

A-4 紫外線の増加がヒトの健康に及ぼす影響に関する疫学的視点を中心とした研究
 (4) 免疫・感染症分野における紫外線照射影響の実験的ならびに疫学的解析

研究代表者	国立感染症研究所	山本紀一
厚生省	国立感染症研究所	ウイルスI部 獣医科学部 生物活性部
山本紀一 浅野敏彦 鈴木和男		
研究協力機関	日本医科大学微生物・免疫学教室	渡理英二
研究委託機関	九州大学医学部皮膚科学教室	安元慎一郎
	平成8～10年度予算額	18,000 千円)
	(平成10年度予算額	6,000 千円)

[要旨]

免疫・感染症の分野に疫学をどのように取り入れることが出来るか一つの試みを行った。厚生省の取りまとめた2つの資料（ツベルクリン反応の全国調査及び伝染病流行予測調査報告書によるワクチン接種抗体調査）をもとに全国紫外線照射推定量と突き合わせ、自然暴露がヒトの免疫機能に影響しているかどうか解析を加えた。

紫外線が感染症に影響を及ぼすケースを探索し、マウスのマラリヤ感染が紫外線の影響を強く受けることを見いだした。またその免疫的背景について解析を加えた。

免疫・感染症の研究の過程で照射マウスの血液について2、3の新しい知見が得られた。これらは直ちに免疫・感染症と結びつくものでないが、紫外線照射と得られた現象の背景を結びつけるメディエーターは共通で有ることも考えられ、紫外線照射による現象解明の一つのアプローチとして研究の必要性が少なくない。またこれら自体を切り離しても紫外線照射が血液の多くの性状に大きな変化をもたらすことが一般的に起こっていることを示しているものと考えられ、光血液生理学（Photohematophysiology）というジャンルの確立を提唱したい。

[キーワード] 全国紫外線照射量、ツ反、マウスマラリヤ、IFN- γ 、光血液生理学

[序]

紫外線のB波が免疫機能に影響を与えることは数多く報告があり今や明白であるが、その殆ど全てが実験室レベルで為されたものである。またその免疫機能混乱の延長線上に感染症拡大のリスクが考えられるが、実験的に見ても感染症に紫外線が影響する例はそれ程多くはない。まして人間社会の自然界においては具体的に疫学調査の対象となるような紫外線の影響（Evidence）は極めて乏しいため、直ちに疫学調査とは行かないのが実状である。この分野でどのような疫学が可能であるか一つの試みである。

8年度から疫学的視点を中心として取り組むことがテーマとして盛り込まれたが、前述のように本分野の特性に鑑みてなお実験室レベルでの研究から疫学研究に資することの出来るマーカーの確立に務める必要がある。また紫外線照射による免疫の低下が感染症に結びつく

