

FITC標識山羊抗家兔ガンマグロブリン血清とZK-H細胞のみの反応でも6%の反応陽性細胞を示したので(表1)、まずFITC標識山羊抗家兔ガンマグロブリン血清をZK-H細胞で吸収し、ZK-H細胞との反応性が全く消失したものを以後の実験に用いた。未吸収の抗HCL血清No.109は640~2,560倍の希釈濃度で60%以上のZK-H細胞と反応した(図1)。この抗血清をZK-N細胞で吸収した血清No.109 N₂はZK-H細胞に対しては40~80倍の抗体価を有したが、ZK-N細胞に対しては20倍希釈で0%と全く反応しなかった(図2)。写真1は抗血清と反応したZK-H細胞を示す。

2) 抗血清の培養細胞株との反応性

抗HCL血清No.109 N₂との反応性を検討した24系の細胞株のうちわけはnon-T, non-B細胞型リンパ芽球様細胞株4系、T細胞型リンパ芽

表1 FITC標識山羊抗家兔ガンマグロブリン血清単独とHCL細胞との反応性

HCL細胞	陽性率%
ZK-H	6
RI	0
PR	0
患者No.1	14
患者No.2	0
患者No.3	0

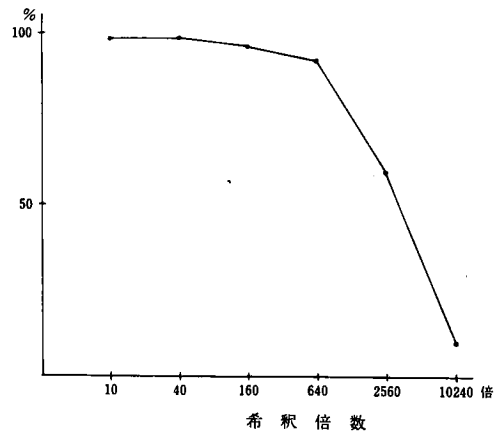


図1 未吸収抗HCL血清とZK-H細胞の反応性

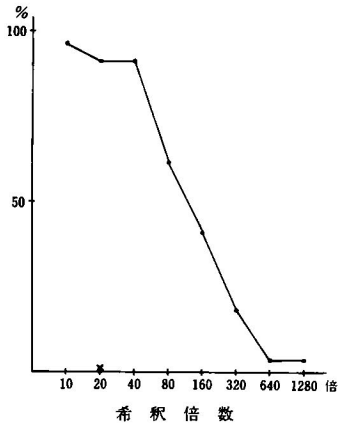


図2 抗 HCL 血清No.109N₂とZK-H細胞の反応性 (×印は ZK-N細胞の反応性を示す)



写真1 抗 HCL 血清No.109N₂と反応陽性のZK-H細胞

球様細胞株6系, B細胞型リンパ芽球様細胞株12系, 骨髓系細胞株2系である(表2)。表に示すごとく HCL患者由来の3系のうちZK-HとRIはそれぞれ85%, 78%と高率に陽性反応を示し, PRは15.5%とやや低率であったが, PRは位相差顕微鏡上, 毛様突起を示し, hairy cellの形態をとる細胞の割合も低く, これら3系はいず

れも陽性と考えられた。これに対し, 他の細胞株は正常リンパ芽球様細胞株JKが7%の反応を示した以外は, すべて1.5%以下で陰性と考えられた。

3) 抗血清の患者細胞との反応性

6例の正常人末梢血より Ficoll-Conrayにより分離した単核細胞と抗血清No.109N₂の反応は平均4.5%であったが, 形態的にリンパ球と思われるものとの反応は見られず非特異的なものと考えられた。また, 正常胸腺細胞との反応も0.5%と陰性であった。抗 HCL 血清との反応性を検討した白血病患者31例のうちはHCL5例, CLL6例, acute lymphocytic leukemia (以下 ALLと略) 4例, adult T-cell leukemia (以下 ATLと略) 3例, acute myelocytic leukemia (以下 AMLと略) 5例, acute monocytic leukemia (以下 A MoLと略) 1例, chronic myelocytic leukemia (以下 CMLと略) 3例, CML急性転化(BC) 3例, 白血性リンパ肉腫1例である(表3)。この表に示すごとく, HCL 5例全例が末梢血の白血球細胞の割合に応じて高率に陽性反応を示し, CLLの2例とはそれぞれ12.0%, 21.0%と若干反応したが, 他の4例は1.5%以下と陰性であった。他の白血病患者については, 白血性リンパ肉腫の1例が10%の反応性を示した以外, いずれも4%以下で陰性であった。

