

ヒトロウイルスの細胞内増殖について

山西 重機・山本 忠雄

I 緒 言

乳幼児下痢症の主要原因であるロタウイルスについては、従来、ヒト以外を宿主とするロタウイルスにくらべ、糞便中に多量の粒子が電子顕微鏡で確認されるにもかかわらず、細胞内における増殖が困難であり、電子顕微鏡による形態観察が中心であったが、佐藤ら¹⁾によって、アカゲザル腎由来株である MA 104 細胞を使用することによって細胞内で増殖し、これを継代できると報告されている。我々は、これらについての方法の検討と従来おこなわれている電子顕微鏡との比較をおこなったのでその概要について報告する。

II 材料と方法

1) 使用した細胞は、MA 104 細胞 (予研より介与) を用い、増殖用培地は、10%ウシ胎児血清加 Eagle minimal essential medium (MEM) を用い、維持用培地は 0.2%ウシ血清アルブミンと 0.05%トリプシン添加 MEM を使用した。

2) ウイルスの分離材料は、感染症各サーベイランス定点より送付された糞便を電子顕微鏡観察用と細胞培養用に二分し、-80℃で保管し、電子顕微鏡で形態的にロタウイルス粒子を確認できた糞便を接種材料とした。

糞便は、PBS で 10% 乳剤とし 3,000 rpm 10 分間低速遠心後、その上清をさらに 10,000 rpm 25 分間遠心し、その上清を 220 nm メンブランフィルターでろ過後 10 μg/ml のトリプシン (シグマ) を添加し 37℃ 30 分処理したものを細胞に接種した。

単層形成された MA 104 細胞を MEM (何も加えてない) でもって洗浄後処理した糞便材料を接種し、37℃ 1 時間吸着後、維持用 MEM でもって 3 回洗浄後、維持用培地で、37℃ 回転培養をおこなった。

ウイルスの継代は、凍結融解により培養細胞破壊をおこないトリプシン処理をすることなく、同様にしおこなった。

3) 蛍光抗体法は、川村ら³⁾の方法に準じ MA 104 細胞で増殖、精製した Nebraska calf Diarrhea virus (NCDV) で抗ウサギ免疫血清を作成し、FITC (BBL 社)

で標識し直接法でおこなった。

4) 糞便からのロタウイルスの抽出精製は、Bishop らの方法³⁾に準拠し、電子顕微鏡観察は、1%酢酸ウラン溶液でネガティブ染色し、日本電子 100s 型電子顕微鏡で観察した。

5) 酵素抗体法 (ELISA) は、ロタウイルス検出キット (アボット社, Rotazyme) を使用した。この方法は、サンドイッチ法による抗原検出系で一次反応抗体としてビーズ表面にコーティングした SAI I (サル由来ロタウイルス) モルモット抗体、第二次反応抗体には、peroxidase 標識抗 SAI I ラサギ特異抗体を用い、酵素活性測定用基質として O-phenylenediamine を用い吸光度を測定し判定するものである。

III 結 果

1) ロタウイルスの継代と CPE の出現

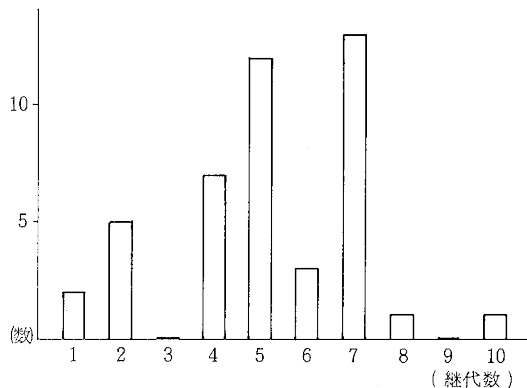


図1 ロタウイルスの継代と CPE の出現

図1は、電子顕微鏡法で確認したロタウイルス陽性の糞便材料を培養細胞接種し、CPEの出現した最初の継代数を示したもので、ほぼ4~7代の継代を必要とし、また2例ではあるが接種初代よりCPEがみられ以後、継代をつづけても同様であった。

