

平成 22 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006～2009

課題番号：18591205

研究課題名 (和文) 水痘帯状疱疹ウイルス感染症における Natural killer 細胞の役割

研究課題名 (英文) Role of natural killer cells on varicella zoster virus infection

研究代表者

寺田喜平 (TERADA KIHEI)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：50172094

研究成果の概要 (和文)：

VZVは細胞親和性が強く、VZVを cell free で取り出すことは非常に困難である。また水痘感染の発症前後でリンパ球関連のウイルス血症が証明されており、我々ほどのリンパ球との細胞親和性が強いのかを in vitro の実験で行った。リンパ球に VZV Oka 株を感染させて、フローサイトメトリーを利用して T 細胞、B 細胞、NK 細胞群にソーティングを行い、それぞれの細胞群についてリアルタイム PCR を用いて VZV-DNA を定量した。T cell では CD45RO、CD3、CD4、B cell では CD74、CD19、CD20、CD21、CD22、NK 細胞では、CD16、CD56、CD57 のモノクローナル抗体を用いて実験を行った。まず、それぞれのモノクローナル抗体陽性群を集めて、定量したところ NK 細胞群、B 細胞群、T 細胞群の順に VZV-DNA 量が高かった。つぎに陽性群と陰性群の 2 種類を取り、その 2 群で比較したところ、NK 細胞のみ陽性群が陰性群より高かった。CD16、CD56、CD57 の 3 種類から 2 種類ずつ比較すると、CD16>CD56、CD16>CD57、CD56>CD57 という関係で VZV-DNA が高く、NK 細胞の中でも CD16 がもっとも細胞親和性が強いと思われた。さらに、2 日間リンパ球と VZV を培養すると、フローサイトメトリーで小型化したサブセットができるので、その群ともとの群において real-time PCR すると有意に VZV が感染していることが判明し、さらに 7-AAD の発現率が高くアポトーシスに向かっていることがわかった。今後、それら感染したリンパ球が NK 細胞であるかを検討している課程にある。

研究成果の概要 (英文)：

Cell tropism of varicella-zoster virus (VZV) is very strong, so that VZV is difficult to be recovered without cells. And there have been some reports about lymphocyte-associated-viremia during VZV infection. In order to detect strength of cell tropism between virus and lymphocyte subsets and/or which lymphocytes are mainly infected, we investigated them in vitro on peripheral blood mononuclear cells. After incubation with VZV Oka strain, we sorted peripheral blood lymphocytes into T, B and NK cells with FACS. And then we measured quantity of VZV copy numbers with real-time PCR. As a result, there were the highest DNA copies in the NK subsets, B cell subsets in second. Next, between NK cells and non-NK cells, the DNA copies were significantly higher in NK cells than those in non-NK cells. Among CD16, CD56 and CD57 subsets of NK cells, there were CD16>CD56, CD16>CD57, CD56>CD57 in infected DNA copy numbers. This suggests that CD16 of NK cells are the strongest cell tropism to VZV. And change of cell size is thought to be associated with VZV infection and apoptosis of the infected cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	900,000	0	900,000
2007年度	800,000	240,000	1040,000
2008年度	800,000	240,000	1040,000
2009年度	800,000	240,000	1040,000
年度			
総計	3300,000	720,000	4020,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：小児科学

キーワード：水痘帯状疱疹ウイルス、NK細胞

1. 研究開始当初の背景

現在判明していることは、過去の我々も含めた多くの研究で、特異細胞性免疫の低下に伴って帯状疱疹の発生頻度が増加することであり、主に CD8、一部は CD4 のキラーT細胞が再活性化に関与していることが明らかになっている。しかし、VZV は感染細胞の MHC class1 発現を抑制するだけでなく、神経ではその発現が抑制されているため、MHC class 1 発現を必要とする特異細胞性免疫からの逃避する手段として考えられる。しかし、特異細胞性免疫だけが VZV の再活性化をコントロールしているのではなく、他の免疫系が関与している可能性が高いと思われる。とくに NK 細胞は MHC との関連の少ない免疫系であり、細胞性免疫と同様に細胞傷害性を認めること、T 細胞や B 細胞など特異免疫が作動するまでの初期に効果の強いことが明らかである。NK 細胞は MHC class1 の低下した細胞を認識して標的とすることも判明している。

2. 研究の目的

NK 細胞の欠損した宿主では VZV 感染アシクロピルの投与によっても完治せず、感染が長期間持続すると報告されている。また水痘感染が重症化した症例では、NK 細胞が一過性に減少しており、回復期には戻っているとの報告も出されている。我々は VZV の細胞親和性がリンパ球の中で NK 細胞に高いことを明らかにしようとしている。これは VZV が NK 細胞に感染することによって NK 細胞をアポトーシスに導き、自然免疫から逃れる機構として存在するとの仮説の基に検討するものである。今回の研究の中心は、VZV が感染するリンパ球は NK 細胞が多いのか、感染した NK 細胞が Caspase などのアポトーシスを示すシ

