

A-4. 紫外線の増加が人の健康に及ぼす影響に関する研究
 (2) 紫外線による免疫機能等生体防御機能の低下に関する研究
 ① 病原微生物感染の影響促進

研究代表者	国立予防衛生研究所	山本紀一
厚生省 国立予防衛生研究所	ウイルス I 部 獣医科学部 細菌部 生物活性部 細菌・血液製材部	山本紀一 浅野敏彦 塚野尋子 鈴木和男 木ノ本雅通
研究協力機関	千葉大学医学部第一微生物学教室 日本医科大学微生物・免疫学教室	伊勢川直久 高橋めぐみ, 渡理英二
研究委託機関	九州大学医学部皮膚科学教室	堀 嘉昭, 安元慎一郎

研究期間 平成2年度～4年度
 平成2～4合計予算額 28,975 千円

[要旨]

紫外線による免疫低下とそれに基づく感染症拡大のリスクについて研究した。この分野は研究が緒に就いたばかりで方法論も確立しているとは云いがたいが、紫外線の免疫に対する影響の分野においては影響を受ける免疫機能の割り出しに務めた。その結果、ワクチン免疫においては極く弱い一過性の体液性免疫の抑制のあること、モルモットを用いて弱毒結核菌 (BCG) 感作による遅延型過敏症のUVによる抑制が検証できること、照射部位におけるインターフェロン産生抑制、等が確認された。またUV照射は強いサンバーンを引き起こすがその程度に応じて血中のシアル酸が上昇してくることが判った。

感染症拡大へのリスクを調べるアプローチとしては、In vitroにおけるウイルス感染と病原細菌の変異の問題を取り上げた。RNA型ウイルスの溶解型急性感染では宿主細胞の死と運命を共にし増殖拡大はみられなかったがDNA型のヘルペスウイルスで増殖性が増す場合のあることが確認された。更にEBウイルス持続感染系でウイルス遺伝子のDNAがUV-Bによって増幅された。仮性結核菌はUV-Cによって変異しその病原性を失ったがUV-Bにはその作用は見られなかった。

個体レベルへの感染に対する影響としてマウスのヘルペスウイルス (HSV) 感染系があげられる。免疫系の備わったマウスも予めUV照射しておくくとHSVに感染するようになり带状疱疹を形成した後最終的にヘルペス脳炎で死亡した。そのようなマウスにおいては表皮の抗原提示機能が低下しており、結果としてヘルペス特異な細胞性免疫の成立が低下していた。

[キーワード] UV-B、免疫機能低下、ウイルス遺伝子増幅、HSV感染症、血中シアル酸上昇

1. 序

オゾン層破壊による太陽紫外線の地上到達量の増加が危惧されているが、地球環境問題の中で紫外線による生物影響と云う問題がしめる位置づけとしては現在必ずしも確立されているとは云いがたい。幾つかの重要な影響、例えば皮膚ガンや白内障、日光過敏症等は既に現在の太陽紫外線量で引き起こされることが指摘されているものの、将来仮に紫外線量が増加した時、一体何が起こるか？ 現時点ではその全容は殆ど明らかにされていない、そのことが問題である。このプロジェクトの目指すものの一つに、この予想される影響（紫外線のヒトの健康に及ぼす影響）に対するリスク評価が大きく位置付けられる必要がある。

2. 研究目的

紫外線による免疫低下とそれに基づく感染症拡大のリスクについては具体的な影響例が少ないことから従来、体系的な研究は為されてこなかった。近年、オゾン層破壊が急速に進んだことによって近い将来紫外線の生体への影響が無視できなくなることが予測されるに至り、紫外線による免疫・感染症発症への影響に関する研究も次第に活発になってきたが、免疫に限ってみても現在なおある特定の免疫を切りだしてその機能低下を調べるといった段階で ” 体系的免疫ネットワークの紫外線照射による修飾 ” へのアプローチはまだまだ遠く、ましてやそれが感染症にまでどの様に影響してくるかという領域は白紙に近い。このプロジェクトにおける標題のテーマは、この空白部にできるだけ具体的な図式を描くことを目的としている。そのアプローチとして 1) 免疫機能、とくに感染症の発症により直接的に関与するとされる遅延型アレルギーやワクチンによる抗体産生、インターフェロン等免疫機能に及ぼす紫外線の影響を調べ、それを実際のウイルス感染等で実証できるよう方向づけをする。

