

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17353

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の検討

研究課題名(英文) Replication competence of epidemic influenza viruses for preventing severe influenza disease

研究代表者

徳永 朱乃 (TSUNEKI-TOKUNAGA, 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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：2009年の新型インフルエンザ流行後、市中で流行するインフルエンザウイルスの増殖能とウイルス誘発性細胞死への影響については十分に調査されていない。我々は、2009年から2015年に採取された鼻咽頭拭い液からMDCK細胞でウイルスを分離した。ヒトで流行する全てのインフルエンザの型・亜型(A/H1N1, A/H3N2, B)において、MDCK細胞で幅広い増殖能を示した。増殖能はヒト肺胞上皮細胞由来A549細胞の細胞傷害程度、および、鼻汁中のウイルス量と相関していた。増殖能はインフルエンザ予後を予測する重要な因子であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インフルエンザの重症化予測因子の開発は、今後の世界的課題である。我々は、流行インフルエンザウイルスの増殖能に大きな違いがあることを見出した。また、増殖能が細胞傷害の程度、鼻汁中のウイルス量に相関しているという結果も得た。増殖能研究の最終目標は、増殖能を簡便な診断学に発展させ、臨床現場で重症化を予測できる医療の実現である。一方で、増殖能の高い株を優先的に制御する、国際的サーベイランスのためのマーカーとしての開発も期待される。

研究成果の概要(英文)：Growth capability of epidemic influenza viruses and its influence on virus-induced cell death has not been fully investigated after the 2009 H1N1 pandemic.

Nasopharyngeal swabs collected in Tottori Prefecture, Japan from 2009 to 2015 were subjected to virus isolation in a MDCK cell line. Epidemic influenza A/H1N1, A/H3N2, and B viruses showed a wide range of growth capability in MDCK cells. The growth was similar in A549 cells, correlated with the death rate of A549 cells, and the nasopharyngeal viral load. Growth capability should be considered as one of the key factors to predict prognosis.

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 肺胞上皮細胞傷害 鼻汁中ウイルス量

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザは時に致死性であり、ハイリスク群(乳幼児、高齢者、妊婦、基礎疾患を有する者)にとって重要な課題である。しかし、重症化の原因は明確でなく、重症化予測は困難である。我々のパイロット調査の結果、インフルエンザウイルスは、株により増殖能に大きな違いがあり、増殖能が高いほど細胞傷害能も大きいことを示していた。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。

### 2. 研究の目的

本研究では、高増殖能株とインフルエンザ重症化との関連を明らかにするために、(1)増殖能と肺胞上皮細胞の細胞傷害の程度との関連、(2)増殖能と重症化の指標とされる鼻汁中のウイルス量の関連を検討する。さらに、増殖能を決定するウイルス遺伝子を探索するため、(3)増殖能の異なる株の遺伝子配列を比較する。

### 3. 研究の方法

(1)インフルエンザウイルスの肺胞上皮細胞傷害能に関しては、扁平上皮細胞癌由来の A549 細胞に一定量のウイルスを感染させ、培養後、蛍光染色法により細胞傷害率を測定し、増殖能との関連を検討する。

さらに、MDCK 細胞と A549 細胞に 5 つの株と実験室株を一定量感染させ、WST 法により 24 時間ごとの細胞生存率を測定し、増殖能との関連を検討する。

(2)鼻汁中のウイルス量に関しては、鼻汁臨床検体の RNA 量を測定し、増殖能との関連を検討する。

(3)増殖能を決定するウイルス遺伝子に関しては、これまでに報告されている増殖能に関連した 24 個の主要なアミノ酸について、増殖能との関連を検討する。

### 4. 研究成果

2009 年から 2015 年に鼻咽頭拭い液から採取されたインフルエンザウイルスは、ヒトで流行する全ての型・亜型(A/H1N1, A/H3N2, B)において、MDCK 細胞で幅広い増殖能を示した(図 1)。A/H1N1 (2009-2010, n=21; 2010-2011, n=20; 2013-2014, n=11; Total, n=52)、A/H3N2 (2010-11, n=4; 2011-2012, n=10; 2012-2013, n=7; 2014-2015, n=21; Total, n=42)、B (2010-2011, n=12; 2011-2012, n=11; 2012-2013, n=17; 2013-2014, n=22; Total, n=62)。

