

平成 27 年 度

学術研究助成事業の概要

平成 28 年 3 月

ふじのくに地域・大学コンソーシアム

目 次

平成27年度 学術研究助成事業の概要	1	
平成27年度 応募・助成の状況	2	
実績報告		
(研究代表者) 静岡県立大学 薬学部 准教授 高橋 忠伸	薬剤耐性インフルエンザウイルスの高感度、簡便、迅速な検出方法および分離法の開発	3
(研究代表者) 浜松医科大学 医学部 教授 鈴木 哲朗	マイクロニッピングを利用したウィルス性胃腸炎モデルの作製	12
(研究代表者) 常葉大学 健康科学学部 准教授 杉井 たつ子	大学とコミュニティの協働による高齢者の孤立防止の検討	14
(研究代表者) 常葉大学 社会環境学部 講師 小河 久志	観光立県・静岡の実現に向けて-外国人観光客のニーズ把握と新たな観光資源の開発-	26
(研究代表者) 浜松医科大学 医学部 助教 柴田 陽介	地域在住高齢者の健康増進を目指した就業のあり方に関する研究	32
(研究代表者) 静岡大学 人文社会科学部 准教授 白井 千晶	静岡県における外国人女性のDV被害支援に関する実態調査および支援者養成プログラム構築	42

本報告書は、静岡県から「平成27年度大学間等連携推進事業費補助金」を受けて公益社法人ふじのくに地域・大学コンソーシアムが実施した「平成27年度学術研究助成事業」の概要を取りまとめたものです。添付資料のうち、頁数の多いものは冊子に含めず、当コンソーシアムで保管しております。なお、「学術研究助成」の募集要領等は当コンソーシアムのウェブサイトにてご覧いただけます。

URL:<http://fujinokuni-consortium.or.jp/josei/index.html>

平成 27 年度 学術研究助成事業の概要

1 目的

本県の大学間連携の促進及び学術研究の向上を図るため、県内の大学研究者又は研究グループが行う研究に対して学術研究助成を実施する。

2 概要等

(1) 事業内容 (5,500 千円)

項 目	内 容
補助対象研究	地域の課題解決・活性化につながるテーマ ＊地域の行政機関、試験研究機関、産業界等との連携（研究分担者としての参画、研究内容に対する意見書提出等）を図った研究を優先的に採択する。
研究期間	平成 27 年 4 月 1 日～平成 28 年 2 月 27 日
補助額（総額）	共同研究：1 件 1,500 千円・単独研究 1 件 500 千円以内 （補助率 10/10）＊予算の範囲内
補助対象者	・県内の大学院、大学、短大及び高等専門学校の研究者 ＊研究グループには、県内外の試験研究機関もしくは産業支援機関に所属する研究者または県外の大学等に所属する研究者が参画することができる。ただし、研究グループの主たる研究者（以下「研究代表者」という。）は県内の大学等に所属する研究者でなければならない。 ・研究代表者は、ふじのくに地域・大学コンソーシアムの会員校に勤務する教員であること。

