

平成21年 5月 8日現在

研究種目：基盤研究(G)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592345
 研究課題名(和文) ヘルペス科ウイルス感染における HDC 活性とサイトカインに関する研究
 研究課題名(英文) in vivo analysis of HDC activity and cytokine productions by herpes virus group infections
 研究代表者 門馬 祐子 (MONMA YUKO)
 東北大学・病院・講師
 研究者番号：00191073

研究成果の概要：

ヘルペス科ウイルス感染に対する宿主の炎症反応について、histidine decarboxylase(HDC)活性と炎症性サイトカインの変動を指標にして調べた。

感染後、臓器重量の増加、HDC 活性の上昇、炎症性サイトカインの増加が認められた。それらは、臓器別、ピークの時期や期間、ウイルスの種類や感染部位に差が認められた。好中球やマクロファージがない状態では、免疫が正常な場合と比較し、臓器重量やサイトカイン量について異なる所見を得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：ヘルペスウイルス感染、HDC 活性、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

口腔感染症のうち、ヘルペス科ウイルス感染症は、主に乳幼児期に初感染し、歯科領域でも以下の通り重要である。単純疱疹ウイルスは、初感染時に不顕性感染とされるのだから、重度の歯肉口内炎までの症状を引き起こす。サイトメガロウイルスは、TORCH 症候群の原因の一つで先天性サイトメガロウイルス感染症を引き起こすことが知られている。免疫が低下している患者では、口腔内にウイルスが排出され、再発病変でも重症化した症

状を呈する。

ヘルペス科ウイルス感染では、はじめ風邪様の症状を呈するだけである。患者の間診からは、口腔症状よりも全身の炎症性変化が先行することを意味している。

これまでに本研究代表者は、マウスの系におけるサイトメガロウイルスの急性感染期に、各臓器でのウイルス分離の時期が HDC 活性の上昇期と一致していたことを見出した。そして、HDC 活性は早期の炎症性反応の指標として、有用である可能性を見出した。

以上から、口腔にウイルスを感染させた場合、全身への組織への炎症の発現や、組織障害はどのような仕組みをたどるのであるのか。口腔粘膜に対してウイルス感染の影響を調べたものは少ない。初感染部位が主に口腔領域であることを考慮すると、口腔領域の免疫機構を含めた全身への波及についての研究は大変重要である。

2. 研究の目的

これまでの研究成果をもとに、ヘルペス科ウイルス感染の急性期における生体の炎症反応を、HDC 活性やサイトカインで検証し、感染初期に作動する自然免疫系の機能の異常がある場合で、ウイルスを感染させたときのサイトカインの産生を調べることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ウイルスの調整

単純疱疹ウイルス 1 型 (HSV) -1 Miyama-GC+株を Vero 細胞にて増殖した。マウスサイトメガロウイルス (CMV) Smith 株は、マウス胎児線維芽細胞にて増殖させて、 -80°C にて使用時までストックした。

(2) ウイルス感染

東北大学大学院医学系研究科動物実験指針と感染実験指針に従い、動物実験委員会の審査を経て行った。

MCMV は、5 週齢の Balb/C 系雌マウスの、腹腔に 10^5 plaque-forming Unit (PFU)/0.1ml を接種した。

HSV は、腹腔または歯肉上皮下へ 10^5 plaque-forming Unit (PFU)/0.1ml を接種した。接種後、経時的にエーテル麻酔下で腋下から採血し、臓器を採取した。血液は遠心後に血清を分離し、 -20°C にストックした。

(3) 免疫に異常のあるマウスの作成

感染初期の免疫で重要な役割を果たす好中球とマクロファージの機能が低下した状態での宿主の反応を調べるため、それぞれのノックアウト (KO) マウスを作成した。好中球の抗体である anti-g1-1 (遠藤康男博士より供与) を 0.2ml/kg を尾静脈へ IV 接種した。マクロファージ KO マウスの作成は、クロドロネート・リポゾーム (遠藤康男博士より供与) の 2ml を尾静脈へ IV 接種した。それぞれ、接種の 24 時間後にウイルス感染を行った。

