

結膜炎起因のアデノウイルスの分離に関する細胞感受性と 分離培養細胞系によるウイルス DNA 切断像の解析 (写真 4, 表 2)

中 國 直 樹 (北海道大学医学部公衆衛生学講座)
樋 口 真 琴・宮 島 輝 英 (北海道大学医学部眼科学講座)
藤 永 薫 (札幌医科大学がん研究所分子生物学講座)

Sensitivities of Host Cells for Virus Isolation from Adenoviral Conjunctivitis and DNA Cleavage Pattern Analysis of Adenoviruses by Cell

Naoki Nakazono, Makoto Higuchi, Teruhide Miyajima
and Kei Fujinaga

*Department of Public Health and Department of Ophthalmology
Hokkaido University School of Medicine, and Department of Molecular
Biology, Cancer Institute of Sapporo Medical College*

要 約

血清学的成績や臨床所見からもアデノウイルス性結膜炎が強く疑われる症例について、アデノウイルスに感受性のあるとされる 3 種の細胞 (HEK, HeLa, 293細胞) で分離培養を試み、分離に用いる細胞系の感受性の差を検討した。また、分離に使用する細胞系によって、アデノウイルスの DNA 切断像に変化がありうるかを検討した。分離率は、HEK 細胞使用で 63.3%, HeLa 細胞で 36.7%, 293細胞で 40.8% と使用細胞により明らかに差がみられた。血清型との関係は、Ad3 と Ad4 の分離は使用細胞系による分離率に著明な差は認められなかったが、Ad8 の分離は、HEK 細胞が HeLa 細胞に比べて優れて、Ad19 の分離は HEK 細胞が 293細胞より優れていた。Ad37 は、使用細胞系による分離率の違いは有意ではなかった。同一血清型内では分離歴、継代歴が異なってもウイルス DNA 切断像の差異、変化は観察されなかった。(日眼 92: 381—385, 1988)

キーワード: アデノウイルス性結膜炎, ヒト胎児腎細胞, HeLa 細胞, 293細胞, DNA 制限酵素切断解析

Abstract

In 49 conjunctivitis cases in which adenoviral etiology was strongly suspected, virus isolation was attempted using HEK, HeLa and 293 cell lines. Adenovirus were isolated in 31 cases with HEK cells, in 18 with HeLa cells and in 20 with 293 cell. Isolated adenoviruses were 4 Ad3, 8 Ad4, 11 Ad8, 4 Ad19 and 5 Ad37. The HEK cell was more sensitive for the isolation of adenoviruses than HeLa and 293 cell lines, particularly for isolation of Ad8 and Ad19. DNA cleavage patterns did not differ in the same serotypes of adenovirus which were isolated and grown in different cells. (Acta Soc Ophthalmol., Jpn 92: 381—385, 1988)

Key words: Adenoviral conjunctivitis, HEK cell, HeLa cell, 293 cell line, DNA cleavage analysis

別刷請求先: 060 札幌市北区北15条西 7 丁目 北海道大学医学部公衆衛生学講座 中國 直樹
(昭和62年 9 月 7 日受付)

Reprint requests to: Naoki Nakazono, M.D. Dept. of Public Health, Hokkaido University School of Medicine
Sapporo, Japan, 060

(Accepted September 7, 1987)

I 緒 言

わが国のウイルス性結膜炎の起因ウイルスは、アデノウイルスとエンテロウイルスの2つに大別できる。アデノウイルス性結膜炎は各地に常在しており、エンテロウイルス性のものは、急性出血性結膜炎として時として爆発的に流行することがある。アデノウイルス性結膜炎の主な起因ウイルスは、従来は圧倒的にアデノウイルス8型(Ad8と略す)であったが、近年はAd8以外の4, 19, 37型(Ad4, 19, 37と略す)等の多彩な血清型が報告¹⁾されてきている。また最近ではDNA切断解析法により同一血清型内でのアデノウイルスの遺伝子型の違いまでに研究²⁾が及んでいる。起因ウイルスの決定は主に、結膜材料からのウイルスの分離でなされる。それ故、これらの研究は分離されたウイルスについてであり、分離されるか否かが最大の問題である。筆者らはアデノウイルス性下痢症同様に、『アデノウイルス性結膜炎の起因ウイルスの中に難分離、難培養性のウイルスの存在の可能性は無いのであろうか?』の疑問を持ち、本研究を試みた。

