

## Acid $\alpha$ -naphthyl Acetate Esterase : Tリンパ球の標識酵素としての特異性・感度の再検討

川崎医科大学 人体病理学教室

福屋 崇, 真鍋 俊明, 日浦 研哉  
西崎 真住, 狩屋伊津美, 山成 憲子  
山下 貢司

(昭和56年9月27日受付)

### Acid $\alpha$ -naphthyl Acetate Esterase : Re-evaluation of its Specificity and Sensitivity as the Marker Enzyme for T-lymphocyte

Takashi Fukuya, Toshiaki Manabe  
Kenya Hiura, Masumi Nishizaki  
Izumi kariya, Noriko Yamanari  
and koshi Yamashita

Department of Human Pathology, Kawasaki Medical school

(Accepted on Sept. 27, 1981)

リンパ球中に証明される Acid  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase (ANAE) のスポット状陽性顆粒の存在は Tリンパ球に特異的であるとされているが, E rosette 形成細胞内の出現頻度, EAC rosette 形成細胞内の出現頻度に関しては一定の統一見解をみない. 我々は手技の違い, 陽性の確認法の違いによる誤差を考慮に入れ, ANAE の Tリンパ球の標識酵素としての特異性, 感度の再検討を試みた. 人末梢血中の ANAE 陽性細胞の出現率は  $53.2 \pm 4.3\%$ , E rosette 形成細胞出現率  $52.7 \pm 3.3\%$  と近似値を示したが, E rosette 形成細胞中 ANAE 陽性のは  $72.9 \pm 4.8\%$  であり, また EA, EAC rosette 形成細胞群中にもそれぞれ  $29.7 \pm 2.7\%$ ,  $38.7 \pm 2.6\%$  ANAE 陽性のものがみられた. この結果は Yang らの結果に類似し, 確かに多くの E rosette 形成細胞で ANAE は陽性となるが, EA, EAC rosette 形成細胞でも ANAE 陽性のものがかなり存在し, その特異性, 感度は低いものと考えられた. さらに, Tリンパ球を欠くと考えられているヌードマウス BALB/C nu/nu のリンパ球に ANAE 陽性細胞をみたことも, この結果を支持する所見と思われた.

Acid  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase (ANAE) activity has been known to be a useful T-lymphocyte marker. Incidence of ANAE positivity in E rosette-forming as well as EAC rosette-forming lymphocytes, however, varied to a greater extent among investigators. We tried to re-evaluate their incidence, using different procedures of rosette formation and criteria of positivity. ANAE activity in human peripheral blood lymphocytes was positive in  $53.2 \pm 4.3\%$ , and E rosette-forming cells were

present in  $52.7 \pm 3.3\%$ . ANAE positivity in E rosette-forming cells was  $72.9 \pm 4.8\%$ , but that in EA and EAC rosette-forming cells was also detected in  $29.7 \pm 2.7$  and  $38.7 \pm 2.6\%$ , respectively. Therefore, it can be said that the majority of E rosette-forming cells are positive for ANAE, but many of the other cells may also give positivity. This result is in good agreement with that of Yang et al., indicating dubious specificity of ANAE positivity as T-lymphocyte marker. It was also another supportive evidence that ANAE was positive in some lymphocytes from nude mice (BALB/c nu/nu).

### 緒 言

リンパ球の中には、少なくとも T cell 及び B cell の2つの亜型が存在することが知られている。これらの細胞は、その細胞表面に存在する receptor, 表面免疫グロブリンの有無, 細胞酵素染色法によってある程度識別することができる<sup>1)</sup>。

Non-specific acid esterase の存在は monocyte-macrophage を他の単核球から分離同定するのに広く利用されているが、最近の人及びマウスを用いた研究で non-specific acid  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase (以下 ANAE) がリンパ球にも存在し、その多くのものが T cell であることが明らかにされるようになり、T・B cell 同定の一助を担うようになった<sup>2)</sup>。

しかし、ANAE の T cell 特異性については異論のあるところで、一定見解をみない状態である。例えば人末梢血について、高田<sup>3)</sup>は ANAE 陽性率は T cell で  $91 \pm 4\%$ 、B cell で  $2 \pm 1\%$ と報告し、伊東ら<sup>4)</sup>は E rosette 陽性細胞の約 70%、Yang ら<sup>5)</sup>は E rosette 形成細胞の  $80.6 \pm 2.2\%$ 、EAC rosette 形成細胞の  $44.1 \pm 2.6\%$ は ANAE 陽性であると報告している。

