

原 著

スフェロイド培養法による牛糞便からの
ロタウイルスCの分離大竹 祥紘[†] 米 山 州 二

栃木県県央家畜保健衛生所（〒321-0905 宇都宮市平出工業団地 6-8）

（2020年1月25日受付・2020年3月19日受理）

要 約

3次元的な細胞コロニーであるスフェロイドは、2次元的な接着培養に比べ生体に近い環境での培養が可能である。獣医学領域においては本手法をウイルス分離へ応用した例はないため、分離困難と考えられているロタウイルスC (RVC) の特異遺伝子を検出した牛由来の糞便5検体を用い、接着培養及びスフェロイド培養の分離結果を比較した。接着培養ではいずれの検体もRVCの分離には至らなかったが、スフェロイド培養では5検体中3検体でRVCの分離に成功した。また、検体接種の時期をスフェロイドの形成前後で比較したところ、形成前に接種した方が高率に分離可能で、本法を実施するにはスフェロイド形成前に検体を接種することが重要と考えられた。国内でのRVC分離例は2例のみであり、本法は分離が困難とされてきたウイルス種の確保に有用であると考えられた。

—キーワード：ロタウイルスC, スフェロイド, 3次元培養。

-----日獣会誌 73, 443~448 (2020)

従来のウイルス分離には、静置培養や回転培養など、プラスチック容器やガラス容器に単層の細胞シートを形成させる2次元接着培養がおもに用いられてきた。しかし、生体内では多くの細胞が他の細胞や細胞外マトリックスにより3次元的に囲まれており、接着培養のような2次元的な条件では生体環境を十分に再現しているとは言い難い。一方、3次元的な細胞コロニーであるスフェロイドは血管系の発達こそないが、接着培養と比較した場合、多次元構造の形成、細胞間結合が広く認められること、栄養や代謝物の濃度勾配が不均一であること、細胞の寿命が長くなること、タンパク質や遺伝子などの発現プロファイルが異なることが報告 [1-4] されており、より生体環境に近い条件での培養が可能である。このような特性から、本培養技術は創薬などの分野において幅広く用いられているが [5, 6]、現在のところ獣医学領域での使用例は乏しく、ウイルス分離に応用した報告はない。

ロタウイルスC (RVC) は成牛の下痢の原因病原体として知られており [7]、わが国の牛群でも広く浸淫し、本ウイルスを原因とした下痢症は散発的に発生が認めら

れている [8, 9]。一方、牛由来の糞便からのRVCの分離に至った報告は国内で1例のみであることから [8]、分離が非常に困難なウイルスとして認識されている。

そこで、今回、スフェロイド培養のウイルス分離への応用の可能性を検討すべく、RVCを標的としてスフェロイド培養法と従来の接着培養法にてウイルス分離を実施し、両者の成績を比較した。その結果、従来法に比べスフェロイド培養法ではRVCの分離率が大きく向上したのでその概要を報告する。

材料及び方法

検査材料：2016年度に採取した牛由来の糞便の中から、逆転写PCR (RT-PCR) にてRVCの特異遺伝子を検出した5検体を選出した。当該糞便について、Eagle's minimum essential medium培地で10%乳剤にした後、20,000×gで10分間遠心 (自然減速) して上清を回収し、ふたたび同条件で遠心及び上清の回収を行った。回収した糞便乳剤上清に、最終濃度が10 μ g/mlとなるようにトリプシン (Trypsin (1 : 250) Powder, Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) を添加し、37°Cで1時間処理し

[†] 連絡責任者(現所属)：大竹祥紘 (日本ハム(株)中央研究所)

〒300-2646 つくば市緑ヶ原3-3

☎ 029-847-7811 FAX 029-847-7902

E-mail : y.otake@nipponham.co.jp

たものを検査材料とした。

遺伝学的検査：RVCを標的としたRT-PCRは、既報[10, 11]に準じて実施した。

培養細胞：接着培養（静置及び回転培養）及びスフェロイド培養によるウイルス分離並びに間接蛍光抗体法（IFA）は、いずれもアフリカミドリザル胎子の腎臓由来株化細胞であるMA104細胞を用いた。

IFA：細胞変性効果（CPE）を認めた培養細胞を、80%アセトンで固定し、PBSで3回洗浄後、抗RVC抗体としてRVC感染耐過牛血清を感作させ37℃で1時間反応させた。その後、細胞をPBSで3回洗浄し、FITC標識2次抗体を感作させ37℃で30分間反応させた。さらにPBSで3回洗浄した後、蛍光顕微鏡にて特異蛍光を観察した。

