

46. リアルタイムPCRを用いたアデノウイルス定量によるウイルス分離の効率化の検討

榎本美貴

(旧所属 兵庫県立健康環境科学研究所, 現所属 兵庫県立健康生活科学研究所)

[目的]

咽頭結膜熱や肺炎、胃腸炎など多彩な感染症を引き起こすアデノウイルスの検査法として、従来から行われている培養細胞を用いたウイルス分離は、ウイルスの感染性や抗原性を調べる上で欠かせない方法である。しかし、ウイルス分離は結果を得るまでに長期間を要することがある。過去 5 年間の兵庫県での感染症発生動向調査において検出されたアデノウイルス 432 件のうち、408 件 (94.4%) が B 種、C 種および E 種であった。そこで、本研究では、病原体サーベイランス上重要である B 種、C 種および E 種のアデノウイルスの分離に最適な培養細胞の選定と、ウイルス分離に要する日数とウイルスコピー数との相関性を調べてウイルス分離の効率化について検討した。

[材料及び方法]

材料：2007 年～2008 年に感染症発生動向調査で採取された 0 歳から 10 歳の患者の臨床検体 34 検体を検査材料とした。臨床検体は、PCR 法あるいはウイルス分離の中和反応で、アデノウイルス B 種(3 型, 7 型, 11 型)、C 種(1 型, 2 型, 5 型, 6 型)および E 種(4 型)と同定された咽頭ぬぐい液、鼻汁、便を用いた。

1. アデノウイルス分離に最適な細胞の検討

咽頭ぬぐい液と鼻汁はストレプトマイシンとペニシリンを添加した D-MEM 培地で懸濁し、3,000rpm で 20 分遠心した上清を用いた。便検体はさらに 10,000rpm で 10 分遠心し、上清を 0.45 μm フィルターでろ過をした。あらかじめ 24 ウェルマイクロプレートに単層培養した 4 種類の細胞 (A549、HeLa、Vero-E6 および RD-18S) の細胞上清を除いたのち、それぞれの細胞に検体を 50μL ずつ接種した。5%CO₂ インキュベーター (35℃) 中で 30 分間インキュベートした後、接種ウイルス液を除き、2%FBS 添加の D-MEM 培地を 1mL 加えて 7 日間培養した。検鏡下、目視判定で、各細胞での細胞変性効果 (CPE) がウェルの面積のほぼ 25%、50%、75%および 100%出現したと判断されるまでの培養日数を記録した。

2. アデノウイルスの分離日数に影響する要因の検討

臨床検体からハイピュアウイルス核酸キット (ロシュ) によって抽出したアデノウイルス DNA のコピー数 (copy/μL) を既報¹⁾ に準じてリアルタイム PCR 法で測定した。増幅には SYBR® Premix Ex Taq™ (TaKaRa) を使用した。アデノウイルスのコピー数は、各サンプルについて 3 回ずつ測定し平均を測定値とした (表 1)。

A549 細胞でのアデノウイルス分離にかかる日数を従属変数、患者の年齢、発熱温度、発症から検体採取までの日数およびアデノウイルスコピー数の対数値を独立変数として、ステップワイズ法による重回帰分析を行った。

表 1. 臨床検体のアデノウイルス血清型およびコピー数

血清型	検体数(n)	ウイルスコピー数(copy/ μ L)
1 型	7	$1.47 \times 10^4 - 1.61 \times 10^7$
2 型	7	$6.74 \times 10^4 - 1.13 \times 10^8$
3 型	8	$1.23 \times 10^6 - 1.81 \times 10^8$
4 型	2	$5.48 \times 10^6 - 1.60 \times 10^7$
5 型	5	$6.48 \times 10^5 - 5.50 \times 10^7$
6 型	2	$1.43 \times 10^5 - 9.82 \times 10^7$
7 型	2	$2.69 \times 10^4 - 2.05 \times 10^7$
11 型	1	1.22×10^5

3. アデノウイルスの分離所要日数とウイルスコピー数の相関

供試した 34 検体のうちアデノウイルス 1 型 (7 検体)、2 型 (6 検体)、3 型 (8 検体) の 21 検体について、リアルタイム PCR 法で測定したウイルスコピー数を基に、それぞれの検体を D-MEM 培地で 10 倍階段希釈し、10 copy/ μ L から最大 10^8 copy/ μ L のウイルス液を作製した。A549 細胞を 24 ウェルマイクロプレートに単層培養し、希釈した検体を 1 検体当たり 2 ウェルに 50 μ L ずつ接種した。維持培地には 2%FBS 添加の D-MEM を用い、培地は接種後 2~3 日ごとに交換し、21 日間培養した。ウイルス分離の可否の判定が可能となる CPE がマイクロプレートのウェルの面積の約 25%出現するまでに要した日数と、ウイルスコピー数との関連性について検討した。

[結果]

