

終了報告書〈概要〉

施設・所属: 埼玉医科大学呼吸器内科 氏名 中込一之

概要の構成は自由ですが、研究目的、研究手法、研究成果などを1ページでまとめてください。
(図表・写真などの貼付を含む、日本語)

【背景】気管支喘息は、吸入ステロイドを中心とした抗炎症療法の普及により、以前と比べコントロール良好な疾患となったが、現在もなお年間約 2000 人の喘息死があり、難治性喘息の病態解明は急務である。難治性喘息の一つの特徴として、しばしば喘息増悪をおこすことが挙げられる。ライノウィルス(RV)は、いわゆる風邪症候群発症において中心的役割を果たすが、喘息増悪にも強く関与することが知られている。一般にウィルス感染は、喘息増悪時の 50-80%で見られ、その中でも RV は、原因ウィルスが同定された患者の約 65% で検出される。従って、ライノウィルス感染の制御は、喘息コントロールの点からも重要と考えられる。

RV は多様性を持つ。約 100 の古典的血清型(RV-A と RV-B が属する)に加え、近年 60 以上の新しい RV(ほぼすべてが RV-C)が PCR 法などによって発見された。RV-C がいままで発見されなかった理由として、一般の cell line や上皮細胞に RV-C が感染せず、ウィルスを増殖させられなかったことなどがあげられる。

近年の臨床試験から、ライノウィルスの種(species)による病原性の違いが示唆されている。例えば Bizzintino らは、救急室での検討で、RV-C は、他の RV と比較して、小児喘息発作患者の鼻汁でより検出されることを報告し、RV-C が重篤な喘息発作の原因となる可能性を示唆した(1)。また我々は、前向き研究で、0-1 才小児にルーチンで鼻汁をとり、そのウィルスの種類(血清型)と臨床症状とを比較したところ、RV-A と RV-C は、RV-B と比較し、より重篤な症状を引き起こすことを報告した(2)。

前述の通り、RV-C は一般の細胞では増殖しないが、我々は近年 RV-C が、副鼻腔組織で良く増殖することを報告した(3)。さらに RV-C は、air-liquid interface で培養し、完全に分化した副鼻腔上皮細胞で、良く増殖することを報告した(4)。この系を使うことで、種によるウィルスの性質の違いを検討することが可能となった。

今回我々は、ライノウィルスの病原性の違いの機序を検討する目的で、air-liquid interface で培養した副鼻腔細胞を使用し、RV-A/B/C のウィルス複製能、サイトカイン・ケモカイン産生能などの違いを調べた。

【方法】RV はすべて臨床株を使用した。臨床検体から RV-A16, A36, B52, B72, C2, C15, C41 の cDNA を cloning し、plasmid を作成。T7 RNA polymerase を使用して、ウィルス RNA を合成し、cell line に transfection することで、リコンビナントウィルスを作成した。RV-A7 と B6 は、cell line 感染後の培養液を精製し、ウィルスを得た。副鼻腔上皮細胞を、air-liquid interface で約 2 ヶ月培養し、完全に分化させた後、RV 感染させた (1×10^8 RNA copies/sample)。感染後、上皮細胞を回収し、RT-PCR を用いウィルス量を測定した。また培養液を回収し、ケモカイン・サイトカイン、及び細胞障害性の指標として LDH 濃度を測定した。一部の実験では上皮細胞を回収し、アポトーシスの指標として Caspase3/7 活性を測定した。

【結果】以下の結果を得た。

1. RV-B は、RV-A 及び RV-C と比較して、ウィルス複製が遅く、かつ低いことがわかった。RV-B(B52, B72, B6) 感染 24 時間後のウィルス量は、RV-A または RV-C 感染と比較して、少なくとも 10 倍低値であった。RV-A 及び RV-C のウィルス量のピークは 24-48 時間後であったが、RV-B は 72 時間後であり、より遅い複製が示唆された。
2. RV-B 感染 48 時間及び 72 時間後の、CXCL10, CXCL11, CCL5 濃度は、RV-A 及び RV-C と比較して、有意に(少なくとも 10 倍)低値であった。
3. RV-B 感染 48 時間及び 72 時間後の、LDH 濃度は、RV-A 及び RV-C と比較して、有意に低値であった。
4. RV-B 感染 48 時間及び 72 時間後の、IFN- λ 1 濃度は、RV-A 及び RV-C と比較して、有意に低値であった。
5. 感染 8 時間及び 24 時間後の Caspase3/7 活性は RV-A/B/C で差がなかった。

【結論】RV-B は、RV-A または RV-C と比較して、ウィルス複製が、より低く、より遅いと考えられた。さらに、RV-B は、RV-A または RV-C と比較して、サイトカイン・ケモカイン産生、及び細胞障害が低いと考えられた。これらの性質が、臨床で観察される、RV-B 感染の軽微な病態に関与する可能性が考えられた。

参考文献 1) Bizzintino J, et al. Eur Respir J 2011;37:1037-42.

2) Lee WM, et al. Am J Respir Crit Care Med 2012;186:886-91.

3) Bochkov YA, et al. Nat Med 2011;17:627-32. 4) Ashraf S, et al. Virology 2013;436:143-9.