2) 平行して、紫外線の In vitro での感染系に及ぼす影響についてウイルス感染を中心に調べる。

3) UV照射による免疫低下が感染拡大リスクに繋がることを具体的かつ総合的に明らかにするため、紫外線影響の Evidence が明白なマウスのヘルペスウイルス感染系をその方法論として位置づける。

3. 研究方法

[液性免疫産生に及ぼす紫外線の影響] : マウス (ddy ♀ 8週令) の背部 (又は腹部) を除毛 (電気バリカンと除毛クリーム) し露出皮膚を一晩環境に順化させて使用した。除毛翌日よりUVランプ (東芝FL20S・E 波長ピーク 314nm) を通常40cm距離 (0.065mW/cm²) で一日1時間連日照射した (230mJ/mouse 相当)。連日照射の過程で4群のマウス (1群4匹) のうち其々を1週間間隔で照射部位近傍の皮下に、インフルエンザウイルス自家ワクチン (280HA/mouse) を接種し2、3及び4週後の血中の抗HI抗体価を測定した。

[遅延型アレルギーの及ぼす紫外線の影響] : モルモット (350g ♀) の背部を約 6x14

(cm)に亘って脱毛した後、216mJの UV-B を3日に分けて照射し、4日目照射部位範囲内に100 μ gの BCGを皮内接種で感作した。1、2、3、4 週後にBCG接種部位とは異なる箇所を脱毛し、0.2 μ gの ツベルクリンを皮内接種し、24時間後に現れた発赤の長径と短径を測定した。

〔インターフェロン産生に及ぼす紫外線の影響〕： PCマウス(一部ICR使用)にUV-Bを230mJ/dayを3日間照射した。4日目にIFNの誘導剤 (Stimulator)を静脈内(iv)または 腹腔内(ip)、皮内 (ic) 何れかの方法で投与した後一定時間後に採血して IFN のサンプルとした。IFN の力価は L 細胞を用いた VSV の 50% ブラック減少法で常法にしたがって測定した。

〔ウイルス感染に及ぼす紫外線の影響〕： RNA型ウイルスとしてインフルエンザウイルス (IFV)、ウシ口内炎ウイルス (VSV)、RSウイルス (RSV)、DNA型ウイルスとして単純ヘルペスウイルス (HSV) を用いた。細胞はウイルスに応じて MDCK、HEp2、HMV-Iの3種類を用いた。ウイルス感染24時間～48時間前に一定時間UV照射を行いウイルス感染後は未照射で3日間培養し、増殖したウイルスを常法に従いブラック法で感染価を測定した。HSV については更に40.5℃下に置いた感染細胞を36℃へのshift-downする際、UV照射 (UV-C 2.5mJ/cm²)し24時間後のウイルス量を Vero細胞で測定した。

〔紫外線のウイルス遺伝子増幅作用の検索〕： In vitroの系としてEBウイルス持続感染細胞 (B95-8) またはウシパピローマウイルス持続感染細胞 (ID14) にUV-B又はUV-Cを一定条件で照射後3日後にDNA抽出を行い、EBウイルスについてはPCRを25サイクル行って未照射のDNAと比較した。パピローマウイルスについては得られたDNAを標識 VPV-1 DNA を用いたサザンブロット法で比較した。In vivo の系としてマウスの長期紫外線照射によって誘導される皮膚ガンが発達過程におけるマウスパピローマウイルスの遺伝子増幅を検索した。2300J/m² (1時間当たり)を連日照射し形成された皮膚ガンよりDNAを抽出しヒトパピローマウイルスをプローブとしてサザンブロット法により検索した。

〔紫外線照射によるマウスのヘルペスウイルス病原性の変化並びに特異免疫の変化〕： BALB/cマウス (6W ♀) の胸部の毛を刈り取り12～13J/m²のUV-Bを行い、2日後に単純ヘルペスウイルス (HSV) 1型を2.5×10⁴PFU皮内接種し2週間観察し皮疹の形成及び脳炎による死亡率をみた。また、同一照射、感染マウスのヘルペス特異免疫を ①耳介より調整した表皮細胞 (EC) の抗原提示能 ②脾及びリンパ節細胞の感作T細胞増加数 について常法に従って³H-チミジンの取り込み法で調べた。

〔病原細菌の紫外線照射による病原性の変異〕： 仮性結核菌を寒天プレート (選択培地) 上に接種してUV-C、UV-Bランプを其々に一定時間照射し、生育した変異菌のコロニーをカウントした。

〔血中シアル酸の測定〕： マウス (ddy ♀ 8週) の背部を除毛し翌日 UV-B ランプを照射 (230mJ/cm²)した。3日後に採血し血中のシアル酸を市販のキットで測定した。

4. 実験結果

(1) 紫外線の免疫毒性

[体液性免疫に及ぼす影響]

紫外線照射マウスにおけるIFV自家ワクチンの皮下接種によるHI抗体産生を表1に示す。マウスは接種前のみならず接種後も採血日まで連日UV照射した。

Table. 1 : Effect of sequential irradiation of UV-B ray on humoral immunity of mice.

