

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23657170

研究課題名(和文) 潜伏感染ウイルスの再活性化を用いた新規非侵襲的ストレス指標の確立

研究課題名(英文) Reactivation of latently infected virus as a novel non-invasive stress marker

研究代表者

石田 貴文(Ishida, Takafumi)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20184533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：非侵襲的ストレスマーカーの探索と確立を目指し、常在潜伏感染ウイルスの再活性化と唾液中α-アミラーゼの動態を調べた。唾液α-アミラーゼの簡易測定器の量的・系統的使用範囲を調べ、人以外のいくつかの動物でストレスモニタリングが可能であることを示した。ヒトヘルペスウイルス(EBV)の唾液中への排出は、α-アミラーゼの変動より遅れて推移し、中期ストレスマーカーと見なすことが出来ることが分かった。

研究成果の概要(英文)：To search for novel non-invasive stress marker(s), reactivation of latently infected ubiquitous viruses and salivary alpha-amylase were monitored. The concentrations of salivary alpha-amylase among several animals such as elephants, chimpanzees, horses, were measurable with a simple machine produced for human amylase monitoring. Shedding pattern of the human gamma-herpesvirus (EBV) into saliva delayed the changes of alpha-amylase concentration; reactivation of EBV (or gamma-herpesvirus) is considered to be a medium-range stress marker.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：人類学・応用人類学

キーワード：ストレス評価 ウイルス 非侵襲

1. 研究開始当初の背景

「病は気から」と言われるように、ストレスは私たちの身体に様々な影響を与え、ストレスがもたらす疾患も多い。ストレスが身体に与える影響は、内分泌系のストレスマーカーを指標として研究が進められてきた。免疫系への影響に関しては、血中免疫グロブリンなどを指標としてその定量化が模索されてきたが、免疫系は色々な側面を持つことから、異なる経路に関わるより多くの指標が求められている。通常、宿主と共存状態を保っている潜伏感染ウイルスは、宿主の免疫能が低下すると再活性化することが知られている。Epstein-Barr ウイルス(EBV)は人類に広く分布し、通常潜伏感染しているが、身体の状態、例えば、免疫力の低下等によっては再活性化を起こすことが知られている。さらに、宇宙飛行・期末考査といった精神的ストレスがEBV 再起動の引き金となることも示唆されている(Pierson et al., 2005; Stowe et al., 2001)。一方、ヒトに近縁な霊長類(類人猿・旧世界ザル)はEBV 類似の種固有のウイルスを持っており(Ishida and Yamamoto, 1987)、ストレスによる潜伏感染からの再活性化がマカクで認められている(Ishida et al., 1993)。さらに、チンパンジーにおいて群内順位ストレスとウイルス量の相関が明らかとなり(Yamamoto et al. 2010)、霊長類におけるEBV 群の再活性化がストレス指標となることから本研究立案に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒトに常在し潜伏感染しているウイルスがストレスにより活性化する点に注目し、ウイルスの再活性化を社会的・心理的ストレスの新たな指標として確立し、同時に、非侵襲的方法を構築することである。現代社会の抱える問題の一つに社会構造の多様化・グローバル化によるストレスの増大がある。ストレスの問題は、単に医学・生物学的なものだけではなく文化・社会的な要因も絡み、多様なストレス像が存在している。「病は気から」と言われるように、精神・心理的な抑圧は身体の免疫力を低下させることが知られている。その精神・心理的ストレスを非侵襲的かつ簡便な、しかも、定量的方法で測定できれば、心の健康のモニタリングにも貢献できると期待される。また、近年非侵襲的マーカーとして注目を集めている、唾液 α -アミラーゼについて、人のみならず、他の動物にも一般化できるか検討することも目指した。

3. 研究の方法

抗ウイルス抗体については、蛍光抗体法を、ウイルス DNA の定量については RT-PCR 法を、 α -アミラーゼについては酵素発色法を用いた。過去に収集した試料、取得したデータも併せ解析に用いた。

4. 研究成果

現在使用している唾液アミラーゼの簡易測定器は、新鮮採取試料を用いることを推奨しているため、予備テストとして保存唾液試料を用いた測定法の検討をおこなった。また、他動物試料について使用の範囲を知るため入手可能な動物唾液についての検討をおこなった。保存試料を用いた場合、測定チップに載せる唾液量が不十分だと、値が大きくなるため、最適最少量を調べたところ、50 μ l という値を得た。本研究で用いる簡易型機器の長所は、免疫学的測定法と異なり、基質を分解する酵素活性を測定するため、被験動物種を問わないところにある。チンパンジーの保存唾液は使用可能であることが確認できた。また、直接飼育アジアゾウについては、唾液採取をするのではなく、人の場合と同様にチップを直接口内に運び、安定した計測値をえることができ、非侵襲的ストレス計測法として飼育管理への応用も期待された。一方、いくつかの哺乳類では唾液中にアミラーゼが分泌されないとの報告があり、実際、唾液を採取して測定しても低値を示す種が見つかり、更なる検討を要した。

