

2021年2月18日

キーワード：

ウイルス産生、病原性ウイルス、超純水、
アリウム Pro VF、宿主細胞侵入、
偽型VSVの安定性

偽型ウイルスを用いた高病原性ウイルスに関する 研究の実施

データ品質に対する超純水の影響

Markus Hoffmann¹, Mahmoud Tarek Elzayat¹ and Elmar Herbig²

1. Infection Biology Unit, German Primate Center GmbH – Leibniz Institute for Primate Research, 37077 Göttingen, Germany

2. Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, 37079 Göttingen, Germany

抄録

2013年から2016年にかけて、西アフリカで11,000人以上がエボラウイルス感染により死亡しました。この最も記憶に新しいエピソードは、いわゆるエマージングウイルスがいかに危険であるかを示しています。偽型ウイルスを使用すれば、このようなウイルスの侵入経路を容易に調べることができます。偽型ウイルスを産生するには、特に超純水の水質が重要となります。その理由については、以下をお読みください。

緒言

エマージングウイルスと呼ばれる新規ウイルスは、ヒトの健康に、過小評価できない脅威をもたらします。これらのウイルスは、異種間伝播、あるいは自然発生的なウイルスゲノム変化のいずれかにより、ヒトへの感染能を獲得しています [1]。ヒトの免疫系は、未知のウイルス、なかでも動物由来のウイルスに対する防御能を持っていない場合があるため、エマージングウイルスによる感染症は重篤化することが多く、死に至ることもあります (詳細については参考文献を参照 [2])。

エマージングウイルスの発生や拡散を促す要因はさまざまです [3]。土地開拓のための森林伐採という生態学的要因や、国際通商および世界規模の人の移動を伴う私たちの生活様式などが含まれます。こうして生息地が失われていくことで、人・ペット・家畜が、もともとは隔絶した場所に生息していたためにエマージングウイルスの自然宿主となることがなかった野生種と接触する機会が増えます。さらに、移動する機会の増えたグローバル社会を取り巻く状況も、世界中に病原性ウイルスを無症状のうちに拡散させています。

この100年間に、エマージングウイルスがヒト集団に入り込み、地域的な流行 (エピデミック) や世界的な大流行 (パンデミック) に発展したという例がいくつもあります (表1参照)。なかでも最も記憶に新しいエボラウイルスは、西アフリカのエボラウイルス流行で11,000人以上の命が奪われ、エマージングウイルスがもたらす壊滅的な脅威があらわになったことから、世界中で懸念が示されました [4]。

エマージングウイルスに関する研究は、多くの場合、バイオセーフティーレベル (BSL) 3および4の高度封じ込め施設に限定されます (表1参照)。BSL-4実験室での作業は、非常に手間と費用がかかり、ごく一部の場所でしか許可されていないため、ウイルス性病原体の特性評価や抗ウイルス薬の開発において迅速な科学的進歩を成し遂げるには困難が伴います。



表1：新規ウイルスによる感染拡大

感染症	ウイルス	感染状況					BSL ^{e)}
		年	場所 ¹⁾	規模	感染者数	死亡者数 ²⁾	
スペイン風邪	A型 (H1N1型) インフルエンザウイルス	1918年～1920年	?	パンデミック	?	>20 mn ^{a)}	3
アジア風邪	A型 (H2N2型) インフルエンザウイルス	1956年～1958年	東南アジア	パンデミック	?	1～2 mn ^{b)}	3
重症急性呼吸器症候群	SARS-CoV	2002年～2004年	東南アジア	パンデミック	8,096 ^{c)}	774 ^{c)}	3
中東呼吸器症候群	MERS-CoV	2012年～現在	アラビア半島	エピデミック	1,952 ^{c),d)}	639 ^{c),d)}	3
エボラ出血熱	エボラウイルス	2013年～2016年	西アフリカ	エピデミック	28,616 ^{c)}	11,310 ^{c)}	4