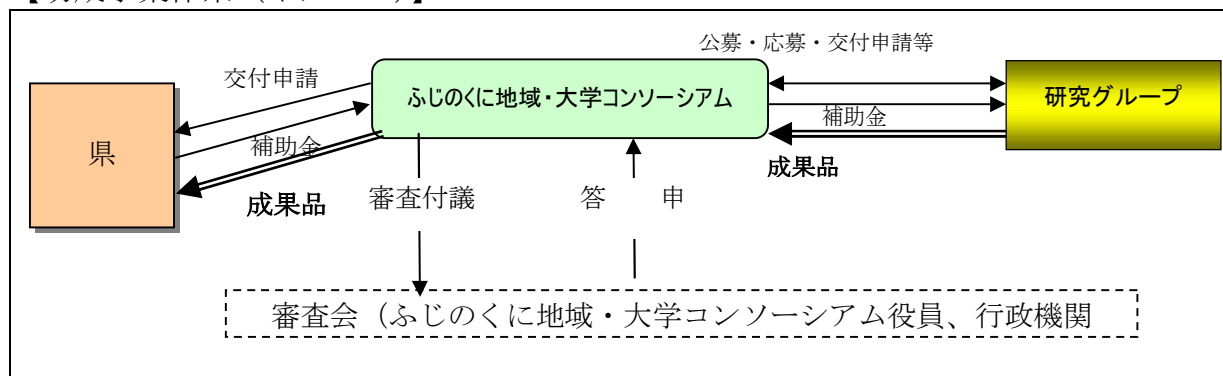
(2) 補助対象経費

備品購入費、賃金、謝金、旅費、会場使用料、消耗品費、通信運搬費

(3) 研究成果

研究成果は、成果発表会やホームページ等において発表・発信する。

【助成事業体系（イメージ）】



平成27年度 応募・助成の状況

1.応募の状況

応募件数 31件

2.学術研究助成 対象者・研究課題

No.	大学	学部	代表者	共同 単独	研究課題	助成額
1	静岡県立大学	薬学部	高橋忠伸	単独	薬剤耐性インフルエンザウイルスの高感度、簡便、迅速な検出方法および分離法の開発	450,000
2	浜松医科大学	医学部	鈴木哲朗	共同	マイクロミニピッグを利用したウィルス性胃腸炎モデルの作製	1,350,000
3	常葉大学	健康科学学部	杉井たつ子	単独	大学とコミュニティの協働による高齢者の孤立防止の検討	450,000
4	常葉大学	社会環境学部	小河久志	共同	観光立県・静岡の実現に向けて-外国人観光客のニーズ把握と新たな観光資源の開発-	800,000
5	浜松医科大学	医学部	柴田陽介	共同	地域在住高齢者の健康増進を目指した就業のあり方に関する研究	1,100,000
6	静岡大学	人文社会科学部	白井千晶	共同	静岡県における外国人女性のDV被害支援に関する実態調査および支援者養成プログラム構築	1,350,000
合計 6 件						5,500,000

実 績 報 告

学術研究助成事業の概要

静岡県立	大学		
薬	学部		
職名	准教授	氏名	高橋忠伸

研究課題：

薬剤耐性インフルエンザウイルスの高感度、簡便、迅速な検出方法および分離法の開発

研究の概要と成果：

研究概要

現在、抗インフルエンザ医薬品であるシアリダーゼ阻害剤は、リレンザ、タミフル、イナビル、ラピアクタの四種類が市販されている。2007年に北ヨーロッパで、Aソ連型と呼ばれていたH1N1型インフルエンザA型ウイルスのタミフル耐性株が発生し、2008年までに日本を含めて世界中に流行が拡大した。タミフル耐性化ウイルスはリレンザが有効であったことから、薬剤耐性ウイルスの治療には適した薬剤の使用が重要と考えられる。各シアリダーゼ阻害剤に対して高感度、簡便、迅速な薬剤耐性化検出法が存在すれば、インフルエンザ患者へのシアリダーゼ阻害剤の選択基準として利用できるはずである。また、各地の衛生検査機関で多検体の薬剤耐性ウイルスの検出と分離が簡便に実施できれば、薬剤耐性ウイルスの流行状況や耐性化に寄与するウイルスの遺伝子情報が大量に迅速に収集でき、シアリダーゼ阻害剤の選択の指針作成にも貢献する。

研究代表者は広島国際大学薬学部の大坪忠宗准教授、池田潔教授と共同でインフルエンザA型及びB型ウイルス（1-4）、ヒトパラインフルエンザウイルス（5）、おたふく風邪ウイルス（6）、センダイウイルス（7）、及びニューキャッスル病ウイルス（8）が持つシアル酸切断酵素「シアリダーゼ」を迅速、簡便、局所的に蛍光化可視化する試薬 2-(benzothiazol-2-yl)-4-bromophenyl-5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosidonic acid (BTP3-Neu5Ac) を開発した。BTP3-Neu5Acは水溶性の非蛍光物質であるが、

