

〔原 著〕

Epstein-Barr ウィルス形質転換ヒト末梢血 B 細胞が 分泌する抗スギ花粉抗体の検索

独立行政法人食品総合研究所

新本洋士

宮崎大学農学部

高橋俊浩

財団法人東京都臨床医学総合研究所

新本美智枝

スギ花粉アレルゲンに対するヒト抗体分泌細胞を取得する目的で、13 人のドナーより末梢血リンパ球を採取し、Epstein-Barr ウィルスで形質転換した。約 5000 の培養穴に形質転換細胞が増殖し、そのうち 88 穴にスギ花粉粗アレルゲンに対する抗体分泌細胞が検出された。精製スギ花粉アレルゲン Cry j1 および Cry j2 との反応を調べたところ、Cry j1 と反応する抗体は 14、Cry j2 と反応する抗体分泌細胞は 10 であった。スギ花粉アレルゲンに結合するほとんどの抗体は IgM クラスであり、これは Epstein-Barr ウィルスが IgM を表現した B 細胞に感染するためと考えられる。

Key words : antibodies — cedar pollen — Epstein-Barr virus — human B-lymphoblastoid cells

はじめに

スギ花粉症は大量のスギ花粉の飛散によって引き起こされるアレルギー症状である¹⁾。くしゃみ、鼻水、鼻詰まり、目のかゆみ、頭痛などの症状を引き起こし、労働生産性を低下させる原因として大きな社会問題となっている。患者血清を用い、スギ花粉中のアレルゲンとして Cry j1 および Cry j2 の 2 種の主要スギ花粉アレルゲン蛋白質が同定され^{2)–4)}、最近では新たなスギ花粉アレルゲンも見いだされつつある。マウスモノクローナル抗体や患者血清を用い、スギ花粉アレルゲン上の抗体結合部位 (B 細胞エпитープ) が解析され、また T 細胞エпитープの解析も進んでいる^{5)–8)}。

このような中で、スギ花粉に対するヒト抗体は、ヒ

トの花粉に対する免疫応答を解析するツールとして有用と考えられるが、これまでスギ花粉に対するヒト抗体を継続的に分泌する細胞株を作製した報告はない。

筆者らはこれまでに、食物アレルゲンに対するヒト抗体分泌細胞の取得を試みてきた⁹⁾¹⁰⁾。その過程で、健康人末梢血リンパ球を Epstein-Barr ウィルス (EBV) で形質転換することにより、米、小麦、大豆、乳蛋白質、卵白蛋白質など種々の食物アレルゲンに対するヒト抗体分泌細胞を得られることが明らかになった¹¹⁾。また、豚ゼラチンに対する抗体を用いた競争酵素免疫測定法によって低アレルゲン化ゼラチンの抗原性を判定できることを報告した¹²⁾。

本研究ではスギ花粉アレルゲンの構造解析に利用できるヒト抗体分泌細胞を樹立することを目的とし、ヒト末梢血リンパ球を Epstein-Barr ウィルス (EBV) で形質転換することにより、多数の抗体分泌細胞を見いだしたので報告する。

Received : August 28, 2003

Accepted : November 10, 2003

Abbreviations : EBV Epstein-Barr virus

新本洋士 : 独立行政法人食品総合研究所 [茨城県つくば市観音台 2-1-12]

E-mail : shinmoto@affrc.go.jp

Table 1 Transformation of human peripheral blood lymphocytes with Epstein-Barr virus

Donor #	Wells with transformed cells	Wells with anti-pollen antibodies	Donor #	Wells with transformed cells	Wells with anti-pollen antibodies
1	438	2	8	540	4
2	672	5	9	480	5
3	280	10	10	576	15
4	288	9	11	384	5
5	288	3	12	288	17
6	332	1	13	288	2
7	288	10			

試料および方法

1. 末梢血リンパ球の調製

スギ花粉症患者6人を含む13人の健常人よりヘパリン採血し、密度勾配遠心法により末梢血リンパ球を調製した。血液10mlを等量のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で希釈し、この7mlをあらかじめ15ml遠心管に分注しておいた5mlのフィコールバック(アマシャムバイオサイエンス)の上に重層し、1500×gで30分間遠心した。フィコールバックと血漿の界面に得られた単球画分をERDF培地(極東製薬株式会社)で3回遠心洗浄し、末梢血リンパ球とした。なお、採血にあたっては、血液提供者に本研究の趣旨を詳しく説明し、同意を得た。

