

機関番号： 32665

研究種目： 若手研究 (B)

研究期間： 2009 ~ 2010

課題番号： 21791574

研究課題名 (和文) 胎盤におけるインフルエンザウイルス感染の解析

研究課題名 (英文) Placenta as a target of influenza virus infection

## 研究代表者

相澤 志保子 (AIZAWA SHIHOKO)

日本大学・医学部・助手

研究者番号： 30513858

研究成果の概要 (和文) : インフルエンザウイルス A/Udorn/72 (H3N2) は、胎盤を構成する trophoblast のモデルとなるヒト絨毛癌細胞株 BeWo、不死化ヒト初期絨毛株 HTR8, Swan71 に感染し、細胞のアポトーシスを誘導した。2009 pandemic A/H1N1 インフルエンザウイルスも HTR8, Swan71 に感染するが、感染効率は H3N2 ウイルスよりも低く、アポトーシスの誘導も認めなかった。

研究成果の概要 (英文) : We report here placenta as a target organ of influenza A virus. A choriocarcinoma cell line and immortalized human invasive trophoblasts were challenged with an influenza virus strain A/Udorn/72 and /or clinical isolate of H1N1/09 influenza virus. We observed viral replication in both viruses, while cytotoxicity was less prominent in H1N1/09.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,300,000	390,000	1,690,000

研究分野：産婦人科感染症

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：微生物・胎盤・インフルエンザウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

過去の歴史のなかで、人類は幾度もインフルエンザウイルスによるパンデミックを経験してきた。近年、新型インフルエンザウイルスによるパンデミックの恐れが広く認識されてきており、様々な対策が講じられている。事実、研究開始直後の2009年4月に、豚由来の新型インフルエンザウイルスによるパンデミックが発生した。

妊娠中にインフルエンザウイルスに感染した場合、過去に起きたパンデミックでは妊婦の死亡率は非常に高率であった

(Rasmussen et al. Emerg Infect Dis. 2008)。軽症であっても、流・早産や子宮内胎児死亡が増加すること、児が思春期以降に統合失調症を発症するリスクが高まることが報告されている (Fruntes et al. Med Sci Monit 2008, Limosin et al. Acta Psychiatr Scand 2003)。しかしながら、胎盤局所におけるインフルエンザウイルスの影響については、明らかではない。加えて、2009年4月に発生した新型インフルエンザウイルスが妊婦・胎児に与える影響は不明である。

## 2. 研究の目的

胎盤のインフルエンザウイルス感染の機序、感染による細胞の変化を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) Trophoblast のモデル細胞

Trophoblast stem cell のモデルとして、ヒト絨毛癌細胞株 BeWo を用い、forskolin (50  $\mu$ M) により分化誘導を行った。また、不死化ヒト初期絨毛株 HTR8, Swan71 を invasive trophoblast のモデルとして用いた。

### (2) A/Udorn/72 インフルエンザウイルス (H3N2) 感染実験

BeWo、HTR8、ならびに Swan 71 細胞に A/Udorn/72 インフルエンザウイルス (H3N2) を MOI=5 で感染させた。感染8時間、24 時間後に抗インフルエンザ蛍光抗体で免疫染色し、感染細胞を検出した。培養上清中のインフルエンザウイルス量を HA 法、プラーク法を用いて測定した。細胞のアポトーシスは ssDNA を検出する enzyme-based immunoassay (ELISA) により検討した。

### (3) 臨床検体からの 2009/H1N1 インフルエンザウイルスの分離

施設内の倫理委員会、バイオセーフティー委員会の承認を得てインフルエンザ患者からのウイルス分離を行った。日本大学医学部附属板橋病院の総合内科を受診し簡易検査で A 型インフルエンザウイルス抗原陽性の患者からインフォームドコンセントを得て、鼻咽頭拭い液を採取した。BSL3 実験室にて、鼻咽頭拭い液を MDCK 細胞に加えウイルスを感染・増殖させた後に回収した。

### (4) 臨床分離株 2009/H1N1 インフルエンザウイルス感染実験

HTR8 あるいは Swan 71 細胞に臨床分離株 2009/H1N1 インフルエンザウイルスを MOI=5 で感染させた。感染8時間、24 時間後に抗インフルエンザ蛍光抗体で免疫染色し、感染細胞を検出した。培養上清中のインフルエンザウイルス量を HA 法を用いて測定した。細胞のアポトーシスを ssDNA の検出により検討した。

## 4. 研究成果

### (1) インフルエンザウイルス A/Udorn/72 (H3N2) は trophoblast に感染する

#### ① BeWo 細胞への感染

BeWo に A/Udorn/72 インフルエンザウイ

ルス (H3N2) を感染させた。抗インフルエンザ蛍光抗体で免疫染色したところ感染 8 時間後から細胞質内にウイルスタンパクが検出され、インフルエンザウイルスの絨毛細胞への感染が確認された (図 1)。さらに培養上清中に HA 活性を認めた (図 2)。分化誘導後の BeWo 培養上清では HA 活性が抑制された (図 2)。また、ssDNA の検出により感染細胞のアポトーシスを認めた (図 3)。