電子顕微鏡による粒子観察と細胞による分離を比較すると、図2のように細胞内増殖が確認できたのは、75例中44例 (58.6%) であった。

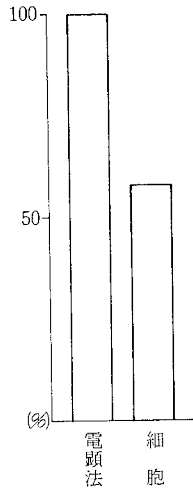


図2 ロタウイルス検出の比較

2) 各継代培養細胞中のロタウイルス抗原のELISAによる検出

各継代時における培養細胞破壊後の培養液中のロタウイルス抗原をELISAで測定したO.Dを図3で示した。初代では接種したウイルスが検出されるためか、ほとんど全ての培養材料でロタウイルス抗原が確認されるが、これ以後2～4代では、抗原を検出することはできなくなり、再び5～6代でウイルス抗原を再度確認することができるようになった。

またここに示してある検体でCPEは、両ケースとも6代継代中に出現した。

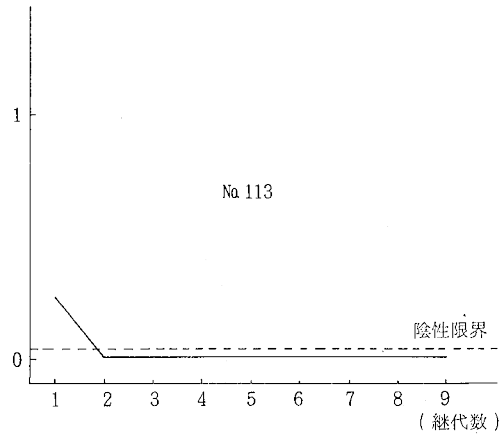
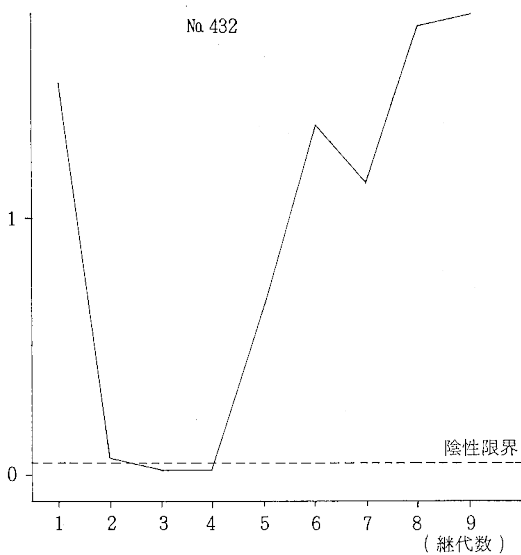


図4

図4は、接種初代においては、抗原を検出することができたが以降各継代で抗原を検出することができず、陰性であった例である。

3) 培養細胞中の蛍光抗体法によるロタウイルス抗原の検出

写真で示してあるように、Aは陰性例で、Bは陽性例であり、細胞質内でのロタウイルス増殖が認められる。

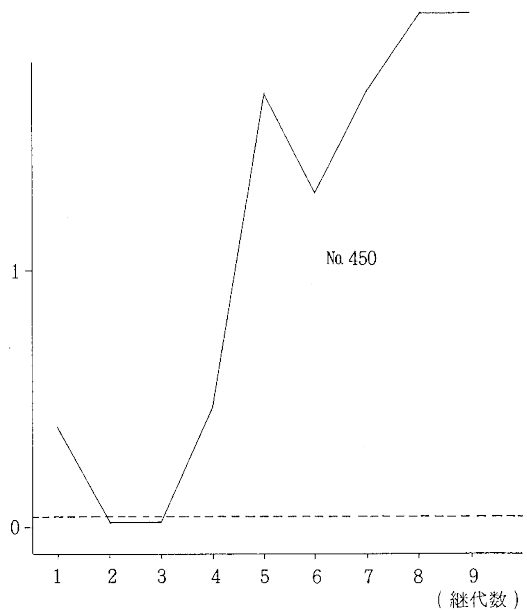
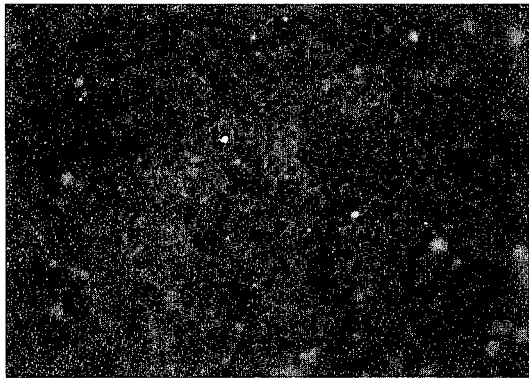
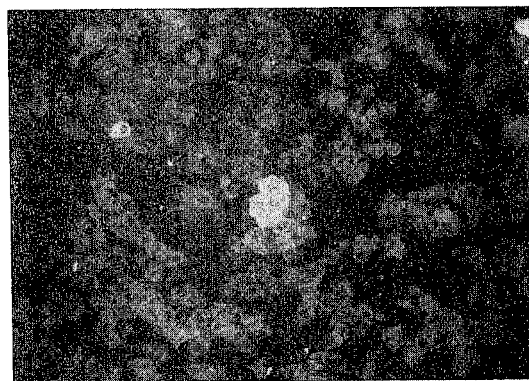


