

ヒト白血病細胞の中性糖脂質

京ヶ島 守

信州大学医学部心臓血管病研究施設脂質生化学部門
(主任: 武富 保教授)

Neutral Glycosphingolipids in Human Leukemic Cells

Mamoru KYOGASHIMA

*Department of Lipid Biochemistry, Institute of Cardiovascular
Disease, Shinshu University School of Medicine
(Director: Prof. Tamotsu TAKETOMI)*

Neutral glycosphingolipids from human leukemic cells in 7 myeloid cases and 3 lymphoid cases were analyzed.

Neutral glycosphingolipids showed remarkable differences according to whether they were from myeloid and lymphoid cells or undifferentiated and differentiated cells. Although glucosylceramide, lactosylceramide, lactotriaosylceramide and neolactotetraosylceramide were found as common components in the myeloid cells, the cells in chronic myelogenous leukemias contained about 7 times the amount of neutral glycosphingolipids than those in acute myelogenous and monocytic leukemias and in chronic myelomonocytic leukemia. Globotetraosylceramide was also found in one case of acute monocytic leukemia. In contrast to the myeloid cells, the cells in acute lymphoblastic leukemias contained a smaller amount of neutral glycosphingolipids, which contained glucosylceramide and lactosylceramide as common components. Galactosylceramide was also found in 6 specimens of the myeloid cells and 1 specimen of the lymphoid cells.

Cholesterol and phospholipid contents were slightly lower in the lymphoid cells than in the myeloid cells. The molar ratio of ethanolamine plasmalogen to phosphatidylethanolamine (EP/PE) was clearly different between the myeloid and lymphoid cells: it was higher than 1.0 in the former and lower than 1.0 in the latter. *Shinshu Med. J.*, 35: 74—90, 1987

(Received for publication August 4, 1986)

Key words: neutral glycosphingolipid, human myeloid leukemia, human lymphoid leukemia
中性糖脂質, ヒトミエロイド系白血病, ヒトリンパ系白血病

I 緒 言

スフィンゴ糖脂質(以下糖脂質)は一般に動物細胞に広く分布し、脂質部分であるセラミドが細胞膜脂質二重層の中に埋めこまれ、糖鎖部分を細胞外表層にむけ存在すると考えられている¹⁾。糖脂質は細胞膜の主

要構成脂質であるコレステロールやリン脂質にくらべ、きわめて微量でありながら²⁾、細胞や組織に特異的なパターンを示し、細胞の識別マーカーの役割を示す。細胞表面の抗原物質のいくつかは、糖脂質の糖鎖であることはこういった事実を背景にもつ。さらにこうした特異的なパターンは、細胞の分化度、組織の成育度

をも反映する。胎児や新生児赤血球にみられる ABH 型物質の減少³⁾や、胎児脳にみられるセレブロンドの減少やガングリオン組成の変化⁴⁾等はその好例である。一方組織が腫瘍化すると、その組織の固有の糖脂質組成には種々の変化が生ずるが、そのうちのいくつかは、正常組織の未成熟段階の糖脂質の性格を示すことが知られてきた⁵⁾⁶⁾。こういった背景を踏まえ、本研究では、白血病細胞の分化、成熟度、あるいは細胞系統の違いと中性糖脂質の関連性を検討し、合わせて膜主要脂質であるコレステロールやリン脂質の比較分析も行った。

II 材料および方法

A 細胞の調製

検体は全部で10例で、年齢は13歳から76歳の範囲である。各白血球は血液成分分離装置 (IBM 2997)⁷⁾により患者から得たあと、溶血により赤血球成分を除去し⁸⁾、3mM EDTA を含む phosphate buffered saline (pH7.4) を加え洗浄した後、300 g で遠心し、上層に浮遊する血小板を吸引除去した。細胞の洗浄は3回くりかえし、その後凍結乾燥させ、分析まで保存した。細胞分画は鏡検により確認した。赤血球の混在はほとんど認めず、血小板の混在率は5%以下であった。得られた細胞の乾燥重量は各検体でバラツキがあるが2~10 g、細胞数にして、 $0.2 \sim 1.0 \times 10^{11}$ 個であった。白血病の分類は、French-American-British co-operative group による分類 (以下FAB 分類)⁹⁾⁻¹¹⁾に従った。

B 脂質の抽出

凍結乾燥して得られた白血球容積の約20倍量のクロロホルム-メタノール-水、混液 (C-M-W と略、40:20:3, 30:30:3, 20:40:3, v/v/v) で順次抽出した総脂質を Ledeen らの方法¹²⁾に従い C-M-W, (30:60:8) に溶かし、DEAE-セファデックス A-25 (酢酸型 Pharmacia Fine Chemicals 社製) カラムにのせ、

中性脂質画分を溶出させた。この中性画分をさらにアセチル化し、フロリジル (Floridin 社製) カラムにのせ、1, 2ジクロルエタンで単純脂質を溶出させたあと、1, 2ジクロルエタン-アセトン (1:1) 混液でアセチル化糖脂質画分を溶出した¹³⁾。この画分を減圧乾固したあと、0.5N KOH の C-M (1:1) 混液中に溶かし、37°C 5 時間で脱アセチル化した。この画分を酢酸で中和後、蒸留水に対し透析し、中性糖脂質画分を得た。一方、コレステロール、リン脂質の調製には、総脂質の一部に Folch 分配を施し¹⁴⁾、その下層を分析に供した。

C 薄層クロマトグラフィー (thin layer chromatography, TLC)

TLC にはシリカゲル60プレート (Merck 社製, 5721) を用いた。中性糖脂質は、C-M-W (65:25:4) で展開した。リン脂質の分析には二次元展開を行った。すなわち、一次元には、C-M-W, (65:25:4) あるいは C-M-13.5N アンモニア-W, (70:30:4:1) の溶媒を適宜用い、展開風乾後、塩化水素ガスにさらし、二次元には、C-M-アセトン-酢酸-W, (75:15:30:15:7.5) を用い展開した。各バンドの検出には、酢酸銅リン酸試薬¹⁵⁾を用いた。

D 中性糖脂質の分析

中性糖脂質画分は、調製用 TLC を用い、各バンドを精製するか、あるいは、シリカゲル 60 (Merck 社製) カラムを用い精製した。こうして得られた中性糖脂質を3%塩酸メタノール溶液85°C 中で3時間メタノリシス後、構成脂肪酸はメチルエステル誘導体として、ガスクロマトグラフィー (gas-liquid chromatography, GLC) で分析し、構成糖はメチルグリコシドのトリメチルシリル誘導体として、やはり GLC で分析した。この時、マンニトールを内部標準に用い、定量も行った。脂肪酸は、OV-101 シリコンキャピラリーカラム ($\phi 0.2\text{mm} \times 25\text{m}$) を用い、250°C 恒温で分析した。糖は、2% OV-1 カラム ($3\text{mm} \times 2\text{m}$) を

Abbreviations:

Glc, glucose, Gal, galactose, GlcNAc, *N*-acetylglucosamine, GlcCer, glucosylceramide, GalCer, galactosylceramide, LacCer, lactosylceramide, Lc3Cer, lactotriaosylceramide, Gb3Cer, globotriaosylceramide, Gb4Cer, globotetraosylceramide, nLc4Cer, neolactotetraosylceramide, Lc4Cer, lactotetraosylceramide, Gg4Cer, gangliotetraosylceramide, C24:0, C24 non-hydroxy-fatty acid, C24:0h, C24 hydroxy-fatty acid.

