RS ウイルスの迅速な分離同定法

(二種細胞混合培養法および蛍光抗体法の併用)

茂田 士郎* 沼崎 義夫* 石田 名香雄**

RAPID ISOLATION AND IDENTIFICATION OF RS VIRUS BY MEANS OF MIXED TISSUE CULTURE AND IMMUNOFLUORESCENCE

Shiro Shigeta, Yoshio Numazaki and Nakao Ishida

Virus Laboratory, Sendai National Hospital and Department of Bacteriology,
Tohoku University School of Medicine, Sendai

[受付: 7月7日, 1966]

RS (Respiratory Syncytial) ウイルスが小児急性気道感染症の病原ウイルスとして重要な位置を占めることは Chanock²⁾ および Hilleman⁴⁾ 等により明らかにされたが、本邦における RS ウイルス感染症は、須藤等¹³⁾¹⁴⁾ によりその全貌が明らかにされた。

さて、RS ウイルスの初代分離を試みる場合、2つの条件が要求される。すなわち、RS ウイルスの検索を行うべき患者材料は、多くの場合他の呼吸器ウイルス (Myxoviruses, Adeno virus, Rhino virus 等) の検索も同時に行わねばならないので、分離に使用する細胞は RS ウイルスのみならず、他の呼吸器ウイルスに対しても高い感受性を示すことが望ましい。加えて臨床検査の本質からみて、分離同定は迅速であることが要求される。

この二つの要求を同時に満足させるために、数種の細胞系を用いて、RS ウイルスおよび他の呼吸器ウイルスの比較分離を試みると共に、Schieble 等¹²⁾ の報告した蛍光抗体法を用いての迅速同定法の追試も行い、HEp-2 および VERO 細胞の混合培養が所期の目的に合致するすぐれた方法であることを確認したので報告する。

材料と方法

1. 細胞

HEp-2 および VERO の cell line, 人胎児腎 (HEK) および肺 (HEL) 組織から得た Diploid cell, ならびにカニクイザル腎の初代細胞 (MK) を使用した。

HEp-2 および Diploid cell の growth medium には 15% 牛血清を加えた Eagle の minimum essential me-

dium (MEM) を、VERO 細胞の growth medium には、0.5% lactalbumin hydrolysate および 0.1% yeast extract を含む Earle's BSS (YLE) に 15% 牛血清を加えたものを、MK の growth medium には 0.5% lactalbumin hydrolysate を加えた Hank's BSS (LH) に 5% 牛血清を加えたものをそれぞれ使用した。

Maintenance medium には、すべて 2% の非働化牛血清を加えた MEM を使用した。

2. ウイルス分離材料および分離方法

使用した分離材料は昭和 40 年 10 月より 41 年 1 月までの間に、国立仙台病院小児科を訪れた急性気道感染症患児の咽頭ぬぐい液である。分離に使用した細胞は MK, HEL および HEK の混合培養 (HEF), HEp-2 および VERO の混合培養 (HV) の三系である。HEL および HEK は各々約 10^5 /ml の浮遊液を等量混合し、HEp-2 および VERO は前者は約 8×10^4 /ml, 後者は約 25×10^4 /ml の浮遊液を等量混合して、37°C で培養し 3 日目に使用した。材料の採取、保存、および分離方法については別報の方法¹⁴⁾に従った。

3. 抗血清

RS ウイルス Long 株を用いて、モルモットを一回鼻かがせ免疫し、3 週後に採血して血清を分離した。中和抗体価は 128 倍あり 56°C 30 分非働化後、最終稀釈濃度 16 倍で使用した。

4. 蛍光抗体および染色方法

蛍光抗体は、新鮮なモルモットの補体で免疫したウサギの γ -グロブリンに、fluorescein isothiocyanate を結合させたもので、F/P ratio 2.9×10^{-3} , 1.65mg Protein/ml