実例を今後も更に探索する必要がある。戦略的には紫外線の影響を受ける感染症を探しだし、それをモデルとして免疫学的背景を逆探知することが考えられる。

(A) 免疫・感染症分野における紫外線影響についての疫学導入のための試み。

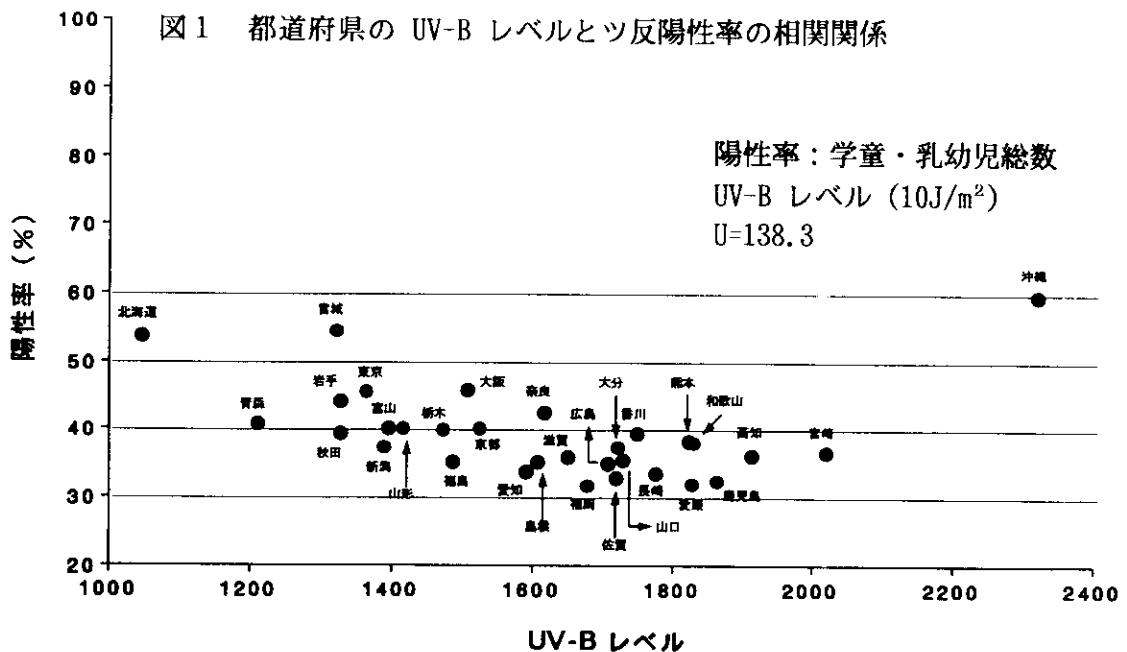
[背景] 免疫は通常目で見ることができず、また免疫の低下のみで病院に来院することはない。免疫は血液等の材料を実験室に持ち帰りそれぞれの免疫機能を然るべき方法で測定するのが原則である。したがって免疫の疫学を実施するには、ある目的で(この場合人為的紫外線照射または自然暴露)実施された集団のサンプルについて実験室におけるデータを取りそれを疫学の対象とする、と云うことになるが倫理的見地からこのような企画の実施は最近では困難になってきている。

一方免疫の低下によって感染症が引き起こされることが考えられるが、事態はそれ程単純ではなく感染の背景となる免疫が十分に解析されている例はそれ程おおいとは云えない。更に感染症で病院診療所に来院するケース自体が少なくなっているところに持ってきて臨床症状だけで感染症を診断できる疾患は限られており、通常は診断に数日からの日数を要するのが一般的である。この点が紫外線影響を考える場合、皮膚がんや白内障と決定的に異なる点である。このような背景によって、紫外線暴露に過敏な諸外国(欧米豪)においてさえなおこの種の疫学調査は未だ例を見ない。

(1) 学童・乳幼児のツベルクリン反応(ツ反)成績と紫外線照射の相関

上記の点を考慮して、われわれは唯一とも云える”目で見ることの出来る”かつ”実験室測定の不要な”免疫反応としてツベルクリン反応(ツ反)に着目した。

ツ反は遅延型アレルギー(DTH)の代表的なものであるが、DTHの一種である接触過敏症が紫外線照射の影響を強く受けることから、ツ反も照射の影響を受けることが考えられる。用いた資料は学童・乳幼児を主体とする総数の都道府県別ツ反陽転率(厚生省統計情報部発表平成7年度)で、それを全国各地の1961-1990の年平均UV-B推定照射量(10J/m²)⁽¹⁾



に対してプロットした（図1）。図中の都道府県名から明らかなように年間紫外線照射量は緯度の南下に一致して増加しているが、この紫外線量の増加に対するツ反の陽性率は右肩下がりの負の相関があることが示された。この相関性について出現率の傾向線による解析を加えたところ、傾向示すUの絶対値は 38.3 で、危険率 0.1% のU値 3.32 を大きく越えていることから高度に相関性がある、つまり換言すれば紫外線量が増えれば陽性率が低下する事は有意であることが確認された。

但しこの結論には沖縄と云う例外が存在する。最も南に位置し照射量が最大の沖縄は逆に陽性率も最大の 59.5% を示した。今回はこの沖縄の例外について十分な解析を加えられなかったが、ツ反の実施の方法において他の都道府県とは異なる何らかの要因があるものと考えられる。

（2）その他のワクチンの地域的分析

先のツ反で得られた”紫外線量の増加に伴い免疫反応が低下する傾向”は、ツ反だけに限られたものなのか、あるいは他のワクチンでも一般的に云える事なのか検証する必要がある。被接種者数および接種後調査においてツ反の全国調査には及ばないものの多少とも県別調査が行われているポリオと風疹について厚生省発表の統計資料（伝染病流行予測調査報告書）をもとに調査結果を分析した。

