

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08180

研究課題名(和文)セシウムがインフルエンザウイルス・RSウイルス感染に及ぼす影響

研究課題名(英文)Effect of stable isotope cesium on influenza virus and RS virus infection (in vitro)

研究代表者

山下 信子 (Yamashita, Nobuko)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：40379798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、安定同位体セシウム(Cs)の添加がインフルエンザウイルスA(IAV)、RSウイルス(RSV)感染に及ぼす影響(細胞内ウイルスゲノム量、mRNA量、培養上清のウイルス感染価、ミニゲノムアッセイ等)を検討した。IAVはH1N1亜型(A/NC、A/PR8、A/WSN)、H3N2亜型(A/Panama)、RSVはlong strain(RSV-A)を用いた。A/NCでは、低濃度CsCl添加でウイルス侵入が増加していたが、他のIAV株ではウイルス侵入の有意な増加は認められなかった。また低濃度CsClはウイルス複製に影響を及ぼさなかった。RSVでもウイルス侵入と複製に影響はなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2018年から2019年当時、感染症発生動向調査の週別インフルエンザ患者数は、2016年以後最高値を更新し続けていて2009pdmの流行期を上回っている状態であった。またRSウイルスについても、週別患者数のピークが、2010年には第5週(1-2月)にあったが、2014年以降は秋から初冬、2018年は夏というように、流行時期が明らかに変化していた。この原因として、東日本大震災に伴うセシウム(Cs)の影響かと仮説を立てたが、本研究で行ったin vitroの実験では、安定同位体CsはインフルエンザウイルスやRSウイルスの増殖・複製に影響していなかった。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the effect of stable isotope caesium (Cs) addition on influenza A virus (IAV; A/NC, A/PR8, A/WSN) and RS virus (RSV; long strain) infection (intracellular viral genome and mRNA quantification, culture supernatant plaque-forming unit, minigenome assay, etc.). Viral entry of A/NC was increased by the addition of low concentrations of CsCl, while no significant increase was observed in the other IAV strains. Low concentrations of CsCl also had no effect on virus replication. RSV also showed no effect on virus entry and replication.

研究分野：ウイルス学、小児科学

キーワード：セシウム インフルエンザウイルス RSウイルス

1. 研究開始当初の背景

2018年から、2019年にかけて、即ち新型コロナウイルスパンデミック以前、「インフルエンザの患者数が過去最高に達しました」「冬から春にかけて流行していたRSウイルスが、夏から秋に流行しています」といった報道がなされていた。事実、感染症発生動向調査によると、当時の週別インフルエンザ患者数は、2016年以後最高値を更新し続けており、2009pdmの流行期を上回っている状態であった。また、RSウイルスについても、週別患者数のピークが、2010年には第5週(1-2月)にあったが、2014年以降は秋から初冬になり、この2018年は第37週(夏)にあるというように、流行時期が明らかに変化していた。その間、診断・治療やモノクローナル抗体による予防方法に大きな変化はなく、この原因は現在も不明である。

一方、東日本大震災以後、セシウム(Cs)が人体に及ぼす影響についての研究が、各分野で進められるようになった。そして、インフルエンザウイルスやRSウイルスの流行像の変化は、同時期、東日本大震災以後に起こっていることから、私達は以下の「Csは、インフルエンザウイルスやRSウイルス感染に影響し得るのか?」という疑問をもった。

これを考える上で、私達は二つの文献について、着目した。ひとつは、福島医科大学からの文献(Kobayashi D et al, *FEBS Lett* 2017)である。Csは、原子番号55のアルカリ金属であり、安定同位体Cs (^{133}Cs)と放射性同位体Cs (^{134}Cs 、 ^{137}Cs)に大別される。彼らの報告は、放射性同位体Csの作用を検討する前段階として、まずアルカリ金属としての安定同位体Csの影響を、CsCl添加により *in vitro* で検討したものである。この文献に準じて、CsClを用いてインフルエンザウイルスやRSウイルスに及ぼす影響を評価することを考えた。

もう一つはの論文が、インフルエンザウイルスの侵入にCa²⁺チャンネルが関与する(Fujioka Y et al, *Cell Host and Microbe*, 2018)という報告である。これは、シアル酸に修飾されたCa²⁺チャンネルがHAと結合することで、IAVの細胞侵入が促進することを報告している。CsはKとサイズが似ているため、生体のK⁺チャンネルに入り込みK⁺チャンネルを詰まらせる、K⁺チャンネルブロッカーとしての作用がある。K⁺チャンネルは、ウイルスの細胞侵入に関与している可能性があるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「放射性同位体Csの作用を検討する前段階として、またアルカリ金属としての安定同位体Csの添加が、小児の主要な呼吸器感染症であるインフルエンザウイルスや、RSウイルスの細胞侵入・複製について、どのような影響を及ぼすかを *in vitro* で明らかにすることである。

