

短報

A549細胞を用いた流入水中アデノウイルスの分離

吉富秀亮・濱崎光宏・中村麻子・世良暢之

終末処理場への流入水中アデノウイルスの分離におけるA549細胞の有用性を検討した。検体は2014年4月から2015年3月までの期間において、毎月1回、2箇所の終末処理場で採取された流入水合計24検体を用いた。流入水濃縮液をA549細胞に接種しアデノウイルスの分離・同定を行った。その結果、アデノウイルスは10月を除く調査月で分離され、合計53株のアデノウイルスが分離された。今回の検討の結果、A549細胞のウイルス分離率は35.9%と算出され、A549細胞はエンテロウイルス流行期においても流入水中のアデノウイルスを感度良く検出することが可能であることが示唆された。

[キーワード：アデノウイルス、A549細胞、流入水]

1 はじめに

A549細胞(ATCC登録番号CCL185)はヒト肺胞上皮細胞株で、1972年にGiardらによって樹立された細胞である¹⁾。A549細胞はコクサッキーウイルスB群(CB)およびアデノウイルス(HAdV)共通の受容体(Coxsackie and adenovirus receptor: CAR)を発現しており、CARを介してHAdVの感染が成立することが知られている²⁾。国立感染症研究所の示すHAdV検査・診断マニュアル³⁾において、A549細胞はHEp-2細胞、CaCo-2細胞、FL細胞及びHeLa細胞と比較して特にHAdVに対する感受性が高いとされており、臨床検体からのHAdVに汎用される細胞である。

また、流入水中のウイルス分離は、平成25年度から感染症流行予測調査事業のポリオウイルス感染源調査として行われている⁴⁾。しかしながら、ポリオウイルスを含めたエンテロウイルス(EV)が対象であるため、流入水からのHAdVの分離については、海外での環境水サーベイランスでは報告されているが^{5) 6)}、国内での報告は少ない⁷⁾。さらに、A549細胞は臨床検体に対する有用性は示されているが⁸⁾、流入水検体を用いた検討はほとんど報告がない。

そこで本研究では、環境中のHAdVの消長を把握することを目的とし、A549細胞による流入水からのHAdV分離を行った。

2 方法

検体は2014年4月から2015年3月までの期間において毎月1回、2箇所の終末処理場で採取された流入水合計24検体を用いた。流入水中のウイルス濃縮は国立感染症研究所が示す「ポリオウイルス感染症の実験室診断マニユア

ル」に準拠した。すなわち、流入水1Lを良く混和し、4℃で3000rpm、30分間遠心し、上清に塩化マグネシウムを添加、PH3.5に調整後、陰電荷フィルターにウイルスを吸着させ、10mLの3%ビーフェキストラクト存在下で誘出し、これをウイルス濃縮液とした。

A549細胞は5%ウシ胎児血清(Invitrogen, USA)存在下Dulbecco's MEM(Sigma-Aldrich)培地で培養した。96ウェルプレートにA549細胞を0.1mL播種後、濃縮液10μLを8ウェルずつ接種し、37℃で培養した。接種から10日後盲継代しさらに10日間観察し、細胞変性効果が見られたウェルの培養上清を分取した。さらに、既報^{9) 10)}を参考に表1に示すプライマー及びプローブを用い、HAdVはTaqMan Universal PCR Master Mix(Life technologies)により、EVはQuantiTect Probe RT-PCR Kit(QIAGEN)により、Stratagene MX3005PリアルタイムPCRシステム(Agilent Technologies)を用いて、培養上清からHAdV及びEVの検出を行った。ウイルス分離率は、接種数192ウェル(8ウェル×12ヶ月×2箇所の終末処理場)に対するHAdV及びEVの分離株数を分離率として算出した。

表1 HAdV及びEV検出プライマー・プローブセット

Virus	Primer or probe	Sequence (5'→3')
HAdV	AQ2	GCCCCAGTGGTCTTACATGCACATC
	AQ1	GCCACGGTGGGGTTCTAAACTT
	AP	FAM-TGCACCAGACCCGGCTCAGGTACTCCGA-TAMRA
EV	PCR-1	GCGATTGTCACCATWAGCAGYCA
	PCR-2	GGCCCCTGAATGCGGCTAATCC
	PanEV Probe	FAM-CCGACTACTTTGGGWTCCGTGT-BHQ1

