

(海外・国内) インターンシップ報告書

2013 年 12 月 26 日提出

氏名	黒田 誠
所属	人獣共通感染症リサーチセンター 国際疫学部門
学年	博士課程 3 年
インターンシップ先	米国国立衛生研究所 国立アレルギー・感染症研究所 ロッキーマウンテンラボラトリーズ ウイルス研究所
インターンシップ期間	2013 年 7 月 15 日～2013 年 9 月 12 日
目的	フィロウイルス感染実験と BSL4 施設見学

活動内容 (2,000 字程度、活動内容が判る様な写真や図表を加えて下さい)

2013 年 7 月 15 日から 9 月 12 日までのおよそ 2 ヶ月間、米国モンタナ州にあるロッキーマウンテンラボラトリーズ(RML)のウイルス研究所にて、フィロウイルスを用いた感染実験及び Biosafety level 4 実験施設(BSL4)の見学を行った。

今回予定していた実験は、日本でフィロウイルスの表面糖蛋白質 GP をもつ VSV シュードタイプウイルスを用いて行った実験より得られた以下の知見に関して、実際のフィロウイルスを用いて確認することである。

1. フィロウイルス受容体(もしくは接着分子)と考えられている TIM-1 を認識するモノクローナル抗体 M224/1 の Vero E6 細胞へのウイルス感染阻害効果と Fab 化した M224/1 の阻害効果。
2. TIM-1 の遺伝子多型間 (Vero E6 細胞及び Cos 細胞由来の TIM-1) で TIM-1 発現細胞のウイルス感受性が異なる。
3. TIM-1 中の 1 アミノ酸を相互に置換した変異体を発現する細胞間で感受性が逆転する。
4. TIM-1 同様、接着分子と考えられている C 型レクチン DC-SIGN がフィロウイルスに非感受性である Jurkat 細胞に感受性を与える一方、TIM-1 の発現は Jurkat 細胞に感受性を与えない。

フィロウイルスの取り扱いには BSL4 実験施設が必要であるが、実際に BSL4 内で実験を行うには、長期間のトレーニングが必要であるため、今回のインターンシップでのウイルス実験は共同研究者である Andrea Marzi 博士にお願いした。BSL4 のあるウイルス研究所のセキュリティーは非常に厳重で、建物に入るときは毎回、ID と

持ち物のチェックをされる。カメラ機能があるものは持ち込めないため、今回の写真は少ない。また、私は **visitor** として滞在していたため、各部屋の移動（トイレも）には常にエスコートが必要だった。**RML** に到着後もすぐには実験を始められるわけではなかった。バイオセーフティ、情報管理、緊急時対策、施設利用等々のトレーニングやテストを受けなくてはならず、8 週間しかない滞在期間の最初 1 週間は実験の打ち合わせだけで終わってしまった。

RML の研究者は、土日は休み、平日は夕方 6 時頃には帰宅し、金曜日は昼 3 時頃には帰宅し始めるという平日の日中に集中して実験を行うという生活スタイルであった。また、**BSL4** からのサンプルの持ち出しには丸 2 日間かかること、**Andrea** も自分自身の研究があることを考えると、週に 1 回の感染実験というペースであった。そのため今回は、日曜日に実験に使う細胞の準備、月曜日に感染実験、火曜もしくは水曜にサンプルの回収、金曜日にサンプルをもらい解析、土曜日に次の実験を考える、というサイクルで過ごした。平日の空いた時間は **Andrea** の実験の手伝いもやらせてもらった。

BSL2 での使用許可が下りた後は、すぐに実験を開始した。

実験(1) **M224/1** は **Vero E6** 細胞を抗原として作出されたモノクローナル抗体である。その標的分子は **Vero E6** 細胞に発現する膜タンパク質 **TIM-1** である。この抗体が実際にフィロウイルスの **Vero E6** 細胞への感染を阻害するか否かを確かめた。実験プロトコールと結果は図 1 に示した。結果、**M224/1** はフィロウイルスに対してもシールドタイプウイルス同様阻害効果を持ち、Fab 化した **M224/1** 抗体もウイルス感染を阻害できることが分かった。

実験(2)-(3) 実験に用いる **TIM-1** 安定発現細胞は日本で作製し、米国に送った。送った細胞の生存と **TIM-1** の発現チェックを終えた後、これらの細胞を用いて感染実験を行った。図 2 に示す。このプロトコールでは、ウイルス粒子がよく染色されるようにと固定前に染色を行ったが、ウイルス摂取量の増加(図 2 の上段)、**TIM-1** 発現によるウイルス感染効率の上昇(図 2 の下段)により、細胞の形態が変化し、**FCM** で正確に感染細胞を検出することが困難になってしまった。そのため、プロトコールを 2 点変更した。1 点目は、生細胞と死細胞を染色し分ける **Live/Dead cell staining** の追加、2 点目は細胞の変形を防ぐため、染色前に固定を行った。その結果、細胞の形態は維持され、十分な生細胞も確保することができたが、今度はウイルス粒子の染色されなくなってしまった(図 3)。今回は、時間が限られていたため、これ以上のプロトコールの修正は避け、予定を変更し感染させた細胞上清中のウイルス力価を測定することにした。そのプロトコールは図 4 に示す。結果、シールドタイプウイルスを用いて得られた結果と同様に、**Vero TIM-1** 発現細胞のほうが **Cos TIM-1** 発現細胞よりも

