

平成30年 5月17日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12635

研究課題名(和文) 培養細胞のアポトーシスを指標とした下水再生水のウイルス感染リスク評価技術の開発

研究課題名(英文) Development of a novel method to detect infectious viruses from reclaimed wastewater based on apoptosis of host cultivated cells

研究代表者

佐野 大輔 (Sano, Daisuke)

東北大学・工学研究科・准教授

研究者番号：80550368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：平成28年度は、水中病原ウイルスの感染性を評価するための新規手法を開発するために、ウイルス感染初期に発現する細胞応答に着目した。その結果、本研究で試験したウイルス濃度の範囲内であれば、サンプル接種後12時間以内に感染性エンテロウイルス71型(EV71)を検出することが可能であった。平成29年度には、感染性ウイルスの早期検出に与えるウイルス多重感染の影響を評価した。その結果、EV71の増殖によりアデノウイルス40型の検出が阻害されることが示された。以上の結果から、水サンプル中に複数種のウイルスが存在する場合には、特にエンテロウイルスについて増殖を抑制させることが必要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop a novel method to detect infectious enteric viruses in water samples. In the first year, cellular responses, including apoptosis, in the early stage of enteric virus infection with human cultivated cells were investigated as possible indicator for the virus detection. As a result, it was shown that infectious enterovirus 71 (EV71) was possible to detect within 12 hours when the concentration in a inoculated sample was high enough. In the second year, the effect of multiple virus infection with host cells on the early detection of infectious viruses was investigated. As a result, the detection of adenovirus 40 (AdV40) was significantly inhibited by the co-infection of EV71. This result implies that the inhibition of EV71 growth is necessary when AdV40 is a target virus in water samples.

研究分野：環境水質工学

キーワード：胃腸炎ウイルス 感染性 細胞応答 アポトーシス 感染リスク

1. 研究開始当初の背景

下水処理再利用において生じる水系感染症リスクの制御は、大腸菌群の水中濃度基準値を遵守することにより行われている。しかしながら、指標細菌により細菌以外の病原体、特にウイルスによる水系感染症リスクの制御が可能かについては異論が多く、大腸菌ファージなど代替指標に関する研究も進んでいる。しかしながら、下水処理再生水中の制御対象病原体であるノロウイルスやロタウイルスなどのヒト病原ウイルスに関し、感染性を保持している“生きた”ウイルスの水中濃度を正確且つ迅速に評価する技術は存在しなかった。

そこで本研究では、免疫応答やプログラム細胞死の一種であるアポトーシス等、ウイルス感染における細胞応答(図1)に着目し、感染性エンテロウイルス検出手法に適用可能な細胞応答遺伝子を同定することを試みた。研究代表者による先行研究において、PV1感染に対する細胞応答遺伝子の発現が網羅的に解析されているが、その中でイオンチャネルであるKCNJ4の遺伝子発現がPV1感染により有意に変動することが示された。そこで本研究では、組織細胞にPV1接種を施した場合のKCNJ4遺伝子発現量の経時変化を解析した他、アポトーシスを誘導する重要因子であるカスパーゼの定量を行い、KCNJ4の発現とアポトーシスの関係性について調査した。

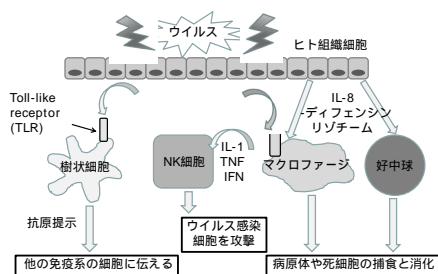


図1. ウイルス感染時の細胞応答

また、環境水中の感染性ウイルスを検出するための手法として細胞培養法とPCR法を組み合わせたIntegrated cell culture-PCR (ICC-PCR)法が開発されてきたが、上記の細胞応答はこの手法におけるウイルス検出結果に影響を与える可能性が存在した。従来から感染性ウイルスの検出に用いられてきた細胞培養法では、感染性ウイルスの検出までに数日以上要する他、細胞変性効果(Cytopathic effect: CPE)を生じないウイルスには適用できない等の問題があったが、ICC-PCR法では24時間程度で検出可能であり、またCPEを呈さないウイルスにも適用可能である。また、ICC-PCR法には標的ウイルスを培養細胞で増殖させる過程が含まれる

ことから、感染性ウイルスと不活化ウイルスを区別することができないPCR法の弱点が克服されている。しかしながら、ウイルス感染時のアポトーシスを含む細胞応答によりウイルス増殖が抑制されると、ICC-PCRによる感染性ウイルスの検出が阻害される可能性がある。そこで本研究では、特に水由来サンプル中に複数種のウイルスが存在する場合を想定し、ウイルスの多重感染及び細胞応答がICC-PCR法による感染性ウイルスの検出に与える影響を評価することを試みた。

