

EBV-INFECTED LYMPHOBLASTOID CELL LINES ESTABLISHED FROM VARIOUS LYMPH NODES IN THE HEAD AND NECK REGION

Shinji Tamura, Masaru Kunimoto, Ikuharu Takano and Toshihide Tabata

Department of Otolaryngology, Wakayama Medical College

We established seven lymphoblastoid cell lines (LCLs) from various lymph nodes in the head and neck region (1 case of reactive lymphoid hyperplasia, 1 of atypical lymphoid hyperplasia, 3 of malignant lymphomas, 1 of metastasis of nasopharyngeal carcinoma and 1 of infectious mononucleosis), and one LCL from the peripheral blood of the patient suffered from chronic infectious mononucleosis (IM). These 8 LCLs were examined about the morphology, expression of the adhesion molecules and the contained Epstein-Barr virus (EBV) genomes.

The summarized results were as follows;

- 1) Two LCLs derived from IM cases were growing in the floating single cells, whereas the other 6 LCLs were whether forming clumps or adhering to the wall of culture flask.
- 2) All LCLs expressed LFA-1 (CD11a) and ICAM-1 (CD54). Hermes (CD44) was not expressed on the LCLs from IM cases, but the other 6 LCLs express-

ed the Hermes.

- 3) EBV nuclear antigen (EBNA) and latent membrane protein (LMP) were expressed on all examined LCLs. EBV DNA was detected in the seven of 8 LCLs by polymerase chain reaction (PCR) detecting the sequence coding the EBNA2 region of EBV genome. By this PCR method, EBV DNA was not detected in one LCL derived from the peripheral blood of IM case, and it was suggested that the sequence coding the EBNA2 region of this LCL EBV genome was containing a large deletion by Southern blot hybridization probed with EBV *Bam* HI-H fragment.
- 4) Seven of 8 LCLs (88%) contained type 1 EBV genomes. The same results were obtained in the mouth washings of the healthy donors and the tissues of nasopharyngeal carcinomas, so it was thought that the type 1 EBV was predominant in Japan.

頭頸部領域リンパ節より樹立したEBV感染 リンパ芽球様細胞株の検討

田村 真司 國本 優 高野 郁晴 田端 敏秀

和歌山県立医科大学耳鼻咽喉科学教室

はじめに

Epstein-Barr virus (EBV) は初感染の後、その宿主に潜伏感染を起こす代表的なウイルスの一つである。また、年長者の初感染では伝染性単核症を発症することがあるだけでなく、上咽頭癌やホジキン病を含めたいくつかの型の悪性リンパ腫との関連が報告されている。正常EBV既感染者では末梢血、およびリンパ節内には非常に少数のEBV感染B細胞が存在している。これまでEBV感染パーキットリンパ腫細胞株^{1,2)}や上咽頭癌細胞株³⁾については種々の面から検討されているが、非腫瘍性のEBV感染リンパ芽球様細胞株 (lymphoblastoid cell line, LCL) についての検索は散見される程度である¹⁾。このLCLを検索することはEBVによる伝染性単核症や悪性腫瘍の発症を考える上に重要であると思われる。今回我々は、頭頸部領域のリンパ節より7株と慢性伝染性単核症患者の末梢血より1株のLCLを樹立できたので、その培養細胞の形態、付着分子の発現、および感染しているEBVについて検討を行った。

材料と方法

1) 材料とLCLの樹立法

材料は7例の頭頸部リンパ節と1例の末梢血で、その詳細はTable 1に示した。そ

NAME	SEX	AGE	SOURCE	DISEASE	DATE
1 有本	M	19	lymph node	reactive lymphoid hyperplasia	1991.11. 6
2 大川	F	47	lymph node	atypical lymphoid hyperplasia	1991. 6.19
3 山下	M	62	lymph node	malignant lymphoma	1990. 5.30
4 長谷	F	70	lymph node	malignant lymphoma	1990.11.20
5 橋本	M	62	lymph node	malignant lymphoma	1991.10. 9
6 松本	M	64	lymph node	metastatic lymph node of NPC	1991.10.29
7 鈴木	F	15	lymph node	infectious mononucleosis	1990.12. 3
8 中元	M	10	peripheral blood	infectious mononucleosis	1990. 9.12

Table 1 Profiles of established lymphoblastoid cell lines(LCLs).

