

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650158

研究課題名（和文） 日常生活において、人体でウイルスを増え易くする肉体的、並びに精神的負荷の探索

研究課題名（英文） Research for factors in everyday life augmenting virus in saliva

研究代表者

荒尾 雄二郎 (ARAO YUJIRO)

岡山大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号：40151146

研究成果の概要（和文）：健常人におけるウイルス性疾患の発病や悪化を避けるためには、ヒトの身体でウイルスを増え易くする日常的要因を知る必要がある。健常人で増えて唾液中に出てくるウイルスを利用してこのような要因を探したところ、病院実習、就職活動、演歌鑑賞、及び睡眠時間減少により、唾液からヒトヘルペスウイルス6型が検出される頻度を増やすことを見出した ($p < 0.05$)。また、睡眠時間はトルケテノウイルスが見つかる頻度と逆相関した ($r = -0.71$)。従って、睡眠時間の減少はこのウイルスを増やす要因とも考えられる。

研究成果の概要（英文）：To prevent healthy persons from onset and deterioration of viral disease, we need to know unknown factors in everyday life increasing virus load in them. The aim of this study is to find such factors by utilizing viruses that is persistently infecting healthy persons and excreted into saliva. I found that practical training in a hospital, job hunting, listening unfavorable music, and reduced sleeping hours significantly heightened the human herpesvirus type 6 (HHV6)-positive rate of saliva samples ($p < 0.05$). I also found that the factors induced the similar increase in the torque teno virus (TTV)-positive rate of saliva samples but the increase was not significant. Sleeping hours also correlated reversely with the TTV-positive rate ($r = -0.71$), suggesting that reduction in sleeping hours is an enhancive factor for TTV in saliva in addition to HHV6.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	2,800,000	390,000	3,190,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：保健健康情報、持続感染ウイルス

1. 研究開始当初の背景

健康であるためには病原微生物により障害されないことが必要である。病原微生物によ

る障害のおこりやすさは、体内に侵入した病原微生物の量、病原微生物の病原性の強さ、並びに免疫力の強さで決まると考えられてき

た。そして、国内外における感染症の研究は、これらの要因に対応することを念頭に実施されてきた。しかし、新型インフルエンザウイルス感染症において重篤化した症例の中には既知の危険因子(基礎疾患、高齢、乳幼児、妊娠)で説明できない事例があることからわかるように、上記の3要因に加えて病原微生物が増え易くなる(既知の免疫力以外の)身体の状態があると考えられる。そこで、健常人におけるこの種の体調変化とこれを誘導する身体への負荷を明らかにし、健康情報として提供することが必要である。

なお、他の目的で実施された過去の研究において、単純な運動疲労は体内ウイルス量を増大させなかったことから、ヒトの身体でウイルスを増え易くする負荷としては、精神的負荷が考えられる。

2. 研究の目的

本研究課題は、健常人においてウイルスが増え易くなる体調の変化とその変化を誘導する日常的因子を明らかにし、ウイルス感染症の予防、及び症状の悪化を回避するための健康情報を把握することを目的とする。これらの情報はウイルス感染症に対して危険な状態にあるヒトを回復させる研究をも加速させると期待できる。

3. 研究の方法

(1) 唾液中ウイルスDNAの調査

① ウイルスDNAの検出

Nested PCR法で唾液中のウイルスDNAを検出した。ヒトヘルペスウイルス6型(HHV6)、ヒトヘルペスウイルス7型(HHV7)、及びトルケテノウイルス(TTV)を調査対象とした。

② ウイルスDNAの定量

競合的内部標準を用いた定量的遺伝子増幅法(QCN-PCR法)を用いて、唾液中のウイルスゲノムのコピー数を測定した。内部標準とす

るDNA断片は、野生型のDNA断片を基に、2次PCRで増幅したDNA断片が特定の制限酵素により真ん中で切断されるように変異を導入することで作製した。変異の導入は、PCRによる変異導入法にて実施した。野生型のDNA断片には、1次PCRで増幅したDNA断片を使用した。

③ 唾液中核酸の抽出

唾液中の核酸を蛋白質分解酵素処理とヨウ化ナトリウム/イソプロパノール沈殿法で回収した。2本鎖DNA特異的蛍光試薬(PicoGreen reagent)を用いて、回収したサンプル液中の2本鎖DNA濃度を計測した。