アデノウイルスの補体結合(CF)反応の血清学的成績や臨床所見からもアデノウイルス性結膜炎が強く疑われる症例について、アデノウイルスの分離に感受性のあるとされる3種の細胞(HEK, HeLa, 293細胞)で分離培養を試み、分離に用いる細胞系の感受性の差を検討した。また、各々の細胞系での分離培養によるアデノウイルスDNAの差異の可能性についても検討した。

II 実験方法

① 被検対象：アデノウイルス性結膜炎が強く疑われた49症例(CF反応でベア血清で有意上昇15例、上昇14例、陽性であるが変動なし12例とベア血清なしの8例)についてウイルス分離を試みた。ウイルス分離用検体は3種の分離用細胞に同時に接種するなどの分離条件を同一にするために、採取より分離までに3～4年間-70℃に保存保管されていたものを用いた。また、結膜炎の発症より採取までの病日は1～3病日が23検体、4～7病日が20検体、8～12病日が6検体で平均4.1日であった。

② ウイルス分離・同定：-70℃に凍結保存されていたこれら症例の結膜拭い液を、3種細胞系にそれぞれ接種した。HEK細胞は常法通り作成した。HeLa細胞は当教室で常時継代の細胞を用いた。293細胞はアデノ

ウイルス5型のDNA分子の左端に位置する初期遺伝子E1AおよびE1B領域(左端約12%)を含むHEK細胞³⁾である。これら細胞に結膜拭い液を各細胞に1チューブ当たり0.2ccずつ接種し、細胞変性効果(CPE)を観察した。CPE陽性検体は、さらに2代同一細胞で継代した後に、型特異的抗アデノウイルス血清を用いた中和試験(マイクロタイター法)で血清型を同定した。

③ DNA切断解析法：ウイルスDNAの抽出精製はFujinagaらの方法⁴⁾で行い、各種制限酵素による切断やDNA切断断片の電気泳動の方法はFujiiらの方法⁵⁾に準じて行った。使用した制限酵素は各血清型とも基本的にはHind III, Bam HIで、8型についてはSst I, Sa IIでも切断した。

III 成 績

1. アデノウイルス分離とCF反応、病日との関連

アデノウイルスが分離されたのは32例で、その血清型は同定の結果、3型が4例、4型が8例、8型が最も多く11例で、19型が4例、37型が5例であった。この分離成績をCF反応応答との関連で検討した。4倍以上の有意上昇例は15例中12例(80%)に、2倍上昇例は14例中8例(57.1%)、抗体価変動なしでは12例中5例(41.7%)にアデノウイルスが分離されており、CF反応の成績はアデノウイルスの分離に当たってかなりの指標となりうることを示している。しかし一般にウイルス分離成績には分離材料の採取病日も関与するので、分離と病日との関係をあわせて検討した(表1)。病日は、分離陰性例は幾分病日が進んでいるものに多い様であるが、むしろ抗体価の変動のない例では分離陰性例の病日が早いなど、病日との関係よりもCF反応の成績が、より関連がありそうである。

2. 使用細胞系による分離感受性の比較

全体での分離率は32/49(65.3%)であるが、HEK細胞使用で31例(63.3%)、HeLa細胞で18例(36.7%)、293細胞で20例(40.8%)分離され、分離率が使用細胞により明らかに差がみられ($p < 0.02$)、HEK細胞がアデノウイルス分離に優れている。分離できた32例のみについて、分離細胞系別に分離とその血清型を調べた(表2)。HEK細胞では32例中31例(96.9%)、HeLa細胞で18例(56.3%)、293細胞では20例(62.5%)が分離され、細胞系による分離感受性に明らかに差がみられた($p < 0.01$)。そして使用する細胞とウイルス血清型との間に一定の特性が観察された。即ち、血清型別

表 1

		分 離 陽 性 例						分離陰性例
CF 応答	総数	3 型	4 型	8 型	19型	37型	平均病日	平均病日
有意上昇	15	1	2	6	1	2	4.0日	5.6日
上昇	14	1	3	2	2	0	4.5日	7.2日
変動なし	12	0	0	4	0	1	3.0日	1.4日

表 2

細 胞 系			血 清 型				
HEK	HeLa	293	3 型	4 型	8 型	19型	37型
(+)	(+)	(+)	2	6	1	—	2
(+)	(+)	(—)	—	1	2	2	1
(+)	(—)	(+)	1	1	4	—	1
(—)	(+)	(+)	1	—	—	—	—
(+)	(—)	(—)	—	—	3	2	1
(—)	(+)	(—)	—	—	—	—	—
(—)	(—)	(+)	—	—	1	—	—
総 計			4	8	11	4	5

