

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細胞株の有用性の検討

研究分担者 小池智 東京都医学総合研究所

研究要旨： PVR遺伝子を破壊したHeLa細胞 (HeLa Δ PVR)、ならびにRD-A細胞 (RD Δ PVR) を作製し、ポリオウイルス、enterovirus 71 (EV71)、Coxsackievirus B 3 (CVA3)、CVA10、encephalomyocarditis virus (EMCV) を感染させた。 Δ PVR細胞はポリオウイルス非感受性であったが、他のウイルスに対する感受性は野生型とほぼ同一であった。 Δ PVR細胞はポリオを増殖させずに他のウイルスの分離を行うに適した細胞である。特にRD-A細胞は他のウイルスに対する感受性が高く有用性が高い。

A. 研究目的

直腸拭い液、咽頭拭い液、便検体などから種々のウイルスの分離などを試みる際に通常のコロニー形成単層細胞を用いると、ポリオウイルスが混入している可能性がある場合 (PIM)、意図せずに増殖させてしまう可能性がある。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いければ、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、その有用性を示すことが目的である

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PVR遺伝子のノックアウトが最も有効であると考えた。そこでPVR遺伝子のエクソン2の部分 (ウイルス結合部位をコードしている) を標的とするsgRNAを設計してプラスミド構築した。このプラスミドをHeLa細胞あるいはRD-A細胞にトランスフェクションして遺伝子を破壊した。細胞のクローニングをおこなった後、ポリオウイルスを感染させ、ウイルス耐性を示した細胞を取得した。非感受性細胞のゲノムDNAをチェックし、PVR遺伝子が破壊されていることを確認した。野生型とPVR KOのHeLaにEV71、CVB3、CVA10、EMCVを感染させ、感受性を比較した。

C. 研究結果

PVR KO細胞はポリオウイルス非感受性で、全くCPEが観察されなかった。他方では、他のウイルスに対する感受性は野生型とほぼ同一であった。

D. 考察

HeLa Δ PVR細胞とRD Δ PVR細胞ともにポリオウイルスの感染は非常に低いレベルに抑えることができた。HeLa Δ PVR細胞とRD Δ PVR細胞と比較するとRD-A細胞の方がウイルス感受性は高く、なおかつCVA2, 3, 6, 10などにも高い感受性を示す。HeLa細胞は広範に使用されている細胞であるが、多くのエンテロウイルスに対する感受性が低い点が何点である。

E. 結論

PVRノックアウト細胞が意図せずポリオウイルスを増殖させてしまうことを未然に防ぐ目的に最適であると考えられる。ポリオ根絶に際してはこのような細胞を普及させ、PIMからの他のウイルス分離操作において利用することが望ましい。基本となる細胞としてはRD Δ PVR細胞の方が他のエンテロウイルス一般の感受性が高いことからエンテロウイルスの分離が目的であればRD-A細胞を用いることがより望ましい。

F. 研究発表

1. 論文発表

Koike S. The risk of unintentional propagation of poliovirus can be minimized by using human cell lines lacking the functional CD155 gene. *Microbiol. Immunol.* 2020;1-5. doi: 10.1111/1348-0421.12843.

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 なし