

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：24303
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：21H03184
研究課題名（和文）SARS-CoV-2およびインフルエンザウイルス伝播機構の解明

研究課題名（英文）Transmission of SARS-CoV-2 and influenza viruses

研究代表者

中屋 隆明（Nakaya, Takaaki）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：80271633

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：高病原性鳥インフルエンザH5N1の環境中及びヒト皮膚上の安定性および消毒薬（アルコール等）耐性が他のインフルエンザウイルスと比較して高いことを見出し、得られた成果を論文発表した。また、アルコール系以外の各種消毒薬のSARS-CoV-2およびインフルエンザウイルスに対する消毒効果を評価し、これら消毒薬の環境中および手指衛生に関する効果を論文発表した。さらに免疫不全状態にあるCOVID-19長期感染者において、生物学的製剤、レムデシビルおよびニルマトレルビルに対する耐性変異ウイルスのウイルスゲノム解析およびin vitro感染試験等により解析し、得られた成果を論文発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の遂行により、SARS-CoV-2コロナウイルスおよびH5N1を含む（鳥）インフルエンザウイルスの環境中および生体（手指）表面における感染動態を統一した評価系を用いて解析することが可能となった。その結果、種々の消毒薬の抗ウイルス活性を評価することができ、これら病原ウイルスのヒト間伝播機構の解明につながる知見を集積することができた。加えて、COVID-19長期感染者において出現した薬剤耐性ウイルスのウイルス学的性状（遺伝子変異）を明らかにした。さらに、これら薬剤耐性ウイルスの感染力は野生型に比べて低下していることを見出し、市中感染するリスクは低いことを示唆する結果を発表した。

研究成果の概要（英文）：The stability of highly pathogenic avian H5N1 influenza virus in the environment and on human skin, as well as its resistance to disinfectants (such as alcohol), was found to be higher compared to other influenza viruses, and the results were published in a paper. Additionally, the disinfectant effects of various non-alcohol-based disinfectants against SARS-CoV-2 and influenza viruses were evaluated, and the effects of these disinfectants in the environment and on hand hygiene were published in papers. Furthermore, in long-term COVID-19 patients with immunodeficiency, the viral genome analysis and in vitro infection experiments of resistant mutant viruses against sotrovimab, remdesivir, and/or nirmatrelvir were conducted, and the findings were published.

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 コロナウイルス COVID-19 伝播機構 SARS-CoV-2 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

2019年終わりからパンデミックを引き起こした COVID-19 の原因病原体である SARS-CoV-2 の感染者は 2020 年 10 月半ばの時点で 4000 万人を超え、死者は 110 万人に達している。また、インフルエンザウイルスによる世界中の年間死者数は 29-65 万人に及ぶ (WHO) と報告されている。インフルエンザウイルスは人獣共通感染症であり、これまでの鳥インフルエンザ H5N1 ウイルスのヒト感染は散発的であるものの、致死率は 50%を超えている。したがって、2009 年に発生した H1N1pdm のようにヒト間で効率的に伝播を起こす (鳥インフルエンザウイルス由来の) 変異ウイルスが出現すると、極めて危険な新型インフルエンザウイルスとなることが危惧され、これらのウイルスはパンデミック予備群と位置付けられる。

このようなウイルス感染に対する生体側の免疫機構として、獲得免疫、自然免疫があるが、さらに前線の防御機構として、皮膚・粘膜および、涙・鼻水・唾液・喀痰などの生体粘液による物理的・化学的生体防御 (バリア) がある。我々はこれまでに皮膚表面および喀痰中に存在する SARS-CoV-2 およびインフルエンザウイルスの感染力の経時変化を解析し、両ウイルスと生体バリアとの攻防の一端を明らかにすることができた。

本研究では上記研究をさらに進展させ、SARS-CoV-2 およびインフルエンザウイルスにおける「環境中安定化要因」と「生体の物理的・化学的バリアとの攻防」に焦点を当てた研究を行う。本研究の遂行により、SARS-CoV-2 およびインフルエンザウイルスのヒト間伝播機構の解明、および、パンデミック予備群と考えられる H5N1 (および H7N9) ウイルスのヒト間感染拡大のリスク評価に寄与することが期待できる。

