

# 上気道感染症ウイルス（ライノウイルス）の感受性と運動

東北大学大学院 永 富 良 一

## Exercise and Susceptibility to Human Rhinovirus Infection

by

Ryoichi Nagatomi

*Laboratory of Health & Sports Science,*

*Tohoku University Graduate School of Biomedical Engineering*

### ABSTRACT

Common cold symptoms are often mild and self-limited, but for competitive athletes even mild and self-limited symptoms may critically compromise their performance. Human Rhinovirus (HRV) is one of the most common causative viral agents for common cold symptoms. HRV type 14 (HRV-14) is known to replicate efficiently in human fibroblasts cultivated at 33 degrees and induces cytotoxicity but not at 37 degrees. In an attempt to elucidate the cellular mechanism by which HRV-14 prefers colder temperature, DNA microarray analysis was performed to compare the expression profiles of mRNA in HRV type 14 infected human fibroblastic cells cultured at 37 degrees and 33 degrees. Inhibitor of apoptosis protein (IAP) was found to be up-regulated at 37 degrees but not at 33 degrees. HRV-14 replicated and induced cytotoxicity in HRV-14 infected fibroblastic cells cultured at 37 degrees after knockdown of IAP by siRNA. Cellular temperature is thus important to protect cells from HRV induced pathogenesis. Those with lower upper respiratory tract surface temperature may be at a higher risk of HRV infection, and exercise induced lowering of upper respiratory airway may render the epithelial cells susceptible to HRV infection, which needs further to be determined.

## 要 旨

カゼ症候群は一般に軽症で自然治癒するが、多くの競技選手にとっては軽症といえども競技能力に重大な影響を及ぼす可能性がある。ライノウイルス (Human Rhinovirus; HRV) はカゼ症候群の原因のうちもっとも一般的なウイルスである。そのうちHRV 14型は33℃の培養繊維芽細胞で効率よく複製し細胞傷害を起こすが、37℃では複製も細胞傷害も起こらない。なぜ低温で細胞傷害が起こるのかを明らかにするために33℃と37℃でHRV-14に感染した繊維芽細胞のmRNAの発現プロフィールの比較を行った。その結果37℃では誘導されるアポトーシス抑制因子IAPが33℃では誘導されないことがわかった。37℃の繊維芽細胞のIAPをノックダウンしてHRVを感染させたところ37℃でもHRVの複製と細胞傷害が起こった。したがってIAPは37℃前後の温度環境ではHRV感染時に細胞保護的に働いていることが明らかになった。上気道表面温度には個人差があるが、低温の場合はHRVの感受性が高くなる可能性がある。また運動後には上気道表面温度が低下することが報告されていることから一時的にHRVの感染感受性が高くなる可能性がある。いずれの可能性も今後さらに検討が必要である。

## 緒 言

カゼ症候群は一般に軽症で経過し自然治癒する上気道感染症の総称である。しかし軽症とはいえ国内外の選手権レベルの競技会あるいは進学・就職のための試験・面接などの時にはカゼといえども、人生を左右しかねない状況を招くことがある。根治療法ではないにも関わらず症状の緩和を目的とした総合感冒薬の我が国での年間売り上げが数百億円に上っていることはその反映である。したがって軽症のカゼ症候群といえどもその予防対策は健康科学・体力科学・公衆衛生学上の重要な課

題である。

カゼ症候群の原因の80～90%はウイルス感染であると考えられている。そのうち成人が初秋に罹患する急性上気道感染症のおよそ3分の2はライノウイルス (Human Rhinovirus : HRV) が原因になっている<sup>1)</sup>。HRV感染症は、成人の場合、上気道粘膜における炎症症状、すなわち、咽頭痛、鼻づまり、くしゃみ等が主徴になるいわゆるカゼ症候群を起こす。多くの場合軽症のうちに治癒するが、活動性や意欲などの健康関連QOLが有意に低下することが知られている<sup>2)</sup>。

実験的にHRVを健常人に投与し、発症および症状経過を追跡する研究の結果HRVの罹患は心理社会的な要因に左右されることが知られている<sup>3-8)</sup>。興味深いことに1ヶ月以上にわたるストレス状態は発症率の増加に関連していた<sup>9)</sup>。しかしなぜストレスや心理社会的要因が感染感受性に関連するかそのメカニズムは明らかになっていない。免疫系の感染感受性への関連も検討されているが、ライノウイルスに対するNatural Killer (NK) 活性や血中のリンパ球サブセット (CD3+, CD19+, CD4+, CD8+, CD16+/CD56+) は発症や重症度とはなんら関係がみられていない<sup>9)</sup>。

