

B-29 細胞応答を活用した 感染性ウイルス検出手法の開発

○田澤 恵^{1*}・三浦 尚之²・佐野 大輔²・岡部 聡²

¹北海道大学大学院工学院環境創生工学専攻（〒060-8628 北海道札幌市北区北13条西8丁目）

²北海道大学大学院工学研究院環境創生工学部門（〒060-8628 北海道札幌市北区北13条西8丁目）

* E-mail: megumi-tazawa0620@eng.hokudai.ac.jp

1. はじめに

我々の生活環境には、河川水、海水、レクリエーション水、修景用水、及び農業用水等、直接または間接的に体内に取り込む可能性のある環境水が多く存在する。これらの環境水は、時として水系ウイルス感染症を発生させる媒体となり、胃腸炎等の健康被害をもたらしている^{1,2)}。これは、病原ウイルスが患者糞便中に多量に存在するため、下水処理過程において十分な除去・不活化が行われなかった場合、病原ウイルスが下水処理水と共に水環境へと放出されるためである。水環境を安全且つ快適に利活用可能な生活を保つために、環境水中の病原ウイルスによる感染リスクを正確に評価し、適切に管理する術を構築することが不可欠である。

ウイルスによる水系感染症発生リスクを定量的に評価するには、感染性を有したウイルスの水中濃度を正確に測定することが必要となる。しかしながら、環境水中のウイルスは希釈を受ける他、太陽光照射を含む様々な因子により不活化されることで、検出限界値よりも低い濃度になりうる。また、水中筈雑物への吸着等により検出の際の回収率が低下することも、正確な感染性ウイルス濃度測定妨げとなっている。また、リアルタイム定量PCR法により低濃度のウイルス遺伝子を定量することが可能だが、この手法では感染能力の評価は不可能である。環境水中の病原ウイルスの感染リスクを正確に評価するための手法は、未だ確立されていないのが現状である。

感染性のあるウイルスを定量的に評価する既存の方法は、プラーク法とTCID₅₀法である。これらの方法は、ウイルス感染による細胞変性効果 (Cytopathic effect: CPE) を利用した測定法であり、リアルタイム定量PCR法等では評価できないウイルスの感染性を定量的に評価できる。しかしながら、最終的な結果を得るまでに最低でも24時間以上を要する他、低濃度のウイルスに対する適用が困

難である等の短所がある。また、これらの方法はアストロウイルスやA型肝炎ウイルス等のように組織細胞に感染してもCPEが現れないウイルスや、ノロウイルスのように組織細胞を用いた培養法が確立していないウイルスに対しても適用できない。

本研究では、環境水中に低濃度で存在するウイルスの感染性を短時間で定量的に評価する新規手法を確立することを目的とし、ウイルス感染時の免疫応答を含む組織細胞における細胞応答に着目した。この場合の細胞応答とは、ウイルス感染により細胞内で生じる様々な恒常性変化の総称である。もし、ウイルス感染に対する細胞応答を定量的且つ実用に足る時間内に検出することが可能であれば、細胞応答を活用した感染性ウイルス定量手法を確立することが可能であると考えられる。

2. 実験方法

(1) 細胞培養

本研究ではヒト小腸上皮細胞であるINT407細胞を使用した。5% 牛胎児血清、1% ペニシリン/ストレプトマイシン、1% L-グルタミンを含むイーグルMEM培地 (ニッスイ) を用いて、飽和水蒸気、37°C、5% CO₂条件下で培養した。

(2) 供試ウイルス株とその定量

供試ウイルスとして、ポリオウイルス1型Sabin株 (PV1) を用いた。PV1は、INT407細胞を用いて培養された後、0.22μmメンブレンフィルターを用いてろ過されたものを使用した。QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いてRNAを抽出した後、Prime Script RT reagent Kit (Perfect Real Time, TAKARA) を用いてcDNAを作成し、Monpocho³⁾らに従って定量した。

(3) DNAマイクロアレイ解析

60mmディッシュを用いて80%コンフルエント(約 10^6 cells/dish)になるまで培養したINT407細胞に、PV1を感染多重度 (Multiplicity of infection: MOI) が 10^3 となるよう接種し (N=3), 飽和水蒸気, 37°C , 5% CO_2 条件下で12時間インキュベートした。インキュベート後, RNeasy Mini Kit (QIAGEN) およびQIA shredder (QIAGEN) を用いて細胞からmRNAを抽出し, 逆転写反応によりcDNAを合成した。その後, GeneChip Human Genome Focus Array (Affymetrix) を用いて, 低濃度ウイルス感染時の組織細胞における網羅的な遺伝子発現解析を行った。統計的なデータ解析には, Gene Spring GXソフトウェア (Agilent Technologies) を用いた。

