

受付番号：2018-1-897

課題名：呼吸器ウイルス感染によるヒト気管上皮細胞の炎症性機能変化と制御法の研究

1. 研究の対象

2016年1月～2016年12月に当院で病理解剖を受けられた患者様

2. 研究期間

2015年2月（倫理委員会承認後）～2021年2月

3. 研究目的

呼吸器ウイルス（風邪ウイルス）感染は気管支喘息や肺気腫などの慢性閉塞性肺疾患の症状悪化や呼吸不全をもたらすため、ウイルス感染による気道・肺の病態や治療法の研究が重要です。

気道上皮細胞は呼吸器ウイルス感染の最初の標的細胞です。私たちは、ご遺族の承諾を頂いて実施された病理解剖の気管組織から上皮細胞を培養し、呼吸器ウイルスであるライノウイルスやインフルエンザ、RS(respiratory syncytial)ウイルス感染による喀痰分泌や気道過剰水分分泌、炎症惹起物質の合成などの研究を実施してきました。これまでの研究において、ウイルス感染による炎症惹起物質や喀痰の合成促進、呼吸器治療薬剤（気管支拡張薬や吸入ステロイド薬など）による炎症の抑制作用を明らかにしてきました。

病理解剖から提供される気管上皮初代培養細胞を用いた研究は、わが国では私たちの研究室でのみ実施されています。本研究において、呼吸器ウイルス感染による気道上皮細胞の機能変化や、ウイルス感染予防法・治療法の研究を、培養気管上皮細胞を用いて行ないます。本研究を通じて風邪症候群を生じる呼吸器ウイルス感染による気道炎症に関する機序が解明され、ウイルス感染抑制法およびウイルス感染に随伴する気管支喘息・慢性閉塞性肺疾患増悪の治療法・予防法が開発されると期待されます。

4. 研究方法

[細胞の分離と培養]

病理解剖において研究用に供された気管から上皮細胞を、酵素を用いて単離し、試験管および培養プレートなどの容器に培養します。

- 1-1: 気管表面から上皮組織を剥離します。
- 1-2: プロテアーゼを溶解した緩衝液に上皮組織を入れて冷蔵庫で保存します。
- 1-3: 翌日に上皮組織を振とうして細胞を組織から遊離させ、回収します。
- 1-4: 試験管、フラスコ、プレートなどの容器などに細胞を入れて培養します。

[培養細胞のウイルス感染と測定試料の回収]

1. 容器に培養した気管上皮細胞に呼吸器症状を生じるウイルス（ライノウイルス、respiratory syncytial virus、インフルエンザウイルス、ヒト・メタニューモウイルス、パラインフルエンザウイルス、コロナウイルス、エンテロウイルス）を感染させます。
2. 感染の後、培養液および細胞蛋白、細胞内 RNA を回収します。
3. 培養した一部の細胞を保存、継代および不死化して、ウイルスの感染性が上がるかどうかを検討します。

[測定内容と方法]

1. 培養液ウイルス放出量、細胞内ウイルス RNA 複製量、培養液炎症性サイトカイン放出量、ムチン量、活性酸素（オキシダント）放出量等の時間経過を測定します。
2. 培養液ウイルス放出量は 10 倍希釈法で希釈したのち、感受性のある細胞に感染させ、顕微鏡で細胞の形態を観察することで定量する。細胞形態の変化した現象（細胞変性効果）を引き起こす最大希釈倍率からウイルス量を求めます。
3. 細胞内ウイルス複製量は RT-PCR 法によるウイルス RNA の定量を行います。
4. 細胞培養液に放出された炎症性サイトカイン濃度測定はインターロイキン (IL)-1beta、IL-6、IL-8、腫瘍壊死因子 (TNF-alpha) などを予定しています。

[薬剤の抑制効果測定法]

1. 該当する試薬あるいは呼吸器疾患の治療で使用する薬剤を培養液に加え、細胞に作用させる。その上で培養液ウイルス放出量、細胞内ウイルス RNA 複製量、炎症性サイトカイン放出量、活性酸素（オキシダント）放出量が減少するかどうかを測定します。この結果を元に、ウイルス感染および気道炎症の抑制をもたらすかどうかを検討します。
2. ウイルス感染抑制機序を測定するため、感染受容体や細胞内シグナルである NF-kB などの活性を測定します。また、細胞内のウイルス進入部位である酸性エンドゾーム数、IL-6 受容体、細胞死に関係する細胞内酵素の関与を計測します。