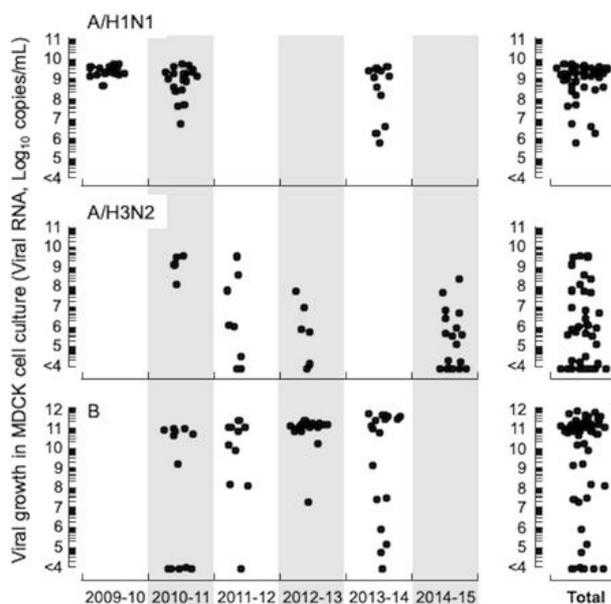


図 1 2009 年から 2015 年までのインフルエンザウイルスの増殖能

(1) 増殖能と肺胞上皮細胞傷害の程度に相関がみられた(図2)。A/H1N1:  $n=9$ ,  $r=0.67$ ,  $P<0.05$ ;  
A/H3N2:  $n=10$ ,  $r=0.86$ ,  $P<0.05$ ; B:  $n=10$ ,  $r=0.63$ ,  $P=0.05$ ; Total:  $n=29$ ,  $r=0.65$ ,  $P<0.05$ 。

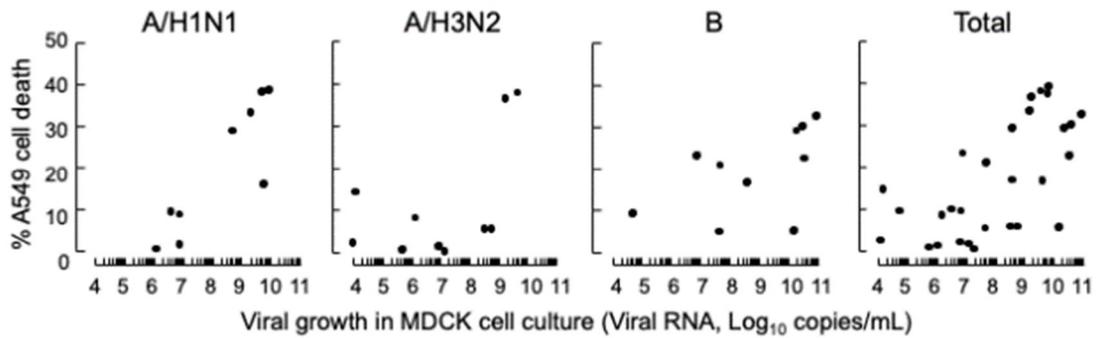


図2 増殖能と肺胞上皮細胞傷害の程度

さらに、増殖能に対する細胞生存率は、明らかに株特異的に異なるレベルに減少した(図3)  
(PR8, ST1349, ST215, ST1890, ST777, ST1705)。MDCK cell culture:  $r=0.96$ ,  
 $P<0.05$ 。