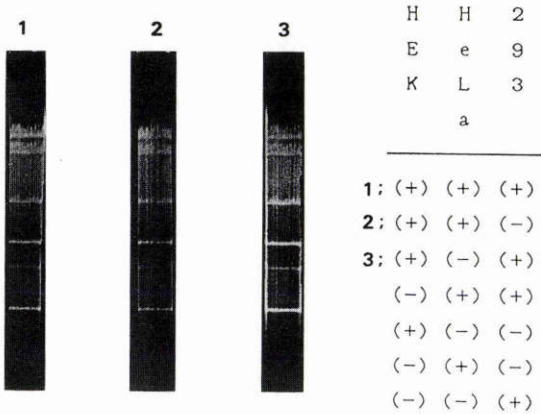


写真 1 Cleavage Ad4 with Hind III

にみると、Ad3は293細胞では4株全てが分離され、HEK細胞とHeLa細胞でも3株が分離された。Ad4は8株全てがHEK細胞では分離され、HeLa、293細胞でも7株が分離された。Ad3とAd4の分離に関しては、使用細胞系によるウイルス分離率に著明な差は認められなかった。しかしAd8の分離は、HEK細胞では11例中10例とHeLa細胞では11例中3例と明らかに分離率に差がみられ、HEK細胞が優れている ($p < 0.01$)。Ad19の分離はHEK細胞と293細胞の使用とには差がみられた ($p < 0.05$)。Ad37はHEK細胞を用いての分離が幾分優れているが、使用細胞系による分離率の違いは有意ではなかった。

しかし、分離ウイルスのどの血清型も大半の分離株は2種以上の細胞系で分離されており、細胞系の併用と分離血清型とには一定の傾向はそれほど明らかではなかった。

一方、ある細胞によってのみウイルスが分離されたものもある。例えば、Ad8ではHEK細胞で3株、293細胞で1株の計4株、Ad19の2株とAd37の1株がHEK細胞でのみ分離された。しかし、これも血清型と細胞系とに特別の関連はなさそうである。

3. アデノウイルスの分離の可能性の検討

ウイルスが分離できなかった17検体について検討した。病日は10病日以上と比較的遅い例が2例あるが、

他は1～3病日が8例、4～7病日が5例などと平均病日は4.6日で、検体採取が分離陽性例(表2にはCF反応との成績で示してあるが、分離陽性例全体の平均病日は4.0日)と比べて病日が遅すぎるとは思えない。また分離陽性例にも10病日で37型が分離できた1例があるなど、分離の陽性例と陰性例との間に病日毎の例数に極端な不一致はなかった。一方、CF反応では9例がベア血清で上昇または有意上昇例で、病日も2～7病日である。うち4検体は5病日以内で分離に比較的好適な検体であるにも拘らず、3種細胞系の併用分離でもアデノウイルスが分離出来なかった。あるいは、この3種の細胞系の細胞感受性に限度があるのかもしれない。またさらに別種の細胞系を使用するなどの試みも必要であろう。

4. 分離アデノウイルスのDNA切断像の比較

分離までに至った細胞継代歴の異なる分離株について、各種制限酵素によるDNA切断を試みた。各血清型内で、分離細胞歴の異なる株でのDNA切断像を比較した。同一血清型内では調べる限りにおいてDNA切断像の変化、差異は観察されなかった。しかし、Ad37で、HEK細胞だけで分離された1株が他のAd37株とDNA切断像が異なっていた。写真は代表的にHind

