

A hydroxypropyl methylcellulose plaque assay for human respiratory syncytial virus

J Virol Methods. 2022; June 304: 114528.

DOI: 10.1016/j.jviromet.2022.114528

Takumi-Tanimukai Y, Yamamoto S, Ogasawara N, Nakabayashi S, Mizuta K, Yamamoto K, Miyata R, Kakuki T, Jitsukawa S, Sato T, Tsutsumi H, Kojima T, Takano K, Yokota S

要旨 ウイルスの研究において感染性のあるウイルス粒子を正確に定量することは、病原性の評価のみならずウイルスに対する新規治療薬の効果を客観的に評価するために極めて重要な手技である。プラークアッセイ法はウイルス粒子を定量するために不可欠な技術であるが、Respiratory syncytial virus (RSV) において、プラークアッセイ法を安定して行うことはしばしば困難である。今回我々は、overlay material (充填化合物) が細胞増殖に与える影響を中心に RSV および human metapneumovirus (hMPV) におけるプラークアッセイ法の最適化の検討を行った。

【背景】

プラークアッセイ法は、生きたウイルスを定量できる唯一の方法であり、その最適な方法は細胞やウイルスの種類によって異なる。

Respiratory syncytial virus (RSV) は、1歳以内の小児における下気道感染の主要原因である¹⁾。現時点で、RSV に対するワクチンや治療薬は、抗 RSV F モノクローナル抗体 (Palivizumab) 以外には存在しない。開発薬剤の有効性の適正な評価には、感染性粒子の正確な定量を行うことが不可欠であるが RSV では形成されるプラークが小さく不明瞭で数の計測が難しいため、定量がこれまで困難であった²⁾。

主に食品添加物として開発されてきたセルロース誘導体³⁾は、プラークアッセイ法における充填化合物として汎用されてきた。50-60度での溶解と染色前に剥がす作業が必要なアガロースよりも使い勝手が良く、含有培地の調製が簡便である^{2) 3)}。そのなかで汎用されているのは Carboxymethyl cellulose sodium salt (CMC) であるが、Microcrystalline cellulose (MCC; Avicel®)⁴⁾を含むいくつかの新しいセルロース誘導体があり、充填化合物として注目されている。本研究では、RSV および同科の human metapneumovirus (hMPV) のプラークアッセイ法の最適化を試みた。

【方法】

RSV は RSV long (genotype A), CH18537 (genotype B) を使用し、培養には HEp-2 細胞を用いた。hMPV は臨床分離株 (GenBank : AB251516)

を使用し、hTMPRSS2 発現 VERO-E6 細胞で培養した。充填化合物として CMC, Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC), MCC, Hydroxyethyl cellulose (HEC) を検討した。

まず、各セルロース誘導体を細胞に充填した後の細胞数を測定し、加えてスクラッチアッセイを行った。次に細胞播種 24 時間後にウイルス接種を行い至適濃度に調整した各化合物を充填した。培養後、ホルマリン固定しクリスタルバイオレットで染色し、プラーク数を計測し、その性状を観察した。RSV は 6 日間、hMPV は 7 日間培養した。

統計学的解析は Brown-Forsythe 検定、また Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて、one-way ANOVA で分析し、Holm-Sidak's post-test で群間比較を行った。p 値が 0.05 未満の差を有意とみなした。

【結果】

1. セルロース誘導体が細胞増殖に及ぼす影響

培養 6 日目に CMC, HEC, MCC で細胞増殖が抑制されたが HPMC は全ての濃度で培地と同等の細胞増殖を示した。

MCC は不溶性で充填後に細胞を観察できないためスクラッチアッセイから除外したが、CMC, HEC と比較して HPMC 存在下ではスクラッチ後の細胞移動距離が有意に増加していたため、HPMC は細胞増殖への影響が少ないことが明らかとなった (Fig. 1A)