用い、140°Cから毎分2°Cの昇温で分析した¹⁶⁾。一部の中性糖脂質については、長鎖塩基の分析および、メチル化分析も GLC を用いた。カラムはいずれも脂肪酸分析の時と同じものを用いた。長鎖塩基は、中性糖脂質を 2N 水性塩酸メタノール中で 75°C、5 時間水解後、Ando と Yu の方法¹⁷⁾により精製し、トリメチルシリル誘導体とし、250°C 恒温で分析した。メチル化分析は、Phillips と Fraser の方法¹⁸⁾に従って完全メチル化糖脂質を得、さらにアルジトールアセテート誘導体にかえ¹⁹⁾、部分メチル化糖アルジトールアセテートとし、150°Cから毎分2°Cの昇温で分析した。

E 酵素分解

Endo- β -galactosidase (*Bacteroides fragilis* 由来, T. Feizi からの恵与) および, *N*-acetyl- β -hexosaminidase (Jack bean 由来, 生化学工業社製)を用いた。分解条件は、おのおの、Scudder ら²⁰⁾、Svennerholm ら²¹⁾の方法に従った。

F リン脂質、コレステロールおよび蛋白質の定量
リン脂質、コレステロールは、Bartlett 法²²⁾、Zak 法²³⁾をおのおの用い定量した。蛋白質は Lowry の変法²⁴⁾を用い定量した。

III 結 果

A Myeloid (好中球, 単球) 系白血病

検体は慢性骨髄性白血病 (chronic myelogenous leukemia, CML) 3 例 (CML case I, CML case II, CML case III), 急性骨髄性白血病 (acute myelogenous leukemia, AML) FAB 分類 M1, 1 例, 急性単球性白血病 (acute monocytic leukemia, AMoL)

FAB 分類 M5a と M5b 各 1 例, 慢性骨髄単球性白血病 (chronic myelomonocytic leukemia, CMMoL) 1 例の計 7 例である。表 1 に各検体の細胞構成を示した。CML では各分化段階にある好中球系細胞がみられたのに対し, AML (M1) と AMoL (M5a) では各芽球が主体をなした。AMoL (M5b) では単球系への成熟傾向がみられ, CMMoL では好中球, 単球両方向への分化成熟傾向がみられた。

図 1 に各白血病細胞の全中性糖脂質 TLC パターンを示す。各白血病とも monoglycosylceramide, diglycosylceramide, 少量の triglycosylceramide および, tetraglycosylceramide より構成されていた。Monoglycosylceramide は GLC の分析から GlcCer と少量の GalCer より構成されていた。(ただし CML case I では GlcCer のみが検出された。) Diglycosylceramide は Glc : Gal = 1 : 1 であったため LacCer と考えられた。Triglycosylceramide は TLC 上で標準試料の Gb3Cer よりやや低い Rf 値を示した。この画分はきわめて微量であったため, GLC による分析は, CML および AMoL (M5a) のみ行った。いずれの検体も Glc : Gal : GlcNAc = 1 : 1 : 1 の結果を示したため, Lc3Cer と考えられた。このことをもとに, 各検体の triglycosylceramide 画分に, endo- β -galactosidase 処理を行った。図 2 に AML (M1) と AMoL (M5a) の酵素処理の結果を示した。酵素処理により GlcCer に相当するバンドがみられ, これらが, Lc3Cer であることが確認された。他の検体でも同様の結果が得られた。Tetraglycosylceramide は, いずれも標準試料の Gb4Cer よりも低い Rf 値を示した。GLC の結果は Glc : Gal :

表 1 Myeloid 系白血病細胞の細胞構成(%)

		Mbl	ProMyl	Myl	Meta	Band	Seg	Monbl	ProMon	Mono	Bas	Eos	Ebl	Lym
CML	I	4	21	20	17	19	7	0	0	0	4	2	3	3
CML	II	5	18	29	16	13	10	0	0	1	4	1	2	1
CML	III	1	10	11	15	23	30	0	0	1	5	0	0	4
AML (M1)		92	4	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	2
AMoL (M5a)		0	0	0	0	1	0	97	0	0	0	0	0	2
AMoL (M5b)		0	0	0	0	4	0	6	32	49	0	0	1	8
CMMoL		2	2	6	16	18	2	1	11	39	1	1	1	0

Mbl, myeloblast; ProMyl, promyelocyte; Myl, myelocyte; Meta, metamyelocyte; Band, band neutrophil; Seg, segmented neutrophil; Monbl, monoblast; ProMon, promonocyte; Mono, monocyte; Bas, basophil; Eos, eosinophil; Ebl, erythroblast; Lym, lymphocyte.

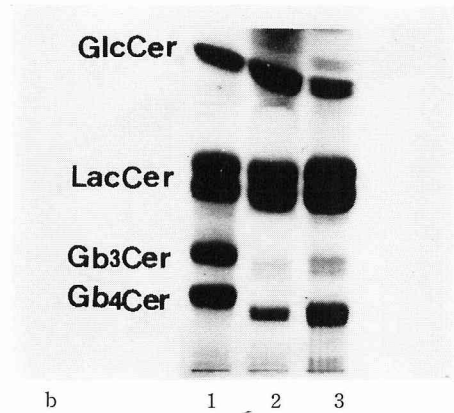
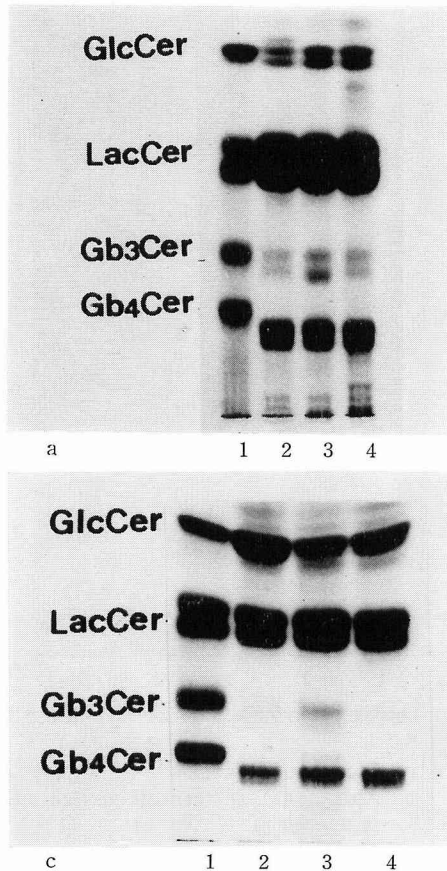


図1 Myeloid 系白血病細胞の中性糖脂質薄層クロマトグラム

a	1	標準試料	2	CML case I
	3	CML case II	4	CML case III
b	1	標準試料	2	AML (M1)
	3	CML case I		
c	1	標準試料	2	AMoL (M5b)
	3	AMoL (M5a)	4	CMMoL

展開系: C-M-W, (65:25:4)

発色: 酢酸銅リン酸試薬

GlcNAc = 1:2:1 であった。またこれらの脂質を endo- β -galactosidase で処理したところ、GlcCer に相当するバンドを認めたため(図3)、これらの脂質は Lc4Cer あるいは nLc4Cer であると考えられた。CML と AMoL (M5a) についてはさらに、糖の結合位置を明らかにするため、おのおのの検体につき、メチル化分析を行った。図4に示すように、1, 5-di-*O*-acetyl-2, 3, 4, 6-tetra-*O*-methylgalactitol, 1, 4, 5-tri-*O*-acetyl-2, 3, 6-tri-*O*-methylglucitol, 1, 3, 5-tri-*O*-acetyl-2, 4, 6-tri-*O*-methylgalactitol, 1, 4, 5-tri-*O*-acetyl-3, 6-di-*O*-methyl-2-deoxy-2-*N*-methylacetamidoglucitol からなることがわかり、これらの脂質が nLc4Cer であることが確認された。AML (M1), AMoL (M5b), CMMoL の tetraglycosylceramide 画分は少量であったため、これらの画分を一緒にして分析したが、GLCの結果は、図4と同じであったため、これらも nLc4Cer と考えられた。AMoL (M5a) には、nLc4Cer の直上に微量ながら標準試料の Gb4Cer に相当するバンドがみられた

(図5)。この脂質を *N*-acetyl- β -hexosaminidase で処理したところ Gb3Cer に相当するバンドが生じたため、AMoL (M5a) には微量ながら Gb4Cer が存在することが確認できた。表2に各検体の中性糖脂質組成を示した。図1に示したごとく、CML と他の検体では、著しい差が認められた。CML では5%と微量成分である GlcCer が、他の検体では増大し、AMoL (M5b) でもっとも顕著(55.5%)であった。CMMoL は AML (M1) ときわめて近い組成を示した。