それぞれの材料より無菌的に単離したリンパ球を10% FCS 加 RPMI 1640 培地 (ペニシリンG 100U/ml, ストレプトマイシン100 μg/mlを含む) に浮遊し、週2回培地を交換することによりLCLを樹立した。

2) 付着分子の発現の検索

1) で樹立された細胞よりスメアスライドを作成し、冷アセトン固定後、各種単クローン抗体を一次抗体として反応し、酵素抗体法にてその発現を検出した。使用した抗体は、CD 3, CD22, LFA-1 (CD11a), ICAM-1 (CD54), Hermes (CD44) である。EBV 核内抗原 (EBNA) の発現は蛍光抗体補体法にて、latent membrane protein (LMP) の発現は単クローン抗体を用いて酵素抗体法にて検出した。

また同時にいくつかのパーキットリンパ腫由来細胞株についても検索を行った。

3) EBV の検出、およびそのゲノム解析

培養細胞より通常の方法にてDNAを抽出し、我々が開発したEBVのEBNA2をコードする領域を検出するPCR法⁴⁾によりその型別を検索した。このPCR法では1型の欠損を含む領域を増幅しそのPCR産物のサイズにより1型、2型の型別を判定できる位置にプライマーを設定した。

また、いくつかのLCLについてはEBNA2をコードする領域であるEBV BamHI-H断片をプローブとして通常の方法にてサザンハイブリダイゼーション法を行った。

結 果

Table 1に示すように反応性リンパ過形成1例、異型性リンパ過形成1例、悪性リンパ腫3例、上咽頭癌の転移1例、伝染性単核症1例の各リンパ節より計7株、および慢性伝染性単核症の末梢血より1株のLCLを樹立した。これらはそれぞれ培養開始後約1ヶ月で樹立された。これらの細胞株は免疫染色によりCD22陽性、CD3陰性でB細胞系と考えられた。

培養細胞の形態は伝染性単核症より樹立された2株(鈴木, 中元LCL)では浮遊単細胞の状態で増殖した(Fig. 1A)が、他の細胞株(有本, 大川, 山下, 長谷, 橋本, 松本L

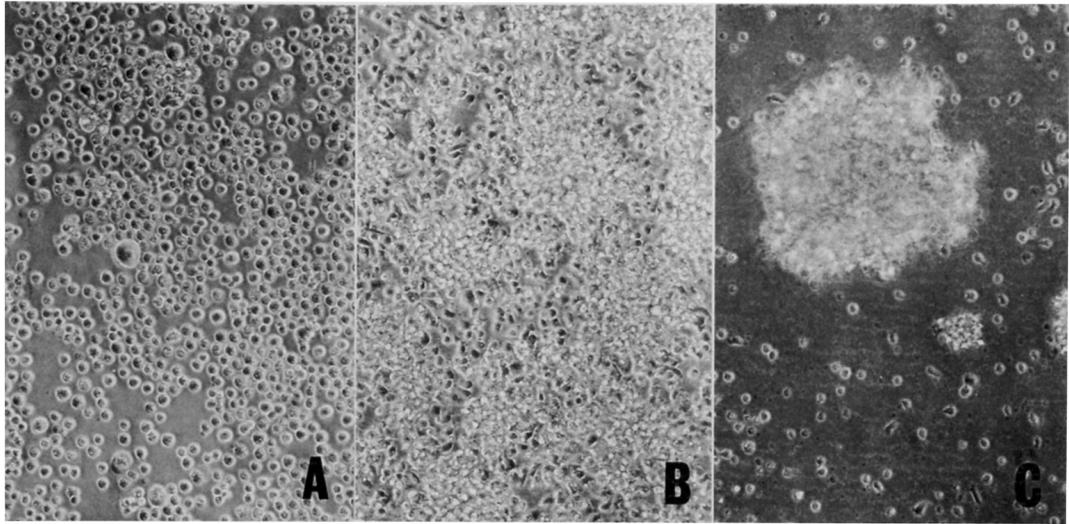


Fig. 1 Morphologic findings of established LCLs.
 A : LCL derived from infectious mononucleosis lymph node (No.7 in Table 1).
 B : LCL derived from reactive lymphoid hyperplasia lymph node (No.1).
 C : LCL derived from malignant lymphoma lymph node (No.4).
 (original magnification×50).

CL) では、培養フラスコの壁に付着、またはクランプを形成した (Fig. 1 B, C) .