培養上清中に放出されるウイルス粒子が多いという結果が得られた。このことから Vero TIM-1 発現細胞のほうが Cos TIM-1 発現細胞よりもウイルス感受性もしくは増殖効率が高いと考えられる。ただし、1 アミノ酸置換による TIM-1 発現細胞の感受性の逆転はこの実験系では見ることはできなかった。滞在期間中に得られた結果はここまでであったが、帰国前にいくつか条件を変更したサンプルも用意し、帰国後に結果をもらったが、再現性のあるは得られなかった。

実験(4) フィロウイルスのエントリーに必要な分子の組み合わせを特定するために、フィロウイルスに対しての非感受性でありかつ TIM-1 の発現が認められない Jurkat 細胞に、Vero E6 TIM-1、Cos TIM-1、ヒト TIM-1 をそれぞれ発現させ、フィロウイルスに対する感受性の変化を図 4 のプロトコールと同様の方法でみた。この実験の結果は図 5 に示した。シュードタイプウイルスを使った実験結果と同様、TIM-1 を発現する Jurkat は、感受性を示さないように思われる。今回は、作業の都合上、ウイルス摂取後、ウイルスを取り除かないまま解析を行ったが、その点を改善すればきれいな結果が得られると思われる。

最後に、BSL4 の見学に関して述べる。先にも述べたよう実際に BSL4 に入ることにはできないが、BSL4 の部屋の様子を見ることはできた。BSL4 の周囲は廊下に囲まれており、ガラス窓から中を覗くことができた。実験室の中では、空気を供給するチューブに繋がれた宇宙服型のスーツを着て作業を行っていたが、他の点は人獣共通感染症リサーチセンターにある BSL3 と同じような構造になっていた。施設の安全管理は徹底されており、ヘパフィルター、滅菌・排水処理は常にモニタリングされ、適切に稼動しているかどうか 365 日毎日チェックされている。ストックしているウイルス量、使用量も毎回記録しなければならない。ウイルスの管理は一人のスタッフが行っており、ウイルスを使用する際は必要量を申し出、そのスタッフからもらわなければならない。別の施設には BSL4 のトレーニングルームがあり、実際にスーツを着ての実験操作を体験することができた。スーツの中はチューブから入ってくる空気の音だけが静かに響いており、陽圧になったスーツの膨らみは予想以上であり、初めはキャスター付きの椅子にうまく座ることすらできなかった。また、厚手のゴム手袋を 3 重で装着しているため、手の動きと感覚はかなり制限され、たった 5、6 個のスクリーキャップの蓋の開閉だけでも思っていた以上の時間と労力を要した。BSL4 での実験の大変さを実感した。

