

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

Effect of virus interference on the virus detection with integrated cell culture-PCR

北海道大学大学院工学院 ○学生員 渡邊亮介 (Watanabe Ryosuke)

北海道大学大学院工学研究院 正会員 北島正章 (Kitajima Masaaki)

北海道大学大学院工学研究院 正会員 岡部聡 (Okabe Satoshi)

東北大学大学院工学研究科 正会員 佐野大輔 (Sano Daisuke)

1. 背景と目的

細胞培養法と PCR 法を組み合わせた Integrated cell culture-PCR (ICC-PCR) 法は、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開発された¹⁾。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、実際の環境水サンプル中には複数種のウイルスが同時に存在する可能性があり、1つの細胞に複数のウイルスが感染すると一方あるいは両方の増殖が抑制される現象(ウイルス干渉現象)が生じることが知られている²⁾。したがって、複数種のウイルスが含まれる環境水サンプルに ICC-PCR 法を適用した場合、細胞培養時にウイルス増殖が抑制され、本来存在しているはずの感染性ウイルスの検出が困難となる可能性がある。しかしながら、ICC-PCR 法ではこのウイルス干渉現象による影響が全く考慮されていないの

が現状である。

そこで本研究では、2種類のウイルスが含まれるサンプルに ICC-PCR 法を適用し、ウイルス干渉現象が 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. 実験方法

2.1 細胞培養及び試験ウイルス

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。

2.2 定量 PCR 法

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。

3. 結果及び考察

図1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1A)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り得る。

4. 結論

アデノウイルスはICC-PCR法の標的ウイルスになることが多いことから、本研究の結果は、エンテロウイルスの存在下では感染性アデノウイルスの検出を見逃す可能性があることを示している。複数ウイルスの存在を確認するための手法と組み合わせるなどの工夫が今後必要になると考えられる。

参考文献

- 1) Reynolds KA. Integrated cell culture/PCR for detection of enteric viruses in environmental samples. *Methods Mol Biol.* 268, 69-78, 2004.
- 2) Virus interference. *McGraw-Hill Dictionary of Scientific & Technical Terms*, 6E, Copyright, 2003.

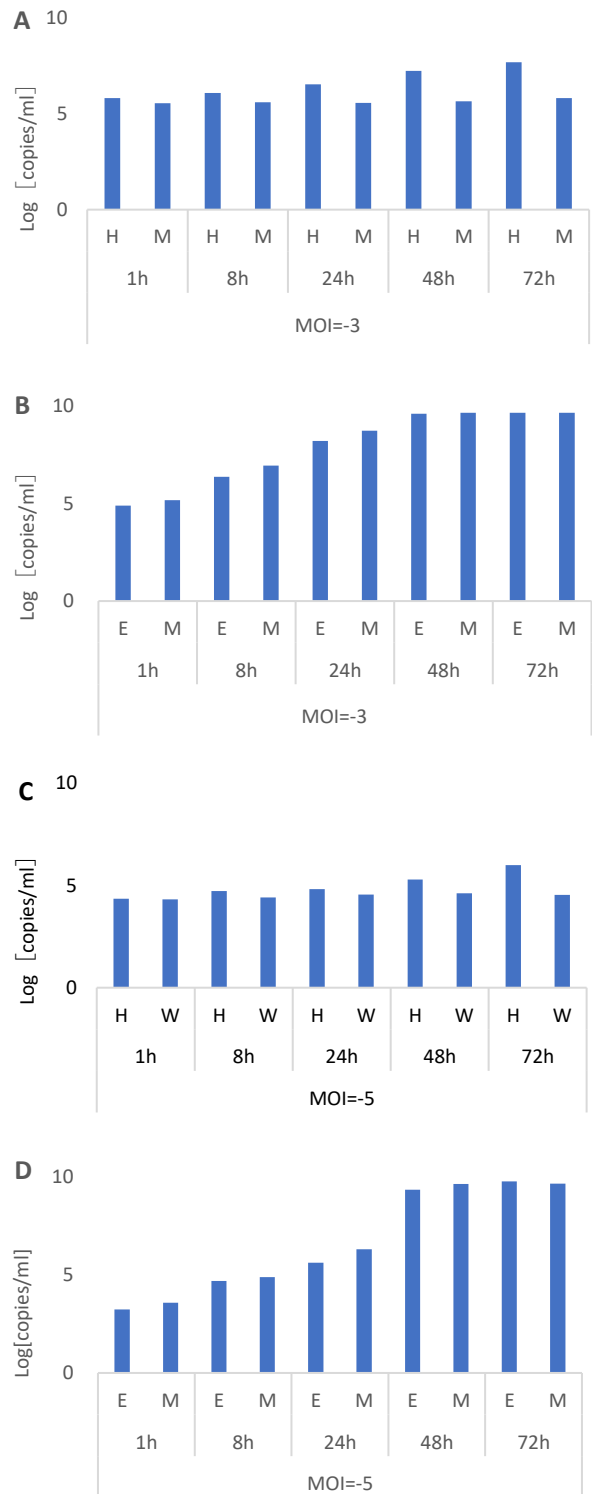


図1. BGM細胞培養上清中のウイルス由来遺伝子濃度. A, C) AdV40、B, D) EV71 (H: AdV40接種, E: EV71接種, M: 同時接種)