

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893135

研究課題名(和文)死亡例におけるインフルエンザウィルスの有無とその潜伏におけるTRIMの役割

研究課題名(英文)The role of TRIM on the latent infection of influenza virus by post-mortem virus detection

研究代表者

吉澤 秀憲 (Yoshizawa, Hidenori)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教(常勤)

研究者番号：90739905

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：潜伏感染等の症状の乏しいウィルス感染では医療機関の関与が少なく、その疫学についての調査が困難である。インフルエンザウィルスは通年で潜在的に感染している可能性があり、致死経過をたどることも知られている。本研究では典型的なウィルス感染症状の無い医療機関外の死亡例に対し、インフルエンザウィルスの検出を試み、死因についての検討を目的とした。

我々の施設で検案した13症例の咽頭ぬぐい液に、インフルエンザウィルスの遺伝子増幅法を施行したところ、1例からB型インフルエンザウィルスが検出された。このことから、死後検体からもウィルスの検出が可能なが分かり、死体検案時におけるウィルス検査の有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To clarify the epidemiology of the latent virus infection is difficult as the latent virus infection often shows non-typical symptoms. Influenza virus infection is epidemic not only in winter but also in summer. The type of influenza virus is different from each year. So, the latent influenza virus infection may happen throughout the season. In this study, we detected the latent infection of influenza virus using PCR for throat swab extracts from the victims out-of-hospital and unveiled the relationship between the cause of death and the latent infection. Influenza virus type B was detected from only one case out of 13 cases. From these finding, it is possible to detect the latent virus infection from post-mortem specimen. Accordingly, it is important that checking the viral infection, especially latent virus, in the post-mortem examination can be useful to diagnose the cause of death.

研究分野：死因診断学

キーワード：死因診断学 病理学 ウィルス学 公衆衛生学 法医学

## 1. 研究開始当初の背景

ウイルス感染症には、急性感染症をおこすものと持続感染をおこすものが知られている。急性のウイルス感染症や、臨床的に明らかな症状を示す持続性ウイルス感染症では、患者自ら医療機関を訪れるため、臨床検査によって原因ウイルスの同定が行われることがほとんどである。一方で、ウイルスの感染には潜伏感染と呼ばれる病態が知られている。これは、一種の持続感染であるが、感染ウイルスの産生が見られないことや、宿主の免疫系がほとんど応答しないことが特徴で、潜伏性のウイルス感染は、一般的に臨床所見に乏しく、したがって臨床検査の対象となりにくいと考えられる。今回我々は、潜伏性のウイルス感染について調査し、その実態を明らかにしようと考えた。

潜伏感染するウイルスとして、本研究ではインフルエンザウイルスに着目した。インフルエンザウイルスは毎年冬季に流行がみられ、11月下旬頃から流行が始まり、翌2月頃にピークとなり、5月頃までに終息していくというパターンであり、ピークの時期や程度はその年によって異なる。また流行する株も年毎に変化があり、予防対策を困難にしている一因となっている。また、最近では夏季にもインフルエンザの集団発生や小流行が報告されている。このことから、年間を通じ、症状のないウイルス感染が潜在的に存在している可能性が考えられ、その実態を明らかにすることは公衆衛生政策上も重要であると考えられる。

ウイルスの潜伏感染に関連した死亡機序としては、一般にウイルスの再活性化によるものが知られている。具体的にはJCウイルスによる進行性多巣性白質脳症等があげられるが、この病態はウイルスの再増殖によるものであり、通常のウイルス感染症と同様に、ウイルスの毒性因子によるものと考えられる。しかしながら、こうした機序によりすべてを説明することは難しい。

近年、ウイルスに対する防御機構として様々な機序が明らかとなっており、その一つに内因性免疫がある。これは、細胞内に存在するウイルス抑制性因子と呼ばれるタンパク質が直接抗ウイルス因子として働くもので、HIV-1に対するA3G等が知られている。なかでも、tripartite motif (TRIM) family proteinはその抑制性因子として同定された物質であるが、最近の研究では、自然免疫系の調節因子としても作用することがわかっている。したがって、ウイルス感染を契機としてTRIMタンパクが発現すると、それ自体の抗ウイルス作用によって、ウイルスの増殖が抑制されるだけでなく、同時に周囲の自然免疫機構へ作用することで、宿主の免疫学的な内部環境に変化を生じることが予想される。したがって、生体における様々な炎症反応の個体間での多様性は、ウイルスの潜伏感染およびTRIMタンパクの働きに起因する

と考えられる。現在、ウイルスに対する内因性免疫として作用するTRIMタンパクにはHIV-1に対するTRIM5のほか、human adenovirusに作用するTRIM21などが知られており、インフルエンザウイルスの潜伏感染とTRIMタンパクの関連についての検討を目的とした。