図3 継代培養細胞中のロタウイルスのELISA法による検出



A



B

IV 考察およびまとめ

牛, 豚, サルなどヒト以外の哺乳動物を宿主とするロタウイルスの細胞内増殖は容易になされ, また最近までヒトのロタウイルスについては, 困難であり, ただ, Wyatt⁴⁾らが無菌仔ブタを継代後培養細胞で継代可能なヒトロタウイルス株を樹立しているが, 稲葉らは, 乳児嘔吐下痢症患者の材料をトリプシン処理し, MA 104 細胞を用い回転培養することによって容易に細胞内増殖が可能であると報告しているが, 我々の検討でも75例中44例(58.6%)の増殖し継代可能なロタウイルスを分離することができた。これは, 継代10代で初代接種材料が継持用培地でもって 10^{-6} まで希釈されることから, 接種ウイルスとは無関係であり, 細胞内での増殖は確実である。

またCPEの出現と継代数との関係では, 少数例ではあるが初代においてみられた場合もあるが, 大部分は4~7代の継代が必要であり, 継代中のCPEは, 接種後, 2~3日後出現するのが普通であった。

また, 各継代培養中のロタウイルス抗原力価をELISA価でみると各分離ウイルス株とも約8代で最高に達することがわかった。

梅津ら⁶⁾のRPHAによる抗原力価の測定で初代培養から以降, 段階的に上昇していく成績とは異なるが, CPEの出現継代数では, ほぼ一致している。

しかし分離できなかった継代培養液をELISAでみると, 接種初代では抗原が検出されるが以降は陰性であり, 患者の糞便採取から, 細胞への接種の間に, 何らかの理由でウイルスが不活化されたものと考えられ, 電子顕微鏡法と比較すると, 58.6%の分離率ではあるが, 血清型別等からもウイルス分離は必要であり, また今回実施していないが, 電子顕微鏡観察による陰性材料の培養により, 少数粒子による見のがし例からの分離ということも考えられる。

V 文 献

- 1) 佐藤邦彦, ヒトロタウイルスの細胞培養への分離とその抗原性, 物理化学的性状, ウイルス, 31(2), 153~163 1981。
- 2) 川村明義, 蛍光抗体法, 微生物検査必携, 695~771, 日本公衆衛生協会, 1966(東京)
- 3) Bishop, R.F., Davidson, G.P., Holmes, I.H., Ruck, B. J., Detection of a new virus by Electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. Lancet, ii, 149~151, 1974。
- 4) Wyatt, R.G., James, W. D., Bohl, E.H., Theil K.W saif, L. J., Kalica, A. R., Greenberg, H. B Kapikian, A. Z., Chanock, R. M. Human rotavirus type 2, Cultivation in vitro, Science 207, 189~191, 1980。
- 5) Inaba, U. Isolation of human rotavirus from faeces of gastroenteritis patients using MA 104 cell cultures. The Joint Japan-United states Working Conference on Viral Diseases, November, 17~19, Oiso, 1980
- 6) 梅津幸司, 白地良一, 今野二郎, 千葉良, 永井幸夫, 海老名卓三郎, 石田名香雄, ヒトロタウイルスの分離培養, 121(6), 330~331, 1982。