

【調査研究】

血清型が異なるヒトエンテロウイルスが混在する検体からの ブラック分離法の検討

Study of Isolation by Plaque Methods from Specimen Containing Various Serotypes of Human Enterovirus

牧本智恵, 石井 学, 土本祐栄, 清迫理恵, 佐藤 淳, 石故明衣子, 鶴海 剛, 船橋圭輔*, 木田浩司

*岡山市保健所

MAKIMOTO Tomoe, ISHII Manabu, TSUCHIMOTO Sachie, SEIZAKO Rie,
SATOU Atsushi, ISHIKO Meiko, TSURUMI Go, FUNAHASHI Keisuke*, KIDA Kouji

要 旨

我々は、平成26年以降、下水から分離されたヒトエンテロウイルスについて、患者由来のヒトエンテロウイルスと比較し、流行疫学解析への活用を試みてきた。しかし、両者の血清型は一致することが少なく、その原因として、複数のヒトエンテロウイルスが混在する下水では、使用するRD-A細胞への指向性が強い血清型が優先して分離される可能性が考えられた。そこで今回我々は、下水中のヒトエンテロウイルスの血清型の存在比率を反映した分離結果を得ることを目的に、RD-A細胞に強い細胞変性効果を示すエコーウイルス11型及び弱い細胞変性効果を示すコクサッキーウイルスA6型を用い、ブラック分離法の検討を行った。まず、両ウイルスの増殖能を比較したところ、エコーウイルス11型はコクサッキーウイルスA6型よりも高い増殖能を示し、細胞変性効果と増殖能の間には相関が認められた。次に、両ウイルスのブラック分離法における重層寒天濃度及び回収時間を検討したところ、重層寒天濃度は1.5%、回収時間は接種後72時間が最適であった。また、染色液に2-(p-ヨードフェニル)-3-(p-ニトロフェニル)-5-フェニル-テトラゾリウムクロリドを用いることで、RD-A細胞に生じたブラックから感染性を保持したウイルスを分離できた。

[キーワード：ブラック, ヒトエンテロウイルス, ウイルス分離]

[Key words : Viral Plaque, Human Enterovirus, Virus Isolation]

1 はじめに

ヒトエンテロウイルスは、ゲノムにプラス一本鎖のRNAを有するピコルナウイルス科エンテロウイルス属のウイルスであり、A~Dの4種に分類される。その血清型は更に細分化され、ポリオウイルス(1~3型)、コクサッキーウイルスA(1~22, 24型)、コクサッキーウイルスB(1~6型)、エコーウイルス(1~9, 11~21, 24~27, 29~33型)及びエンテロウイルス(68~71型)が知られている¹⁾。ヒトではその多くが腸管に感染し、夏期に小児を中心に流行する。血清型によって様々な症状を示し、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」(平成十年法律第百十四号)(以下「感染症法」という。)では、2類感染症として急性灰白髄炎、5類感染症として手足口病、ヘルパンギーナ、急性出血性結膜炎、急性弛緩性麻痺及び無菌性髄膜炎が届出対象とされている。

感染症法に基づく様々な感染症の届出情報は、全国的に患者サーベイランスに活用されており、本県においても、その解析結果を感染症情報センターから情報発信し

ている。一方、流行性感染症の場合、届出対象となった患者だけでなく、その周囲に存在している多数の軽症者、不顕性感染者、媒介生物等も流行にかかわる重要な要素になると考えられている。そのため、近年は、新型コロナウイルス感染症などで、環境を対象としたサーベイランスを実施し、患者サーベイランスの結果と併せて総合的に解析する試みが活発に行われている²⁾。

本センターにおいても、平成26年から、下水中のポリオウイルスを対象とした感染症流行予測調査事業で副次的に分離されたヒトエンテロウイルスについて、感染症発生动向調査事業で分離されたヒトエンテロウイルスと比較し、流行疫学解析への活用を試みている。しかしながら、下水と患者では、同時期に採取した検体であっても異なる血清型のヒトエンテロウイルス株が分離されることが多かった^{3)~7)}。その原因として、様々な血清型のヒトエンテロウイルスが混在する下水では、分離に使用する株化細胞に対して強い細胞指向性を有する血清型の株が優先的に増殖し、下水中の血清型の存在比率を正確に反映できていない可能性が考えられた⁷⁾。