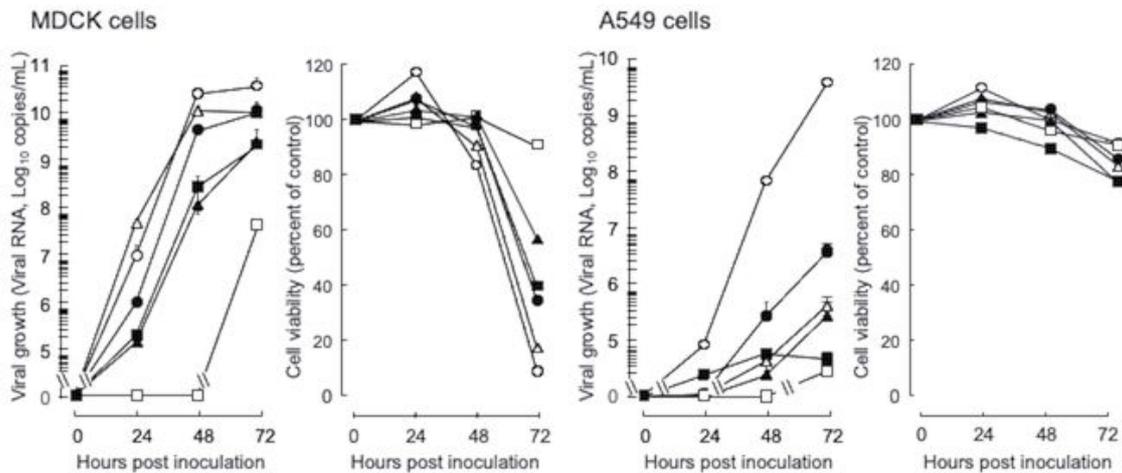


図3 増殖能と細胞生存率

(2) 増殖能と鼻汁中のウイルス量に相関がみられた(図4)。A/H1N1:  $n=27$ ,  $r=0.40$ ,  $P<0.05$ ;  
A/H3N2:  $n=24$ ,  $r=0.45$ ,  $P<0.05$ ; B:  $n=25$ ,  $r=0.51$ ,  $P<0.05$ ; Total:  $n=76$ ,  $r=0.53$ ,  $P<0.05$ 。

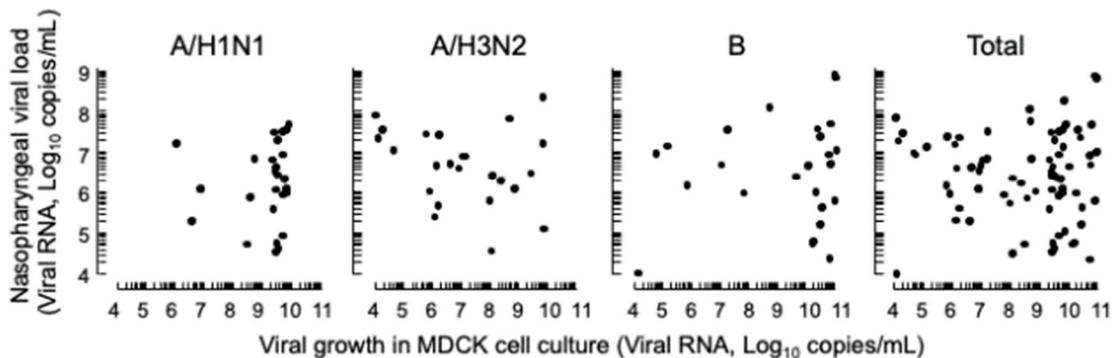


図4 増殖能と鼻汁中のウイルス量

(3) これまでに報告されている増殖能に関連した 24 個の主要なアミノ酸について、増殖能とウイルス遺伝子の関連性は確認されなかった (表 1)。現在、純系ウイルスを作出し、高増殖能を規定する責任遺伝子の同定に挑戦するための準備を進めているところである。

表 1 増殖能に関連した主要なアミノ酸

Strain ID	PB2				PB1			PA					HA				NP	NA	M			NS		
	482*	591	627	701	207	436	538	149	266	357	515	529	47	52	156	218	357	369	30	139	215	103	106	125
PR8	K	Q	K	D	K	Y	D	S	R	T	T	D	V	D	G	V	K	D	D	T	A	S	I	D
ST1349	-	R	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	V	I	I	-	T	-	-	-	F	M	E
ST215	-	R	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	S	-	-	F	M	E
ST1890	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	V	I	I	-	T	-	-	-	F	M	E
ST1705	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	V	I	I	-	T	-	-	-	F	M	E
ST777	-	R	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	V	I	I	-	T	-	-	-	F	M	E

\*: Reported amino acids related to pathogenicity in animal model. A laboratory strain (PR8) and five epidemic strains (ST1349, ST215, ST1890, ST1705 and ST777) appeared in the order of viral growth levels.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsuneki-Tokunaga Akeno, Kanai Kyosuke, Itagaki Asao, Tsuchie Hideaki, Okada Takayoshi, Kasagi Masaaki, Tanaka Kiyoshi, Aoki Miho, Hinay Alfredo Jr. A., Kageyama Seiji	4. 巻 166
2. 論文標題 Growth capability of epidemic influenza viruses in Japan since the 2009 H1N1 pandemic	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 1193 ~ 1196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00705-021-04976-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Akeno Tsuneki-Tokunaga, Kyosuke Kanai, Seiji Kageyama
2. 発表標題 Various levels of replication competence of epidemic influenza viruses influencing upon virus-induced cell death
3. 学会等名 日本ウイルス学会
4. 発表年 2018年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------