The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ヘルペスウィルス感染に及ぼす活性酸素の影響に関する研究
Author(s)	有本, 絵美子
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46423
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【9】

氏　　名	有本　絵美子（ありもと　えみこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　２０２１０　号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学　位　論　文　名	**ヘルペスウイルス感染に及ぼす活性酸素の影響に関する研究**
論文審査委員	（主査） 教　授　由良　義明 （副査） 教　授　村上　伸也　　助教授　川端　重忠　　講　師　森本　佳成

論文内容の要旨

【目的】

口腔領域で頻度が高い単純ヘルペスウイルス（HSV-1）感染病変では、上皮細胞の変性に加えて炎症性細胞浸潤がみられる。また、細菌感染や物理的要因で惹起される炎症によって HSV-1 感染病変の増悪をみることもある。炎症性浸潤細胞の中で多形核白血球やマクロファージは、$O_2^{\cdot -}$、$HO^{\cdot}$、過酸化水素（H_2O_2）などの活性酸素を産生して抗菌作用を示すが、一方で組織傷害も引き起こす。また、H_2O_2 は歯科治療において口腔内で使用されることも多い。したがって、口腔粘膜の HSV-1 感染細胞はこれら炎症で発生する活性酸素や外部から持ち込まれる活性酸素に曝される状況下にある。

活性酸素が細胞傷害性を発揮する際には、細胞内の Ca^{2+} をセカンドメッセンジャーとするシグナル伝達系が活性化されることが知られている。また、HSV-1 を含む多くのウイルス感染によって細胞内カルシウムイオン濃度（$[Ca^{2+}]i$）に変動をきたすことも報告されている。したがって、ウイルス感染細胞に活性酸素が作用した場合にも、$[Ca^{2+}]i$ は影響を受けるものと推察されるが、この点を明らかにした報告はまだみられていない。そこで、本研究ではウイルス感染が酸化ストレスによってどのような修飾を受けるかを明らかにするため、活性酸素として H_2O_2 を用いて HSV-1 感染サイクルの最終段階に相当するウイルス放出過程と $[Ca^{2+}]i$ に及ぼす影響について検討を行った。

【材料と方法】

細胞として、ヒト口腔扁平上皮癌由来の FI 細胞、サル腎由来 Vero 細胞を用いた。ウイルスは HSV-1 の野生株である KOS 株を用いた。ウイルス感染力価は Vero 細胞でのプラック形成法にて測定した。培養液分画と細胞分画の調製では、HSV-1 感染細胞を H_2O_2 で処理したのち細胞を増殖させたプレートを遠心し、その上清を培養液分画として回収した。残りのプレートに培養時と同量の培養液を加えて凍結融解後遠心し、上清を細胞分画として回収した。$[Ca^{2+}]i$ 測定では、Ca^{2+} 感受性蛍光色素 fura-2/AM で細胞を標識したのち、AQUACOSMOS ratio imaging application software と倒立蛍光顕微鏡を用い細胞単位で $[Ca^{2+}]i$ を測定した。死細胞の算定にはトリパンブルー細胞分染法を用いた。アポトーシスによる sub-G1 細胞を検出するため、エタノールで固定した細胞を propidium iodide にて染色したのち flow cytometry（FCM）解析を行った。細胞径の測定は、単一に分散させた細胞を FCM にて解析した。細胞の超微構造ならびにウイルス粒子は、単層に増殖させた細胞をその位置で固定しエポン樹脂包埋したのちディッシュ底と平行に薄切した切片を作製し、透過型電子顕微鏡にて観察した。

【結果】

1. FI 細胞に HSV-1 を感染多重度（MOI）2で感染させ、18 時間後から各種濃度の H_2O_2 で2時間処理した結果、0.5 mM 以上の濃度で培養液分画のウイルス量は増加した。1 mM、5 mM で増加がより顕著となった。細胞分画のウイルス量に著明な変化はみられなかった。

2. 1 mM H_2O_2 で HSV-1 感染細胞を処理し$[Ca^{2+}]i$ を測定した結果、$[Ca^{2+}]i$ の一過性上昇とその後の持続的上昇が認められた。感染細胞をカルシウムキレーターである EGTA、1,2-bis(beta-aminoethyl ether)ethane-N',N',N',N'-tetraacetic acid（BAPTA）あるいは quin-2 で前処理すると、この $[Ca^{2+}]i$ 上昇は抑制された。

3. HSV-1 感染細胞をカルシウムキレーターで前処理し、その後 1 mM H_2O_2 を2時間作用させた場合、H_2O_2 による培養液分画のウイルス量の増加は抑制された。

4. HSV-1 感染細胞を 1 mM H_2O_2 で2時間処理すると死細胞数が増加した。この場合もカルシウムキレーターの前処理で死細胞数の増加は抑制された。

5. 細胞死の形態として、細胞萎縮を生じるアポトーシスと細胞の膨化をきたすオンコーシスが知られている。HSV-1 感染細胞を 1 mM H_2O_2 で2時間、24 時間処理し FCM 解析を行ったところ、sub-G1 はみられなかった。細胞径の FCM 解析では、径の増大はなく断片化し縮小した細胞が認められた。

6. 1 mM H_2O_2 で2時間処理した HSV-1 感染細胞を電子顕微鏡で観察したところ、核に大きな変化はなく、細胞間隙の拡大と細胞膜の部分的断裂像が認められた。細胞間隙に蓄積したウイルスは減少し、細胞表面からはウイルスの漏出がみられた。

【考察と結論】

HSV-1 感染細胞を H_2O_2 処理すると培養液分画のウイルス量が顕著に増加することから、H_2O_2 にはウイルス放出を亢進させる働きのあることが明らかとなった。この H_2O_2 の効果は、カルシウムキレーター前処理で $[Ca^{2+}]i$ 上昇を抑制すると失われるため、Ca^{2+} がセカンドメッセンジャーとして働くと考えられた。また、H_2O_2 による細胞死は核の断片化を伴わないウイルス複製にとって有利なものであった。以上より、H_2O_2 は HSV-1 感染細胞において Ca^{2+} シグナル伝達系を活性化させ、細胞膜断裂を特徴とする細胞死を引き起こし、ウイルス放出を促進するものと示唆された。HSV-1 感染部に存在する活性酸素は、産生ウイルスの細胞外放出亢進を通じて病変の増大や感染伝播に貢献するものと思われる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、単純ヘルペスウイルス1型（HSV-1）感染に及ぼす活性酸素の影響を検討したものである。

その結果、HSV-1 感染上皮細胞において H_2O_2 が細胞内カルシウムイオン濃度（$[Ca^{2+}]i$）の上昇を介して細胞死を誘導し、細胞外へのウイルス放出を促進することが明らかとなった。

以上の結果は、活性酸素による HSV-1 の細胞外放出亢進において $[Ca^{2+}]i$ が重要な役割を果たすことをはじめて明らかにしたものであり、博士（歯学）の称号を与えるに値するものと認める。