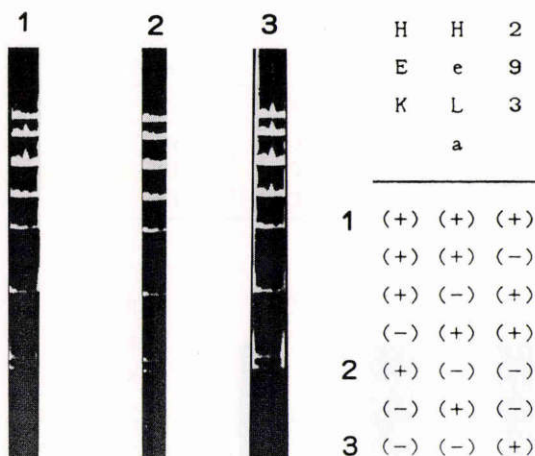


写真2 Cleavage Ad8 with Hind III

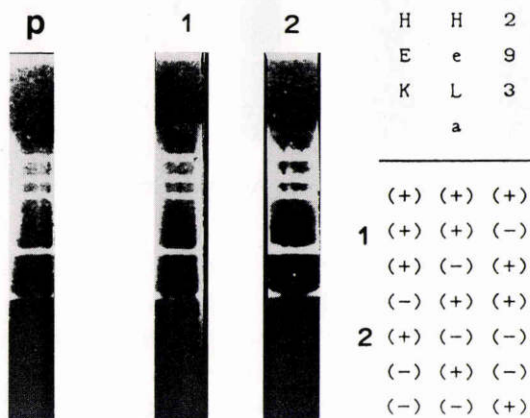


写真3 Cleavage Ad19 with Hind III

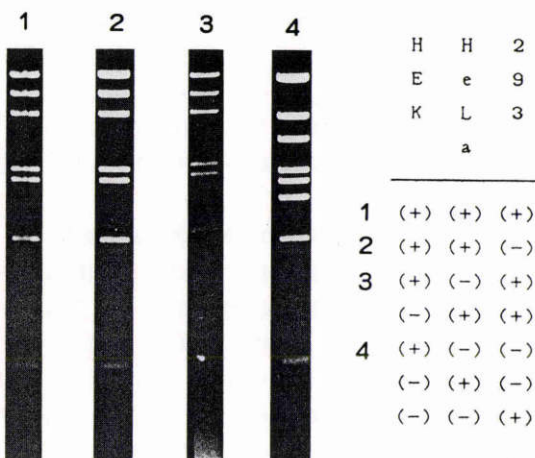


写真4 Cleavage Ad37 with Hind III

IIIによるDNA切断像を示した(写真1, 2, 3, 4)。

IV 考 按

下痢症の近年の電顕学的研究からアデノウイルス性下痢症の存在が知られ、分離培養が試みられていた。その起因アデノウイルスは最近まで一般に難分離・培養性であったが、293細胞の使用によりこの難培養性の下痢症アデノウイルスの培養増殖がある程度可能になった^{6)~9)}。この293細胞はアデノウイルス5型の初期遺伝子領域E1を組み込んだ細胞のためか、呼吸器や糞便材料からのアデノウイルスの分離が高率になされ、病原診断に有効とされている¹⁰⁾。

本研究は臨床所見や血清学的検査所見からもアデノウイルス性結膜炎が強く疑われ、また検体も比較的に早期に採取された症例について、この293細胞を含む、アデノウイルスに感受性のあるとされるHEK, HeLa細胞等を用いて、アデノウイルス性結膜炎の病原を検討した。しかし、これを判断するには、これらの検体中にアデノウイルス粒子が存在するか否かを、まず電顕等で確認して検討すべきであろう。しかし、本研究では下痢症の糞便ほどの検体が物理的にも量的にも得られない。このような制約がある上での解析であるので、結果を断定はできない処に問題がある。

一応、検体は-70℃保管であるが3~4年保存されていたものである。新鮮材料に比べ分離の条件が悪いのは否めないが、全体で32検体(65.3%)分離された。しかし、分離に使用する細胞によりアデノウイルスの分離率や分離される血清型には特性が観察された。この3種の分離細胞の感受性には明らかな差がみられ、アデノウイルスの分離はHEK細胞>293細胞>HeLa細胞の順で、分離にはHEK細胞が明らかに優れていた。また分離ウイルスの血清型との関係ではAd3, Ad4およびAd37の感受性には細胞による差は観察されなかったが、Ad8とAd19の感受性には細胞による差があり、HEK細胞が明らかに優れていた。本研究では、293細胞に関してアデノウイルス下痢症での報告^{6)~9)}やBrownらの報告¹⁰⁾にみられるほどアデノウイルスの分離に好結果は得られなかった。これは前記の諸報告が対象とした血清型と結膜炎の起因のそれと異なるためかと推測される。

しかし、対象症例中に難分離培養性のアデノウイルスの存在の可能性を否定できない。と言うのも、分離陰性の17検体中9検体はCF反応、病日からしても分離には好適であると言えるからである。この3細胞併