2. 研究の目的

本研究ではコロナウイルス (SARS-CoV-2) およびインフルエンザウイルスのヒト間伝播機構の解明を研究目的とする。そのために、これらウイルスにおける「環境中安定化要因」と「生体バリアとの攻防」について知見を集積することを計画している。

3年間の研究期間内に以下の課題を予定している。

- (1) コロナウイルスの生体および環境中におけるウイルス粒子安定性の解析、
- (2) 環境中におけるインフルエンザウイルスの安定性解析、
- (3) 生体粘液・生体 (表面上) の抗ウイルス機構および治療薬・消毒薬効果の評価、

本研究の遂行により、コロナウイルスおよび (鳥) インフルエンザウイルスのヒト間伝播機構の解明、および上記ウイルスのヒト間感染拡大 (パンデミック) のリスク評価、に寄与することが期待できる。加えて、COVID-19 感染症例について、(薬剤耐性) ウイルス変異のウイルス学的研究を併せて行い、

(4) 薬剤耐性 SARS-CoV-2 ウイルスの出現機構および感染伝播力の評価を行うことを研究目的とした。

3. 研究の方法

1. 「コロナウイルス (SARS-CoV-2) および (鳥) インフルエンザウイルスの生体 (皮膚など剖検体由来組織) および環境中におけるウイルス粒子安定性の解析」

ウイルス粒子の乾燥状態に着目し、様々な環境下におけるウイルス感染力の経時変化 (残存

性)について解析した。また、法医解剖献体由来の培養皮膚による病原体安定性評価モデル「ヒト皮膚モデル」を構築し、皮膚上におけるSARS-CoV-2およびインフルエンザウイルスの生存時間をシミュレートし、種々の消毒薬によるウイルス不活化実験を行った。

2. 「COVID-19感染者における(薬剤耐性)ウイルス変異の意義」

腎移植後および多発性骨髄腫治療中の免疫不全状態にある長期COVID-19感染者にフォーカスし、生体内におけるウイルス進化について解析する。特に、生物学的製剤を含む抗ウイルス薬に対する耐性ウイルスの出現について解析し、薬剤耐性変異ウイルスのウイルス学的特徴についてウイルスゲノム解析およびin vitro感染試験等により解析した。

4. 研究成果

2021 年度実績

高病原性鳥インフルエンザ H5N1 の環境中及びヒト生体(皮膚)上の安定性および消毒薬(エタノール)耐性が他のインフルエンザウイルスと比較して高いことを論文発表(Emerg Infect Dis. 2022;28(3):639-649)した。さらにウイルス側要因としてNAが重要であることを示唆する結果を得た。また、確立したヒト生体(皮膚)モデルを用いて、エタノールやイソプロパノールに加えて、非アルコール系のグルコン酸クロルヘキシジン・塩化ベンザルコニウムがSARS-CoV-2およびインフルエンザウイルスに対する消毒効果が見られる条件を評価し、これら消毒薬の手指衛生に関する提案を論文発表した(Clin Microbiol Infect. 2021;27(7):1042.e1-1042.e4.)。さらに、上記ウイルスについて、消毒薬に対する(塗布後乾燥した条件での)残留効果を評価し、エタノールやイソプロパノールなどのアルコール系消毒薬には残留消毒効果がほとんど認められなかった一方で、グルコン酸クロルヘキシジン・塩化ベンザルコニウムなどの消毒薬には残留消毒効果が認められたことを論文発表(Environ Sci Technol. 2021;55(23):16044-16055)した。この評価システムを用いて、普通紙やインクジェット紙など種々の紙に付着したウイルスの感染保持時間を測定し、論文発表した(J Infect Chemother. 2022;28(2):252-256)。

2022 年度実績

SARS-CoV-2と同じベータコロナウイルス属であるHCoV-OC43のVero-TMPRSS2細胞を用いた細胞傷害性(TCID50)評価システムを確立し、OC43ウイルスの環境下での感染力の経時変化(残存性)を解析した(Microbiol Spectr. 2023;11(2):e0238122)。また、これまでに報告されている疫学上懸念されるSARS-CoV-2変異ウイルス(VOC)を用いた解析を行い、進化に伴うウイルス粒子の環境中安定性の変遷を評価した。その結果、武漢株(パンデミック発生時)から順に出現したアルファ株、ベータ株、ガンマ株、デルタ株、オミクロン株(BA.1およびBA.2)の環境中(プラスチック上、皮膚上)の残存時間(中央値)はそれぞれ8.6、19.6、11.0、16.8および21.1、22.5時間でありオミクロン株の環境中安定性が高いことが示唆された。一方で、上記全ての株は35%エタノール処理により15秒以内に完全に失活することも明らかにした(Clin Microbiol Infect. 2022;28(11):1486-1491)。

