

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16915

研究課題名(和文)小児急性中耳炎・副鼻腔炎におけるRSウイルスと起因菌相互作用の基盤研究

研究課題名(英文) Analysis of the interaction between respiratory syncytial virus and causative bacteria in pediatric acute otitis media and sinusitis

研究代表者

實川 純人 (Jitsukawa, Sumito)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：80706549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：小児急性中耳炎・副鼻腔炎は、抗菌薬使用ガイドラインの作成・計画的ワクチン導入の効果によって、治療・予防戦略に変化がみられる一方で、反復・難治化する症例も少なくない。今回、ウイルス感染が細菌感染に及ぼす影響、宿主細胞に及ぼす影響の大きく2つの視点から分子生物学的検討を行った。小児咽頭扁桃組織から作成した上皮細胞を用いて、単層培養においてRSウイルス(RSV)、ライノウイルス、パラインフルエンザウイルスを感染させてRNA sequence解析を行った。RSVの定量系としてブランクアッセイ法の改良に関わり、Journal of virological methodに報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子供における感染症がどのように生じるのかを詳しく、科学的に解明することは、有効な治療法を開発するために不可欠です。幼少期に感染する感染症のほとんどがウイルス性感染症であり、ほぼ全ての幼児が感染しますが、何度も感染したり、治療に難渋する幼児もあり、感染後の病態に個人差がかかわることも知られていますが、その原因は不明です。ウイルスとヒト細胞の間にどのような関係があるのかについて手術によって得られた組織から作成した細胞を用いてウイルス感染後の反応をRNA sequenceという解析技術を用いて解析しました。本研究では、感染からその後が生じる炎症反応がウイルスによってどのように異なるかを解明しました。

研究成果の概要(英文)：Pediatric acute otitis media/sinusitis remains an important infectious disease in children even after the introduction of routine vaccination against the main causative bacteria. Although treatment and prevention strategies have changed due to the creation of guidelines for the use of antibiotics and the systematic introduction of vaccines, there are still many cases where the disease is recurrent or difficult to treat. This time, we conducted a molecular biological investigation from two major perspectives: the impact of viral infection on bacterial infection and the impact on host cells. We mainly examined the effects of respiratory infection viruses infecting the upper respiratory tract. We cultured children's adenoid epithelial cells, infected them with respiratory syncytial virus, rhinovirus (HRV), and parainfluenza virus (PIV). RNA sequence analysis was performed after infection with virus, rhinovirus (HRV), and parainfluenza virus (PIV).

研究分野：小児耳鼻科 難聴 めまい

キーワード：RSウイルス 急性中耳炎 急性副鼻腔炎 アデノイド

## 1. 研究開始当初の背景

小児急性中耳炎・副鼻腔炎は、その主要起因菌であるインフルエンザ菌と肺炎球菌に対するワクチン定期接種導入以後も小児における重要な感染症である。抗菌薬使用ガイドラインの作成・計画的ワクチン導入の効果によって、治療・予防戦略に変化がみられる一方で呼吸器感染性ウイルスが上気道感染症に及ぼす影響についての分子生物学的検討は未だ少ない。申請者は日常臨床を通じて生じた疑問からウイルス感染が上気道感染症の重症化や細菌感染に影響を与える予測因子について詳細に解析し、分子生物学的機序に基づき微生物が依存する宿主因子を探索・解析することで小児上気道感染症に対する新たな治療標的を見出すことを最終目標とした計画を立案した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は呼吸器感染性ウイルスが誘導する宿主免疫応答機構と上気道感染起因菌の病原性に及ぼす影響とその分子機構を解析し、宿主におけるウイルスと細菌感染の相互作用の一端を明らかにする。

## 3. 研究の方法

手術の際に得られる鼻粘膜や咽頭扁桃組織から作成した上皮細胞を用いて、単層培養 (submerge) において小児で感染例の多いRSウイルス (RSV, subtype A2)、ライノウイルス (HRV16)、パラインフルエンザウイルス (PIV2, Toshiba strain) を multiplicity of infection (MOI) = 1 の割合で感染させて48時間後に上清と lysate を回収した。回収した lysate から total RNA を RNeasy kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands) によって抽出し、RNA sequence 解析を行った。また、RSVおよびヒトメタニューモウイルス (hMPV, 臨床分離株および GFP-hMPV) 感染の定量系として知られるブランクアッセイ法について、充填物質 (セルロース誘導体: Carboxymethyl cellulose sodium salt (CMC), Microcrystalline cellulose (MCC; Avicel®), Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC), Hydroxyethyl cellulose (HEC)) や細胞数、継代方法、培地などに関して最適化を行った。hMPV は hTMPRSS2 発現 VERO-E6 細胞と hTMPRSS2 発現 LLC-ML2 細胞を用いて培養した。