1. アデノウイルス分離に最適な細胞に関する検討

1) 各細胞における CPE 出現率の比較

4 種類の細胞 (A549、HeLa、Vero-E6 および RD-18S) において、CPE が出現した検体数からアデノウイルスによる CPE 出現率を求めた(表 2)。CPE がウェルの面積の 75%出現した検体の割合は、高い順に A549 が 94.1%、HeLa が 85.3%、RD-18S が 35.3%、Vero-E6 が 26.5% であった。Vero-E6 細胞と RD-18S 細胞では、CPE が 100%となった検体は全体の 10%未満であった。CPE がウェルの面積の 25%、50%、75%、100%に出現したときの全てで、4 種類の細胞における CPE 出現率に有意差が認められた。

2) 分離に要する日数の比較

表 2 より、Vero-E6 細胞と RD-18S 細胞は他の細胞に比べ、明らかに CPE 出現率が低かったため、A549 細胞と HeLa 細胞を用いてアデノウイルス分離所要日数を比較した。CPE がウエルの面積の 25%、50%、75%、100%出現するのに要した平均日数は、A549 細胞では順に 2.1 日、3.3 日、4.0 日、5.0 日、HeLa 細胞では 3.9 日、4.3 日、4.8 日、5.3 日で、常に A549 細胞のほうが HeLa 細胞よりも短かった。CPE が 25%、50%および 75%出現するのに要した日数は、ノンパラメトリックな検定(Wilcoxon の順位和検定)において、A549 細胞と HeLa 細胞の間に有意差が認められた。

表 2. 4 種類の細胞でのアデノウイルスによる CPE 出現率 (n=34)

	CPE 25%*		CPE 50%*		CPE 75%*		CPE 100%*	
	検体数	(%)	検体数	(%)	検体数	(%)	検体数	(%)
A549	33	(97.1%)	33	(97.1%)	32	(94.1%)	32	(94.1%)
HeLa	32	(94.1%)	30	(88.2%)	29	(85.3%)	27	(79.4%)
VERO-E6	22	(64.7%)	15	(44.1%)	9	(26.5%)	2	(5.9%)
RD-18S	29	(85.3%)	24	(70.6%)	12	(35.3%)	3	(8.8%)

*) CPE がウエルの面積に占める割合を示す。

2. アデノウイルスの分離日数に影響する要因の検討

CPE が 25%、50%、75%および 100%出現するのに要する日数のヒストグラムを調べた結果、CPE75%における分布が適当だと考えられたため、CPE 75%の所要日数を従属変数として、アデノウイルスの分離所要日数に影響する要因を検討した。その結果、患者の年齢、発熱温度、発症から検体採取までの日数およびアデノウイルスコピー数対数値のうち、有意に関連した要因はアデノウイルスのコピー数の対数値のみであった。

3. アデノウイルスの分離所要日数とウイルスコピー数の相関

1) 曲線当てはめによるモデルの検討

CPE がウエルの面積の 25%出現するのに要した日数と臨床検体に含まれるアデノウイルスコピー数対数値の関係を、線型モデル、指数関数モデル、ロジスティックモデル等 11 のモデルを用いて検討した結果、最もシンプルで適合度も十分なモデルは指数関数モデルであった(図 1)。