ヒトに潜伏感染するウイルスは多々あるが、唾液中に排出される Epstein-Barr ウイルス(EBV)を用いることで非侵襲的方法に通じ、また、唾液中に分泌される α -アミラーゼは近年ストレスマーカーとして注目されているので、 α -アミラーゼも併せモニタリングした。共同研究を行っているタイ国ケンケン大学医学部において、「運動と免疫・ストレス」に関する研究が行われていたので、唾液中の EBV と α -アミラーゼのモニタリングを行った。 α -アミラーゼはストレスに対し敏捷に反応し、短時間のモニタリングに適していることがわかった。一方、DNA コピー数でモニタリングした唾液中 EBV 量は、およそ1週間程度遅れて推移していることが推察された。 α -アミラーゼと EBV 量の変動パターンの波形は一致しているわけではなく、EBV ある程度の期間中のストレス量を積分したパターンと考えられた。すなわち、 α -アミラーゼは即効性のマーカー、EBV は遅効性のマーカーと捉えられ、EBV はストレスの存在を遡って推測でき、両者を併用することでストレス評価がより密になると期待された。

「非侵襲的」観点から、EBV 以外のウイルスマーカーの探索を試みた。パポウイルスに属する JC ウイルスは尿中に排出されるので、ストレスマーカーとして適しているが、検出率・ゲノム配列の多様性等について既存データの再検討をおこなった。JC ウイルスの尿中への排出はかなりの頻度で観察され非侵襲マーカーとしては考慮の余地があったが、より高齢者に多く、若年層での尿中の検出率が低いため、普遍的ストレスマーカーとしては不向きと考えられた。

ウイルスの潜伏感染をストレスマーカーとする他動物への適用についての検討を行

った。EBV の経験から、サル(マカク)血中ヘルペスウイルス量を RT-PCR 法でモニタリングするための、プライマの設計をおこない、既知のプライマでは増殖ができなかった試料にも使用できるものを作成した。このプライマーを用い、野外での採取ニホンザル試料への適用を試みている。

他の動物において、実際の社会性ストレスと新たなストレスマーカーの関係を調べる試みを、過去に収集した試料で再検討した。個別飼育されていたオス9頭のチンパンジーにグループ形成を試みた時の唾液試料を用いた。ヒトと近縁のチンパンジーではヒトと同様のメカニズムでウイルスの再活性化が期待されることから、グループ作りに伴う心理的ストレスと EBV_{cmp} の関係を解析した。また、一時的にグループから離れた個体が再度グループに戻る過程での EBV_{cmp} の再活性化も解析した。その際、行動変化・古典的ストレスマーカー値等を参考にした。チンパンジーのグループ作りにおいて、攻撃を中心とした行動が一部のチンパンジーに急激な心理的ストレスを引き起こし、唾液中ウイルス量が上昇したと考えられた。一時的に離れていた個体がグループに再度合流する過程では、戻ってくる個体だけでなく受け入れる側でも唾液中のウイルス量の変動しており、両者にストレスが生じていることを示唆していた。また、唾液中のホルモン濃度とウイルス量との関係では、コルチゾール量との間に相関はみられなかったものの、テストステロン量との間には有意な相関がみられたことは興味深い。社会ストレスを評価する上で、潜伏感染ウイルスの再活性化をモニターすることは新たなバイオマーカーとしても有用であると考えられた。

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17件)全て査読有り

1. Natphopsuk, S., Settheetham-Ishida, W., Pientong, C., Sinawat, S., Yuenyao, P. and Ishida, T. Human papillomavirus genotype and cervical cancer in Northeast Thailand. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* (in press)

2. Furusawa, T., Naka, I., Yamauchi, T., Natsuhara, K., Eddie, R., Kimura, R., Nakazawa, M., Ishida, T., Inaoka, T., Matsumura, Y., Ataka, Y., Ohtsuka, R. and Ohashi, J. Hypertension Susceptibility Gene Prevalence in the Pacific Islands and Associations with Hypertension in Melanesia. *Journal of Human Genetics*, 2013, 58: 142-149.

doi:10.1038/jhg.2012.147

3. Barelli, C., Matsudaira, K., Wolf, T., Roos, C., Heistermann, M., Hodges, K.,

Ishida, T., Malaivijitnond, S. and Reichard, U.H. Extra-pair paternity confirmed in wild white-handed gibbons. *American Journal of Primatology*, 2013, 75: 1185-1195.

DOI: 10.1002/ajp.22180

4. Mexitalia, M., Yamauchi, T., Utari, A., Sjarif, D R., Subagio, H W., Soemantri, A. and Ishida, T. The role of uncoupling protein 2 and 3 genes polymorphism and energy expenditure in obese Indonesian children. *Journal of Pediatric Endocrinology*, 2013, 26: 441-447.

DOI 10.1515/jpem-2012-0311

5. Matsudaira, K., Reichard, U., Malavijitnond, S. and Ishida, T. Molecular evidence for the introgression between *Hylobates lar* and *H. pileatus* in the wild. *Primates*, 2013, 54: 33-37.