3. 研究の方法

IAVは、H1N1亜型としてA/NewCaledonia/20/1999(A/NC)とA/WSN/1933(A/WSN)、H3N2亜型として、A/Panama/2007/1999(A/Panama)を使用した。RSウイルスはlong strain株(RSV-A)を使用した。培養細胞は、A549細胞(ヒト肺胞上皮癌由来細胞)、MDCK細胞(イヌの正常腎臓尿管上皮細胞)、Hep2(HeLa derivative)細胞を使用した。インフルエンザウイルス・RSウイルスのゲノム量とmRNA量はQuantitative RT-PCR法で定量した(Yamashita N, *Biochem Biophys Res Commun.* 2017,)。また、インフルエンザウイルス複製についてはミニゲノムアッセイを行った。インフルエンザウイルスのミニゲノムアッセイ(pCAGGS-PB2,PB1,PA, NP(A/WSN/1933(H1N1))とNP分節NCRを持つルシフェラーゼ遺伝子をコードするpPolI-NP(0)Fluc(0)をHEK293T細胞にトランスフェクションし、転写・翻訳されるルシフェラーゼを測定)を行った。ウイルス感染価については、培養上清中の感染価をブランクアッセイで測定した。ブランクアッセイは、インフルエンザウイルスではMDCK細胞(12 well plate)、またRSウイルスではHep2細胞(6 well plate)を用いた。培養上清の10倍段階希釈系列を作成しホルマリオン固定、クリスタルバイオレット染色後、感染価を算出した。また、CsがKチャンネルブロッカー作用を有するため、KチャンネルブロッカーであるTEA(tetraethylammonium chloride)を感染前添加した場合の、IAVのブランク数の変動を検討した。

4. 研究成果

(1) 安定同位体Cs添加時の細胞毒性

安定同位体Cs添加時の細胞毒性評価をMTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assayで行った。MEM培地にCsClを0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30mMで添加した場合の吸光度(A570-A650)で評価し、A549細胞とHEK293T細胞で検討を行った。添加48時間後ではCsCl添加0.1~3mMの生細胞率はA549細胞とHEK293T細胞のいずれも80%を超えていた(CsCl(-)を100%とした場合)。しかし、CsCl10mMを超えると著しい細胞障害が認められた。

(2) 安定同位体CsがIAV感染に及ぼす影響

細胞障害を起こさない低濃度のCsCl添加時(0, 0.1, 0.5, 1mM)で検討を行った。IAVをMOI 0.1(trypsin 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)でのA549細胞に感染させ、かつ細胞上清にCsClをウイルス感染24時間前から感染後48時間まで添加した場合の、細胞上清のウイルス感染価(48hr p.i.)、細胞内Flu M1 mRNA量、IFN β mRNA量、IFN λ 2/3 mRNA量(1hr p.i.・48hr p.i.)につ

いて検討した。安定同位体 Cs が IAV の細胞侵入を促進する可能性が考えられたため、MDCK 細胞を用いて、安定同位体 Cs を感染前添加した場合と、安定同位体 Cs が K チャンネルブロッカー作用を有するため、K チャンネルブロッカーである TEA (tetraethylammonium chloride ; 10 mM) を感染前添加した場合の、IAV のプラーク数の変動 インフルエンザミニゲノムアッセイを用いて、インフルエンザウイルスのゲノム複製に与える影響を検討した。

結果として A/NC では、48hr p.i.の細胞上清のウイルス感染価は、CsCl 1mM ・ 3mM 群で増加していたが ($p < 0.05$)、A/Panama と A/WSN では有意な増加はなかった。1hr p.i.では、細胞内 Flu M1 RNA は A/NC と A/Panama 共に、CsCl 1mM 群で有意に増加した ($p < 0.05$)、A/WSN では有意な増加はなかった。48hr p.i. の IFN β mRNA 量、IFN $\lambda 2/3$ mRNA 量には有意差はなかった。MDCK 細胞を用いたプラークアッセイでは、A/NC では、Cs 1mM ・ 3 mM 群でプラーク数は有意に増加した ($p < 0.05$) が、A/Panama と A/WSN では有意な増加はなかった。TEA 添加と インフルエンザミニゲノムアッセイではいずれも有意な変動は認められなかった。

これらの結果から、安定同位体 Cs の低濃度 CsCl 添加は、IAV の亜型により、多少の差はあるが、概ねインフルエンザウイルスの侵入・ゲノム増殖・ウイルス放出には影響しないと考えられた。

(3) 安定同位体 Cs が RSV 感染に及ぼす影響

インフルエンザウイルスと同様に、低濃度の CsCl 添加時(0, 0.1, 0.5, 1 mM)で検討を行った。RSV を MOI 0.01 での A549 細胞に感染させ、かつ細胞上清に CsCl をウイルス感染 24 時間前から感染後 48 時間まで添加した場合の細胞上清のウイルス感染価(48hr p.i.)、細胞内 RSV N mRNA 量には有意な変動は認められなかった。また RSV のミニゲノムアッセイでも有意な変動は認められなかった。安定同位体 Cs の低濃度 CsCl 添加では、in vitro では、RSV の感染に影響をしないと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小川 寛人 (Ogawa Hirohito) (80455237)	岡山大学・医歯薬学域・助教 (15301)	
研究分担者	八代 将登 (Yashito Masato) (80585943)	岡山大学・大学病院・助教 (15301)	
研究分担者	難波 ひかる (Namba Hikaru) (20273972)	岡山大学・医歯薬学域・助教 (15301)	
研究分担者	本田 知之 (Honda Tomoyuki) (80402676)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------