4) CLL細胞吸収抗血清の反応性

組織適合抗原の異なった免疫細胞と吸収細胞の組み合わせによる従来の抗血清作製法により抗血清を作製し反応性を検討した結果を次に示す。抗血清No.109SC₂作製に用いたCLL細胞はNo.9のCLL患者の末梢白血球である。抗血清No.109SC₂はCLL5例に対し5%以下で陰性であったが, HCL3例は蛍光が減弱したもののなお60%以上の細胞が陽性であった(表4a)。また, 培養細胞に対しては, ZK-H細胞に88%, ZK-N細胞に68%の陽性を示したが, Raji細胞には1.5%と陰性であった(表4b)。

5) CLL細胞過剰吸収抗血清の反応性

HCL細胞とCLL細胞に質的な抗原の差があるか否かを検索するために抗 HCL 血清をCLL細胞で過剰に吸収した抗血清とZK-H細胞と

表2 抗 HCL 血清No.109 N₂と培養細胞株との反応性

細胞株	起 源	細胞タイプ	陽性率(%)	文 献
NALL-1	ALL	Non-T, non-B	0	13), 17)
F ₁₇	ALL	Non-T, non-B	0	未発表
NALM-18	ALL	Non-T, non-B	0	未発表
NALM-1	CML-BC	Non-T, non-B	0	27)
TALL-1	ALL	T	0.6	13), 22)
MOLT-3	ALL	T	0	25)
MOLT-4	ALL	T	0.5	25)
HPB-ALL	ALL	T	0	31)
HPB-MLT	白血性リンパ腫	T	0	31)
MT-1	ATL	T	0	30)
BALL-1	ALL	B	0.3	13)
TK	脳原発リンパ腫	B	0	未発表
JBL2	Burkitt リンパ腫	B	1.5	14), 28)
JBL	Burkitt リンパ腫	B	0	29)
JBL3	Burkitt リンパ腫	B	0	未発表
Raji	Burkitt リンパ腫	B	0	26)
T-54	CLL	B	0	未発表
JK	正常 B 細胞	B	7	未発表
ZK-N	正常 B 細胞	B	0	32)
ZK-H	HCL	B	85	32)
RI	HCL	B	78	15)
PR	HCL	B	15.5	15)
ML-1	AML	骨 髄 系	0	未発表
HL-60	APL	骨 髄 系	0.5	16)

の反応性を検討した。抗血清No.109 NC および No.109 NC₂ 作製に用いた CLL 細胞は患者No.9の末梢白血球である。表5に示すごとく、ZK-H細胞は抗血清を CLL 細胞で吸収する回数を増すと陽性細胞の%は減少し蛍光も減弱した。

6) 吸収試験

抗血清No.109 N₂を2倍希釈したものは、ZK-H細胞が由来したNo.1の患者末梢白血球と72%の反応性を示した。この血清を、方法の吸収試験の項で述べたように、No.1患者末梢白血球で吸収すると9%に、ZK-H細胞で吸収すると0%にそれぞれ反応性の低下および消失をきたした(表6)。また、抗血清No.109 N₂を2倍希釈したものはZK-H細胞と61.5%の反応性を示したが、方法の吸収試験の項で述べたように、この抗血

清をZK-H細胞で吸収するとZK-H細胞との反応性は0%と完全に消失した。

7) 正常家兎血清とHCL細胞との反応性

正常家兎血清とHCL細胞との反応性を検討した結果を表7に示す。表のごとく未希釈の正常家兎血清とはかなり高率に反応が見られたが、40倍希釈すると反応はほとんど見られなくなった。