略語：BSL=バイオセーフティーレベル、mn=百万、SARS-CoV=重症急性呼吸器症候群コロナウイルス、MERS-CoV=中東呼吸器症候群コロナウイルス

1) 一次感染発生地

2) 情報源は次のとおり

a) CDC (<https://www.cdc.gov/>) およびProMEDmail (<http://www.promedmail.org/>)

b) ブリタニカ (<https://britannica.com/event/Asian-flu-of-1957>)

c) WHO (<http://www.who.int/en/>)

d) 2017年5月12日版

e) German Central Committee on Biological Safety,

ZKBS (Zentrale Kommission für die biologische Sicherheit [<http://apps2.bvl.bund.de/organismen/organisms.jsf>]) に準拠した分類

このような状況において、高病原性ウイルスの細胞への侵入を安全かつ効率的に研究する魅力的な方法の1つとなるのが偽型ウイルスです。安全かつ効率的に研究することができるのは、病原体全体ではなく、宿主細胞への侵入を媒介する構成要素のエンベロープタンパク質だけを解析するからです。このタンパク質こそが、ウイルスの細胞侵入の鍵となります。偽型ウイルスの場合、高病原性ウイルスのエンベロープタンパク質は、自律的に複製することができない、つまり複製欠損性の担体ウイルスに組み込まれます（偽型化）。偽型化に多く用いられるシステムは、ラブドウイルス（例：水疱性口内炎ウイルス [VSV]、図1）とレトロウイルスです。

本研究の目的は、エンベロープタンパク質を介した偽型ウイルスの侵入が、インタクトウイルスの宿主細胞侵入を反映するかどうかを確認すること、また、使用試薬（この場合はラボ用水）の純度が偽型ウイルスの産生にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることでした。

材料と方法

細胞培養、発現プラスミド、トランスフェクション：
HEK-293T細胞、MDCKII細胞、Vero E6細胞を、10%ウシ胎仔血清と1%ペニシリン-ストレプトマイシン溶液を添加したダルベッコ改変イーグル培地にて、37°C、5% CO₂で培養しました。継代と播種のため、これらの細胞をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄し、トリプシンEDTA溶液と共に培養して分離させました。

偽型VSVの産生には、発現ベクターとして、VSV糖タンパク質（VSV G）、エボラウイルス糖タンパク質（EBOV GP）、中東呼吸器症候群コロナウイルス（MERS-CoV S）のスパイク糖タンパク質、ならびに「スペイン風邪」パンデミック（1918年）の原因ウイルスであるA型インフルエンザウイルスのH1N1株の血球凝集素（HA）およびノイラミニダーゼ（NA）のウイルスエンベロープタンパク質のプラスミドを使用しました。また、ジペプチジルペプチダーゼ4（DPP4）の発現プラスミドも使用しました。空の発現プラスミドを対照としました。HEK-293T細胞をリン酸カルシウム沈殿法によりトランスフェクトしました。緩衝液および溶液はすべて、脱イオン水かザルトリウスのアリウム Pro VF超純水のいずれかを用いて調製しました。

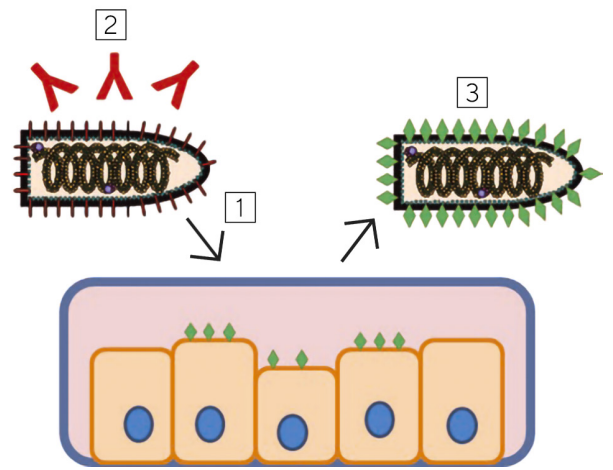


図1：偽型VSVの産生。1) VSV G-trans補完VSVのエンベロープタンパク質発現細胞への侵入。2) 過剰ウイルスの中和。3) 対象のエンベロープタンパク質を有する偽型VSVの回収。

超純水の製造

使用したアリウム Pro VF超純水（装置は前のページに示しています）は、NitzkiとHerbig（2013）の報告どおり [5] に製造しました。この超純水のTOC（全有機炭素、つまり有機的に結合した炭素）含有量は2 ppb未満、25°C補正の電気伝導率が0.055 μS/cm（比抵抗値18.2 MΩ × cmに相当）です。

