

リンパ球膜抗原による成人T細胞白血病の重症度の評価

石井俊徳・岩下孝子・前川るりこ・坂本由美
佐々木貴子・二見玄次郎・高月 清

Estimation of severity of adult T cell leukemia by cell surface antigens of peripheral blood lymphocytes

Toshinori Ishii¹⁾ Koko Iwashita²⁾ Ruriko Maekawa²⁾ Yumi Sakamoto³⁾
Takako Sasaki⁴⁾ Jenjirou Futami⁵⁾ Kiyoshi Takatsuki⁵⁾

Although there is clinical classification of ATL which reflects severity of disease, its criteria is not essentially objective. As surface antigen profiles of ATL cells reveal some kinds of characteristics depending on each clinical type of ATL, we quantified clinical severity of ATL as severity score by multiple regression analysis with CD4, CD25, CD29 and CD45RA. The severity score significantly correlated with survival time and degree of organ involvement. But LDH value correlated only with the latter. And corrected calcium level did not correlate with the both. We could estimate prognosis of patients of ATL by making regression formula which calculated one year survival rate and 50% survival time with severity score. Improvement of severity score seemed to relate with survival time, so we speculated that severity score was useful to estimate both the treatment effect and the severity in ATL.

Key Words : Adult T cell leukemia (ATL) Cell surface marker Clinical type Severity score

はじめに

成人T細胞白血病(ATL)は最初高月等¹⁾により特徴的なATL細胞(いわゆる花冠状細胞)の出現と著しい地域特異性により独立した疾患として報告され、臨床的血液学的に診断されてきたが、その後症例を積み重ねることにより臨床像の多様性²⁾が明らかとなってきた。ATLはレトロウイルスの一種であるhuman T-cell leukemia virus type I (HTLV-I)に感染したキャリアーの一部が感染T細胞の腫瘍化により発症する疾患であり、その感染経路は母乳に

よる感染、輸血による感染、性交による感染の三つがある。感染T細胞の腫瘍化の過程は明らかでないが、HTLV-I遺伝子内のtaxによるIL-2とIL-2Rの発現の増強、感染細胞のポリクローナルな増殖、さらに未知の第二の変化によって感染細胞のクローンが選択されモノクローナルな細胞増殖へと進む³⁾と考えられている。

ATLは臨床的に腫瘍細胞数、血清LDH、血清Ca、臨床症状などをもとにくすぶり型、慢性型、急性型と非白血性のリンパ腫型に分類される。この分類はATLの進行と重症度を反映しており病型分類というよりも病期分類であるが、その基準はかなり曖昧でおおまかな分類であり、各病型の中にも様々な病態のATLが含まれていることが多い。したがって臨床的に治療方針の確立、治療効果の評価、予後判定等に

- 1) 熊本大学医療技術短期大学部衛生技術学科
- 2) 済生会熊本病院検査部
- 3) 熊本大学医学部付属病院中央検査部
- 4) 熊本赤十字健康管理センター
- 5) 熊本大学医学部第二内科

用いるには問題点も多い。

他方 ATL 細胞の細胞膜抗原についてみると、ATL に共通した特徴と各病型によって異なる特徴がみられる⁹⁾ したがってこれらの膜抗原の特徴をもとに ATL の重症度を数量化することができれば、病型分類よりも客観的なより現実 に即した重症度の評価が可能と考えられる。そこで ATL 細胞の膜抗原による重症度の数量化の試みと症例、その臨床的有用性について検討した。

症 例

熊本大学付属病院第二内科を受診した抗 HTLV-I 抗体陽性の患者のうち比較的典型的な ATL 患者を対象とした。ATL 症例の臨床病型の判定は Lymphoma Study Group (LSG) の病型分類⁹⁾ にしたがった (表1)。症例数は ATL 急性型 27 例 (男:女=15:12, 平均年齢 57.0 歳), 慢性型 12 例 (男:女=3:9, 平均年齢 52.3 歳), くすぶり型 23 例 (男:女=11:12, 平均年齢 61.2 歳), 健常人 29 名 (男:女=13:16, 平均年齢 48.5 歳), をコントロールとした。臨床検査ではリンパ球数, LDH, Ca いずれも急性型のみ他の病型と有意差があった。ATL の重症度の数量化の基準として, 急性型に 3, 慢性型に 2, くすぶり型に 1, 健常人に 0 の数値を当てた。重症度の数量化以外の解析には新たにリンパ腫型 5 例を加えた。また臓器浸潤の