考 察

本研究において著者は前編³²⁾で報告した同一患者由来のZK-H細胞とZK-N細胞を用いて抗HCL血清を作製し、種々の白血球細胞および培養血液細胞に対する反応性を検討した。その結果、この抗血清がHCL細胞に対して特異的に反応することが明らかとなった。なお対照とし

表3 抗 HCL 血清No.109N₂と新鮮白血病リンパ腫細胞との反応性

患者No.	白血病タイプ	材料	白血球数 (有核細胞数)	白血病細胞の比率 (%)	陽性率 (%)
1	HCL	末梢血	30,000	80	84.0
2	HCL	末梢血	20,000	83 (Ficoll-Conray)	80.5
3	HCL	末梢血	7,400	36	26.0
4	HCL	末梢血	20,000	70	53.7
5	HCL	末梢血	13,000	70	62.0
6	CLL	末梢血	119,000	ly 96	1.5
7	CLL	末梢血	4,800	ly 83	1.5
8	CLL	末梢血	26,300	ly 81	0
9	CLL	末梢血	300,000	ly 95	12.0
10	CLL	末梢血	16,600	ly 59	21.0
11	CLL	末梢血	54,600	ly 99	0
12	ALL	末梢血	40,000	88	0
13	ALL	末梢血	150,000	90	0
14	ALL	末梢血	108,800	78	0
15	ALL	骨 髄	670,000	96	0
16	ATL	末梢血	24,000	57	3.0
17	ATL	末梢血	9,900	32	3.0
18	ATL	末梢血	18,000	60	0
19	AML	骨 髄	185,000	bl20, pr30	2.0
20	AML	末梢血	83,400	90	1.0
21	AML	骨 髄	100,000	50	3.5
22	AML	末梢血	3,800	40	1.5
23	AML	末梢血	72,500	96	0
24	AMoL	末梢血	6,000	50	0
25	CML	末梢血	12,600		0.7
26	CML	末梢血	13,500		0.5
27	CML	末梢血	40,000		0.5
28	CML-BC	末梢血	194,400	90	0
29	CML-BC	末梢血	199,000	51	4
30	CML-BC	末梢血	10,000	30	0
31	リンパ腫	末梢血	13,400	ly 60	10

て正常家兎血清を HCL 細胞に作用させた場合、未希釈のものは HCL 細胞と反応した。従って未希釈で抗血清の反応性を検討することは不可能である。正常家兎血清が HCL 細胞と反応することに関しては種々の可能性が考えられる。1つは家兎血清中に HCL 細胞と共通した抗原に対する自然抗体が含まれている可能性であり、

他は、Fc レセプターその他を介する非特異的な反応の可能性である。しかしながら血清を40倍に希釈するともはや HCL 細胞との反応は見られなくなり、この希釈レベルでは非特異的な因子の関与を除外して考えることができる。40倍希釈の抗 HCL 血清にのみ反応が見られたことや、ZK-H 細胞による吸収により抗 HCL 血清

表4 CLL細胞で吸収した抗HCL血清No.109SC₂の反応性
(a)新鮮白血病細胞 (b)培養細胞株

(a) 患者No.	白血病タイプ	陽性率(%)
1	HCL	71
2	HCL	61
4	HCL	60
6	CLL	0
8	CLL	0
9	CLL	0
10	CLL	4.5
11	CLL	5.0

(b) 細胞株	起 源	陽性率(%)
ZK-H	HCL	88
ZK-N	正常B細胞	68
Raji	Burkittリンパ腫	1.5

のZK-H細胞およびそれが由来した元のHCL細胞に対する反応性が消失したことは、抗血清No.109N₂の反応がFcレセプターを含めた非特異的なものでないことを示している。また、EAロゼット試験により検出されるFcレセプター陽性細胞がZK-H細胞では15~29%であるのに対し、抗血清に反応するZK-H細胞は90%と解離が見られること、およびA MoL患者の末梢血細胞が39%のFcレセプター陽性細胞をもつにもかかわらず、この抗血清との反応が全く見られなかったことはこの抗血清の反応がFcレセプターを介するものでないことを裏づけている。

