

Epstein-Barr Virus 特異的 IgE 抗体の検出

東北大学医学部第一内科学教室

大野 勲 丹野恭夫 滝島 任

国立療養所岩手病院内科

井田士朗

ウイルス特異的 IgE 抗体の存在とその生物学的意義を調べるために、我々は抗ヒト IgE モノクロナール抗体を用いて、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により、Epstein-Barr virus (EBV) 特異的 IgE 抗体を測定した。その結果、伝染性単核球症 (infectious mononucleosis, IM) や上咽頭癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) を含む EBV 関連疾患をはじめ、健常者や気管支喘息、各種膠原病患者でも EBV 特異的 IgE 抗体の存在を確認した。しかし、その抗体価は、各疾患群や健常者群の間で有意差を認めなかった。また、抗 EBV IgG 抗体と IgE 抗体の分布には相関はみられず、抗 EBV IgE 抗体の分布は、血清 IgE 値と無関係であった。

Key words: Epstein-Barr virus — specific IgE antibody — ELISA

緒 言

IgE は、その細胞表面上に Fc(ϵ)-receptor を有する肥満細胞 (mast cell) や好塩基球 (basophil) とともに、即時型過敏症において重要な役割を担っている。一方、ウイルス感染と即時型過敏症との関連では、疫学的に、上気道のウイルス感染が、気管支喘息患者に喘鳴発作を誘発することはよく知られている¹⁾²⁾。その機序としては、ウイルス感染による非特異的な影響^{3)~5)}やウイルス特異的 IgE 抗体、すなわち herpes simplex virus-1⁶⁾や respiratory syncytial virus⁷⁾ parainfluenza virus⁸⁾, cytomegalovirus⁹⁾ に対する IgE 抗体の関与が報告されている。

EBV は、IM¹⁰⁾や NPC¹¹⁾, Burkitt lymphoma (BL)¹²⁾との関連で知られているが、またアトピー性疾患にも関与するとされており、アトピー性疾患を有し血中総 IgE 値が高値の小児における、抗 EBV IgG 抗体の高値¹³⁾や、IM 急性期における血中総 IgE 値の上昇¹⁴⁾などが報告されている。しかし、上記の如き EBV 特異的 IgE 抗体の報告はない。

そこで、我々は、EBV 特異的 IgE 抗体の存在を

ELISA にて検出するとともに、その生物学的意義をみるために、その抗体価を各種疾患群で比較し、また、IgG 抗体価や血清 IgE 値との相関をもみた。

材料および方法

1. 被験血清

急性期の IM 8名、NPC 9名、アトピー性気管支喘息 18名、sarcoidosis 6名、膠原病 21名 (全身エリテマトーデス 8名、慢性関節リウマチ 5名、シェーグレン症候群 7名、強皮症 1名) 以上 62名 (男性 31名、女性 31名、平均年齢 38.4歳) の患者と、健常正常人 62名 (男性 29名、女性 33名、平均年齢 35.9歳) より得られた。患者と健常人の年齢分布は Fig. 1 に示した。

2. EBV の精製

EBV は Miller ら¹⁵⁾の方法に従い、B95-8細胞より分離、精製した。すなわち、EBV 持続感染細胞である B95-8細胞を 7日間連続培養した上清を遠心 (4℃にて 500×g, 10分間) 後、上清をさらに超遠心 (4℃にて 50000×g, 90分間) し、沈澱を酒石酸カリウム 10% から 50% の不連続密度勾配にのせて遠心 (4℃にて 85000×g, 15時間) した後の 20% と 30% との中間帯を精製 EBV (蛋白濃度 3.8mg/ml) とした。

3. 抗体価測定

a) 間接蛍光抗体法 (indirect immunofluorescence assay, IFA)¹⁶⁾: B95-8細胞をアセトン固定後、0.1M

Received: October 16, 1989

Accepted: December 8, 1989

Abbreviations: BL Burkitt lymphoma; EBV Epstein-Barr virus; ELISA enzyme-linked immunosorbent assay; IFA immunofluorescence assay; IM infectious mononucleosis