程度を肝, 脾, 肺, 骨髄, 中枢神経系, 深部リンパ節は 2 点, 皮膚, 表在リンパ節, 抹消血は 1 点として数値化して表した。

方 法

1. リンパ球膜抗原の測定

リンパ球膜抗原のモノクローナル抗体 (MoAb) による染色はヘパリン加静脈血 100 μ l と至適量の蛍光色素標識 MoAb を混和し遮光下で 4°C 30 分反応させ, 赤血球溶解液 2 ml を加え溶血後, リン酸緩衝食塩液 (PBS) で洗浄し行った。間接蛍光抗体法の場合は, 二次抗体として Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識 goat anti-mouse Ig (Tago, Inc., Burlingame, CA, USA) を用いた。蛍光抗体染色細胞は 5~10x10⁵/ μ l の濃度に PBS に浮遊しフローサイトメトリ-Cytoron (オーソ社) に 400 μ l を吸引させ 488nm のアルゴンイオンレーザー光の前方散乱光, 側方散乱光, 緑色蛍光, 赤色蛍光の 4 パラメーターを測定した。データは外部出力 RS232C を介して Cytoron よりデータ解析装置 DS-1 (オーソ社) に送り陽性率と平均蛍光強度 (MFI) を解析した。直接蛍光抗体法の場合 single color は FITC 標識抗体を, two color の場合 FITC 標識抗体と phycoerythrin (PE) 標識抗体を組み合わせて用いた。

表 1 ATL の臨床分類, 病像と重症度スコア

臨床病型	くすぶり型	慢性型	急性型	正常人
症例数	23	12	27	29
年 齢	61.2 \pm 13.7 *	52.3 \pm 11.9	57.0 \pm 12.3	48.5 \pm 18.5
性(M:F)	11:12	3:9	15:12	13:16
リンパ球数 (/ μ l)	2,090 \pm 1,039	6,742 \pm 3,982	46,471 \pm 50,741	1,991 \pm 576
LDH (u/l)	345 \pm 136	274 \pm 136	1,156 \pm 744	ND
Ca (mg/dl)	9.0 \pm 1.0	9.0 \pm 0.5	11.2 \pm 2.8	ND
重症度スコア	1	2	3	0

** Mean \pm SD, ND: not done

MoAb は pan T に対して CD2 (OKT11 : Ortho Diagnostic System Inc., N.J., USA), CD3 (OKT3 : Ortho), pan B に対して CD20 (B1 : Coulter Immunology, Hialeah, Fla, USA), NK cell に対して CD16 (OKNK : Ortho), T cell subset に対して CD4 (OKT4 : Ortho), CD8 (OKT8 : Ortho), CD4+T cell subset に対して CD4+CD29 (4B4 : Coulter), CD4+CD45RA (2H4 : Colter), CD8+T cell subset に対して CD8+CD11b (Mo-1 : Coulter), 活性化 T に対して CD25 (IL-2R, Becton Dickinson, Mountain View, Cal, USA), CD4+HLA-DR (OKDR : Ortho) を用いた。

2. データの統計処理

データの統計処理は Macintosh IICx と統計ソフト JMP (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用い、基礎統計, Student's t-test および重回帰分析を行った。また生存曲線の作成および生存率の一般化ウイルクソン検定は医療統計処理ソフト STAX (中山書店) を用いて行った。

