



# Purine nucleoside phosphorylase (PNP) and adenosine deaminase (ADA) activities examined cytochemically in unfixed lymphocytes of patients with lymphoproliferative disorders

前田, 恵三

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1982-03-10

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0357

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000357>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	まえ だ けい ぞう 前 田 恵 三 ( 静 岡 県 )
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	医博い第 343 号
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の日付	昭和 57 年 3 月 10 日
学 位 論 文 題 目	Purine Nucleoside Phosphorylase (PNP) and Adenosine Deaminase (ADA) Activities Examined Cytochemically in Unfixed Lymphocytes of Patients With Lymphoproliferative Disorders 未固定リンパ球を材料とする purine nucleoside phosphorylase (PNP) 及び adenosine deaminase (ADA) 細胞化学的染色法の開発と、リンパ球増殖性疾患患者リ ンパ球での検討
審 査 委 員	主査 教授 山 口 延 男 教授 西 塚 泰 美      教授 島 田 桂 吉

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 緒 言

Purine nucleoside phosphorylase (PNP) 及び adenosine deaminase (ADA) は purine salvage 経路の酵素である。

ヒトでの PNP 欠損症は、B リンパ球 (bursa 相等器官由来リンパ球) の機能は正常のままであるが、選択的に T リンパ球 (胸腺由来リンパ球) の機能不全を示す。このことから、PNP は正常な T リンパ球免疫機能発現のために不可欠と考えられている。Borgers らは細胞化学的検索から、PNP は正常末梢 T リンパ球に存在するが、B リンパ球には存在しないとの興味ある報告をした。一方では、B リンパ球を多く含む補体レセプター陽性細胞分画、及び B リンパ球株に生化学的測定により PNP 活性を認めたという報告がある。これらの結果が一致しない原因は、細胞化学的染色での材料固定に伴う酵素失活にあると推測される。

一方、ADA の欠損は複合免疫不全症を発現し、PNP 欠損症とは病態が異なることから注目されている。我々の知る限りでは、ADA 活性の細胞化学的検出法についての報告はまだない。

慢性リンパ性白血病 (CLL) 患者末梢リンパ球の生化学的測定による PNP 及び ADA 活性値は、正常より有意に低いとの報告がある。活性が低いのは、個々の陽性細胞の活性低下に由来するものか、陽性細胞の数の減少によるものかがわかっていない。

上記の未解決の問題を解決するために、我々は新しく未固定リンパ球を材料とする PNP 及び ADA 細胞化学的染色法を開発した。この新しい方法を用いて、健康人及びリンパ球増殖性疾患患者の末梢 T と B リンパ球の両酵素活性を調べたので報告する。

#### 実験材料及び方法

リンパ球増殖性疾患患者 17 例及び健康成人 21 例のヘパリン加静脈血に、単球除去用試薬（KAC-II, 日本抗体研究所）を加え、Ficoll-sodium metrizoate 比重遠心法にて単球を除去すると同時にリンパ球分画（未分画リンパ球）を得た。この分画に neuraminidase 処理した羊赤血球を加え、E-ロゼットを形成しこれを T リンパ球とした。牛赤血球を用いて補体レセプター（CR）検出用指示細胞（EAC）を調製して、EAC-ロゼットを形成しこれを補体レセプター陽性細胞（CR cell）とした。ロゼット形成細胞を比重遠心法にて分離採取後、指示赤血球を溶血除去して各リンパ球分画を得た。表面免疫グロブリン（SmIg）陽性細胞は蛍光抗体法にて同定した。

PNP 及び ADA 細胞化学的染色は次の様に行った。単離精製した未固定リンパ球のリン酸緩衝生理食塩水浮遊液と、酵素活性検出用試薬を含む agarose ゼルをスライドガラス上で直接混合し、ゲル化させた後酵素反応を行わせた。反応後混合物を乾燥させ一層の被膜としてスライドガラス上に残し、対比染色後鏡検した。PNP 及び ADA 染色は、それぞれの基質である inosine 及び adenosine が最終的に尿酸に酸化される際に、添加してあった MTT tetrazolium が還元されて、不溶性の青色 formazan 顆粒を生じる反応を利用した。