ウイルスのシアリダーゼ活性によりシアル酸 (*N*-acetylneuraminic acid, Neu5Ac) が切断されると、水に不溶性の 2-benzothiazol-2-yl phenol (BTP) の誘導体 (2-benzothiazol-2-yl)-4-bromophenol (BTP3) が沈殿する (図1) (9-11)。BTPは、1) 水に極めて難溶で固体状態で蛍光性を示すため無固定状態の細胞でも蛍光組織染色が可能、2) 酸性条件に耐性を有し強い蛍光性を示す、3) フェノール性水酸基上の置換基の有無によって蛍光性のオン・オフ制御が可能、4) 自家蛍光などの影響を抑えるのに十分な150 nm以上のストークスシフトを示す、5) 誘導体の種類により蛍光波長を選択可能、といった特性を持つ蛍光色素である。BTP3-Neu5AcはBTP3のフェノール性水酸基に、シアリダーゼの基質のシアル酸の主な分子種であるNeu5Acを付加することで蛍光性をオフ制御した化合物である。BTP3-Neu5Acは、抗ウイルス抗体や固定化处理などの余分な操作やコストを必要とせずに、試薬を添加するだけで迅速にウイルスやその感染細胞を蛍光化できる。本研究は、研究代表者らが開発したBTP3-Neu5Acを利用して、薬剤耐性インフルエンザウイルスを高感度、簡便、迅速に検出および分離する技術確立することを目的とする。

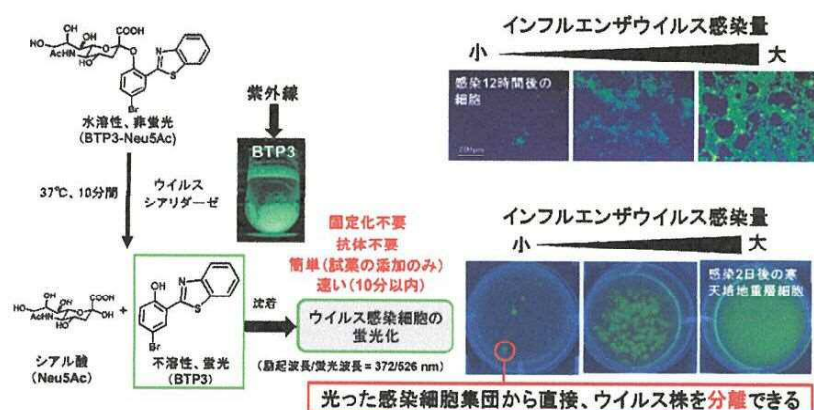


図1. BTP3-Neu5Acによるシアリダーゼ活性の局所的な蛍光化機構とインフルエンザA型ウイルス感染細胞(集団)の蛍光化像

研究成果

タミフル耐性ウイルスあるいはその感染細胞は、シアリダーゼ阻害剤のタミフル (実験に使用したタミフルは活性型) 存在下でもシアリダーゼ活性を維持することから、BTP3-Neu5Acの反応により蛍光可視化が可能と予想される。そこで、2008～2009年に分離されたタミフル耐性株と感受性株を利用して (図2)、タミフルの使用濃度や検出条件を求めた。これらのウイルスをイヌ腎由来MDCK細胞に感染させ、感染細胞表面上にウイルス由来シアリダーゼを豊富に発現させるため、37℃、12時間培養した。シアリダーゼ阻害剤を添加せずにBTP3-Neu5Acのみを反応させたとき、タミフル耐性及び感受性の両ウイルス感染細胞で紫外線照射下、蛍光顕微鏡によって蛍光化が観察された。タミフルを添加してBTP3-Neu5Acを反応させると、タミフル感受性ウイルスの感染細胞は蛍光化され

なかった一方で、タミフル耐性ウイルスの感染細胞は蛍光化された。本法により、薬剤耐性ウイルスの選択的蛍光化が可能であることが判明した。リレンザを添加してBTP3-Neu5Acを反応させた細胞では、両ウイルスともに蛍光化されなかった（図3）。これは、今回使用している2008年国内分離株のタミフル耐性ウイルスにリレンザが有効とする結果と一致する。