UV-B irradiation	Immune periods					
	2W		3W		4W	
	UV	Cont.	UV	Cont.	UV	Cont.
1W	48 $\pm$ (9.2)**	40 $\pm$ (8.0)	64 $\pm$ (0)	36 $\pm$ (4.0)	ND	
2W	24 $\pm$ (2.3)	20 $\pm$ (5.6)	38 $\pm$ (2.0)	34 $\pm$ (5.0)	46 $\pm$ (10.5)	27 $\pm$ (5.0)
3W	52 $\pm$ (7.7)	50 $\pm$ (8.2)	100 $\pm$ (13.7)	72 $\pm$ (20.1)	36 $\pm$ (34.4)	56 $\pm$ (13.9)
4W	28 $\pm$ (4.0)	26 $\pm$ (4.3)	59 $\pm$ (23.2)	34 $\pm$ (4.3)	45 $\pm$ (9.6)	40 $\pm$ (8.0)

* Mean HI titer of 4 mice.

** Standard Error.

この結果マウスの体液性免疫産生能はUV-Bの長期間照射によって全く影響されないことが判った。これに反して照射直後の影響をみたところ、表2に示すように照射翌日のマウスで弱い抗体産生の抑制がみられた。

Table. 2 : Effect of short period irradiation on humoral immunity* of mice.

UV-B	Immune periods	
	3 W	4 W
-	6.5 $\pm$ 5.2**	8.0 $\pm$ 4.9
+	<2.8 $\pm$ 1.5	<3.5 $\pm$ 3.0

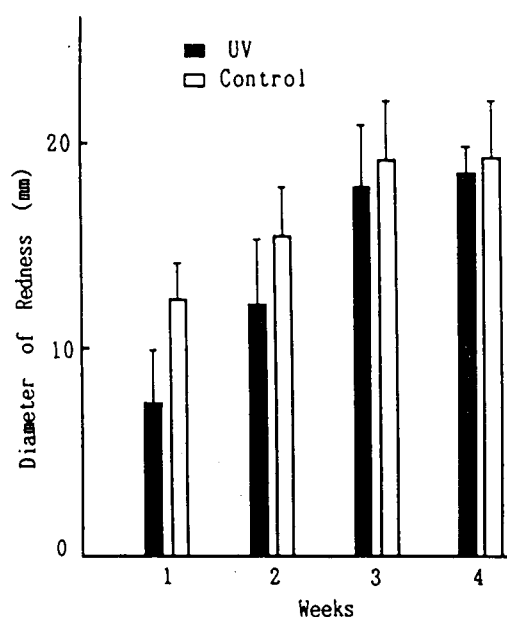
* Vaccinated at the next day of UV irradiation

** SE

[ツベルクリン反応を用いたDTHに及ぼす紫外線の影響]

BCGの検定に用いるモルモットの皮内反応を用いて紫外線のDTHに対する影響を調べた。UV-B照射したモルモットは1～2週という免疫(感作)段階で明らかに対象との間に発赤の縮小がみられた(図1)。しかし3週以降その差はみられなくなり照射モルモットにおいても対象と同等のDTH感作が成立することが判った。

Fig. 1. Effect of UV irradiation on DTH in guinea-pig sensitized with BCG



[インターフェロン (IFN) 産生系に及ぼす影響]

IFN α , β , γ についてまとめた結果を表3に示した。 β を誘導する poly I:C は一般的な腹腔内投与 (ip) で対象と差がないものの皮内投与 (ic) でUV照射マウスに有意のIFN産生抑制がみられた。 α , γ についてはこの実験 (静脈内投与 iv) では差はみられなかった。

Table 3 : In vivo IFN induction of UV-B irradiated mice.