HLAと腫瘍関連抗原が細胞表面上に密接に関係していることはマウスやヒトの白血病細胞において報告されている^{18),19)}。白血病細胞から腫瘍抗原のみを分離してそれに対する純粋な抗血清を作製することが困難なため従来の白血病細胞

表5 CLL細胞過剰吸収抗血清とHCL細胞との反応性

細胞	抗血清	No.109 NC	No.109 NC ₂
ZK-H細胞		93%	21%
患者No.9 CLL細胞		14.5%	NT

NT: not tested.

表6 HCL細胞吸収抗血清No.109N₂とHCL細胞との反応性

反応細胞	吸収細胞	吸 収 前	No.1患者HCL細胞	ZK-H細胞
No.1患者HCL細胞		72%	9%	0%
ZK-H細胞		61.5%	NT	0%

NT: not tested.

表7 正常家兎血清とHCL細胞との反応性

細胞	血清濃度	未 希 釈	40倍希釈
ZK-H細胞		36%	0%
患者No.1 HCL細胞		90%	8%
患者No.2 HCL細胞		58%	0%

に対する異種抗血清の特異性には問題があった。1975年、Durantezら⁶⁾はCML患者由来のリンパ芽球様細胞株RPMI-4265をシステインの存在

下でパパイン処理し、その膜成分で家兎を免疫し抗血清を作製したが、この抗血清はlymphocyte-dependent antibody assay法でHLA-2抗

原をもった正常人末梢血細胞に反応することを報告した。著者の作製した抗血清では、同一患者の正常 B 細胞由来の ZK-N で吸収したことによりこのような HLA 抗原の関与を一応除外して考えることができる。

1976年木谷ら^{12),20)}は末梢血中の hairy cell が 98%以上を占める HCL 患者の末梢血細胞を家兎に静注し、得られた抗血清を非働化した後、O 型ヒト赤血球、ヒト kidney powder、健康人末梢白血球で吸収し、その抗血清が cytotoxicity test にて HCL, B 細胞性 CLL, reticulum cell sarcoma (RCS) と反応し、他の白血病細胞とは反応せず、CLL 細胞で吸収後も HCL, RCS に反応性を残すことを報告した。一方、1979年 Stuart ら²¹⁾はやはり HCL 患者の末梢血で家兎を免疫して得られた抗血清を赤血球、ヒト胸腺細胞で吸収し、その抗血清が正常人の B 細胞、HCL, B 細胞性 CLL, B 細胞性 ALL, B 細胞性リンパ腫と反応することを認め、CLL 細胞で吸収することにより B 細胞に対する活性が消失すると報告した。

このように HCL 細胞が正常 B 細胞抗原以外の抗原を持つか否かについては議論のあるところである。著者の成績では抗 HCL 血清 No.109 N₂ は 9 系の B 細胞株とは全く反応せず、3 系の HCL 細胞株とのみ反応した。また、正常人リンパ球ともほとんど反応せず、HCL 患者の白血病細胞とのみ反応した。これらのことは HCL 細胞が B 細胞抗原とは明らかに異った抗原を有していることを示している。また、抗 HCL 血清 No.109 N₂ は HCL 患者の白血病細胞以外に一部の CLL 患者の末梢白血球とも若干の反応性を示した。そこで著者は 12.0% の反応性を示した No. 9 の CLL 患者の末梢白血球で吸収した抗 HCL 血清 No.109 SC₂ を別に作製し、HCL および CLL 患者の白血病細胞に対する反応性を検討した。その結果、5 例の CLL 細胞に対する反応性が消失し、HCL 細胞には細胞表面の蛍光が減弱したものなお高率に陽性細胞が認められた。これは一部の CLL 細胞が HCL 細胞と交叉する抗原を有しているが、HCL 細胞にはさらに別の抗原が存在することを示している。このことは抗血清 No.109 N₂ が CLL 由来の細胞株である T-54 と