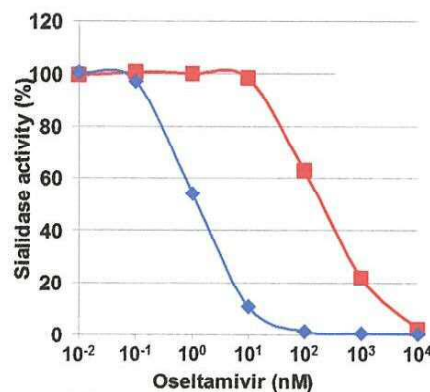


図2. タミフル感受性および耐性ウイルスのタミフルによるシアリダーゼ阻害効果
Oseltamivirはタミフル（活性型）の一般名。■はタミフル耐性ウイルス、◆はタミフル感受性ウイルス。タミフルを37℃、15分反応後、BTP3-Neu5Acを添加し、37℃、1時間反応させ、Ex : Em = 372 nm/ 526 nmでシアリダーゼ活性を蛍光測定した。タミフル非添加時の活性を100%とする相対活性で示した。

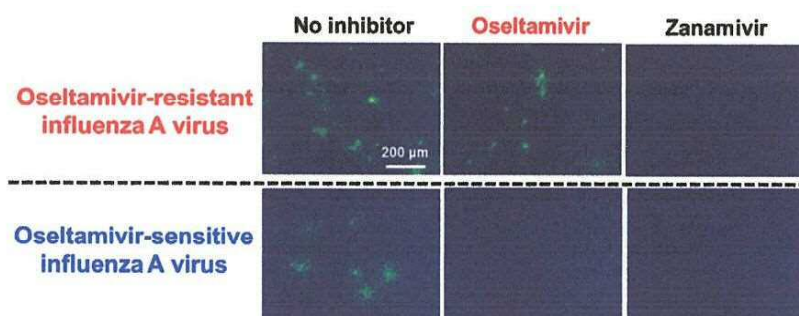


図3. ウイルス感染細胞の蛍光化によるタミフル耐性検出
Zanamivirはリレンザの一般名。ウイルス感染細胞にシアリダーゼ阻害剤を37℃、5分間反応後、BTP3-Neu5Acを37℃、30分間反応させ、紫外線照射下で緑色蛍光を観察した。

ウイルス感染細胞をアガロースゲル培地で重層して培養すると、一つのウイルスが感染した細胞から産生された子孫ウイルスが大きく拡散せずに、近接した周囲の細胞のみに感染拡大していく。形成された感染細胞集団はプラーク状となり、ウイルスが誘導する細胞死により脱落するとプラークとなる。ただし、このプラーク形成能は細胞死誘導能などのウイルス株の性状に大きく依存するため、ウイルス株によっては明確なプラーク形成が見られないこともある。一つのウイルスから感染細胞集団が形成されるため、この細胞集団プラークをピックアップすることでウイルス株クローンを分離することができる。本研究では、タミフル耐性ウイルスのプラークを選択的に蛍光化する方法、さらに耐性株のみを効率的に分離する方法の確立を試みた。タミフル感受性ウイルスの感染

価100に対してタミフル耐性ウイルスの感染価1の割合で、MDCK細胞に混合感染させて2 $\mu\text{g/ml}$ のアセチル化トリプシン含有アガロース無血清培地を重層した。37°C、48時間培養後、アガロース培地上にBTP3-Neu5Acのみ、あるいはタミフルとBTP3-Neu5Ac混合液を滴下して、37°C、1時間培養した。紫外線照射下、ウイルス感染細胞集団をプラーク状に蛍光化した。BTP3-Neu5Acのみを反応させたとき、多数のプラーク状に蛍光化された感染細胞集団が見られた。一方、タミフルとBTP3-Neu5Ac混合液を反応させたとき、わずかの感染細胞集団のみが蛍光化された（図4）。

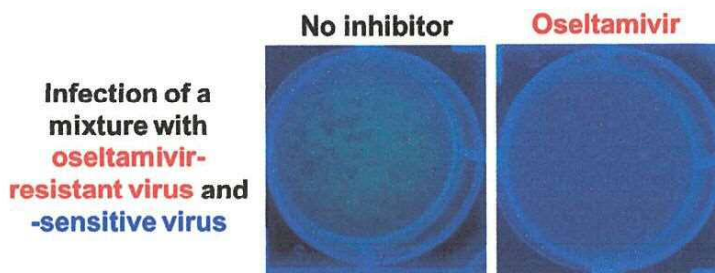


図4. タミフル耐性及び感受性ウイルス混合感染からの耐性株の選択的検出
左図はタミフル非存在下、右図はタミフル存在下の、BTP3-Neu5Acによるプラーク状の感染細胞集団の蛍光可視化。