2023 年度実績

綿、ポリエステル製の乾燥スワブ(乾燥条件)と回収液に浸したスワブ(湿潤条件)での擦過回収について、種々の物体表面に対しインフルエンザウイルス等を塗布し、ウイルスRNA、感染性ウイルスの回収率を比較した。その結果、全ての表面において乾燥条件と比較して湿潤条件で回収率が上昇した。また、回収率は綿スワブがポリエステルスワブより優れ、単位面積当たりのスワブの水分放出量と感染性ウイルス回収率が正の相関を認めた。以上より、最も効

果的な回収法は湿潤な綿スワブを用いて10平方センチメートル程度の面積をサンプリングすることであり、以上の成果をまとめて論文発表した(Environ Int. 2023;180:108199)。

また、腎移植患者におけるソトロビマブおよびレムデシビルに対する耐性ウイルスの解析を行い、スパイク (S) タンパク質とRNA dependent RNA polymerase (RdRp) に耐性変異 (S:E340A/RdRp:V792I) を見出した。一方で、耐性ウイルスのin vitro増殖性は野生型に比べて低下していたこと (cost of fitness) を見出し、これらの成果をまとめて論文発表した(Infect Drug Resist. 2024;17:531-541)。さらに多発性骨髄腫治療中の長期ウイルス感染者において、ニルマトレルビル (プロテアーゼ阻害剤) 治療に対する薬剤耐性ウイルスの解析を行った。治療後3週間以内に出現 (再燃) した薬剤耐性ウイルスはウイルス3CLプロテアーゼに1アミノ酸変異 (T21I) があり、患者より分離したウイルスがニルマトレルビルに対する耐性を獲得していることをin vitro感染試験により確認し、論文発表した(Viruses. 2024;16(5):718)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Watanabe Naoto, Hirose Ryohei, Yamauchi Katsuma, Miyazaki Hajime, Bandou Risa, Yoshida Takuma, Doi Toshifumi, Inoue Ken, Dohi Osamu, Yoshida Naohisa, Uchiyama Kazuhiko, Ishikawa Takeshi, Takagi Tomohisa, Konishi Hideyuki, Ikegaya Hiroshi, Nakaya Takaaki, Itoh Yoshito	4. 巻 11
2. 論文標題 Evaluation of Environmental Stability and Disinfectant Effectiveness for Human Coronavirus OC43 on Human Skin Surface	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e0238122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/spectrum.02381-22	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 -

1. 著者名 Hirose Ryohei, Itoh Yoshito, Ikegaya Hiroshi, Miyazaki Hajime, Watanabe Naoto, Yoshida Takuma, Bandou Risa, Daidoji Tomo, Nakaya Takaaki	4. 巻 28
2. 論文標題 Differences in environmental stability among SARS-CoV-2 variants of concern: both omicron BA.1 and BA.2 have higher stability	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Microbiology and Infection	6. 最初と最後の頁 1486 ~ 1491
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cmi.2022.05.020	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 -

1. 著者名 Bandou R, Hirose R, Nakaya T, Miyazaki H, Watanabe N, Yoshida T, Daidoji T, Itoh Y, Ikegaya H.	4. 巻 28(3)
2. 論文標題 Higher Viral Stability and Ethanol Resistance of Avian Influenza A(H5N1) Virus on Human Skin.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Emerg Infect Dis.	6. 最初と最後の頁 639-649
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3201/eid2803.211752	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 -

1. 著者名 Hirose R, Itoh Y, Ikegaya H, Miyazaki H, Watanabe N, Yoshida T, Bandou R, Daidoji T, Nakaya T.	4. 巻 55(23)
2. 論文標題 Evaluation of the Residual Disinfection Effects of Commonly Used Skin Disinfectants against Viruses: An Innovative Contact Transmission Control Method.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environ Sci Technol.	6. 最初と最後の頁 16044-16055
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.est.1c05296	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirose R, Miyazaki H, Bandou R, Watanabe N, Yoshida T, Daidoji T, Itoh Y, Nakaya T.	4. 巻 28(2)
2. 論文標題 Stability of SARS-CoV-2 and influenza virus varies across different paper types.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Infect Chemother.	6. 最初と最後の頁 252-256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2021.11.006.	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 -