2. Epstein-Barr ウィルス (EBV) による形質転換

EBVはマーモセットB95-8株の培養上清を用いた¹³⁾。B95-8株は10%牛胎児血清(FCS)を含むRPMI 1640培地(Sigma)で培養し、培養上清は0.45μmのフィルターを通した後、-80℃に保存した。ヒト末梢血リンパ球を10%FCSを含むERDF培地に1×10⁶/mlの細胞密度になるようにけんだくし、ここに1/10容量のEBV保存液を添加した。さらにエタノールに溶解したサイクロスポリンA(和光純薬)溶液を終濃度2μg/mlとなるように加え、96穴マイクロカルチャープレートに1穴あたり1×10⁵細胞ずつ播種した。適宜10%FCSを含むERDF培地を添加して37℃、5%炭酸ガス:95%空気的环境下で2~3週間培養した。

3. 酵素免疫測定法による抗スギ花粉抗体の検出

スギ花粉抽出物(LSL株式会社)、精製スギ花粉アレ

ルゲンCry j1およびCry j2(生化学工業株式会社)を50mmol/Lの炭酸水素ナトリウム溶液に0.5~1.0μg/mlとなるように溶解し、96穴ELISAプレート(住友ベークライト株式会社)に分注して4℃で16時間、アレルギーを吸着させた。アレルギーを捨てた後、希釈したブロックエース(大日本製薬株式会社)で1時間プレートをブロッキングし、0.05%Tween20を含むPBSでプレートを3回洗浄した。形質転換ヒトリンパ球の培養上清50μlを各穴に加えて1時間静置後、希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgA, IgG, IgM, IgE抗体(バイオソースインターナショナル)を加えた。1時間静置後プレートを6回洗浄し、基質溶液(2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazolin sulfonic acid), ABTS, 和光純薬株式会社)を加えて発色させた。なお、試験の過程でアレルギーをコートしないプレートと反応する非特異的抗体がいくつか見られたが、これらは結果から除外した。

結果および考察

EBVはヘルペスウィルスの一種である。通常、ウィルスは感染した細胞を死に至らしめるが、EBVは抗体を分泌するヒトB細胞に対しては、あたかも幼若化物質のように働き、細胞を継続させて増殖させる働きがある。13人のドナーから得た末梢血リンパ球をEBVで形質転換したところ、播種した約50枚の培養プレートのすべての培養穴に塊状になって増殖する形質転換細胞が得られた。

約50枚のEBV形質転換ヒトB細胞培養プレートからの培養上清について、スギ花粉抽出物(粗アレルギー)との反応を調べたところ、88の培養上清にスギ

Table 2 Detection of antibodies to cedar pollen allergens secreted by transformed human B-cells

Cell #	Ig class	Antigen(s)*	Cell #	Ig class	Antigen(s)	Cell #	Ig class	Antigen(s)
1-254	M	C	7-1	M	C	10-542	M	C
1-328	G	12	7-24	M	C1	10-543	M	C
2-117	M	12	7-30	M	C	10-547	M	2
2-162	M	C	7-37	M	C	10-564A	A	2
2-251	M	1	7-39	M	C	10-564M	M	2
2-256	A	C	7-93	M	1	11-261	M	C
2-2203	M	1	7-126	M	1	11-265	M	C
3-6	M	C	7-149	M	C	11-287	M	C
3-48	M	C	7-268	M	C	11-292	M	C
3-52	M	1	7-276	M	12	11-296	M	C
3-153	M	C	8-41	M	C	12-25	M	C
3-204	M	1	8-240	M	2	12-26	M	C
3-217	M	C	8-395	M	C	12-30	M	C
3-234	M	C	8-413	M	C	12-31	M	C
3-266	M	2	9-34	M	1	12-33	M	C
3-268	M	C	9-57	M	C	12-36	M	C
3-276	M	C	9-208	M	C	12-138	M	C
4-10	M	C	9-210	M	C	12-201	M	C
4-22	M	C	9-303	M	C	12-202	M	C
4-33	M	C	10-74	M	C	12-203	M	C
4-77	M	2	10-179	M	C	12-208	M	C
4-104	M	C	10-184	M	C	12-210	M	C
4-107	M	C	10-185	M	C	12-225	M	1
4-177	G	1	10-186	M	C	12-228	M	C
4-194	M	C	10-188	M	C	12-230	M	C
4-197	M	2	10-227	M	C	12-231	M	C
5-145	M	C	10-228	M	C	12-233	M	C
5-213	M	C	10-231	M	C	13-38	M	C
5-217	M	C	10-236	M	1	13-52	M	C
6-296	M	C	10-540	M	C			