PNP 及び ADA 活性の生化学的測定には、リンパ球の超音波破碎液を遠心して得た上清を粗酵素液として使った。PNP 及び ADA 活性測定は、それぞれ inosine 及び adenosine を基質とし、最終産物の尿酸の生成量を 293 nm の吸収増大で測定することにより行った。

#### 結 果

健康人末梢リンパ球の PNP 及び ADA 染色では、両染色で陽性細胞内に多数の大型の formazan 顆粒が散在性に認められた。破壊細胞は 10 % 以下であった。反応に必要な試薬を欠いた対照染色では、どちらの染色法も細胞内に全く顆粒がみられないか、又は小顆粒を少数認めるのみであった。PNP 及び ADA のそれぞれの特異的代謝拮抗剤である formycin B 及び coformycin を加えた染色では、顆粒形成は著明に抑制された。これらの結果は、大型の formazan 顆粒形成は特異的に PNP 及び ADA 活性に依存していることを示す。両染色法で、大顆粒 1 コ以上を持つ細胞を酵素活性陽性とした。

熱処理して PNP 及び ADA 活性を低下させた健康人リンパ球を用いて、両染色法の感度を調べた。生化学的に測定した正常リンパ球 PNP 活性の少なくとも 10 % まで、及び ADA 活性の少なくとも 30 % までを検出できることを認めた。

健康人末梢リンパ球の平均 PNP 活性陽性率は、未分画リンパ球、T リンパ球分画及び CR cell 分画共に 93 % 以上であった。これら各分画の示す著明に高い陽性率から、PNP 活性は T リンパ球ばかりでなく B リンパ球にも存在すると考えられる。

健康人末梢リンパ球の平均 ADA 活性陽性率は、未分画リンパ球、T リンパ球分画及び CR cell 分

画で91%以上であった。これは、ADA活性のT、Bリンパ球間分布は、PNPの分布と同様であることを示す。

個々の細胞の酵素活性の強さを知るために、酵素活性陽性細胞の活性度を、大顆粒生成数により低、中、高度の三段階に分類した。PNP活性陽性細胞での低、中、高度陽性細胞の百分率は、未分画リンパ球では上記の順に9、78及び13%、Tリンパ球分画でそれぞれ9、81及び10%、及びCR cell分画でそれぞれ17、74及び9%であった。ADA活性陽性細胞での百分率は、未分画リンパ球でそれぞれ17、77及び6%、Tリンパ球分画でそれぞれ10、82及び8%、及びCR cell分画でそれぞれ11、78及び11%であった。

検索した7例のBリンパ球型CLL患者の末梢未分画リンパ球又はCR cell分画において、PNP活性陽性率はそれぞれの対照に比べ有意に低い値を示した。Null cell型CLL及びTリンパ球型CLL各1例も有意な低値を示した。Bリンパ球型CLLの1例では極端に低いPNP活性陽性細胞率を示し、これが生化学的測定による著明な低値の原因となっていることが認められた。他のCLL患者では、PNP活性低度陽性細胞が大部分を占めることから、陽性細胞率の減少と共に、個々の陽性細胞の活性の低下が生化学的測定値低値の原因と考えられた。

成人T細胞白血病、null cell型急性リンパ性白血病(ALL)、白血病性リンパ肉腫、Sézary症候群及びhairy cell leukemiaを含むCLL以外のリンパ球増殖性疾患患者リンパ球のPNP活性陽性率は80%以上であった。成人T細胞白血病及びnull cell型ALL患者では、PNP活性陽性細胞の大部分が、又Sézary症候群患者のそれでは約半分が活性度低度を示した。これらの患者でみられた生化学的測定によるPNPの低値の原因は、主として個々の陽性細胞の活性低下によることが明らかになった。

Bリンパ球型CLL 7症例のADA活性の検索では、4症例のリンパ球でADA活性陽性率の低下を認めた。しかし同患者リンパ球のPNP活性陽性率との間に相関はみられなかった。測定した6症例全例でADA活性低度陽性細胞が大部分を占めた。これら患者のうち生化学的にADA活性測定を行った3例では、有意の低値を示した。一方、Tリンパ球型CLL、成人T細胞白血病、null cell型ALL及びnull cell型リンパ肉腫患者リンパ球では、ADA活性中等度陽性細胞が大部分を占めた。