* 国立仙台病院ウイルスセンター

** 東北大学医学部細菌学教室

のものを 0.01 モル PBS (pH 7.2) で 3.3 倍に稀釈し、実験に使用した。

材料接種後、一定時間を経たカバースリップ培養細胞を取り出し、magnetic stirrer を用いて、0.01 モル PBS の中で 10 分間、よく洗ったのち、濾紙で水分を吸収し、乾燥せず直ちに、アセトンで室温 10 分間固定した。染色方法は補体法である。方法の詳細は、石田等⁹⁾の記載に従った。

成 績

1. 咽頭ぬぐい液からのウイルス分離

62 件の咽頭ぬぐい液を、(1) HEp-2 および VERO の混合培養 (HV)、(2) HEL および HEK の混合培養 (HEF)、(3) MK、の三種類の細胞系に、同時に接種してウイルス分離を試みた。

Table 1 Positive isolation from 62 throat swabs in several tissue cultures

Isolates	HEp-2+ VERO	Monkey kidney	Human diploid*	Total
RS	8	8	7	8
Adeno	9	5	10	13
Entero	1	0	2	2
Parainfluenza Type-2	3	7	0#	7
Total	21	20	19	30

* Human embryonal kidney and lung

Hemadsorption test was not done

表 1 に示す如く、62 件の分離材料から RS ウイルス 8 株、アデノウイルス 13 株、パラインフルエンザ 2 型 7 株、および未同定のエンテロウイルス 2 株、計 30 株のウイルスを分離したが、3 つの細胞系における分離の内訳は、アデノウイルスは HV で 9 株、HEF で 10 株、MK で 5 株分離され、HV、HEF に比べて MK での分離率が低い。パラインフルエンザ 2 型の場合は HV で 3 株、MK で 7 株分離されたが、HEF では Hemadsorption を行わなかったため 1 株も分離されず、MK による分離率が最も高かった。

Table 2 Time required for detection of RS virus by cytopathic effect

Cells	Days following inoculation of throat specimens until first cytopathic change								
	3	4	5	6	7	8	9	10	11
HEp-2+VERO		1	3		4				
Human diploid*					4	2	1		
Monkey kidney					1		3	3	1

* Human embryonal kidney and lung

これに反し RS ウイルスは、分離の数に於いては、用いた三系の細胞の間に全く差がみとめられなかった。但し CPE 出現迄の日数をみると、三者の間に明らかな差があり、第 2 表に示した様に、HV が最も早く、7 日以内ですべての分離ウイルスは、syncytium 形成による明瞭な CPE を示すが、HEF および MK では、CPE を認めるのに 7 日以上を要し、CPE も HV に比べて不明瞭であつた。

2. 蛍光抗体法による RS ウイルスの同定

初代分離で HV 細胞に syncytium を形成した 5 株の分離ウイルスを HEp-2 細胞のカバースリップに接種し、充分 syncytium が出現した時に、抗 Long 株モルモット血清を用い蛍光抗体染色を施した。

結果は第 3 表の如くであり、No. 730 を除く 4 株は Long 株と同様に syncytium は特異な蛍光を示したが、

Table 3 Identification of RS virus by immunofluorescent technique

Strain	Specific fluorescence	Hemadsorption
392	+	—
730*	—	+
732	++	—
746	++	—
785	+++	—
RS Long	+++	—
Parainfluenza Type-2 Greer	—	+

* 730 was identified as type 2 parainfluenza virus

No. 730 およびパラインフルエンザ 2 型 (Greer) は全く特異蛍光を示さなかった。No. 730 は HI 反応によりパラインフルエンザ 2 型と同定された。

3. 蛍光抗体法による迅速同定

既に RS ウイルスと同定された咽頭ぬぐい液の原材料を、再び HEp-2 細胞のカバースリップおよびチューブに接種し、33°C に静置培養して、カバースリップには蛍光抗体染色を施し、チューブは CPE を観察した。

その結果は図 1 に示す如く、接種後 24 時間で特異的

(a)

(b)

Fig. 1 Fluorescent antibody staining of RS virus infected cells.

- At 24 hours after inoculation of throat specimens.
- At 48 hours after inoculation of throat specimens. Infected cells are connected with long cytoplasmic processes.