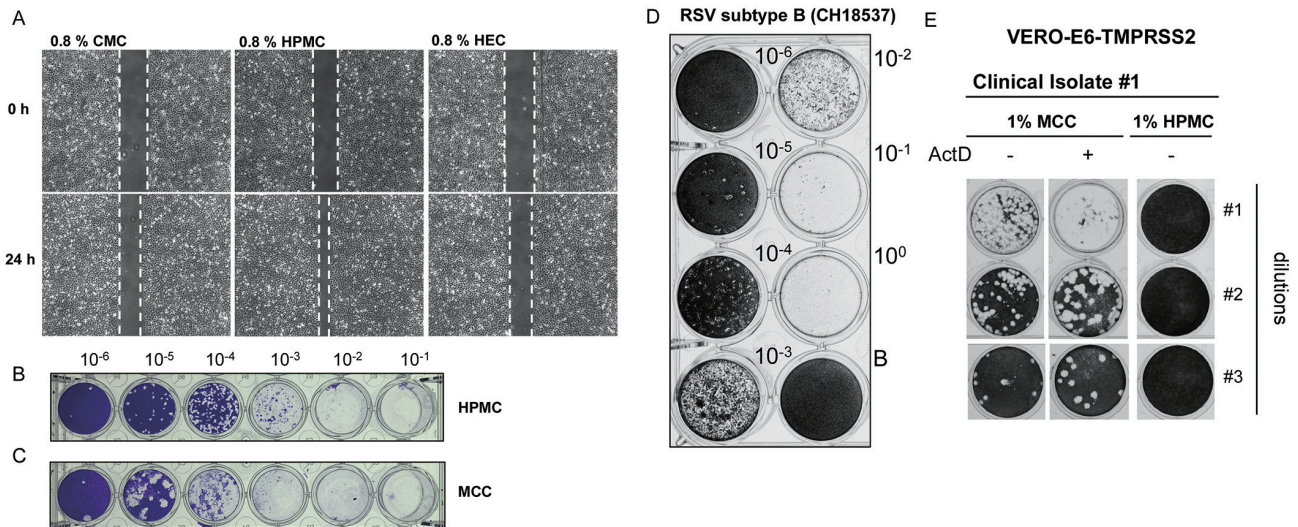


Fig. 1. (A) 0.8 % CMC, HPMC, HEC 存在下でのスクラッチ後 0 時間 (上段) および 24 時間 (下段) の HEp-2 細胞. 白い破線は細胞単層の両端を示す. (B) 0.6 % (w/v) HPMC および (C) 1.0 % (w/v) MCC 存在下での RSV Long の連続 10 倍希釈液を感染させた HEp-2 細胞のプラーク. (D) 0.6 % (w/v) HPMC 存在下での RSV CH18537 株の連続 10 倍段階希釈液を感染させた HEp-2 細胞のプラーク. (E) 1 % (w/v) MCC, 1 % (w/v) HPMC 存在下, さらに 50 nM actinomycin D (ActD) 存在下での hMPV 臨床分離株の連続 10 倍段階希釈液 (#1 - 3) を感染させた hTMPRSS2 発現 VERO-E6 細胞のプラーク.

2. RSV および hMPV におけるプラークアッセイ法

RSV Long 株を使用したプラークアッセイ法では 1.0% (w/v) MCC と比較して 0.6 % (w/v) HPMC 存在下において, 最も明瞭で計測可能なプラークが観察された (Fig. 1B,C). また, RSV CH18537 株においても同条件下で辺縁明瞭なプラークが観察された (Fig. 1D).

RSV とは異なり, 臨床分離 hMPV を使用したプラークアッセイ法では 1 % (w/v) MCC の条件で辺縁明瞭なプラークが形成された (Fig. 1E).

【考察】

HEp-2 細胞を用いた RSV のプラークアッセイ法の最適化を行った.

従来法のアガロース²⁾ では手技が煩雑であり, 代替として CMC は最も汎用されているが^{4), 5)}, 粘性が高く³⁾ 今回の検討では HEp-2 細胞の増殖を妨げた. また不溶性の MCC は培養中の観察が困難であり, MCC と HEC では長期培養において HEp-2 細胞の増殖を阻害したことから, 6 日間の HEp-2 細胞培養を要する本方法では MCC や HEC において細胞障害が目立つと考えられた. 一方で SARS-CoV-2 など, 他の細胞やウイルスでは MCC が適切な充填化合物であることが報告されている⁵⁾. 本研究においては, hMPV が hTMPRSS2 発現 VERO-E6 細胞では 1 % (w/v) MCC で明瞭なプラークを形成した (Fig. 1E). 従って, 最適な充填化合物はウイルスや細胞, 必要細胞培養日

数によって大きく異なることが示された.

結論として, 0.6 % (w/v) HPMC は, HEp-2 細胞を用いた RSV のプラークアッセイ法において最適な充填化合物であることが明らかとなった.

参考文献

- Shi T, and RSV Global Epidemiology Network, et al. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *Lancet* 2017; 390: 946-958.
- McKimm-Breschin JL. A simplified plaque assay for respiratory syncytial virus—direct visualization of plaques without immunostaining. *J Virol Methods* 2004; 120: 113-117.
- Nemazifard M, Kavooosi G, Marzban Z, Ezedi N. Physical, mechanical, water binding, and antioxidant properties of cellulose dispersions and cellulose film incorporated with pomegranate seed extract. *Int J Food Prop* 2017; 20 (sup2): 1501-1514.
- Herzog P, Drosten C, Müller MA. Plaque assay for human coronavirus NL63 using human colon carcinoma cells. *Virology* 2008; 5: 138. doi: 10.1186/1743-422X-5-138
- Jureka AS, Silvas JA, Basler CF. Propagation, inactivation, and safety testing of SARS-CoV-2. *Viruses* 2020; 12: 622. doi: 10.3390/v12060622.

谷向 由佳

略歴

2018年3月 札幌医科大学医学部 卒業

2018年4月～2019年3月 小樽市立病院初期臨床研修

2019年4月～2020年3月 札幌医科大学附属病院初期臨床研修

2020年4月～ 札幌医科大学附属病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科

受賞歴

2022年4月 第2回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会

奨励賞応募演題 会長賞 受賞