そこで今回我々は、株化細胞による下水からのヒトエンテロウイルスの分離において、細胞指向性の影響を低減することを目的としてブラック法⁸⁾を選択し、その条件検討を行うこととした。ウイルスは、分離に使用するヒト横紋筋腫由来のRD-A細胞において、強い細胞変性効果を示すエコーウイルス11型(以下「E11」という。)と、弱い細胞変性効果を示すコクサッキーウイルスA6型(以下「CVA6」という。)の分離株を用いた。また、RD-A細胞に生じたブラックからの分離株の回収には細胞染色が必要となるが、予備試験では、一般的に染色に用いられる中性赤ではRD-A細胞とブラックを染め分けることができなかつたため、染色法の検討も併せて実施した。

2 材料と方法

2.1 株化細胞とウイルス

2.1.1 株化細胞

株化細胞は、ヒト横紋筋腫由来のRD-A細胞を用いた。培養には、Eagle's Minimum Essential Mediumにペニシリン-ストレプトマイシンを1単位/mlとなるよう添加し、更にウシ胎児血清を増殖用としては5%、維持用としては2%(以下「維持培養液」という。)となるよう添加した培養液を用いた。

2.1.2 ウイルス

感染症発生動向調査事業で得たE11及びCVA6の分離株を用い、それぞれRD-A細胞によるブラッククロニングを3回実施し、100 PFU/mLに調製したものを試料とした。

2.2 観察装置

那須らの方法⁹⁾を参考に、2個の箱を上下に重ね、連結部中央に直径60 mmの穴をあけ、上の箱の上面中央に撮影口、下の箱の底面の縁に沿って採光口を設け、面状の光源上に設置し、下部より散乱光のみを照射する装置(以下「暗視野照明観察装置」という。)を作製した(図1)。

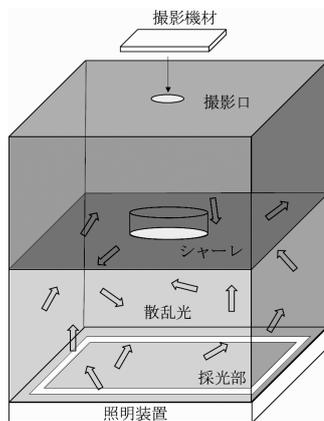


図1 暗視野照明観察装置

2.3 RD-A細胞におけるE11及びCVA6の増殖能

試料のE11及びCVA6を、それぞれ100μLずつ75 cm²の培養ボトルに単層培養したRD-A細胞に接種し、維持培養液を26 mL加えて37℃、5%CO₂ガス気相下で培養した。培養開始直後から、経時的に(0, 16, 24, 40, 48, 64, 72, 88, 96時間経過時点)培養上清を500μLずつ採取し、10,000 rpmで5分間遠心した後、上清を回収した。次に、培養上清中のウイルスのゲノムRNAをQIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN社)を用いて抽出し、MoniqueらのリアルタイムRT-PCR法¹⁰⁾により定量した。なお、定量指標には、リアルタイムRT-PCR法の標的領域を含む形で設計したプライマーセット(EVPR-1 FW及びEVPR-2 RV)によるE11のRT-PCR法増幅産物をアガロースゲル電気泳動後に切り出して精製し、260 nmのOD値からコピー数を算定したものをを用いた。使用したプライマー及びプローブを表1に示す。

表1 プライマー及びプローブ

	塩基長	塩基配列	位置*	文献
EVPR-1 FW	20	ACCCGGCTAACTACTTCGAG	238-257	
EVPR-2 RV	23	TCAGTGAACCTCCCTGGATCYTG	915-893	
EV-F	15	TCCTCCGGCCCTGA	449-463	[10]
EV-R	21	RATTGTCACCATAAGCAGCCA	604-584	[10]
EV-probe	26	FAM-CGGAACCGACTACTTTGGGTGWCCT-TAMRA	538-563	[10]

