科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号: 12601

研究種目: 基盤研究(C)(一般)

研究期間: 2013~2015

課題番号: 25460562

研究課題名(和文)モデル動物を用いたインフルエンザウイルス感染動態に関わる研究

研究課題名(英文)the dynamics of influenza virus infection using animal model

研究代表者

木曽 真紀 (Kiso, Maki)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号:00624602

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文):本研究では免疫不全モデルとしてヌードマウスを用い、抗ウイルス薬の効果と薬剤耐性ウイルス出現メカニズムの解析を目的とした。その結果、マウス馴化A/California/04(pdmH1N1)株をヌードマウスに接種した場合、長期間に渡り肺にウイルスが持続することが明らかとなった。さらに、ウイルスを接種したヌードマウスに抗ウイルス薬を投与し続けた場合、マウスは長期間生残可能となったが、肺には薬剤感受性の低下したウイルスが出現していることが判明し、免疫不全の場合の効果的な薬剤使用について考慮すべきであることが判明した。

研究成果の概要(英文): In this study, we used nude mice as an immune-compromised model and analyzed the effect of antivirals and the mechanism of antiviral resistance. We infected nude mice with a mouse adapted A/California/04(pdmH1N1) virus and treated with anti-influenza drug. The virus replicated in the lung of nude mice for a long term regardless with or without antiviral treatment. Though the survival rate of nude mice were improved by long term treatment, drug resistant viruses were frequently appeared by such a treatment. These findings are useful for the better understanding the emergence and properties of antiviral-resistant viruses in clinical settings.

研究分野: 医歯薬学

キーワード: インフルエンザ

1.研究開始当初の背景

インフルエンザの予防にはワクチンが有効 だが、インフルエンザウイルスは容易に抗原 変異するため、ワクチン効果が高くない場合 が生じる。また、パンデミック時には抗原性 の著しく異なるウイルスが出現する。実際、 2009 年、これまでの季節性ウイルスとは抗 原性の全く異なるブタ由来のウイルスによ るパンデミックが発生した。この際には主に ノイラミニダーゼ阻害薬による治療が行わ れ、多くの患者がその恩恵を受けた。また、 依然として猛威を奮う高病原性鳥インフル エンザウイルスに対する治療にもノイラミ ニダーゼ阻害剤が使用されている。このノイ ラミニダーゼ阻害剤は非常に有効な薬剤だ が、耐性ウイルスの問題が常に付随する。申 請者は、これまでにノイラミニダーゼ阻害剤 で治療された小児において、予想以上に耐性 ウイルスが発生していることや(Lancet. 2004) H5N1 ウイルスにおいても耐性ウイ ルスが存在すること(Nature.2005) それら 耐性ウイルスの病原性は感受性ウイルスと 同等である場合もあること (J. Virol.2011) などを明らかにしてきた。このような背景か ら、薬剤耐性ウイルスの出現状況をモニタリ ングし、効果的な薬剤の投与方法についての 情報を集積することは非常に重要である。ま た、免疫不全患者においては薬剤耐性ウイル スが非常に多く出現している。この問題につ いて、ヌードマウスモデルを用いた感染実験 を行い免疫不全患者における病態を明らか にし、薬剤耐性ウイルスの蔓延防止に有用な 情報を集積する必要性がある。

2.研究の目的

パンデミックの対策としては、ワクチンや抗ウイルス薬による予防と治療が挙げられる。しかし、ワクチンは実際に出現したウイルスをもとに作製するため、感染拡大前に必要量を調整し、十分な効果が得られる保証はない。その点、抗ウイルス薬はパンデミック対策として重要である。しかし、抗ウイルス薬の使用には耐性ウイルス出現の可能性が付かする。本研究では、薬剤耐性インフルエンザウイルスの現状を把握するとともに、マウスモデルを用い、薬剤耐性ウイルス出現機構について考察する。

3.研究の方法

1) ヌードマウスについて、H5N1 ウイルスまたは H1N1 パンデミック 2009 ウイルスを接種し、経時的に肺等の臓器を採取し、ウイルス力価を測定しウイルスが肺に持続するウイルス接種条件を検討する。

2)ヌードマウスについて、マウスが死亡せず、かつ肺に持続する量の H5N1 ウイルスまたは H1N1 パンデミック 2009 ウイルスを接種し、接種後に各種抗インフルエンザウイルス薬

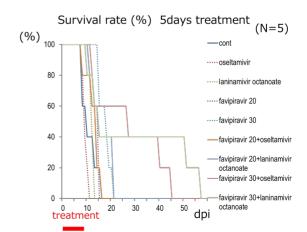
を投与する。

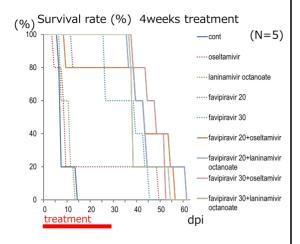
3)投与後、経時的にマウスの肺を採取しウイルス力価の測定およびウイルス分離を行う。