(4) ウイルス検出マーカー遺伝子候補の発現解析

DNAマイクロアレイ解析結果から選出された, イオンチャンネルに関わる2つの遺伝子 (KCNJ4, SCN7A) についてウイルス検出マーカーとしての適用性を検討した。24ウェルプレートを用いて80%コンフルエント (約 10^5 cells/well) になるまで培養したINT407細胞に, PV1をMOIが 10^1 , 10^3 , 10^5 となるよう接種し (N=2), 飽和水蒸気, 37°C , 5% CO_2 条件下で3, 6, 12, 24, そして48時間インキュベートした。それぞれのインキュベート時間後, Nucleo Spin RNA XS (MACHEREY-NAGEL) を用いて細胞からmRNAを抽出し, 逆転写反応によりcDNAを合成した。その後, Primer 3 PlusおよびRoche Assay Design Centerを用いて設計したプライマー (表1) を用いて, SYBR Premix Ex Taq II (TAKARA) によるリアルタイム定量PCRを行い, mRNA発現量を測定した。サンプルの定量値をネガティブコントロールの定量値で除することで相対比を算出し, さらに底を2としたLog値を算出した。これに

表1 プライマー塩基配列

プライマー	塩基配列
KCNJ4-F	5'- CCACGAGATCGACGAGGA -3'
KCNJ4-R	5'- TCTCAAAGTCCTCCGACTCC -3'
SCN7A-F	5'- GTTGGCTTCACCAGAACCTAAG -3'
SCN7A-R	5'- GCCAACTTCCAAATCAGGAG -3'

より, ネガティブコントロールに対してサンプルの発現量が2の倍数的にどれだけ変動したかを示した。

3. 結果と考察

(1) DNAマイクロアレイ解析

MOI= 10^3 , 12時間インキュベートのPV1感染により発現量が上昇した遺伝子数は49, 下降した遺伝子数は66であった (Fold change: FC > 2.0, P < 0.05)。中でも特に高いFC値を示した遺伝子を表2に示した。これらの遺伝子は, ケモカイン, ケモカインレセプター, そしてイオンチャンネルに関わるグループに大別された。ケモカインとは, 免疫応答において細胞から分泌され, 特定の細胞に情報伝達を行うタンパク質であるサイトカインの一群であり, 主に炎症の発生に関与する。構造上の違いから, CCケモカイン, CXCケモカインを含む4種類に分類される。これらのケモカイン, 及びそのレセプターに関わる遺伝子は, 低濃度のPV1感染によって誘発された免疫機構において働くものであると考えられる。CCR5に特異的に結合するリガンドであるregulated and normal T cell expressed and secreted (RANTES) については, ウイルス感染によって上皮細胞において顕著に発現することが多く報告されている⁹⁾。

今回の結果で最も高いFC値を示したKCNJ4は, カリウムイオンチャンネルの調節に関わる遺伝子であり, カリウムの恒常性を保つ働きがある。また, 2番目に高いFC値を示したSCN7Aはナトリウムイオンチャンネルに関わる遺伝子であり, 細胞外のナトリウム濃度を感知することで浸透圧調節を行う働きがある。既往の研究において, ポリオウイルスも属するピコルナウイルスの複製時には, 細胞質内のカリウムイオンの漏出, 並びにナトリウムイオンとカルシウムイオンの流入が引き起こされることが報告されている⁹⁾。つまり, カリウムイオンの恒常性を保つためには, 何らかのカリウムイオンチャンネルの制御が必須であると考えられる。通常, 細胞質内のカリウムイオン濃度は細胞外よりも極めて高いため, 濃度勾配の観点からカリウムイオンチャンネルの発現が減少すること

表2 PV1感染により顕著に発現が変動した遺伝子 (MOI= 10^3 , 12時間インキュベート)

	FC	遺伝子 (遺伝子記号)
上昇変動	3.4	CXC ケモカインに関わる遺伝子 (CXCL5)
	2.2	β ケモカインレセプターに関わる遺伝子 (CCR5)
	10.1	K ⁺ チャンネルの調節に関わる遺伝子 (KCNJ4)
下降変動	8.5	Na ⁺ チャンネルの調節に関わる遺伝子 (SCN7A)
	7.4	β ケモカインレセプターに関わる遺伝子 (CCR6)

で、ウイルス感染による細胞質内のカリウムイオンの漏出が引き起こされたものと考えられる。また、免疫応答において重要な役割を担う抗原提示細胞がT細胞レセプターに結合した際にも、細胞質内のカルシウムイオン濃度は上昇する⁹⁾。このように細胞質内のカルシウムイオン濃度が上昇することで、カルシニューリンと呼ばれる細胞内シグナル伝達に関与するタンパク質ホスホターゼが活性化され、ナトリウムイオンチャネルの内面化によりその発現が減少することも報告されている⁷⁾。これらの現象は本結果におけるSCN7Aの下降変動結果とも一致している。以上のことから、これらのイオンチャネル遺伝子産物はウイルス感染初期に形成される細胞内小器官内外のイオン交換に関わるものと推測され、これらの遺伝子及びその産物が感染性ウイルス検出のためのマーカーとして活用可能であると考えられた。