2) アデノウイルス分離に要する日数の予測

指数関数モデルを用いてパラメーターを求め、コピー数から予測される分離所要日数とその信頼区間を推定した(表 3)。

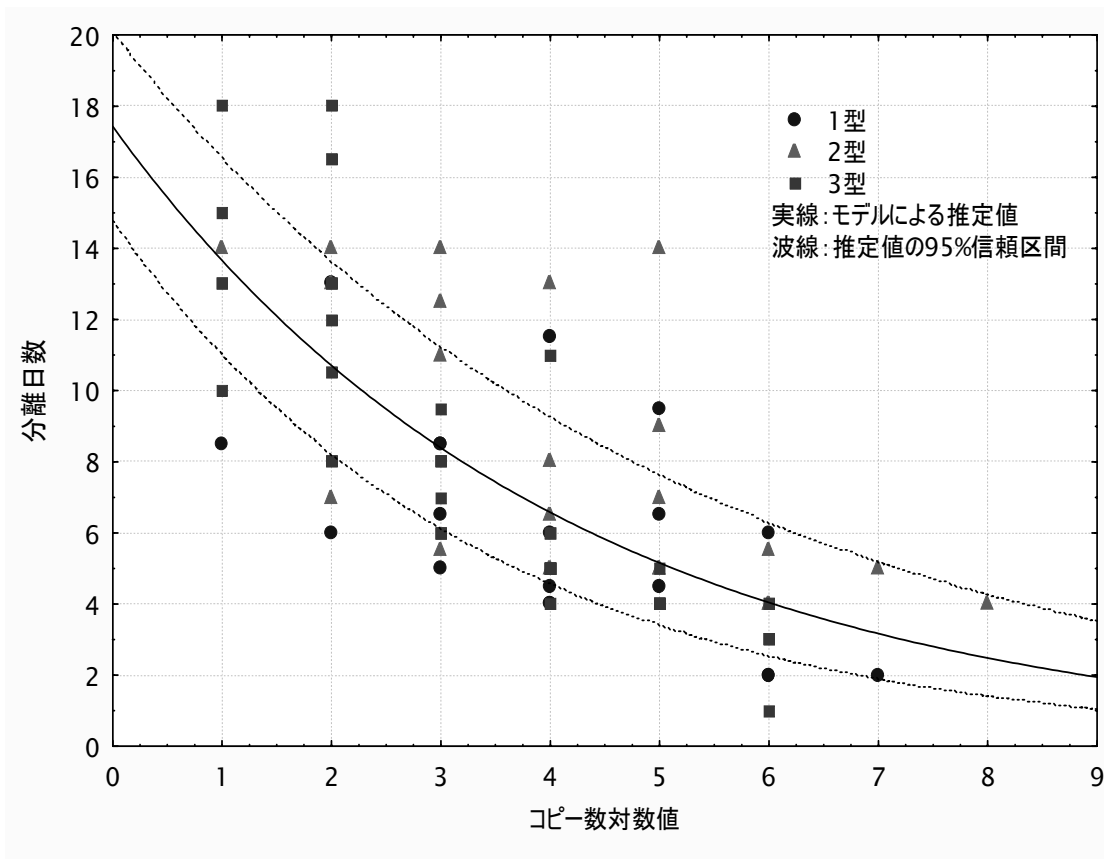


図1. アデノウイルス1型,2型,3型のA549細胞による分離所要日数とウイルスコピー数対数値の関係

表3. アデノウイルス分離(CPE 25%)に要する日数の推定値と95%信頼区間

アデノウイルスコピー数 対数値(x)*	分離に要する 日数推定値(y)*	下限値	上限値
1	13.7	11.0	16.6
2	10.7	8.2	13.6
3	8.4	6.1	11.2
4	6.6	4.6	9.3
5	5.2	3.4	7.6
6	4.0	2.5	6.3
7	3.2	1.9	5.2
8	2.5	1.4	4.3

*) $y = a \exp (bx)$: 各パラメーターの推定値(95%CI 下限, 95%CI 上限)は、
 $a=17.43(14.78,20.08)$ $b= - 0.244(- 0.294, - 0.194)$

[考察]

ウイルスサーベイランスにおいて、B種、C種およびE種のアデノウイルスは患者数が多く、また、B種の7型は临床上重篤な症状を引き起こすことがある。B種、C種およびE種のアデノウイルスを4種類の細胞(A549、HeLa、Vero-E6およびRD-18S)を用いて分離した結果、A549細胞とHeLa細胞でのCPE出現率は、Vero-E6細胞とRD-18S細胞より高く、また、A549細胞はHeLa細胞よりウイルス分離に要する日数が短かった。このことより、アデノウイルスの分離を迅速に進めるうえで最適な細胞はA549細胞であると考えられる。

アデノウイルスを含めて臨床検体からウイルスを分離することはウイルスの性状を見るうえで重要であるが、分離の可否の判定までに1か月程度要することがある。臨床検体に含まれるアデノウイルスコピー数からウイルス分離の所要日数が予測できれば、検体を接種した細胞の培養期間を推測することができるため、長期間の細胞培養が必要となる検体のウイルス分離も可能になると考えられる。今回の検討では、アデノウイルスの分離に要した日数とウイルスコピー数に相関が見られ、指数関数モデルが適合することが示された。そのモデルによると、アデノウイルスの分離には、ウイルスコピー数が $10^3\text{copy}/\mu\text{L}$ 以下の場合には1週間以上、 $10\text{copy}/\mu\text{L}$ ではおよそ2週間の細胞培養が必要であると推定された。あらかじめ、ウイルス分離の所要日数を把握することができれば、効率よくウイルス分離を進めることができ、分離率の向上につながる。今後、臨床検体の数を増やし、今回求められた指数関数モデルがウイルス分離の所要日数の予測に用いることが可能であるか検討をする必要がある。

[謝辞] 検体採取に協力して下さいました兵庫県健康福祉部健康局疾病対策課ならびに発生動向調査における病原体定点の医療機関の関係者の皆様方に深く感謝致します。

[参考文献] 1) Watanabe M, Kohdera U, Kino M, Haruta T, et al.(2005): Detection of adenovirus DNA in clinical samples by SYBR Green real-time polymerase chain reaction assay. *Pediatr.int*,47(3): 286-91.

[経費使途明細]

ピペット(電動ピペットとマルチチャンネルピペット 各1本)	119,050 円
細胞培養培地(D-MEM培地 500mL) 840円×25本	21,000 円
細胞培養プレート 22750円×3箱	68,250 円
サンプリングチューブBOX(0.5mL用と1.5mL用 各1箱)	31,900 円
フィルターチップ(10 μL , 100 μL , 200 μL , 1000 μL 各2箱)	70,400 円
ディスポ手袋 900円×5箱	4,500 円
旅費(国立感染症研究所でのアデノウイルスコピー数の測定等検体搬送)	123,880 円
参考書籍購入費(洋書 Real-time PCR in Microbiology 等2冊)	72,360 円
合計	511,340 円