一方、ANAE 染色法はパラフィン切片にも応用され、悪性リンパ腫細胞起源の同定等に幅広く利用されるようになってきている<sup>6)</sup>。従って ANAE の陽性率・特異性について再検討し、その信頼度を認識し、種々の病的状態判定時の一資料とし、その解釈の基本知識としておくことは重要なことと考えられる。

ヒツジ赤血球を用いた E rosette 形成を

T cell のマーカー、EAC rosette 形成を B cell のそれと考え同定して利用するのが一般説であるが、最近これを疑問視する者もいないわけではない。また、T cell の特異抗体 Human T lymphocyte antigen (HTLA) の精製にも問題があり、neonatal thymus を用いた HTLA 抗体産生は heterogeneous と考えられ、その特異性にも疑問が残るのが現状である。ここでは従来の考えに従い、E rosette, EAC rosette はそれぞれある程度 T cell, B cell を反映するものとの立場から、E rosette 形成細胞、EAC rosette 形成細胞の ANAE 陽性について再検討してみた。

### 材料及び方法

#### 1. 材 料

健常成人 15 人より得られたヘパリン加末梢血及びヌードマウス BALB/C nu/nu のリンパ節、脾臓より得られたリンパ球を用いた。

検索手順は Table 1 の通りである。

#### 2. 人末梢血リンパ球の分離法

ヘパリン加人末梢血 4~5 ml を separate-L (比重 1.077) 5 ml を入れた試験管に静かに重層し、2,500 r.p.m., 30 分間、室温にて遠心後中間層を採取し、PBS(-) で 1,500 r.p.m., 5 分遠心洗浄 2 回後の沈渣を集める。

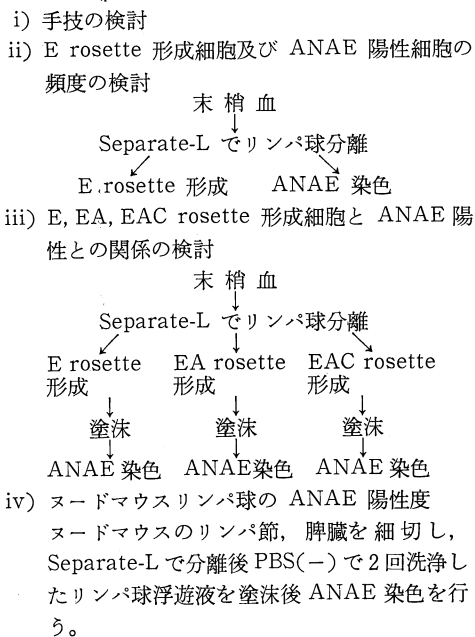
#### 3. E rosette 形成法

E rosette 形成には種々の方法が報告されている。今回、我々は次の3つの方法を比較検討した。

##### i) 試験管法

リンパ球を  $5 \times 10^6$  個/ml の濃度になるように

**Table 1.** Methods of Experiment



ウン胎児血清に浮遊させる。同様に準備した  $1 \times 10^6$  個/ml のヒツジ赤血球を等量混合し,  $37^\circ\text{C}$  にて 15 分静置する。その後, 1,000 r.p.m. で 5 分間遠沈し, そのまま  $0^\circ\text{C}$  で 1 時間静置する。静かに再浮遊させた後, 一方では計算盤上で rosette 陽性の算定をし, また一方で smear を作成した。

ii) 試験管法変法

i) とほぼ同様であるが, 1 回目の静置時間を  $37^\circ\text{C}$  で 1 時間とし, 2 回目を  $4^\circ\text{C}$  で 24 時間とした。

iii) スライドガラス法

小池一須知の方法<sup>7)</sup>に従った。つまり, リンパ球を  $1 \times 10^6$  個/ml の濃度に PBS(-) に浮遊させる。スライドガラス上のビニールテープの穴にリンパ球浮遊液 5  $\mu\text{l}$  を入れ, 湿箱内にて 10 分間放置する。次に 20  $\mu\text{l}$  のウン胎児血清 (FCS) を入れ 10 分間放置後, 毛細管で静かに FCS を吸引除去する。  $1 \times 10^6$  個/ml のヒツジ赤血球を 20  $\mu\text{l}$  入れ湿箱内で  $37^\circ\text{C}$ , 30 分反応後, 冷蔵庫内で 2 時間反応を続ける。未反応の指示赤血球を毛細管で吸引して除き, 直ちに風乾する。