4)マウス肺より分離したウイルスについて、 薬剤感受性試験を行うとともに遺伝子解析 を行い、耐性ウイルス検出を試みる。

4.研究成果

本研究では、主にヌードマウスを用い、イン フルエンザウイルスを感染させたのち、抗ウ イルス薬を投与し、その効果および薬剤耐性 ウイルス出現メカニズムを明らかにし、より 効果的な薬剤治療法を見出すことを目的と した。具体的には、 既存の抗ウイルス薬の 併用による効果的な治療方法の探索、 ドマウスを用いた免疫不全持続感染モデル の確立および ヌードマウスを用いた薬剤 耐性ウイルス出現メカニズムの解明を目的 とし、将来的に免疫不全患者を含め、より効 果的な治療法について探索した。その結果、 馴 ウ ス に 化 し A/California/04/09(pdmH1N1)株をヌードマ ウスに接種すると肺にウイルスが長期にわ たり持続することが確認された。さらに、ヌ ードマウスにウイルスを接種し、抗ウイルス 薬を単剤のみまたは併用投与を行い、その後 のマウスの生死について観察した。また、抗 インフルエンザ薬投与期間について、5 日間 および4週間、の2種を設定した結果、5日 間投与では、ヌードマウスの生残率はあまり 改善しなかった。一方、4 週間投与した場合 は、対照群に比較してマウスが長期に渡り生 残した。また、長期間薬剤投与をしたマウス 肺においてもインフルエンザウイルスが長 期にわたり残存していることが確認された。





Lung Virus titer (log₁₀pfu/g) (5days treatment)

Day	cont	ose	lani	favi 20	favi 30	favi 20+ose	favi 20+lani	favi 30+ose	favi 30+lani
3	7.7	8.0	7.9	6.6	5.6	5.0	6.9	7.0	7.1
	±0.3	±1.0	±0.1	±1.4	±0.4	±0.4	±0.4	±0.3	±0.3
7	7.1	6.9	7.7	6.9	7.0	5.3	4.2	4.5	7.2
	±0.2	±0.4	±0.5	±0.3	±0.2	±0.4	±0.4	±0.2	±0.3
14	6.7	6.4	6.8	7.3	7.1	6.6	7.2	6.6	7.0
	±0.3	±1.0	±0.3	±0.3	±0.5	±0.3	±0.3	±0.3	±0.1
21	n.d	n.d	6.9, 7.1	4.7, 7.1	6.8 ±0.1	6.7	6.8 ±0.8	6.6 ±0.4	7.0 ±0.4
28	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	7.4	7.3, 7.2

Lung Virus titer (log₁₀pfu/g) (4wks treatment)

Day	cont	ose	lani	favi 20	favi 30	favi 20+ose	favi 20+lani	favi 30+ose	favi 30+lani
3	7.7 ±0.3	8.0 ±1.0	7.9 ±0.1	6.6 ±1.4	5.6 ±0.4	5.0 ±0.4	6.9 ±0.4	7.0 ±0.3	7.1 ±0.3
7	7.4 ±0.2	6.7 ±0.7	7.6 ±0.5	5.1 ±1.0	6.1 ±0.6	5.4 ±0.7	6.3 ±0.3	6.2 ±0.2	6.3 ±0.1
14	6.9 ±0.5	n.d	6.1	6.2 ±0.2	6.3 ±0.1	6.2 ±0.4	4.7 ±0.4	4.7 ±1.7	5.7 ±0.5
21	n.d	n.d	n.d	6.2 ±0.2	5.8 ±0.5	6.6 ±0.6	5.8 ±0.4	5.8 ±0.3	6.6 ±0.9
28	n.d	n.d	n.d	5.9 ±0.8	6.3 ±0.2	6.1 ±0.9	6.1 ±0.8	6.3 ±0.9	6.2 ±0.2

薬剤を投与したマウスから経時的に採取した肺からウイルスを分離し、薬剤感受性および遺伝子解析を試みた。その結果、長期間投

与を受けたマウスからは薬剤感受性が低下 したウイルスが多く分離され、また既知の薬 剤耐性変異をもったウイルスが出現してい ることが明らかとなった。

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 件)

[学会発表](計 2 件)

木曽真紀、ヌードマウスにおける抗インフルエンザ薬の治療効果と薬剤耐性ウイルスに関する解析、5th Negative strand Virus Japan Symposium、2016年1月27日、沖縄県恩納村

木曽真紀、マウスにおける H5N1 高病原性インフルエンザウイルスに対する抗インフルエンザ薬オセルタミビルと T-705 の併用効果、日本獣医学会、2014年9月9日~9月12日(北海道札幌市)

[図書](計件)

〔産業財産権〕

出願状況(計件)

名称: 発明者: 種類: 種号:

出願年月日: 国内外の別:

取得状況(計件)

名称: 発明者: 権利者: 種類: 番号:

取得年月日: 国内外の別:

〔その他〕 ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

木曽 真紀 (Kiso, Maki)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号:00624602

(2)研究分担者	()
研究者番号:		
(3)連携研究者	()
研究者番号:		