HRVの罹患率は外気温の低下する秋期に増加しはじめる<sup>1)</sup>。HRVには100種類以上の血清型があることが知られているが、一部のHRVは33℃前後の低温で培養した感染培養繊維芽細胞において37℃に比べてより効率よく増殖する<sup>10)</sup>。このことは外気に暴露され常に深部体温より低い温度環境におかれている上気道へのHRVの親和性の原因の一つとして考えられている。われわれは疲労困憊にいたる自転車エルゴメータによる漸増負荷による運動後には上気道表面の温度が32℃程度まで低下することを報告している<sup>11)</sup>。しかしなぜ低温環境がHRVの細胞内増殖を有利にするのかそのメカニズムは明らかになっていない。そこで本研究では細胞レベルでなぜ低温環境におい

てライノウイルスが細胞障害性を発揮するのかを明らかにすることを目的とした。

## 1. 実験方法

### 1. 1 細胞培養

細胞はヒト胎児肺由来線維芽細胞である MRC-5 (財団法人ヒューマンサイエンス研究資源バンク, 大阪) を用い, 増殖速度が低下しない継代数 35 代以内の細胞を実験にて使用した。線維芽細胞は 10% FBS (Fetal Bovine Serum) 添加 DMEM (Dulbecco's Minimum Essential Medium: Sigma-Aldrich, St Louis, MO) 培地を用い, 75cm<sup>2</sup> 培養フラスコにて 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 濃度のインキュベーターで培養した。継代培養はおよそ一週間で単層になっていることを確認したのち, フラスコ内の培地を除去し, PBS (Phosphate Buffered Saline) で 3 回洗浄した。その後 0.25% Trypsin-0.1% EDTA (Sigma) 溶液を加えて 2 分間 37℃ で反応させた後, 10% FBS 添加 DMEM 10ml を加え, ピペッティング操作で細胞をフラスコ底面からはがした。細胞浮遊液は細胞数 5 × 10<sup>4</sup> cells/ml に調整し, 75cm<sup>2</sup> 培養フラスコに分注し引き続き 37, 5% CO<sub>2</sub> の条件下で継代培養した。一部は 25 cm<sup>2</sup> フラスコあるいは 24 穴培養プレートに培養し, 以下の実験に供した。

### 1. 2 ヒトライノウイルス (HRV)

ウイルスは旧国立仙台病院沼崎義夫博士から分与されたヒトライノウイルス (HRV) 14 型を使用した。実験に用いた HRV は, 保存してあった HRV を 25cm<sup>2</sup> フラスコで培養してある線維芽細胞の培養上清を除去し, 新鮮な 10% FBS 添加 DMEM 5ml を加え, さらに HRV 溶液を添加し 33℃, 5% CO<sub>2</sub> で培養を行い, 単層で覆った線維芽細胞が 100% 傷害された状態のものを HRV 原液として使用した。HRV 原液は実験期間内に同じロットのものを使用できるように分注し, 使用

時まで -80℃ に保存しておいた。

### 1. 3 逸脱乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性測定による HRV の線維芽細胞傷害効果の定量的評価

継代時に線維芽細胞浮遊液を 1 × 10<sup>5</sup> cells/ml に調整した。細胞浮遊液は 96 穴平底培養プレート 2 枚に, 各 well 当たり 0.1ml 播種し, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。HRV による細胞傷害効果測定時には, 各ウェルに新鮮な 10% FBS 添加 DMEM 90 μl を加え, さらに凍結保存しておいた HRV 原液を希釈した HRV 溶液または新鮮培地を各 well に 10 μl ずつ分注した。さらに, 37℃ あるいは 33℃, 5% CO<sub>2</sub> 下で 5 日間再培養した。HRV と共培養 3~5 日目に, 位相差顕微鏡下で細胞の変性を確認したのちに培養上清 50 μl を回収し, 細胞傷害時に培養上清中に逸脱する乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性を測定することによって細胞障害効果を評価した。