**4. EA 及び EAC rosette 形成法**

日本抗体研究所の抗ヒツジ赤血球抗体を使用した。まず抗血清の凝集価を求め, 凝集前抗体濃度の 1/2 量の濃度のものが使用抗血清液である。

$1 \times 10^9$  個/ml のヒツジ赤血球リン酸緩衝液 (PBS(-)) 浮遊液と抗血清液を等量混合し,  $37^\circ\text{C}$  で 30 分静置。PBS(-) で 3 回洗浄後  $1 \times 10^9$  個/ml に再調整する。さらに, 人血清 50 倍希釈のものを等量混合,  $37^\circ\text{C}$  で 15 分間置き PBS(-) で 3 回洗浄し,  $1 \times 10^8$  個/ml に調整する。(EA rosette 形成ではこの過程を省く。) これに  $1 \times 10^6$  個/ml のリンパ球 PBS(-) 浮遊液を等量混合し,  $37^\circ\text{C}$  で 1 時間静置。1,500 r.p.m. で 5 分間遠心し, 室温で 1 時間静置後 smear から rosette 形成率を求める。

**5. Acid  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase 染色**

それぞれ処理したリンパ球沈渣に FCS を 1~2 滴加え攪拌後 スライドガラス上に塗抹する。風乾後, 直ちに  $4^\circ\text{C}$  に冷却した formol acetate buffer (pH 6.0) の固定液中に 10 分間浸し, 水洗後,  $\alpha$ -naphthyl acetate (シグマ社) を基質, hexazotized pararosaniline (メルク社) を発色剤として PH 5.8 に調整した反応液中で  $37^\circ\text{C}$  2 時間静置。この後水洗し, 1% トルイジン青で 2 分間後染する。

細胞膜に接して赤褐色の 1 個ないしは数個の spot を形成するものを ANAE 陽性リンパ球とした。

**6. 結果判定**

それぞれの手技は 5 回繰り返す, 1 回に 500 個の細胞を検索することにした。rosette を形成した場合, まず赤血球 3 個及び 5 個以上のものでの形成率を比較し, その後は赤血球 5 個以上付着するものを陽性として検索した。また monocyte-macrophage の混入は避けられないものであるため, 細胞総数は全 mononuclear cells をもってし, 必要な場合のみ単球による補正値を求めた。

## 結 果

## 1. E rosette 形成における手技の検定

i) 観察方法の違いによる E rosette 形成率の差

試験管法で形成した E rosette 形成細胞を血球計算盤を使って算定した場合、ガラス棒によるひき延し smear, スプレッダーによる smear 作成後 Giemsa 染色を行なった場合、及びスライドガラス法による E rosette 形成率を赤血球 5 個以上を付着するものを陽性として勘定すると、それぞれ 53%, 51%, 50%, 及び 51% となり有意の差は認められなかった。

ii) E rosette 陽性細胞の同定

E rosette 陽性細胞の criteria は研究者によってまちまちである。そこでリンパ球の周りに 3 個以上赤血球がくっついているものと、5 個以上くっついているものとでどれ程陽性率に差があるかをみたのが Table 2 である。観察

Table 2. Difference in positivity according to two different criteria of rosette formation

| Subject* | 陽性細胞率 (%) |      |
|----------|-----------|------|
|          | 3 個       | 5 個  |
| 1        | 61.0      | 58.6 |
| 2        | 65.2      | 59.4 |
| 3        | 60.9      | 53.4 |
| 4        | 61.3      | 54.8 |
| 平均       | 62.1      | 56.6 |

\* 5 回の平均

方法は、試験管法・ガラス棒によるひき延し smear である。両者間には約 6% の陽性率の差が認められた。

以上の結果から、試験管法で作成した E rosette をガラス棒によりひき延し smear を作成し、必要な酵素染色を行ない、specificity を高める意味を含めて 5 個以上赤血球をつけるものを rosette 形成細胞として同定することとした。

