

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
分担研究報告書

腸管ウイルス検体のバイオリスク管理
ポリオウイルス非感受性ヒト細胞株の改良

研究分担者 小池智 東京都医学総合研究所

研究要旨

ポリオ根絶計画以前に採取された検体やcVDPV流行地域から採取された検体などにはポリオウイルスの混入の可能性がある。ヒト臨床検体からウイルス分離を行う際に誤ってそれを増殖させてしまう可能性がある。その可能性を低減させるためにポリオウイルス受容体を破壊したRD細胞(RDΔPVR)を樹立した。この細胞はポリオウイルスとEV71など他のエンテロウイルスの混合物を感染させた場合、EV71が選択的に増殖できる。さらに効率をよくするために他のエンテロウイルス受容体SCARB2, KREMEN1を発現させて改良を試みている。

A. 研究目的

ヒトRD細胞はエンテロウイルスに対する感受性が高いため、咽頭拭い液、直腸拭い液、便検体からのエンテロウイルスの分離を行うために汎用されている。検体などから種々のウイルスの分離などを試みる際にはポリオウイルスの増殖効率が圧倒的に高いため、ポリオウイルスが混入している場合(PIM)、意図せずにポリオウイルスを選択的に増殖させてしまう可能性がある。古い検体やcVDPVが流行している地域から採取された検体ではこの混入の可能性がある。ポリオウイルス受容体のノックアウト細胞を樹立し、ノックアウトによって他のウイルスに対する感受性を失っていなければ、危険を伴わない細胞株となると考えられる。このような細胞の樹立し、さらにその有用性を高めるため他のエンテロウイルスの受容体を発現し、他のウイルスの感受性を上昇させることを試し、その有用性を証明することが目的である。

B. 研究方法

ポリオウイルスの増殖を特異的に阻害するためにゲノム編集によってPVR遺伝子のエクソン2の部分を破壊した細胞を樹立した(RDΔPVR細胞)。この細胞株にEV-Aに属する他のエンテロウイルスの受容体SCARB2とKREMEN1をレトロウイルスベクターを用いて発現させた(RDΔPVR+hSCARB2+hKREMEN1細胞)。これらの細胞にポリオウイルス、他のエンテロウイルスを重感染させ感染の特異性を調べた。

C. 研究結果

他のEVの受容体SCARB2, KREMEN1を発現させることによりそれぞれの受容体を利用するEV71, CVA6などの感受性が上昇した。特にCVA6の臨床分離株の増殖効率の改善が顕著であった。ポリオウイルスとの重感染を行っても増殖するのはEV71, CVA6の増

殖が有利となり、少量のポリオウイルスの混入であれば検出限界以下となった。誤って増殖させる可能性は大幅に低減できることが判明した。

D. 考察

エンテロウイルスの受容体はウイルス感受性を決定する最も重要な因子であるため、その発現をなくす、あるいは増強することによりウイルスの感受性を制御することが可能である。PVR欠損細胞はウイルス感受性がほぼないが、phagocytosisなどで偶発的に取り込まれたPVはごくわずかであるが増殖させてしまう可能性がある。分離したい他のウイルスの受容体を発現させることで、目的のウイルスの増殖効率を高めることにより相対的にPV増殖のリスクは低減する。しかしながらRDΔPVR+KREMEN1細胞においてはCVA6が感染しきらない細胞などがあるので、効率をさらに上昇させるためには細胞のクローニングなどの改良が必要かも知れない。

E. 結論

PVR欠損RD細胞はポリオウイルスのリスク管理に有用である。他のエンテロウイルスの感受性を上げることができればさらに有用性が増すと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他