B Lymphoid 系白血病

検体は3例で、いずれも急性リンパ性白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL) で FAB 分類が L1 で Null cell 型1例, L2 で T cell 型2例 (おのおの, ALL (L2) T cell 型 case I, ALL (L2) T cell 型 case II) である。各検体とも芽球が80%以上を占めていた。図6に各検体の全中性糖脂質 TLC パターンを示した。Monoglycosylceramide は GLC の結果から GlcCer と、T cell 型 case I で少量の GalCer を認めた。Diglycosylceramide は、Glc:Gal=1:1

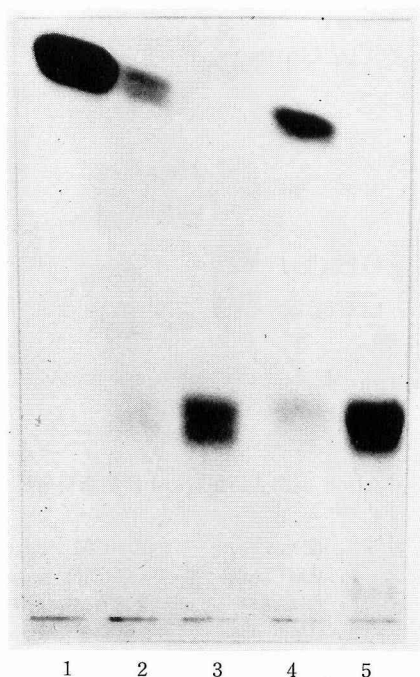


図2 Triglycosylceramide 画分の薄層クロマトグラム

- 1 GlcCer (標準試料)
 - 2 AML (M1) の triglycosylceramide の酵素処理産物
 - 3 AML (M1) の triglycosylceramide
 - 4 AMoL (M5a) の triglycosylceramide の酵素処理産物
 - 5 AMoL (M5a) の triglycosylceramide
- 酵素は endo- β -galactosidase を用いた。
展開系: C-M-W, (65:25:4)
発色: 酢酸銅リン酸試薬

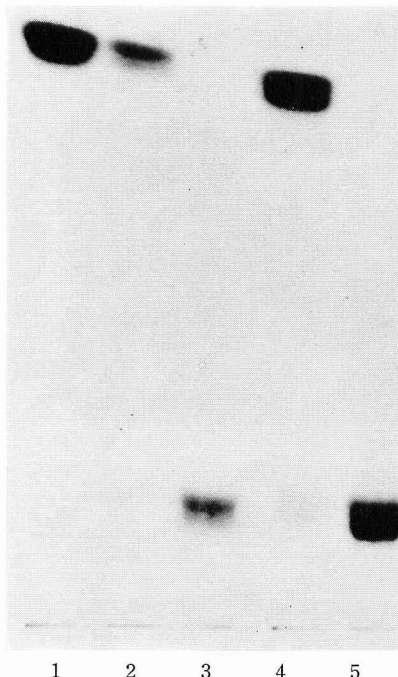


図3 Tetraglycosylceramide 画分の薄層クロマトグラム

- 1 GlcCer (標準試料)
 - 2 AML (M1) の tetraglycosylceramide の酵素処理産物
 - 3 AML (M1) の tetraglycosylceramide
 - 4 AMoL (M5a) の tetraglycosylceramide の酵素処理産物
 - 5 AMoL (M5a) の tetraglycosylceramide
- 酵素は endo- β -galactosidase を用いた。
展開系: C-M-W, (65:25:4)
発色: 酢酸銅リン酸試薬

で LacCer と考えられた。Null cell 型と T cell 型 case II でごく微量の triglycosylceramide, tetraglycosylceramide に相当するバンドがみられたが、試料が少なく、その性状を明らかにすることはできなかった。

対照の AML (M1) と比較して明らかのように、ALL では nLc4Cer に相当するバンドがほとんどみられなかった。ALL にはアシアロ GM1 (Gg4Cer) が存在する²⁵⁾という報告もあるが、本実験では認められなかった。表3に ALL の中性糖脂質組成を示す。T cell 型の方が Null cell 型より GlcCer が多い結果を示した。

C 脂肪酸組成

図7に、各検体の脂肪酸組成を示した。Myeloid 系、

lymphoid 系を問わず、主要構成脂肪酸は、C16:0, C24:0, C24:1 であった。さらに詳細にみると、CML と他の検体をくらべた場合、CML では C16:0 が約40%と多くを占めるのに対し、他の検体では C16:0 の減少傾向と、C22:0 等の増加傾向がみられた。Monoglycosylceramide で、少量のヒドロキシ酸をもつものがみられた。このヒドロキシ酸は C22:0h, C23:0h, C24:0h, C24:1h であった。

D 長鎖塩基組成

表4に monoglycosylceramide (GlcCer と GalCer), と diglycosylceramide (LacCer) の長鎖塩基組成を示した。組成は、4-sphingenine と sphinganine からなっており、4-sphingenine が主要成分であった。

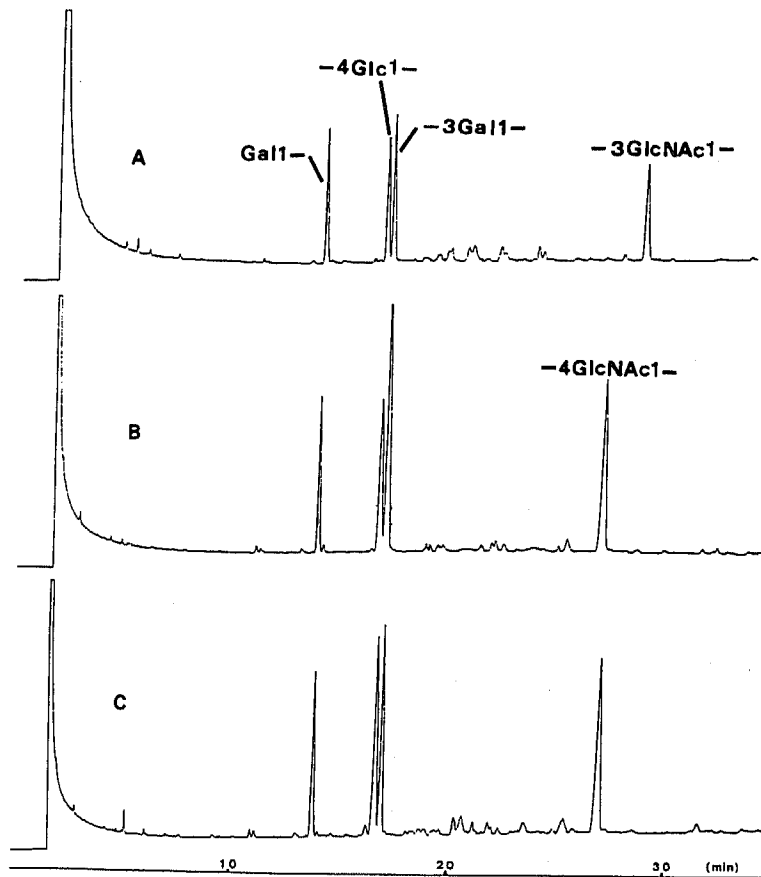


図4 AMoL (M5a) の tetraglycosylceramide 画分のメチル化分析のガスクロマトグラム

A 標準試料 lacto-*N*-tetraose Gall-3GlcNAc1-3Gall-4Glc

B 標準試料 galactosylparagloboside Gall-3Gall-4GlcNAc1-3Gall-4Glc1-1Cer

C AMoL (M5a) の tetraglycosylceramide

Gall- : 1,5-di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methylgalactitol,

-4Glc1- : 1,4,5-tri-*O*-acetyl-2,3,6-tri-*O*-methylglucitol,

-3Gall- : 1,3,5-tri-*O*-acetyl-2,4,6-tri-*O*-methylgalactitol,

-3GlcNAc1- :

1,3,5-tri-*O*-acetyl-4,6-di-*O*-methyl-2-deoxy-2-*N*-methylacetamidoglucitol,

-4GlcNAc1- :

1,4,5-tri-*O*-acetyl-3,6-di-*O*-methyl-2-deoxy-2-*N*-methylacetamidoglucitol.