## 2. 人末梢血における rosette 形成細胞及び ANAE 陽性細胞の頻度

人末梢血における E rosette 形成細胞率は

52.7±3.3%, ANAE 陽性細胞率は 53.2±4.3% で、末梢血出現頻度は両方ともほぼ同率で一見相関があるように見える。個々の症例についても、ほぼ同様の相関性がみられた。

## 3. E rosette 及び EA, EAC rosette 形成細胞と ANAE 陽性との関係 (Fig. 1)

各 rosette 形成細胞群における ANAE 陽性率をみたのが Table 3 である。E rosette 形成細胞に 72.9±4.8% と出現率が高いが、E

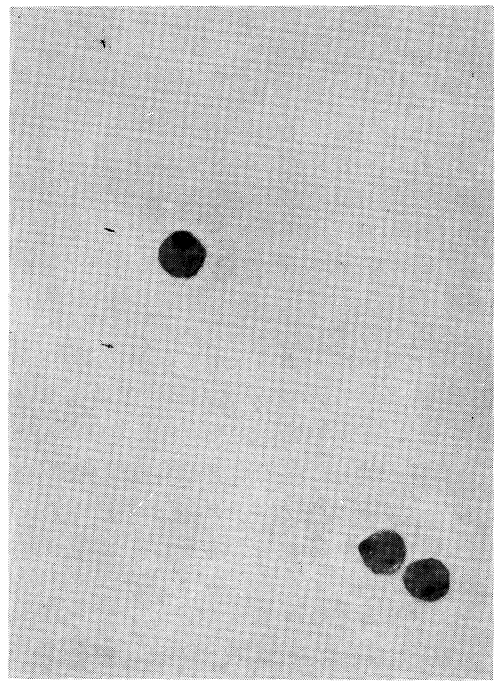


Fig. 1. An E rosette-forming lymphocyte (left upper) with ANAE positive spot. (ANAE stain, original ×400)

Table 3. ANAE positivity in each rosette-forming cell group

| rosette     |   | ANAE 陽性 (%) |
|-------------|---|-------------|
| E rosette   | + | 72.9±4.8    |
|             | - | 55.1±0.9    |
| EA rosette  | + | 29.7±2.7    |
|             | - | 54.4±1.6    |
| EAC rosette | + | 38.7±2.6    |
|             | - | 47.7±0.2    |

rosette 非形成群でも  $55.1 \pm 0.9\%$  の出現をみる。これは、E rosette 形成細胞を specificity を高める目的で、赤血球 5 個以上のものを陽性としたことに多少よるかもしれないが、実際は 3 個以上を陽性とした場合と大きな差はみられなかった。むしろ EA, EAC rosette 形成細胞にも、それぞれ  $29.7 \pm 2.7\%$ ,  $38.7 \pm 2.6\%$  と ANAE 陽性細胞の出現をみる点が重要である。

次に、逆に ANAE 陽性、陰性細胞群での各 rosette 形成率をみたのが **Table 4** である。

**Table 4.** Incidence of rosette formation in ANAE positive and negative cell groups

| ANAE 活性 | E rosette (%)                        | EA rosette (%)                         | EAC rosette (%)                      |
|---------|--------------------------------------|--|--------------------------------------|
| +       | $63.0 \pm 1.3$<br>( $63.8 \pm 2.1$ ) | $23.1 \pm 9.2$<br>( $11.9 \pm 3.3$ )   | $27.4 \pm 1.0$<br>( $15.1 \pm 2.1$ ) |
| -       | $38.9 \pm 5.9$<br>( $44.1 \pm 9.6$ ) | $41.1 \pm 10.5$<br>( $45.8 \pm 10.5$ ) | $34.5 \pm 3.8$<br>( $38.7 \pm 6.3$ ) |

( ) 内は単球による補正值

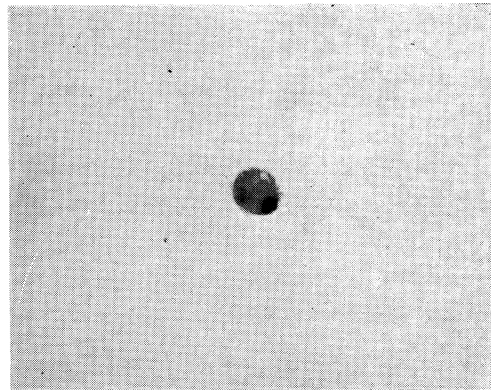
**Table 5.** Incidence of rosette formation in ANAE positive and negative cell groups when three or more RBCs are used as a criterion of positive rosette formation

| ANAE 活性 | E rosette (%)  | EA rosette (%) | EAC rosette (%) |
|---------|----------------|----------------|-----------------|
| +       | $65.1 \pm 2.3$ | $27.4 \pm 4.5$ | $28.7 \pm 2.2$  |
| -       | $42.0 \pm 7.3$ | $45.3 \pm 8.1$ | $40.6 \pm 3.8$  |