## 2. 研究の目的

本研究では、死後検体を用い、インフルエンザウイルスの検出を試みた。典型的な急性期のインフルエンザ症状を呈さずに死亡した症例で、どの程度インフルエンザウイルスが検出されるかを調べることで、潜伏感染の頻度や、場合によっては死亡に至る機序についても新たな知見が得られる可能性が考えられる。通常を受診歴のない死亡例で、インフルエンザウイルスの潜伏を調査することは、予防策を考えるうえで必要な情報となることが予想される。また、非典型的な症状であっても、インフルエンザウイルスの存在が確認された場合、そのことを踏まえた死因診断が可能となり、重篤なウイルス感染症の疫学調査として有用であると考えられる。

以上から、本研究では院外における死亡例からインフルエンザウイルスを検出し、死因診断および公衆衛生に役立てることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 検体採取について

当施設の倫理審査委員会において本研究に対する承認を取得後、検体採取を開始した。検体採取は大阪府監察医事務所において、研究代表者が監察医として担当した検案症例を対象とした。ただし、死後経過時間が72時間以上と推定されるもの、溺水や誤嚥等、明らかに異物を吸引しているものは対象外とした。

検体としては、インフルエンザウイルスの増殖部位でもあり、かつ死体検案で採取が可能であることを考慮し、咽頭ぬぐい液を選択した。

### (2) 採取方法

滅菌済み綿棒にて、遺体から経鼻的に咽頭ぬぐい液を採取する。

採取後綿棒を、滅菌済み2.0 ml チューブにあらかじめ分注したTRIzol® Reagent(Thermo Fisher Scientific) 1.0 mlに懸濁する。

検案業務中は室温にて保存し、業務終了後、-80にて下記手順の施行まで保管する。

### (3) ウィルス核酸抽出・精製

得られたTRIzol® sampleにクロロホルムを加え、十分に遠心分離した後、RNAを含む水相の上清を回収する。

再度70%エタノールで洗浄、遠心後、上清からPureLink® RNA Mini Kit (Thermo Fisher

Scientific) を用い、抽出された RNA の精製物を回収する。

#### (4) ウィルス RNA の検出

##### 検出法について

本研究では conventional PCR 法にてウィルス核酸の検出を行った。

インフルエンザウィルスはオルトミクソウィルス科に属し、エンベロープに包まれたマイナス鎖の一本鎖 RNA を遺伝子として持っている。このため、PCR 反応にはウィルス RNA に相補的な DNA(cDNA) を reverse transcriptase (RT) で合成する必要がある。本研究では RT 反応と PCR 反応をシングルチューブで行う One-Step RT-PCR 法と電気泳動によりインフルエンザウィルスの検出を行った。

また、インフルエンザウィルスはウィルス粒子内部に存在する核蛋白質(NP)およびマトリックス蛋白質(M1)の抗原性の違いから、A,B,C の 3 つの型に分けられる。本研究では季節性インフルエンザとして、A 型および B 型の検出を行い、A 型インフルエンザウィルスが検出されたものに対して H1pdm09、H3、H1 ソ連型の 3 亜型を同定することとした。

##### プライマーについて

国立感染症研究所で使用されており web 上で公開されているインフルエンザウィルス遺伝子同定用プライマーを用いた。

##### (A 型同定用)

Type A/M 遺伝子検出用プライマー

TypeA/M30F2/08

5'-ATGAGYCTTYTAACCGAGGTCGAAACG

TypeA/M264R3/08

5'-TGGACAAANCCTACGCTGCAG

PCR 産物の長さ 244bp

##### (B 型同定用)

B 型 HA 遺伝子検出用プライマー

BHA1-N

5'-AATATCCACAAATGAAGGC

BHA1-C

5'-AGCAATAGCTCCGAAGAAAC

PCR 産物の長さ 1116 もしくは 1119bp

##### (H1pdm09 亜型同定用)

H1pdm09 HA 遺伝子検出用プライマー

NIID-swH1 ConvPCR Primer-F1

5'-TGCATTTGGGTAATGTAAACATTG

NIID-swH1 ConvPCR Primer-R1

5'-AATGTAGGATTTCTGAKCTTTGG

PCR 産物の長さ 349bp

##### (H3 亜型同定用)

H3 HA 遺伝子検出用プライマー

H3HA1-BIGIN

5'-AGCAAAGCAGGGGATAATTC

H3HA1-END

5'-TGCCTGAAACCGTACCAACC

PCR 産物の長さ 1143bp

##### (H1 ソ連型亜型同定用)

H1 former seasonal HA 遺伝子検出用プライマー

マー

H1 HA1-BEGIN

5'-AGCAAAGCAGGGGAAAATAA

H1 R10

5'-GCTATTTCTGGGGTGAATCT

PCR 産物の長さ 729bp

##### One-step RT-PCR 反応

One-step RT-PCR kit(QIAGEN) を用いて RT-PCT 反応を行った。サーマルサイクラーは GeneAmp® PCR System 9700(Applied Biosystems)および GeneAtlas 322(ASTEC)を用いた。

反応条件は下記のとおり行った。

(Type A, H1pdm09 同定用)

50 30min.

