

## 論文内容要旨

報告番号	甲 栄 第 276 号	氏名	野中(西坂)理沙
題 目	Irradiation by ultraviolet light-emitting diodes inactivates influenza A viruses by inhibiting replication and transcription of viral RNA in host cells (紫外線発光ダイオード照射は宿主細胞内でのウイルスRNAの複製と転写を抑制することでA型インフルエンザウイルスを不活化する)		
<p>A 型インフルエンザウイルス(influenza A virus, IAV)はオルトミクソウイルス科に分類される。IAV はマイナス一本鎖の分節状 RNA ゲノムをもち、ヘマグルチニン (HA) やノイラミニダーゼ (NA) を含む 11 種類のタンパク質をコードしている。細胞レセプターへの結合に関与する HA と宿主細胞からの放出に関与する NA の組み合わせによって、IVA はさらに亜型に分類される。近年、IAV の中でも鳥類に対して致死性が高い H5N1 や H7N7 などの高病原性鳥インフルエンザウイルス (HPAI) の野鳥や家禽への感染がアジアを中心に世界的に広まっており、養鶏産業に大きな被害をもたらしている。また、H5N1 や H7N7 などの HPAI はヒトへの感染事例も多く報告され、感染能力はまだ低いものの 50%近い致死性を示すことから、有効な感染対策が必要とされている。そこで本研究では紫外線発光ダイオード (UV-LED) 照射による IAV 感染制御に着目した。当研究グループはこれまでに近紫外線 (UVA) -LED 照射による病原性細菌への殺菌効果とその機構を明らかにしてきた。近年では深紫外線 (UVC) -LED の開発が進み、病原性細菌やファージに対する不活化効果が報告されているが、IAV に対する効果は不明である。そこで本研究では H1N1 亜型(A/Puerto Rico/8/1934)、に ピーク波長がそれぞれ 365nm (UVA)、310nm (UVB) 及び 280nm (UVC) の LED を照射し、不活化効果の評価とその機構を明らかにすることを目的とした。さらに、HPAI の H5N1 亜型(A/Crow/Kyoto/53/2004)の不活化に応用できるか検討した。</p> <p>本研究では 0.3mL の H1N1 亜型のウイルス希釈液へ UV-LED を許容最大の順電流で照射を行った。照射後、イヌ腎臓尿管上皮由来 (MDCK) 細胞に感染させ、プラーク形成単位 (PFU) により不活化効果の評価を行うと、UVA-LED は 63.6 kJ/cm<sup>2</sup> の照射で 1/100 以下、UVB-LED は 1.32 kJ/cm<sup>2</sup>、UVC-LED は 0.11 J/cm<sup>2</sup> の照射で 1/1000 以下まで感染力価が低下した。次に、UV-LED 照射による不活化機構を調べるために細胞接着に重要な HA の力価をニワトリ赤血球を用いて評価した。すると、MDCK 細胞への感染力価を十分に減らす照射エネルギーであっても HA 力価は変化しなかったことから、UV 照射による不活化効果は宿主細胞への接着能力の変化によるものではないと考えられた。さらに、ウイルス RNA の複製に関わる complementary RNA (cRNA) と viral RNA (vRNA)、転写に関わる messenger RNA (mRNA) の 3 種のウイルス RNA の宿主細胞内の動態を定量的 RT-PCR 解析によって調べた。いずれの波長の UV-LED 照射も宿主細胞内の cRNA、vRNA、mRNA の増殖を抑制したことから、UV-LED 照射は宿主細胞内でのウイルス RNA の複製と転写の両方を抑制したと考えられた。最後に、フォーカス法を用いて HPAI の H5N1 亜型への不活化効果の評価すると、UVC-LED と UVB-LED 照射は H1N1 亜型に対してよりも不活化効果が有意に高かった。</p> <p>以上の結果より、UVA から UVC 波長の UV-LED 照射は IAV の宿主細胞内でのウイルス RNA の複製と転写を抑制することで子孫ウイルスの増殖を阻害し、不活化に働くことが分かった。これまで UV-LED 照射によるウイルスへの不活化効果は不明であったが、本研究では UVC-LED と UVB-LED 照射は HPAI も不活化できたことから、鳥インフルエンザの感染対策にも有用である可能性が示唆された。</p>			