ANAE 陽性群では、やはり  $63.0 \pm 1.3\%$  と E rosette 形成率が高く、EA, EAC rosette 形成率と有意の差がある。しかし、これを末梢血液中の全リンパ球の各 rosette 形成率 (E:  $52.6\%$ , EA:  $24.4\%$ , EAC:  $23.9\%$ ) と比較すると、その出現率に特異性があるとはいえない。rosette 形成の sensitivity を高める意味で、赤血球 3 個以上くっつけるものを算定したのが **Table 5** であるが、5 個以上のものと差は認められない。

#### 4. ヌードマウスリンパ球の ANAE 陽性率

ヌードマウスのリンパ節、脾臓から得られたリンパ球を使って ANAE の陽性率を調べる



**Fig. 2.** A lymphocyte from nude mice showing ANAE positivity. (ANAE stain, original  $\times 400$ )

と、リンパ節では  $11.6\%$ 、脾臓では  $9.4\%$  認められた (**Fig. 2**)。

以上の結果から、(1) 人末梢血中の ANAE 陽性細胞の出現率は  $53.2 \pm 4.3\%$  と E rosette 形成細胞出現率  $52.7 \pm 3.3\%$  に近似するが、これは必ずしも ANAE が E rosette 形成細胞に特異的であることを示しているわけではない。

(2) E rosette 形成細胞のうち ANAE 陽性のもは  $72.9 \pm 4.8\%$  と高率であるが、EA, EAC rosette 形成細胞群にも  $29.7 \pm 2.7\%$ ,  $38.7 \pm 2.6\%$  みられ、E rosette 形成細胞に出現率は高いが特異性はやや低い。この結果は Yang ら<sup>5)</sup> の結果に類似する。

(3) Tリンパ球を欠くと考えられているヌードマウスリンパ球にも陽性細胞をみる。ことが明らかとなり、ANAE は Tリンパ球に強い特異性をみないと考えられた。

#### 考 察

リンパ球亜型細胞を同定するマーカーとなるものには諸々のものが存在する。pH 5.8 で行なう esterase 染色では、あるリンパ球はスポット状の陽性顆粒を有し、び慢性に細胞質が染まる monocyte 系と容易に鑑別される<sup>2,4)</sup>。これらの陽性顆粒は Tリンパ球にはほぼ特異的に存在し、Bリンパ球にはほとんど存在しないとす報告が多い。しかし、それに反対する意見も

多く出されており、現在、一定統一見解をみない状態である。従って本法を利用する場合、まずその信頼性を正しく認識しておく必要がある。

一つの検査法を吟味する場合、同一検体を用い、今までに行なわれている検査法で得られた値と、新しい検査法でのそれを比較検討するのが一般である。人末梢血液単核細胞中の E rosette 陽性率と ANAE 陽性率を比較するのがこれにあたるもので、Külenkampff ら<sup>8)</sup>をはじめ、他の研究者同様、我々の結果も良い相関性を示している。しかし、この比較方法は必ずしも両者の同一性を明らかにしているとはいえない。何故なら、両検査法が同じ細胞のもつ違った二つの性質をとらえるものであり、両者共にその特異性に不明瞭さがあるからである。

細胞を対照として二つの違った検査法の同一性をみる時、両者を同一細胞で行ない比較することが可能な場合がある。E, EA, EAC rosette 形成細胞に ANAE 染色を行なうのがこれである。この場合、rosette 形成という比較的不安定な状態を保たせつつ種々の操作を加えるため、false positive, false negative が多くなるのは否めない。rosette 形成細胞群における ANAE 陽性率、非 rosette 形成細胞群における ANAE 陽性率、ANAE 陽性細胞、陰性細胞それぞれに rosette 形成率を調べ比較したのはこのためである。

