

## IDENTIFICATION OF EBV-TRANSFORMED B CELL AND THE ROLE OF EBV SPECIFIC KILLER T CELL

Shinji Tamura, Masaru Kunimoto, Hiromu Kakiuchi,  
Toshihide Tabata

Department of Otolaryngology, Wakayama Medical College

EBV-induced B cell focus-regression assay was carried out to determine the activity of EBV specific killer T cells in the peripheral blood from the patients with malignant diseases on head and neck. The results were summarized as follows;

- 1) When the regression by assay was seen, HLA-DR positive activated T cells with IL-2 receptor were appeared at 3 days after infection of EBV, though B cells were gradually decreased.
- 2) In case of none of regression, EBV-transformed B cells were remarkably increased at 10 days after infection. These cells were characterized with EBNA and

LMP positive, expressing CR2 and CD23, then T cells were gradually decreased.

- 3) All the EBV-seronegative cases showed none of regression.
- 4) The activity of EBV specific killer T cells was impaired in the patients of EBV-positive nasopharyngeal carcinoma (NPC), of course, it was normal in EBV-negative NPC. It was also documented that the histological type of NPC was related.
- 5) Malignant lymphoma and the other head and neck cancer demonstrated normal activity.

## EB virus 感染B細胞の同定とT細胞の役割

田村 真司 國本 優  
垣内 弘 田端 敏秀

和歌山県立医科大学耳鼻咽喉科

### はじめに

Epstein-Barr virus (以下EBV) に対する long-term T-cell mediated immunity は、本ウイルスの初感染及び持続感染における主要な cellular immunity の担い手であると考えられている<sup>1)</sup>。また、最近ATL、及びそのキャリアにおいてその活性の低下が報告され

ており<sup>2)</sup>、その活性による全身の免疫能を検索する試みがなされている。

今回我々は、このEBV特異的キラーT細胞活性測定 assay におけるEBV感染B細胞の同定とその際のT細胞の役割を検索し、更にEBVの関与すると考えられている上咽頭癌を含む頭頸部悪性腫瘍患者におけるEBV特異的

キラーT細胞活性の測定を行ったので報告する。

### 材料および方法

EBV特異的キラーT細胞活性の測定は、甲木等により報告されたEBV-induced B cell focus-regression assay<sup>3)</sup>により行った。

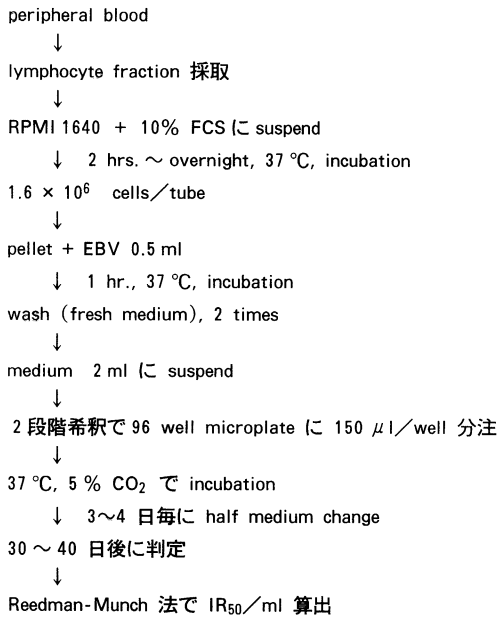


Fig. 1 General procedure of EBV-induced B cell focus-regression assay.

ヒトのヘパリン加末梢血を採取し、Ficoll-Hypaque比重遠沈法にてリンパ球分画を採取し、培地で2時間から一晩培養する。1.6×10<sup>6</sup>個を取り、遠沈し、B95-8細胞の培養上清より作成し、あらかじめ臍帯血リンパ球にて定量したウイルス液を0.5ml加え37°Cで1時間B cellに吸着させる。洗浄後培地を加え、96 well microplateに80×10<sup>4</sup>/mlから2段階希釈で、150μlあて各6穴に分注する。3~4日毎に1/2培地交換しながら37°Cで培養し30~40日後にregressionの有無を判定し、Reedman-Munch法にて、50%regressionに要する最小細胞数(initial cell concentration required to achieve 50% incidence of regression in EBV-infected cell culture : IR<sub>50</sub>/