CELL LINE	DISEASE	EXPRESSION OF					PCR TYPING*
		LFA-1	ICAM-1	HERMES	EBNA	LMP	
有本 LCL	RLH	+	+	+	+	+	1
大川 LCL	ALH	+	+	+	+	+	1
山下 LCL	NHL	+	+	+	+	+	1
長谷 LCL	NHL	+	+	+	+	+	1
橋本 LCL	NHL	+	+	+	+	+	1
松本 LCL	NPC	+	+	+	+	+	1
鈴木 LCL	IM	+	+	-	+	+	1
中元 LCL	IM	+	+	-	+	+	1
RAJI	BL	+	+	-	+	+	1
AKATA	BL	+	+	-	+	+	1
JUJOYE	BL	+	+	-	+	+	2
AG876	BL	+	+	+	+	+	2
BJAB	BL	+	+	-	-	-	-

RLH:reactive lymphoid hyperplasia, ALH:atypical lymphoid hyperplasia
 NHL:non-Hodgkin's lymphoma,NPC:metastatic lymph node of NPC
 IM:infectious mononucleosis,BL:Burkitt's lymphoma
 *The EBV typing was done by PCR method of EBNA2 region.

Table 2 Expression of adhesion molecules and EBV related antigens, and typing of the contained EBV genomes in LCLs and Burkitt's lymphoma cell lines.

付着分子の発現では、すべてのLCLはLFA-1, ICAM-1陽性であった。Hermesは培養細胞がフラスコ底に付着、またはクランプを形成していた6株では陽性であったが、浮遊単細胞であった伝染性単核症由来の2株(鈴木, 中元LCL)では陰性であった (Table 2)。同時に検索したバーキットリンパ腫由

来株ではクランプを形成するAG876のみがHermes陽性であった。また、EBNA, LMPはすべてのLCLで発現が認められた (Table 2)。

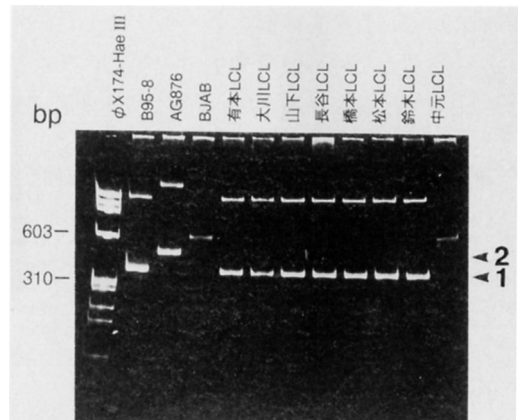


Fig. 2 Detection and typing of EBV genomes in LCLs by PCR method. B95-8, AG876 : EBV positive cell lines containig type 1 and 2 EBV genomes, respectively. BJAB : EBV negative cell line. 1, 2 : bands of type 1 and 2 EBV DNA, respectively.

PCR を用いた EBV の型別の検索では、中元 LCL 以外の 7 株では 1 型の EBV が検出されたが、中元 LCL では今回用いた PCR の系では検出されなかった (Fig. 2, Table 2). この中元 LCL を含めた 4 株の LCL について

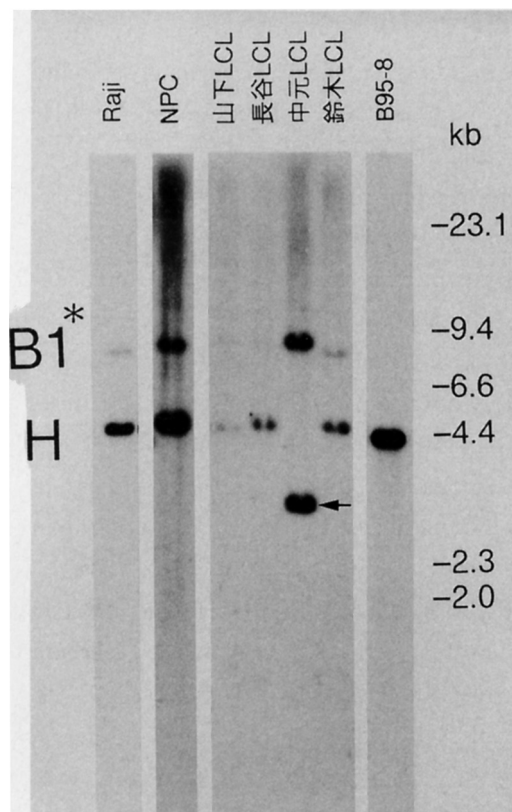


Fig. 3 Detection of EBV *Bam*HI-H fragments in LCLs by Southern blot hybridization.

Each DNA is digested by *Bam*HI restriction enzyme and probed with EBV *Bam*HI-H fragment. Raji, B95-8: EBV positive cell lines, NPC: nasopharyngeal carcinoma, B1*, H: bands of EBV *Bam*HI-B1* and-H fragments.

