

〔技術資料〕

Detection of Enterovirus in cell culture by SYBR green-based real time RT-qPCR

ウイルス課 堤陽子 島あかり 松延富与子 諸石早苗 安藤克幸

1 はじめに

ポリオワクチンについては、日本ではこれまで弱毒生ワクチン(Oral Poliovirus Vaccine:OPV)が使用されていたが、現在、副反応の問題等から不活化ワクチン(Inactivated Poliovirus Vaccine:IPV)に変更されており、国内居住者からはポリオウイルス株は検出されない接種システムとなっている。

当県においても実施しているポリオ環境水サーベイランス(ポリオウイルスサーベイランス)では、その地域集団に、流行国から野生株ポリオウイルスやポリオワクチン株が持ち込まれた場合に、効率よく検出することが可能である。

平成 27 年の全国的な調査では、事業として 16 カ所、調査研究として 2 カ所、計 18 ヶ所の地方衛生研究所が 2015 年 1 月～2016 年 3 月の間、月 1 回の頻度で流入下水を採取し、陰電荷膜法にて濃縮(50～100 倍)し、ウイルス分離・同定を行った。この調査対象地域の下水道利用人口は合計約 600 万人となっている。

今回、このサーベイランス調査において、これまで L20B 細胞に CPE(cytopathiceffect)をもたらすことが報告されていないウイルス株が RT-PCR で検出されたため、検討を行った。

2 材料および方法

ウイルス分離には 1～2 代目に 24 ウェルプレートに播種した RD-A および Hep-2 細胞を、L20B を CPE が認められた場合の継代用細胞とし、図 1 の方法により濃縮した検体をこれらの細胞に接種した。

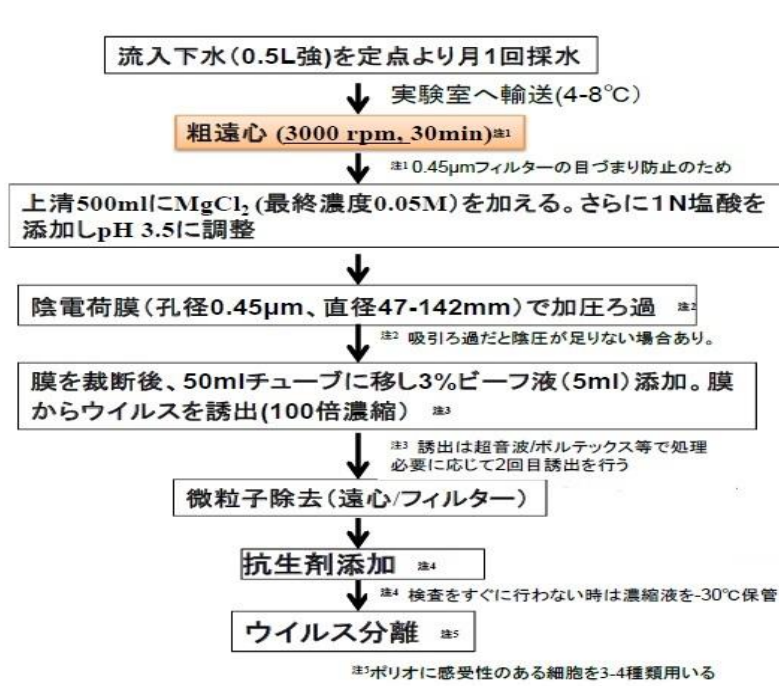


図 1 濃縮および培養方法

検体を接種した細胞は、36.5℃の CO₂ インキュベーターで 1 週間を基本として培養し、CPE を観察した。CPE が出現した場合は培養上清を回収し、同じ細胞に継代し、その後 L20B へ継代して 1 週間培養し CPE の有無を確認した。CPE が出現しなかった場合は陰性と判定した。

〔技術資料〕

2 代継代後 CPE が認められた RD-A および Hep-2 を L20B へ継代し、CPE が認められた L20B のウェルについて遺伝子検査を実施した。

遺伝子検査では Adeno virus , Reo virus および Entero virus (Echo 6) が検出された。L20B 細胞では、Adeno virus, Reo virus, 一部の Entero virus 等による CPE は報告されている^{1),2),3)}が、Echo6 による CPE は報告されていない。

このため、Echo6 陽性の L20B ウェルについて L20B へ再度継代し、SYBR Green による real time RT- qPCR の amplification plot の Cycle threshold(Ct)値により Echo6 増殖の有無について検証することとした。

3 結果

Echo6 陽性の培養上清と L20B で培養した培養上清(再度接種検体)を 100 倍希釈した材料を用いて、Enterovirus と Reovirus について real time RT- qPCR 法で検査を行った。

Enterovirus と Reovirus の L20B へ再度接種前と L20B へ再度接種後の amplification plot の Ct 値散布図は以下のとおりであった。

