

ヒト横紋筋肉腫由来細胞(RD-18S 細胞)によるライノウイルスの分離について

菱沼郁美 柏原尚子 金成篤子 廣瀬昌子 三川正秀 大竹俊秀
微生物グループ

要 旨

ライノウイルスは風邪症候群の原因ウイルスとして5割以上を占めているといわれている。ライノウイルスはヒト胎児線維芽細胞, 胎児扁桃由来細胞などによる分離が一般的であるが, 我々は今年感染症発生動向調査事業において RD-18S 細胞 (ヒト横紋筋肉腫由来細胞) よりライノウイルスを分離した。遺伝子検出手法を用いダイレクトシーケンス法により塩基配列の決定, DDBJ の BLAST により相同性の検索を行いライノウイルスと同定した。現在 RD-18S 細胞はライノウイルスに特異的なレセプターを発現しているか, 血清型により感受性に違いがあるかを確認中である。

キーワード: ライノウイルス, RD-18S 細胞, ダイレクトシーケンス法

はじめに

ライノウイルスは風邪症候群の原因ウイルスの一つである。上気道からの感染によるもので鼻風邪ウイルスと呼ばれることもある。血清型が100以上あり, 何度もこのウイルスに感染してしまうことが知られている。健康な人がこのウイルスにかかると熱はなく鼻, のどの炎症が主症状で1~2週間で軽快する。気管支喘息を基礎疾患として持っている患児が, RS (respiratory syncytial) ウイルスにかかると重篤な喘息発作を引き起こすことがこれまで知られているが, ライノウイルスによっても喘息発作を引き起こすことが明らかになってきた。

ライノウイルスの検出は本県の場合過去に(1984年, 85年)に2症例の検出があったが, この当時の使用細胞は GMK 細胞 (アフリカミドリザル腎細胞) での分離であった。

RD-18S 細胞 (ヒト横紋筋肉腫由来細胞) は, エコーウイルス, コクサッキーウイルス A

群の分離を目的とした細胞であるが, 今年感染症発生動向調査事業において, 2 症例から分離したので報告する。

症 例

ライノウイルスが検出された2症例を表1に示す。A 症例では相模地区で2007年6月に採取された7ヶ月男児の咽頭拭い液から, B 症例では郡山地区で2007年7月に採取された10ヶ月女児の咽頭拭い液, 気管洗浄液から検出された。

方 法

96 穴プレートを用い 34 °C 炭酸ガス培養を行った。凍結融解後, 2 代継代培養を行い, CPE (細胞変性効果) を示す細胞から 25 cm² フラスコで継代培養し増殖させたウイルス液を用いた。

1 RD-18S細胞

RD-18S 細胞はヒト横紋筋肉腫由来の細胞

表1 ライノウイルスが検出された症例

症例	採取月日	分離ウイルス	診断名	年齢	性別	住所	発熱	咽頭	糞便	気管洗浄液
A	2007年 6月14日	Rhino virus sp.	クループ症候群 喘息様気管支炎	7ヶ月	男	相馬郡		●		
B	2007年 7月21日	Rhino sp. (咽頭 気管吸引液) Adeno 2 (咽頭 糞便) CoxA 16 (糞便)	急性心不全	10ヶ月	女	郡山市	37.6	◎	◎	●

●: ウイルス分離された検体

◎: 複数ウイルス分離された検体

表2 結果

症例	力価	BLAST検索		
		Accession No.	株名	相同性
A	$10^{3.6}$ TCID50/25 μ L	L24917	Human rhinovirus type 16 polyprotein gene, complete CDS.	97%
B-1	$10^{3.6}$ TCID50/25 μ L	〃	〃	95%
B-2	$10^{4.2}$ TCID50/25 μ L	〃	〃	95%

注：B-1 咽頭拭い液
B-2 気管吸引液

である。本所所有の RD-18S 細胞は、1986 年に福島県立医科大学細菌学講座（当時）より分与されたもので、由来は愛知県衛生研究所にてクローニングされた細胞である。コクサッキーウイルス A 群、エコーウイルスの分離を目的とした細胞である。

2 培養液

イーグル MEM（ダルベッコ変法）培養液を使用し、細胞増殖用には 10% 牛胎児血清、細胞維持用は 1% 牛胎児血清を加え使用した。

3 ウイルスの定量

エンテロウイルスと力価の違いを比較するため定量を行った。

ウイルス液の濃度を $10^1 \sim 10^6$ まで希釈した液を 4 穴ずつ 25 μ L 接種し、6～10 日間 CPE を観察した。Reed-Muench の方法から 100TCID50（50% Tissue Culture Infection Doses）を算出した。

4 ウイルスの検索

Arono C. Andeweg らのプライマー¹⁾を用い RT-PCR 反応後、目的とするバンドを精製し、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、DDBJ の BLAST により相同性の検索をした。

結果

結果を表 2 にまとめた。

1 ウイルスの定量

RD-18S 細胞によるライノウイルスの定量は、A 症例は $10^{3.6}$ TCID50/25 μ L となった。B-1 症例は $10^{3.6}$ TCID50/25 μ L、B-2 症例は $10^{4.2}$ TCID50/25 μ L となった。

2 ウイルスの検索

BLAST による相同性検索により Human rhinovirus type 16 polyprotein gene, complete CDS（Accession No.L24917）の約 340 の塩基配列と A 症例が 97%、B 症例が 95% の相同性となり、ライノウイルスと決定した。

考察

ライノウイルスの検出にはヒト胎児線維芽細胞が一般に使用される。今回、ヒト横紋筋肉腫由来細胞（RD-18S 細胞）により検出されたのは珍しい現象といえる。この現象が何らかの偶然が重なって今回に限定して起こったことなのか、本所所有 RD-18S 細胞の性状に何らかの変化がおきて起こったことなのかは明らかではない。そこで、現在 RD-18S 細胞については「ウイルス感染症効果的制御のための病原体サーベイランスシステムの検討」の呼吸器ウイルス研究班により、ライノウイルスに特異的なレセプターがどれだけ発現しているか、また、血清型により感受性に違いがあるか等を確認中である。ヒト胎児線維芽細胞は維持管理が困難である。そのため使用は一部の地方衛生研究所に限られている。しかし、今回我々が用いた RD-18S 細胞は広く使用されており、もし RD-18S 細胞で検出が可能になれば、今後ライノウイルスの分離報告の増加につながることを期待される。

謝辞

ライノウイルスについてご指導いただきました国立感染症研究所ウイルス第 3 部の野田雅博先生に深謝いたします。

引用文献

- 1) Arono C.Andeweg, Theo M.Bestebroer, et al. Improved Detection of Rhinoviruses in Clinical Samples by Using a Newly Developed Nested ReverseTranscription-PCR Assay. Journal of Clinical Microbiology 1999 ; 37 : 524-530.
- 2) David O.White, Frank j.fenner, 北村敬. 医学ウイルス学〈第四版〉. 東京：近代出版（株），1998 ; 340-362.
- 3) 国立感染症研究所, エンテロウイルス (2) 2000～2006年. 病原微生物検出情報 <http://idsc.nih.go.jp/iasr/virus/pvirus-j.html>, 2008/02/18
- 4) 国立感染症研究所, 月報病原微生物検出情報 2007年 ; 10 : 32-34.
- 5) 構成科学研究情報, 免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業 http://www.allergy.go.jp/Research/Shouroku_01/15_odajima_01.html 2008/02/18