今回使用したウイルスはシアリダーゼのH275Yアミノ酸置換（ヒトウイルスN1型NAのアミノ酸番号基準）が、タミフル耐性化を決めている。上記で確立した方法によって、タミフル存在下で選択的に蛍光化された感染細胞集団が、タミフル耐性ウイルスに由来することをH275Y置換のRT-PCR遺伝子検出によって確認した。プラーク状の蛍光化細胞集団からピックアップされた8株の中で、すべてが275Y（タミフル耐性）を有していた。1株のみであるが、275H（タミフル感受性）が混在していた（図5）。本法により、高確率で薬剤耐性ウイルス株を選択的に分離できることが分かった（論文投稿中）。

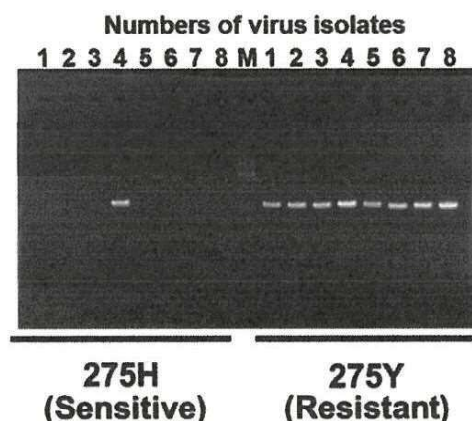


図5. 蛍光化細胞集団から分離したウイルス株のタミフル耐性化変異の検出
RT-PCRにより、プラーク状の蛍光化感染細胞集団から分離したウイルス株のタミフル耐性化を決定するシアリダーゼ遺伝子変異を検出した。275Hはタミフル感受性、275Yはタミフル耐性のウイルスであることを示す。

現在、静岡市環境保健研究所と共同で近年のインフルエンザA型ウイルスを感染させた細胞を各シアリダーゼ阻害剤とBTP3-Neu5Acを反応させることで、薬剤耐性ウイルスをスクリーニングしている。また、シアリダーゼ阻害剤存在下でウイルス培養を繰り返すことで、薬剤耐性化変異を獲得したウイルス株をBTP3-Neu5Acを利用して効率的に分離することを試みている。今後、本研究で開発した方法により、薬剤耐性化機構が効率的に解明されていくものと期待される。また今回、BTP3-Neu5Acがおたふく風邪ウイルスや小児呼吸器ウイルスのヒトパラインフルエンザウイルス及びそれらの感染細胞の蛍光検出に利用できることが判明した。BTP3-Neu5Acは薬剤耐性インフルエンザウイルス検出だけでなく、これらのヒト病原ウイルス検出にも利用できる応用性のある物質である。

最後に本研究にご支援いただいた公益社団法人ふじのくに地域・大学コンソーシアムに深く感謝申し上げたい。

参考文献

1. Yuuki Kurebayashi*, Tadanobu Takahashi* (*these authors contributed equally to this work), Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda, Shunsaku Takahashi, Maiko Takano, Takashi Agarikuchi, Tsubasa Sato, Yukino Matsuda, Akira Minami, Hiroaki Kanazawa, Yuko Uchida, Takehiko Saito, Yoshihiro Kawaoka, Toshihiro Yamada, Fumihiko Kawamori, Robin Thomson, Mark von Itzstein, Takashi Suzuki. Imaging of influenza virus sialidase activity in living cells. *Sci. Rep.* 4, 4877 (2014)
2. 高橋忠伸: ウイルス感染における糖鎖の機能解明、Function of Glycochains in Virus Infection、*YAKUGAKU ZASSHI* 134 (8), 889-899 (2014)
3. 高橋忠伸: ウイルス酵素を利用したウイルスや感染細胞の簡便、迅速な検出試薬の開発とその応用、*実験医学* Vol. 33. No. 13, p. 2114 (2015)
4. Tadanobu Takahashi. Properties of and a new technique for fluorescent detection of influenza virus sialidase. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 27 (158), E49-E60 (2015)
5. Tadanobu Takahashi*, Maiko Takano* (*they contributed equally as first authors), Yuuki Kurebayashi, Takashi Agarikuchi, Chihiro Suzuki, Keijo Fukushima, Shunsaku Takahashi, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda, Akira Minami, Takashi Suzuki. Rapid fluorescent detection assay for human parainfluenza viruses. *Biol. Pharm. Bull.* 38, 1214-1219 (2015)
6. Tadanobu Takahashi, Takashi Agarikuchi, Yuuki Kurebayashi, Nona Shibahara, Chihiro