Stimulus	Dose /mouse	route	Period (h)	Control	UV- irradiated	Type
NDV	300HA	iv	6	561 $\pm$ 115*	573 $\pm$ 210	α
polyI:C	300 μ g	ip	2	272 $\pm$ 130	113 $\pm$ 37	β
"	300 μ g	ic	6	921 $\pm$ 179	519 $\pm$ 60	β
PPD(ICR)	50 μ g	iv	4	1132 $\pm$ 820	410 $\pm$ 223	γ

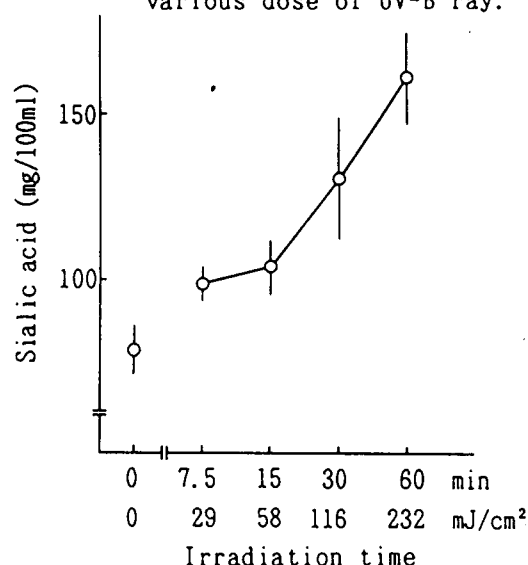
iv:intra venous ip:intra peritoneal ic:intra cutaneous

* Standard error

[UV照射による血中シアル酸の上昇]

マウスにUV-Bを照射するとサンバーンを引き起こす。このとき血中のシアル酸が上昇することが判った (図2)。上昇は照射した線量に依存し、また生じたサンバーンの程度と一致することから、この方法を使用することによってマウスの受けた実効照射量を算定することへの道が開けた。

Fig. 2 Plasma sialic acid increase in mice exposed with various dose of UV-B ray.



(2) -① ウイルス感染に及ぼす紫外線の影響

[溶解感染系 (細胞レベル) への影響]

RNA型ウイルスとして用いた3種類のウイルス (IFV, VSV, RS) はいずれも宿主細胞のUV照射による細胞死に従属してウイルス増殖も低下した (成績省略)。DNA型として用いたヘルペスウイルス (HSV) は単純な溶解感染系ではRNA型同様ウイルス産生は低下したが持続感染系のモデルとされている高温培養系ではシフトダウンによるウイルス誘発の補助因子としてUV照射を行ったところウイルス誘発量は増加する傾向を示した (表4)。

Table. 4 Effect of UV irradiation on HSV-2*¹
induction in L929 cells

UV* ²	Shift down* ³	Virus production (PFU/plate)	Positive rate (%) of 8 dishes
No	No	0.0	0
No	Yes	2.4	50
Yes	Yes	10.0	100

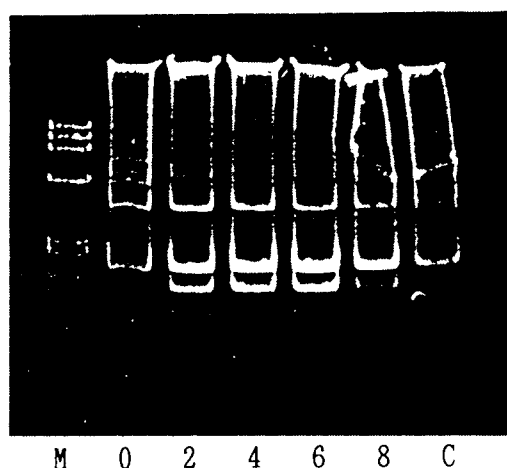
*1 HSV-infected L cells were kept at non-permissive temperature (40.2℃)

*2 UV-C 2.5mJ/cm²

*3 36.0℃

[紫外線照射によるウイルス遺伝子の増幅・活性化]

EBウイルス持続感染細胞 (B95-8) のUV-C照射がウイルスDNAを増幅させることが予備実験において確かめられたので、UV-Bによる本実験を行った。感度の良いPCR法で増幅の有無を調べたところ、UV-B 2.0mJ/cm²以上の照射でウイルス遺伝子は5～10倍に増幅されることが判った(図 3)。一方、既に報告のあるパピローマウイルスはβアクチンを内部コントロールに用いたサザンブロット法により詳しく調べたが In vitro (持続感染細胞)、In vivo (皮膚ガン) のいずれにおいてもウイルスDNAの有意の増加は確認されなかった(成績省略)。



M : Marker
0~8 : mJ/cm²
C : Positive Control

Fig.3 Amplification of EB virus
DNA by UV-B irradiation.