ステムを誘導しているか、NK 細胞 cell line を用いて検討すること、またインターフェロンやサイトカインの分泌能の抑制を実証すること、NK 細胞を示すマーカーのうちどれがもっとも VZV とのアフィニティが強いかを検討することで、VZV 感染における NK 細胞の役割を示すことができると考える。

3. 研究の方法

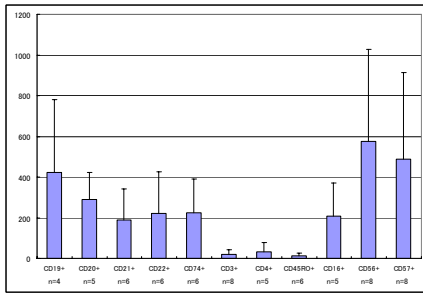
(1) 水痘の既往歴をもつ成人から Ficoll-hypaque で末梢血単核球 (PBMC) を分離した。VZV Oka 株と約 24 時間インキュベーション後、T 細胞 (CD3, CD4 and CD45RO)、B 細胞 (CD19, CD20, CD21, CD22 and CD74)、NK 細胞 (CD16, CD56 and CD57) を BD FACSAria で約 12×10^4 個のリンパ球をソーティングし、DNA を抽出した。VZVgB をターゲットにしたプライマーで ABI PRISM 7700 を使用して real-time 法で VZV DNA を定量した。そして、その中で感染率の高いサブセットを比較し、検討をおこなった。(2) リンパ球と VZV とのインキュベーションの中で、2 日以上経過するとリンパ球が小型化するグループを見つけたので、そのグループに VZV の感染が高いかを検討し、7-AAD の発現率を測定した。

4. 研究成果

(1) どの細胞との関連が強いかの検討

Fig. 1 に示すように、T 細胞、B 細胞、NK 細胞群においてそれを示す陽性細胞群の比較では、B 細胞群と NK 細胞群に VZV DNA コピー数が多く、より多く感染していると疑われた。Cell tropism の可能性として、NK 細胞および B 細胞を考慮すべきであると考えた。

Fig. 1



次にそれぞれの陽性と陰性細胞群を比較すると、Fig. 2 のように、NK 細胞群の CD56 においてのみ陽性群が陰性群より有意に DNA 量が多かった。しかし、DNA 抽出時に問題のないことを確かめるために、同じ検体で細胞 1 個当たり 1 コピーしかない RNase P と比で検討したところ、Fig 3 に示すように CD56 でもっとも高く、同じ結果であることが確認できた。

Fig. 2 c. NK cells

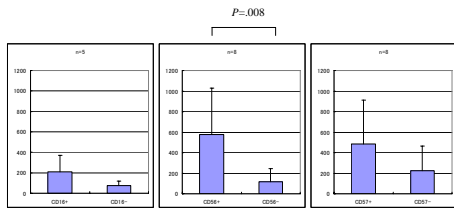
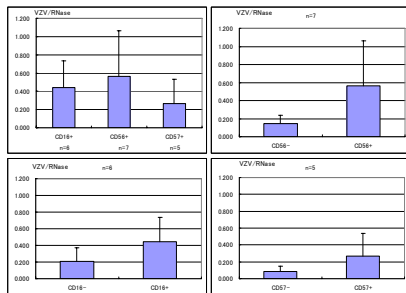


Fig. 3



また CD56 に細胞親和性が高く、最高で 50% の細胞に感染していた。1 個の細胞に 1 コピーしかない RNaseP 遺伝子で VZV-DNA 量を割ると平均 0.5 であった。

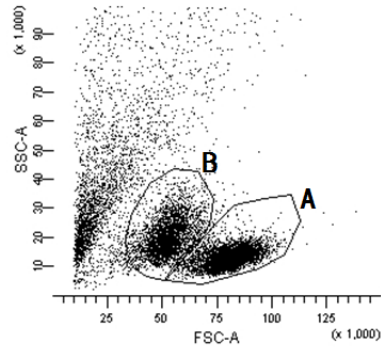
NK 細胞は末梢リンパ球の約 15% を占め、ヘルペスウイルスの排除に重要な役割を果たしている。我々は、以前水痘に感染すると急性期に NK 細胞が減少していることを報告

した。また最近では、life-threatening な重症水痘感染 5 例において急性期 CD56NK 細胞が消失し、回復とともに戻ってきたとの報告があり、関連性が示唆される。

(2) VZV 感染による細胞の変化

24 時間以上インキュベーションすると、FACS で元の細胞群 A から小型の細胞群 B に変化することが、Fig のように判明したので、この細胞群に VZV 感染した結果起こったことであれば VZV 感染率が高いと予測される。

Fig. 4



FACS で A 細胞群と B 細胞群を sorting し、DNA を抽出後に real-time PCR したところ、Fig. 5 に示すように、B 群 (small cluster) で有意に感染率が高いことが判明した。またその 7-AAD の発現率を調べたところ、有意に高く、アポトーシスに向かっていると思われる。