カラムは, OV-101シリコンキヤピラリーカラム (φ0.2mm×25m) を用い150°Cから毎分2°Cの昇温で分析した。

E 中性糖脂質, リン脂質, コレステロール含量

表5に各検体の脂質組成を示し, 図8, 図9に二次元 TLC パターンを示した。全中性糖脂質量は, myeloid 系細胞では, CML で AML や AMoL の約7倍に達し, コレステロールやリン脂質の変動がほとんどないのにくらべ対照的である。CMMoL は, AML や AMoL と似た組成を示した。ALL では全般的に中性

糖脂質, コレステロール, リン脂質とも myeloid 系細胞と比較し, 減少していた。表6に各検体のリン脂質組成を示した。主要成分は各検体共通に, phosphatidylcholine であったが, myeloid 系細胞では phosphatidylethanolamine に対する ethanolamine plasmalogen の比 (EP/PE) が1以上であったのに対し, lymphoid 系細胞では1以下と明らかな

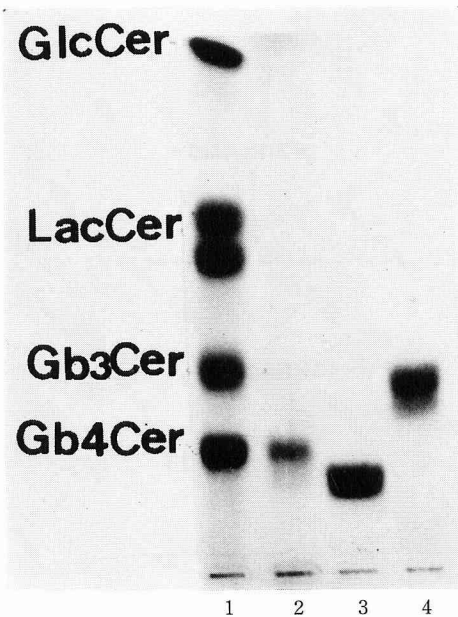


図5 AMoL (M5a) の各々単離した triglycosylceramide と tetraglycosylceramides の薄層クロマトグラム

1 : 標準試料

2, 3 : tetraglycosylceramides

4 : triglycosylceramide

2は Gb4Cer, 3は nLc4Cer, 4は Lc3Cer と各々判明した。

展開系 : C-M-W, (65 : 25 : 4)

発色 : 酢酸銅リン酸試薬

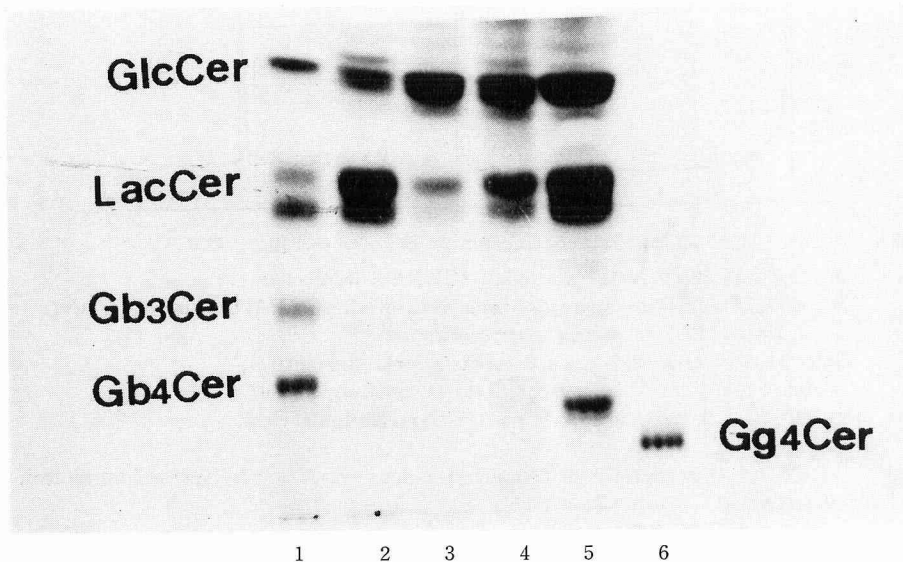


図6 ALL 白血病細胞の中性糖脂質薄層クロマトグラム

1 標準試料

2 ALL (L1) Null cell 型

3 ALL (L2) T cell 型, case I

4 ALL (L2) T cell 型, case II

5 AML (M1)

6 標準試料の Gg4Cer (アシプロ GM1)

展開系 : C-M-W, -(65 : 25 : 4)

発色 : 酢酸銅リン酸試薬

表2 Myeloid 系白血病細胞の中性糖脂質組成

	CML I	CML II	CML III	AML (M1)	AMoL (M5a)	AMoL (M5b)	CMMoL
GlcCer	5.0	5.2	5.1	26.8	12.6	55.5	27.0
GalCer	—	0.6	0.5	2.4	5.1	1.7	1.4
LacCer	84.2	80.8	82.0	62.6	73.2	37.0	60.4
Lc3Cer	2.5	3.1	2.3	+	3.1	+	+
Gb4Cer	—	—	—	—	+	—	—
nLc4Cer	8.3	10.3	10.1	8.2	5.9	5.8	11.2

(mole %)

表3 ALL 白血病細胞の中性糖脂質組成

	L1(N)	L2(T) I	L2(T) II
GlcCer	18.2	54.7	54.1
GalCer	—	7.9	—
LacCer	81.8	37.4	45.9

(mole %)

L1(N); ALL (L1) Null cell type
 L2(T) I; ALL (L2) T cell type, case I
 L2(T) II; ALL (L2) T cell type, case II

差を示した。

IV 考 察

今回の分析結果を myeloid 系細胞と, lymphoid 系細胞との対比で示すと, myeloid 系細胞には共通して, GlcCer, LacCer, Lc3Cer, nLc4Cer が存在した。さらに GalCer は7例中6例で認められた。lymphoid 系白血病では, GlcCer, LacCer が共通にみられ, 3例中1例で GalCer がみられた。全中性糖脂質量も myeloid 系白血病に比較し, 減少していた。

Myeloid 系白血病の中で, CML と AML を比較した場合, CML で中性糖脂質の著増が認められた。この増加は LacCer や nLc4Cer で約7倍から約9倍, と顕著であった。Klock ら²⁶⁾も CML はAML より中性糖脂質含量が増加していることを指摘している。Nojiri ら²⁷⁾は CML 白血病細胞と正常好中球の中性糖脂質パターンを TLC の上で比較し, これらがきわめて近似したパターンをとることを示し, さらに急性転化をおこし形態上はほとんどが骨髓芽球のみからなる CML 白血病細胞では全中性糖脂質量が著減し, これが LacCer や nLc4Cer で顕著であることを示した。彼らの示した急性転化をおこした CML 白血病細胞の中性糖脂質 TLC パターンも本実験での AML の TLC パタ

表4 白血病細胞の長鎖塩基組成

A. GlcCer plus GalCer

		(mole %)	
		d18 : 1**	d18 : 0***
*CML	I	95.0	5.0
CML	II	90.0	10.0
CML	III	94.4	5.6
AML (M1)		84.0	16.0
AMoL (M5a)		78.2	21.8
AMoL (M5b)		94.2	5.8
CMMoL		90.7	9.3
*ALL (L1)N ^a		88.7	11.3
ALL (L2)T ^b	I	88.3	11.7
*ALL (L2)T	II	91.8	8.2

*GlcCer only.

B. LacCer

		d18 : 1	d18 : 0
CML	I	95.2	4.8
CML	II	95.8	4.2
CML	III	96.7	3.3
AML (M1)		93.8	6.2
AMoL (M5a)		92.2	7.8
AMoL (M5b)		96.4	3.6
CMMoL		90.6	9.4
ALL (L1) N		93.1	6.9
ALL (L2) T	I	82.6	17.4
ALL (L2) T	II	91.8	8.2

4-sphingenine, *sphinganine.

^aNull cell type, ^bT cell type.