用では分離出来なかったが、感受性の異なる別の細胞の選択が必要なのかもしれない。

次に、細胞系による分離歴、継代歴が異なる分離株でのウイルス DNA 切断像を各血清型内で比較検討した。『分離に使用する細胞系によって、アデノウイルスの DNA 切断像に変化がありうるか?』が考えられるからである。少数の限られた制限酵素しか使用していないが、調べる限りでは、同一血清型内では分離歴、継代歴が異なってもウイルス DNA 切断像の差異、変化は観察されなかった。また筆者らは Ad8 において分別できた 6 つの subtype²⁾について HeLa 細胞だけで 30 代、HEK 細胞だけで 10 代継代したウイルスの DNA 切断解析を行ったが、この程度の継代ではウイルス DNA 切断像は安定であった(未発表)。使用した制限酵素数も少ないので、十分とはいえないが本研究程度の継代歴、しかも同一細胞での継代ではウイルス DNA に変化がないのも妥当かもしれない。近年、Ad3, 4, 7 型に関して HEK, Chang, 293 細胞で得られた DNA 切断像には違いがなかったとする報告がある¹¹⁾。しかし、種の違う継代細胞を継代することでウイルス DNA の末端の塩基配列が変化した現象がウマアデノウイルスにおいて観察¹²⁾されている。またヒトのアデノウイルス性下痢症において、分離が出来ず直接糞便よりウイルス DNA を抽出した Ad40 の DNA 切断像が、293 細胞で分離培養された Ad40 の DNA 切断像と異なったとの興味ある報告¹³⁾もある。そこで本研究の分離されなかった症例に前記の様な変化、変異のアデノウイルスの存在の可能性は十分考えられる。

また Ad37 で HEK 細胞のみで分離された 1 株が他の Ad37 株とは異なる DNA 切断像 (Hind III) を示した²⁾ことはきわめて興味深い。しかし Ad37 の症例はいまだ少ないので、さらに多くの症例について検討をしてみたい。

文 献

- 1) 山崎修道：眼科疾患を起こすウイルスの最近の話題。臨床とウイルス 14: 134—138, 1986.
- 2) 中園直樹, 宮島輝英, 樋口真琴他：結膜炎由来の代表的アデノウイルスの疫学的研究—とくに DNA 切断解析を中心として, あたらしい眼科 2: 1619—1623, 1985.
- 3) Graham FL, Smiley J: Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J Gen Virol 36: 59—72, 1977.
- 4) Fujinaga K, Rankin A, Yamazaki H, et al: RD-114 virus: Analysis of viral gene sequences in feline and human cells by DNA-DNA reassociation kinetics and RNA-DNA hybridization. Virology 56: 484—495, 1973.
- 5) Fujii S, Nakazono N, Sawada H, et al: Restriction endonuclease cleavage analysis of adenovirus type 8: Two new subtypes from patients with epidemic keratoconjunctivitis in Sapporo, Japan. Jpn J Med Sci Biol 36: 307—313, 1983.
- 6) Takiff HE, Straus SE, Garon CF: Propagation and in vitro studies of previously non-cultivable enteral adenoviruses in 293 cells. Lancet ii: 832—834, 1981.
- 7) de Jong JC, Wigand R, Kidd AH, et al: Candidate adenoviruses 40 and 41: Fastidious adenoviruses from human infant stool. J Med Virol 11: 215—231, 1983.
- 8) Brown M, Petric M, Middleton PJ: Diagnosis of fastidious enteric adenoviruses 40 and 41 in stool specimens. J Clin Microbiol 20: 334—338, 1984.
- 9) Brown M: Selection of nonfastidious adenovirus species in 293 cells inoculated with stool specimens containing adenovirus 40. J Clin Microbiol 22: 205—209, 1985.
- 10) Brown M, Petric M: Evaluation of cell line 293 for virus isolation in routine viral diagnosis. J Clin Microbiol 23: 704—708, 1986.
- 11) Bailey, A.S. Richmond SJ: Genetic heterogeneity of recent isolates of adenovirus types 3, 4 and 7. J Clin Microbiol 24: 30—35, 1986.
- 12) Ishiyama T, Shinagawa M, Sato G, et al: Generation of packaging-defective DNA molecules of equine adenovirus. Virology 151: 66—76, 1986.
- 13) 出村 守, 沢田幸治, 吉田幸一: ヒトアデノウイルス F 群 40 型 (札幌株) ゲノムのクローニング, 制限酵素切断点地図の作成及びトランスホーム遺伝子の同定。札幌医学雑誌 56: 57—69, 1987.