2. 研究の目的

本研究では、実験室内で培養可能な組織細胞の自然免疫機構に着目し、感染性を有するウイルスを検出する技術を開発することで、下水再生利用におけるウイルス感染リスクの正確な評価を実現することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ウイルス感染時のイオンチャネル遺伝子発現プロファイル

組織細胞としてヒト小腸上皮細胞INT407細胞を、テストウイルスとしてポリオウイルス1型ワクチン株LSc(以下PV1)を使用した。24well plateで培養したINT407にPV1を接種し、37°C、5%CO₂下でインキュベートを行った。その後、細胞からtotal RNAを抽出し、逆転写反応によってcDNAを合成後、KCNJ4遺伝子増幅用プライマーを用いてリアルタイム定量PCRを行い、mRNA発現量を測定した。KCNJ4遺伝子発現量は、ハウスキーピング遺伝子であるGDPH遺伝子の発現量との相対量を、PV1を接種した細胞と接種していない細胞について比較した。ウイルス感染時のアポトーシス検出に関しては、96well plateで培養したINT407にPV1を接種し、アポトーシス検出キットを用いてカスパーゼ活性を経時的に測定した。

(2) ウイルス多重感染がICC-PCRによる感染性ウイルス検出に与える影響

試験に用いる培養細胞としてBuffalo Green Monkey腎細胞由来継代細胞(BGM細胞)を使用し、試験ウイルスはエンテロウイルス71(EV71)とアデノウイルス40(AdV40)を用いた。25cm²フラスコに80%コンフルエントで播種したBGM細胞にEV71とAdV40を単独もしくは混合して接種し、ウイルス接種後1、8、24、48、及び72時間後に培養上清を採取した。得られた培養上清から遺伝子を抽出し、EV71及びAdV40由来の遺伝子を標的とした定量PCRによってそれぞれのウイルス由来遺伝子量を測定した。接種したウイルスの濃度は、1宿主細胞あたりに接種したウイルス感染価であるMultiplicity of infection(MOI)で10⁻³もしくは10⁻⁵となるように調整した。

4. 研究成果

(1) ウイルス感染時のイオンチャネル遺伝

子発現プロファイル

KCNJ4 遺伝子の発現量の相対比を図 2 に示した。KCNJ4 遺伝子はそれぞれ感染後 6 時間後に発現量が増加した。特に、 10^2 PFU/well (1well に対して PV1 を 1PFU 接種) という低い濃度の条件において発現量が顕著に上昇した。どのウイルス濃度においても感染後 6 時間付近で最も発現量が上昇しており、少なくとも 4 倍 (Log₂ 値 2.0) 以上の相対比を得た。

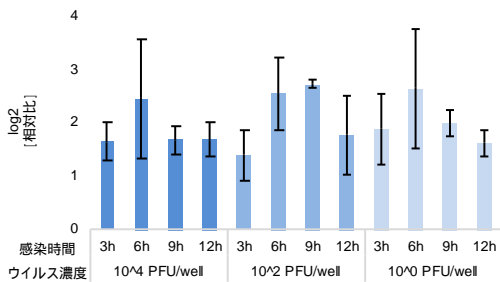


図 2 .KCNJ4 遺伝子発現量相対比の経時変化

カスパーゼ発現量の積算値を図 3 に示した。カスパーゼ発現量の積算値は、ウイルス濃度への依存性は高くないものの、感染後 3 時間から 4 時間にかけて顕著に上昇していることから、その前後でアポトーシスが誘導されていると考えられた。図 2 の結果と比較すると、カスパーゼの急激な発現上昇の後、KCNJ4 遺伝子の発現上昇のピークが観察される。KCNJ4 はカリウムイオンの恒常性に関わることが知られており、ウイルスが細胞に感染した後のイオン交換に KCNJ4 が関与していることが示唆された。

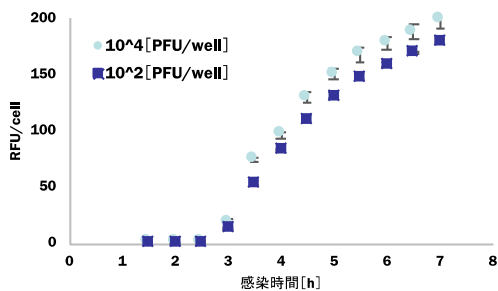


図 3 .カスパーゼ発現量(積算値)