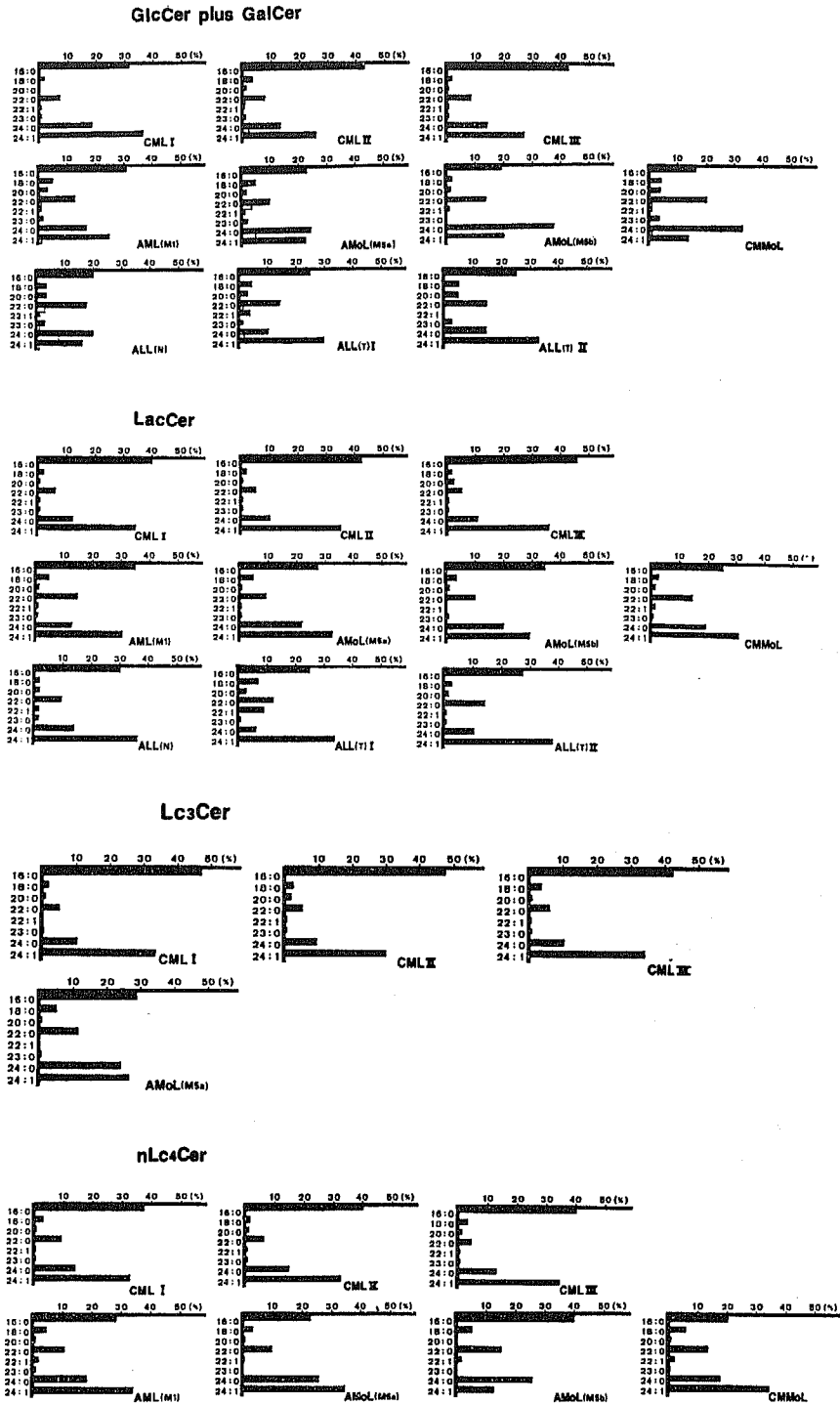


図7 中性糖脂質の脂肪酸組成
 黒：直鎖酸 白：ヒドロキシ酸

ヒト白血病細胞の中性糖脂質

表5 白血病細胞の各脂質含量

(μ mol/g protein)

	CML I	CML II	CML III
Cholesterol	107.6	118.8	106.8
Phospholipid	147.3	180.0	157.1
Neutral Glycosphingolipid	19.7	16.9	21.2
Molar ratio of cholesterol/phospholipid	0.73	0.66	0.68

	AML (M1)	AMoL (M5a)	AMoL (M5b)	CMMoL
Cholesterol	74.5	83.3	129.8	108.6
Phospholipid	162.1	189.2	234.8	148.6
Neutral Glycosphingolipid	2.9	3.3	2.7	2.0
Molar ratio of cholesterol/phospholipid	0.46	0.44	0.55	0.73

	ALL (L1) N ^a	ALL (L2) T ^b I	ALL (L2) T II
Cholesterol	64.8	67.6	34.4
Phospholipid	115.4	123.0	92.3
Neutral Glycosphingolipid	0.82	0.64	0.38
Molar ratio of cholesterol/phospholipid	0.56	0.55	0.37

^aNull cell type, ^bT cell type.

ーンと近似している。またヒト白血病細胞株 HL-60²⁸⁾は形態上は主に前骨髄球でありながら dimethylsulfoxide, やretinoic acid を加え培養すると, 成熟好中球へ²⁹⁾³⁰⁾, また 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) で成熟単球系細胞へ分化誘導される³¹⁾ことが知られている。HL-60細胞の中性糖脂質パターンはその TLC パターンと酵素処理などから GlcCer, LacCer, Lc3Cer, nLc4Cer よりなると考えられ³²⁾³³⁾, AML の中性糖脂質組成に近似している。この細胞が成熟好中球へ分化誘導されたとき, やはり LacCer や nLc4Cer の増加がみられ形態のうえばかりでなく, 中性糖脂質の面からも成熟好中球に近いものへと変化する³²⁾。こういった事実から成熟好中球へ分化が進む際に中性糖脂質の合成能が高まり, 特

に LacCer や nLc4Cer が増加するものと考えられる。単クローン抗体 T₅A₇ は LacCer を認識し, 成熟好中球に反応し, 未分化な myeloid cell とは反応しない³⁴⁾。LacCer は未分化な myeloid cell にも存在するが, この抗体が成熟好中球の LacCer のみと反応するのは, 成熟好中球がきわめて多くの LacCer を含有していることにもよると思われる。

AMoL (M5a) は未分化な単球系細胞からなる白血病であるが, 中性糖脂質の上からは, その組成においても, 全中性糖脂質量の上からも AML と類似していた。AMoL (M5a) には, きわめて微量ながら, Gb4Cer が認められた。ヒト好中球系細胞についてはすでに述べた通りだが, ヒト赤血球, ヒト血小板, ヒトリンパ球の中性糖脂質については以下のごとく報告

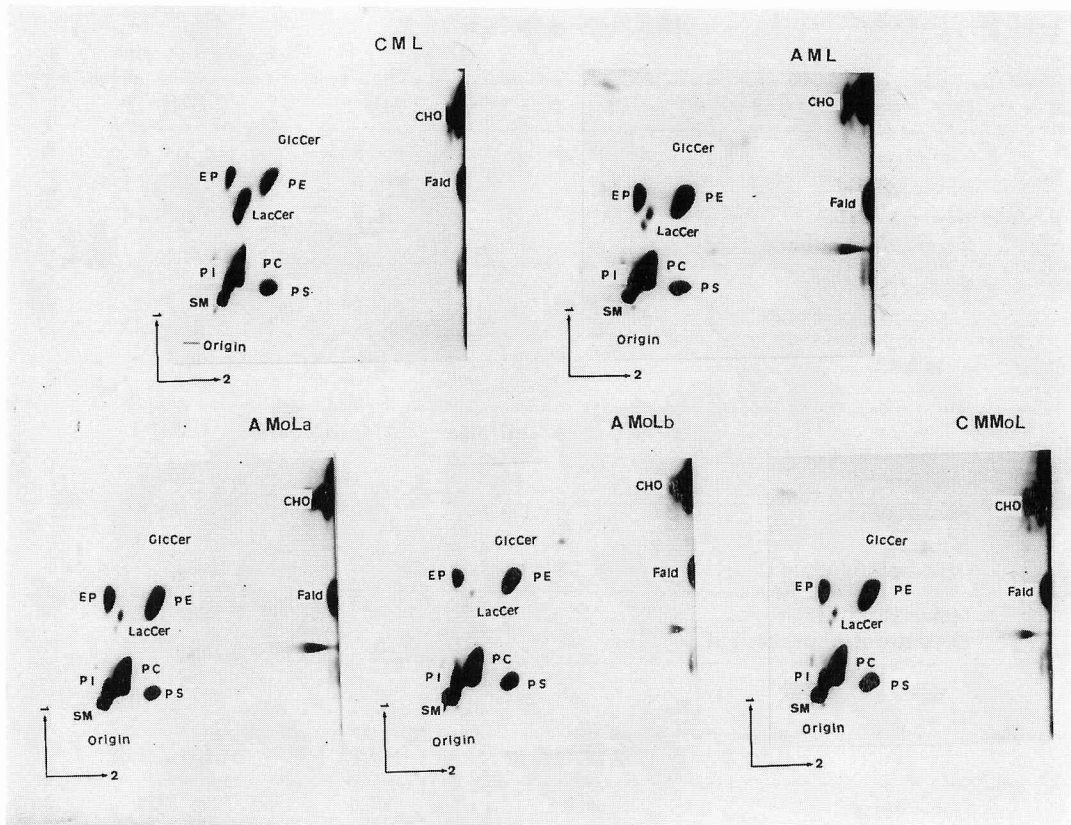


図8 Myeloid 系白血病細胞の二次元薄層クロマトグラム

展開系：一次元，C-M-W，(65：25：4)