(4) HDC 活性の測定

採取した臓器は、重量を測定後、遠藤らの方法に従い、ドライアイスを用いて急速に凍結した。組織抽出液を用い臓器をホモジナイズ後、酵素反応液を加えて

37°C で培養し、カラムを通したあと、遠心分離した上清からヒスタミンを分離し、その量を単位時間と組織重量で割って算出した。

(5) 臓器中のサイトカインの測定

経時的に採取した臓器をホモジナイズ後、遠心分離し、その上清を -20°C で冷凍保存した。

上清中の炎症性サイトカイン量を ELISA kit にて測定した。

(6) 統計分析

統計的検討には、one-way ANOVA を用い、多重比較検定には、Dunnett 法を用いた。有意水準 5%以下を有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) 臓器の体重変化について

*免疫が正常のマウスにおける MCMV 感染群では 3~5 日目に肝臓ならびに脾臓の重量が有意に増加した。HSV の腹腔感染群では、非感染群ならびに歯肉感染群と比較して、2 日目に脾臓の重量が増加した。

*好中球 KO マウスでは、脾臓重量のわずかな増加が認められたが、有意差はなかった。MCMV 感染後は、肝臓・脾臓の重量は有意に増加するが、免疫が正常なマウスと比較するとその増加量は低かった。HSV 感染後は、感染 12 時間後の肝臓の重量が有意に増加し、48 時間後に戻った。脾臓の重量は、歯肉感染では 12 時間後に、腹腔感染では 24 時間後に増加が認められた。

*マクロファージ KO マウスでは、投与後 2 日目から肝臓や脾臓において有意な重量の増加が認められた。MCMV 感染群では、その増加の開始が遅くなる所見を得た。一方、HSV 感染では、感染初期は臓器の重量が大きい、24 時間後には戻る傾向が認められた。

(2) HDC 活性

*MCMV 感染群では、肝臓の HDC 活性は 3 日までに有意に増加し、その後元のレベルに戻った。脾臓では感染後 1 日目より上昇し継続した。肺臓では感染直後より増加する傾向が認められた。

*HSV 感染群では、MCMV 感染群と比べ活性の変動は小さかった。IP 感染群では感染後 12 時間後に肝臓と脾臓で、肺では感染後 1 日目に活性のピークが認められた。歯肉感染群では、感染後 1 日~2 日目に活性のピークが認められた。

(3) サイトカインの動態

炎症性サイトカインの、TNF- α 、IL-12、IL-6 について臓器毎の結果を示す。

①CMV 感染

*免疫正常群：

脾臓では、TNF- α ならびに IL-12 は、感染 1～3 日目に増加しその後元のレベルに戻った。IL-6 は、感染 3～5 日目にわずかに上昇する傾向が認められた。

肝臓では、TNF- α は感染初期に上昇し、3 日目には元のレベルに戻った。IL-12 は、感染 3 日より次第に増加し続けた。IL-6 は、感染後 5 日目に減少して戻った。

肺臓では、TNF- α と IL-6 のレベルは、変動が少なかった。IL-12 では、感染後 3～5 日目に有意に上昇し、9 日目に戻った。

*好中球 KO 群：

脾臓では、TNF- α と IL-6 は低値であった。IL-12 は、はじめは低いのが 5 日目以降に有意に増加した。

肝臓では、TNF- α は 1～3 日目に増加し、5 日目に一旦低値となるが、9 日目に再び増加を示した。IL-12 は 1 日目より急激に増加し、5 日目にピークを認めた。IL-6 は、免疫正常群と比較して有意に高値を継続した。

肺臓では、TNF- α は感染後増加する傾向を示した。IL-12 では、免疫正常群と差がなかった。IL-6 は継続して高い値を示した。

*マクロファージ KO 群：

脾臓では、TNF- α は 1～5 日目に高値を示した。IL-12 は、免疫正常群と同様であった。IL-6 は、感染後 9 日目から上昇する傾向を示した。

肝臓では、TNF- α は 5 日目までは免疫正常群と同様であったが、9 日目に再び上昇した。IL-12 は、感染初期より他の群よりも高値を示して継続した。IL-6 は、高値を示し、その変動は免疫正常群と同様であった。