全く反応性を示さなかったこととも関連して興味深く思われる。しかしながら著者は HCL 細胞に CLL 細胞と質的に全く異なった抗原が存在するか否かについて確認するに至らなかった。というのは CLL 細胞により過剰吸収することにより得られた抗血清 No.109 NC₂ の ZK-H 細胞に対する反応性が著明に減弱し、細胞表面の蛍光を認識するのが困難となったからである。従って CLL 細胞で吸収した抗血清は主として抗原量の差を認識している可能性も考えられる。抗血清 No.109 SC₂ が ZK-H 細胞のみならず ZK-N 細胞にも反応したことは、HLA 抗原あるいは EB ウイルス関連抗原等を認識した可能性が考えられるが、EBNA 陽性の Raji 細胞とは反応しなかった点より後者の可能性は否定されよう。さらに抗血清 No.109 SC₂ は HCL 患者の EBNA 陰性の白血病細胞とも反応することにより、やはり HCL 抗原に対する反応が主体と考えられる。このように免疫と吸収に組織適合抗原の異なった細胞を用いると解釈に困難な点が生じ得るが、著者の用いた同一患者由来の 2 つの B 細胞株による抗血清の作製方法ではそのような恐れがなく、白血病の免疫学的診断に役立つであろう。また、従来の方法では自己抗体等により新鮮白血病細胞抗原が隠され^{23),24)}、家兎によって認識されない可能性があり、大量の正常 B 細胞を吸収に用いることが困難であることを考えると著者の抗体作製方法は今後大いに利用されるべき方法であると思われる。

結 語

69 才の同一 HCL 患者の末梢血より HCL 株 (ZK-H) と正常リンパ芽球様細胞株 (ZK-N) の 2 つの B 細胞株を培養樹立した。家兎を ZK-H 細胞で免疫して ZK-N 細胞で吸収することにより HCL に特異的な抗 HCL 血清とし、間接蛍光抗体法によりその反応性を検討した。吸収抗血清は HCL 株 3 系中 3 系と反応したが、4 系の non-T, non-B 細胞株、6 系の T 細胞株、9 系の B 細胞株、2 系の骨髓系細胞株を含む他の 21 系の細胞株とは反応しなかった。また、この抗血清は正常人および白血病患者の末梢血、骨髓細胞に対しては、HCL 患者 5 例中 5 例と反応し、

CLL 6 例中 2 例と若干反応した以外 6 例の正常人と 26 例の他の種々のタイプの白血病患者とは反応しなかった。これらの結果より、一部の CLL 細胞と交叉するが B 細胞抗原とは異なった抗原を HCL 細胞が保有することが示唆される。この実験で用いた異種抗血清作成方法は組織適

合抗原に関する問題を一応除外でき、白血病の免疫学的診断に有用であると思われる。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲いただいた木村郁郎教授および三好勇夫講師に深謝いたします。