ポリオは国内に流行がなく、調査した中和抗体価は 100% ワクチンによる免疫抗体である。対象はワクチン接種歴が 90% 以上の就学前の幼児と学童（4-14 歳）（1993, 4 年度）としたが、陽性率には 1-3 型とも地域間で差が見られなかった。一方、平均抗体価については 1, 2 型について大分が異常に突出して高く、除大分では有意差なし、また含大分では危険率 1% 以下で紫外線照射量と有意性をもって正の相関を示した（結果省略）。例数がすくないのでこれが直ちにポリオに関しては紫外線によって免疫が増強される、とは云えないにしても少なくともツ反で見られたような南北の地域差と紫外線量の逆相関性はポリオワクチンには当てはまらないといえる。

風疹の解析には、ワクチン接種率が平均 86.4% である 15-24 歳の女性を対象に（1993-95 年度）風疹の HI（赤血球凝集抑制）抗体価を調べた（表1）。

表1 風疹 HI 抗体価と UV-B レベルの相関性

都道府県	UV-B*	HI 抗体価**	都道府県	UV-B*	HI 抗体価**
宮城	1321.7	103.4	山口	1728.2	86.6
新潟	1389.6	137.7	高知	1913.6	64.3
富山	1395.6	44.9	福岡	1678.2	107.8
愛知	1591.4	80.4	長崎	1903.2	59.3
滋賀	1649.7	119.9	熊本	1822.1	85.5
京都	1524.6	64.7	沖縄	2236.2	129.2
島根	1606.0	68.0			

相関係数=0.031 (P=0.221)

結果は一見して南北の地域差は見られず、紫外線量に依存しないランダムな抗体価を示した。相関係数は 0.031 と低く有意性は認められなかった。選んだ対象が年令的に見て 1976 年と 82 年の流行を経験しているグループであるので、このランダムな成績はワクチンによる免疫に加えて過去の感染による免疫抗体が加算された結果と考えられる。また過去の流行に地域差があったことが示唆されている。このことはワクチン接種に対して紫外線による免疫低下が仮に有りえたとしても、その低下は極めて微弱なもので、自然感染による強い免疫を越えるものではない事を示している。

ツ反は細胞性免疫であり風疹の中和抗体は体液性免疫である。われわれはこれまでに紫外線の免疫系に及ぼす影響は細胞性免疫の関与するヘルペス等においては抑制的影響が出るが^{2) 3)}、ワクチン免疫のような液性免疫では紫外線は殆ど邪魔しないかあるいはむしろ促進的のさえある成績を報告してきた⁴⁾。

ツ反とポリオ風疹の結果のみから結論することはできないにしても、実験的に紫外線の影響を受け易い細胞性免疫の代表であるツ反で負の相関性が成立し、実験的には紫外線の影響を受けにくい細胞性免疫の典型であるワクチン免疫で紫外線量と相関性が無かったと云う一致は、単なる偶然と云うよりは実験室の結果が野外のフィールドに反映している好例と見做すことが出来る。

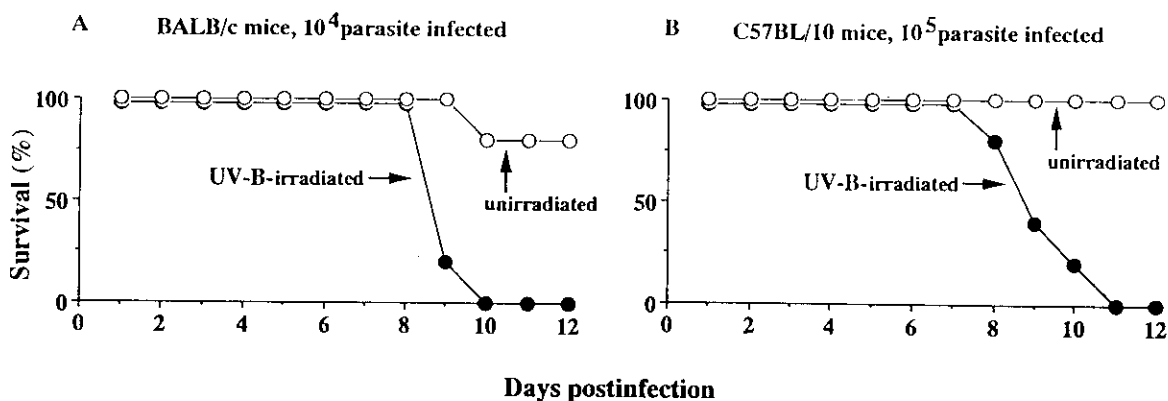
(B) 実験室レベルにおける紫外線の感染症に及ぼす影響—マウスのマラリア感染モデルを用いた UV-B の影響とその免疫学的背景。