報告番号	甲 栄 第 276 号	氏名	野中(西坂)理沙
審査委員	主査 宮本 賢一 副査 野間口 雅子 副査 首藤 恵泉		
題目	Irradiation by ultraviolet light-emitting diodes inactivates influenza A viruses by inhibiting replication and transcription of viral RNA in host cells (紫外線発光ダイオード照射は宿主細胞内でのウイルスRNAの複製と転写を抑制することでA型インフルエンザウイルスを不活化する)		
著者	Risa Nishisaka-Nonaka, Kazuaki Mawatari, Tomomi Yamamoto, Mizuki Kojima, Takaaki Shimohata, Takashi Uebanso, Mutsumi Nakahashi, Takahiro Emoto, Masatake Akutagawa, Yohsuke Kinouchi, Takahiro Wada Masayuki Okamoto, Hiroshi Ito, Ken-ichi Yoshida, Tomo Daidoji, Takaaki Nakaya, Akira Takahashi		
	平成30年12月発行 Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology 第189巻193-200ページに発表済		
要旨	<p>近年、A型インフルエンザウイルス (influenza A virus, IAV) の中でも鳥類に対して致死性が高いH5N1やH7N9などの高病原性鳥インフルエンザウイルス (HPAI) の野鳥や家禽への感染がアジアを中心に世界的に広まっており、養鶏産業等に大きな被害をもたらしている。これらのウイルスはオルトミクソウイルス科に属し、宿主細胞のレセプターへの結合に関与するヘマグルチニン (HA) と宿主細胞からの放出に関与するノイラミニダーゼの組み合わせによって、IAVはさらに亜型に分類される。また、H5N1やH7N9などのHPAIはヒトへの感染事例も多く報告され、感染能力はまだ低いものの50%近い致死性を示すことから、有効な感染対策が必要とされている。そこで本研究では紫外線発光ダイオード (UV-LED) 照射によるIAV感染制御に着目した。近年、UV-LEDは近紫外線 (UVA) から深紫外線 (UVC) まで発光可能な半導体の開発が進み、病原性細菌やファージに対する不活化効果が報告されているが、IAVに対する効果は未だ不明である。そこで本研究ではH1N1亜型 (A/Puerto Rico/8/1934) にピーク波長がそれぞれ365nm (UVA)、310nm (UVB) 及び280nm (UVC) のLEDを照射し、不活化効果の評価とその機構を明らかにすることを目的とした。さらに、HPAIのH5N1亜型 (A/Crow/Kyoto/53/2004) の不活化に応用できるか検討した。</p> <p>まず、0.3mLのH1N1亜型のウイルス希釈液へUV-LEDを許容最大の順電流で照射を行った。照射後、イヌ腎臓尿管上皮由来 (MDCK) 細胞に感染させ、プラーク形成単位により不活化効果の評価を行うと、UVA-LEDは63600 J/cm<sup>2</sup>の照射で1/100以下、UVB-LEDは1320 J/cm<sup>2</sup>、UVC-LEDは0.11 J/cm<sup>2</sup>の照射で1/1000以下まで感染力価が低下した。次に、UV-LED照射による不活化機構を調べるために細胞接着に重要なHAの力価をニワトリ赤血球に対する凝集反応を用いて評価した。その結果、MDCK細胞への感染力価を十分に減らす照射エネルギーであってもHA力価は変化しなかったことから、UV照射による不活化効果は宿主細胞への接着能力の変化によるものではないと考えられた。さらに、ウイルスRNAの複製に関わるcomplementary RNA (cRNA) とviral RNA (vRNA)、転写に関わるmessenger RNA (mRNA)の3種のウイルスRNAの宿主細胞内の動態を定量的RT-PCR解析によって調べた。いずれの波長のUV-LED照射も宿主細胞内のcRNA、vRNA、mRNAの増殖を抑制したことから、UV-LED照射は宿主細胞内でのウイルスRNAの複製と転写の両方を抑制したと考えられた。最後に、フォーカス法を用いてHPAIのH5N1亜型への不活化効果の評価すると、UVC-LEDとUVB-LED照射はH1N1亜型に対してよりも不活化効果が有意に高かった。</p> <p>以上の結果より、UV-LED照射はIAVの宿主細胞内でのウイルスRNAの複製と転写を抑制することで子孫ウイルスの増殖を阻害し、不活化に働くことが分かった。また、UVC-LEDとUVB-LED照射はHPAIも不活化できたことから、鳥インフルエンザの感染対策にも有用である可能性が示唆された。本研究で得られた成果はIAVの感染予防に寄与する重要な知見であると考えられたため、博士(栄養学)に値するものと判定した。</p>		