3 結果及び考察

A549細胞を用いて流入水から分離されたHAdVは53株、EVは16株であった。各月毎の分離状況を図1に示した。

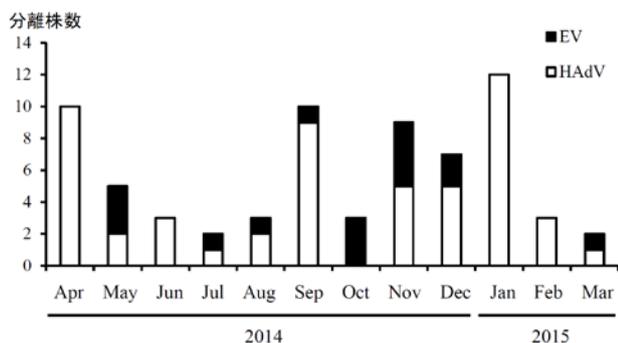


図1 分離株数の月別推移

A549 細胞によるウイルス分離率は 35.9%であった。また、HAdV が分離された 53 件のうち、4 件 (7.5%) からは HAdV に加えて EV が検出された。

FL 細胞及び RD-A 細胞を用いた福岡県におけるポリオウイルス感染源調査では、全国的な傾向¹¹⁾と同様に、2014 年 5 月から 11 月は流入水中から多くの CB が分離された (資料未記載)。A549 細胞が有する CAR は CB と HAdV の共通の受容体であるが、A549 細胞を用いてポリオウイルス感染源調査と同じ流入水検体からウイルス分離を行った結果、HAdV は 10 月を除く全ての月で分離され、EV よりも HAdV が多く分離された (図 1)。このことから、A549 細胞は CB 存在下であっても、HAdV を分離できることが示唆された。

流入水分離株について遺伝子解析または中和試験を行う際、1 つの分離株に 2 種類以上のウイルスが分離されている場合は解析が困難になることがある。FL 細胞及び RD-A 細胞を用いたポリオウイルス感染源調査において、HAdV 分離株から EV が検出された割合はそれぞれ 20.0%、10.8%であった (資料未記載)。このことから、A549 細胞による分離株を解析する場合、他の細胞より比較的容易に

(英文要旨)

Adenovirus isolation from sewage using an A549 cell line

Hideaki YOSHITOMI, Mitsuhiro HAMASAKI, Asako NAKAMURA and Nobuyuki SERA

Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,

Mukaizano 39, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan

Although the A549 cell line, a human lung carcinoma cell line, has been used successfully to isolate viruses from clinical specimens, few studies of virus isolation from sewage have been reported. A total of 24 sewage samples, collected between April 2014 and March 2015, were inoculated in A549. In total, 53 adenoviruses and 16 enteroviruses were isolated using the A549 cell line, yielding an isolation ratio of 35.9%. In four of the adenovirus positive samples, enteroviruses also were detected. Thus, we show that the A549 cell line is suitable for isolating adenoviruses from sewage, with a high sensitivity to epidemic enteroviruses.

[Key words; Adenovirus, A549 cell line, sewage]

行うことができることが示唆された。しかし、同一条件における他の細胞の HAdV 分離結果との比較、また、今回分離された HAdV の詳細な遺伝子解析については未実施であるため、今後も継続して検討を行う予定である。

4 まとめ

A549 細胞によって流入水検体から EV 存在下においても、HAdV を効率的に分離できた。A549 細胞は流入水中の HAdV の消長を調査するために有用であることが示唆された。

文献

- 1) D. J. Giard *et al.*: J Natl Cancer Inst., 51, 1417-1423, 1973.
- 2) D McDonald *et al.*: Gene Therapy, 6, 1512-1519, 1999
- 3) 咽頭結膜熱・流行性角結膜炎検査, 診断マニュアル(第 2 版), 国立感染症研究所, 平成24年5月
- 4) 平成26年度感染症流行予測調査実施要領
- 5) Fong TT. *et al.*: Appl Environ Microbiol., 76, 715-723, 2010
- 6) He JW1, Jiang S.: Appl Environ Microbiol., 71, 2250-2255, 2005
- 7) Haramoto E. *et al.*: Appl Environ Microbiol. 71, 2403-2411, 2005
- 8) Enomoto M. *et al.*: Jpn. J. Infect. Dis., 63, 338-341, 2010
- 9) Heim *et al.*: J Med Virol 2003;70, 228-239
- 10) Oberste MS. *et al.*: J Clin Virol., 49, 73-4, 2010
- 11) 伊藤ら, IASR, 35, 275-276, 2014