

Ⅱ. 分担研究報告書

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・性状解析

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

季節性インフルエンザウイルス（A/H1N1pdm09 亜型、A/H3N2 亜型、B 型山形系統および B 型ビクトリア系統）は、ヒトの上気道でよく増殖することから、従来使用されているイヌ腎由来株化細胞〔Madin-Darby Canin Kidney (MDCK) 細胞〕（hCK 細胞）ではなく、ヒト鼻中隔扁平上皮細胞 RPMI2650 細胞での増殖性を調べた。その結果、いずれのウイルスも hCK 細胞と同程度の増殖性を示した。

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いる。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、季節性インフルエンザウイルス全般の分離・増殖効率の改善を見込める細胞株を探索・樹立し、そ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的とした。

B. 研究方法

現在感染研では、MDCK および MDCK-SIAT1 (SIAT1) 細胞あるいは hCK 細胞（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）をウイルスの分離・増殖に使用しており、一定の効果を上げている。しかしながら、特に SIAT1 細胞および hCK 細胞は培養維持費が高額である点で、地衛研での恒常的な使用については難しい面がある。また 1 種類の細胞でウイルス分離出来る方が、地衛研での細胞の維持の点からも望ましい。季節性インフルエンザウイルスは、上気道でよく増殖することから、筆者はヒト呼吸器系由来、特に上気道の株化細胞に着目している。今回、ヒト鼻中隔扁平上皮細胞 RPMI2650 細胞における季節性ウイルスの増殖性について検討した。

（倫理面への配慮）

該当なし

C. 研究結果

ヒト鼻中隔扁平上皮株化細胞 RPMI2650 細胞において、いずれの季節性ウイルスも MDCK 細胞由来の hCK 細胞と比較して、同程度増殖性する

がことが明らかとなった。

D. 考察

今回使用したヒト鼻中隔扁平上皮株化細胞 RPMI2650 細胞は、hCK 細胞と比較して同程度増殖することが明らかとなり、自然界でのヒトでの増殖を反映していると考えられた。今後は、検体からの分離効率や分離されたウイルスの塩基配列への変異誘導効率などを検討する予定である。

E. 結論

これまで咽頭由来の Detroit 562 細胞で季節性ウイルスの増殖性を検討してきたが、Detroit 562 細胞においては従来使用されている hCK (MDCK 細胞由来) 細胞より増殖性は低かった。今回使用したヒト鼻中隔扁平上皮株化細胞 RPMI2650 細胞では、hCK 細胞と比較して同程度増殖することが明らかとなり、自然界でのヒトでの増殖を反映していると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Takashita E, Yasui Y, Nagata S, Morita H, Fujisaki S, Miura H, Shirakura M, Kishida N, Nakamura K, Kuwahara T, Sugawara H, Sato A, Akimoto M, Kaido T, Watanabe S, Hasegawa H; Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Detection of a Peramivir-Resistant Influenza B/Yamagata-Lineage Virus Imported from Indonesia in Aichi, Japan, March 2019. Jpn J Infect Dis. 2020 9, 73(5), 386-390
- Huddleston J, Barnes JR, Rowe T, Xu X, Kondor R, Wentworth DE, Whittaker L, Ermetal B, Daniels RS, McCauley JW, Fujisaki S, Nakamura K, Kishida N, Watanabe S, Hasegawa H, Barr I, Subbarao K, Barrat-Charlaix P, Neher RA, Bedford T. Integrating genotypes and phenotypes improves long-term forecasts of seasonal influenza A/H3N2 evolution. Elife. 2020 9, 9, e60067
- Takashita E, Fujisaki S, Yokoyama M, Shirakura M,

Morita H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Sato H, Doi I, Sato Y, Takao S, Shimazu Y, Shimomura T, Ito T, Watanabe S, Odagiri T, The Influenza Virus Surveillance Group Of Japan. In Vitro Characterization of Multidrug-Resistant Influenza A(H1N1)pdm09 Viruses Carrying a Dual Neuraminidase Mutation Isolated from Immunocompromised Patients. Pathogens. 2020 9, 9(9), 725

- Takashita E, Abe T, Morita H, Nagata S, Fujisaki S, Miura H, Shirakura M, Kishida N, Nakamura K, Kuwahara T, Mitamura K, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Hasegawa H, Influenza Virus Surveillance Group of Japan, Influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a PA E23K substitution detected from a child without baloxavir treatment. Antiviral Res. 2020 8, 180, 104828

2. 学会発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし