

多重感染と動脈硬化

石 宇 徳永 蔵

要 旨：内皮障害説あるいは内皮活性化説が提唱されて以来、動脈硬化慢性炎症説が注目されるようになった。動脈硬化の発生、進展における内皮細胞の重要性が認識され、活性化因子の一つとして感染性病原体が注目されている。最近、病原体負荷 (Pathogen burden) あるいは多重感染と動脈硬化の関係が指摘され、臨床研究で頸動脈の狭窄程度は病原体負荷と密接に関連することが明らかになった。われわれは各年代の病理解剖例から得られた動脈硬化病変のほとんどない大動脈23例、および肉眼的に明らかな動脈硬化病変を有する10例の大動脈を用いて、ヘルペス属ウイルスやクラミジア・ニューモニエなどの主に細胞内感染を示す病原体の感染状態を免疫組織染色や *In situ* hybridization法、PCR法、電子顕微鏡等によって比較検討した。その結果、非動脈硬化大動脈では *C. pneumoniae* 陰性であるのに対して、動脈硬化病変を有する例では40%陽性であった。また、ヘルペス属ウイルスと *C. pneumoniae* の共感染は動脈硬化病変を有する大動脈にのみ認められた。病原体多重感染は動脈硬化の進展に関連すると考えられる。(J. Jpn. Coll. Angiol., 2003, 43: 667-671)

Key words: Multiple infections, Atherosclerosis, *C. pneumoniae*, Herpesviruses

序 言

内皮障害説が提唱されて以来、動脈硬化において内皮の障害と病原体の役割についての議論が注目されている¹⁾。すなわち病原体の感染が動脈硬化の原因か結果かの問題であるが、少なくとも病原体の感染によって、動脈硬化が促進されることが考えられる。これらの病原体の中でも、ヘルペス属ウイルスやクラミジア・ニューモニエなどの主に細胞内感染するものが取り上げられている²⁾。疫学研究で虚血性心疾患患者にこれらの病原体の抗体保有率が有意に高いこと、また冠動脈や大動脈などの動脈硬化病変から電子顕微鏡やPCR法、免疫組織染色等によって、これらの病原体の存在が確認されている³⁾。しかし動脈硬化に対して1種類の病原体のみを論じた研究がほとんどであった。1997年にChiuら⁴⁾によって初めて頸動脈の同一動脈硬化病変にヘルペス属のCMV、HSV-1とクラミジア・ニューモニエの共存が免疫組織染色で観察され、病原体負荷 (Pathogen burden) と動脈硬化の関係が指摘された⁵⁾。また最近の臨床研究で頸動脈の狭窄程度は病原体負荷と密接に関連することも明らかになった⁶⁾。大

動脈において、同一動脈硬化病変の中にこれらの病原体の共存と動脈硬化との関係を確認するために、われわれは乳幼児から高齢者に至る病理解剖の非動脈硬化大動脈23例および10例の大動脈硬化病変の大動脈を用いて、これらの病原体の感染割合と感染状態を比較検討した。

材料と方法

症例はTable 1に示している。病理解剖例の23週の胎児から75歳までの各年代の非動脈硬化大動脈23例および53歳から75歳まで10例の大動脈硬化病変の組織からPinpoint Slide DNA Isolation法にてDNAを抽出し、PCRとSouthern blotを行い、さらに *In situ* hybridization (ISH) を行って、病原体核酸の有無を検討した。クラミジア・ニューモニエについて免疫組織染色と電顕の観察も行った。大動脈の正常部と動脈硬化病変部の比較においては、個人差あるいは同一症例でも動脈採取部位間の影響を可能な限り低くするように配慮した。本研究では各年代の非動脈硬化大動脈23例と53歳から75歳まで10例の大動脈硬化病変の組織が比較された。さらに非動脈硬化大動脈症例中の53歳以上の8例を10例の

Table 1 Clinicopathological features and detection of *Chlamydia pneumoniae* and herpesviruses¹⁸ in nonatherosclerotic (n=23) and atherosclerotic (n=10) cases

	Case	Age*	Sex	Cause of death	Type	Chlamydia				Herpesviruses		
						IHC	PCR	Southern blot	ISH	HSV-1	EBV	CMV
NonAs group	1	23w	F	Abortion		-	-	-	-	-	-	-
	2	9m	M	Leukemia		-	-	-	-	-	-	-
	3	4y	M	Kawasaki disease		-	-	-	-	-	-	-
	4	5y	M	Accident		-	-	-	-	-	-	-
	5	14y	M	Bronchial asthma		-	-	-	-	-	-	-
	6	21y	F	Lymphoma		-	-	-	-	-	+	-
	7	22y	M	Yolk Sac tumor		-	-	-	-	-	-	-
	8	24y	M	Rhabdomyosarcoma		-	-	-	-	-	-	-
	9	31y	F	Suicide		-	-	-	-	+	-	-
	10	32y	M	Rheumatoid arthritis		-	-	-	-	+	-	-
	11	33y	F	Gastric cancer		-	-	-	-	+	-	-
	12	33y	M	Leukemia		-	-	-	-	-	-	-
	13	38y	M	Diabetes mellitus		-	-	-	-	-	-	-
	14	38y	M	Suicide		-	-	-	-	-	-	-
	15	53y	F	Gastric cancer		-	-	-	-	-	-	-
	16	57y	M	Lymphoma		-	-	-	-	-	-	-
	17	59y	M	Liver cirrhosis		-	-	-	-	-	-	-
	18	64y	M	Lung cancer		-	-	-	-	-	+	-
	19	65y	M	Cancer of urinary bladder		-	-	-	-	-	-	+
	20	73y	F	Adult T-cell lymphoma		-	-	-	-	-	-	-
	21	74y	F	Leukemia		-	-	-	-	-	-	-
	22	75y	F	Gastric cancer		-	-	-	-	-	+	-
	23			Umbilical cord		-	-	-	-	-	-	-
As Group	1	66y	F	Rectal cancer	I, II	+	-	-	+	+	+	-
	2	75y	F	Periarteritis nodosa	II	-	-	-	-	+	+	-
	3	59y	M	Hepatocellular carcinoma	III	-	-	-	-	+	-	-
	4	60y	M	Lung cancer	III	-	-	-	-	-	+	-
	5	62y	M	Hepatocellular carcinoma	III	-	-	+	+	+	-	+
	6	74y	F	Gastric cancer	III	+	-	+	+	+	+	-
	7	73y	F	Lymphoma	IV	-	-	-	-	-	+	+
	8	53y	F	Rectal cancer	V	-	-	-	-	+	+	+
	9	53y	F	Lymphoma	V	+	+	+	+	+	+	-
	10	69y	M	Gastric cancer	VI	-	-	-	-	+	+	+

NonAs, nonatherosclerotic; As, atherosclerotic; *age at death; w, week; m, month; y, year; type I, initial lesion; type II, fatty streak; type III, preatheroma; type IV, atheroma; type V, fibrolipid plaque; type VI, complicated lesion. IHC, immunohistochemical stain; PCR, polymerase chain reaction; ISH, *in situ* hybridization; HSV-1, herpes simplex virus type 1; EBV, Epstein-Barr virus; CMV, cytomegalovirus; +, positive; -, negative.

大動脈硬化病変の組織と年齢対応させて比較検討した。大動脈硬化病変は94年AHAでStaryら⁷⁾が報告した分類法によって、六つのタイプに分類した。type I, initial lesion; type II, fatty streak; type III, preatheroma; type IV, atheroma; type V, fibrolipid plaque; type VI, complicated lesion.

成 績

Table 1に示しているように、非動脈硬化大動脈では *C. pneumoniae* は全例陰性であるのに対し、大動脈硬化病変からの10例のうち4例が陽性であった。中でもISHが一番感度が高かった。ヘルペス属ウイルスについて

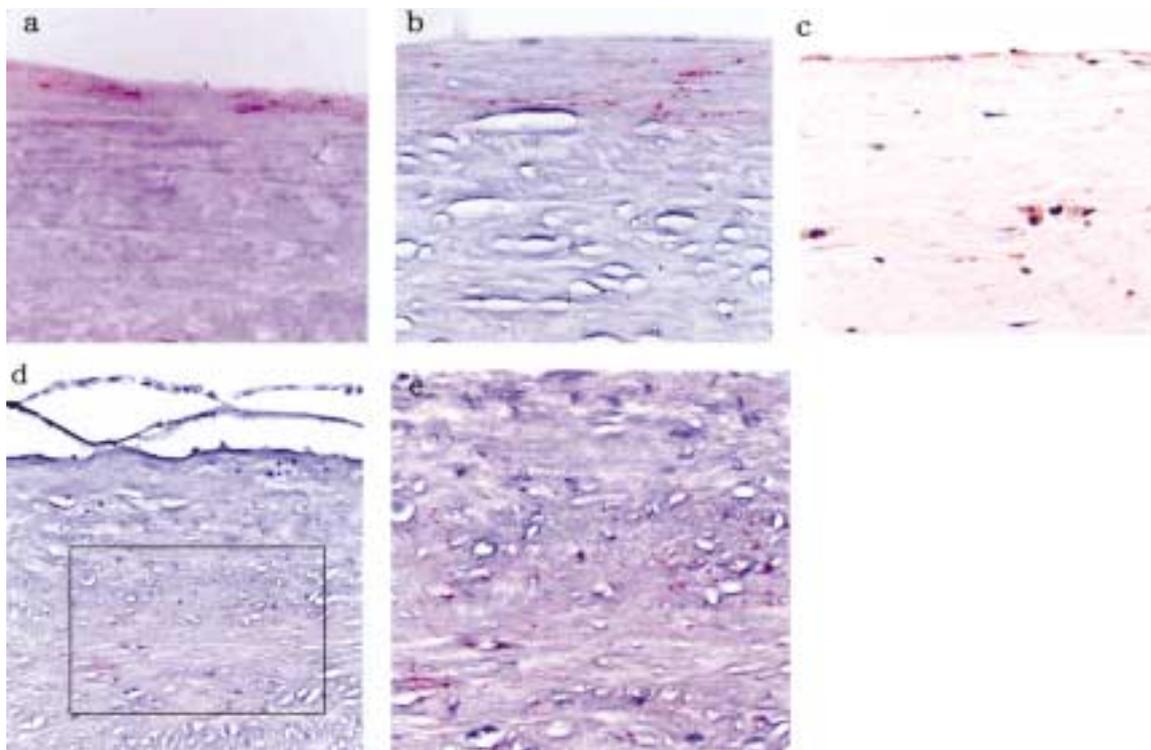


Figure 1 Detection of herpesvirus and *C. pneumoniae* in the aorta. In situ hybridization shows the presence of HSV-1 DNA (visualized as red signal) in non-atherosclerotic aorta (a) and atherosclerotic aorta (b). Immunohistochemical staining of *C. pneumoniae* by peroxidase technique (brown reaction product) in an atherosclerotic lesion (c). In situ hybridization shows the presence of *C. pneumoniae* DNA in an atherosclerotic lesion (d). The rectangular portion is magnified to $\times 400$ (e).

HSV-1, EBV, CMVのいずれも大動脈硬化病変部のほうが感染率が高いが、非動脈硬化大動脈でも検出された。ウイルスの検出にはPCR法が一番感度が高かった。これは大動脈でのウイルスのabortive infectionを裏付けるものと考えられる。Fig. 1のα(非動脈硬化大動脈症例9)とβ(大動脈硬化病変症例7)はISH法にて検出したウイルスで平滑筋細胞と思われる細胞核に存在することが分かる。aの薄い内膜を有している非動脈硬化大動脈に比べて、bの動脈硬化病変部では肥厚した内膜に認められる。内皮の被覆は保たれ、単なる内皮剥離後のウイルスの進入とは考えられず、ウイルスは血管壁に対してある程度のtropismを有していると考えられる。Fig. 1のcの写真は抗*C. pneumoniae*抗体の免疫ペルオキシダーゼ染色で、陽性物質は茶色で動脈硬化病変の肥厚した内膜の内皮細胞や泡沫細胞に存在する。Fig. 1のdはISHにて動脈硬化病変部の細胞質あるいは細胞外基質の中に*C. pneumoniae*の陽性シグナルが認められ