文 献

1. Greaves, M.F. and Brown, G.: Antisera to acute lymphoblastic leukemia cells. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 4, 67—84, 1975.
2. Billing, R., Minowada, J., Cline, M., Clark, B. and Lee, K.: Acute lymphocytic leukemia - associated cell membrane antigen. *J. Natl. Cancer. Inst.* 61, 423—429, 1978.
3. Minowada, J., Janossy, G., Greaves, M.F., Tsubota, T., Srivastava, B.I.S., Morikawa, S. and Tatsumi, E.: Expression of an antigen associated with acute lymphoblastic leukemia in human leukemia-lymphoma cell lines. *J. Natl. Cancer. Inst.* 60, 1269—1277, 1978.
4. Mohanakumar, T., Metzgar, R.S. and Miller, D.S.: Human leukemia cell antigens: serologic characterization with xenoantisera. *J. Natl. Cancer. Inst.* 52, 1435—1444, 1974.
5. Mohanakumar, T., Pauly, J.L., Sokal, J.E. and Metzgar, R.S.: Human leukemia-associated antigens: detection on cells of established lymphoblastoid lines. *J. Immunol.* 115, 1542—1548, 1975.
6. Durantez, A., Zigelboim, J., Thieme, T. and Fahey, J.L.: Antigens shared by leukemic blast cell and lymphoblastoid cell lines detected by lymphocyte-dependent antibody. *Cancer Res.* 35, 2693—2698, 1975.
7. Zigelboim, J., Bick, A. and Durantez, A.: Recognition by human and rabbit sera of common antigens to leukemia blast cells, peripheral blood B-lymphocyte, and monocytes. *Cancer Res.* 37, 3656—3662, 1977.
8. Kaplan, J., Ravindranath, Y., and Peterson, W.D.: T and B lymphocyte antigen-positive null cell leukemias. *Blood.* 49, 371—378, 1977.
9. Kaplan, J. and Peterson, W.D.: Detection of T-and B-lymphocyte antigens on two major null cell subsets. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 8, 530—535, 1977.
10. Oliver, R.T.D. and Pillai, A.: Reactivity of antisera to oncornavirus proteins with human leukaemia cells. *Proc. Roy. Soc. Med.* 70, 556—559, 1977.
11. Metzgar, R.S., Mohanakumar, T. and Bolognesi, D.P.: Relationships between membrane antigens of human leukemic cells and oncogenic RNA virus structural components. *J. Exp. Med.* 143, 47—63, 1976.
12. 木谷照夫, 倉田義之, 待井隆志, 西内明子, 平岡 謙, 米沢 毅, 西川光夫, 高林治一: 抗 hairy cell 抗血清の特異性と交叉抗原性. *医学のあゆみ*, 98, 74—76, 1976.
13. Miyoshi, I., Hiraki, S., Tsubota, T., Kubonishi, I., Matsuda, Y., Nakayama, T., Kishimoto, H. and Kimura, I.: Human B cell, T cell and null cell leukaemic cell lines derived from acute lymphoblastic leukaemias. *Nature*, 267, 843—844, 1977.
14. Miyoshi, I., Hiraki, S., Tsubota, T., Uno, J., Nakamura, K., Ota, T., Hikita, T., Hayashi, K., Kataoka, M., Tanaka, T., Kimura, I., Sairenji, T. and Hinuma, Y.: Epstein-Barr virus-positive Japanese Burkitt lymphoma. *Gann*, 69, 449—450, 1978.
15. Saxon, A., Stevens, R.H., Quan, S.G. and Golde, D.W.: Immunologic characterization of hairy cell leukemias in continuous culture. *J. Immunol.* 120, 777—782, 1978.
16. Collins, S.J., Gallo, R.C. and Gallagher, R.E.: Continuous growth and differentiation of human myeloid