[知的財産権の帰属先および特許申請]

1. 本研究により得られた結果やデータ、知的財産権は、東北大学に帰属します。具体的な取扱いや配分は協議して決定します。研究責任者の知的財産の帰属先を個人とするか研究機関とするかは、所属研究機関の取り決めに従います。

2. 本研究により得られた結果やデータ等の知的財産を元にして東北大学知的財産部が設定した取決めに従い特許申請を行います。具体的な取扱いは所属研究機関の取決めに従います。

5. 研究に用いる試料・情報の種類

試料：初代培養上皮細胞、初代培養上皮細胞を用いた継代細胞および不死化細胞等

6. 外部への試料・情報の提供

試料の提供：仙台医療センター病因研究室 西村秀一室長 および埼玉医科大学呼吸器内科 中込一之講師に研究用に提供されます。仙台医療センター 西村秀一室長へは培養した細胞を直接手渡し、あるいは細胞を容器に入れて宅配します。埼玉医科大学呼吸器内科 中込一之講師へは培養した細胞を容器に入れて宅配します。

情報の提供：特定の関係者以外がアクセスできない状態で、紙媒体あるいは e-mail 等で行います。対応表は、当大学の研究責任者が保管・管理します。

7. 研究資金および利益相反（当該企業等との利害関係）について

本研究は、文部科学省科学研究費、企業との受託研究費及び大学での研究を使用目的として企業から受け入れた寄附金により実施します。

研究責任者である山谷睦雄および研究分担者の鄧 雪は、杏林製薬（株）、大正富山医薬品（株）、富山化学工業（株）の 3 社が寄附元である寄附講座の教員および職員であり、本研究にて対象とする原末の提供元のうちの一社であるアストラゼネカ（株）から年間 200 万円以上の研究費を受け入れて、受託研究を行っています。本課題は一部をその一環として実施する。また、高山 真 および菊地章子は（株）ツムラが寄附元である寄附講座の教員です。

本研究では、杏林製薬（株）が製造販売元である「ムコダイン」（一般名：L-カルボシステイン）、大正富山医薬品（株）が発売元である「クラリス」（一般名：クラリスロマイシン）、マイラン EPD 合同会社が発売元である「クラリシッド」（一般名：クラリスロマイシン）、「ホクナリン」（一般名：ツロブテロール）、第一三共（株）が製造販売元である「イナビル」（一般名：ラニナミビル）、日本ベーリンガーインゲルハイム（株）が発売元である「スピリーバ」（一般名：チオトロピウム）、アストラゼネカ（株）が製造販売元である「シムビコート」（一般名：ブデソニド/ホルモテロール配合薬）およびアストラゼネカ（株）が製造販売承認予定となっている一般名「グリコピロニウム」の原末、帝人ファーマ（株）が製造販売元である「ムコソルバン」（一般名：アンブロキシール）、中外製薬（株）が発売元である「タミフル」（一般名：オセルタミビル）、グラクソ・スミスクライン（株）が製造販売元である「リレンザ」（一般名：ザナミビル）、「セレベント」（一般名：サルメテロール）および「フルタイド」（一般名：フルチカゾン）、塩野

義製薬（株）が製造販売元である「ラピアクタ」（一般名：ペラミビル）、小野薬品工業（株）が製造販売元である「エラスポール」（一般名：シベレスタット）、「エフオーワイ」（一般名：ガベキサート）および「フォイパン」（一般名：カモスタット）、鳥居薬品（株）が製造販売元である「フサン」（一般名：ナファモスタット）、セラバリューズ（株）が製造元で杏林製薬（株）が発売元である「キョークルミン」（一般名：クルクミン）の原末（医薬品製造の工程において、原料として用いられる個々の薬物の粉末）、（株）ツムラが製造販売元である「麻黄湯」、「麻杏甘石湯」、「麻黄附子細辛湯」、「葛根湯」、「小青龍湯」、「清肺湯」、「人参養栄湯」、「麦門冬湯」、「小柴胡湯」および「柴朴湯」のエキス末も使用する。また、北里大学北里生命科学研究所が合成したエリスロマイシン誘導体（EM900）も使用します。