*配列の位置はE11 Gregory株(GenBank accession number X80059)を基準にした。

2.4 ブラック分離法の寒天濃度及びウイルス回収時間の検討

試料のE11及びCVA6を、それぞれ6枚の60 mmシャーレに単層培養したRD-A細胞に200μLずつ接種し、1時間吸着させた。その後ウイルス液を除去し、45℃に維持した1.0%、1.5%及び2.0%寒天培地(維持培養液に寒天を添加したもの)をそれぞれ2枚のシャーレに5 mLずつ重層し、硬化後に37℃、5%CO₂ガス気相下で培養した。

RD-A細胞に生じたブラックを各濃度の寒天培地においてそれぞれ10個ずつ選択し、暗視野照明観察装置により、経時的に(0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 72, 80, 96, 104時間経過時点)その直径を計測した。56時間経過時点の寒天濃度1.0%におけるCVA6のブラック像を図2に示す。なお、ブラックの成長により隣のブラックと重なった場合は計測不能とし、その後の計測は中止した。

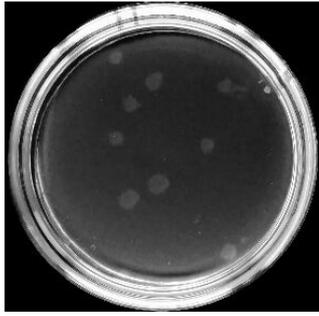


図2 暗視野照明観察装置によるCVA6のプラック像
(寒天濃度1.0% 培養時間56時間)

2.5 プラック染色法の検討

E11を用い、2.4と同様の方法で1.0%寒天培地を重層したRD-A細胞にプラックが形成された時点で、染色液として2-(p-ヨードフェニル)-3-(p-ニトロフェニル)-5-フェニル-テトラゾリウムクロリド(以下「INT」という。)を0.05%又は0.1%となるよう添加した1.0%寒天培地(以下「染色寒天培地」という。)を5mL重層し、硬化後に37℃、5%CO₂ガス気相下に置いた。その後、1、2、3、4、5、6、7、8、25、31及び49時間経過時点の色調変化を観察した。

3 結果

3.1 RD-A細胞におけるE11及びCVA6の増殖能

E11及びCVA6について、RD-A細胞における培養上清中のウイルス量をリアルタイムRT-PCR法により定量した結果を図3に示す。両ウイルス共に培養時間の経過に伴いコピー数が上昇し、最終的にプラトーに達した。対数増殖期のグラフの傾きはE11の方が大きく、定量値も全ての時間で上回っていた。

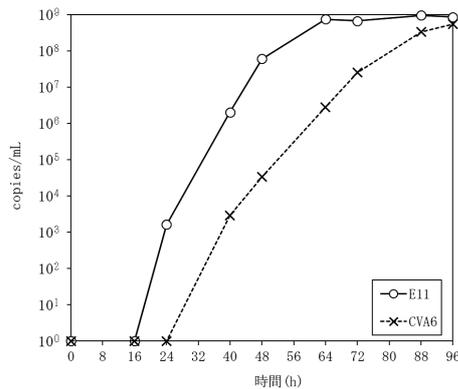


図3 RD-A細胞におけるE11及びCVA6の増殖

3.2 プラック分離法の寒天濃度及びウイルス回収時間の検討

E11及びCVA6について、1.0%、1.5%及び2.0%寒天培地を重層したRD-A細胞に生じたプラックの直径を経

時的に測定した結果を図4に示す。各濃度の寒天培地において、10個のプラックの直径から近似曲線(直線近似)を描いたところ、両ウイルス共に寒天濃度が高いと近似曲線の傾きが小さくなり、プラックの成長が抑制されることが明らかとなった。また、いずれの寒天濃度においても、E11はCVA6よりも近似曲線の傾きが大きく、プラックの成長速度が速かった。プラック法によるウイルス分離には、観察可能な大きさで隣のプラックと重ならない条件とする必要がある。そこで、両ウイルスの大きさが3mmから7mmの範囲で、共に回収可能と考えられる寒天濃度1.5%、培養時間72時間を至適条件とした。