結 果

1. ATL の各臨床病型間の膜抗原の変化 (表2)

各病型で膜抗原を比較すると, CD2, CD4, CD25, HLA-DR+CD4+はくすぶり型, 慢性型, 急性型と病態が重症化するにつれて陽性率は高くなり, CD8, CD16, CD20, CD45RA+CD4+は逆に低くなった。また ATL の膜抗原の変化の特徴の一つである CD3MFI の低下も重症化にしたがって強くなった。しかし, CD29+CD4+は慢性型までは陽性率は増加したが, 急性型は低下した。次に各病型間で t-検定を行ってみると, 慢性型ではくすぶり型に対して CD2, CD3, CD4, CD29+CD4+の陽性率が有意に増加しこれらの膜抗原は腫瘍量を反映していると考えられた。また, CD25 の陽性率の増加と CD3MFI の低下も有意差がみられ, 腫瘍細胞が活性化 T 細胞であることを示していた。反対に CD8, CD16, CD20, CD45RA+CD4+は有意に減少していた。急性型では CD2, CD4, CD25 は慢性型と比べて有意に増加し, 腫瘍細胞が慢性型よりさらに増加していることを示していた。他方 CD29+CD4+ は逆に有意に低下し, この抗原の変化が ATL の重症化に関係していることが示唆された (図1)。また CD25 が

表2 ATL の各臨床病型間の膜抗原の変化

臨床病型	くすぶり型	慢性型	急性型	正常人
CD2	86.7±7.6 *	93.6±4.8	97.7±2.4	84.7±6.3
CD3	72.2±11.7	86.8±9.9	76.8±28.6	69.3±9.6
CD3 MFI	106.6±25.9	56.1±30.0	35.4±21.8	108.3±30.6
CD4	52.4±14.3	79.6±15.2	89.1±9.9	41.8±10.2
CD8	24.5±13.7	8.5±6.7	6.1±5.3	30.2±9.5
CD4/CD8	2.9±1.9	19.7±18.2	41.1±50.2	1.6±0.8
CD20	11.1±10.6	5.1±3.5	2.1±2.6	10.8±5.2
CD25	20.2±8.7	58.6±21.0	73.1±15.4	8.3±4.6
CD16	17.5±9.5	7.9±6.8	2.7±2.8	21.5±9.3
CD45RA+CD4+	18.3±9.4	4.6±5.2	4.6±4.0	19.8±8.7
CD29+CD4+	30.3±12.4	59.9±20.2	37.1±31.8	19.6±6.5
HLA-DR+CD4+	14.1±10.5	15.7±17.3	23.5±24.6	4.4±3.5

