

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19228

研究課題名(和文)重症化予防のためのインフルエンザウイルス株の増殖能と増殖因子の検討

研究課題名(英文) influenza virus replication capacity and the factor for prevention of severe influenza

研究代表者

常城 朱乃(Tsuneki, Akeno)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：90632901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザは症例・関連死亡率が多い割に、重症化回避のための診断法は未開発である。我々は、一定量のインフルエンザウイルスを培養細胞に感染させ72時間後のウイルス量を評価することにより、ウイルス株により増殖能に大きな違いがあることを示した。また、インフルエンザ重症化症例の一部に細胞傷害が関与していることが死亡解剖体の病理所見に確認されていることから、インフルエンザウイルスの細胞傷害能を増殖能と比較するパイロット調査を行ったところ、A(H1N1)亜型とB型について増殖能が高いほど細胞傷害率が高い結果を得た。このことは、増殖能が有望な重症化予測因子であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Diagnostic method for avoiding severe influenza has not been developed yet, though there are many severe cases associated influenza. We showed that influenza virus strains had difference replication capacities were assessed by the yielded viral RNA in the culture for 72 hours after virus inoculation of 3,300 copies/ml to MDCK cells. It was reported that the cytotoxicity was involved in a part of severe cases of influenza by the pathological findings of the dead anatomy. When we conducted a pilot study comparing influenza virus cytotoxicity to virus replication capacity, we found that the high replication capacity of A (H1N1) and B viruses correlated the high cytotoxicity rate. This study suggested that replication capacities will be a factor of predicting of severe influenza cases.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザウイルス 増殖能 細胞傷害性

1. 研究開始当初の背景

(1) インフルエンザ重症化予防に増殖能診断が果たす役割

インフルエンザによる年間死亡者数は、約1万人である。重症化による死亡例が多いにもかかわらず、重症化を予想できる判断基準はない。日常診療では、定性的な診断(型・亜型の判別を含む)のみ可能であり、定量診断は用いられない。一方、ヒト免疫不全ウイルスやB型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスなどによる慢性感染症の重症度は、ウイルス量を重要な判断基準にしている(Reid SD et al. Clin Epidemiol. 2013)。したがって、インフルエンザウイルス量と重症度との相関を検討する意義は大きく、重症化指標樹立への期待は大きい。

(2) ウイルス株の増殖能には差がある。

私たちは、A(H1N1)09型の40株について増殖ウイルス量(増殖能)に差があることを明らかにした(自験例:A. Tsuneki et al. J. Med. Virol. 2013)。一定量のウイルスを吸着させた細胞から産生される子孫ウイルス量は、株によって差が見られた。

2. 研究の目的

(1) インフルエンザの重症化症例の調査は、世界的に新しい試みであり(Puig-Barera et al., 2015)、既存の調査項目は、患者のワクチン接種歴、他の病原体との重複感染、インフルエンザウイルスの型・亜型などに限られている(Lekhan et al., 2016)。より詳細な重症化指標が求められるため、インフルエンザウイルス株が持つ増殖能という性質に注目し、A(H1N1)亜型、A(H3N2)亜型、B型すべてにおいて株による違いを解析した。

(2) インフルエンザ重症化例の少なくとも一部に細胞傷害、特に肺胞上皮の傷害が大きく関与していることが、2009年流行期に死亡解剖体の病理所見に確認された(Shieh et al., 2010)。そこで、インフルエンザウイルスの細胞傷害能を、増殖能と比較するパイロット調査を行った。高増殖能株とインフルエンザ重症化との関連を検証し、重症化予測因子の開発を目指す。

3. 研究の方法

鳥取県感染症懇話会の協力を得て、3,000株以上の解析試料を確保する。その後、核酸解析(ウイルス分離、核酸分離、型・亜型判別)、増殖能解析(MDCK細胞に暴露・培養後、増殖ウイルス量を測定する)、細胞傷害能解析(MDCK細胞に暴露・培養後、生細胞数を測定する)の順に進めた。

(1) 核酸解析

患者鼻汁採取:鳥取県感染症懇話会の臨床医の協力を得て、500検体/年を目標にインフルエンザ抗原陽性患者の鼻汁を採取した。

ウイルス分離:500株/年を目標に、MDCK細胞に鼻汁を接種し、ウイルス分離株を得た。

核酸分離:RNA抽出後、one-step RT-PCR法(Zhou B. et al. 2009)でcDNAを作成した。

型・亜型判別:亜型特異的なプライマーを用いてPCR後、電気泳動により型・亜型を判別した。

(2) 増殖能解析

3,300 copies/mlの濃度で50株/年以上のウイルス株をMDCK細胞に暴露させ、72時間後の増殖ウイルスRNAコピー数を測定することにより増殖能を決定する。コピー数の測定は、Real-time RT-PCR法(Chidlow G. et al. 2010)を用いた。また、A(H1N1)亜型、A(H3N2)亜型とB型のマトリックス部分を試験管内で人工合成し、既知の濃度のRNAを確保した。

(3) 細胞傷害能解析

10^7 copies/mlの高・低増殖能株をMDCK細胞に暴露させ、72時間後の細胞傷害率を比較する。細胞傷害能は、WST法(WST-8を生細胞に含まれる酵素で反応したWST-8 formazanで評価)を用い、ウイルス非暴露時(コントロール)の生細胞数と比較し、細胞傷害率を算出した。

なお、 10^7 copies/mlのウイルス暴露濃度が高濃度であり、細胞死の差を十分に表現できていない可能性を考慮し、 10^6 、 10^5 copies/mlの濃度でもウイルスの暴露を試みた。