さらに気相液相界面培養 (air-liquid interface: ALI) において RSV と肺炎球菌の混合感染系の予備検討を行った。

## 4. 研究成果

RSウイルスは感染後 Interferon (type I, III) を産生し、その量は時間依存的に増大するが、HRV感染では interferon 産生は強く抑制される。それらのサイトカイン産生能の違いはウイルス感染によって誘導される宿主免疫応答反応経路の違いによると推察された。

Submerge と気相液相界面培養 (air-liquid interface: ALI) の状態では interferon 産生を誘導するウイルス単位や感染時の上皮細胞形態に差がみられた (未発表データ)。また ALI の状態では submerge の状態とは異なり、RSV 感染は上皮バリア機能を減少させ、RSV 感染後の肺炎球菌感染は上皮バリア機能をさらに減少させ、肺炎球菌の上皮侵入能力が有意に上昇していることを見出している。

ウイルスの定量系のゴールドスタンダードとして知られるブランクアッセイ法において、様々な充填物 (セルロース誘導体) を検討した結果、0.6% (w/v) HPMC を使用した際に計測可能で良好なブランク形成が見られることが判明した。一方で同じ属である hMPV では、1% (w/v) MCC 存在下において辺縁明瞭なブランクが形成された (図1)。

さらに、我々の予備検討では、HEC はマウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞におけるマウスノロウイルスのブランクアッセイ法に適していた (JVM, 2022)。培養時間は RSV は6日間、hMPV は7日間培養が最適であった。

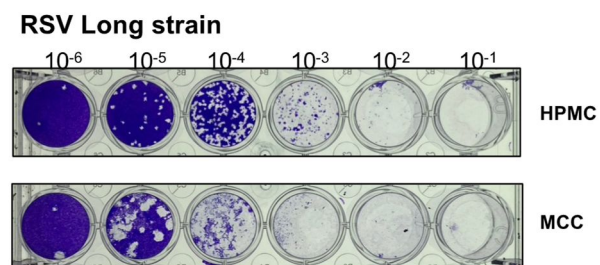
MCC は充填後に細胞が観察できないという問題点があるが、近年ヒトコロナウイルス (NL63) や SARS-CoV-2 においても最適なブランクが形成されると報告されている。これまで、ブランクアッセイ法ではアガロースが汎用されていたが、培地の調整や充填物の剥離などの手技が煩雑であり、代替として、CMC や MCC が使用される例が増えている。CMC は最も汎用されているが、他のセルロース誘導体よりも粘性が高いため今回の検討では HEp-2 細胞の増殖を妨げることがわかった。

以上の結果から RSV のブランクアッセイ法において最適な充填化合物は 0.6% HPMC であることを見出した。

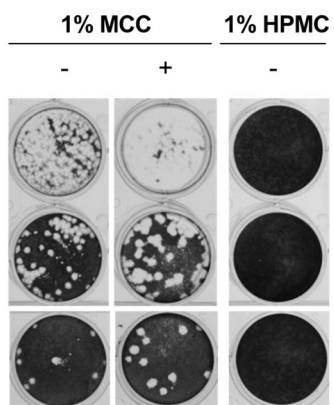
最適な充填化合物はウイルスや細胞、必要細胞培養日数などによって大きく異なることが示唆され、ウイルスや細胞ごとの細かな条件検討が必要と考えられた。感染性ウイルス粒子の定量方

法は、あらゆるウイルス実験の根本手技であり、最適化を行うことは非常に重要であると考えられた。

図1 充填物質によるプラーク形成の違い



**hMPV Clinical Isolate #1**



**VERO-E6-TMPRSS2**

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 0件）

1. 著者名 Takumi-Tanimukai Yuka, Yamamoto Soh, Ogasawara Noriko, Nakabayashi Sayaka, Mizuta Katsumi, Yamamoto Keisuke, Miyata Ryo, Kakuki Takuya, Jitsukawa Sumito, Sato Toyotaka, Tsutsumi Hiroyuki, Kojima Takashi, Takano Kenichi, Yokota Shin-ichi	4. 巻 304
2. 論文標題 A hydroxypropyl methylcellulose plaque assay for human respiratory syncytial virus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Virological Methods	6. 最初と最後の頁 114528 ~ 114528
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jviromet.2022.114528	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------