る。eはdの拡大像である。Fig. 2は*C. pneumoniae*免疫染色陽性症例の電子顕微鏡写真で、矢印は大型の封入体を有する細胞で、拡大すると封入体中にさまざまなステージの*C. pneumoniae*菌体が認められる。Table 2は年齢調節をして非動脈硬化例8例と大動脈硬化例10例と比較したもので、HSV-1とEBVに感染率の有意の差が見られた。2種類以上の病原体が同一病変部に同時検出という多重感染は動脈硬化病巣を有する大動脈にのみ認められ、動脈硬化は病原体の感染だけでなく、病原体の種類や数にも関連することがわかった(Table 3)。多重感染は動脈硬化病変の程度と相関する傾向は見られるが、症例数が少ないので統計的な差は見られなかった。

考 案

本研究でヘルペス属ウイルスと*C. pneumoniae*は動脈硬化を有する大動脈に重複感染していることを確認し

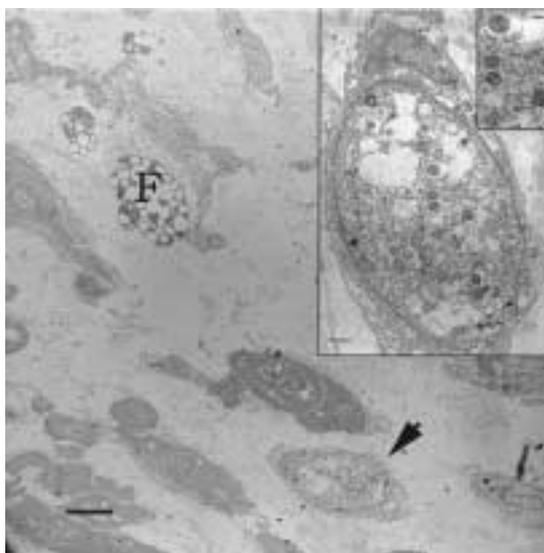


Figure 2 Transmission electron micrographs of an atherosclerotic lesion containing *C. pneumoniae*. The arrow points to a macrophage-like cell with an inclusion and compressed nucleus. The insets are larger views showing various stages of *C. pneumoniae*. F, foam cell; N, nucleus. The scale bars are 5 μm , 1 μm and 200 nm, respectively.

た。しかもこれらの病原体の多重感染は動脈硬化病巣を有する大動脈にのみ認められるので、動脈硬化の進展は病原体多重感染にも関連すると考えられ、いわゆるPathogen burdenの説⁹⁾を支持する結果であった。確かに本研究で用いられた病理解剖例は、治療によるある程度のImmunocompromisedの患者で病原体に易感染性であったと考えられるが、動脈硬化と非動脈硬化両グループはほぼ同一条件であるので比較可能と思われる。Nicholsonら⁹⁾のレビューで、ウイルスの感染は動脈硬化を引き起こすことを支持している。ヘルペスウイルス感染にて動脈硬化を誘発した動物モデルや、ヘルペスウイルス感染にて平滑筋細胞へのコレステロールの蓄積、増殖因子、サイトカインの過剰発現などが取り上げられている。*C. pneumoniae*の感染によって動脈硬化促進する動物のモデルも報告された⁹⁾。これらの病原体の共通の特徴は、細胞内寄生で宿主細胞への慢性持続感染が特徴である。ウイルス感染による細胞内の封入体形成を認めないのは、不全型感染(abortive infection)の状態であると考えられる。一方、免疫染色や電顕観察で動脈硬化病巣に*C. pneumoniae*を認め、しかも動脈硬化大動脈にのみ存在するので、*C. pneumoniae*

Table 2 Viral DNA presence in non- and atherosclerotic groups after ruling out age factor

	HSV-1	EBV	CMV
Nonatherosclerotic group (n=8)	0	2	1
Atherosclerotic group (n=10)	8	8	4
<i>P</i> value	<0.01	<0.05	

Table 3 Relation between multiple infections and atherosclerosis

	Double	Triple	Quadruple
Nonatherosclerotic Group (n=23)	0	0	0
Atherosclerotic Group (n=10)	2	6	0
<i>P</i> value	<0.05	<0.05	