ml)を算出した(Fig. 1)。

対照として、著者の末梢血を用いassayを行った。40×10<sup>4</sup>/mlでは、すべてのwellでregressionがみられ、10×10<sup>4</sup>/mlではすべてのwellで細胞の増殖が認められた。そこで、40×10<sup>4</sup>/ml、および10×10<sup>4</sup>/mlにてassayを行うことにし、前者をA群、後者をB群とした。EBV感染前、および感染3, 5, 7, 10, 14, 21, 28日後に細胞を回収し、trypanblue dye exclusion法により200個の細胞をcountし、その生存率(%)を算出し、また、smear slideを作成し、モノクローナル抗体により酵素抗体法による免疫染色を行い、各種細胞の割合を検索した。EBNA (EBV-determined nuclear antigen) は蛍光抗体補体法にて検索した。

対象は、EBV既感染の正常者4例、EBV未感染の正常者3例、および当科を受診した悪性腫瘍患者(上咽頭癌5例、悪性リンパ腫5例、喉頭癌2例、上顎癌1例、聴器癌1例)としてassayを行った。EBVの感染の有無は血中抗体価にて判定した。

### 結 果

A群(40×10<sup>4</sup>/ml)のwellでは、感染5~14日目には、細胞がclumpを形成したが、その後増殖は見られず、blast化した細胞にregressionが認められた。しかし、B群(10×10<sup>4</sup>/ml)のwellではclumpを作った細胞が次第に増殖した。

この間の各wellの細胞の生存率をFig. 2に

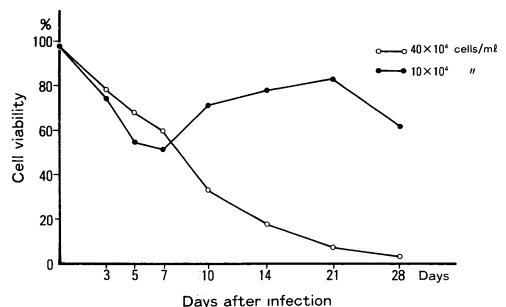


Fig. 2 Cell viabilities of different cell concentration after EBV infection.

示す。A群では細胞の生存率は経時的に低下し、3週間後には10%以下となり、regressionが起こったと考えられた。B群では1週目までは同じように生存率は低下したが、その後上昇した。4週目に生存率が低下しているのは、細胞がovergrowthしたためと考えられる。

次に、構成細胞の割合の経時変化をTable 1に示す。A群の21、28日目は死細胞が多

細胞濃度 /ml	抗体	CD	days after infection									
			0	3	5	7	10	14	21	28		
40×10 <sup>4</sup>	Leu 4	3	##	##	##	##	##	##	##	##	*	*
	Leu 3a	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Leu 2a	8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Tac	25	-	+	+	+	+	+	±	±	±	±
	panB	22	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±
	CR 2	21	-	±	±	±	±	±	±	-	-	-
	Leu 20	23	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-
	EBNA	-	±	±	±	±	-	-	-	-	-	-
	LMP	-	+	+	+	+	+	±	±	±	±	±
	HLA-DR	+	+	+	+	##	##	##	##	##	##	##
10×10 <sup>4</sup>	Leu 4	3	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##
	Leu 3a	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±
	Leu 2a	8	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±
	Tac	25	-	±	±	±	±	±	±	-	±	±
	panB	22	+	+	+	+	+	+	##	##	##	##
	CR 2	21	-	-	+	+	+	+	##	##	##	##
	Leu 20	23	-	-	±	±	±	±	±	±	±	±
	EBNA	-	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	LMP	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±
	HLA-DR	+	+	+	+	##	##	##	##	##	##	##

- : 0%, ± : trace, + : ~25%, # : 25~50%, ## : 50~75%, ### : 75%~  
 \* : 40×10<sup>4</sup>/mlの21, 28daysは死細胞が多いため判定不能

Table 1 Immunological identification of surface phenotype and EBV related antigens on the cultured cells after EBV infection.