な蛍光を示す感染細胞が見出され、48時間後には2乃至5コの細胞からなる syncytium が、72時間後には5乃至15コの核を含む syncytium が見られ、いずれも特異蛍光を発していることが示された。

各症例についての結果をまとめたものが表4である。接種後24時間では6例中5例が特異的な蛍光を示し、48時間後には全例において特異蛍光を認めた。

分離株ウイルスによる感染細胞はいずれもその細胞質内にウイルス抗原を持ち、細胞表面より細かい突起を出して、その突起の中までウイルス抗原で充たされていること、syncytium の細胞質もウイルス抗原で充たされ、中には細長い突起で細胞間が連結しているものがあることなど、RS Long 株による蛍光抗体染色の所見⁸⁾¹²⁾ とほぼ同様であった。

表4に示す如くウイルス接種後24時間と48時間とで

Table 4 Detection of RS virus infected cell by immunofluorescence and CPE

Isolates	Fluorescent cell (syncytium) by immunofluorescence			Days required for detection of apparent CPE
	at 24 hr.	48 hr.	72 hr.	
1270	++*	##(++)	##(++)	7
1351	+	++(+)		6
1373	—	+(-)		6
1393	+	++(+)		6
1404	+	##(++)	##(++)	7
1420	+	++(+)	++(+)	9

* Number of specific fluorescent cell per cover slip
+ 1-10 ++ 10-100 ##100-

は、蛍光細胞の数に著しい差がみられ、明らかにウイルス増殖による二次感染のあったことを示しているが、興味ある所見は infectious focus が密集していることである。同時に行なつた RS ウイルス Long 株による二次感染の focus はカバースリップ上に広範囲に散在し、syncytium の発展も速い様である。

考 察

従来 RS ウイルスの分離には Chang liver cell¹⁰⁾, Bristol HeLa cell⁹⁾, HEp-2 cell²⁾ 等が用いられ、近年に至り monkey kidney cell¹⁷⁾, human diploid cell¹¹⁾ の優秀性が報告されているが、我々は HEp-2 および VERO 細胞の混合培養という系が、CPE の出現する速さと、明瞭さにおいて、monkey kidney cell および human diploid cell より秀れていることを認めた。この細胞系は RS ウイルスのみならず、アデノウイルス、パラインフルエンザウイルスにも良い感受性を示し、呼吸器ウイルスは分離に適したものと考えられる。

ウイルス感染症の早期診断に蛍光抗体法を応用することは、一つは生体よりの脱落細胞を掴えること⁵⁾⁹⁾¹⁵⁾, 他の一つは、ウイルスの初代分離に際して感染細胞を早く見つけ出すこと⁷⁾¹¹⁾¹⁶⁾ でいろいろと試みられている。前者は、早期診断という点では理想的であるが、なお未だ sensitivity, specificity および技術的な面に問題がある。我々は後者の方法に従つて、カゼという雑多な病原を持つ疾患群の中から、RS ウイルスによる感染症を材料接種後24時間という比較的早期に、しかも確実に診断することが出来た。24時間では不明瞭な場合でも、48時間後に syncytium の形成される時期になれば、確実に診断し得る。この方法によれば、通常の CPE 検出によるウイルス分離、および同定による診断を約10日短縮することが出来る。

結 論

1) HEP-2 および VERO 細胞の混合培養, 人胎児二倍体細胞, 初代猿腎細胞の三系を用いて呼吸器ウイルスの比較分離を行った結果, RSウイルスの分離には HEP-2 および VERO 細胞の混合培養が, CPE の出現が速くしかも明瞭であつて, 他の二系の細胞よりすぐれている。

2) 蛍光抗体補体法を用いることにより, 咽頭ぬぐい液の接種後 24 時間で, RS ウイルスを同定することが出来た。

Summary

A simple and sensitive isolation procedure for respiratory viruses and a rapid identification of these isolates were intended.

RS virus was isolated more easily and rapidly by using mixed culture of HEP-2 and VERO cells rather than primary monkey kidney or human diploid cell cultures.