- Suzuki, Akiko Kishikawa, Keijo Fukushima, Maiko Takano, Fumie Suzuki, Hirohisa Wada, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda, Akira Minami, Takashi Suzuki. Easy and Rapid Detection of Mumps Virus by Live Fluorescent Visualization of Virus-Infected Cells. *PLoS One* 10, e0144038 (2015).
7. Maiko Takano*, Tadanobu Takahashi* (*they contributed equally as first authors), Takashi Agarikuchi, Yuuki Kurebayashi, Akira Minami, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda, Hiroaki Kanazawa, Takashi Suzuki. Histochemical fluorescent staining of Sendai virus-infected cells with a novel sialidase substrate. *Virology* 464-465, 206-212 (2014)
 8. Tadanobu Takahashi, Maiko Takano, Takashi Agarikuchi, Yuuki Kurebayashi, Akira Minami, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda, Takashi Suzuki. A novel method for detection of Newcastle disease virus with a fluorescent sialidase substrate. *J. Virol. Methods* 209, 136-142 (2014)
 9. Tadamune Otsubo, Akira Minami, Haruna Fujii, Risa Taguchi, Tadanobu Takahashi, Takashi Suzuki, Fumiteru Teraoka, Kiyoshi Ikeda. 2-(Benzothiazol-2-yl)-phenyl- β -D-galactopyranoside derivatives as fluorescent pigment dyeing substrates and their application for the assay of β -D-galactosidase activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23, 2245-2249 (2013)
 10. Akira Minami, Tadamune Otsubo, Daisuke Ieno, Kiyoshi Ikeda, Hiroaki Kanazawa, Kosuke Shimizu, Ko Ohata, Tsunehiro Yokochi, Yuuki Horii, Hokuto Fukumoto, Risa Taguchi, Tadanobu Takahashi, Naoto Oku, Takashi Suzuki. Visualization of Sialidase Activity in Mammalian Tissues and Cancer Detection with a Novel Fluorescent Sialidase Substrate. *PLoS One* 9, e81941 (2014)
 11. Tadanobu Takahashi, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda, Akira Minami, Takashi Suzuki. Histochemical imaging of alkaline phosphatase using a novel fluorescent substrate. *Biol. Pharm. Bull.* 37, 1668-1673 (2014)

研究成果発表（平成27年度）

本研究に関する原著論文・総説（下線太字は研究代表者）

1. Yuuki Kurebayashi*, Tadanobu Takahashi* (*They contributed equally as first authors), Tadamune Otsubo, Chihiro Tamoto, Tatsuya Yokozawa, Nona Shibahara, Hirohisa Wada, Keiji

Sahara, Fumihiko Kawamori, Akira Minami, Kiyoshi Ikeda, Takashi Suzuki. Selective detection and isolation of neuraminidase inhibitor-resistant influenza virus by sialidase live fluorescence imaging. (投稿中)