(2) ヒト体調の客観的評価

① 唾液酸化還元電位の測定

唾液用酸化還元電位確認計(LL001)で唾液の酸化還元電位を測定した。電位が酸化側に傾くと体調が悪化していると考えられている。

② 唾液中コルチゾール濃度の測定

酵素免疫測定法で唾液中のコルチゾール濃度を定量した。コルチゾール濃度はストレスに応答して上昇すると報告されている。

③ 唾液中 α -アミラーゼ濃度の測定

活性測定法で唾液中の α -アミラーゼ濃度を定量した。 α -アミラーゼ濃度はストレスに応答して上昇すると報告されている。

④ 唾液中分泌型IgA濃度の測定

酵素免疫測定法で唾液中のIgA濃度を定量した。分泌型IgA濃度はストレスにより低下すると報告されている。

(3) ヒト体調の主観的評価

日本疲労学会の提唱する疲労感visual analogue scale (VAS) 検査で唾液を採取した時の主観的な疲労感を定量的に評価した。

(4) アンケート調査

アンケート調査で唾液を採取した当日の出来事、及び直前の睡眠時間を記録した。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

①QCN-PCR法の構築

HHV6、HHV7、及びTTVのゲノムを検出する nested PCR法、並びにそのコピー数を計測するQCN-PCR法を構築した。

②唾液中ウイルスを増加させる因子の同定

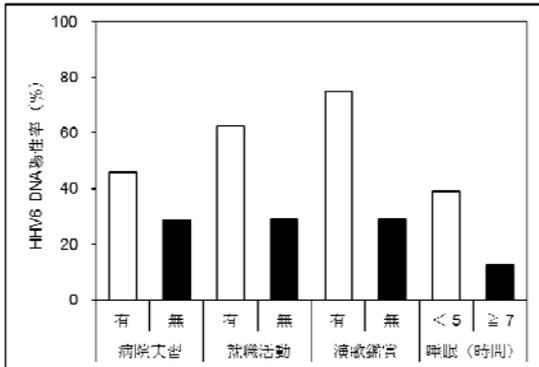


図1 日常的因子による健常人唾液のHHV6 DNA陽性率の増加

唾液中ウイルスを増加させると考えられる日常的因子を同定した(図1)。すなわち、病院実習、就職活動、演歌鑑賞、及び睡眠時間減少は、健常人唾液のHHV6 DNA陽性率を有意 ($p < 0.05$) に増加させた。これらの因子はTTV DNA陽性率も同様に増加させる傾向があったが、その増加は有意には至らなかった。ただし、病院実習を部門別に解析すると一部の部門で有意 ($p < 0.05$) なTTV DNA陽性率の増加が認められた。

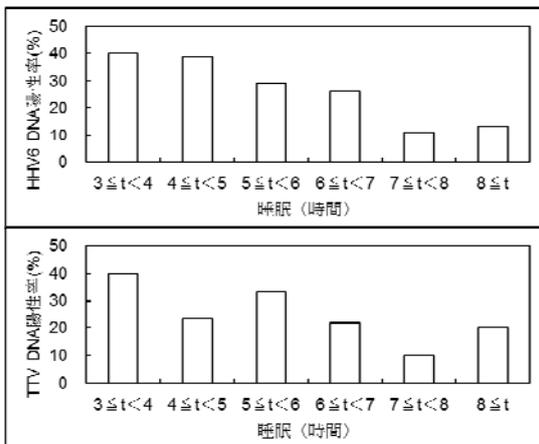


図2 睡眠時間と健常人唾液のHHV6、またはTTV DNA陽性率の比較

睡眠時間とウイルスDNA陽性率の間でピアソンの相関係数を計算すると、睡眠時間はHHV6、及びTTV DNA陽性率と逆相関した(それぞれ、 $r = -0.94$ 、及び -0.71)。従って、睡眠時間の減少は唾液中のHHV6の増加要因であることが重ねて示唆されるとともに、TTVの増加要因であるとも推測される。一方、唾液中のウイルスDNA量は全体的に当初予想よりも少なく、多くのウイルスDNA陽性サンプルにおいてQCN-PCR法の信頼限界を下回ったため定量的比較は有意差を検出できなかった。

③体調の客観的評価

唾液中のコルチゾールと分泌型IgAの濃度は、上記の日常的因子に曝露しても、有意に変化することはなかった。また、唾液中の α -アマラーゼ活性も有意な変化を示さなかった。従って、上記の因子は、免疫力等の変化を調べる既知の指標には影響を及ぼさないにもかかわらず、唾液中のウイルスを増大させるものと考えられる。