肺臓では、TNF- α は変化がなかった。IL-12 は、免疫正常群と同様であった。IL-6 は、感染後 3 日目より上昇し、9 日目には有意差が認められた。

②HSV 感染

*免疫正常群：

脾臓では、TNF- α は変動が少なく、感染経路で差がなかった。一方、IL-12 は、感染経路で差が認められ、腹腔感染群では感染 1 日目にわずかに上昇した。IL-6 は、感染 3 日目までは増加しなかった。

肝臓では、TNF- α と IL-6 は感染部位の差がなく、変動しなかった。IL-12 は、歯肉感染群の方が高い傾向を示したが有意差はなかった。

肺臓では、TNF- α は、腹腔感染 2 日後に上昇した。IL-12 と IL-6 は、変動が認められなかった。

*好中球 KO 群：

脾臓では、TNF- α は変動が少なく感染経路で差がなかった。IL-12 は、免疫正常群と比較し、歯肉感染群が一時的に有意に高値となり、腹腔感染群が継続して有意に高値を示した。IL-6 は、ほとんど産生されなかった。

肝臓では、TNF- α と IL-6 は免疫正常群と比較して、有意に高値が継続した。IL-12 は、わずかに増加したが、有意差はなかった。

肺臓では、TNF- α は、接種部位に差がなく、感染初期から有意な増加を示した。IL-12 と IL-6 は微増したが、免疫正常群と有意差はなかった。

マクロファージ KO 群

脾臓では、TNF- α は、変動は認められなかった。IL-12 は、免疫正常群と比べて有意に高値であるが、変動は少ない。IL-6 のレベルは、ほぼ一定であった。

肝臓では、TNF- α は、歯肉感染群で有意に高レベルを維持したが、腹腔感染群では感染直後に微増しすぐに元のレベルにもどった。IL-12 は、免疫正常群と比べ微増したが、有意差は認められなかった。IL-6 は、歯肉感染群で次第に増加するが、腹腔感染群では高値のまま推移した。

肺臓では、TNF- α は、歯肉感染群では 12 時間後に、腹腔感染群では 1 日目に有意なピークが認められた。IL-12 は、腹腔感染では 1 日後に有意な上昇が認められた。IL-6 では、微増したが、有意差はなかった。

まとめ

ウイルスを腹腔感染させた場合、全身への免疫反応が引き起こされる。歯肉感染の場合、口腔上皮でウイルスの増殖がおり、リンパ組織、白血球の感染に移行し、全身へのウイルス血症や免疫反応が引き起こされる。脾臓、肝臓、肺臓は血行性にウイルスが到達しやすい臓器である。臨床で CMV は全身のほぼあらゆる組織に感染しうるが、HSV は抹消神経を上行する。臓器毎にウイルスの到達した量、排除までの期間などが異なるため、臓器での炎症反応の程度に差が生じた。

ウイルス感染後の臓器の重量変化については、炎症反応による組織の浮腫が生じているか、防御機構の増強を示唆するものである。

HDC は炎症反応を誘導し増強すると考えられており、ウイルス感染早期に産生される IL-12 や TNF- α によって誘導される。

感染初期には、自然免疫系も宿主の防御に重要な役割をつかさどるので、好中球とマクロファージが働かない状態で感染させた場合についても検討したところ、予想に反して、炎症性サイトカインの動態が変化することが示された。好中球がウイルス感染に対してある役割を持つことを示唆する新しい知見を得た。炎症反応とのかかわりやそのメカニ

ズムについて、更なる研究が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0件)

[学会発表] (計 0件)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

門馬 祐子 (MONMA YUKO)

東北大学・病院・講師

研究者番号：00191073

(2) 研究分担者

菅原 俊二 (SUGAWARA SHUNJI)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：10241639

(3) 研究協力者

遠藤 康男 (ENDO YASUO)

東北大学・大学院歯学研究科・

大学院非常勤講師

研究者番号：50005039