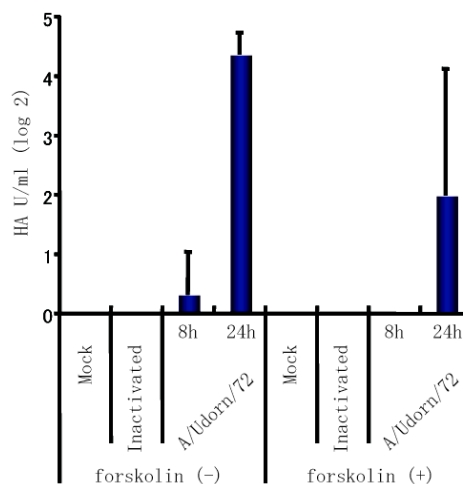
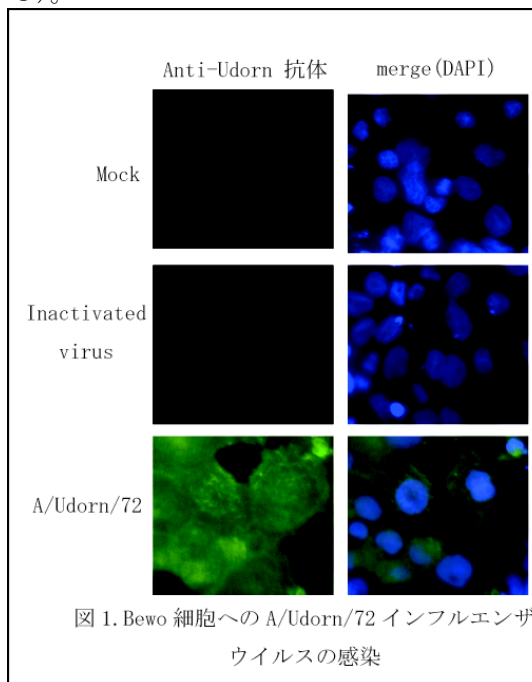


図 2 培養上清中の HA 活性

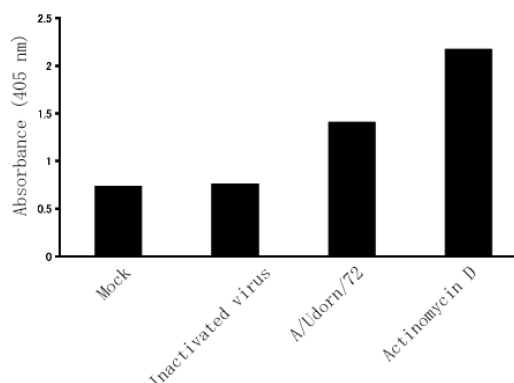


図 3 Apoptosis ELISA

② HTR8、Swan71 細胞への感染

HTR8 およびSwan71 細胞にインフルエンザウイルス A/Udorn/72 (H3N2)を感染させ、抗インフルエンザ蛍光抗体で免疫染色したところ、感染 8 時間後から細胞質内にウイルスタンパクが検出され、インフルエンザウイルスの絨毛細胞への感染が確認された(図4)。さらに培養上清中に HA 活性を認めた(図5)。また、ssDNA の検出により感染細胞のアポトーシスを認めた(図6)。