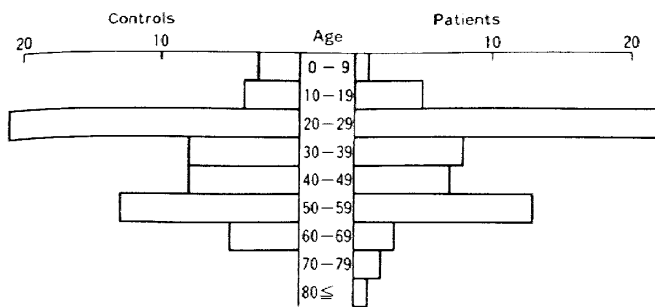


Fig. 1. Age distribution of patients and healthy controls studied.

phosphate buffered saline (PBS) にて10倍希釈から4倍段階希釈した被験血清と、37℃にて30分間反応させた。PBS にて洗浄後、fluorescein isothiocyanate 標識抗ヒト IgG (Fc) ヤギ IgG (Cappel Laboratories, Inc., Cochranville, PA, USA) を、37℃にて30分間反応させ、蛍光顕微鏡にて、蛍光抗原の認められる血清の最大希釈倍数をもって、EBV 関連抗原である viral capsid antigen (VCA) に対する IgG 抗体価とした。なお、10以下の抗体価は5とした。

b) 酵素抗体法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)¹⁷⁾: 精製 EBV を 0.05M carbonate-bicarbonate buffer (coating buffer, pH 9.5) にて600倍に希釈後、ELISA 用 microplate (Flow Laboratories, Inc., Mclean, Va, USA) の各 well に 100μl ずつ分注し、4℃にて一晩静置した。0.05% Tween 20 を含む PBS (PBS-T) にて洗浄後、PBS-T にて10倍希釈から2倍段階希釈された被験血清を、各段階希釈あたり4 well を用い、各 well に 100μl ずつ分注し、室温にて2時間反応させた。洗浄後、alkaline phosphatase で標識された抗ヒト IgG (Fc) ヤギ IgG (Cappel) あるいは抗ヒト IgE (ε chain) マウスモノクローナル抗体 (Yamasa Shouyu Co. Ltd., Tokyo) を PBS-T にて各々400倍に希釈したものを各 well に 100μl ずつ分注し、室温に2時間放置した。再び洗浄後、10% diethanolamine buffer 中に 1mg/ml に溶解した基質 (P-nitrophenyl phosphate) を各 well に 200μl ずつ分注し、室温に30分放置、発色の程度を Titertek Multiscan (Flow) にて測定した。coating buffer のみの well を EBV 抗原なしの対照とした。対照の OD₄₀₅ は常に 0.05 以下であったので、2倍以上、つまり 0.1 以上の OD₄₀₅ を示す最大希釈倍数をもって抗体価とした。なお、10以下の抗体価は5とした。また、PBS-T にて5倍希釈した被験血清を、PBS-T にて200倍希釈した精

製 EBV または EBV なしの PBS-T と 1:1 に混和し、37℃で30分間反応させた後、同様に抗体価を測定した。

4. 血清 IgE の測定

the Phadebas radioimmunosorbent test system (Pharmacia Diagnostics) (固相法による radioimmunoassay 法) により測定した。

5. data の統計処理

相関係数と回帰分析には Pearson の相関係数 r と $y=a+bx$ を、2群の差の検定 (対応の有無を含めて) には、Student's t-test を用いた。

結 果

1. IFA と ELISA により測定した抗 EBV IgG 抗体価の相関

B95-8細胞を抗原とした IFA と精製 EBV を抗原とした ELISA とで、同一検体 (IM 8例、うち1例は回復期の血清も用いた、NPC 6例、気管支喘息1例、先天性免疫不全症候群1例、健常者7名) につき IgG 抗体価を測定した。この結果、各々の測定法による抗体価に有意な相関 ($r=0.80$, $p<0.01$) がみられ (Fig. 2), ELISA でみた抗 EBV IgG 抗体は、抗 VCA IgG 抗体と相応して変動するものと考えた。以後、抗 EBV IgG 抗体は ELISA にて測定した。

2. EBV 関連疾患における抗 EBV IgG 抗体の分布

EBV 関連疾患として IM 8例 (1例は回復期の血清を含む) と NPC 9例、sarcoidosis 6例の他、健常者11例につき、ELISA にて抗 EBV IgG 抗体価を測定した (Fig. 3)。抗体価 (幾何平均±標準偏差) は、IM 群 117.5 ± 4.6 , NPC 群 186.7 ± 5.0 , sarcoidosis 群 40.0 ± 2.4 , 健常者群 54.8 ± 3.4 であった。IM や NPC の検体で高い抗体価を示すものがあつたが、抗体価の分布には、統計学的に各群間に有意差は認められなかった。