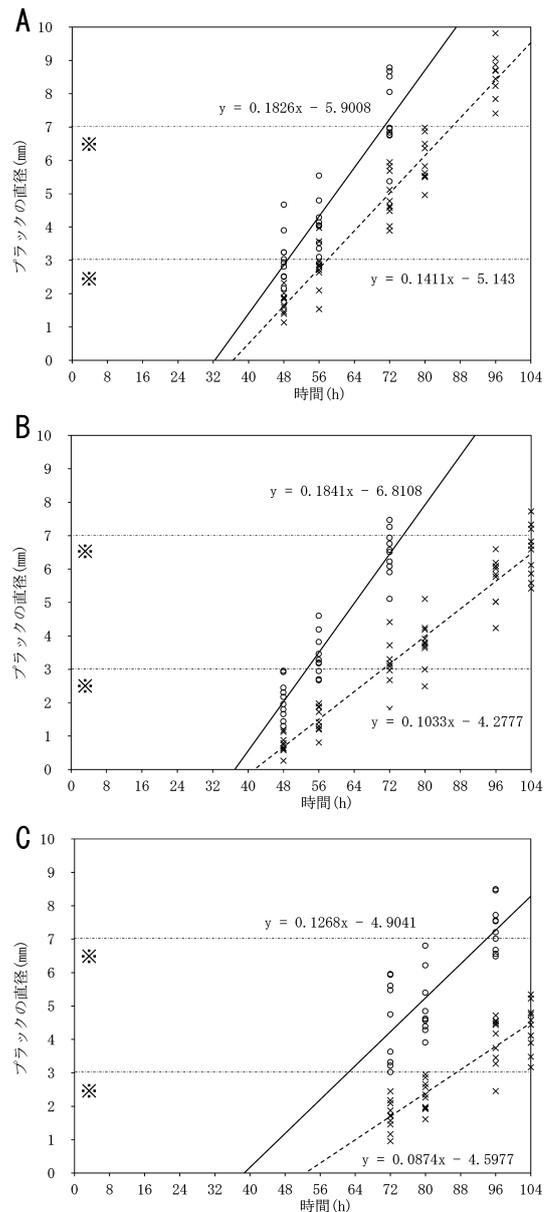


図4 E11及びCVA6におけるプラック形成の経時的変化
A 1.0%寒天 B 1.5%寒天 C 2.0%寒天
○E11 ×CVA6
※破線の範囲(3-7mm)は、ウイルス分離に適切なプラックの直径を示す。

3.3 ブラック染色法の検討

INTにより、未感染のRD-A細胞は、8時間では染色されなかったが、25時間以降に赤紫色に染色された。また、E11によってRD-A細胞に形成されたブラックは、3時間で青紫色に染色され、8時間までは経時的に濃くなったが、25時間以降は色調が透明に変化した。なお、INT濃度を0.05%と0.1%で比較したところ、ブラックの色調は、3から8時間において、常に0.1%の方が濃かった（データは示さない）。

4 考察

今回我々は、ブラック法により血清型が異なる2種のヒトエンテロウイルスを同時に分離する条件を検討した。

通常、ウイルスの増殖によって株化細胞に生じるブラックは、中性赤等によって非感染の株化細胞を染色することで可視化される。しかし、細胞染色は、ウイルス増殖への影響が懸念されることから、本検討では、まず散乱光による暗視野照明観察装置を作製し、無染色下でのブラックの観察を試みた。その結果、E11及びCVA6が形成したブラックを明瞭に視認することが可能となった。

次に、両ウイルスを75 cm²ボトルに培養したRD-A細胞に接種し、培養液中のウイルス量をリアルタイムRT-PCR法で経時的に定量したところ、E11はCVA6よりも増殖能が高かった（図3）。また、暗視野照明観察装置により、両ウイルスのRD-A細胞上に形成するブラックを経時的に測定したところ、E11はCVA6と比較してブラック形成速度が速かった（図4-A）。これらのことから、RD-A細胞においては、ヒトエンテロウイルスの増殖能とブラック形成速度には相関があり、ウイルスの増殖能が高いほどブラックサイズも速く大きくなると考えられた。そこで、これまでの検討で異なる増殖能を示したE11及びCVA6を使用し、異なる血清型のヒトエンテロウイルスの試料からそれぞれの血清型株が分離可能となるブラック法の条件を検討することにした。

ブラック法でウイルスを個別に分離するためには、株化細胞上に生じるブラックは、他と重なることなく視認できる必要がある。そこで、E11及びCVA6の分離株回収時のブラックの大きさの条件を3 mmから7 mmまでと定め、ブラックの直径を経時的に測定することにより、分離に適した重層寒天濃度及び回収時間を検討した。その結果、ブラック法による分離条件は、重層寒天濃度は1.5%、回収は接種後72時間が最適と判断した（図4）。