は動脈硬化に特異性があることが考えられるが、この論点についての直接的な動物モデルや大規模な抗生物質投与による臨床治験などの証拠は十分とはいえない。本研究での動脈硬化早期病変にクラミジアが検出されたのに炎症反応が目立たない理由は不明であるが、クラミジアに対する直接免疫反応が弱いと考えられる。炎症のバイオマーカーとしてC-reactive protein (CRP)の血中濃度1~5 $\mu\text{g/ml}$ 程度の上昇は心血管疾患のリスクと強く関連すると報告され、また、動脈硬化発生に直接役割を演じているとも考えられる¹⁰⁾。多重感染は宿主の低レベルのCRP上昇を来して、動脈硬化にかかわる可能性がある。一方、病原体は血管内皮、平滑筋細胞の直接損傷あるいはヒートショックタンパク(HSP)の分泌によって自己免疫反応を起こして、動脈硬化を促進する説も注目されている⁵⁾。このように多重感染は動脈硬化の進展に関係する因子の一つと考え

文 献

- 1) Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993, **362**: 801-809. Hansson GK:

- Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21**: 1876-1890.
- 2 Epstein SE, Zhou YF, Zhu J: Infection and atherosclerosis: emerging mechanistic paradigms. *Circulation*, 1999, **100** (4): e20-28.
 - 3 Morre SA, Stoker W, Lagrand WK et al: Microorganisms in the aetiology of atherosclerosis. *J Clin Pathol*, 2000, **53**: 647-654.
 - 4 Chiu B, Viira E, Tucker W et al: Chlamydia pneumoniae, cytomegalovirus, and herpes simplex virus in atherosclerosis of the carotid artery. *Circulation*, 1997, **96**: 2144-2148.
 - 5 Epstein SE, Zhu J, Burnett MS et al: Infection and atherosclerosis: potential roles of pathogen burden and molecular mimicry. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20**: 1417-1420.
 - 6 Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Blankenberg S et al: Impact of infectious burden on extent and long-term prognosis of atherosclerosis. *Circulation*, 2002, **105**: 15-21.
 - 7 Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE et al: A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 1995, **92**: 1355-1374. *Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis*.
 - 8 Nicholson AC and Hajjar DP: Herpesviruses in atherosclerosis and thrombosis: etiologic agents or ubiquitous bystanders? *Arterioscler Thromb Vas Biol*, 1998, **18**: 339-348.
 - 9 Muhlestein JB, Anderson JL, Hammond EH et al: Infection with Chlamydia pneumoniae accelerates the development of atherosclerosis and treatment with azithromycin prevents it in a rabbit model. *Circulation*, 1998, **97**: 633-636.
 - 10 Yeh ET, Willerson JT: Coming of age of C-reactive protein: using inflammation markers in cardiology. *Circulation*, 2003 Jan 28, **107** (3): 370-371.

Multiple Infections and Atherosclerosis: Co-infection of *Chlamydia Pneumoniae* and Herpesviruses in the Aorta is Related to Atherosclerosis

Yu Shi, and Osamu Tokunaga

Department of Biodefense and Pathology, School of Medicine, Saga University

Key words: Multiple infections, Atherosclerosis, *Chlamydia pneumoniae*, Herpesviruses

Atherosclerosis is now widely accepted as a chronic inflammatory disorder that is initiated by vascular injury induced by oxidized LDL, reactive oxygen species, diabetes, infection, etc. New epidemiological data has shown the connection between infection and atherosclerosis. Studies into the role of infection in atherosclerosis have usually involved the investigation of a single pathogen. Recent studies have suggested that the impact of infection on atherogenesis is related to the role of multiple infections and the concept of "pathogen burden." In this study, we examined *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*) and herpesviruses (HSV-1, EBV, and CMV) in aortic tissue, by means of immunohistochemistry, polymerase chain reaction, Southern hybridization, *in situ* hybridization, and electron microscopy. In atherosclerotic aorta, 40% of tissues examined were positive for *C. pneumoniae* in contrast to absence of this bacteria in non-atherosclerotic aorta. Herpesviruses were also detected in non-atherosclerotic aortas, however, co-infection of herpesviruses or/and *C. pneumoniae* was only found in atherosclerotic aortas. Our findings indicate the link between multiple infections in aortic tissue and atherosclerosis. (J. Jpn. Coll. Angiol., 2003, **43**: 667-671)