偽型VSVの産生

偽型VSVの産生には、2個のレポーター遺伝子、すなわち緑色蛍光タンパク質（GFP）をコードするオープンリーディングフレーム（ORF）とホタルルシフェラーゼ（fLUC）をコードするORFによってVSV糖タンパク質（VSV G）のゲノム情報が置換されている複製欠損性VSVベクターを使用しました。このウイルス（VSV*ΔG-fLUC）を増殖するには、VSV Gをトランスフェクトする必要があります（例：発現プラスミドのトランスフェクション）。偽型VSVはHoffmannら（2016）の報告どおり [6] に産生しました。

シアリダーゼまたは阻害剤を用いた標的細胞の前処理：

MDCKII細胞を組換えシアリダーゼ200 mUで処理し、細胞膜の糖タンパク質と糖脂質から末端シアル酸を除去しました。偽型VSVのエンベロープタンパク質を介した細胞侵入が、酸性pHと細胞内システインプロテアーゼ活性に依存するかどうかを調べるため、Vero E6細胞を50 nMバフィロマイシンA1 または50 μ M E-64dと共に培養しました。用いた化学物質は細胞培養液で希釈し、培養は37°C、5% CO₂で、2時間行いました。未処理細胞を対照としました。

結果

中東呼吸器症候群コロナウイルス (MERS-CoV、旧称ヒトコロナウイルス、EMC = hCoV-EMC) は、ウイルススパイク糖タンパク質 (S) と細胞膜タンパク質ジペプチジルペプチダーゼ4 (DPP4) の相互作用を介して細胞表面に結合することで、細胞に侵入できるようになることがわかっています [7]。これが偽型VSVにも当てはまるかどうかを確認するため、標的細胞をDPP4発現ベクターまたは空の発現プラスミド (受容体を持たない) でトランスフェクトしました。その結果、予想どおり、エンベロープにMERS-CoV Sを埋め込んだ偽型では、DPP4発現の誘導により、偽型VSVの宿主細胞侵入が有意に増加しました (図2A参照)。

インフルエンザ感染症の原因病原体であるA型インフルエンザウイルスは、細胞膜の糖タンパク質上と糖脂質上に生じる天然修飾であるシアル酸という末端糖鎖構造に結合することで、標的細胞に侵入します (詳細については参考文献を参照 [8])。A型インフルエンザウイルスのエンベロープタンパク質を偽型VSVに組み込んだ場合にもシアル酸依存的な細胞侵入に至るかどうかを調べるため、H1N1株 (1918年) HA/NAの偽型VSVを用いて、シアル酸を標的細胞の表面から酵素的に除去しました。予想どおり、シアル酸の除去により、エンベロープにH1N1株 (1918年) HA/NAを埋め込んだ偽型VSVの宿主細胞侵入が大幅に減少しました (図2B参照)。この結果から、偽型ウイルスは、本物のA型インフルエンザウイルスの細胞侵入機構を反映することが確認できました。

エンベロープタンパク質を介した宿主細胞侵入の解析：

標的細胞を、偽型VSVと共に1時間培養した後にPBSで洗浄し、細胞培養液と共にさらに16~20時間培養しました。その後、これらの細胞をルシフェラーゼ溶解緩衝液で溶解し、市販の測定キットを用いて、化学発光計測装置で細胞溶解物中のルシフェラーゼ活性を測定し、エンベロープタンパク質を介した形質導入の効率 (すなわち偽型の宿主細胞侵入) を求めました。