3. 抗 EBV IgE 抗体の存在

Fig. 4 に、精製 EBV と抗ヒト IgE モノクローナル抗体を用いた ELISA による、4例の被験血清 (IM, NPC, 気管支喘息の患者および健常人、各1例ずつ) 段階希釈液の抗 EBV IgE 抗体の測定結果を示した。血清の希釈に伴って OD₄₀₅ の低下が認められた。OD₄₀₅ の読みが 0.1 以上を示す血清最大希釈倍数を抗体価とすると、NPC と気管支喘息の2例はともに80倍、IM では40倍、健常人では10倍ということになる。この

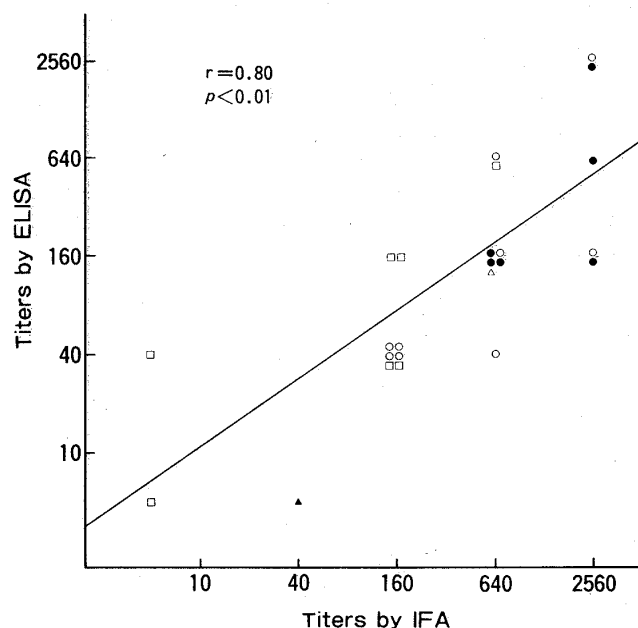


Fig. 2. Correlation between anti-VCA IgG titers by IFA and anti-EBV IgG titers by ELISA. ○: IM (9 samples), ●: NPC (6 samples) △: bronchial asthma (1 sample), ▲: congenital immunodeficiency syndrome (1 sample), □: control (7 samples). In each sample, anti-VCA IgG titer was measured by IFA and anti-EBV IgG titer by ELISA.

dilution curve は、抗体価が同じであれば疾患や健常者に関係なく同様であった。抗原である EBV 不在の対照として coating buffer を、被験血清または抗ヒト IgE なしの対照として PBS-T を用いた場合、いずれも発色はみられなかった。

また、NPC 1 例（抗 EBV IgG 抗体価 160 以上）、健常者 1 例および気管支喘息 2 例（抗 EBV IgE 抗体価は、それぞれ 40, 80, 80 であった）の血清を、EBV 抗原（1:400 希釈）と 37°C で 30 分間反応させた後、血清の抗 EBV 抗体を ELISA にて測定すると、IgG 抗体価は 160 倍以上から 40 倍に低下し、IgE 抗体価も、それぞれ 40 倍から 5 倍、80 倍から 10 倍あるいは 40 倍に有意 ($p < 0.05$) に低下した (Table 1)。

4. 各種疾患における抗 EBV IgE 抗体の分布

抗 EBV IgE 抗体価を各疾患群で比較した (Fig. 5)。健常者で 8.5 ± 2.1 に対し、EBV 関連疾患である IM や NPC では各々 11.9 ± 2.6 , 10.9 ± 2.6 と有意差はなかった。また、I 型アレルギー性疾患としての気管支喘息 (14.7 ± 3.1) や免疫異常をきたす sarcoidosis (7.9 ± 2.3)、種々の膠原病 (8.2 ± 1.8) なども健常者群と有意な差はみられなかった。