HRV を添加していないウェルの培養上清を低コントロール, 上清回収 30 分前に HRV を添加していないウェルに最終濃度 1% の Triton-X-100 (Sigma-Aldrich) を加え細胞を完全に変性させたウェルの上清を高コントロールとした。感染 3~5 日目の培養プレートの各 well から測定用の 96 穴平底培養プレートに, 培養上清を 50 μl ずつ各 well に移し, CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay キット (Promega, Madison, WI) を用い, LDH 酵素活性を測定した。ELISA リーダーで LDH 活性に相当する波長 490nm (対照波長 630nm) における吸光度を測定した。得られた吸光度を以下の式に代入し, 細胞傷害効果を求めた。

$$\text{細胞傷害効果\%} = \frac{\text{測定値} - \text{低コントロール}}{\text{高コントロール} - \text{低コントロール}} \times 100$$

#### 1. 4 マイクロアレーによる mRNA の発現 プロフィールの解析

異なる温度環境が HRV の細胞傷害効果に及ぼす影響を mRNA レベルで明らかにするために、33℃および37℃で培養を行い単層コンフルエントになった繊維芽細胞に HRV の  $10^4$  倍希釈液を添加し、2 時間後に RNeasy キット (QIAGEN, Valencia, CA) を用いて RNA の抽出を行った。混入 DNA の DNaseI (QIAGEN) 処理後に RNA 濃度を定量し各試料の RNA  $1\mu\text{g}$  から逆転写キット Rever Tra Dash (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて相補的 DNA (cDNA) を作成した。人全ゲノム cDNA マイクロアレー (Agilent, Santa Clara, CA) を用いて 33℃と 37℃で発現レベルに差がある mRNA のスクリーニングを行った。すなわち cDNA の蛍光ラベルを Agilent 社の指示通り行った後に共焦点レーザーキャナー ScanArray 4000 (Packard BioScience BioScience, Meriden, CT) にてアレー各スポットの蛍光強度を測定した。データは ArrayVision (Imaging Research, Ontario, Canada) にて解析を行った。

#### 1. 5 RNA 干渉 (siRNA) による IAP ノック ダウン

マイクロアレー解析においてアポトーシスに関連する遺伝子のうち Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP) の siRNA 用オリゴ RNA は北海道システムサイエンス (札幌, 日本) より購入した。繊維芽細胞への遺伝子導入は 6 穴培養プレートに単層 50-60% コンフルエントの状態で行った。コントロール siRNA あるいは IAPsiRNA  $6\text{nM}$  を OptiMEM 培地 (Invitrogen, Carlsbad, CA) に溶解し、リポフェクタミン 2000 (Invitrogen) を用いて細胞に導入した。

ノックダウンの確認は siRNA 遺伝子導入後ただちに至適濃度の HRV を感染させ、感染 2 時間後に Reverse Transcription Polymerized Chain

Reaction (RT-PCR) 法により IAP mRNA の有無を確認した。対照として HRV 非感染細胞に siRNA 配列の導入を行ったものを用いた。mRNA は ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を用いて抽出精製し、直ちに逆転写キット Rever Tra Dash (Toyobo) を用いて cDNA を合成、PCR は Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) を含む反応液  $25\mu\text{l}$  に template cDNA  $1\mu\text{l}$  を加え遺伝子増幅を行った。増幅条件は  $95^\circ\text{C}$  1 分、 $37^\circ\text{C}$  1 分、 $72^\circ\text{C}$  1 分であった。増幅産物は 1.5% アガロース電気泳動を行い、Ethidium Bromide で染色し、UV トランスルミネータを用いて可視化した。

#### 1. 6 HRV-RNA の定量

HRV 感染 72 時間後の繊維芽細胞内の HRV-RNA を定量するために D-LUX<sup>TM</sup> プライマー (Invitrogen) を用いて定量的 RT-PCR を行った。HRV-14 特異的蛍光プライマーは Invitrogen 社のオンラインプライマーデザインサービス D-LUX<sup>TM</sup> Designer (<http://escience.invitrogen.com/lux/>) にて配列を決定した。コントロールにはヒト GAPDH プライマー (Invitrogen) を使用した。PCR は Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) を含む反応液  $50\mu\text{l}$  に template cDNA  $1\mu\text{l}$  と  $100\text{nM}$  の各プライマーを加え遺伝子増幅を行った。蛍光量の測定および定量は ABI Prism 7700 (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) を用いた。増幅条件は各サイクル  $50^\circ\text{C}$  2 分、 $95^\circ\text{C}$  2 分、及び 45 サイクルの  $95^\circ\text{C}$  15 秒  $60^\circ\text{C}$  30 秒であった。 $37^\circ\text{C}$  で HRV14 を感染させた MRC-5 から抽出した全 RNA の 10 倍希釈液を作成し、希釈倍と蛍光の最小検出サイクル (サイクル閾値) による標準曲線を作成し、GAPDH mRNA の発現量で除して標準化を行った。