- leukaemic cells in suspension culture. *Nature*, **270**, 347-349, 1977.
17. Hiraki, S., Miyoshi, I., Kubonishi, I., Matsuda, Y., Nakayama, T., Kishimoto, H. and Masuji, H.: Human leukemic "null" cell line (NALL-1). *Cancer* **40**, 2131-2135, 1977.
 18. Callahan, G.N., Allison, J.P., Pellegrino, M.A. and Reisfeld, R.A.: Physical association of histocompatibility antigens and tumor-associated antigens on the surface of murine lymphoma cells. *J. Immunol.* **122**, 70-74, 1979.
 19. Metzgar, R.S., Mohanakumar, T., Green, R.W., Miller, D.S., and Bolognesi, D.P.: Human leukemia antigens: partial isolations and characterization. *J. Natl. Cancer Inst.* **52**, 1445-1453, 1974.
 20. 木谷照夫, 待井隆志, 倉田義之, 西内明子, 平岡 諱, 米沢 毅, 那須輝史, 高林治一: Hairy cell leukemia. *日本臨床*, **34**, 50-60, 1976.
 21. Stuart, A.E. and Dewar, A.E.: Properties of anti-hairy cell serum. *Br. J. Haematol.* **41**, 163-168, 1979.
 22. Hiraki, S., Miyoshi, I., Kubonishi, I., Matsuda, Y., Nakayama, T., Kishimoto, H., Machida, K., Masuji, H., and Kimura, I.: Establishment of a T-cell line from human lymphosarcoma. *Gann*, **69**, 115-118, 1978.
 23. Garret, T.J., Takahashi, T., Clarkson, B.D. and Old, L.J.: Detection of antibody to autologous human leukemia cells by immune adherence assays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 4587-4590, 1977.
 24. Hsu, C.C.S., and Morgan, E.R.: Detection of B-lymphocyte (B-cell)-associated antigens on human leukemic lymphocytes. Masking of membrane antigens. *Am. J. Clin. Pathol.* **70**, 741-747, 1978.
 25. Minowada, J., Ohnuma, T. and Moore, G.E.: Rosette-forming human lymphoid cell lines I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes. *J. Natl. Cancer Inst.* **49**, 891-895, 1972.
 26. Epstein, M.A., Achong, B.G., Barr, Y.M., Zajac, B., Henle, G. and Henle, W.: Morphological and virological investigations on cultured Burkitt tumor lymphoblasts (strain Raji). *J. Natl. Cancer Inst.* **37**, 547-559, 1966.
 27. Minowada, J., Tsubota, T., Greaves, M.F. and Walters, T.R.: A non-T, non-B human leukemia cell line (NALM-1): Establishment of the cell line and presence of leukemia-associated antigens. *J. Natl. Cancer Inst.* **59**, 83-87, 1977.
 28. Miyoshi, I., Hiraki, S., Kimura, I., Miyamoto, K., and Sato, J.: 2/8 translocation in a Japanese Burkitt's lymphoma. *Experientia.* **35**, 742-743, 1979.
 29. Miyoshi, I., Hiraki, S., Kubonishi, I., Matsuda, Y., Kishimoto, H., Nakayama, T., Tanaka, T., Masuji, H. and Kimura, I.: Establishment of an Epstein-Barr virus-negative B-cell lymphoma line from a Japanese Burkitt's lymphoma and its serial passage in Hamsters. *Cancer* **40**, 2999-3003, 1977.
 30. Miyoshi, I., Kubonishi, I., Sumida, M., Hiraki, S., Tsubota, T., Kimura, I., Miyamoto, K. and Sato, J.: A novel T-cell line derived from adult T-cell leukemia. *Gann.* **71**, 155-156, 1980.
 31. Morikawa, S., Tatsumi, E., Baba, M., Harada, T. and Yasuhira, K.: Two E-rosette-forming lymphoid cell lines. *Int. J. Cancer* **2** 1, 166-170, 1978.
 32. 疋田隆雄: Hairy cell leukemia に関する研究. 第1編, 細胞株の樹立とその性状. *岡山医学会雑誌*, **92**, 1980.

Studies on hairy cell leukemia

Part 2. Production of hairy cell leukemia-specific antiserum and its reactivities

Takao HIKITA

Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director : Prof. I. Kimura)

Two B-cell lines, a hairy cell leukemia (HCL) line (ZK-H) and a normal lymphoblastoid line (ZK-N), were established in long-term culture from Peripheral blood of the same patient with HCL. An anti-HCL serum was prepared by immunizing a rabbit with ZK-H cells, rendered HCL-specific by absorption with ZK-N cells and tested in indirect membrane immunofluorescence. The absorbed antiserum reacted with 3 of 3 HCL lines but not with another 21 hemic cell lines, including 4 non-T, non-B cell lines, 6 T-cell lines, 9 B-cell lines and 2 myeloid cell lines. When tested against fresh normal and leukemic cells, positive reactions were observed in 5 of 5 HCL cases but not in 6 normal persons or in another 26 cases of various leukemias, except for a low percentage positive reaction in 2 of 6 cases of CLL. These results suggest that HCL cells possess a specific HCL-associated antigen which is shared by certain CLL cells but which is distinct from a B cell antigen. The method of production of hetero-antiserum used in the present experiment appears to obviate problems related to histocompatibility antigens and would be useful for the immunodiagnosis of leukemias.