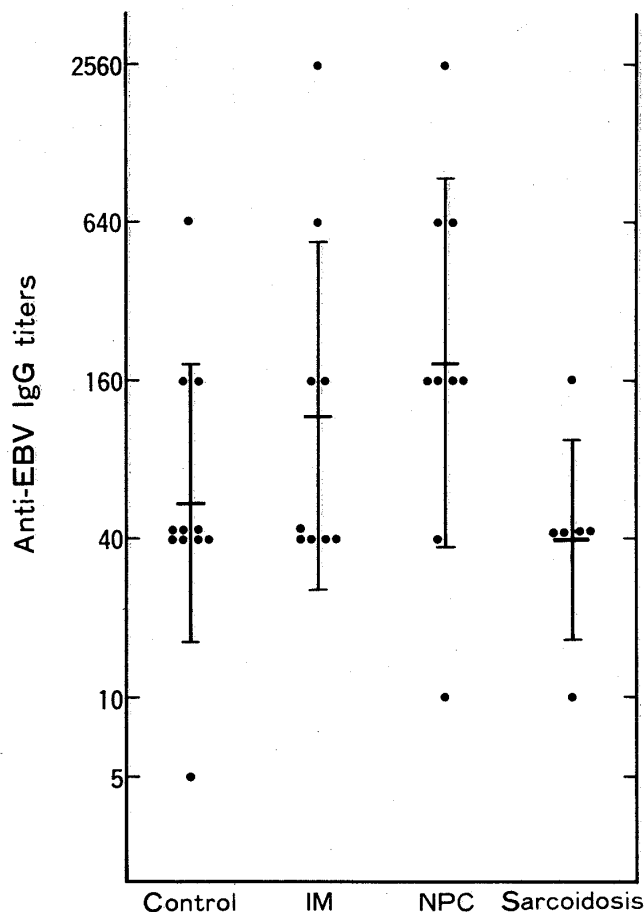


Fig. 3. Distribution of anti-EBV IgG titers in various diseases. In the groups of the controls and the patients with IM, NPC and sarcoidosis, anti-EBV IgG titers of the sera were measured by ELISA, and expressed as reciprocal of dilution. Bars meant mean $\pm$ SD.

Table 1 Blocking effect of EBV antigen on IgG and IgE class of anti-EBV antibody

Ig class of anti-EBV antibody	Anti-EBV titer in tested serum treated with	
	Buffer	EBV
IgG	160 <	40
IgE	40	5
	80	10
	80	40
	$p < 0.05$	

Anti-EBV IgG and IgE titers of the samples (one from NPC for IgG, and one from healthy control and two from bronchial asthma for IgE) were measured by ELISA after the preincubation with EBV antigen or buffer. The difference of IgE titers between treatments with EBV and buffer was analyzed with paired Student's t-test, and significant ($p < 0.05$).

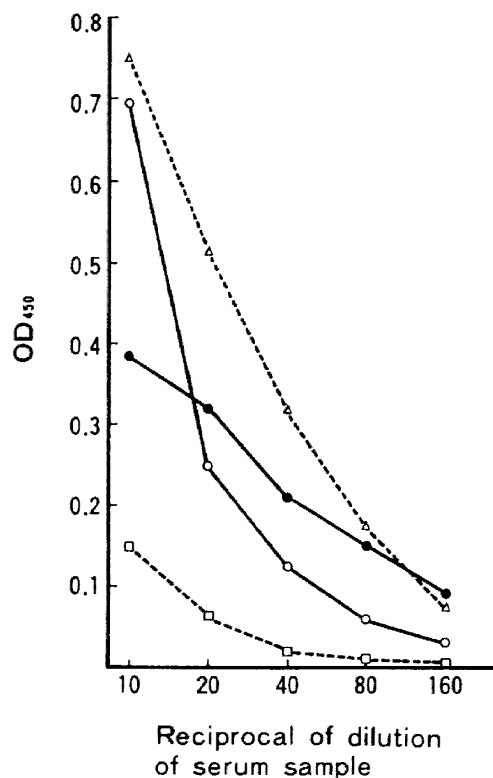


Fig. 4. Effect of the dilution of sera on absorbance at 405nm in the ELISA. ○ : IM, ● : NPC, △ : bronchial asthma, □ : control. Diluted serum samples were subjected to the ELISA using anti-human IgE monoclonal antibody.