#### 1. 7 統計処理

得られた測定値から平均値及び標準偏差を求め

た。培養上清による細胞傷害抑制活性は、ANOVAにより検定を行い、有意差があればTukey法によるpost-hocテストを実施した。危険率5%未満をもって有意とした。

## 2. 研究結果

### 2. 1 HRVの線維芽細胞傷害効果に及ぼす培養温度の影響

ヒト胎児肺線維芽細胞株にHRVを感染させ、33℃あるいは37℃でさらに5日間培養した後、細胞傷害効果を測定した結果を図1に示した。37℃においてHRVは、広い濃度範囲において線維芽細胞をほとんど傷害しないのに対して、33℃においてはHRVの濃度依存的に線維芽細胞が傷害されることがわかった。すなわち37℃ではほとんど細胞傷害が認められず、33℃において濃度依存的に傷害効果が高まった。

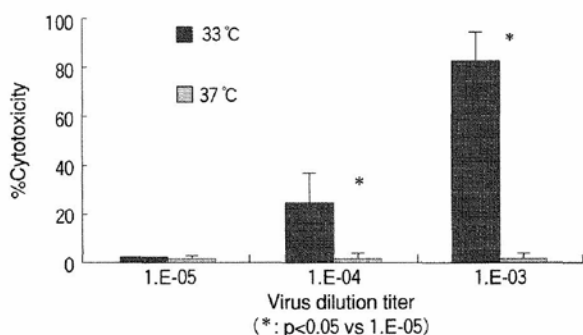


図1 HRVの線維芽細胞傷害効果と培養温度  
各希釈倍のHRV14を感染させた培養温度条件の異なる線維芽細胞72時間後の培養上清中のLDH活性を測定。データは5ウェルの平均±標準偏差を表示。統計分析は2way-ANOVAとTukey法によるposthoc testを実施した。

### 2. 2 DNAマイクロアレーによるmRNAの網羅的解析

33℃および37℃の異なる温度環境がHRVの細胞傷害効果に及ぼす影響をmRNAレベルで明らかにするために、33℃および37℃で培養をしている線維芽細胞に $1 \times 10^3$ 倍希釈したHRVを感染させ2時間後に抽出したmRNAを人全ゲノム約41000種類の遺伝子をスポットしたDNAマイク

ロアレーを用いて発現レベルの違いを比較した。その結果、37℃ではHRV感染時に細胞障害に関連するアポトーシス制御因子であるIAPが2.55倍増加しているのが認められた。RT-PCRにて確認すると、HRV非感染状態あるいはHRV感染時でも33℃の時にはIAPはほとんど検出されず、37℃においてHRV感染後にのみ誘導されることが明らかになった。

### 2. 3 IAPノックダウンがHRV感染線維芽細胞の細胞傷害効果に及ぼす効果

そこでアポトーシス抑制因子であるIAPのsiRNAを導入し、HRVを感染させ、細胞障害効果を観察した。図2に示すようにControl siRNAを導入しても37℃の線維芽細胞ではHRVを感染させても細胞傷害は誘導されない。しかしIAPの発現を抑制するsiRNAによるノックダウンを行うと、33℃で培養したときと同様に強い細胞傷害効果が起こることが確認された。図には示さないが、HRVを感染させていない細胞にIAPsiRNAを導入しても細胞傷害は誘導されず、また33℃の線維芽細胞にIAPsiRNAを導入しても33℃における細胞傷害効果に変わりはいみられなかった。

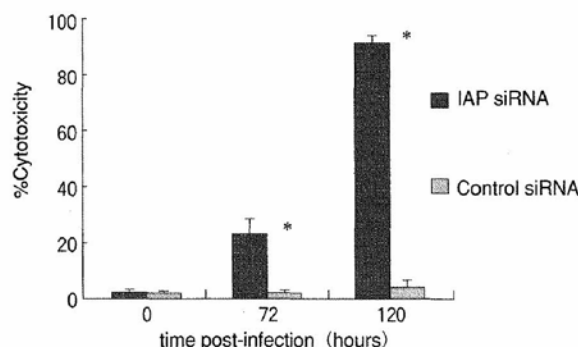


図2 37℃のHRV感染線維芽細胞に及ぼすIAPノックダウンの効果

37℃で培養した線維芽細胞のIAPをsiRNAによってノックダウンを行いHRV14を感染させ細胞傷害効果を経時的に培養液中に逸脱するLDH活性で測定を行った(5ウェルの平均±標準偏差)。統計分析は2 way-ANOVAとTukey法によるposthoc testを実施した(\* $p < 0.05$  control siRNAに対して)