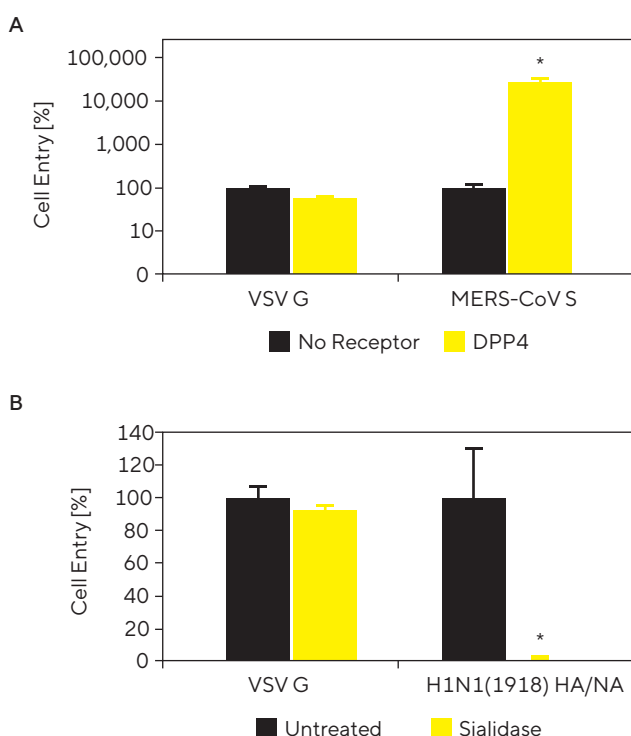


図2. 偽型ウイルスの受容体依存的な細胞侵入。

(A) VSV G または MERS-CoV S を有する偽型VSVを用いて、空のベクター (受容体を持たない) またはヒトジペプチジルペプチダーゼ4 (DPP4) 発現プラスミドのいずれかでトランスフェクトしたHEK-293T細胞を播種した。(B) VSV G または H1N1株 (1918年) HA/NAのエンベロープタンパク質を有する偽型VSVを用いて、シアリダーゼで前処理したMDCKII細胞または未処理MDCKII細胞のいずれかを播種した。形質導入効率、すなわち侵入効率は、ウイルスによってコードされたルシフェラーゼの活性により求めてデータを正規化した。また、t-検定により、データの統計学的有意性が確認された (*: p < 0.05)。

細胞侵入時のエボラウイルス糖タンパク質の活性化はpH依存的であり、システインプロテアーゼ活性を必要とする

エボラウイルス糖タンパク質 (EBOV GP) は翻訳後に修飾されて複数のオリゴ糖を持つようになり、こうして形成された高密度のグリカンクラスターは、ウイルスがヒト免疫系によって効率的に認識されるのを妨害すると考えられています [9]。しかし、宿主細胞侵入時には、大多数の糖修飾を有しているEBOV GPの一部が除去される必要があります [10]。この機能的なプライミングは、エンドソーム小胞に存在して低エンドソームpH下でのみ活性化する細胞内システインプロテアーゼ [11] によって媒介されます。

そこで、偽型VSVのEBOV GPを介した侵入も、細胞内システインプロテアーゼの活性と低pHに依存的であるかどうかを調べました。方法は次のとおりです。エンベロープにEBOV GPを埋め込んだ偽型VSVを産生し、この偽型VSVを用いて、バフィロマイシンA1 (プロトンポンプを阻害することにより、エンドソーム内の酸性化を防ぐ) またはシステインプロテアーゼ阻害剤 (E-64d) を共に培養済みの標的細胞を播種しました。その結果、EBOV GPを介する細胞侵入は、偽型VSVの場合でも、酸性環境 (図3A参照) とシステインプロテアーゼ活性 (図3B参照) に依存的であることが明らかとなりました。また、VSV Gを介した偽型はシステインプロテアーゼに依存的ではなく、低エンドソームpHに依存的であることから、E-64d処理がEBOV GPを介する細胞侵入を特異的に阻害することも示されました。