* C : crude pollen antigen, 1 : Cry j1, 2 : Cry j2.

花粉抽出物と結合する抗体が含まれていた (表 1)。

ドナーのうち、スギ花粉症の自覚症状のある患者は、2, 3, 8, 9, 10, 13 の 6 人であったが、これらの患者から特にスギ花粉抽出物に対する抗体分泌細胞が多く得られたわけではなかった。花粉症の既往がないドナーの末梢血 B 細胞からも、スギ花粉抽出物に対する抗体分泌細胞が得られた。特にドナー 4, 7, 12 からは多数の抗体分泌細胞が得られた。これらの事は、スギ花粉症の症状が出ていない健常人であっても、末梢血中にはスギ花粉抽出物に対する抗体分泌細胞が多数存在することを示している。本研究ではドナーの血清中の抗スギ花粉アレルゲン抗体 (特に IgE 抗体) については検討していないが、4, 7, 12 がスギ花粉症の自覚症状のない高抗体価ドナーである可能性もある。今後、血中抗体

価についても検討を行いたい。

表 1 に示した B 細胞培養上清のうち、スギ花粉抽出物と強く反応した抗体のクラスを調べたところ、IgA クラス 2, IgG クラス 2, IgM クラス 85, IgE クラス 0 であった (表 2)。このうち、10-564 は IgM と IgA の 2 つのクラスの抗スギ花粉抗体を分泌していた。IgM クラスの抗体がほとんどであったことは、EBV が細胞表面に IgM を表現した B 細胞に感染するためと考えられる¹⁴⁾。

次にスギ花粉抽出物と反応する培養上清に含まれる抗体について、精製スギ花粉アレルゲン Cry j1 および Cry j2 との反応を調べたところ、Cry j1 と反応する抗体を含む上清は 14, Cry j2 と反応する抗体を含む上清は 10 (どちらの抗原とも反応する上清を含む) であっ

たが, Cry j1, j2 のどちらとも反応せず, スギ花粉抽出物とのみ反応する抗体が 69 あった (表 2 中で C と表記). これらのスギ花粉抽出物 (粗アレルゲン) とのみ反応する抗体が認識するアレルゲン (抗原) について, 詳しく解析する必要がある.

得られた不死化細胞は多数のクローンが混在した状態で増殖している. EBV で不死化した細胞は, 実際には有限増殖細胞である¹⁵⁾. テロメラーゼが活性化されておらず, 長期にわたって安定的に培養することができない. 長期培養すると何らかの理由でテロメラーゼが活性化された細胞クローンのみが生き残り, 当初の細胞集団とは異なった細胞集団に変化する. このため, 抗体分泌が安定なうちに凍結保存し, 必要最小限の継代培養を行うにとどめるのがよい. 今後, これらの抗体分泌形質転換 B 細胞から安定な抗体分泌細胞をクローニングし, ヒトモノクローナル抗体を得る必要があると思われる. スギ花粉アレルゲンに対するヒトモノクローナル抗体は, アレルゲンの検出, アレルゲン蛋白質のエピトープ解析等に有用と考えられる.