* Mean±SD, MFI:平均蛍光強度, その他は陽性率

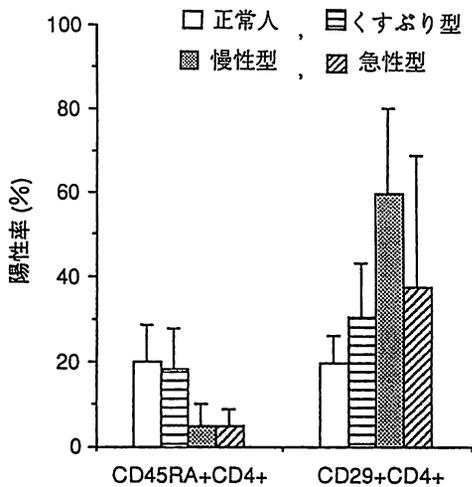


図1 ATLの各臨床病型におけるCD4陽性T細胞亜群

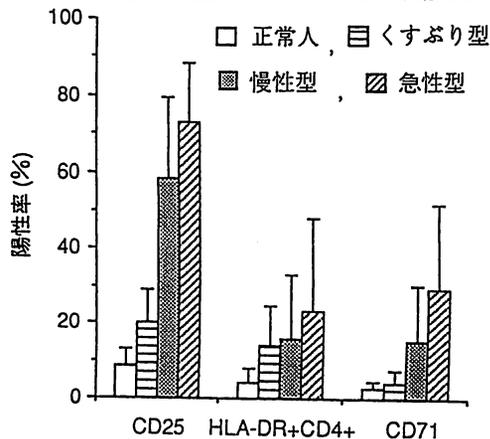


図2 ATLの各臨床病型における活性化T細胞

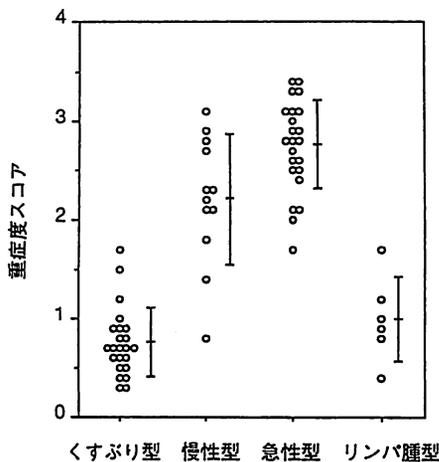


図3 ATLの重症度スコアと臨床病型
縦棒はMean±SD

慢性型、急性型で高度陽性なのに比較してHLA-DR+CD4+, CD71が相対的に陽性率が低いこともATLの活性化抗原の特徴の一つと考えられる(図2)。

2. 重回帰分析によるATLの重症度の数量化

ATLの各病型間でt-検定で有意差のみられた抗原を説明変数として重回帰分析を行った。

変数増減法により多重共線性を有する変数を取捨選択し次の重回帰式を得た。

$$\text{重症度スコア} = -0.143 + 0.018 \times \text{CD4}\% + 0.021 \times \text{CD25}\% - 0.02 \times (\text{CD4} + \text{CD45RA} +) \% - 0.003 \times (\text{CD4} + \text{CD29} +) \%$$

重相関係数は0.922, 残差の標準偏差は0.481と, 当てはまりはかなり良い回帰モデルと考えられる。この回帰式で計算した重症度スコアと病型との関係(図3)をみると, 典型的と思われる症例を選んだにもかかわらず急性型, 慢性型, くすぶり型のいずれも重症度スコアの偏差が大きく, 同じ病型でも重症度はかなり不均一であると思われた。この結果は症例の重症度をくすぶり, 慢性, 急性の三段階で評価するには無理があることを示している。また今回対象としなかったリンパ腫型症例の末梢血の重症度スコアを見ると, くすぶり型に相当しており非白血性を裏付けていた。

3. 重症度スコアと臨床的パラメーターの関係(表3)

重症度スコアは腫瘍細胞(CD4+CD25+細胞)数の対数と $r=0.939$, 臓器浸潤度と $r=0.765$ と非常に高い相関性がみられた。また生存日数とも $r=-0.444$ と有意の相関がみられ, 重症度スコアがATLの重症度評価に有用であることを示している。LDHの場合臓器浸潤と腫瘍細胞数とは有意の相関がみられたが, 生存日数とは相関はみられず, またCaでは腫瘍細胞とのみ低い相関がみられたに過ぎない。したがってLDHやCaよりも重症度スコアの方がATLの重症度の評価に優れているといえよう。

表3 重症度スコアのATL重症度と検査データとの相関性

	重症度スコア	LDH	Ca	腫瘍細胞数
生存日数	-0.444 *	-0.322	-0.370	-0.471 *
臓器浸潤	0.765 **	0.382 *	0.232	0.790 **
腫瘍細胞数#	0.939 **	0.615 **	0.304 *	-
Ca	0.315 **	0.268	-	-
LDH	0.407 **	-	-	-

* p<0.05, ** p<0.01, # 対数変換

4. 重症度スコアと予後

死亡例 25 例について初診時からの生存日数と重症度スコアとの関係を見ると、 $r = -0.444$ と高い相関性があった。そこで症例を重症度スコアの 1.5 と 2.5 で 3 群に分け、累積生存率の推移 (図4) を一般化ウイルコクソン検定すると、3 群間で重症度スコアが高いほど有意に生存率の低下がみられた。この場合 50% 生存期間は 2.5 以上の群で 225 日、1.5 以上 2.5 未満の群で 1,689 日以上であった。さらに重症度スコアから 50% 生存期間および 1 年生存率を推定する回帰式の作成を試み、次の式を得た。

$\log(50\% \text{ 生存期間}) = 4.69 - 0.83 \times \text{重症度スコア}$
 $r = -0.97$

1 年生存率 = $109.3 - 24.5 \times \text{重症度スコア}$
 $r = 0.98$

この式により重症度スコアからかなり高い精度で予後推定が可能である。

5. 重症度スコアによる ATL の治療効果の評価

ATL の治療は主に急性型が対象となり、VEPA, VEPA-Bleo, VEPAM などの多剤併用化学療法が行われる。慢性型やくすり型の場合穏和な化学療法や最近では一種の免疫療法である extracorporeal photochemotherapy[®] という方法が試みられている。治療効果は治療前に異常を示す症状や検査データについて、完全に正常化した場合を完全寛解 (CR), 50% 以上