いため判定できなかった。A群では、常にT cellが多数存在し、培養3日目よりIL-2 receptorのTac陽性細胞が出現した。EBV感染細胞を示すEBNA, LMP (latent membrane protein) 陽性細胞も少数出現したが、増殖は認められず、次第に減少した。また、7、10日目ではHLA-DR陽性細胞の増加が認められた。

一方、B群ではT cellは10日目より減少し、代わってB cellの増加が認められた。これら

の細胞はその形態より、EBV-transformed B cellと考えられ、EBNA, LMP陽性であり、CR 2, CD23などの表面抗原が発現されていた。CD23はCR 2にやや遅れて発現されていた。Tac陽性の活性化T cellの出現も認められたが、その数はB cellに比して非常に少なかった。

Fig. 3は症例毎のassayの結果をまとめた

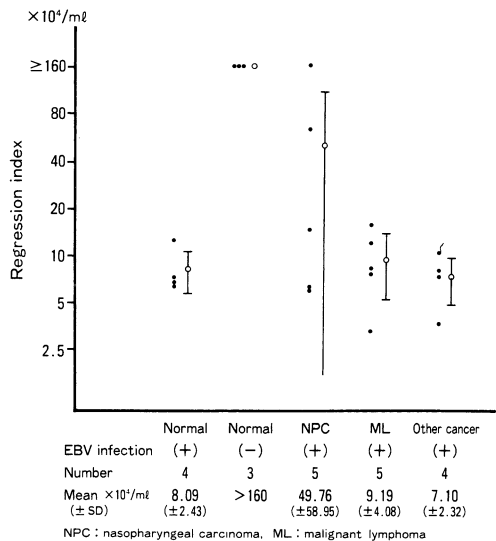


Fig. 3 Graphical representation of regression index showing the activity of EBV specific killer T cells.

ものである。EBV既感染の正常者のIR<sub>50</sub>/mlは、平均8.09×10<sup>4</sup>/mlであり、未感染者ではregressionは全く認められなかった。上咽頭癌では、5例中2例で活性の低下が認められ、特に1例ではEBV-seropositiveであるにもかかわらずregressionは全く見られず、IR<sub>50</sub>/mlは、平均49.76×10<sup>4</sup>/mlであった。悪性リンパ腫では、平均は9.19×10<sup>4</sup>/ml、その他の頭頸部癌では、平均7.10×10<sup>4</sup>/mlとEBV既感染の正常者と同様に活性の低下した症例は認められなかった。

上咽頭癌の症例では、regression活性の高い2例(症例Y.N., N.S.)は、共に扁平上皮癌で、腫瘍にはEBV genomeは認められな

Case	Y.N.	N.S.	M.T.	T.N.f	K.H.
Age	74	43	53	59	48
Sex	male	male	male	male	male
Histologic diagnosis	moderately diff. scc	poorly diff. scc	non-keratinizing carcinoma	undiff. carcinoma	non-keratinizing carcinoma
Stage	IV, T1N3M0	V, T2N3M0	IV, T4N1M0	II, T1N1M0	V, T4N3M0
Anti-EBV Ag. titers					
VCA IgG	640	40	1280	5120	320
IgA	80	<10	40	320	40
EA IgG	<10	<10	40	320	80
IgA	<10	<10	<10	<10	<10
EBNA	20	80	640	320	160
Tumor specimen					
EBNA expression	-	-	N.D.*	+	+
LMP expression	-	N.D.	N.D.	+	±
EBV DNA	-	-	N.D.	+	N.D.
Regression index*	5.96	6.16	14.42	62.25	>160

\*: not done, †: recurrence  
#: ×10<sup>3</sup>/ml

Table 2 A summary of clinical profiles of nasopharyngeal carcinomas.