二次元，C-M-アセトン-酢酸-W，(75：15：30：15：7.5)

発色：酢酸銅リン酸試薬

CML は CML case I を示した。他の CML の検体も同様の結果を示した。

AMoLa は AMoL (M5a)，AMoLb は AMoL (M5b) を各々示す。

CHO：cholesterol，Fald：fatty aldehyde

EP：ethanolamine plasmalogen，PE：phosphatidylethanolamine，

PC：phosphatidylcholine，SM：sphingomyelin，

PI：phosphatidylinositol，PS：phosphatidylserine。

他の略号は欄外の Abbreviations を参照。

表6 白血病細胞のリン脂質組成

(mole %)

	CML			AML M1	AMoL		CMMoL	ALL		
	I	II	III		M5a	M5b		L1 (N)	L2(T) I	L2(T) II
EP	14.1	15.8	12.6	18.1	17.5	12.6	16.8	5.9	8.3	6.6
PE	8.3	12.1	8.8	10.1	8.7	8.6	11.9	10.0	12.8	14.4
PC	48.3	49.4	50.1	46.3	43.8	46.5	43.3	60.3	50.5	61.6
SM	13.7	13.2	18.8	10.5	14.7	19.7	15.4	15.3	17.0	9.0
PI	6.2	3.5	3.8	8.8	8.2	5.2	6.5	4.5	6.6	4.2
PS	9.4	5.9	5.9	6.1	7.1	7.2	6.1	4.1	4.8	4.2
EP/PE*	1.70	1.31	1.43	1.79	2.01	1.47	1.41	0.59	0.65	0.46

*molar ratio of ethanolamine plasmalogen/phosphatidylethanolamine，リン脂質の略号は図8を参照

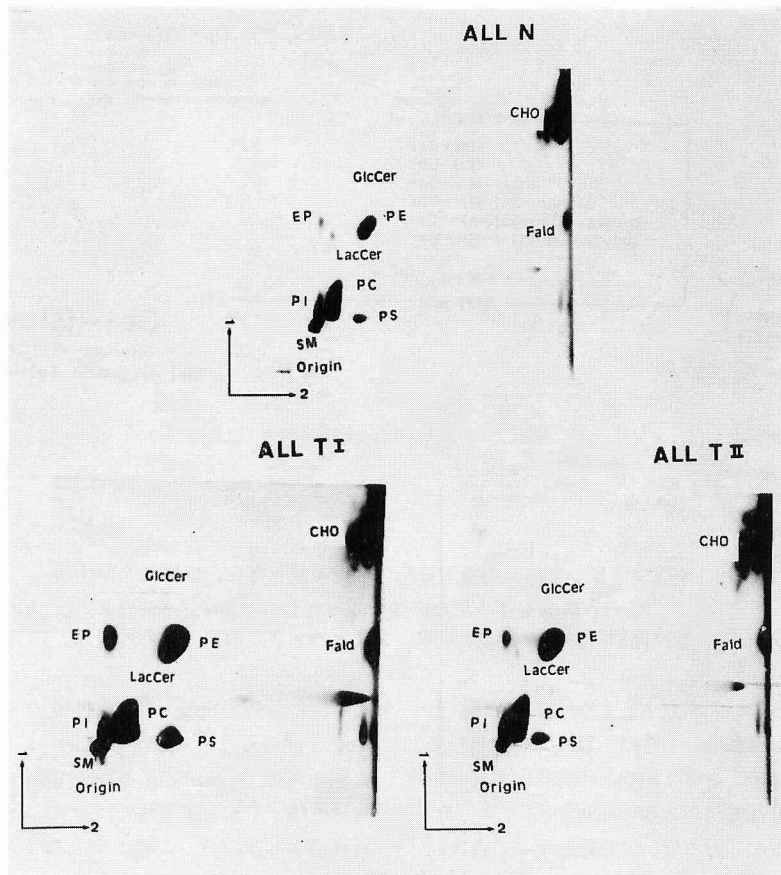


図9 Lymphoid 系白血病細胞の二次元薄層クロマトグラム展開系，発色は図8と同じ。

されている。赤血球では GlcCer, GalCer, LacCer に加えグロボ系糖脂質の Gb3Cer, Gb4Cer ならびに少量のネオラクト系糖脂質の nLc4Cer や ABH型物質をもつ糖脂質，および nLc4Cer の前駆体と考えられる Lc3Cer が存在する³⁵⁾⁻³⁷⁾。血小板やリンパ球には，GlcCer, LacCer の他，Gb3Cer, Gb4Cer のグロボ系糖脂質が含まれる³⁸⁾⁻⁴⁰⁾。一般にこれらの各血球は未分化な状態になると，糖脂質はその成熟血球に固有なパターンを失うと考えられている。ヒト erythroid 系の白血病細胞株と考えられている HEL 41) や K562⁴²⁾ は成熟赤血球で微量成分のネオラクト系糖脂質がむしろ主要糖脂質であるグロボ系糖脂質よりも多く存在する⁴³⁾⁴⁴⁾。またヒト急性白血病細胞には，グロボ，ネオラクトの2系の糖脂質が混在することが指摘されている³³⁾⁴⁵⁾。今回分析された急性白血

病の中では AMoL (M5a) でグロボ，ネオラクト2系の混在がみられた。中性糖脂質のうえからは，AMoL (M5a) は，他の myeloid 系の検体にくらべ，もっとも未分化なものと推定された。

単球系へ成熟傾向を認めた AMoL (M5b) は今回分析された myeloid 系白血病の中で唯一，GlcCer を主要成分としている。糖脂質の詳細な分析には多量の試料を必要とするのに対し，正常ヒト単球を純粋かつ多量に集めることが困難なこともあり，現在まで単球系細胞の中性糖脂質の詳細な分析はなされていない。前述の HL-60 細胞が TPA で単球系細胞に誘導されると，この際中性糖脂質は TPA 無処置の HL-60 細胞にくらべ，全中性糖脂質量の若干の減少を示し，組成のうえでも，GlcCer が LacCer をうわまわるようになる。また nLc4Cer もやや減少する³²⁾。こういった現象は本実験でみられた AMoL (M5a) と，AMoL (M5b)

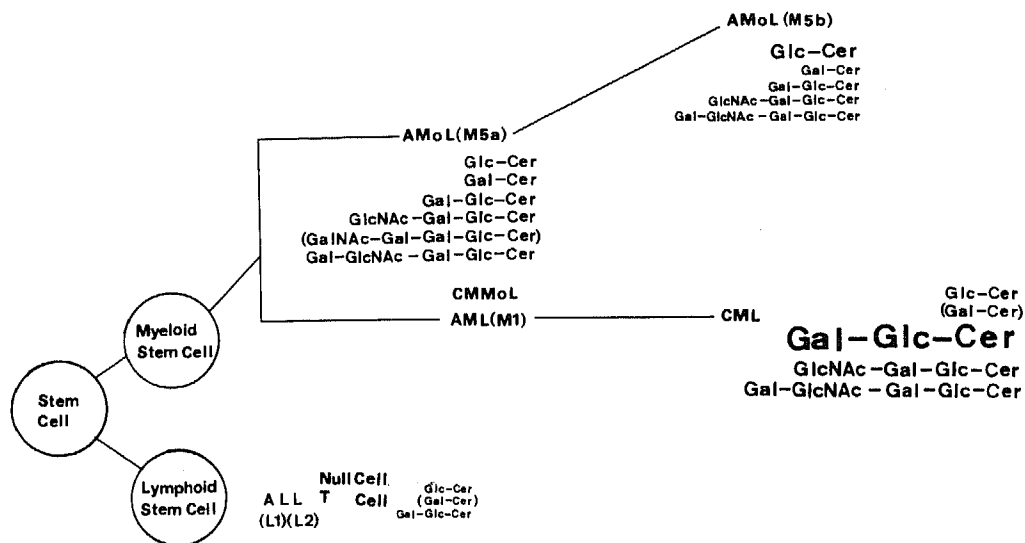


図10 中性糖脂質からみた白血病細胞の細胞系統と分化，成熟度の関係図
 () 内の糖脂質は一部の検体で認めたものを示す。蛋白1gあたりの糖脂質含量のおよその違いを文字の大きさの差であらわした。