(目的) これまでにわれわれはヘルペス感染に及ぼす紫外線の影響について報告してきた^{2) 3)}。しかしヘルペスの感染病理像は背景にある免疫系が非常にふくぎつで紫外線の影響を研究するには限界があった。われわれはこの数年間紫外線照射によって影響を受ける他の適当な実験系を探してきたが、その結果マウスのマラリア感染モデル系が目的に合うことを見いだしたので、その免疫的背景に若干の検討を加えた。

(方法) 用いたマラリア原虫はマウスマラリア (*Plasmodium chabaudi*)。マウスは 7-10 週令の BALB/c または C57BL/10 で背部を除毛した後 200 mJ/cm² の UV-B (東芝 FL20S・E) 照射し、原虫を感染赤血球数で BALB/c では 10⁴、C57BL/10 では 10⁵ 腹腔内に接種した。

(結果と考察) 結果を図 1 に示した。BALB/c は感受性のマウスとされているが、亜致死

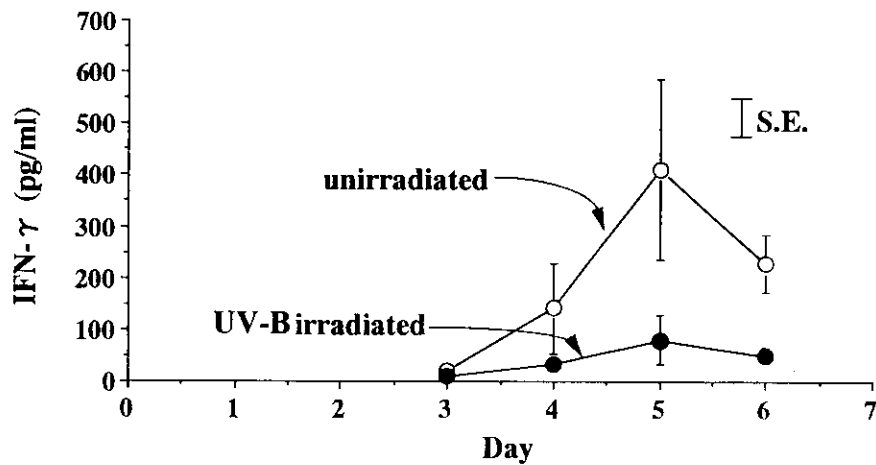
図 1 紫外線照射のマウスのマラリア感受性に及ぼす影響



量の 10^4 接種した場合 80% のマウスが生存する。そのような場合でも紫外線を感染の前日または当日に照射しておくで 100% のマウスが死亡した。更に興味あることは、本来非感受性（抵抗性）マウスとされている C57BL/10 の場合でも照射によってマウスの死亡を引き起こすようになることが判った。平均死亡日数も BALB の場合とほぼ等しく、C57BL においても BALB と同様な発病病理の経過をたどって死亡したものと思われた。つまり紫外線には感受性マウスの感受性を更に増強し、抵抗性マウスの抵抗性を感受性型に切り換える作用があるといえる。

これまでに C57BL の抵抗性は IFN- γ の産生にあることが判っている。そこで照射した C57BL の IFN- γ を調べてみると、図 2 から明らかなように感染 5 日目の血中 IFN- γ は非照射対象マウスで約 410pg/ml あるのに対し、照射マウスでは 80pg/ml と約 1/5 に抑制されていた。