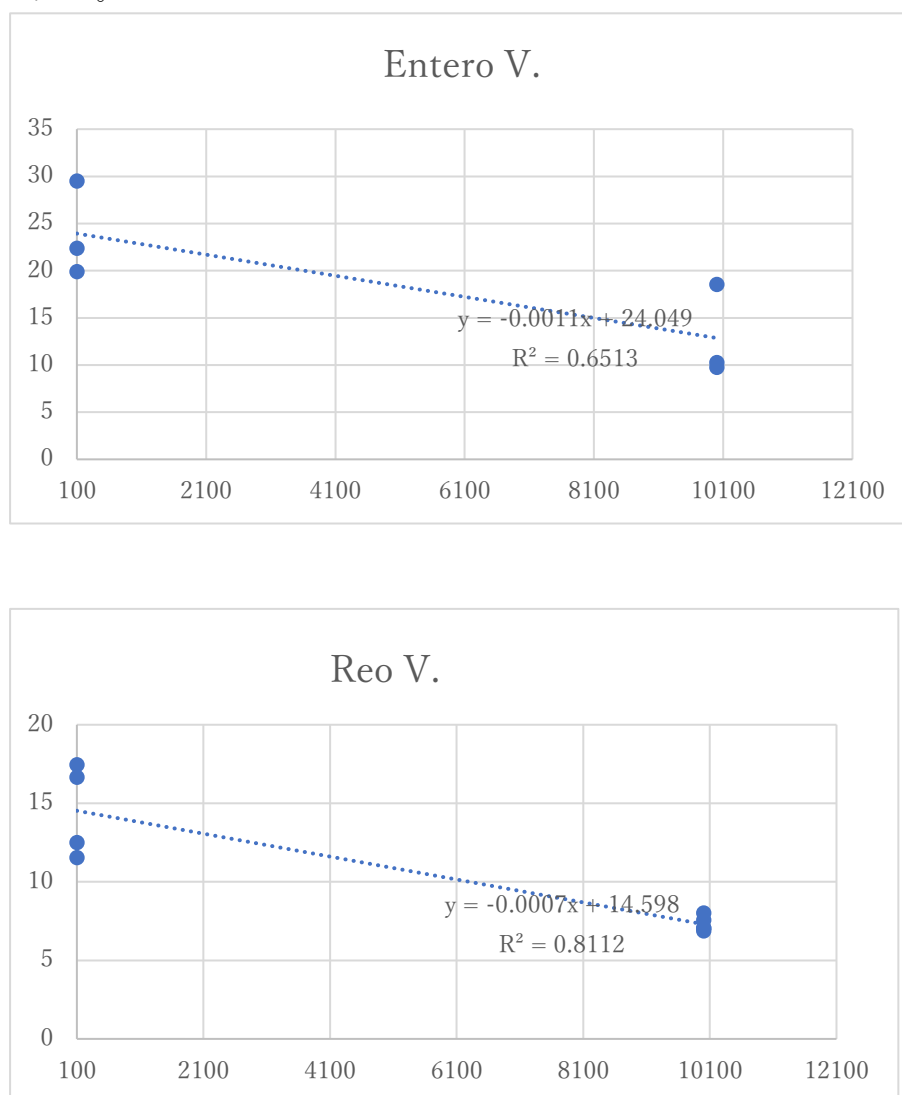


図 2 Enterovirus と Reovirus の amplification plot の Ct 値散布図

〔技術資料〕

また、L20B へ再度接種前と L20B へ再度接種後の Ct 値の差の有意差検定では、 $p=0.040$ であり、5%の有意水準で有意差が認められた。

4 考察

L20B 細胞はポリオウイルス以外のウイルスのうち、coxsackievirus B4、Reovirus type2 及び coxsackievirus A で CPE を生じることが報告されている。²⁾

図 2 の散布図の結果から、これまでの報告⁴⁾により L20B 再度接種前と L20B 再度接種後の Echo6 RNA 量は希釈による変動を反映しているのみであり、Echo6 は増加していなかった。つまり、L20B 接種後では、Echo6 は増殖していないことが示唆された。また、図 2 の散布図の結果から L20B 接種前と L20B 再度接種後の Reovirus RNA 量は、希釈による予定数よりも増加していた。このことから、CPE 陽性の L20B well 中において Reovirus が増加していることが示された。

これらの結果から継代後 L20B well の CPE 陽性には、Reovirus が寄与していることが明らかになった。

参考文献

- 1) Grabow WO, Botma KL, de Villiers JC, Clay CG, Erasmus B. Assessment of cell culture and polymerase chain reaction procedures for the detection of polioviruses in wastewater. Bull World Health Organ. 1999; 77(12): 973-980.
- 2) Sarmiento L et al. Evidence for nonpoliovirus enterovirus multiplication in L20B cells. Rev Cubana Med Trop vol.59 no.2 Ciudad de la Habana May-Aug. 2007
- 3) World Health Organization (WHO), Polio laboratory manual, 4th edition, Geneva: WHO, 2004.
- 4) Yasuo Suda et al. Highly sensitive detection of influenza virus in saliva by real-time PCR method using sugar chain-immobilized gold nanoparticles; application to clinical studies. Biotechnology Reports 7 (2015) 64-71.