95 15min.

94 30sec. }  
50 30sec. } × 45 cycles  
72 40sec. }

72 10min.

4

(H3, H1 ソ連型, Type B 同定用)

50 30min.

95 15min.

94 30sec. }  
50 30sec. } × 45 cycles  
72 80sec. }

72 10min.

4

##### 電気泳動

電気泳動装置 Mupid-2plus®(Mupid) UV 照射写真撮影装置、電気泳動用 2%アガロースゲル、分子量マーカー(100 bp DNA ladder, Promega 社)、1xTAE 電気泳動バッファー(TAE Buffer 40x(Promega)を希釈して使用)、DNA 染色試薬 ローディングバッファー EZ-Vision®(AMRESCO)を用いて電気泳動を行った。

泳動はローディングバッファー 1 µl に対し、検体 (PCR 産物) 4 µl をピペティングにて混和し、アガロースゲルのウェルに混合液 5 µl をアプライし、100V、30 分以上電気泳動した。泳動後、ゲルを UV 照射写真撮影装置上に置き、写真撮影した。

#### 4. 研究成果

上記 3.(1)、(2)の手順で H28.3 月中旬より、研究期間終了の同年 3 月下旬まで検体採取を行った。全体で 13 症例からの検体を得ることができた。

上記 3(3)、(4)の方法でウィルス遺伝子の検出を行った。

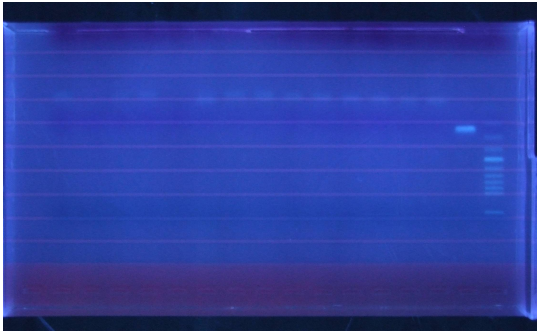


図 1 A 型検出用プライマー使用

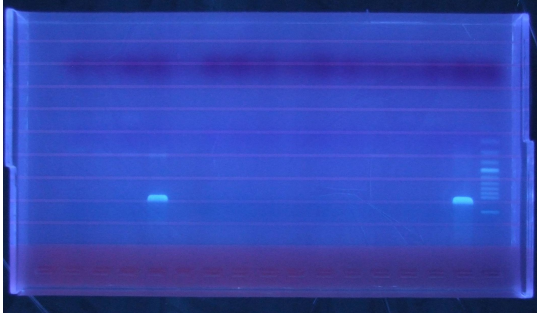


図 2 B 型検出用プライマー使用  
(図 1,2 とも右のレーンから、分子量マーカー、陽性コントロール、陰性コントロール、検体 1~検体 13)

13 症例のうち、1 例で B 型インフルエンザウイルスが検出された。

インフルエンザウイルスは比較的不安定なウイルスであるため死後変化によってウイルス核酸が変性する可能性もあったが、少なくとも一定のウイルス量があれば今回の手法を用いて、死後検体からもインフルエンザウイルスの遺伝子が検出可能であることが確かめられた。

また、今回得られた検体では、いずれも生前に典型的なインフルエンザ症状を呈していた症例はなく、医療機関においてインフルエンザウイルス感染を指摘されている症例もなかったが、死後検体からは 1 例でインフルエンザウイルスが検出された。このことから示唆されることとして、一つにはウイルスが潜伏感染していた可能性が考えられる。今回の検体採取期間では、インフルエンザウイルスの流行期は終息しかかっていたが、1 例で陽性例が認められたことは、医療機関等において、把握されている流行状況が死後検体による検査結果にも反映していると考えられる。今後も症状の明らかでない死亡例による調査を継続することで、真のウイルス潜伏状況が把握できるようになると考えられる。もう一つの可能性として、感染徴候が非典型的なものであった可能性が考えられる。鑑別としては、ウイルス自体が強毒性の変異株であった可能性や、ウイルス保有者が高齢である等によって生理的な生体反応を示さなかったが、免疫学的には高度の炎症反応が全身で起こっていた可能性が考えられるが、これは非典型的な症状を呈するものの、本質的にはウイルスの毒性因子による病態であると

考えられる。一方では、研究開始当初想定していた様に、TRIM タンパクのように、ウイルス自体の毒性因子というよりもむしろ、宿主側が有する抗ウイルス作用を含む免疫学的特徴に病態の本質がある可能性も考えられる。いずれにせよ、陽性例を集積することで新たな解析が可能になるものと考えられる。

## 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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

<http://www.legal.med.osaka-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉澤 秀憲 (YOSHIZAWA, Hidenori)  
大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)  
研究者番号：90739905