## 2. 4 IAP ノックダウンが 37℃における HRV 感染繊維芽細胞内の HRV-RNA 量に及ぼす効果

HRV 感染 48 時間後の繊維芽細胞内の HRV-RNA 量を定量 RT-PCR 法を用いて評価した。その結果、コントロール siRNA 条件では HRV-RNA は検出限界ぎりぎりであったが、IAP のノックダウンを行った場合には HRV-RNA 量が 10 倍以上になることがわかった。

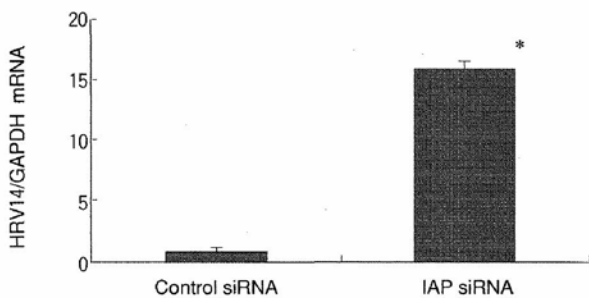


図 3 IAP ノックダウンによる 37℃における 繊維芽細胞内の HRV-RNA 量

37℃で培養した繊維芽細胞の IAP を siRNA によってノックダウンを行い HRV 14 を感染させ 48 時間後の RNA を抽出し、HRV14-RNA を定量的 RT-PCR で測定した。GAPDH をハウスキーピング遺伝子としてその相対値をもって HRV14-RNA 量の評価を行った (5 ウェルの平均±標準偏差)。統計検定は t 検定を用いた (\* $p<0.05$ )。

## 3. 考 察

本研究では、急性上気道感染症の原因ウイルスの一つである HRV の細胞傷害効果の温度依存性に関与する宿主細胞側の要因を *in vitro* 培養ヒト肺線維芽細胞を用いて明らかにすることを目的とした。ヒト胎児肺線維芽細胞 MRC-5 に対する HRV-14 の *in vitro* 細胞傷害性は 33℃において 50% 以上の細胞が傷害される濃度のウイルスを添加しても 37℃場合には、ほとんど細胞は傷害されなかった。従ってこの *in vitro* HRV 感染モデルにおいては細胞培養温度が 37℃になると細胞障害効果が阻害される可能性が確認された。

さらにマイクロアレー法による mRNA の網羅的解析から、アポトーシス抑制因子 IAP の mRNA レベルが 33℃の低温環境下の HRV 感染

MRC-5 では 37℃の培養環境下に比べ 50% 以上抑制されていることがわかった。そこで IAP が直接細胞傷害に関連するかを明らかにするために通常 HRV を感染させても細胞障害効果がおきない 37℃の培養温度において HRV 感染と同時に siRNA による IAP のノックダウンを行ったところ 33℃での培養とほぼ同様に細胞障害が発生した。さらにこのときの HRV-RNA は 37℃にも関わらず著しく増加していた。以上より 1) IAP は 37℃付近では HRV の細胞内への侵入があったとしても HRV の増殖を抑制すること、2) 33℃で細胞が傷害される原因の一つとして低温で IAP が誘導されなくなること、が明らかになった。

ところで IAP は最初にバキュロウイルスで発見されたアポトーシスの抑制因子である。最近ではアポトーシスの制御因子としてウイルスに限らず、酵母から哺乳動物まで幅広く相同性の高い配列が保存されている<sup>12)</sup>。最近では悪性腫瘍細胞の IAP を抑制することによる癌治療が注目されている<sup>13)</sup>。IAP は直接アポトーシスに関与する caspase3,7,9 に結合し、これを抑制することが知られている<sup>14)</sup>。本実験において caspase cascade のどの部分が IAP によって抑制されたのかを明らかにすることは次の課題である。