図 1

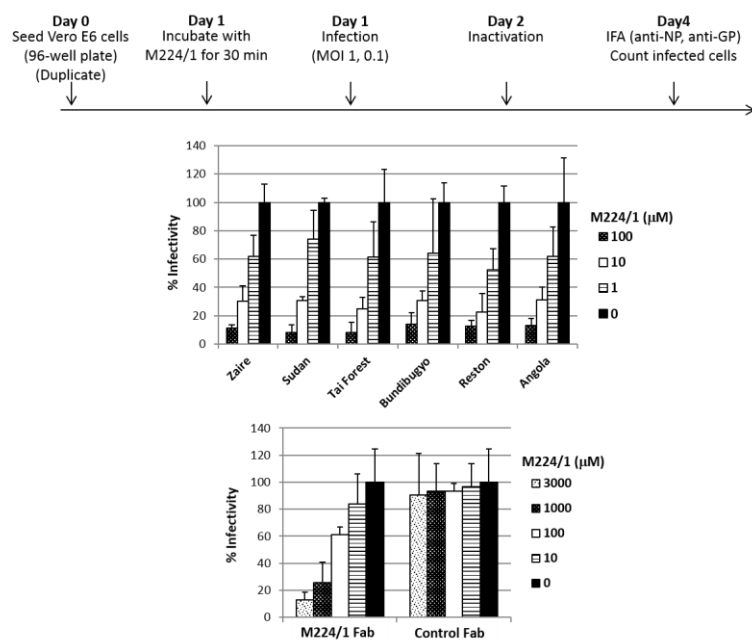


図 2

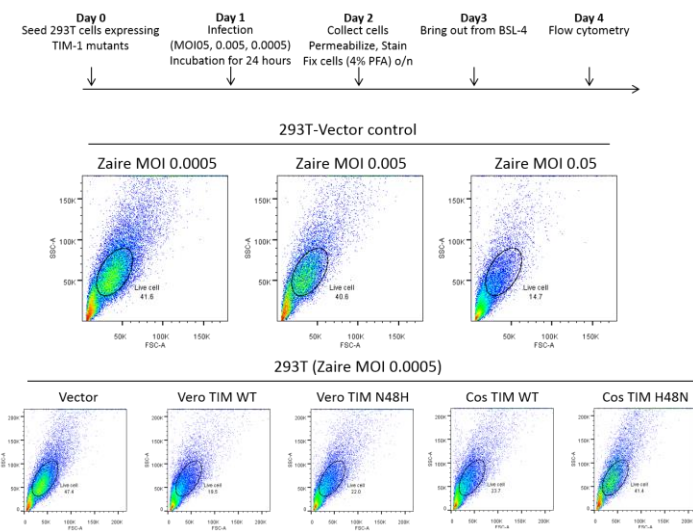


図 3

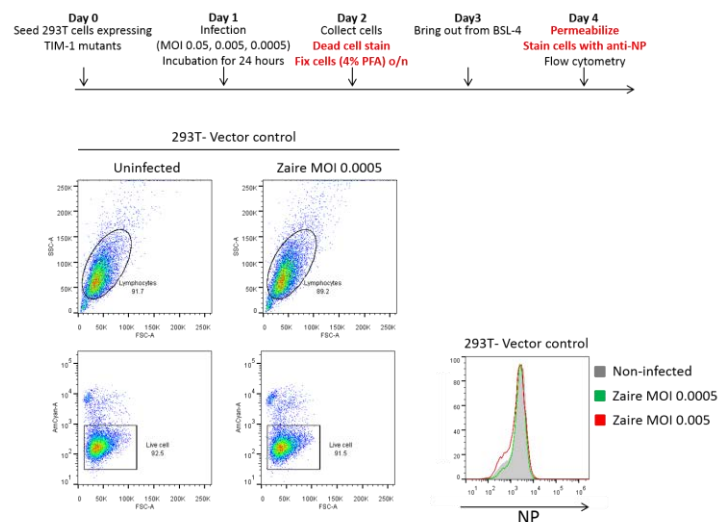


図 4

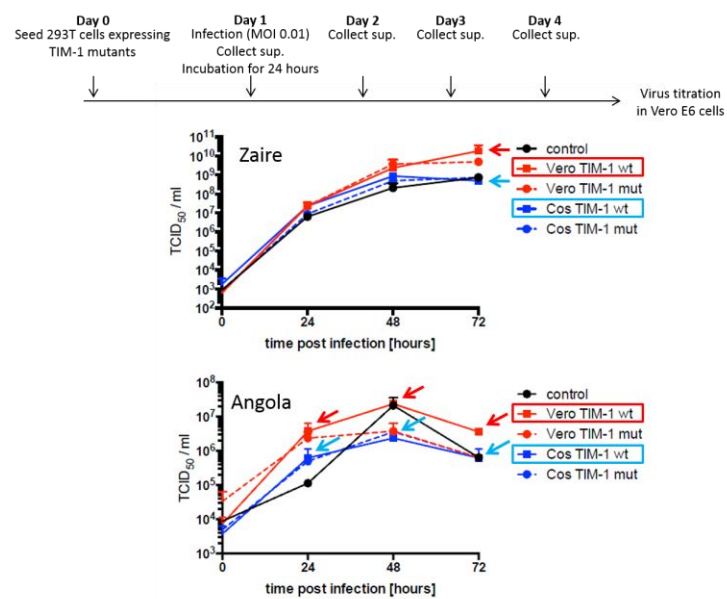
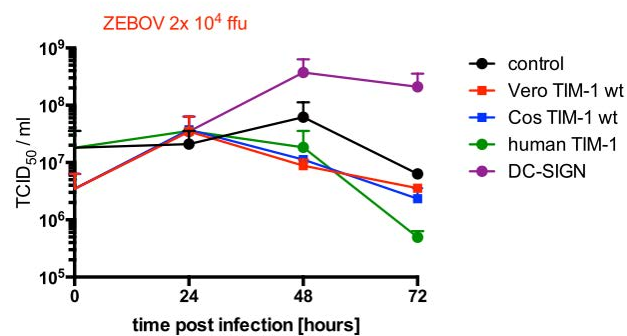


図 5



指導教員確認欄	指導教員所属・職・氏名 人獣共通感染症リサーチセンター・国際疫学部門 教授 高田 礼人 印
---------	--

- ※1 電子媒体を e-mail で国際連携推進室・リーディング大学院担当に提出するとともに、指導教員が押印した原本を国際連携推進室・リーディング大学院担当に提出して下さい。
- ※2 インターンシップ先の担当者が活動内容を証明した文書（署名入り）を提出して下さい。
- ※3 本報告書はリーディングプログラムキャリアパス委員会で内容を確認します。その後、教務委員会で単位認定を受けることになります。

提出先：国際連携推進室・リーディング大学院担当

内線：9545 e-mail: leading@vetmed.hokudai.ac.jp