E rosette 形成細胞中の ANAE 陽性率  $72.9 \pm 4.8\%$  は Davey ら<sup>9)</sup> の  $61 \pm 5\%$ 、伊東ら<sup>4)</sup> の  $70\%$ 、Yang ら<sup>5)</sup> の  $80.6 \pm 2.2\%$  に近似するが、高田<sup>3)</sup> の  $91 \pm 4\%$ 、西部ら<sup>10)</sup> の  $94.0 \pm 2.9\%$  に比べ低い。EAC rosette 形成細胞中の ANAE 陽性率  $38.7 \pm 2.6\%$  は Yang らの報告

$44.1 \pm 2.6\%$  に近似し、高田の  $2 \pm 1\%$ 、西部らの  $4.8 \pm 1.1\%$  とは大きく異なる。我々は、これらの報告の大きな差異がどこからくるのか説明することはできない。Rosette 形成法、陽性細胞判定法、smear の作成法、その他色々検討を加えたが、これほどの差異を生じさせ得る原因をみつけだすことはできなかった。いずれにせよ、我々の結果は Yang らと同様、確かに多くの E rosette 形成細胞で ANAE は陽性となるが、EA, EAC rosette 形成細胞のかなりのものも ANAE 陽性であることを示している。

最近、E rosette の T cell 特異性に関して批判的な意見が出され始めている。HTLA に最高の T cell 特異性を持たせるべきと考えられるが、その作成方法の点から、その特異性にも多少の疑問が残される。Monoclonal antibody の作成までは、その特異性に関しては、いずれの方法にも不明確さが残るわけである。従って、T cell の中にのみ ANAE が陽性であることを証明するのみでなく、逆に B cell の中に ANAE 陽性となる細胞が存在することを明らかにしようと考えた。手技の問題、同一細胞で ANAE 陽性がみられること、マウスも人同様 ANAE が T cell に特異的といわれていることを考慮に入れて、T cell が存在しないとされるヌードマウス BALB/C nu/nu のリンパ節及び脾臓から得られたリンパ球を用いて ANAE の陽性率をみた。それぞれ  $11.6\%$ 、 $9.4\%$  の陽性率をみたことは、さらに B cell の中にも ANAE が陽性であるものがかなりあることを示唆する所見と考えられた。

この実験結果から、ANAE は T cell に特異的とはいえ、本法を T cell の同定に用いる場合には注意を要すると考えられた。

## 文 献

- 1) Parker, J. W.: Immunological approach to lymphoid neoplasms. In Malignant lymphoproliferative disease, ed. by Van den Tweel, Boston, Leiden Univ. Press. 1980, pp. 85—110
- 2) Schwarze, E. W.: Cytochemical methods. In Malignant lymphoproliferative disease, ed. by Van den Tweel, Boston, Leiden Univ. Press. 1980, pp. 137—148
- 3) 高田勝利: 悪性リンパ腫のマーカー検索法と細胞化学. 臨床病理 28: 733—739, 1980

- 4) 伊東恭悟, 佐藤 譲, 安原 徹, 熊谷勝男: ヒト末梢血単球ならびにリンパ球(T細胞)の Acid  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase 染色による検出. 日本免疫学会編: 免疫実験操作法. 日本免疫学会 1978, pp. 2173—2176
- 5) Yang, T. J., Jantzen, P. A. and Williams, L. F.: Acid  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase: Presence of activity in bovine and human T and B lymphocytes. *Immunol.* 38: 85—93, 1979
- 6) Ranki, A., Reitamo, S., Kontinen, Y. T. and Häyry, P.: Histochemical identification of human T lymphocytes from paraffin sections. *J. Histochem. Cytochem.* 28: 704—707, 1980
- 7) 小池考一, 須知泰山: 形能学的観察に適したロゼット形成法. 日本免疫学会編: 免疫実験操作法. 日本免疫学会 1977, pp. 1859—1863
- 8) Kulenkampff, J. Janossy, G. and Greaves, M. F.: Acid esterase in human lymphoid cells and leukaemic blasts: a marker for T lymphocytes. *Brit. J. Haematol.* 36: 231—240, 1977
- 9) Davey, F. R., Dock, N. L. and MacCallum, J.: Cytochemical reactions in resting and activated T-lymphocytes. *Am. J. Clin. Pathol.* 74: 174—179, 1980
- 10) 西部久美子, 清水千里, 塚田理康: ヒトリンパ球における Acid  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase の染色性について. *臨床病理* 28: 271—273, 1980