すでに 1998 年に我々は運動負荷に伴う上気道粘膜の温度を検討し図 4 に示すように運動後に上気道粘膜の温度が大きく変化する結果を得ている。すなわち 8 名の健康人男性の自転車エルゴメータを用いた 25 分以内に疲労困憊に至る漸増負荷前後のサーモグラフィーによる口腔粘膜温度と赤外線温度計による鼻腔および鼓膜温の変化を観察した。その結果、運動により少なくとも 2℃以上の温度差が生じること、また個人差も 2℃以上にわたることを見いだした<sup>11)</sup>。

このようにヒトの上気道粘膜の温度には数度の範囲の個人差があり、さらに疲労困憊に至る運動直後には平均で少なくとも 2℃以上の上気道粘膜



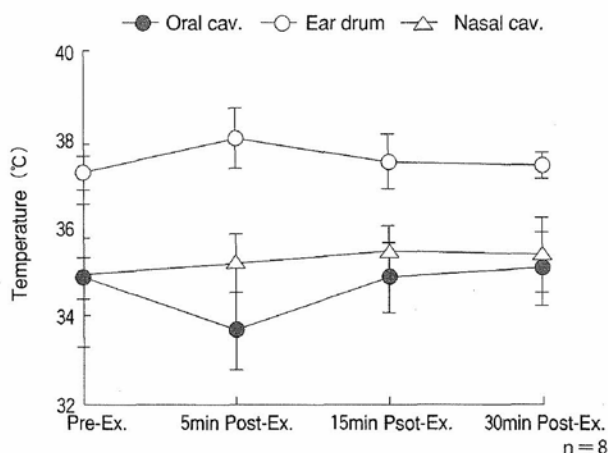


図4 ヒト上気道粘膜温度の運動による変化(永富良一,平成10年度日本体育協会スポーツ医・科学研究報告<sup>11)</sup>より) 8名の健康人男性の自転車エルゴメータを用いた25分以内に疲労困憊に至る漸増負荷前後のサーモグラフィーによる口腔粘膜温度と赤外線温度計による鼻腔および鼓膜温の変化を観察したものである。運動により少なくとも2℃以上の温度差が生じること, また個人差も2℃以上にわたることがわかる。

温度の低下が起き33℃前後まで温度の低下がみられること, さらにその回復までには30分以上要することが起こる。さらに運動開始前の時点での個体差も大きく上気道粘膜の温度が常時33℃前後のケースもみられている(図4<sup>11)</sup>)。この事実を考慮すると, HRVが上気道粘膜に感染した場合, IAPが誘導されなくなる結果HRVの増殖が促進し, 細胞傷害が起きる可能性が考えられる。また運動直後の温度低下によりIAPが低下しHRVの増殖を制御できなくなり上気道粘膜が傷害される可能性がある。今回の実験ではMRC-5細胞を観察期間中120時間通して33℃の低温で培養し続けているので, 運動後の30分程度の温度低下がHRVに対する感受性を高めるかどうかについては, 今後IAP誘導を阻害する低温暴露の時間閾値を明らかにしていく必要がある。

HRVには100以上の亜型があることが知られている<sup>15, 16, 17)</sup>。その中には感染感受性が細胞の温度に依存しないものも知られている<sup>18)</sup>。したがって今回HRV-14で明らかになった低温指向性の原因は, 粘膜表面温度の高い肺に感染し気管支喘息などを惹起するタイプ<sup>19)</sup>にはみられない現象かもしれない。しかし元々HRVの低温指向性

が明らかになったのは, HRVの血清中からの単離が低温ではじめて成功したことがきっかけになっており<sup>20)</sup>, いずれにしても多くの亜型に低温指向性があると考えられる。もちろんカゼ症候群の原因になるのはHRVだけではない。今後他のウイルスの感受性についても検討を進めていく必要がある。インフルエンザも感染細胞にアポトーシスを誘導するウイルスである<sup>21)</sup>。インフルエンザウイルス感染症の発症への環境要因の寄与も今後明らかにしていきたい。