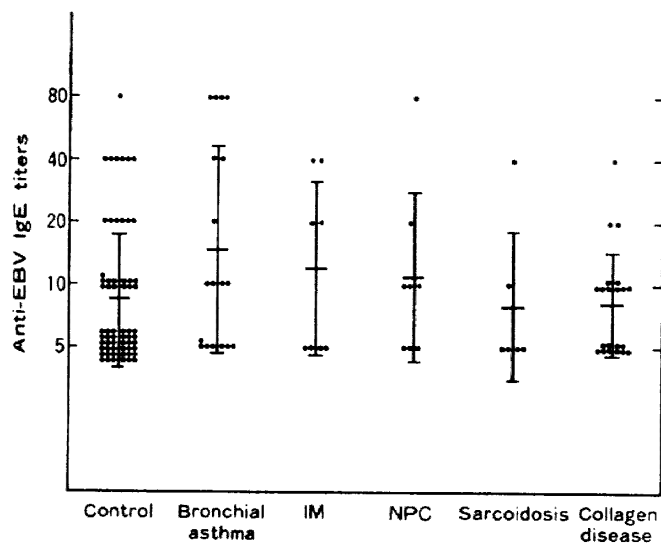


Fig. 5. Distribution of anti-EBV IgE titers in various diseases. Serum samples of the healthy controls and the patients with bronchial asthma, IM, NPC, sarcoidosis and collagen disease were measured for the anti-EBV IgE titer by ELISA.

5. EBV に対する IgG 抗体価と IgE 抗体価の相関
ELISA により、血清材料33検体についてそれぞれの

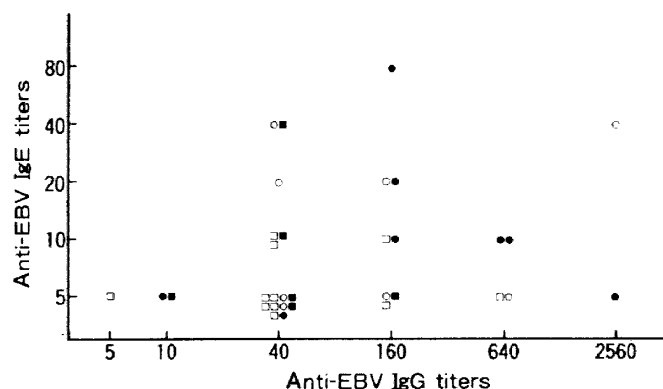


Fig. 6. Correlation between anti-EBV IgG titers and anti-EBV IgE titers. ○ : IM (8 samplis), ● : NPC (8 samplis), ■ : sarcoidosis (6 samplis), □ : control (11 samplis). Anti-EBV IgG and anti-EBV IgE titers were measured by ELISA.

抗 EBV IgG および IgE 抗体価を測定し、その分布を比較したが(Fig. 6), 両者間に相関はみられなかった。

6. 血清中の総 IgE 量と抗 EBV IgE 抗体価の相関

気管支喘息患者17名の血清について、総 IgE 量と抗 EBV IgE 抗体価の相関を調べたが、EBV 特異的 IgE 抗体価は総 IgE 量に無関係な分布を示した (data 省略)。

考 察

EBV 持続感染細胞である B95-8細胞から精製した EBV を抗原とし、抗ヒト IgE モノクローナル抗体を用いた ELISA にて、抗 EBV IgE 抗体の存在と、その特異性を検討した。EBV 特異的 IgE 抗体の存在についての報告は、Heiner¹⁸⁾らの学会発表があるのみで、文献報告はいまだなされていない。今回、我々は、ELISA による抗 EBV IgG 抗体価が IFA によるそれとよく相関すること、また再現性があり、客観的であり¹⁷⁾、これまでに respiratory syncytial virus⁷⁾, parainfluenza virus⁸⁾, cytomegalovirus⁹⁾ に対する特異的 IgE 抗体の検出に用いられていることから、ELISA を用いた。また、その特異性は、被験血清を EBV 抗原で前処置すると抗体価が低下することにより確認された。ただし、IgE 抗体価の低下が、検体により異なったのは、IgE 抗体によって、EBV 粒子の抗原認識部位に差がある為かもしれない。

抗 EBV IgE 抗体を、EBV との関連が指摘されている各種疾患にて測定した。すなわち、急性期の IM¹⁰⁾,

治療前の NPC¹¹⁾, sarcoidosis¹⁹⁾, 慢性関節リウマチ²⁰⁾などの膠原病, atopic disease¹³⁾としての気管支喘息, そして正常群で測定したが, いずれも, 10倍以下から80倍までに分布しており, 正常群と各疾患の間, また各疾患の間, また各疾患との間で, 抗体価に有意差はなかった。