図 2 マラリヤ感染マウスの IFN- γ 産生に及ぼす紫外線の影響



IFN- γ が照射を受けた抵抗性マウスの死亡に直接関与しているかどうかを投与の実験で確かめた。照射マウスを 2 分して一方には市販のマウス型 IFN- γ を感染 3 日目から 7 日まで 5 日間 400ng 連続投与した。その結果、対象の照射マウスが 5 匹中 4 匹死亡したのに対し、投与した実験群では死亡は 1 匹のみで 4 匹生存し、治癒率は 60% と計算された（表 1）。以上のことは紫外線は何んらかのメディエーターを介してマラリヤ感染マウスの IFN- γ 産性を抑制し、これによって C57BL の抵抗性が失われることが判った。今後このメディエーターの解析が必要になる。

表 1. IFN- γ 投与による UV-B 照射マウスの死亡阻止

UV	IFN- γ	Survivor/Total	Survival rates (%)	Cure ratio (%)
—	—	5/5	100	—
+	—	1/5	20	—
+	+	4/5	80	60

(C) 光血液生理学 (Photohematophysiology) の提唱

[背景] 研究の過程で興味ある2、3の知見が得られた。これらは直ちに免疫・感染症と直接結びつくものでないが、皮膚という局所で受けた UV-B 照射の影響が全身性の現象として起こる点で、免疫・感染症への影響と共通する部分がある。おそらくは UV-B 照射を受けて誘導されたメディエーターがリンパ球に作用して免疫系を攪乱し、他の組織・臓器に作用した場合、下記のごとき血液の性状の変化として表現されるものと思われる。免疫・感染症とは車の両輪のような関係にあるとも考えられ、この研究を通して免疫・感染症への理解も更に深まることが期待される。

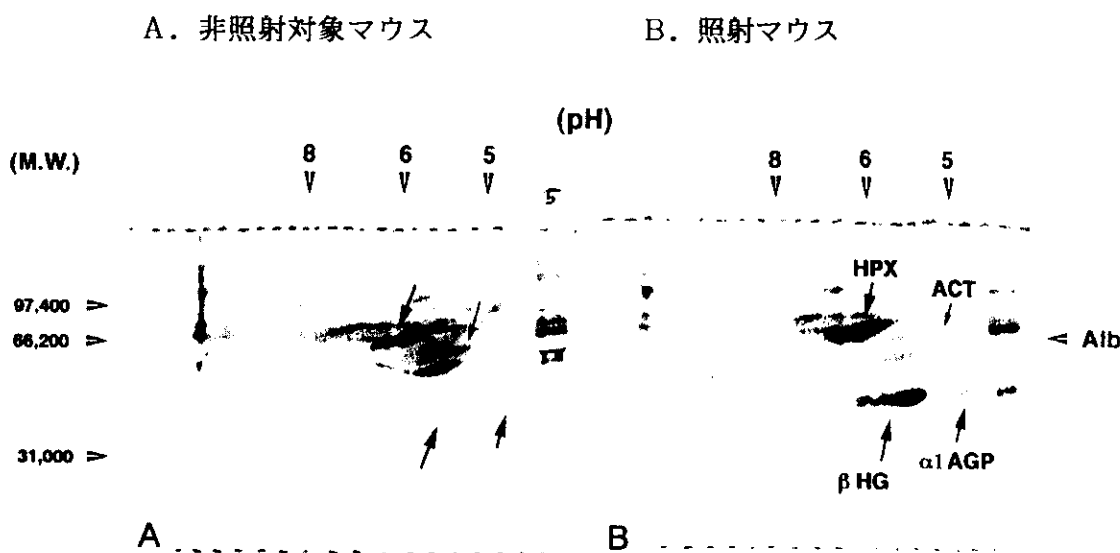
(1) UV-B 照射により上昇する血中シアル酸の本体

(目的) マウスに UV-B を照射すると急性期応答が惹起され血中のシアル酸が増加することを報告してきた⁵⁾。シアル酸は糖タンパクの末端成分であることからおそらくは血清タンパクの成分に変化をきたしているものと予測される。事実超遠心による予備実験でシアル酸はリポド分画よりもタンパク分画に増加が見られたことから、2次元電気泳動による血清タンパクの解析を行った。