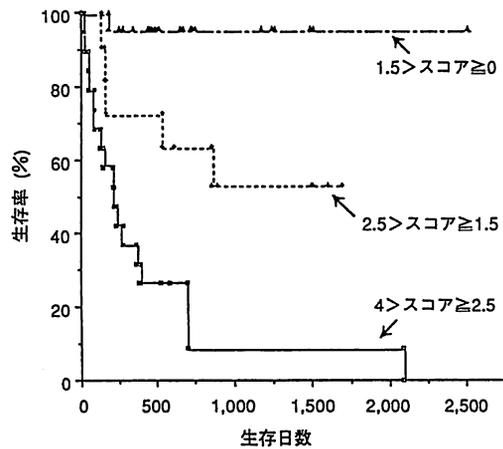


図4 ATLの重症度スコア別の累積生存率の推移の改善を部分寛解 (PR) として判定しているのが現状である。重症度スコアは臨床的パラメーターともかなりの相関を有しており、治療効果判定にはより有用と思われる。事実臨床の評価では (表4) PRにもかかわらず重症度スコアでは 3.3→3.0, 3.0→2.8 と殆ど改善せず 141 日、101 日で死亡した急性型 ATL の 2 例 (症例1, 2) を経験している。また治療前のスコアが 2.6 であった症例 4 は治療後 2.2 とやや改善し、225 日生存した。また症例 3 の場合には重症度スコアが 2.8 から 0.5 と著しく改善し臨床の評価でも CR となり、700 日生存した。これらの 4 症例はいずれも従来の検査データについては治療後かなりの改善がみられた症例であるのに、予後に関しては大きな差がみられたわけである。

このことは治療前の重症度スコアによって治療効果がある程度推定できること、また治療効果の評価に重症度スコアが有用である可能性を示唆している。

考 察

岡本⁷⁾はATLをその発症年齢分布が、Weibullおよびガンマ分布に従い多段階発癌モデルによく沿うことから5つの独立の事象(危険因子)の蓄積により成立する現象とし、HTLV-I感染はその1つと考えているが、他の4つの因子については不明としている。我々はATLの発症増悪に関与している膜抗原としてCD3, CD4, CD25, CD29, CD45RA, HLA-DRを考えている⁸⁾が、これらの膜抗原の変化が危険因子の1つによって惹起されている可能性は十分にあり、危険因子を捜し出す手がかりとなることを期待している。

重症度スコアは臨床分類を基準とし膜抗原を変数として回帰式より計算し、臨床分類は腫瘍細胞数、LDH, Ca, 臓器浸潤などから総合的に判定する。したがって重症度スコアとこれらの臨床パラメーターとの間にはある程度の相関は予想されたが、血清Caを除けば相関性は高く、特に腫瘍細胞数はこれだけで重症度スコアが計算出来そうな程に相関性が高い。このことは重症度スコアがATLの重症度と関係していると

考えられるパラメーターを良く反映していることを示している。

ATLの高Ca血症の機序としては腫瘍細胞由来のparathyroid hormone-related protein (PTHrP)の関与が考えられている⁹⁻¹²⁾が、たとえATL細胞が高Ca血症に関係しているとしてもその細胞が悪性度が高いことを意味しているのではない。つまり高Ca血症があれば一般的な意味で臨床的に重症であるが、ATLの重症度が高いことの指標にはならないことを意味している。急性型でも高Ca血症をきたさない症例もかなりあることはこの考えを支持している。

治療前の重症度スコアによって回帰式により1年生存率や50%生存日数を推定することは、治療法のレベルが同じであればある程度可能と考えられるが、症例を追加し治療後のスコアの変化などの情報を加えればより精度の高い予想が可能と思われる。また重症度スコアにより治療時期、治療内容の決定、治療効果の評価を行えば治療成績も向上するものと考えられる。