この点に関して, 病勢あるいは治療による抗 EBV IgE 抗体価の変動もみる必要があるが, 今回用いた患者血清に関する限り, その抗体価はせいぜい80倍であり, 抗 EBV IgG 抗体のように IM¹⁰⁾や NPC¹¹⁾で特に高値を示すわけでもなく, しかも IgG 抗体と相関もみられないことから, IgE 抗体の診断における有用性については, 現在のところ不明である。また, IM 患者の血清中総 IgE 値が発症早期に一過性に上昇することが報告されている¹⁴⁾。今回, 我々は EBV 特異的な IgE 抗体をみたが, 経時的に検体を得ることができなかったで, どのような経過をとるかは不明である。

しかし, 血清中総 IgE 量と無関係な分布を示すことから, 抗 EBV IgE 抗体価の変動は, 抗原非特異的に総 IgE 量が増加したためでなく, EBV 抗原特異的であり, 何らかの意義をもつと考えられる。今まで報告されてきた抗ウイルス IgE 抗体についてみると, respiratory syncytial virus や parainfluenza virus 感染患者の鼻咽頭分泌液中の特異的 IgE 抗体は, 喘鳴などの症状や分泌液中のヒスタミン濃度と相関するとされ^{7,8)}, さらに, Herpes simplex virus を抗原として, 特異的 IgE 抗体を介した好塩基球からのヒスタミンの遊離が証明されている⁶⁾。このように, ウイルス特異的 IgE 抗体は, ウイルス感染によるアレルギー症状の発現との関連で論じられてきているが, 抗 cytomegalovirus IgE 抗体のように, 初感染診断の指標としての意義づけもある⁹⁾。

抗 EBV IgE 抗体の意義としては, その抗体価の分布に疾患特異性, 特に気管支喘息では高抗体価がみられず, また EBV と atopic disease との関連も B cell mitogen としてである¹³⁾。従って抗 EBV IgE 抗体が, EBV 抗原とともに肥満細胞や好塩基球を刺激して chemical mediator の遊離をひき起こすなどして, アレルギーの病態に関与する可能性は少ないであろう。むしろ, EBV が NPC¹¹⁾や BL¹²⁾の発症に関連していることや, 好塩基球が, IgE 抗体と特異抗原とで刺激されることにより, 抗腫瘍因子の1つである tumor necrosis factor を遊離すること²²⁾などから, 今回は EBV 持続感染腫瘍細胞表面の抗原に対する IgE 抗体はみ

ていないが, 抗 EBV IgE 抗体は, EBV 抗原とともに好塩基球を刺激することにより, NPC や BL に対する特異的免疫応答に関与しているのかもしれない。

文 献

- 1) McIntosh, K., Ellis, E.F., Hoffman, L.S., Lybass, T.G., Eller, J.J. and Fulginiti, V.A.: The association of viral and bacterial respiratory infections with exacerbations of wheezing in young asthmatic children. *J. Pediatr.* 82, 578-590, 1973.
- 2) Lemanske, R.F. Jr., Dick, E.C., Swenson, C.A., Vrtis, R.F. and Busse, W.W.: Rhinovirus upper respiratory infection increases airway hyperreactivity and late asthmatic reaction. *J. Clin. Invest.* 83, 1-10, 1989.
- 3) Frick, O.L., German, D.F. and Mills, J.: Development of allergy in children. I. Association with virus infections. *J. Allergy Clin. Immunol.* 63, 228-241, 1979.
- 4) Ida, S., Hooks, J.J., Siraganian, R.P. and Notkins, A.L.: Enhancement of IgE-mediated histamine release from human basophils by viruses: Role of interferon. *J. Exp. Med.* 145, 892-906, 1977.
- 5) Sakamoto, M., Ida, S. and Takishima, T.: Effects of influenza virus infection on allergic sensitization to aerosolized ovalbumin in mice. *J. Immunol.* 132, 2614-2617, 1984.
- 6) Ida, S., Siraganian, R.P. and Notkins, A.L.: Cell-bound and circulating IgE antibody to herpes simplex virus. *J. Gen. Virol.* 64, 533-537, 1983.
- 7) Welliver, R.C., Wong, D.T., Sun, M., Middleton, E., Vaughan, R.S. and Ogra, P.L.: The development of respiratory syncytial virus-specific IgE and the release of histamine in nasopharyngeal secretions after infection. *N. Engl. J. Med.* 305, 841-846, 1981.
- 8) Welliver, R.C., Wong, D.T., Middleton, E., Sun, M., McCarthy, N. and Ogra, P.L.: Role of parainfluenza virus-specific IgE in pathogenesis of croup and wheezing subsequent to infection. *J. Pediatr.* 101, 889-896, 1982.
- 9) Loon, A.M., Logt, J.T.M., Heessen, F.W.A. and Veen, J.: Quantitation of immunoglobulin E antibody to cytomegalovirus by antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 21, 558-561, 1985.
- 10) Henle, G., Henle, W. and Diehl, V.: Relation