なお、使用する原末のうち、「L-カルボシステイン」は杏林製薬（株）から、「クラリスロマイシン」は大正富山医薬品（株）から、「ツロブテロール」はマイラン EPD 合同会社から、「ラニナミビル」は第一三共（株）から、「チオトロピウム」は日本ベーリンガーインゲルハイム（株）から、「オセルタミビル」は中外製薬（株）から、「ザナミビル」、「サルメテロール」および「フルチカゾン」はグラクソ・スミスクライン（株）から、「ペラミビル」は塩野義製薬（株）から、「シベレスタット」、「ガベキサート」および「カモスタット」は小野薬品工業（株）から、「クルクミン」はセラバリューズ（株）から、「ブデソニド」、「ホルモテロール」および「グリコピロニウム」はアストラゼネカ（株）から、「麻黄湯」、「麻杏甘石湯」、「麻黄附子細辛湯」、「葛根湯」、「小青龍湯」、「清肺湯」、「人参養栄湯」、「麦門冬湯」、「小柴胡湯」および「柴朴湯」のエキス末は（株）ツムラから研究試料の提供に関する覚書により無償で提供を受けており、帝人ファーマ（株）が製造販売元である「アンプロキシオール」、および鳥居薬品（株）が製造販売元である「ナファモスタット」は研究費により購入しています。「エリスロマイシン誘導体（EM900）」は北里大学北里生命科学研究所 砂塚敏明教授より研究試料の提供に関する覚書により無償で提供されています。

研究責任者等は、本研究の実施に際し、利益相反マネジメント委員会の審査と承認を得ています。また、研究責任者等は、本研究における企業等との利害関係に追加・変更が生じた場合はその都度、東北大学利益相反マネジメント委員会へ申告し審査を受けることにより、本研究の企業等との利害関係についての公平性を保っています。

8. 研究組織

研究責任者

東北大学大学院医学系研究科 先進感染症予防学寄附講座 山谷 睦雄

研究協力者

埼玉医科大学 呼吸器内科 中込一之
仙台医療センター 病因研究室 西村 秀一

9. お問い合わせ先

本研究に関するご質問等がありましたら下記の連絡先までお問い合わせ下さい。
ご希望があれば、他の研究対象者の個人情報及び知的財産の保護に支障がない範囲内で、
研究計画書及び関連資料を閲覧することが出来ますのでお申出下さい。

照会先：

研究責任者： 東北大学大学院医学系研究科 先進感染症予防学寄附講座 山谷睦雄

住所：〒980-8575 仙台市青葉区星陵町 2-1

連絡先 電話：022-717-7184

メールアドレス：myamaya@med.tohoku.ac.jp

研究代表者： 東北大学大学院医学系研究科 先進感染症予防学寄附講座 山谷睦雄

◆個人情報の利用目的の通知に関する問い合わせ先

保有個人情報の利用目的の通知に関するお問い合わせ先：「9. お問い合わせ先」

※注意事項

以下に該当する場合にはお応えできないことがあります。

<人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 第6章第16の1(3)>

- ①利用目的を容易に知り得る状態に置くこと又は請求者に対して通知することにより、研究対象者等又は第三者の生命、身体、財産その他の権利利益を害するおそれがある場合
- ②利用目的を容易に知り得る状態に置くこと又は請求者に対して通知することにより、当該研究機関の権利又は正当な利益を害するおそれがある場合

◆個人情報の開示等に関する手続

本学が保有する個人情報のうち、本人の情報について、開示、訂正及び利用停止を請求することができます。

保有個人情報とは、本学の役員又は職員が職務上作成し、又は取得した個人情報です。

- 1) 診療情報に関する保有個人情報については、東北大学病院事務部医事課が相談窓口となります。詳しくは、下記ホームページ「配布物 患者さまの個人情報に関するお知らせ」をご覧ください。（※手数料が必要です。）

【東北大学病院個人情報保護方針】

<http://www.hosp.tohoku.ac.jp/privacy.html>

- 2) 1)以外の保有する個人情報については、所定の請求用紙に必要事項を記入し情報公開室受付窓口に提出するか又は郵送願います。詳しくは請求手続きのホームページをご覧ください。（※手数料が必要です。）

【東北大学情報公開室】

<http://www.bureau.tohoku.ac.jp/kokai/disclosure/index.html>

※注意事項

以下に該当する場合には全部若しくは一部についてお応えできないことがあります。

＜人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 第6章第16の2(1)＞

- ① 研究対象者等又は第三者の生命、身体、財産その他の権利利益を害するおそれがある場合
- ② 研究機関の研究業務の適正な実施に著しい支障を及ぼすおそれがある場合
- ③ 法令に違反することとなる場合