Tリンパ球型CLL、成人T細胞白血病及びSézary症候群を含む3例のTリンパ球増殖性疾患患者Tリンパ球では、正常リンパ球対照に比べ、生化学的測定によるPNP活性値は低かったが、ADA活性値は高いか同じレベルであった。

## 考 察

未固定リンパ球を材料に使うPNP及びADA細胞化学的染色法は、固定による酵素失活の恐れがなく、特異性の高い、破壊細胞の少ない良好な染色結果を得た。Agaroseの役割は、ゲル化による細胞膜破壊により反応試薬を細胞内に浸入し易くすることにある。

健常人末梢CR cellの約半分がSmIgを保有し、逆に80%のSmIg陽性細胞がCRを保有しているとの報告がある。我々の染色結果から、健常人末梢CR cellの少なくとも90%以上がPNP活性陽性を示したことは、健常人末梢Tリンパ球ばかりでなくBリンパ球もPNP活性陽性であること

を示す。この結果は、健常人末梢CR cell 分画の生化学的PNP活性測定値はTリンパ球分画のそれと有意の差なしとの結果、及び正常及び白血病由来Bリンパ球株はむしろTリンパ球株より高いPNP活性を有しているとの報告とも一致している。

以上の結果から、PNP欠損症でTリンパ球のみ機能不全に陥る機構は、T、B両リンパ球間での酵素局在の有無からは説明できないとの結論を得た。

CLL患者リンパ球では、生化学的測定で低いPNP及びADA活性値を示すとの報告がある。細胞化学的に検索した結果、CLL 9例のうち1例ではPNP活性陽性細胞率の低下がPNP活性低値の主とした原因と考えられ、一方他のCLL例ではPNP活性陽性細胞率の低下ばかりでなく、個々の陽性細胞の活性低下もその原因となっていることを認めた。一方、正常末梢Bリンパ球はPNP活性陽性であるのに対し、Bリンパ球型CLL細胞では陽性率及び個々の細胞の活性度の低下がみられたことから、PNPはBリンパ球の成熟の程度を知るために、又Bリンパ球型CLLの生化学的亜型を識別するために利用でき得ると推測される。

ラットの胸腺細胞では、成熟に伴いPNP活性値は上昇し、逆にADA活性値は低下するとの報告がある。Tリンパ球型CLL、成人T細胞白血病及びSézary症候群を含む3例のTリンパ球疾患患者リンパ球では、正常リンパ球に比べ低いPNP活性値及び正常かそれ以上の高いADA活性値を示した。これらの酵素活性は、ヒトTリンパ球の成熟の過程で、ラットの胸腺細胞と同じく、変動することが推測される。

## 結 語

未固定ヒトリンパ球を材料とするPNP及びADA細胞化学的染色法を新たに開発した。生リンパ球浮遊液と酵素活性検出用試薬を含むagaroseゾルをスライドガラス上で混合し、ゲル化後酵素反応を行わせた。反応後乾燥させ鏡検した。酵素活性陽性細胞は、細胞内に反応の最終産物であるformazanの顆粒が散在性に生成されることで識別された。個々の細胞の酵素活性の強さを知るために、陽性細胞の活性度を顆粒生成数により、低、中、高度の三段階に分類した。

健常成人末梢リンパ球の平均PNP及びADA活性陽性細胞率は、未分画リンパ球分画、Tリンパ球分画及び補体レセプター陽性細胞分画で91%以上であった。これら各分画の示す高い陽性率から、PNP及びADA活性はTリンパ球ばかりでなくBリンパ球にも存在するとの結論を得た。これら各分画の陽性細胞の大部分は中等度活性を示した。

リンパ球増殖性疾患患者リンパ球のPNP及びADA染色を行い、酵素活性の検討をした。CLL患者9例のリンパ球では、PNP活性陽性細胞率の低下が認められ、さらに酵素活性低度陽性細胞の比率が増加していることを認めた。5例のBリンパ球型CLL患者リンパ球のADA染色結果も、PNPのそれと同様であることを認めた。