DOI 10.1007/s10329-012-0323-5

6. Sakae, C., Natphopsuk, S., Settheetham-Ishida, W. and Ishida, T. Low prevalence of *Toxoplasma gondii* infection among women in Northeastern Thailand. *Journal of Parasitology*, 2013, 99: 172-173.

doi.org/10.1645/GE-3222.1

7. Naka, I., Hikami, K., Nakayama, K., Koga, M., Ishida, N., Kimura, R., Furusawa, T., Natsuhara, K., Yamauchi, T., Nakazawa, M., Ataka, Y., Ishida, T., Inaoka, T., Munkhtulga, L., Iwamoto, S., Matsumura, Y., Ohtsuka, R. Tsuchiya, N. and Ohashi, J. A functional promoter polymorphism of the beta-2 adrenergic receptor gene (*ADRB2*) is associated with obesity in Oceanic populations. *International Journal of Obesity*, 2013, 37: 1204-1210.

doi:10.1038/ijo.2012.206

8. Natphopsuk, S., Settheetham-Ishida, W., Sinawat, S., Pientong, C., Yuenyao, P. and Ishida, T. Risk factors for cervical cancer in northeastern Thailand: detailed analyses for the sexual and smoking behaviors. *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, 2012, 13: 5489-5495.

9. Ohtani, H., Naruse, T.K., Iwasaki, Y., Akari, H., Ishida, T., Matano, T. and Kimura, A. Lineage-specific evolution of T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 gene in the primates. *Immunogenetics*, 2012, 64: 669-678.

DOI 10.1007/s00251-012-0628-y

10. Naka, I., Ohashi, J., Kimura, R., Furusawa, T., Yamauchi, T., Nakazawa, M., Natsuhara, K., Ataka, Y., Nishida, N., Ishida, T., Inaoka, T., Matsumura, Y. and Ohtsuka, R. *DRD4* VNTR polymorphism in Oceanic populations. *Anthropological Science*, 2012, 120: 151-155.

DOI: 10.1537/ase.110901

11. Kurosaki, T., Ueda, S., Ishida, T., Abe, K., Ohno, K. and Matsuura, T. The unstable CCTG repeat responsible for myotonic dystrophy type 2 originates from an AluSx element insertion into an early primate genome. *PLoS One*, 2012,

7:e38379

doi:10.1371/journal.pone.0038379

12. Sakae, C. and Ishida, T. Direct evidence for *Toxoplasma gondii* infection in a wild Japanese serow (*Capricornis crispus*) from mainland Japan. *J. Parasitology*, 2012, 98: 224-225.

doi.org/10.1645/GE-2881.1

13. Yamamoto, H., Suzuki, J., Matsuda, A., Ishida, T., Ami, Y., Suzuki, Y., Adachi, I., Wakita, T., Takeda, N., Li, T.-C. (2012): Hepatitis E virus outbreak in monkey facility, Japan. *Emerging Infectious Diseases*, 2012 18 (12): 2032-2034.

DOI: <http://dx.doi.org/eid1812.120884>

14. Nakayama, K., Yanagisawa, Y., Ogawa, A., Ishizuka, Y., Munkhtulga, L., Charupoonphol, P., Supannatas, S., Kuartei, S., Chimedregzen, U., Koda, Y., Ishida, T., Kagawa, Y. and Iwamoto, S. High prevalence of an anti-hypertriglyceridemic variant of the MLXIPL gene in Central Asia. *Journal of Human Genetics*, 2011, 56: 828-833. doi:10.1038/jhg.2011.109

15. Settheetham-Ishida, W., Yuenyao, P., Natphopsuk, S., Settheetham, D. and Ishida, T. Genetic Risk of DNA Repair Gene Polymorphisms (XRCC1 and XRCC3) for High Risk Human Papillomavirus Negative Cervical Cancer in Northeast Thailand. *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, 2011, 12: 963-966.

16. Ohtani, H., Nakajima, T., Akari, H., Ishida, T. and Kimura, A. Molecular evolution of immunoglobulin superfamily genes in primates. *Immunogenetics*, 2011:63: 417-428.

DOI 10.1007/s00251-011-0519-7

17. Furusawa, T., Naka, I., Yamauchi, T., Kimura, R., Nakazawa, M., Ishida, T., Nishida, N., Eddie, R., Ohtsuka, R. and Ohashi, J. The serum leptin level and body mass index in Melanesian and Micronesian Solomon Islanders: focus on genetic factors and urbanization. *American Journal of Human Biology*, 2011, 23: 435-444.

DOI 10.1002/ajhb.21124

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Matsudaira, K. and Ishida, T. “Current advances in gibbon phylogeny” The 3rd International Symposium on Southeast Asian Primates Research: Diversity and Evolution of Asian Primates, Bangkok, Thailand, August 25, 2012.

2. Ishida, T. “Stress and Immunity” The 40th Annual Meeting of the Physiological Society of Thailand, International Conference, Khon Kaen, Thailand, May 2, 2011.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/anthro/lab.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石田 貴文 (ISHIDA, TAKAFUMI)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：20184533

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

田宝 玄人 (TADAKARA, GENTO)

東京大学・大学院理学系研究科・博士課程