Fig. 5

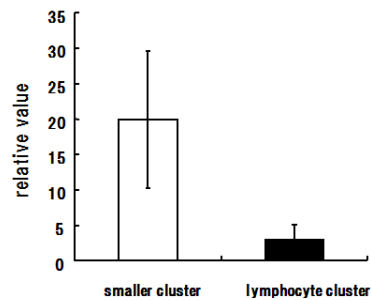
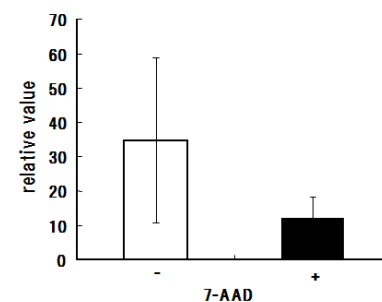


Fig. 6



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 8 件)

- 1) 寺田喜平、山口徹也、他. 10 年間の抗体変動から推定した水痘帯状疱疹ウイルスとの接触歴. 小児科臨床, in press
- 2) Kihei Terada, Yasuko Kosaka, Satoko Ogita, Takako Yukiyooshi, Naoki Kataoka. Booster effect of rubella vaccination in college students with pre-existing low antibody titers in Japan. *Kawasaki Med J* 34:165-170, 2009
- 3) Teranisi Hideto, Kawasaki Kozo, Sasaki Atsuko, Fujimoto Hiroki, Inoue Mika, Monju Ayaka, Wakabayashi Tokio, Akaike Hideto, Yamaguchi Tetsuya, Ogita Satoko, Oda Keiko, Terada Kihei, Kazunobu Ouchi. Localized Intraabdominal Kikuchi-Fujimoto Disease: a case report and review of the Literature. *Kawasaki Med J* 34(4):285-289, 2008
- 4) Kihei Terada, Yasuhiro Kawai, Ayaka Monju, Wakabayashi Tokio, Kazunobu Ouchi et al. Adolescent jump case in Japan associated with influenza but not oseltamivir. *Pediatr Infect Dis J* 27:88-89, 2008
- 5) 寺田喜平. 水痘. *最新医学* 63:1365-1377, 2008
- 6) Kurokawa Keiji, Yorifuji Tohru, Kawai Masahiko, Momoi Toru, Nagasaka Hironori, Takayanagi Masaki, Kobayashi Keiko, Yoshino Makoto, Kosho Tomoki, Adachi Masanori, Otsuka Harumi, Yamamoto Shigenori, Murata Toshiaki, Suenaga Akihito, Ishii Tsutomu, Terada Kihei et al. Molecular and clinical analyses of Japanese patients with carbamylphosphate synthetase 1 (CPS1) deficiency. *Journal of Human Genetics* 52(4):349-354, 2007
- 7) Shibasaki Kensaku, Murakami Tatsufumi, Kushida Ryutarou, Kurokawa Katsumi, Terada Kihei, Sunada Yoshihide. Acute disseminated encephalomyelitis associated with oral polio vaccine. *Internal medicine* 45:1143-1146, 2006
- 8) Satoko Ogita, Kihei Terada, Takahiro Niizuma, Yasuko Kosaka, Naoki Kataoka. Characteristics of facial nerve palsy during childhood in Japan. *Pediatr Internat* 48:245-249, 2006

[学会発表] (計 7 件)

- 1) 寺田喜平、他、10 年間における水痘帯状疱疹ウイルス抗体価の変動—IgA 欠損児

において、第 50 回日本臨床ウイルス学会、6/12/09

- 2) 寺田喜平、麻疹、水痘等ウイルス感染症の概要、第 24 回日本環境感染学会、横浜、2/27/09
- 3) 寺田喜平、他、学校・職場・病院における感染制御と予防接種 病院における感染制御と予防接種、第 23 回日本環境感染学会、長崎、2/23/08
- 4) 寺田喜平、母親から麻疹に感染した低出生体重児が 5 年間で抗体陰性化、第 39 回日本小児感染症学会、11/9/07、横浜
- 5) 寺田喜平、他、風疹ワクチン接種対象者は HI 抗体 16 倍以下でよいか、第 48 回日本臨床ウイルス学会、富山、6/2/07
- 6) 寺田喜平、他、小児期顔面神経麻痺と VZV 関連の頻度、第 47 回日本臨床ウイルス学会、6/6/06、東京
- 7) 寺田喜平、他、末梢リンパ球における水痘帯状疱疹ウイルスの細胞親和性、第 38 回日本小児感染症学会、11/10/06、東京

[図書] (計 4 件)

- 1) 寺田喜平編著；ひとりで始める院内感染対策、中外医学社、東京、2009
- 2) 梶谷喬、寺田喜平、小河晶子著：医療保育、診断と治療社、東京、2009
- 3) 寺田喜平、二木芳人編著：エビデンスに基づいた院内感染べからず集、中外医学社、東京 2006
- 4) 寺田喜平編著：実践予防接種マニュアル改訂第 2 版、中外医学社、東京、2008

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺田 喜平 (TERADA KIHEI)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：50172094

(2) 研究分担者

荻田 聡子 (OGITA SATOKO)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：40309555

(3) 連携研究者

なし