かった (Table 2)。症例M. T. は活性がやや低く、組織はnon-keratinizing carcinomaで、抗EBV抗体価は高値を示していた。症例T. N. は再発例で、組織はundifferentiated carcinoma, 抗EBV抗体価も高値で、腫瘍組織にEBNA, LMPの発現が認められ、EBV DNAも陽性であり、regression活性は、明らかに低下が見られた。症例K. H. はnon-keratinizing carcinomaでEBNA陽性、LMPも一部の腫瘍細胞では陽性であった。EBV-seropositiveであるにもかかわらずregression活性は全く認められなかった。

## 考 察

今回、上咽頭癌を含む頭頸部腫瘍患者においてEBV-induced B cell focus-regression assayを用いてEBV特異的キラーT細胞活性を測定したところ、EBV陽性の組織型ではnon-keratinizing carcinoma (WHO II), undifferentiated carcinoma (WHO III) の症例で活性の低下が認められた。特に1例では活性は全く認められなかった。これに対し、EBV陰性のsquamous cell carcinoma (WHO I) の症例では活性は正常であった。一方、悪性リンパ腫、およびその他の頭頸部癌ではホジキン病の症例でやや活性の低下が認められた以外は、すべて正常者と同様であった。

このassayにおいて、regressionが認められる場合と認められない場合で経時的に構成細

胞の比率を調べたところ、認められる場合には常に多数のT cellが存在しEBV感作により活性化したと思われる大型でCD 4, CD 8陽性の細胞が出現した。それに伴いIL-2 receptor陽性細胞, HLA-DR陽性細胞の増加が認められ、これらの細胞がEBV-transformed B cellを攻撃しregressionが起こったと思われた。一方、regressionが認められない場合、T cellは感染10日目より減少し、代わって大型のB cellが増加した。この細胞はCR 2, CD23陽性でEBV関連抗原であるEBNA, LMPを発現しており、EBV-transformed B cellであった。

EBVは上咽頭癌の原因ウイルスと考えられているが、未だ直接的な証明はなされていない。今回、EBV特異的キラーT細胞の標的抗原と考えられているLMPが上咽頭癌腫瘍細胞に発現されているにもかかわらず、regression活性の低下が見られたことより、EBVの関与する上咽頭癌の原因としてT cellの機能異常 (EBV特異的キラーT細胞活性の低下) が関係していることが示唆された。

## ま と め

EBV特異的キラーT細胞活性の測定を行い以下の結果を得た。

1. regressionが認められる場合、感染3日目よりIL-2 receptor, HLA-DR陽性の活性化T cellが出現、B cellは減少し、3週間で生細胞は10%以下となった。
2. regressionが認められない場合、感染10日目よりEBV-transformed B cellが増加し、この細胞はEBNA, LMP陽性で、CR 2, CD23を発現していた。T cellは次第に減少した。
3. EBV未感染者では、regressionは認められなかった。
4. EBV陽性の上咽頭癌患者で活性の低下が認められたが、EBV陰性の患者では活性は正常であった。これは腫瘍細胞の組織型と

関連していた。

5. 悪性リンパ腫, 他の頭頸部癌患者では活性は正常者と同様であった。
6. EBVの関与する上咽頭癌の発症に, EBV特異的キラーT細胞活性の低下が関与していることが示唆された。

稿を終えるにあたり御指導, 御援助を頂いた塩野義医科学研究所, 日沼頼夫, 義江修両先生に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) Moss, D. J., Rickinson, A. B. and Pole, J. H. : Long-term T-cell mediated immunity of Epstein-Barr virus in man. I. Complete regression of virus-induced transformation in cultures of seropositive donor leukocytes. *Int. J. Cancer*, 22 : 662-668, 1978.
- 2) Katsuki, T., et al. : Immune suppression in healthy carriers of adult T-cell leukemia retroviruses (HTLV-I) : Impairment of T-cell control of Epstein-Barr virus-infected B-cells. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 78 : 639-642, 1987.
- 3) 甲木孝人 : EBV-induced B cell focus-regression assay法によるEBV特異的キラーT細胞活性の測定. *臨床免疫*, 19 [Suppl. 12] : 267-270, 1987.