- of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 59, 94-101, 1968.
- 11) Henle, W., Henle, G., Ho, H., Burtin, P., Cachin, Y., et al.: Antibodies to Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma, other head and neck neoplasms, and control groups. *J. Natl. Cancer Inst.* 44, 225-231, 1970.
 - 12) Epstein, M.A., Achong, B.G. and Barr, Y.M.: Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1, 702-703, 1964.
 - 13) Strannegard, I.L. and Strannegard, O.: Epstein-Barr virus antibodies in children with atopic disease. *Int. Archs Allergy Immunol.* 64, 314-319, 1981.
 - 14) Bahna, S.L., Horwitz, C.A., Fiala, M. and Heiner, D.C.: IgE response in heterophil-positive infectious mononucleosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 62, 167-173, 1978.
 - 15) Miller, G. and Lipman, M.: Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 190-194, 1973.
 - 16) Henle, G. and Henle, W.: Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J. Bacteriol.* 91, 1248-1256, 1966.
 - 17) Hopkins, R.F. III, Witmer, T.J., Neubauer, R.H. and Rabin, H.: Detection of antibodies to Epstein-Barr virus antigens by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Infect. Dis.* 146, 734-740, 1982.
 - 18) Heiner, D.C. and Bahna, S.L.: Specific IgE antibodies to EBV in infectious mononucleosis. Presented at the Third International Congress of Immunology. Sydney, p.845, 1977.
 - 19) Hirshaut, Y., Glade, P., Vieira, L.O.B.D., Ainsbender, E., Dvorak, B. and Siltzbach, L.E.: Sarcoidosis, another disease associated with serologic evidence for herpes-like virus infection. *N. Engl. J. Med.* 283, 502-506, 1970.
 - 20) Alspaugh, M.A. and Tan, E.M.: Antibodies to cellular antigens in Sjögren's syndrome. *J. Clin. Invest.* 55, 1067-1073, 1975.
 - 21) Farram, E. and Nelson, D.S.: Mouse mast cells as anti-tumor effector cells. *Cell. Immunol.* 55, 294-301, 1980.
 - 22) Ohno, I., Tanno, Y., Yamauchi, K., Ida, S. and Takishima, T.: The production of tumor necrosis factor- α by rat basophilic leukemia cells with triggering IgE receptor. *Tohoku J. Exp. Med.* 156, 209-210, 1988.

DETECTION OF EPSTEIN-BARR VIRUS SPECIFIC IgE ANTIBODY

Isao Ohno, Yasuo Tanno and Tamotsu Takishima

First Department of Internal Medicine, Tohoku University School of Medicine

Shiroh Ida

Department of Internal Medicine, National Sanatorium Iwate Hospital

To confirm the existence and investigate the biological significance of IgE virus-specific antibodies, we studied Epstein-Barr virus (EBV)-specific IgE antibody by enzyme-linked immunosorbent assay with an anti human IgE monoclonal antibody. We detected EBV-specific IgE antibody in sera not only from patients with the EBV associated diseases of infectious mononucleosis and nasopharyngeal carcinoma, but also from patients with bronchial asthma, collagen disease and healthy volunteers. However, there was no significant difference in the titers of IgE antibody specific for EBV among these groups. No significant relationship between the titers of EBV-specific IgG and IgE antibody, or between the titers of EBV-specific IgE and the total IgE levels in the sera was observed.