文 献

- 1) Okawa, T., Konno, A., Yamakoshi, T., Numata, T., Terada, N., et al. : Analysis of natural history of Japanese cedar pollinosis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **131**, 39-45, 2003.
- 2) Kawashima, T., Taniai, M., Taniguchi, Y., Usui, M., Ando, S., et al. : Antigenic analyses of Sugi basic protein by monoclonal antibodies I. Distribution and characterization of B-cell-tropic epitopes of Cry j I molecules. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **98**, 110-117, 1992.
- 3) Sone, T., Komiyama, N., Shimizu, K., Kusakabe, T., Morikubo, K., et al. : Cloning and sequencing of cDNA coding for Cry j I, a major allergen of Japanese cedar pollen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**, 619-625, 1994.
- 4) Komiyama, N., Sone, T., Shimizu, K., Morikubo, K., et al. : cDNA cloning and expression of Cry j II the second major allergen of Japanese cedar pollen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**, 1021-1028, 1994.
- 5) Taniai, M., Kayano, T., Takakura, R., Yamamoto, S., Usui, M., et al. : Epitopes on Cry j I and Cry j II for the human IgE antibodies cross-reactive between Cupressus sempervirens and Cryptomeria japonica pollen. *Mol. Immunol.* **30**, 183-189, 1993.
- 6) Suzuki, M., Ito, M., Ito, H., Baba, S., Takagi, I., et al. : Antigenic analysis of Cryptomeria japonica and Chamaecyparis obtusa using anti-Cry j 1 monoclonal antibodies. *Acta Otolaryngol. Suppl.* **525**, 85-89, 1996.
- 7) Tamura, Y., Kawaguchi, J., Serizawa, N., Hirahara, K., Shiraishi, A., et al. : Analysis of sequential immunoglobulin E-binding epitope of Japanese cedar pollen allergen (Cry j 2) in humans, monkeys and mice. *Clin. Exp. Allergy* **33**, 211-217, 2003.
- 8) Yoshitomi, T., Hirahara, K., Kawaguchi, J., Serizawa, N., Taniguchi, Y., et al. : Three T-cell determinants of Cry j 1 and Cry j 2, the major Japanese cedar pollen antigens, retain their immunogenicity and tolerogenicity in a linked peptide. *Immunology* **107**, 517-522, 2002.
- 9) Shinmoto, H., Nakahara, K., Kobori, M. and Tsushida, T. : Preparation of human immortalized B-cells secreting antibodies against food allergens. *Biotechnology Techniques* **12**, 545-547, 1998.
- 10) Shinmoto, H., Yamagishi, K., Kimura, T. and Suzuki, M. : Epitope analysis of a rice allergen with a monoclonal antibody secreted by a human-mouse hybridoma. *Biotechnology Letters* **22**, 1823-1826, 2000.
- 11) 新本洋士 : 食物アレルゲンに対するヒト抗体分泌細胞の作製. *化学と生物* **37**, 286-287, 1999.
- 12) Shinmoto, H., Yamagishi, K., Kimura, T., Suzuki, M. and Sakai, Y. : Antigenicity estimation of collagenase-treated gelatins by a novel assay system using human antibodies secreted by B-lymphoblastoid cells. *Food Sci. Technol. Res.* **7**, 331-333, 2001.
- 13) Shinmoto, H., Dosako, S. and Tanaka, S. : Transformation of human colostrums lymphocytes with Epstein-Barr virus. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* **17**, 129-132, 1992.
- 14) Brown, N.A. and Miller, G. : Immunoglobulin expressed by human B lymphocytes clonally transformed by Epstein-Barr virus. *J. Immunol.* **128**, 24-29, 1982.
- 15) Counter, C.M., Botelho, F.M., Wang, P., Harley, C.B. and Bacchetti, S. : Stabilization of short telomeres and telomerase activity accompany immortalization of Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes. *J. Virol.* **68**, 3410-3414, 1994.

HUMAN ANTIBODIES TO CEDAR POLLEN SECRETED BY HUMAN PERIPHERAL
LYMPHOCYTES TRANSFORMED BY EPSTEIN-BARR VIRUSHiroshi Shinmoto¹⁾, Toshihiro Takahashi²⁾ and Michie Shinmoto³⁾¹⁾*National Food Research Institute*, ²⁾*Miyazaki University*,³⁾*The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science*

To establish immortalized human B-cells secreting antibodies to cedar pollen allergens, peripheral blood lymphocytes from 13 donors were transformed with Epstein-Barr virus. Of 5000 micro culture wells with transformed cell growth, supernatants from 88 wells were found to contain antibodies to pollen allergens. Fourteen supernatants reacted with a cedar allergen Cry j1 and 10 reacted with Cry j2. IgM class antibodies were predominant.