これまでに上気道感染症いわゆるカゼの感受性についてはさまざまな検討が行われている。その中でも注目されているのは心理的ストレスである。Cohenらは394名の健康人ボランティアにHRV-2,9,14,コロナウイルス229E,およびRespiratory Syncytial Virusを投与し, 感染症の発症およびその症状経過を観察した結果, ウイルス分離とそれに伴う症状をもって判定した発症率は心理的ストレスのスコアと強く関連していることを明らかにした<sup>7)</sup>。興味深いことに喫煙, 飲酒, 運動, 睡眠の質, 白血球数, 免疫グロブリンのレベルはいずれもこの関連を説明するには至らなかったことを報告している。ただしその後の報告では喫煙者と非喫煙者の比較を行った結果, 喫煙者において発症率が高かったことも報告されている<sup>4)</sup>。さらに同様の別な研究において社会的な絆(友人, 家族, 両親, 職場の同僚やさまざまなグループへの所属)が多いほど逆に発症率が低かったことが明らかになっている<sup>8)</sup>。これらは同意を得られたボランティアに実験的にウイルスを接種しているためウイルス暴露の機会が均等化されていることから信頼性の高いデータである。心理的ストレスや社会的絆などはストレス状態と関連がある。例えば自律神経や視床下部・下垂体・副腎皮質系を介して上気道の血流を減少させ温度の低下につながるかどうか明らかになれば, あるいは別のIAPの発現にかかわる制御が今後明らかになれば, カゼに罹

りやすい状態あるいは人をあらかじめ予測することができるようになるかもしれない。今後さらに追求する必要がある。

HRVはピコルナウイルス科のRNAウイルスに属する。HRVはウイルス受容体としてICAM-1(細胞間接着因子)を使用して、これを介して細胞内に侵入することが知られている<sup>22)</sup>。一般にウイルスが感染した場合にI型インターフェロンが誘導されるが、HRVはその応答を抑制することが知られている<sup>23)</sup>。以前抗ウイルス薬としての1型インターフェロンが注目されていたときにHRVの治療薬になることも期待され経鼻的に投与する臨床試験が行われた。しかし確かにウイルスの抑制はできるものの、投与期間中は典型的な感染症状に見舞われるため、治療手段としては適切でないと結論づけられている<sup>24)</sup>。

また本研究成果で得られた結果からすれば上気道温度を低下させないような操作、すなわちマフラーあるいはマスクの装着は上気道温度を低下させないことにつながる。このような操作が予防手段として効果があるか、その方法のコンプライアンスも含めて評価していきたい。またIAPがなぜ低温では誘導されなくなるのかそのメカニズムは明らかになっていない。今後の検討課題である。

#### 4. 結論

1. HRVはヒト胎児肺線維芽細胞MRC-5に対して、in vitroで低培養温度の時に高い細胞傷害効果を誘導する。

2. HRVの細胞傷害効果37℃では著しく抑制される。

3. 低温環境である33℃ではアポトーシス抑制因子IAPが誘導されず細胞がアポトーシスに陥る。一方37℃ではHRVが感染してもIAPがアポトーシスを抑制する

#### 謝 辞

本研究に対して助成を賜りました財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に厚く御礼申し上げます。また、実験に協力して下さった元東北大学大学院生、張瑞雪博士、齋史哉博士、東北大学大学院生青沼悦子氏、青天目州晶氏に心より感謝いたします。

#### 文 献

- 1) Monto A.S., The seasonality of rhinovirus infections and its implications for clinical recognition. *Clin Ther.*, 24 (12) : 1987-1997 (2002)
- 2) Linder J.A., Singer D.E., Health-related quality of life of adults with upper respiratory tract infections. *J. Gen. Intern. Med.* 18 (10) : 802-807 (2003)
- 3) Cohen S., Tyrrell D.A., Smith A.P., Negative life events, perceived stress, negative affect, and susceptibility to the common cold. *J. Pers. Soc. Psychol.*, 64 (1) : 131-140 (1993)
- 4) Cohen S., Tyrrell D.A., Russell M.A., Jarvis M.J., Smith A.P., Smoking, alcohol consumption, and susceptibility to the common cold. *Am. J. Public Health.*, 83 (9) : 1277-1283 (1993)
- 5) Stone A.A., Bovbjerg D.H., Neale J.M., Napoli A., Valdimarsdottir H., Cox D., Hayden F.G., Gwaltney J.M., Jr., Development of common cold symptoms following experimental rhinovirus infection is related to prior stressful life events. *Behav. Med.*, 18 (3) : 115-120 (1992)
- 6) Sperber S.J., Hendley J.O., Hayden F.G., Riker D.K., Sorrentino J.V., Gwaltney J.M., Jr., Effects of naproxen on experimental rhinovirus colds. A randomized, double-blind, controlled trial. *Ann. Intern. Med.*, 117 (1) : 37-41 (1992)
- 7) Cohen S., Tyrrell D.A., Smith A.P., Psychological stress and susceptibility to the common cold. *N. Engl. J. Med.*, 325 (9) : 606-612 (1991)
- 8) Cohen S., Doyle W.J., Skoner D.P., Rabin B.S., Gwaltney J.M., Jr., Social ties and susceptibility to the common cold. *JAMA.*, 277 (24) : 1940-1944 (1997)
- 9) Cohen S., Frank E., Doyle W.J., Skoner D.P., Rabin B.S., Gwaltney J.M., Jr., Types of stressors that