2. Tadanobu Takahashi, Takashi Agarikuchi, Yuuki Kurebayashi, Nona Shibahara, Chihiro Suzuki, Akiko Kishikawa, Keijo Fukushima, Maiko Takano, Fumie Suzuki, Hirohisa Wada, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda, Akira Minami, Takashi Suzuki. Easy and Rapid Detection of Mumps Virus by Live Fluorescent Visualization of Virus-Infected Cells. *PLoS One* 10, e0144038 (2015)
3. Tadanobu Takahashi*, Maiko Takano* (*they contributed equally as first authors), Yuuki Kurebayashi, Takashi Agarikuchi, Chihiro Suzuki, Keijo Fukushima, Shunsaku Takahashi, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda, Akira Minami, Takashi Suzuki. Rapid fluorescent detection assay for human parainfluenza viruses. *Biol. Pharm. Bull.* 38, 1214-1219 (2015)
4. Tadanobu Takahashi. Properties of and a new technique for fluorescent detection of influenza virus sialidase. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 27 (158), E49-E60 (2015)
5. 高橋忠伸: インフルエンザウイルスのシアリダーゼの性状と新しい蛍光検出法、*Trends Glycosci. Glycotechnol.* 27 (158), J49-J60 (2015)
6. 高橋忠伸: ウイルス酵素を利用したウイルスや感染細胞の簡便、迅速な検出試薬の開発とその応用、*実験医学* (2015年8月号、羊土社), 33 (13), 2114 (2015)
7. Tadanobu Takahashi, Takashi Suzuki: Low-pH Stability of Influenza A Virus Sialidase Contributing to Virus Replication and Pandemic. *Biol. Pharm. Bull.* 38, 817-826 (2015)
8. 高橋忠伸: インフルエンザウイルスの新たな創薬や防疫戦略の開発をめざした研究、*Aging & Health* 73号 (2015年4月発行、株式会社厚生科学研究所), 38-41 (2015)

本研究に関する学会発表

1. 紅林佑希、高橋忠伸、田本千尋、大坪忠宗、池田 潔、鈴木 隆: 薬剤耐性判定に利用可能なインフルエンザウイルス蛍光検出法の確立、第61回日本薬学会東海支部 総会・大会(名古屋)、2015年7月4日
2. 高橋忠伸: 糖鎖を利用したウイルスと宿主の生存戦略、糖鎖科学中部拠点 糖鎖科学講義(名古屋)、2015年7月29日
3. 高橋忠伸、上り口 敬、紅林佑希、高野舞子、福島圭穰、鈴木千尋、柴原乃奈、和田裕久、大

坪忠宗、池田 潔、南 彰、鈴木 隆：シアリダーゼ蛍光イメージング剤を用いたヒト病原パ
ラインフルエンザウイルスの検出分離法の開発、第34回日本糖質学会年会（東京）、2015年8月
3日

4. 紅林佑希、高橋忠伸、田本千尋、大坪忠宗、池田 潔、鈴木 隆：薬剤耐性判定を可能とする
インフルエンザウイルス蛍光検出法の確立、第14回 次世代を担う若手ファーマ・バイオフィ
ーラム2015（千葉）、2015年9月12日
5. 高橋忠伸、大坪忠宗、池田 潔、柴原乃奈、和田裕久、南 彰、鈴木 隆：おたふく風邪ウイ
ルスを短い時間で簡単に検出！しかもウイルス分離も楽に！、USフォーラム2015 ハイライト
紙面発表、2015年9月29日
6. Yuuki Kurebayashi, Tadanobu Takahashi, Tadamune Otsubo, Chihiro Tamoto, Nona Shibahara,
Keiji Sahara, Kiyoshi Ikeda, Takashi Suzuki : Selective detection and isolation of
neuraminidase inhibitor-resistant influenza virus using live fluorescence imaging of
sialidase、第20回静岡健康・長寿学術フォーラム（静岡）、2015年10月30日
7. Yuuki Kurebayashi, Tadanobu Takahashi, Takashi Suzuki : 薬剤耐性インフルエンザウイル
スの迅速かつ高感度な検出分離法の確立、The 63rd Annual Meeting of the Japanese Society
for Virology (Fukuoka)、2015年11月23日
8. Tadanobu Takahashi : Functional analysis of glyco-molecules that bind with influenza virus,
The 63rd Annual Meeting of the Japanese Society for Virology (Fukuoka) 杉浦奨励賞受
賞講演、2015年11月24日
9. 高橋忠伸 : ウイルス感染における糖鎖の機能解明と糖鎖の利用技術の開発、第38回日本分子生
物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2015) ワークショップ「糖鎖を利用した、
異物と宿主の生存戦略」招待講演（神戸）、2015年12月3日
10. 高橋忠伸 : 薬剤耐性インフルエンザウイルスの高感度、簡便、迅速な検出方法および分離法の
開発、第1回ふじのくに地域・大学フォーラム（静岡）、2016年2月27日予定
11. 紅林佑希、高橋忠伸、大坪忠宗、田本千尋、池田 潔、鈴木 隆：薬剤耐性インフルエンザウ
イルスの迅速かつ選択的な検出分離法の確立、日本薬学会第136年会（横浜）、2016年3月27日
予定