静置培養：24wellの細胞培養プレート（培養面積：186mm²）に細胞を播種後、37℃で24時間培養（表1）、フルシートしたことを確認し、Dulbecco's Modified Eagle's Medium（DMEM）培地で2回洗浄後に、各検体を150μlずつ4wellに接種し、15分間隔でティルティングを行いながら37℃で1時間培養した。その後検体を回収し、DMEM培地で2回洗浄後、各wellに1.5mlのDMEM培地（1μg/mlトリブシン含）を添加し、37℃で7日間培養した。ウイルス増殖の判定は顕微鏡観察下による細胞変性効果（CPE）の確認により実施した。ウイルス接種から7日間を経てもCPEを確認できない場合は、培養細胞及び培養液を-80℃で2回凍結融解し、1,000×gで10分間遠心後の上清150μlをふたたび細胞に接種し、さらに7日間培養することを4代繰り返した。また、継代ごとに培養上清についてRVCを対象としたRT-PCRを行った。

回転培養：小試験管に細胞を播種後、37℃で24時間培養（表1）、シートしたことを確認し、DMEM培地で2回洗浄後、各検体を100μlずつ4本に接種し、37℃で1時間回転培養した。その後検体を回収し、DMEM培地で2回洗浄後、1mlのDMEM培地（1μg/mlトリブシン含）を添加、37℃で7日間回転培養を行い、静置培養と同様の継代、継代毎のCPE確認及びRT-PCRを行った。

スフェロイド培養（方法1）：市販キット（Cultrex® 3D Spheroid Colormetric Proliferation/Viability Assay, Trevigen Inc, U.S.A.）を用いて実施した。DMEM培地に対し、培養時の最終濃度が10%となるように牛胎子血清（FBS）及び同キット付属の細胞外マトリックス（ECM：Cultrex® 10X Spheroid Formation ECM, Trevigen Inc, U.S.A.）を添加したものを細胞培養液とし、細胞を懸濁した。その後、本キット付属の96wellの細胞培養プレートに、1well当たり3,000個の細胞となるように30μlの細胞培養液と検体20μlを同時

表1 培養操作開始時の培養液の組成

組成	静置培養		回転培養		スフェロイド培養	
	細胞培養	ウイルス分離	細胞培養	ウイルス分離	方法1	方法2
DMEM (μl)	900	1,500	900	1,000	20	40
FBS (μl)	100	—	100	—	5	5
トリブシン (μg/ml)	—	1	—	1	—	—
ECM (μl)	—	—	—	—	5	5

方法1

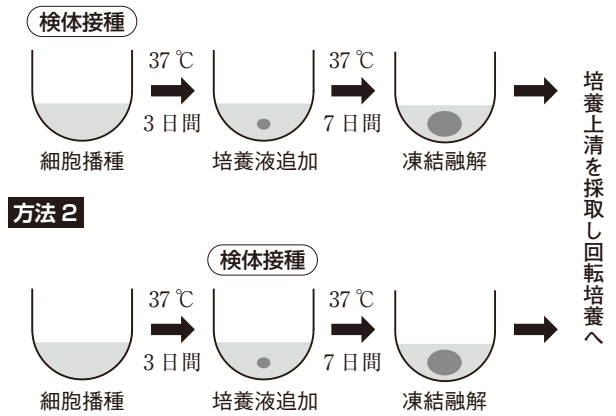


図1 各方法における細胞と検体接種時期

に接種した（表1、図1）。なお、1検体につき3well、計15wellに接種した。また、スフェロイドの形成を確認するため、検体未接種の陰性対照を10well用意した。37℃で3日間の培養後、スフェロイドの形成を確認し、37℃に加温したDMEM培地（10% FBS含）を1well当たり50μl添加した。さらに7日間培養を継続し、スフェロイドの形態を保っていた検体は、従来法と同様に凍結融解及び遠心分離し、その上清全量を回転培養に供し、37℃で7日間培養した。接種から7日間を経てもCPEを確認できない場合は、培養細胞及び培養液を-80℃で2回凍結融解し、1,000×gで10分間遠心後の上清100μlをふたたび細胞に接種し、さらに7日間培養することを4代繰り返した。なお、回転培養時にCPEを確認した際には、回収した培養上清についてはRT-PCRで、培養細胞については間接蛍光抗体法（IFA）でRVCの存在を確認した。また、陰性対照としたwellは、最大で14日目まで培養を継続した。

スフェロイド培養（方法2）：培養液の調整までは方法1と同様に実施した。1well当たり3,000個の細胞となるように50μlの培養液を接種（表1）、37℃で3日間培養した。その後、スフェロイドの形成を確認し、37℃に加温したDMEM培地（10% FBS含）を1well当たり30μl、検体を20μlずつ3wellに接種した（図1）。そ

表2 スフェロイド形成に至った検体数

検体 No.	スフェロイド形成	
	方法1	方法2
1	3/3	3/3
2	2/3	3/3
3	2/3	3/3
4	3/3	2/3
5	2/3	2/3
NC	10/10	10/10