1. 著者名 Hirose R, Watanabe N, Bandou R, Yoshida T, Daidoji T, Naito Y, Itoh Y, Nakaya T.	4. 巻 6(3)
2. 論文標題 A Cytopathic Effect-Based Tissue Culture Method for HCoV-OC43 Titration Using TMPRSS2-Expressing VeroE6 Cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 e00159-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mSphere.00159-21.	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 -

1. 著者名 Hirose R, Bandou R, Ikegaya H, Watanabe N, Yoshida T, Daidoji T, Naito Y, Itoh Y, Nakaya T.	4. 巻 27(7)
2. 論文標題 Disinfectant effectiveness against SARS-CoV-2 and influenza viruses present on human skin: model-based evaluation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clin Microbiol Infect.	6. 最初と最後の頁 1042.e1-1042.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cmi.2021.04.009.	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 -

1. 著者名 Elgendy Emad Mohamed, Arai Yasuha, Kawashita Norihito, Isobe Ayana, Daidoji Tomo, Ibrahim Madiha Salah, Ono Takao, Takagi Tatsuya, Nakaya Takaaki, Matsumoto Kazuhiko, Watanabe Yohei	4. 巻 102
2. 論文標題 Double mutations in the H9N2 avian influenza virus PB2 gene act cooperatively to increase viral host adaptation and replication for human infections	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of General Virology	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jgv.0.001612	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 該当する

1. 著者名 Miyazaki Hajime, Hirose Ryohei, Ichikawa Mikako, Mukai Hiroki, Yamauchi Katsuma, Nakaya Takaaki, Itoh Yoshito	4. 巻 180
2. 論文標題 Methods for virus recovery from environmental surfaces to monitor infectious viral contamination	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Environment International	6. 最初と最後の頁 108199 ~ 108199
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.envint.2023.108199	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 -

1. 著者名 Tanino Yoko, Nishioka Keisuke, Yamamoto Chie, Watanabe Yohei, Daidoji Tomo, Kawamoto Masataka, Uda Sayaka, Kirito Shoko, Nakagawa Yuta, Kasamatsu Yu, Kawahara Yoshiyuki, Sakai Yuri, Nobori Shuji, Inaba Tohru, Ota Bon, Fujita Naohisa, Hoshino Atsushi, Nukui Yoko, Nakaya Takaaki	4. 巻 Volume 17
2. 論文標題 Emergence of SARS-CoV-2 with Dual-Drug Resistant Mutations During a Long-Term Infection in a Kidney Transplant Recipient	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Infection and Drug Resistance	6. 最初と最後の頁 531 ~ 541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/IDR.S438915	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 -

1. 著者名 Yamamoto Chie, Taniguchi Masashi, Furukawa Keitaro, Inaba Toru, Niiyama Yui, Ide Daisuke, Mizutani Shinsuke, Kuroda Junya, Tanino Yoko, Nishioka Keisuke, Watanabe Yohei, Takayama Koichi, Nakaya Takaaki, Nukui Yoko	4. 巻 16
2. 論文標題 Nirmatrelvir Resistance in an Immunocompromised Patient with Persistent Coronavirus Disease 2019	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 718 ~ 718
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v16050718	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4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 渡邊洋平
2. 発表標題 ACE2 N-glycosylation modulates interactions with SARS-CoV-2 spike protein in a site-specific manner
3. 学会等名 日本ウイルス学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大道寺智
2. 発表標題 鳥インフルエンザウイルスのエタノール存在下での感染性残存の評価
3. 学会等名 日本ウイルス学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荒井泰葉
2. 発表標題 Stimulation of IFN-beta responses by aberrant SARS-CoV-2 small viral RNAs
3. 学会等名 日本RNA学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中屋隆明
2. 発表標題 鳥インフルエンザウイルス -現在の感染状況とパンデミックへの備え-
3. 学会等名 かんさい感染症セミナー（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中屋隆明	4. 発行年 2023年
2. 出版社 バイオメディカルサイエンス研究会	5. 総ページ数 59
3. 書名 BMSA バムサジャーナル	

〔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
---------	---------