おわりに

HTLV-Iに感染しているか否かは抗HTLV-I抗体の測定によりほぼ100%判定できるが、被感染者がどのような病態にあるかを判定するのは必ずしも容易ではない。従来の病型分類に加

表4 重症度スコアによるATLの治療効果の評価

症 例 治 療	1.SM M69		2.HF M65		3.TF M42		4.AK M48	
	前	後	前	後	前	後	前	後
スコア	3.3	3	3	2.8	2.8	0.5	2.6	2.2
白血球数	126,000	8,630	35,900	3,310	14,190	2,210	19,000	5,000
リンパ球数	57	66.2	66	55.2	48.9	40.9	74.9	25
LDH	1,300	235	799	388	524	333	ND	388
Ca	12.1	9.9	9.8	13.3	9.5	9	ND	8.4
浸潤臓器	肝、脾、骨髓		肝、脾、骨髓		リンパ節		リンパ節、肝	
生存日数	141		101		700		225	

えて重症度スコアのようなより客観的より数量的な病態の評価法を活用することで、治療効果ひいては予後の改善へとつながることを期待したい。

文 献

1. Takatsuki, K. et al.: Adult T cell leukemia in Japan. In Topics in Hematology (edited by Seno, S. et al.), p73-77, Excerpta Medica, Amsterdam, 1977.
2. Yamaguchi, K., et al.: A proposal for smoldering adult T-cell leukemia (smoldering ATL): A clinicopathologic study of 5 cases. *Blood* 62 : 758-766, 1983.
3. Yoshida, M.: Expression of the HTLV-I genome and its association with a unique T-cell malignancy. *BBA* 907 : 145-161, 1987.
4. 石井俊徳他: 成人T細胞白血病の臨床分類と表面マーカー. *臨床免疫* 19 (suppl. 11) : 96-105, 1987.
5. Shimoyama, M., et al.: Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukemia-lymphoma. *Br. J. Haematol.* 79 : 428-437, 1991.
6. Futami, G., et al.: Treatment of adult T-cell leukemia and progressive systemic sclerosis by extracorporeal photochemotherapy. *Therapeutic Plasmapheresis*. (IX) : 89-95, 1991.
7. Okamoto, T., et al.: Multi-step carcinogenesis model for adult T-cell leukemia. *Jpn. J. Cancer Res.* 80 : 191-195, 1989.
8. 石井俊徳他: Extracorporeal photochemotherapyによるATL細胞膜抗原の変化. *臨床免疫* 21 : 409-415, 1989.
9. Motokura, T., et al.: Expression of parathyroid hormone-related protein in a human T cell lymphotropic virus type-I infected T cell line. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 154 : 1182-1188, 1988.
10. Fukumoto, S., et al.: Secretion of parathyroid hormone-like activity from human T-cell lymphotropic virus type I-infected lymphocytes. *Cancer Res.* 49 : 3849-3852, 1989.
11. Motokura, T., et al.: Parathyroid hormone-related protein in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Ann. Intern. Med.* 111 : 484-488, 1989.
12. Watanabe, T., et al.: Constitutive expression of parathyroid hormone-related protein gene in human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) carriers and adult T cell leukemia patients that can be trans-activated by HTLV-I tax gene. *J. Exp. Med.* 172 : 759-765, 1990.

抄 録

ATLには急性型、慢性型、くすぶり型という重症度を反映した病型分類があるが、必ずしも客観的な分類ではない。ATL細胞の膜抗原のいくつかは各臨床病型によって異なる特徴がある。そこでCD4、CD25、CD4サブセット(CD45R、CD29)を用いて重回帰分析によりATLの重症度を数量化(重症度スコア)した。この重症度スコアは腫瘍細胞数のみならず生存日数や臓器浸潤度と有意の相関がみられたが、LDH値は臓器浸潤度のみ相関がみられ、Ca値はともに相関がなかった。また重症度スコアを用いて、1年生存率と50%生存期間を推定する回帰式が高い相関性をもって作成でき、重症度スコアは予後の評価に有用であると考えられた。さらに治療前後の重症度スコアの変化をみるとスコアの改善と生存日数は関係しているように思われ、治療効果の評価にも有用と思われた。