との間でみられた違いと類似するように思われる。しかしながら，単球系細胞の中性糖脂質はグロボ系である⁴⁶⁾との報告もあり，単球系細胞の中性糖脂質については，さらに充分な究明が必要であろう。

興味深い結果を示したのは，CMMoLでこの白血病は好中球，単球，両系への分化傾向が認められたにもかかわらず，中性糖脂質の上からは，AMLときわめて類似していた。この白血病は，myelodysplastic syndromeに分類され¹¹⁾，こういったものの中のいくつかは，経過中，急性非リンパ性白血病へ移行するものがみられる⁴⁷⁾。今回の分析結果はこういったCMMoLの性格を示す可能性もあり，さらに症例をふやし検討する余地を残した。

ALLはmyeloid系細胞と異なり，中性糖脂質のパターンは単純でかつその総量も減少していた。このことから，中性糖脂質の面から，lymphoid系とmyeloid系白血病の識別が可能であると思われる。すでに述べたように，正常ヒトリンパ球はGlcCer, LacCer, Gb3Cer, Gb4Cerからなる³⁸⁾と報告されているが，未分化なリンパ球系細胞ではグロボ系糖脂質合成能が低下していると考えられる。リンパ球はさまざまなsubpopulationに分類されるが，こういったsubpopulationの間での糖脂質組成の比較はまだ行われておらず，今後の課題と思われる。

今回の分析で10例の白血病細胞のうち7例でGalCerが認められた。従来GalCerは，myeloid系細胞に認められ，lymphoid系細胞で認められないとされてきた⁴⁸⁾。しかし本実験ではCMLの1例でGalCerは検出されず，むしろALLの1例で認められた。こういったことから，GalCerの存在は，myeloid, lymphoid間の差というよりは各検体固有の特性を示すものかもしれない。GalCerは，未分化な白血病細胞に存在するという指摘もあるが³³⁾⁴⁴⁾，GalCerが分化度を反映するとは考え難い。

図10に，今回の分析結果をもとに，白血病細胞の細胞系統と，分化度をシェーマで示した。

糖脂質の脂肪酸もやはり，組織特異性を示す。脳のガングリオシドはC18:0がその80%以上を占め¹⁷⁾，またセレブロシドには炭素数が，24以上の長鎖のものや，ハイドロキシン酸をもったものが含まれている¹⁶⁾。各血球にもおのおの特徴が認められる。ヒト赤血球ではC16:0, C24:0, C24:1が主要なものであるが，糖鎖がのび，三糖以上の糖脂質になるとC16:0が減少し，C24:0, C24:1が主要成分になる³⁶⁾³⁷⁾。ヒト血小板は，C22:0が主要成分である³⁹⁾⁴⁰⁾。ヒト白血球は，myeloidおよびlymphoidを問わず，C16:0, C24:0, C24:1, が主要成分で赤血球とちがって三糖以上糖をもった糖脂質でもこの傾向は

変わらない³⁸⁾⁴⁹⁾。本実験でも脂肪酸はこの特徴をよく示していた。しかしCMLではC16:0が40%程度存在していたにもかかわらず、急性白血病では、C16:0の減少傾向がみられ、むしろC22:0等の増加傾向がみられた。こういった点が急性白血病細胞の特徴であろう。

コレステロールやリン脂質ではALLでややその総量の減少がみられたが、中性糖脂質で認められたような、大きな差はなかった。しかし、myeloid系細胞とlymphoid系細胞の間でみられたethanolamine plasmalogenとphosphatidylethanolamine比(EP/PE)の逆転は興味深い。Myeloid系細胞で、ethanolamine plasmalogenが多く、lymphoid系細胞で少ないことはすでにGottfried⁵⁰⁾により指摘されていることであるが、これは正常の好中球、リンパ球のみならず、白血病細胞でもみられる。こういった事実と、中性糖脂質の分析結果を合わせて検討することにより、その白血病細胞がmyeloid由来か、あるいはlymphoid由来かをより一層明瞭にできるものと考えられた。

V 結 語

ヒト白血病細胞10例の脂質を中性糖脂質を中心に分析し、以下の結果を得た。

1 Myeloid (好中球, 単球) 系白血病細胞ではGlcCer, LacCer, Lc3Cer, nLc4Cerが共通して認

められた。GalCerは7例中6例で、Gb4CerはAMoLの1例で認められた。全中性糖脂質量はCMLで著明に増加していた。

2 Lymphoid系白血病細胞では、全中性糖脂質量が、myeloid系白血病細胞と比較し減少しており、その組成も単純で、GlcCer, LacCerが共通成分であった。GalCerは1例で認められた。

3 コレステロールやリン脂質は、lymphoid系白血病細胞で減少していた。リン脂質のうち、EP/PEは、myeloid系細胞で1以上を示し、lymphoid系細胞で1以下を示した。

4 以上のように、中性糖脂質やリン脂質の分析により、ヒト白血病細胞の、myeloid系あるいはlymphoid系といった細胞系統の違いおよび細胞の分化、成熟度を明瞭にできるものと考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導いただいた、信州大学医学部心臓病研究施設脂質生化学部門、武富 保教授、ならびに試料を提供していただいた、信州大学医学部附属病院輸血部、緒方洪之講師、同第2内科学教室、斉藤 博、北野喜良(現、自治医大、血液学教室)の各先生、ならびに同小児科学教室、宮川幸昭講師に深く感謝の意をあらわします。

本研究の一部は、1985年7月第27回日本脂質生化学研究会(東京)および1985年9月第58回日本生化学大会(仙台)において発表した。

文 献

- 1) Hakomori, S.: Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. In: Kanfer, J.N. and Hakomori, S., Sphingolipid biochemistry, pp.327-379, Plenum Press, New York, 1983
- 2) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D.: The plasma membrane. In: Molecular biology of the cell, pp.255-317, Garland Publishing, Inc., New York, 1983
- 3) Fukuda, M.N. and Levery, S.B.: Glycolipid pattern and structural study of H₂-glycolipid from new born erythrocytes. Biochemistry, 22: 5034-5044, 1983
- 4) Kunishita, T. and Taketomi, T.: Brain lipids of a still-born 28-week-old fetus from a pregnant woman with severe hydroamnion. Jpn J Exp Med, 51: 157-164, 1981
- 5) Hakomori, S. and Kannagi, R.: Glycosphingolipids as tumor-associated and differentiation markers. J Natl Cancer Inst, 71: 231-251, 1983
- 6) Fukuda, M.: Cell surface glycoconjugates as onco-differentiation markers in hematopoietic cells. Biochim Biophys Acta, 780: 119-150, 1985
- 7) Hester, J.P., Kellogg, R.M., Mulzet, A.P., Kruger, V.R., McCredie, K.B. and Freireich, E.J.: Principles of blood separation and component extraction in a disposal continuous-flow single-stage channel. Blood, 54: 254-268, 1979