(方法) UV-B 照射後3日目のマウス血清を O' Farrell⁶⁾ の方法で2次元展開した後、ゲルを電気的にニトロセルロースメンブランに転写した。次いでシアル酸に特異的なレクチンであるMAM (ビオチン標識のもの) でメンブランを処理し、アビジン化ペルオキシダーゼを反応させた後クロロナフトールとジアミノベンチジンの2重染色を行った。スポットの同定はBaumann が1983年に発表した成績⁷⁾に突き合わせた。

(結果) 結果を図1に示す。

図1. UV-B 照射マウス血清のシアロ糖タンパクの2次元パターン



非照射の対象マウス血清および照射マウスの血清のシアル酸はそれぞれ 61.8 mg, 141.6 mg/100ml と照射によって2倍以上の上昇を示したサンプルを用いた。同定の可能で

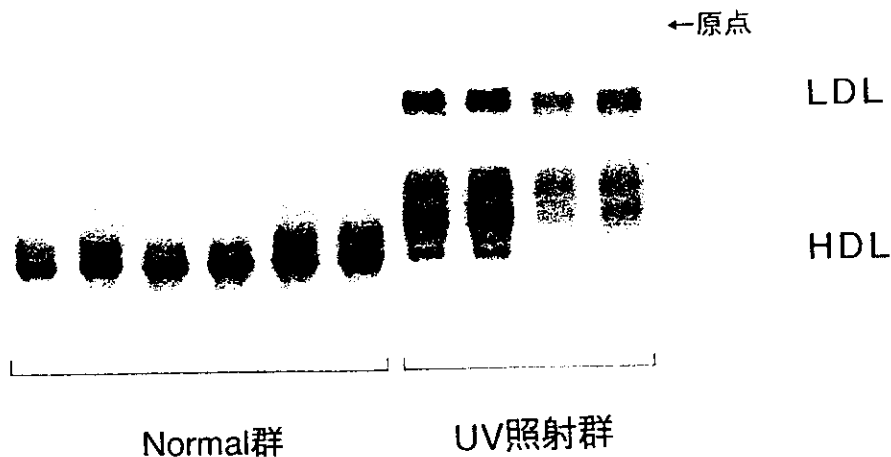
あったスポットを3つの大きい→(増加)と小さい→(減少)で示した。際立っていたのはヘモペキシシン(HPX)と β -ハプトグロビン(β -HG)の増加で、特に β -HGはデンストメーターで2,000倍以上の増加を示した。代表的なシアロ糖タンパクである α_1 AGPは330倍の増加であったことから、UV-B照射によるシアロ酸の増加は主に β -HGとHPXの増加に依存していることが判った。興味あることに減少するタンパクも見られ、その一つはアンチキモトリプシン(ACT)と同定された。

(2) UV-B照射によるマウスの血中リポタンパクの変動

(目的) 前述のヘモペキシシンやハプトグロビンの増加は肝機能の大きな変化を予測させる。他のタンパクにも変化が見られることが予測されたので、シアロ酸の染色で捉えきれなかったリポタンパクに焦点をあてた。

(方法と結果) 常法にしたがってマウスに紫外線(UV-B, 240 mJ/cm²)照射し、3日目に採血し、血清をアガロース電気泳動にかけた後コレテロール染色して解析した(図2)。

図2 UV-B照射マウス血清のリポタンパクのアガロース電気泳動パターン



高密度リポタンパク(HDL)は照射で移動度が遅くなりバンドも幅広くブロードに変化している。一方、低密度リポタンパク(LDL)は非照射マウスでは非常に薄いか殆ど見えないに等しいバンドであるが、照射によって図のように濃い(デンスな)バンドとして出現してくるようになった。

このような移動度の遅れが粒子サイズの違いなのか、荷電の違いなのか、を見るためにアクリルアミド電気泳動を行った。この条件では粒子サイズに依存して泳動することが判っている。結果はHDL, LDL共に移動度に全く変化は見られなかった(図省略)。したがって、アガロース電気泳動で見られた移動度の変化は、粒子サイズの違いでは無しに荷電の変化に基づいている、と結論づけられた。