By means of immunofluorescent staining, identification of RS virus was possible within 24 to 48 hours postinoculation. Whereas, apparent CPE was not detectable until 6 to 9 days.

文 献

- 1) Anderson, J. M. and Beem, M. D. (1966) : Use of human diploid cell culture for primary isolation of respiratory syncytial virus. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 121, 205-209.
- 2) Chanock, R. M., Kim, H. W., Vargosko, A. J., Delewa, A., Johnson, K. M., Cumming, C. and Parrot, R. H. (1961) : Respiratory syncytial virus. 1 Virus recovery and other observations during 1960 outbreak of bronchitis, pneumonia, and minor respiratory diseases in children. *J. A. M. A.* 176, 647-653.
- 3) Hamparian, V. V., Ketler, A., Hilleman, M. R., Reilly, C. M., McClelland, L., Cornfeld, D. and Stokes, J. Jr. (1961) : Studies of acute respiratory illnesses caused by respiratory syncytial virus. Laboratory finding in 109 cases. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 106, 717-722.
- 4) Hilleman, M. R., Hamparian, V. V., Ketler, A., Reilly, C. M., McClelland, L., Cornfeld, D. and Stokes, J. (1962) : Acute respiratory illness among children and adults. *J. A. M. A.* 180, 445-453.
- 5) 日沼頼夫, 沼崎義夫 (1962) : 蛍光抗体法による

ウイルス感染症の診断, 小児科臨床, 15, 887-894.

- 6) 石田名香雄, 日沼頼夫, 宮本勉 (1962) : 蛍光抗体法の実験 (II). *臨床病理*, 10, 60-66.
- 7) Kalter, S. S., Hatch, M. H. and Ajello, G. N. (1959) : The laboratory diagnosis of poliomyelitis with fluorescent antibodies. *Bact. Proc.* 89-90.
- 8) Kisch, A. L., Jhonson, L. M. and Chanock, R. M. (1962) : Immunofluorescence with respiratory syncytial virus. *Virology* 16, 177-189.
- 9) Liu, C. (1956) : Rapid diagnosis of human influenza infection from nasal smears by means of fluorescein labelled antibody. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 92, 833-887.
- 10) Morris, J. A., Blount, R. E. Jr. and Savagem, R. M. (1956) : Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc. Soc. Biol. and Med.* 92, 544-549.
- 11) Schieble, J. H., Lenmetem, E. H. and Kase, A. (1965) : An immunofluorescent staining method for rapid identification of respiratory syncytial virus. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 120, 203-208.
- 12) 茂田士郎, 日沼頼夫, 須藤恒久, 石田名香雄 (1964) : RS ウイルスの HEP-2 細胞感染の蛍光抗体法による解析, 第 12 回日本ウイルス学会総会で発表.
- 13) Suto, T., Yano, N., Ikeda, M., Miyamoto, M., Takai, S., Shigeta, S., Hinuma, Y. and Ishida, N. (1965) : Respiratory syncytial virus infection and its serological epidemiology. *Amer. Jour. Epid.* 82, 211-224.
- 14) 須藤恒久, 矢野南己男, 池田まり, 宮本操子, 高井莊次, 茂田士郎, 日沼頼夫, 石田名香雄 (1964) : 本邦における RS (Respiratory Syncytial) ウイルス 感染症—小児急性気道感染症よりのウイルス分離とその臨床像—日本医事新報, 2094, 13-16.
- 15) Tateno, I., Suzuki, S., Kawamura, H., Kusano, N., Aoyama, Y., Sugiura, A., Akao, Y., Oikawa, K., Homma, N. and Naito, M. (1962) : Diagnosis of influenza by means of fluorescent antibody technique. *Jap. Jour. Exper. Med.* 32, 531-559.
- 16) Weller, T. H. and Coons, A. H. (1954) : Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 86, 789-794.
- 17) Wulf, H., Kidd, P. and Wenner, H. A. (1964) : Respiratory syncytial virus: Properties of strain propagated in monkey kidney cell cultures. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 115, 458-462.