(2) -② 感染症分野に於ける紫外線の変異原性について

[病原細菌に対する変異原としての紫外線]

感染症との関連で問題となるのは UV 照射による病原性の変化である。仮性結核菌に UV-B、UV-C を照射してこの菌の持つ病原性プラスミド上の遺伝子に起こる変異を調べた。UV-C では菌 10⁷個に 17mJ/cm²線量を照射した時、生き残った10個の菌のうち1個に変異が起こっていた。自然界での変異率は 10⁻⁷~10⁻⁸であるので、この条件では約 10⁶~10⁷倍の変異率となる。これに対して UV-B は菌の生存が全くみられなくなるまで線量をあげて行っても変異株の出現はみられなかった。

(3) 個体レベルのウイルス感染に対する影響

[マウスのヘルペスウイルス感染病理に及ぼす紫外線照射の影響]

免疫系の備わっているBALB/Cマウス等は通常皮内接種部位のびらんに留まりやがて治癒してしまいが、このマウスをUV-B前照射しておくともヌードマウスでみられるような帯状皮疹が形成されることが判った。この帯状皮疹の形成はUVの照射量に依存し 134mJ照射で皮疹形成率は60%(3/5)、336mJでは100%(5/5)のマウスに皮疹形成がみられ、このマウスは2週間以内にヘルペス脳炎で全例死亡した(表 5)。

この免疫学的背景を解るため表皮内の免疫担当細胞の抗原提示能及びヘルペス特異Tリンパ球の感作程度、について測定した。その結果360mJ/cm²の照射では抗原提示能は対象の40%、即ち紫外線照射によって60%もの抗原提示活性の抑制がみられた(表 6)。一方その様なマウスにおけるTリンパ球の感作の程度を調べてみると 表 7(130mJ照射実験成績)に示すようにリンパ節のT細胞で68.2%(32%の抑制)、脾臓のT細胞のカウントの取り込みは対象の22.0%で実に 80%もの分裂能の低下が確認された(表 7)。

Table. 5
Effect of UV irradiation on HSV-2 disease in mice.

UV-B (mJ/cm ²)	HSV-2	No. with Z. L. * /Total	No. of Dead /Total
-	+	0/5	0/5
134	-	0/5	0/5
134	+	3/5	0/5
336	-	0/5	0/5
336	+	5/5	5/5

* Zosteriform lesion

Table. 6 Antigen presenting capacity of epidermal cells (EC) and its reduction by in vivo exposure to UV-B ray.

Accessory cells (EC)	UV (mJ/cm ²)	HSV Ag	³ H-TdR incorpora- tion(cpm±SD)	reconsti- tution (%)
-	-	+	1649±398	
+	0	+	7808±510	100.0
+	120	+	5052±380	65.0
+	360	+	3086±192	40.0

Table. 7 Effect of UV-B irradiation* on HSV diseases and lymphocyte response.

UV-B	HSV	No of mice with zosteriform lesion	Incorporation of ³ H-thymidine	
			Lymph node	Spleen
-	+	0/5	21,191±3,384**	16,566±2,358
+	+	3/5	14,467±3,005	3,638±339

* 135 mJ

** cpm ± SD

5. 考察

〔体液性免疫に対する影響〕

ワクチン免疫接種前1週間以上のUV-B照射は殆ど抗体産生に影響しなかった。このことは抗体産生に影響が出るとしても一過性でそれは1週間以内に回復すること、及び一度感作された抗体産生細胞は紫外線照射下においても正常に抗体を分泌することを示している。事実短日照射をみた実験から照射翌日に弱い抗体産生低下がみられた。

〔DTHに対する影響〕

DTHは紫外線の影響を受ける最も代表的な免疫系の一つでその影響の出方は局所にとまらず全身系を介して作用が出ることが知られている。しかし、これまでの研究の殆どはピクリルクロライド等の薬剤を用いた接触過敏症を用いて為されたものであった。今回我々の用いた方法は弱毒生ワクチンであるBCGの国家検定で用いられている方法をそっくり採用した点で、よりナチュラルな遅延型過敏症をみていると考えられる。結果に示した如く、紫外線照射は免疫成作1～2週のモルモットでツ反の発赤を有意に低下させた。しかし3週以降は対象と差がなくなった。このことはモルモットのUV照射ではT_Hリンパ球のBCGに対する感作が対象より遅れて成立する傾向があることを示した。