以上はリポタンパクのタンパク成分の性状であるが、もう一つの構成成分であるリピド(コレステロール及びトリグリセライド)について分析した。血中の総コレステロール量は107, 116と殆ど変化が見られないのに対して、トリグリセライドは照射によって85から45.5と約1/2に大きく減少することが判った(表2)。

TG 減少の意味は不明であるが、LDL の大きな増加や HDL タンパクの性状の変化は生体にとって一種のリスク因子と考えられ、紫外線の新たな作用として無視できないと思われる。

表1 UV-B 照射による総コレステロール(TC)とトリグリセライド(TG)の変動

	N	TC (mg/dl)	TG (mg/dl)
Normal	6	107.1± 15.9	85.0± 24.9
UV-B	6	116.1± 12.1	45.5± 21.9*

Mean± SD * P<0.05

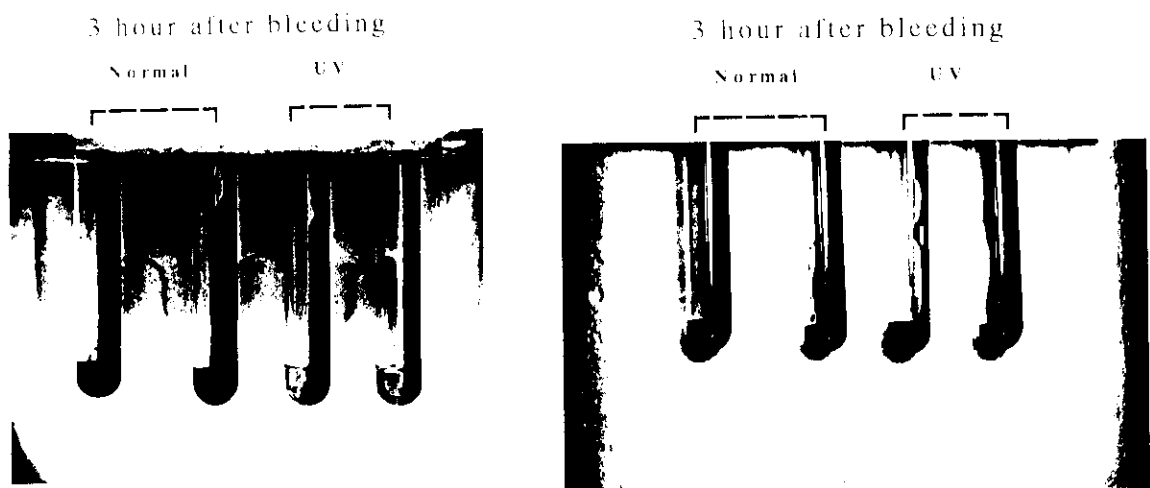
(3) UV-B 照射マウスの血液凝固性の促進

血液を取扱う実験の過程で UV-B 照射したマウスの血液は対象の非照射マウスに較べて有意に強い凝固性を示すことに気付いた。遺伝的に正常なマウスの場合（この実験では ddy 系を使用）血液凝固の進行状況を観察すると比較的速やかに凝固が始まるが、一部の血球はその後いつまでも凝固せずに残り、軽い衝撃または振動で一旦分離した清浄な血清に混合し再び濁った状態を呈する（図3 A Normal）。これに対し UV 照射マウスの血液は、残余の血球が殆ど無く完全に透明な血清の状態を示した（図3 A UV）。

図3 UV-B 照射による血液凝固性の促進

(A) 遺伝的正常マウス

(B) IL-6 ノックアウトマウス



この強い凝固性は1時間後の血清で既に見られ単に凝固の時間が速い、というよりは全ての血球を凝固させてしまうような質的な血液成分の変化が考えられた。

一方、遺伝的に正常なマウスでは UV-B 照射によって炎症性サイトカインである IL-6 が分泌されることをわれわれは既に報告しているが、IL-6 の遺伝子を欠損する IL-6 ノック

アウトマウスの血液凝固を見ると、血液を採血後静置3時間後でも対象の正常血液と全く変らなかった(図3B)。この事実はここでみられた血液凝固促進現象にIL-6が関与していることを示唆するものでありIL-6の直接作用なのか或いはIL-6が一連のサイトカインネットワークの1因子として作用しているのかが興味を持たれた。