PCR で増幅した EBNA2 領域を含む *Bam*HI-H 断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行ったところ中元 LCL では、他の LCL や B95-8, Raji 細胞株より小さい *Bam*HI-H 断片が検出された (Fig. 3, arrow).

考 察

今回種々の疾患の頭頸部リンパ節、および伝染性単核症の末梢血より樹立した LCL について検討を行った。形態については伝染性単核症由来の 2 株では浮遊単細胞であり、他の反応性リンパ節や悪性リンパ腫由来の LCL では培養フラスコ壁や細胞間の接着を示した点に興味をもたれた。この原因としては接着因子の発現の検索により Hermes (CD44) の発現の欠如が考えられた。

次にこのような発現の差が感染した EBV にあるのではないかと考え、それぞれの LCL に含まれる EBV ゲノムの検索を行った。伝染性単核症由来の LCL のうち鈴木 LCL では PCR では 1 型の EBV が検出され、サザンハイブリダイゼーションでも通常のサイズの *Bam*HI-H 断片が検出された。一方、慢性伝染性単核症末梢血由来の中元 LCL では我々の行った PCR では検出されず、サザンハイブリダイゼーションにて EBNA2 の一部をコードする *Bam*HI-H 断片のサイズが小さく、この領域に欠損があることが示唆された。EBV 感染細胞に対する T 細胞免疫の標的抗原は、LMP⁵⁾ および EBNA2 の一部と考えられている。今回伝染性単核症由来の LCL でこの EBNA2 領域の欠損が認められたことは伝染性単核症発症における EBV の役割を考える上に興味深い。更に LMP など他の領域についても検索が必要であると考えられる。

また、本邦の種々の材料による EBNA2 領域の型別割合の PCR での検索では、健常人の咽頭うがい液⁴⁾、上咽頭癌組織⁵⁾ともに 1 型が優位であり、今回樹立した LCL で 8 株中 7 株 (88%) が 1 型であったことと合わせ本邦では 1 型が優位であると考えられる。

ま と め

頭頸部領域のリンパ節 (反応性腫大 2 例、悪性リンパ腫 3 例、上咽頭癌の転移 1 例、伝染性単核症 1 例) から EBV 感染リンパ芽球

様細胞株 (LCL) を計7株樹立し, 慢性伝染性単核症患者の末梢血より樹立された1株を加え以下の検討を行った.

1. 培養細胞株の形態は, 伝染性単核症より樹立された2株は浮遊単細胞であったが, 他のLCLはフラスコ底に付着, あるいはクランプを形成した.
2. 付着分子の検索では, LFA-1, ICAM-1は全細胞株で発現が見られたが, Hermesは伝染性単核症の2株では発現は認められなかった.
3. EBNA, LMPは全細胞株で発現が見られ, EBNA2領域のPCR法ではそのうち7株で1型のバンドが検出された. 伝染性単核症末梢血より樹立された株ではPCR法により増幅が見られず, サザンブロット法によりEBVのこの領域に欠損があることが示された.
4. LCLより検出されたEBVは88%が1型であり, 正常者の咽頭うがい液, および上咽頭癌組織より検出されたEBVと同様に1型が優位であった.

文 献

- 1) Rincon, J., Prieto, J., et al: Expression of integrins and other adhesion molecules in Epstein-Barr virus-transformed B lymphoblastoid cells and Burkitt's lymphoma cells. *Int. J. Cancer* 51: 452-458, 1992.

- 2) Gulley, M. L., Raphael, M., et al: Epstein-Barr virus integration in human lymphomas and lymphoid cell lines. *Cancer* 70: 185-191, 1992.
- 3) Zhang, H.-Y., Yao, K., et al: Expression of the Epstein-Barr virus genome in a nasopharyngeal carcinoma epithelial tumor cell line. *Int. J. Cancer* 46: 944-949, 1990.
- 4) Kunimoto, M., Tamura, S., et al: One-step typing of Epstein-Barr virus by polymerase chain reaction: predominance of type 1 in Japan. *J. Gen. Virol.* 73: 455-461, 1992.
- 5) Murray, R. J., Wang, D., et al: Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T-cell recognition of transfectants expressing the virus-coded latent membrane protein LMP. *J. Virol.* 62: 3747-3755, 1988.
- 6) 國本 優, 田村真司ら: 口腔咽頭疾患と Epstein-Barr virus - Polymerase chain reaction (PCR) による唾液中EBVの検出-. *口咽科* 3: 157-163, 1991.