〔INF産生系に及ぼす影響〕

INFの α と β は強い抗ウイルス活性を持ちウイルス感染と大きな関わりを持っている。またINF- γ はサイトカインとしての活性が強く免疫ネットワークに強い影響力を持っている。INF- β がpoli I:Cの腹腔内投与で照射群と差がみられなかったのに対し照射部位付近の皮内接種で有意の差がみられたことはINF産生系に対して紫外線は局所影響を持っていることを意味している。INF- α と γ で有意の差がみられなかったことはこの投与方法がUVの影響を受けにくい全身性投与出あることと関連ある可能性が強く α 、 γ も投与ルートによっては照射の影響を受けることが予測される結果が得られた。

〔UV照射による血中シアル酸の上昇〕

血中シアル酸の意義はこれまで不明であったが、ごく最近、白血球の炎症部位への定着を阻止するフィードバックインヒビターとの仮説が出され免疫ファミリーとして認められつつある。また、血中シアル酸の由来が肝と考えられることから、UV-B照射を受けた結果表皮で起こった生理的变化の情報を肝に伝えるmediatorが存在するはずで、それが免疫ファミリーであるサイトカインである可能性も高く、その場合にはその作用はたんに肝臓にとどまらず多くの免疫機構に影響を与えているものと考えられる。

〔持続感染細胞系のウイルス遺伝子の増幅〕

B95-8細胞はごく少量のウイルスを産生し続けているEBウイルス持続感染細胞である。この細胞にUV照射すると、UV-CのみならずUV-Bによってもウイルス遺伝子のDNAは大幅に増幅されることが判った。ウイルス遺伝子そのものの紫外線による増幅例は極めて少なく、EBウイルスのほか

ID-14細胞を用いたパピローマ等の報告がみられるが、何れも短波長のUV-Cを用いた実験であり、我々の成績のようにUV-Bを用いてウイルス遺伝子の増幅が確認された例は今回が初めてである。UV-Bによる遺伝子増幅のメカニズムは今後の課題であるがウイルス遺伝子DNAに対してはUV-Cと本質的に同一の可能性が強い。

〔マウスのヘルペスウイルス感染病理に及ぼす影響〕

個体（マウス）レベルのUV照射は表皮の免疫担当細胞（EC）の抗原提示能をUV線量に応じて低下させることが判った。この結果ヘルペスに特異的な細胞性免疫の成立が不十分となりヘルペスウイルスの増殖が防御されにくくなる。最終的には帯状皮疹の形成とそれに続くヘルペス脳炎という眼に見える病理変化として現れるものと考えられた。この帯状皮疹形成とヘルペス性脳炎を指標とした実験系は個体レベルに対する紫外線の影響を評価するうえで格好のモデルと位置づけられる。

6. まとめ

過去3年間における紫外線の免疫・生体防御機能への影響と感染症への関わり方を表にまとめた。＋は影響あり、－は影響の殆どみられないことを示す。

		UV-C	UV-B
In Vitro	Bacteria の変異（病原性）	＋	－
	RNAウイルスの増殖性（急性感染系）	－	－
	DNAウイルスの増殖性（高温培養系）	＋	ND
	ウイルス遺伝子の増幅		
	（EB virus）	＋	＋
	（papilloma virus）	－（追試不可）	ND
In Vivo	体液性免疫		抗原の投与ルートに依り＋
	細胞性免疫（遅延型アレルギー）		＋
	非特異生体防御因子（インターフェロン産生）		局所＋、全身－
	感染系（マウスのヘルペスウイルス感染）		
	局所の免疫機能		＋
	全身影響		＋
	発症の促進作用		＋
	代謝機能？（血中シアル酸の上昇）		＋

7. 研究発表の状況

報告 安元慎一郎, 単純ヘルペスウイルス感染と皮膚紫外線照射
ーサイトカイン (IFN- α , IL-2, IL-4) 産生に及ぼす影響ー,
第39回日本ウイルス学会総会, 福岡, 1991年10月

畑 滋、石丸さゆり、小浦美奈子、木村博久、山本紀一, 紫外線照射によるマウスの
血中シアル酸の変動, 第14回 日本光医学・光生物学会, 東京, 1992年7月

論文 Hata, S. et al.: Photomedicine and Photobiology, 14 : 121~124, 1992