本研究に関係する受賞

1. 紅林佑希：「シアル酸蛍光プローブを用いたインフルエンザウイルス検出法の確立」糖鎖科学

中部拠点 2014年度 奨励賞

2. 紅林佑希：「薬剤耐性判定に利用可能なインフルエンザウイルス蛍光検出法の確立」学生優秀発表賞、第61回日本薬学会東海支部 総会・大会（名古屋）、2015年7月4日
3. 紅林佑希：「薬剤耐性判定を可能とするインフルエンザウイルス蛍光検出法の確立」優秀発表賞、第14回 次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム2015（千葉）、2015年9月12日
4. 高橋忠伸：「Functional analysis of glyco-molecules that bind with influenza virus」日本ウイルス学会 平成27年度 杉浦奨励賞、日本ウイルス学会、2015年11月23日

学術研究助成事業の概要

浜松医科大学

医学部感染症学講座

職名 教授 氏名 鈴木 哲朗

研究課題：マイクロミニピッグを利用したウイルス性胃腸炎モデルの作製

研究の概要と成果：

ヒトノロウイルス（以下ノロウイルス）は、食中毒、感染性胃腸炎の最も重要な原因因子であるが、培養細胞や実験動物での感染増殖系が確立していないことから、予防法、治療法の開発が遅れている。マイクロミニピッグ（MMP）は、県内にて開発された世界最小の実験用ブタであり医療用実験動物としての可能性が示されているが、ウイルス感染症モデルとしての有用性は明らかにされていない。本研究では、MMPがノロウイルスの感染増殖系またウイルス性胃腸炎モデルとして有用であるかを明らかにすることを目的とした。

食中毒及び集団胃腸炎感染症例より採取したノロウイルス陽性便材料から乳化処理、遠心・濾過操作などによりgenogroup I及びIIのノロウイルス株を含むウイルス検体を調製した。このウイルス検体をMMPへ経口投与しその後毎日1回糞便の回収を行い、排泄されたノロウイルス量（ウイルスRNA量）を投与後12日目まで経時的に測定した。

MMPの個体差はあるものの、ノロウイルス接種後1から4日目まで、高いウイルス排泄レベルを示しその後は日を迫うにつれ排泄ウイルス量は低下した。多くのMMPで接種後10日前後には糞便中のウイルスRNAが検出限界以下となったが、一部のMMPではその後、再び排泄ウイルスが検出されるようになった。これが、ウイルスの感染増殖に伴うものなのか不明であるが、接種したウイルス検体中には数種類のノロウイルス株が混在していることから、接種後10日以降に再検出されたウイルスがどの株に由来するかを遺伝子解析によって明らかにすることにより、MMPに感受性を示すノロウイルスの特徴がわかるかもしれない。

研究論文を提出できない理由

本申請採択後、速やかに実験準備を開始し、本学医学研究倫理委員会への実験計画の申請、承認（昨年11月）を経て、患者由来ウイルス材料のマイクロミニピッグ（MMP）への感染実験を実施致しました。

結果は、様式第3号別紙（学術研究助成の概要）の通りであります。MMPでのノロウイルス感染の成立を確実なものとし、病態モデルとしての有用性を評価するためには、実験条件（感染材料の選抜、調製方法の改良、感染条件の改善など）の最適化を計った上で多方面（ウイルス学的、免疫学的、病理学的）に亘る詳細なMMP材料の解析を実施し、さらに再現性を確認することが必要となります。そのためには少なくとも今後複数年の実験期間を要することが想定されます。

現時点で取得しております実験結果をもって本研究の結論を論じることが困難であり、上記のような今後の実験から得られます結果を精査し結論を導く所存であります。その上で研究成果の学術発表の方針を決定し実施したいと思っております。今後、本研究成果について学会誌等に発表する論文は改めて提出致します。

本研究は、世界的に成功していないノロウイルスの感染、病態動物モデルの確立を目指す、極めて挑戦的なものであることをどうぞご理解ください。

研究課題名 マイクロミニピッグを利用したウイルス性胃腸炎モデルの作製
大学名 浜松医科大学
氏 名 鈴木 哲朗