- 8) Hoffman, R.A., Kung, P.C., Hansen, W.P. and Goldstein, G. : Simple and rapid measurement of human T lymphocytes and their subclasses in peripheral blood. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77 : 4914-4917, 1980
- 9) Bennet, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.G.A., Gralnick, H.R. and Sultan, C. : Proposals for the classification of the acute leukaemias. *Br J Haematol*, 33 : 451-458, 1976
- 10) Bennet, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.G.A., Gralnick, H.R. and Sultan, C. : The morphological classification of acute lymphoblastic leukaemia : concordance among observers and clinical correlations. *Br J Haematol*, 47 : 553-561, 1981
- 11) Bennet, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.G.A., Gralnick, H.R. and Sultan, C. : Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*, 51 : 189-199, 1982
- 12) Ledeen, R.W., Yu, R.K. and Eng, L.F. : Gangliosides of human myelin : sialosylgalactosylceramide (G7) as a major component. *J Neurochem*, 21 : 829-839, 1973
- 13) Saito, T. and Hakomori, S. : Quantitative isolation of total glycosphingolipids from animal cells. *J Lipid Res*, 12 : 257-259, 1971
- 14) Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G.H. : A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, 226 : 497-509, 1957
- 15) Fewster, M.E., Burns, B.J. and Mead, J.F. : Quantitative densitometric thin-layer chromatography of lipids using copper acetate reagent. *J Chromatogr*, 43 : 120-126, 1969
- 16) Hara, A., Kitazawa, N. and Taketomi, T. : Abnormalities of glycosphingolipids in mucopolysaccharidosis type III B. *J Lipid Res*, 25 : 175-184, 1984
- 17) Ando, S. and Yu, R.K. : Fatty acid and long chain base composition of gangliosides isolated from adult human brain. *J Neurosci Res*, 12 : 205-211, 1984
- 18) Phillips, L.R. and Fraser, B.A. : Methylation of carbohydrates with dimethyl sulphate in dimethyl sulfoxide. *Carbohydr Res*, 90 : 149-152, 1981
- 19) Yang, H. and Hakomori, S. : A sphingolipid having a novel type of ceramide and lacto-*N*-fucopentaose III. *J Biol Chem*, 246 : 1192-1200, 1971
- 20) Scudder, P., Hanfland, P., Uemura, K. and Feizi, T. : Endo- β -D-galactosidases of *Bacteroides fragilis* and *Escherichia freundii* hydrolyze linear but not branched oligosaccharide domains of glycolipids of the neolacto series. *J Biol Chem*, 259 : 6586-6592, 1984
- 21) Svennerholm, I., Mansson, J.-E. and Li, Y.-T. : Isolation and structural determination of a novel ganglioside, a disialosyl-pentahexosylceramide from human brain. *J Biol Chem*, 248 : 740-742, 1973
- 22) Bartlett, G.R. : Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem*, 234 : 466-468, 1959
- 23) Zak, B. : Simple rapid microtechnic for serum total cholesterol. *Am J Clin Pathol*, 27 : 583-588, 1957
- 24) Markwell, M.A.K., Haas, S.M., Tolbert, N.E. and Bieder, L.L. : Protein determination in membrane and lipoprotein samples : manual and automated procedures. *Methods Enzymol*, 72 : 296-303, 1981
- 25) Nakahara, K., Ohashi, T., Oda, T., Hirano, T., Kasai, M., Okumura, K. and Tada, T. : Asialo GM1 as a cell-surface marker detected in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 302 : 674-677, 1980
- 26) Klock, J.C., D'Angona, J.L. and Macher, B.A. : Chemical characterization of neutral glycolipids in the human myeloid leukemias. *J Lipid Res*, 22 : 1079-1083, 1981
- 27) Nojiri, H., Takaku, F., Ohta, M., Miura, Y. and Saito, M. : Changes in glycosphingolipid composition during differentiation of human leukemic granulocyte in chronic myelogenous

- leukemia compared with *in vitro* granulocytic differentiation of human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Cancer Res*, 45 : 6100-6106, 1985
- 28) 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
- 29) Collins, S. J., Ruscetti, F. W., Gallagher, R. E. and Gallo, R. C. : Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethylsulfoxide and other polar compounds. *Proc Natl Acad Sci USA*, 75 : 2458-2462, 1978
- 30) Breitman, T. R., Selonick, S. E. and Collins, S. J. : Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77 : 2936-2940, 1980
- 31) Rovera, G., Santoli, D. and Damsky, C. : Human promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophage-like cells when treated with a phorbol diester. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76 : 2779-2783, 1979
- 32) Nojiri, H., Takaku, F., Tetsuka, T., Motoyoshi, K., Miura, Y. and Saito, M. : Characteristic expression of glycosphingolipid profiles in the bipotential cell differentiation of human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Blood*, 64 : 534-541, 1984
- 33) Buehler, J., Qwan, E., DeGregorio, M. W. and Macher, B. A. : Biosynthesis of glycosphingolipids by human myeloid leukemia cells. *Biochemistry*, 24 : 6978-6984, 1985
- 34) Symington, F. W., Bernstein, I. D. and Hakomori, S. : Monoclonal antibody specific for lactosylceramide. *J Biol Chem*, 259 : 6008-6012, 1984
- 35) Yamakawa, T. and Nagai, Y. : Glycolipids at the cell surface and their biological functions. *Trends Biochem Sci*, 3 : 128-131, 1978
- 36) 原 厚 : ヒト赤血球膜スフィンゴ脂質の組成, 化学構造, 脂肪酸及び長鎖塩基に関する研究. *信州医誌*, 23 : 237-251, 1975
- 37) Ando, S., Kon, K., Isobe, M., Nagai, Y. and Yamakawa, T. : Existence of glucosaminyl lactosyl ceramide (Amino CTH-I) in human erythrocyte membrane as a possible precursor of blood group-active glycolipids. *J Biochem (Tokyo)*, 79 : 625-632, 1976
- 38) Lee, W. M. F., Klock, J. C. and Macher, B. A. : Isolation and structural characterization of human lymphocyte neutral glycosphingolipids. *Biochemistry*, 20 : 3810-3814, 1981
- 39) Tao, R. V. P., Sweeley, C. C. and Jamieson, G. A. : Sphingolipid composition of human platelets. *J Lipid Res*, 14 : 16-25, 1973
- 40) Kyogashima, M. and Taketomi, T. : Lipids from human platelets in primary thrombocythemia. *Jpn J Exp Med*, 56 : 113-118, 1986
- 41) Martin, P. : HEL cells : A new human erythroleukemia cell line with spontaneous and induced globin expression. *Science*, 216 : 1233-1235, 1982
- 42) Gahmberg, C. G. and Andersson, L. C. : K562-A human leukemia cell line with erythroid features. *Semin Hematol*, 18 : 78-77, 1981
- 43) Kannagi, R., Papayannopoulou, T., Nakamoto, B., Cochran, N. A., Yokochi, T., Stamatoyannopoulou, G. and Hakomori, S. : Carbohydrate antigen profiles of human erythroleukemia cell lines HEL and K562. *Blood*, 62 : 1230-1241, 1983
- 44) Suzuki, A., Karol, R. A., Kundu, S. K. and Marcus, D. M. : Glycosphingolipids of K562 cells : A chemical and immunological analysis. *Int J Cancer*, 28 : 271-276, 1981
- 45) Lee, W. M. F., Westrick, M. A. and Macher, B. A. : Neutral glycosphingolipids of human acute leukemias. *J Biol Chem*, 257 : 10090-10095, 1982
- 46) Kniep, B., Monner, D. A., Schwulera, U. and Mühlradt, P. F. : Glycosphingolipids of the globo-series are associated with the monocytic lineage of human myeloid cells. *Eur J Biochem*, 149 : 187-191, 1985
- 47) Vallespsi, T., Torrabardella, M., Julia, A., Irriguible, D., Jane, A., Acebedo, G. and Tri-

- giner, J. : Myelodysplastic syndromes : A study of 101 cases according to the FAB classification. Br J Haematol, 61 : 83-92, 1985
- (48) Macher, B.A., Lee, W.M.F. and Westrick, M.A. : Glycosphingolipids of normal and leukemic human leukocytes. Mol Cell Biochem, 47 : 81-95, 1982
- (49) Fukuda, M.N., Dell, A., Oates, J.E., Wu, P., Klock, J.C. and Fukuda, M. : Structures of glycosphingolipids isolated from human granulocytes. J Biol Chem, 260 : 1067-1082, 1985
- (50) Gottfried, E.L. : Lipids of human leukocytes : relation to cell type. J Lipid Res, 8 : 321-327, 1967

(61. 8. 4 受稿)