④HHV6陽性とTTV陽性の連動性

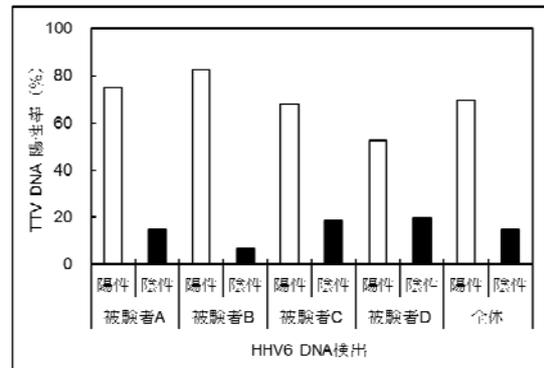


図3 健常人唾液のHHV6 DNA陽性とTTV DNA陽性の連動性

HHV6 DNA陽性サンプルのTTV DNA陽性率は69.4%であり、HHV6 DNA陰性サンプルのTTV DNA陽性率、14.9%と比較して極めて高かった ($p < 0.01$)。従って、HHV6 DNA陽性とTTV DNA陽性の間には高い一致性があり、上記の日常的因子による唾液中ウイルスの増加は、ウイルス特異的なものではなく、多くのウイルスの増殖に影響を与える身体側の変化によるも

のと推測される。

(2) 研究成果の位置づけとインパクト

① 唾液中ウイルス増加因子同定の意義

過去に連休前は連休後よりも唾液中のHHV6 DNAが多いという報告が1つだけあるが、そのストレスが精神的なものか肉体的なものか全く不明であった。今回、個別の日常的因子がHHV6 DNA陽性率の増加と関連するが判明したことは国内外を問わず初めてであり、先駆的な意義がある。また、同定された因子群が精神的なストレスであると思われることから今後の研究の方向性を指し示すものと考えられる。

② 日常的因子によるTTV陽性率増加の意義

HHV6 DNA陽性率のみならず、TTV DNA陽性率も日常的因子により増加する傾向を示したという事実は、ストレスにより増加するウイルスがHHV6のみでないことを示唆した点で大きな意義がある。今後、多くのウイルスで同様の事実が検証されることが期待される。

③ 関連研究へのインパクト

今回見出された日常的因子に暴露したヒトの体内で何が変化しているかを調べることで、体内でのウイルス増加を惹起する物質を探索することが可能になると期待される。

(3) 今後の展望

① 唾液中ウイルス増加因子の絞り込み

病院実習、就職活動、演歌鑑賞、及び睡眠時間減少で唾液のHHV6 DNA陽性率が増加した。これらの因子は精神的ストレスであると推測される。ウイルス増加要因として精神的ストレスに焦点を当てることが有望と考えられる。

② 日常的因子による唾液中ウイルス増加の一般性

HHV6 DNA陽性とTTV DNA陽性の間には高い一致性があり、本研究で見出された唾液中ウイ

ルスDNAの増加は、ウイルス特異的なものではなく身体側の変化によるものと推測された。

従って、HHV6とTTVのみならず、他のウイルスも精神的ストレスを感じているヒトの体内で増加しやすくなるのではないかと危惧される。今後、この推測を実証していく必要がある。

③ 今後の課題

TTV DNA陽性率では、日常的因子への曝露によりHHV6 DNA陽性率と同様の増加傾向があったものの、当初予想より唾液中のウイルスDNA量が少なかったため、信頼できる定量的解析が可能であったサンプル数が少なく、統計学的有意差を得るには至らなかった。有意差のある結果を得るためにサンプル数を増やす必要がある。さらには、ウイルス増加因子への対応策を立てるために、ウイルスを減少させる因子を探索する必要がある。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒尾 雄二郎 (ARAO YUJIRO)
岡山大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号：40151146

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

近末久美子 (CHIKASUE KUMIKO)
岡山大学・大学院保健学研究科・博士課程
研究者番号：

池田 千将 (IKEDA KAZUYUKI)
岡山大学・大学院保健学研究科・修士課程
研究者番号：

青野江里子 (AONO ERIKO)
岡山大学・医学部保健学科・学部学生
研究者番号：

大西 巧真 (OHNISHI TAKUMA)
岡山大学・医学部保健学科・学部学生

研究者番号：

片山 大奨 (KATAYAMA DAISUKE)
岡山大学・医学部保健学科・学部学生
研究者番号：

川西 悟史 (KAWANISHI SATORU)
岡山大学・医学部保健学科・学部学生
研究者番号：

徳原 成未 (TOKUHARA NARUMI)
岡山大学・医学部保健学科・学部学生
研究者番号：

長谷 友紀 (NAGATANI YUKI)
岡山大学・医学部保健学科・学部学生
研究者番号：

萩 美穂子 (HAGI MIHOKO)
岡山大学・医学部保健学科・学部学生
研究者番号：