- increase susceptibility to the common cold in healthy adults., *Health Psychol.*, 17 (3) : 214-223 (1998)
- 10) Stott E.J., Heath G.F., Factors affecting the growth of Rhinovirus 2 in suspension cultures of L132 cells., *J. Gen. Virol.*, 6 (1) : 15-24 (1970)
  - 11) 永富良一. 上気道感染症のリスクと運動の関係について. 平成10年度日本体育協会スポーツ医・科学研究報告. ジュニア期におけるスポーツ活動と防衛体力に関する研究報告 (第3報), p. 42-45 (1998)
  - 12) Deveraux Q.L., Reed J.C., IAP family proteins--suppressors of apoptosis., *Genes. Dev.*, 13 (3) : 239-252 (1999)
  - 13) Plenchette S., Cheung H.H., Fong W.G., LaCasse E.C., Korneluk R.G., The role of XAF1 in cancer., *Curr. Opin. Investig. Drugs.*, 8 (6) : 469-476 (2007)
  - 14) Deveraux Q.L., Leo E., Stennicke H.R., Welsh K., Salvesen G.S., Reed J.C., Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases., *EMBO J.*, 18 (19) : 5242-5251 (1999)
  - 15) Tyrrell D.A., Rhinoviruses and coronaviruses - virological aspects of their role in causing colds in man., *Eur. J. Respir. Dis. Suppl.*, 128 (Pt 1) (332-335 (1983)
  - 16) Johnston S.L., Sanderson G., Pattemore P.K., Smith S., Bardin P.G., Bruce C.B., Lambden P.R., Tyrrell D.A., Holgate S.T., Use of polymerase chain reaction for diagnosis of picornavirus infection in subjects with and without respiratory symptoms., *J. Clin. Microbiol.*, 31 (1) : 111-117 (1993)
  - 17) Lu X., Holloway B., Dare R.K., Kuypers J., Yagi S., Williams J.V., Hall CB, Erdman DD, Real-time reverse transcription-PCR assay for comprehensive detection of human rhinoviruses., *J. Clin. Microbiol.*, 46 (2) : 533-539 (2008)
  - 18) Papadopoulos N.G., Sanderson G., Hunter J., Johnston S.L., Rhinoviruses replicate effectively at lower airway temperatures., *J. Med. Virol.*, 58 (1) : 100-104 (1999)
  - 19) Johnston S.L., Natural and experimental rhinovirus infections of the lower respiratory tract., *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 152 (4 Pt 2) : S46-52 (1995)
  - 20) Taylor-Robinson D., Tyrrell D.A., Serotypes of viruses (rhinoviruses) isolated from common colds., *Lancet.*, 1 (7227) : 452-454 (1962)
  - 21) Zhang L., Katz J.M., Gwinn M., Dowling N.F., Khoury M.J., Systems-based candidate genes for human response to influenza infection., *Infect. Genet. Evol.*, 9 (6) : 1148-1157 (2009)
  - 22) Staunton D.E., Merluzzi V.J., Rothlein R., Barton R., Marlin S.D., Springer T.A., A cell adhesion molecule, ICAM-1, is the major surface receptor for rhinoviruses., *Cell.*, 56 (5) : 849-853 (1989)
  - 23) Peng T., Kotla S., Bumgarner R.E., Gustin K.E., Human rhinovirus attenuates the type I interferon response by disrupting activation of interferon regulatory factor 3., *J. Virol.*, 81 (11) : 6161 (2007)
  - 24) Sperber S.J., Levine P.A., Sorrentino J.V., Riker D.K., Hayden F.G., Ineffectiveness of recombinant interferon-beta serine nasal drops for prophylaxis of natural colds., *J. Infect. Dis.*, 160 (4) : 700-705 (1989)