

検体からのウイルス分離・増殖効率を改善する細胞株の探索

研究分担者 渡邊 真治

国立感染症研究所・インフルエンザウイルス研究センター・室長

研究要旨

インフルエンザウイルスの分離にはイヌ腎由来株化細胞 [Madin-Darby Canin Kidney (MDCK) 細胞] が慣習的に使用されている。近年、季節性インフルエンザウイルスのひとつである A/H3N2 亜型ウイルスについて、MDCK 細胞を用いた分離・増殖の効率低下の傾向が報告されてきており、野外流行株の分離捕捉率の低下が懸念されている。そこで本研究では、A/H3N2 亜型ウイルスの分離・増殖効率を改善する細胞株の探索を目的に検討試験を進めた。

A. 研究目的

流行期ごとの季節性インフルエンザウイルスの性状（抗原性や抗ウイルス薬感受性）を理解することは、適切なワクチン株を選定する、あるいは抗ウイルス薬耐性株の出現・拡がりに対する対策を施す上で、大変重要である。そのため、流行期の患者臨床検体からのインフルエンザウイルス分離が必須となる。インフルエンザウイルスの分離にはイヌ腎由来株化細胞 [Madin-Darby Canin Kidney (MDCK) 細胞] が長く慣習的に使用されてきた。しかしながら近年、特に季節性ウイルスのひとつである A/H3N2 亜型ウイルスについて、MDCK 細胞を用いての分離・増殖効率の低下傾向が報告されてきており、野外流行株の分離捕捉率の低下、またこれによる流行株性状の正確な把握が妨げられることが懸念されている。そこで、ウイルス分離・増殖効率の改善を見込める細胞株を探索・樹立し、この細胞株をインフルエンザ流行株分離用基材として地方衛生研究所に配布、活用してもらうことでインフルエンザウイルス株サーベイランスへ貢献することを目標に、昨年度より株化細胞を用いた検討試験を進めた。

B. 研究方法

現在感染研では、MDCK-SIAT1 (SIAT1) 細胞と呼ばれる、季節性インフルエンザウイルスのレセプターを多く発現している細胞を A/H3N2 亜型ウイルスの分離・増殖に使用しており、ウイルスの分離・増殖効率改善に一定の効果を上げている。しかしながら、この SIAT1 細胞は培養維持費が高額であることと、海外研究機関で樹立された細胞である点で、地衛研での恒常的な使用については難しい面がある。そのため、SIAT1 細胞以外でヒト呼吸器系由来株化細胞に着目した。中でも、季節性インフルエンザウイルスの増殖の場である上気道咽頭由来の Detroit 562 細胞について検討した。

（倫理面への配慮）

該当なし

C. 研究結果

通常、株化細胞は継代後 3-4 日で培養面一面に増殖し、その状態でウイルス感染に用いられることが一般的である。ところが、肺胞上皮由来株化細胞において、長期間（約 3 週間）培養によって細胞の性質が分化状態へ誘導される報告があり (Cooper et al., PLoS One, 11:

e0164438, 2016)、咽頭由来株化細胞の Detroit 562 細胞について、通常培養と長期間（2 週間）培養を行い、ウイルスの増殖について調べた。インフルエンザウイルスの増殖には、トリプシン様酵素が必須であるが、通常培養（2-3 日間）ではトリプシン非存在下ではウイルス増殖が確認されなかったが、長期間培養ではトリプシン非存在下においてもウイルス増殖が確認された。以上の結果は、Detroit 562 細胞は、長期間培養によりトリプシン様酵素を分泌する細胞へ状態が変化したことを示唆している。

D. 考察

Detroit 562 細胞は、長期間培養によりトリプシン様酵素を分泌する細胞へ状態が変化したことを示唆しており、よりヒト体内における性質を有した細胞に状態が変化し、そのためウイルスが増殖出来るようになったと考えられた。

E. 結論

ウイルス分離・増殖に関する技術支援の一環で、分離・増殖効率を改善する細胞株の探索を行い、これまでの培養法（2-3 日間の培養）とは違い、長期間培養（約 3 週間の培養）で、よりヒト体内における性質を有した細胞に状態が変化し、ウイルスが増殖することを確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Nakamura K, Shirakura M, Fujisaki S, Kishida N, Burke DF, Smith DJ, Kuwahara T, Takashita E, Takayama I, Nakauchi M, Chadha M, Potdar V, Bhushan A, Upadhyay BP, Shakya G, Odagiri T, Kageyama T, Watanabe S, Characterization of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from Nepalese and Indian outbreak patients

in early 2015. *Influenza Other Respir Viruses*. 11(5) 399-403 2017

- Yokoyama M, Fujisaki S, Shirakura M, Watanabe S, Odagiri T, Ito K, Sato H. Molecular Dynamics Simulation of the Influenza A(H3N2) Hemagglutinin Trimer Reveals the Structural Basis for Adaptive Evolution of the Recent Epidemic Clade 3C.2a. *Front Microbiol*. 8, 584, 2017
- Imai M, Watanabe T, Kiso M, Nakajima N, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Hatta M, Yamada S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Shirakura M, Takashita E, Fujisaki S, McBride R, Thompson AJ, Takahashi K, Maemura T, Mitake H, Chiba S, Zhong G, Fan S, Oishi K, Yasuhara A, Takada K, Nakao T, Fukuyama S, Yamashita M, Lopes TJS, Neumann G, Odagiri T, Watanabe S, Shu Y, Paulson JC, Hasegawa H, Kawaoka Y. Highly Pathogenic Avian H7N9 Influenza Virus Isolated from A Human Is Lethal in Some Ferrets Infected via Respiratory Droplets. *Cell Host Microbe*. 22(5) 615-26 2017
- Uda K, Shoji K, Koyama-Wakai C, Furuichi M, Iwase N, Fujisaki S, Watanabe S, Miyairi I. Clinical characteristics of influenza virus-induced lower respiratory infection during the 2015 to 2016 season. *J Infect Chemother*. pii: S1341-321X(18)30007-2. 2018
- Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Watanabe S, Odagiri T. Isolation of egg-adapted influenza A(H3N2) virus without amino acid substitutions in the antigenic

sites of its hemagglutinin. Jpn J Infect Dis. (In press)

2. 学会発表

- Watanabe S, Nakamura K, Kishida N, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, Kuwahara T, Sato A, Akimoto M, Miura H, Ogawa R, Sugawara H, Watanabe K, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Odagiri T, The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2016/17 season and vaccine viruses selected for the 2017/18 season. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月
- Takashita E, Shirakura M, Fujisaki S, Nakamura K, Kuwahara T, Kishida N, Watanabe S, Odagiri T. Antiviral susceptibility of avian influenza A(H7N9) viruses isolated from humans. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月
- Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Sato A, Ogawa R, Miura H, Akimoto M, Sugawara H, Watanabe S, Odagiri T. Characterization of cell-derived and egg-passaged influenza A/Saitama/ 103/2014 (H3N2) strain. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

H. 健康危険情報

該当なし