またこの研究においては、凝固のどの段階での反応の促進かは明らかにすることが出来なかったが、UV-B照射によって誘導されたメディエーターが一連の凝固反応に関与する何れかの成分の分泌を促進していることが考えられ、今後の研究課題である。

[まとめ]

1. 全国の学童・乳幼児のツベルクリン反応(ツ反)の成績を緯度又は地域的に分類、分析した結果、全国の紫外線の年間照射量とツ反の陽性率との間には負の相関性のあることが判った。またポリオ及び風疹ワクチンでは陽性率および平均中和抗体価に有意差は見られなかった。

2. 実験室レベルでは紫外線照射がマウスのマラリヤ感染に強い影響を及ぼすことが確認された。マラリヤに感受性の系統においては照射によって感受性がより増強され、また抵抗性のマウスでも感受性を示すように変化した。その免疫学的背景は、照射によるIFN- γ 産生の低下にあることが判った。

3. 免疫・感染症の研究の過程で2、3の新しい知見が得られた。

照射によって血中のシアル酸が増加するがその本体は、ハプトグロビンとヘモペキシンであることが証明された。

照射を受けたマウスの血中リポタンパクはLDL及びHDLともに電気泳動的遅延とバンドの増加またはブロード化を示した。

また、照射を受けたマウスの血液は正常マウスに較べ血液凝固性が強く、速やかに凝固する性質を示した。

これらのことは紫外線照射が血液の多くの性状に大きな変化をもたらすことが一般的に起こっていることを示しているものと考えられ、光血液生理学(Photohematophysiology)というジャンルの確立を提唱したい。

[研究発表]

安元慎一郎、村上義之、堀嘉昭、単純ヘルペスウイルス感染培養ヒト表皮角化細胞からのインターロイキン-1 α 産生に対する紫外線照射の影響、西日本皮膚科、58(3): 444-446 (1996)

古谷崇子、川中正憲、亀岡洋祐、山本紀一、紫外線照射により誘導されるシアロ糖タンパクの種類について、第18回日本光医学・光生物学会(平成8年7月、前橋市)

山本紀一、貴堂としみ、近藤和夫、マウスの血中リポタンパクに対する紫外線照射の影響について、第19回日本光医学・光生物学会(平成9年7月、神戸市)

K. Yamamoto et al. Effect of UV-B irradiation on the lipoprotein in mouse plasma. *Photomedicine and Photobiology* 19:99-100 (1997)

K. Yamamoto, Furuya T, Kameoka Y., and Kawanaka M. Changes in serum levels of sialoglycoproteins in mice exposed to UV-B radiation. *Biol. Pharm. Bull.* 21(9):1000-1002 (1998)

山本紀一、伊東玲子、小浦美奈子、神山恒夫、感染症に及ぼす紫外線の影響 —マウスマラリヤを例として—、第20回日本光医学・光生物学会（平成10年7月、熊本市）

[文献]

1. 高橋 謙、川名一夫、大久保利晃他、生態学的・環境学的研究の暴露指標としての地域別有害紫外線UV-B量の推定、*JUOEH (産業医科大学雑誌)* 18(1):51-60 (1996)2.
2. S.Yasumoto, Hayashi, Y. and Aurelian L., Immunity to Herpes Simplex Virus Type 2, Suppression of Virus-Induced Immune Response in Ultraviolet B-Irradiated Mice. *J. Immunol.* 139:2788-2793 (1987)
3. S.Yasumoto, Moroi, Y., Koga T., et al. Ultraviolet-B irradiation alters cytokine production by immune lymphocytes in herpes simplex virus-infected mice. *J. Dermatol. Sci.* 8:218-223 (1994)
4. 山本紀一、紫外線の増加がヒトの健康に及ぼす影響に関する研究(2) 地球環境研究総合推進費平成7年度研究成果報告集、303-315 (1995)
5. K.Yamamoto, Takano K., and Yamamoto M. Increase of plasma sialic acid upon UV irradiated mice. *Biol. Pharm. Bull.* 18:917-919 (1995)
6. O'Farrell P.H., *J. Biol. Chem.*, 250:4007-4021 (1975)
7. Bauman H., Jahreis G.P., Gaines K.C., *J. Cell Biol.*, 97:866-876 (1983)