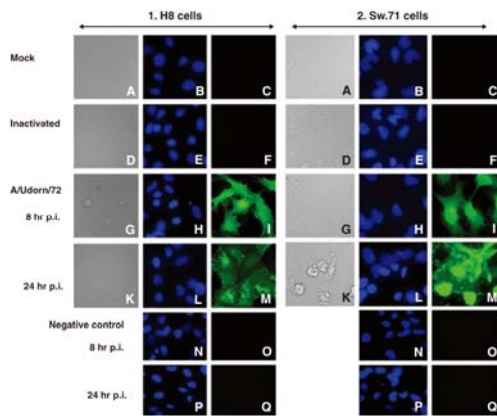


図4 HTR8 (H8)、Swan 71 (Sw71)への A/Udorn/72 インフルエンザウイルスの感染

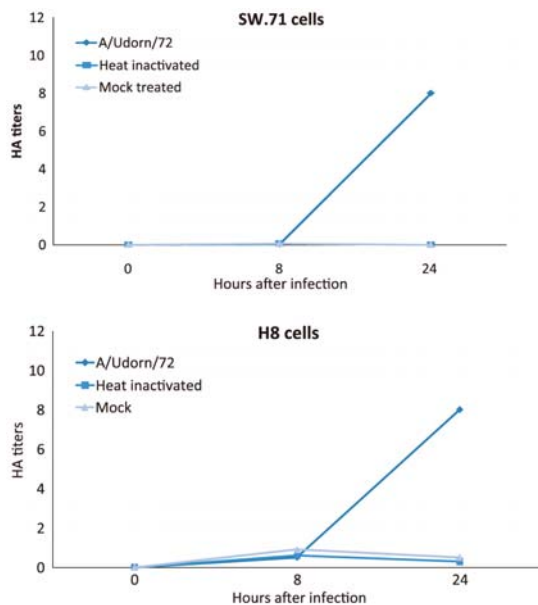


図5 培養上清中の HA 活性

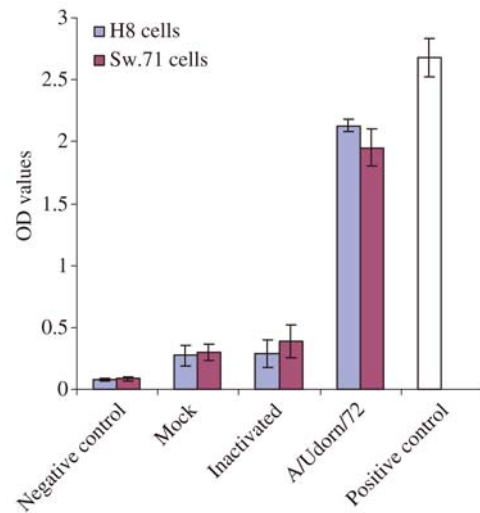


図6 Apoptosis ELISA

これらの結果から、絨毛細胞はインフルエンザウイルスに感受性があり、妊娠中にインフルエンザウイルスに感染すると、胎盤が直接傷害され、低酸素状態や代謝障害によって胎児の発育に影響を及ぼす可能性が示唆された。

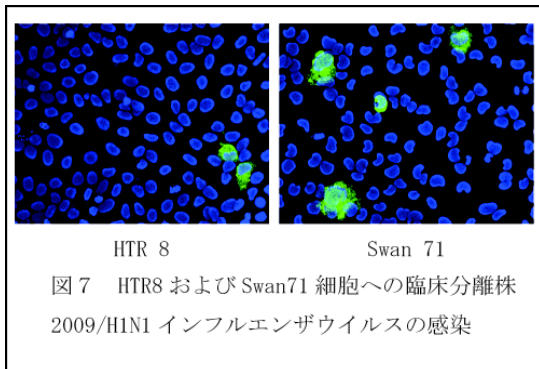
(2) 臨床検体からの 2009/H1N1 インフルエンザウイルスの分離

施設内の倫理委員会、バイオセーフティー委員会の承認を得てインフルエンザ患者からのウイルス分離を行った。日本大学医学部付属板橋病院の総合内科をインフルエンザ症状のため受診し、簡易検査で A 型インフルエンザウイルス抗原陽性の患者からインフォームドコンセントを得て、鼻咽頭拭い液を採取した。BSL3 実験室にて、鼻咽頭拭い液を MDCK 細胞に加えウイルスを感染・増殖させた後に回収した。回収したウイルスから RNA を抽出し PCR にて HA のバンドを確認した。さらに HA のシークエンスを行い分離したウイルスが A Narita 2009 (H1N1) の HA 配列と一致することを確認した。このウイルスを臨床分離株 2009/H1N1 インフルエンザウイルスとして、trophoblast への感染実験に用いた。

(3) 臨床分離株 2009/H1N1 インフルエンザウイルスは HTR8 ならびに Swan71 細胞に感染する

不死化ヒト初期絨毛株 HTR8, Swan 71 に臨床分離株 2009/H1N1 インフルエンザウイ

ルスを感染させ、抗インフルエンザ蛍光抗体で免疫染色したところ感染 24 時間後には細胞質内にウイルスタンパクが検出され、インフルエンザウイルスの感染が確認された (図 7)。しかし、A/Udorn/72 インフルエンザウイルス (H3N2) に比較して、抗インフルエンザ蛍光抗体で染色される細胞数が少なく、感染効率は低いと考えられる。培養上清中の HA 活性も認められなかった。絨毛細胞は 2009/H1N1 インフルエンザウイルスに感受性があるが、他の季節性インフルエンザウイルスと比較して、特に強い感受性があるとはいえない。この結果は、スペイン風邪やアジア風邪のような以前のパンデミックでは、流産、死産などの合併症が増加したとの報告があるのに対して、2009/H1N1 インフルエンザウイルスシーズンではそのような報告がみられないことの pathophysiological な裏付けとなりうる。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Trinh QD, Izumi Y, Komine-Aizawa S, Shibata T, Shimotai Y, Kuroda K, Mizuguchi M, Ushijima H, Mor G, Hayakawa S. H3N2 influenza A virus replicates in immortalized human first trimester trophoblast cell lines and induces their rapid apoptosis. *Am J Reprod Immunol* 査読有、62(3), 2009, 139-146

[学会発表] (計 1 件)

- ① 相澤志保子、早川 智. ブタ由来新型インフルエンザウイルス (H1N1) が初期胎盤絨毛に与える影響. 第 63 回日本産科婦人科学会総会・学術集会. 2011 年 4 月 15 日 (東日本大震災の影響で 2011 年 8 月 29 日に延期となった). 大阪国際会議場 (大阪)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

相澤 志保子 (AIZAWA SHIHOKO)

日本大学・医学部・助手

研究者番号：30513858