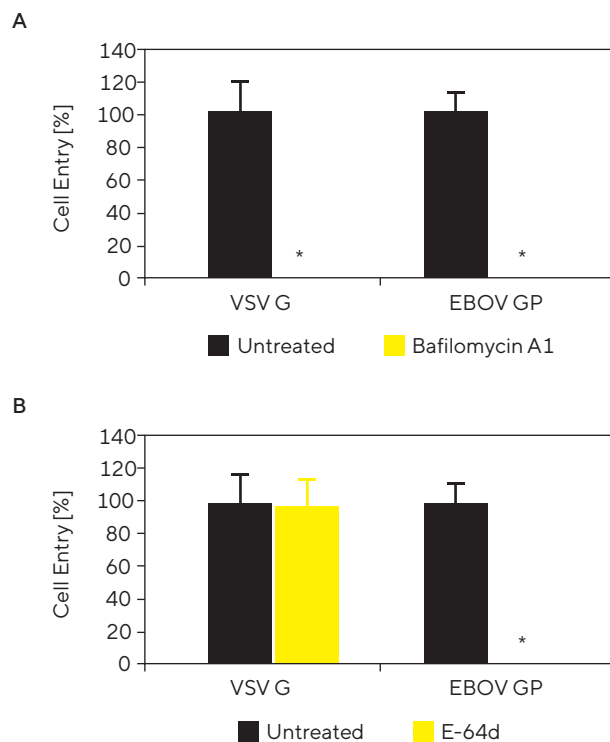


図3：偽型ウイルスのpH依存的な細胞侵入。
VSV GまたはEBOV GPを有する偽型VSVを用いて、バフィロマイシンA1 (A) またはE-64d (B) で処理済みのVero E6細胞を播種した (未処理細胞を対照とした)。偽型ウイルスの形質導入効率、すなわち侵入効率は、ウイルスによってコードされたルシフェラーゼの活性により求め、データを正規化した。また、t-検定により、データの統計学的有意性が確認された (*: $p < 0.05$)。

ラボ用水の純度は偽型VSVの品質を左右する

これまでの実験で、偽型VSVが高病原性ウイルスの宿主細胞侵入について調べるのに適したモデルであることが明らかになったところで、次に解明すべき問題は、使用するラボ用水の純度が偽型VSVの品質にどのような影響を及ぼすかということでした。偽型VSVの産生時にはさまざまな緩衝液と溶液を使用しますが、これらはすべて、水で調製します。しかし、どんな水でもこれらの試薬を調製するのに十分であるというわけではありません。実験室で使用するには、適切な純度のものを選ばなければなりません。

そこで、超純水を使用することで偽型VSVの品質が向上するかどうかを調べるため、以下の並列実験において2通りの偽型VSVを産生しました。一方の偽型VSVは、セントラルラボ用水供給源（19°Cでの電気伝導率が3.7～4.1 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ）から採水した脱イオン水を、すべての溶液および緩衝液の溶媒として用いて産生し、もう一方の偽型VSVは、すべての溶液および緩衝液をアリウム Pro VF超純水（電気伝導率0.055 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 、@25°C）で調製して産生しました。そして、エンベロップタンパク質としてEBOV GPとMERS-CoV Sを調べました。偽型VSVを同一の培養条件下で並行産生した後、標的細胞を播種し、偽型VSVのエンベロップタンパク質を介した侵入を定量しました。

考察

本研究では、複製欠損性の水疱性口内炎ウイルス（VSV）を用いて偽型ウイルスを産生し、各種の高病原性ウイルスのエンベロップタンパク質を調べました。その結果、偽型ウイルスの宿主細胞侵入は、本物のウイルスで報告されているのとまったく同じ受容体分子と生化学的プロセスに依存的であることが明らかとなりました。さらに、偽型VSVの産生に超純水を使用したことでこのプロセスが最適化されたことも示されました。さらなる研究を計画して、この観察結果の根底にあるメカニズムが、偽型VSV産生量の増加であるのか、細胞侵入の効率化であるのか、それとも偽型ウイルスの安定性向上であるのかを明らかにする必要があります。例えば、超純水を使用すると、塩類、プロテイナーゼ、あるいはリパーゼが存在しないために、偽型VSVの安定性が高まるのではないかと推測することができます。

結論として、偽型ウイルスは高病原性ウイルスの宿主細胞侵入について調べる際に重要なツールであると言えます。偽型ウイルスを用いれば、高病原性ウイルスに関する研究がBSL-3実験室やBSL-4実験室に限定されないため、より多くの施設で研究が行えるようになります。

このような設定で実験を行うことにより、アリウム Pro VF超純水をすべての緩衝液および溶液の溶媒として用いて産生した偽型VSVの宿主侵入（品質の程度のパラメーター）は、脱イオン水を使用して産生した偽型VSVの宿主侵入と比べて有意に高値であることが示されました（図4）。