## 論文審査の結果の要旨

Puine代謝の salvage 経路にある purine nucleotide phosphorylase (PNP) 及び ade-

inosine deaminase (ADA) はリンパ球機能と密接な関係があると考えられている。すなわち、ヒトの PNP 欠損症では、細胞性免疫不全症を、ADA 欠損症では重症複合免疫不全症を発症することが知られており、また慢性リンパ性白血病では、細胞性免疫能低下とともに、PNP 及び ADA 活性の低下が報告されている。しかし、PNP 及び ADA 活性の変動は従来主として生化学的測定法によって行われていたため、リンパ球 subpopulation における異常との関係は明確でなかった。

本研究は、PNP 及び ADA の新しい細胞化学的染色法を開発し、リンパ球 subpopulation におけるこれら酵素活性の異常、各種リンパ増殖性疾患におけるリンパ球異常などについて検討を行ったものである。

観察対象は健康人 21 例及びリンパ増殖性疾患 17 例で、ヘパリン加静脈血より Ficoll-sodium metrizoate 比重遠心法を用い単球を除去したリンパ球分画、T リンパ球及び補体レセプター陽性細胞を単離した。PNP 及び ADA の細胞化学染色は次の様に行った。単離したリンパ球を未固定のまま酵素活性検出用試薬を含む agarose とスライドガラス上で混合し、ゲル化させたのち酵素反応を行わせた。基質である inosine 及び adenosine が最終的に尿酸に酸化される際、予め添加してあった tetrazolium が還元されて不溶性の青色 formazan 顆粒を生じる反応が利用されている。別にリンパ球の超音波破碎液について PNP 及び ADA の生化学的測定を行い細胞学的所見と比較することも行われている。なお B リンパ球の固定には SmIg による蛍光抗体法を用いた。

本研究で得られた知見は次のようである。まず健康人末梢リンパ球では、T リンパ球及び補体レセプター陽性細胞のいずれも PNP 染色及び ADA 染色は陽性で、従来の諸報告と異なりこれらの酵素活性が B リンパ球にも存在することが確認された。これは未固定染色法による酵素失活の防止と関係があると考えられた。また、PNP 欠損症で T リンパ球のみ機能不全におちいる機構は、T、B 両リンパ球間の酵素局在の有無からでは説明できないとの結論をえた。リンパ増殖性疾患についての成績はつぎのようである。慢性リンパ性白血病 ( $\beta$ -リンパ球型) での PNP 活性の低下は、PNP 活性陽性細胞率の低下のほか個々の細胞の陽性度低下もその原因になっていることを認めた。また、生化学的測定による ADA 活性の低下は、個々の細胞の活性度低下によることが明かになった。正常の T B リンパ球は、PNP 及び ADA とともに中等度陽性を示すことから、CLL の場合の活性低下は B リンパ球の腫瘍化と関係があるものと考えられた。一方、T リンパ球型 CLL、成人 T 細胞白血病、null cell 型 ALL、null cell 型リンパ肉腫症では PNP 活性低下と個々の陽性細胞の活性度低下がみられたが、ADA 活性は正常または高値で、ADA 染色陽性度も中等度以上であった。これらの結果はリンパ増殖性疾患では、病型、起原細胞などによって、PNP 及び ADA の動態が異なることを示し、PNP、ADA 染色が細胞レベルでの病型鑑別に役立ちうることを示している。

以上、本研究は新しく PNP と ADA 細胞化学染色法を開発し、これを用いてリンパ系腫瘍細胞を分析したもので本研究の成果は、ADA または PNP 欠損を病因とする免疫不全症の診断及び病態解析、リンパ増殖性疾患の病型分類などのほか、PNP と ADA の特異的阻害剤のリンパ系腫瘍の治療に応用するにあたっての症例または薬剤の選択にも活用されるものと期待される。

本研究者はこのような価値ある集積を得たので医学博士の学位を得る資格があるものと認めた。