(2) ウイルス多重感染が ICC-PCR による感染性ウイルス検出に与える影響

図 4 に EV71 と AdV40 を単独もしくは混合接種した際のウイルス遺伝子増幅に関するグラフを示した。MOI = 10^{-3} での AdV40 由来の DNA 量 (図 4 A) は、単一感染と比較した場合、8 hours post infection (hpi) から徐々に

増殖に差が表れ、72 hpi ではコピー数の差が 100 倍以上となる顕著な変化が見られた。MOI = 10^{-5} での AdV40 由来の DNA 量は、単一感染と比較した場合、ゆっくりではあるが遺伝子量に差が表れ、こちらも 72hpi では 10 倍以上の差が見られた。反対に、EV71 に関しては、ウイルス濃度や混合接種の条件に関わらず単独接種の場合と同レベルのウイルス遺伝子増幅が見られた。ICC-PCR 法を環境水サンプルに適用する場合、サンプル接種後 24 時間後に培養上清を分析することから、今回の結果のように 24hpi でのウイルス増殖が抑制される場合にはウイルスの過小評価に繋がると言える。

以上の結果より、ICC-PCR 法により水中の感染性アデノウイルスを検出する場合には、共存する可能性のあるエンテロウイルスの増殖を抑制する必要があると言える。

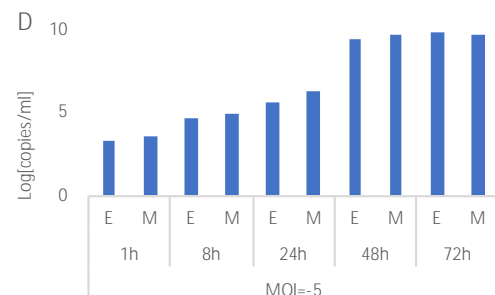
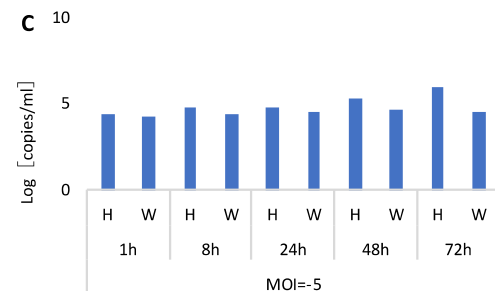
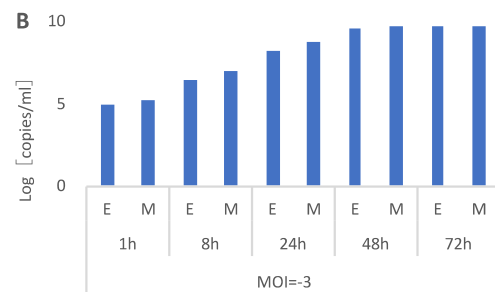
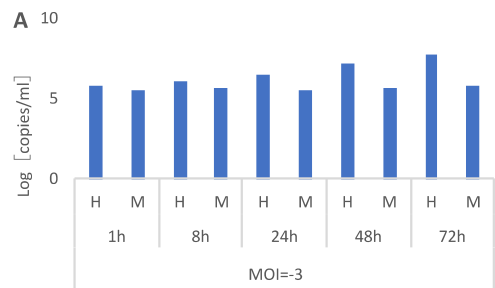


図4 . BGM 細胞培養上清中のウイルス由来
遺伝子濃度 . A , C) AdV40、 B , D) EV71
(H : AdV40 接種, E : EV71 接種, M : 同時接
種)

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計5件)

(1) 渡邊亮介、北島正章、岡部聡、佐野大輔 .
ウイルス干渉現象が Integrated cell
culture-PCR による感染性ウイルス検出に与
える影響 . 平成 29 年度土木学会北海道支部
年次技術研究発表会 . 2018 年 1 月 27 日 . 北
海道大学 (北海道札幌市)

(2) Manami Inaba, Syunsuke Kadoya, Ryosuke
Watanabe, Satoshi Okabe, Tatsuo Omura,
Daisuke Sano. Rapid and sensitive detection of
infectious viruses in environmental water using
human genetic markers. 5th Food and
Environmental Virology Conference. 2016 年 9
月 13 日. ホテル櫻井 (群馬県草津町)

(3) 稲葉愛美、門屋俊祐、渡邊亮介、岡部聡、
佐野大輔 . 水環境中における感染性ヒト腸管
系ウイルスの迅速検出を目的としたヒト細
胞由来遺伝子マーカーの開発 . 水圏微生物研
究フォーラム 2016 . 2016 年 8 月 9 日 . 東京大
学大気海洋研究所 (千葉県柏市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

特記事項なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

佐野 大輔 (DAISUKE SANÓ)

東北大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号 : 80550368