4. 研究成果

(1) 季節性インフルエンザ患者のウイルス株の増殖能力について経年的に検討した例は、世界的に稀である。我々は、2009年以降現在まで7回の流行期に、合計3,227鼻汁検体よりウイルス分離を試み、2,902株の分離に成功した。これらの株の増殖能を解析した結果、株間に増殖能の違いがみられ、新型の登場した2009年を除き、全ての流行期に、明らかに増殖能の違うウイルスが検出された(図1)。また、増殖能はin vitroでの継代に影響を受けず、安定して評価可能であった(図2)

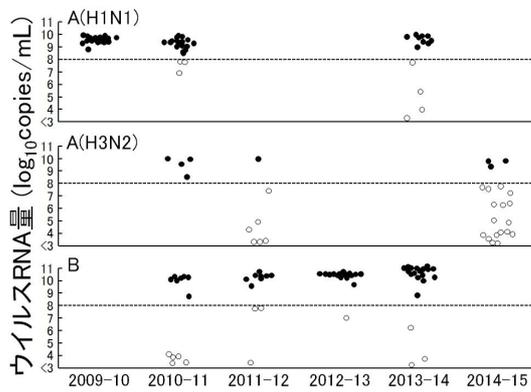


図 1 各流行期に分離された A(H1N1)、A(H3N2)、B 型株が示す増殖能の違い
2009 年を除き、高増殖能株と低増殖能株が見られた。

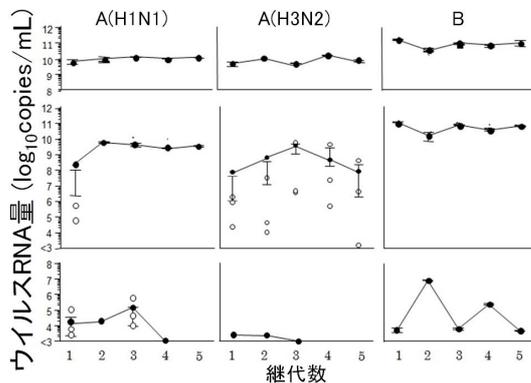


図 2 増殖能の表現型の変化
継代によって増殖能レベルは変化しない。
4 つの培養上清平均のウイルス量に最も近いウイルス株を継代に供した。

(2) インフルエンザウイルスの細胞傷害能を、増殖能と比較するパイロット調査を行ったところ、A(H1N1)亜型と B 型については、増殖能が高いほど細胞傷害率が高い結果を得た。一方、A(H3N2)亜型には、増殖能と細胞傷害能との関連がみられなかった(図 3)。増殖能の高さが必ずしも細胞傷害に関連しない株についての原因は、今後の課題として残されている。

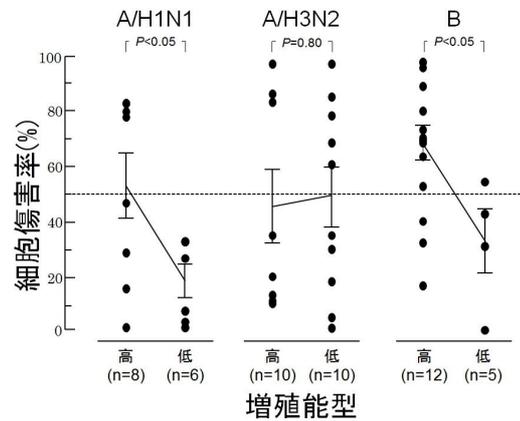


図 3 増殖能型と細胞傷害率
A/H3N2 を除く、A/H1N1、B では、高増殖能株ほど細胞死の割合が高い傾向がみられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Ito A, Tsuneki A, Yoshida Y, Ryoke K, Kaidoh T, Kageyama S. In Vitro Inhibition of Cytopathic Effect of Influenza Virus and Human Immunodeficiency Virus by Bamboo Leaf Extract Solution and Sodium Copper Chlorophyllin. *Yonago Acta Med*, 59: 61-65, 2016. (査読有り)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4816750/pdf/yam-59-061.pdf>

Yoshida Y, Tsuneki A, Itagaki A, Tsuchie H, Okada T, Narai S, Kasagi M, Tanaka K, Ito A, Ryoke K, and Kageyama S. Frequent Isolations of Influenza A Viruses (H1N1)pdm09 with Identical Hemagglutinin Sequences for more than Three Months in Japan. *Yonago Acta Med*, 58: 165-171, 2015. (査読有り)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4701988/pdf/yam-58-165.pdf>

〔学会発表〕(計 1 件)

常城 朱乃、景山 誠二、過去 5 年間の流行期間中に生じたインフルエンザウイルスの変異の程度について、第 56 回日本臨床ウイルス学会、2015 年 6 月 14 日、岡山大学鹿田キャンパス(岡山県・岡山市)

〔図書〕(計 1 件)

常城 朱乃、金原出版、小児科、2016、6

〔その他〕

鳥取大学医学部ウイルス学分野ホームページ

<http://www.med.tottori-u.ac.jp/virus/6022.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

常城 朱乃 (TSUNKI, Akeno)
鳥取大学・医学部・助教
研究者番号：90632901

(2) 研究協力者

青木 美帆 (AOKI, Miho)
笠木 正明 (KASAGI, Masaaki)
奈良井 栄 (NARAI, Sakae)
岡田 隆好 (OKADA, Takayoshi)
田中 清 (TANAKA, Kiyoshi)
土江 秀明 (TSUCHIE, Hideaki)
板垣 朝夫 (ITAGAKI, Asao)