分離株の回収時に必要なブラック染色法の検討において、染色液として用いたINTは、ブラックと未感染のRD-A細胞を明瞭に染め分け、濃度0.1%、染色時間8時間でウイルス分離に最も適した染色効果を示した。染色寒天培地の重層後、ブラックの成長速度は著しく減速した。しかし、ブラックから感染性ウイルスを分離回収することができたことから、INTは、RD-A細胞の活性には何らかの影響を及ぼす一方、形成されたウイルス粒子自体にはほとんど影響しないと考えられた。

本検討で確立したブラック分離法により、下水検体に混在するヒトエンテロウイルスについて、RD-A細胞への指向性の影響を低減し、実際の血清型の含有比率を反映したウイルス分離が可能となることが期待される。しかし、RD-A細胞にブラックを形成せず、視認できないウイルスが下水検体中に存在した場合、当該ウイルスが増殖したRD-A細胞上に重なるように別のウイルスによるブラックが形成され、これらが混合して回収される可能性がある。また、下水検体ごとに含有ウイルス濃度が異なるため、本分離法においては、適切な希釈濃度を決定するための予備試験が必要になるなど、課題も残る。

下水検体からのヒトエンテロウイルスの分離において、RD-A細胞への指向性の影響を低減する方法として、他県では限界希釈法が試みられている（未発表）。これは複数のヒトエンテロウイルスが混在する検体を分離限界まで希釈することで、最も存在比率の高い血清型のみを分離する方法であるため、次に存在比率の高い血清型のウイルスを特定できないという欠点がある。今回我々が検討した分離法は、ブラックを形成するヒトエンテロウイルスであれば、下水中に混在する血清型とその存在比率を明らかにできる点で優位性があると考えている。

今後は、本ブラック分離法を下水検体に適用し、必要に応じて更なる改良を加えつつ、県内のヒトエンテロウイルスの流行状況の把握に努めていきたい。

文 献

- 1) 細矢光亮：小児のエンテロウイルス感染症，環境感染誌，32(6)，344-354，2017
- 2) 厚生労働省：厚生労働科学研究成果データベース 環境水を用いた新型コロナウイルス監視体制を構築するための研究，
<https://mhlw-grants.niph.go.jp/project/148380>
(2024.6.6アクセス)
- 3) 梶原香代子，磯田美穂子，木田浩司，谷川徳行，松岡保博ら：平成28年度感染症流行予測調査（ポリ

- オ感染源調査), 岡山県環境保健センター年報, 42, 63-65, 2018
- 4) 橋本清美, 松岡保博, 野宮加代子, 濱野雅子, 木田浩司ら:平成29年度感染症流行予測調査(ポリオ感染源調査), 岡山県環境保健センター年報, 43, 111-113, 2019
 - 5) 松岡保博, 橋本清美, 石井 学, 長尾和彦, 濱野雅子ら:平成30年度感染症流行予測調査(ポリオ感染源調査), 岡山県環境保健センター年報, 44, 67-69, 2020
 - 6) 船橋圭輔, 松岡保博, 石井 学, 長尾和彦, 岡本尚子ら:令和元年度感染症流行予測調査(ポリオ感染源調査), 岡山県環境保健センター年報, 45, 47-50, 2021
 - 7) 船橋圭輔, 長尾和彦, 石井 学, 土本祐栄, 岡本尚子ら:令和2年度感染症流行予測調査(ポリオ感染源調査), 岡山県環境保健センター年報, 46, 57-58, 2022
 - 8) 北村 敬:ウイルス検査のための組織培養技術, 188-211, 株式会社近代出版, 1976
 - 9) 那須潜思, 竹茂 求, 小川廣幸:暗視野照明を用いた生菌数計測の迅速化, 平成18年度電気関係学会東北支部連合大会, 80, 2006
 - 10) Monique Nijhuis, Noortje van Maarseveen, Rob Schuurman, Sandra Verkuijlen, Machiel de Vos, et al.:Rapid and Sensitive Routine Detection of All Members of the Genus Enterovirus in Different Clinical Specimens by Real-Time PCR, J. Clin. Microbiol., 40(10), 3666-3670, 2002