(2) ウイルス検出マーカー遺伝子候補の発現解析

図1及び図2に、KCNJ4並びにSCN7Aの発現量のネガティブコントロールに対する相対比をそれぞれ示した。KCNJ4については、感染後6時間以内において発現量が顕著に上昇しており、特にMOI=10¹においては20倍以上(Log値は約4.5)上昇した。また、MOI=10⁵ (1つのウェルに対してウイルスを1コピー接種) という極めて濃度の低い条件であるにも関わらず、感染後6時間において極めて高い相対比を示しており、この遺伝子が低濃度のウイルス感染に対しても敏感に反応することが示唆された。

SCN7Aについては、KCNJ4と比較すると相対比は高くないものの、いくつかの条件においては2倍以上の相対比を示していた。しかしながら、全体的に目立った傾向は観察されず、このように遺伝子発現レベルで考察した場合には、SCN7AよりもKCNJ4の方が感染性ウイルス検出マーカーとして優れていると考えられた。

4. まとめ

本研究では、DNAマイクロアレイを用いることでウイルス感染時における遺伝子発現を網羅的に解析し、環境水中に低濃度で存在する感染性ウイルスの検出マーカーとしての適用性を検討した。その結果、数種類の免疫応答遺伝子とともに、2つのイオンチャネルに関する遺伝子の発現が顕著に変動することを確認した。このイオンチャネル遺伝子に関して発現プロファイルを解析したところ、PV1感染後数時間以内においてKCNJ4の発現量が顕著に上昇した。これらの遺伝子及びその産物が感染性ウイルス検出のためのマーカーとして活用可能であることが示唆された。

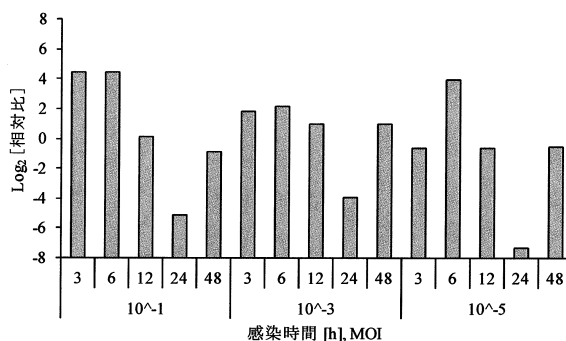


図1 KCNJ4の発現量の相対比

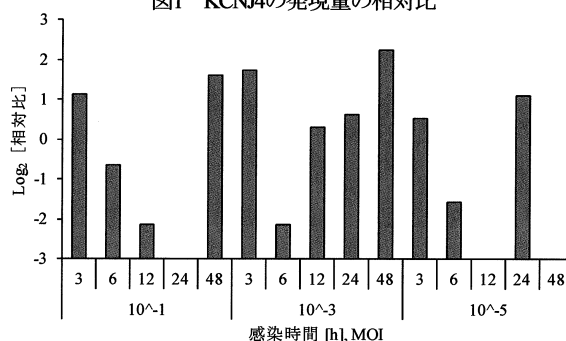


図2 SCN7Aの発現量の相対比

参考文献

- 1) Haas CN, Rose JB, Gerba C, Regli S: Risk assessment of virus in drinking water. *Risk Anal*, 13, 545-552 (1993)
- 2) 佐野大輔, 植木洋, 渡部徹: 水中病原ウイルスによる水環境汚染の実態, モダンメディア, 52 (4), 115-124 (2006)
- 3) Monpoeho S. et al.: Quantification of Enterovirus RNA in Sludge Samples Using Single Tube Real-Time RT-qPCR. *BioTechniques*, 29, 88-93 (2000)
- 4) Matsukura S. et al.: Expression of RANTES by normal airway epithelial cells after influenza virus A infection. *Cell Mol. Biol*, 18, 255-264 (1998)
- 5) Egberts E., Hackett PB., Traub P.: Alteration of the intracellular energetic and ionic conditions by mengovirus infection of ehrlich ascites tumor cells and its influence on protein synthesis in the midphase of infection. *Journal of Virology*, 22 (3), 591-597 (1977)
- 6) Yamashita M. et al.: T cell receptor-induced calcineurin activation regulates T helper type 2 cell development by modifying the interleukin 4 receptor signaling complex. *JEM*, 191 (11), 1869-1879 (2000)
- 7) 和田明彦: 電位依存性Na⁺チャネルの細胞膜発現・局在化機構とチャネル病, 蛋白質核酸酵素, 47 (7), 779-786 (2002)