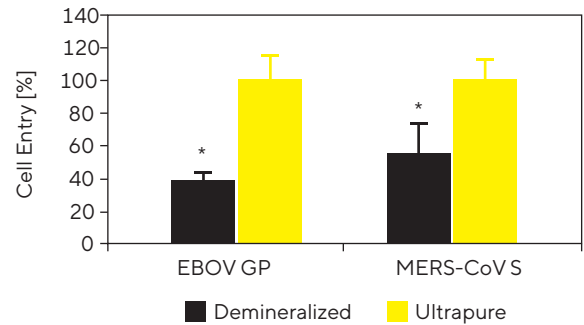


図4：ラボ用水の純度は偽型ウイルスの品質を左右する。EBOV GPまたはMERS-CoV Sを有する偽型VSVを、脱イオン水（図中の「Demineralized」）またはアリウム Pro VF超純水（図中の「Ultrapure」）のいずれかで調製した緩衝液および溶液を使用して産生し、これらの偽型VSVを用いてVero E6細胞を播種した。偽型ウイルスの形質導入効率、すなわち侵入効率は、ウイルスによってコードされたルシフェラーゼを定量化して求め、データを正規化した。また、t-検定により、データの統計学的有意性が確認された（*： $p < 0.05$ ）。

そうなれば、エマージングウイルスによる細胞侵入の特性を明らかにすることができ、適切な検出法や抗ウイルス戦略（治療薬やワクチン）のより迅速な開発が可能になります。また、偽型ウイルスを使用すれば、全身防護服が必要な高度封じ込め施設での高い緊張感のある作業による負担を軽減したり、実験作業に伴う多額のコストや著しい制限（高度封じ込め実験室内にない設備を使用できないことなど）を減らしたりすることもできます。さらに、本物の高病原性ウイルスに比べて、偽型ウイルスは、ラボで働く人たちが不慮の曝露によって感染するというリスクを最小限に抑えることができ、安全性が大幅に向上します。

例えば、試薬は、水で調製するものについては特に、高純度のものを使用することによって産生プロセスを最適化し、その後の分析方法の感度も高まり、産生量が増えて、産生コストをさらに抑えられる可能性があります。

謝辞

本研究の監督、原稿のレビュー、そしてこの主題に関する建設的なディスカッションを通してのご指導を賜りましたPöhlmann教授 (PhD) に深く感謝いたします。

参考文献

- [1] Li, W. et al. Animal origins of the severe acute respiratory syndrome coronavirus: Insight from ACE2-Sprotein interactions. *Journal of Virology* 2016; 80: 4211-4219.
- [2] Mandl, J. et al. Reservoir host immune responses to emerging zoonotic viruses. *Cell* 2015; 160: 20-35.
- [3] Morse, S. S. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases* 1995; 1: 7-15.
- [4] Shiwani, H. A. et al. An update on the 2014 Ebola outbreak in Western Africa. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2017; 10: 6-10.
- [5] Nitzki, F., Herbig, E. In situ Hybridisierung – Die Bedeutung von Reinstwasser für RNA Technologien“, *GIT Labor-Fachzeitschrift* 57. Jahrgang, 3; 2013
[also available in English: In Situ Hybridization: The Importance of Ultrapure Water for RNA Technologies].
- [6] Hoffmann, M. et al. The glycoproteins of all filovirus species use the same host factors for entry into bat and human cells but entry efficiency is species dependent. *PLoS One*; 2016, Vol. 11.
- [7] Raj, V. S. et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature* 2013; 495: 251-254.
- [8] De Graaf, M., Fouchier, R. A. M. Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis. *The EMBO Journal* 2014; 33: 781-935.
- [9] Cook, J. D., Lee, J. E. The secret life of viral entry glycoproteins: Moonlighting in immune evasion. *PLoS Pathogens* 2013; Vol. 9.
- [10] White, J. M., Schornberg, K. L. A new player in the puzzle of filovirus entry. *Nature Reviews Microbiology* 2012; 10: 317-322.
- [11] Chandran, K. et al. Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science* 2005; 308: 1643-1645.

ザルトリウス・ジャパン株式会社

東京本社

〒140-0001

東京都品川区北品川1-8-11

Daiwa 品川Northビル4階

Phone: 03 6478 5200 Fax: 03 6478 5494

Email: hp.info@sartorius.com

名古屋営業所

〒461-0002

名古屋市東区代官町35-16

Phone: 03 6478 5204

Fax: 03 6478 5497

大阪営業所

〒532-0003

大阪市淀川区宮原4-3-39



For further contacts, visit

www.sartorius.com

www.sartorius-labsolutions.jp