※ NC：陰性対照

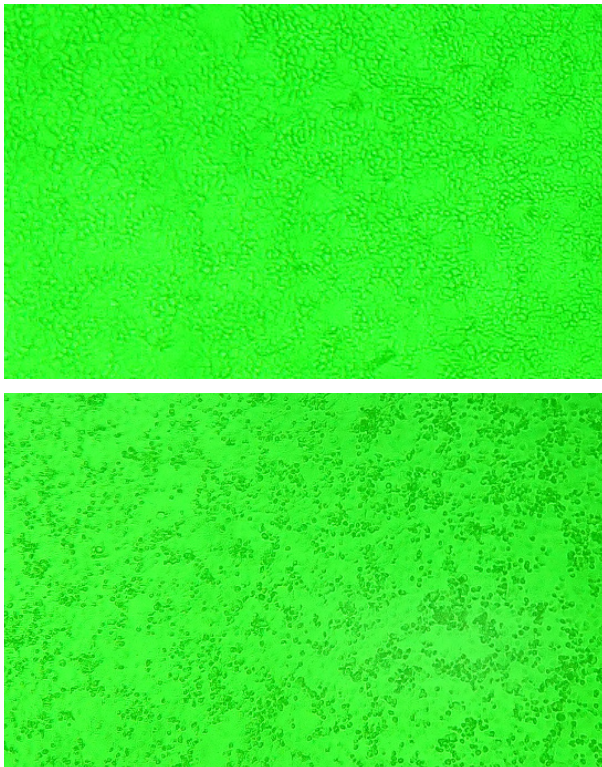


図2 RVCによるCPEを認めたMA104細胞（画像は回転培養時の観察像）
 上図：正常細胞
 下図：CPEを認めた細胞（RVC接種後4日目）

の後、方法1と同様に陰性対照wellの接種、回転培養による継代及び抗原の確認を行った。

成 績

静置培養及び回転培養：いずれの検体においてもCPEは認めず、RT-PCRもすべて陰性であった。

スフェロイド培養（方法1）：3検体（No. 2, 3, 5）を接種したwellでは、それぞれ1wellがスフェロイドの形成に至らなかった（表2）。その後の回転培養では、No. 3では2本中1本で、No. 4, 5ではすべての小試験管で培養3代目までにCPEを認めた。これらCPEを認めた検体は、RT-PCR, IFAともにすべて陽性となっ

表3 各検体の抗原判定方法と陽性検体数

検体 No.	判定方法					
	方法1			方法2		
	CPE	IFA	PCR	CPE	IFA	PCR
1	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
2	0/2	0/2	0/2	0/3	0/3	0/3
3	1/2	1/2	1/2	0/3	0/3	0/3
4	3/3	3/3	3/3	0/2	0/2	0/2
5	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2

※本結果はスフェロイド培養後の回転培養時のものであり、スフェロイド形成に至らず回転培養に供することができなかった検体は除外した

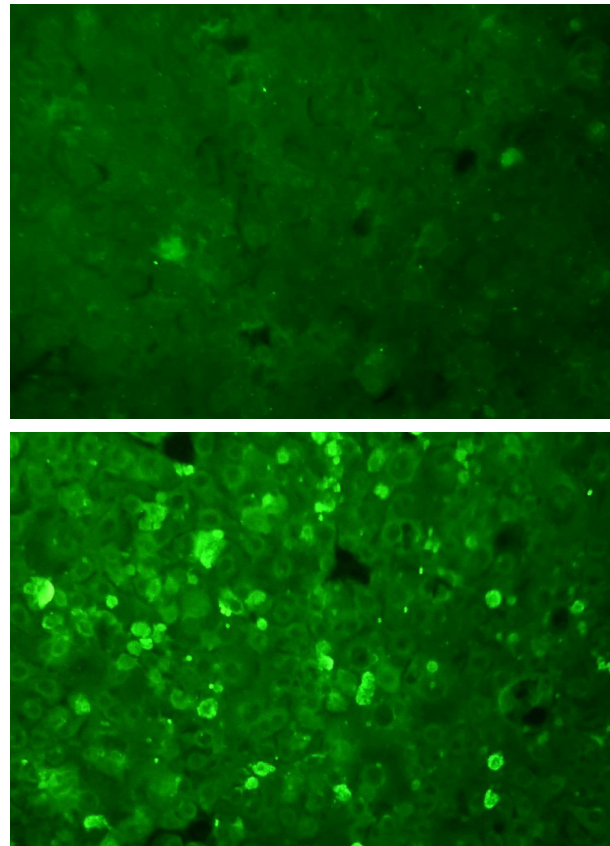


図3 RVCを対象としたIFAにて蛍光を認めたMA104細胞（画像は回転培養時の観察像）
 上図：正常細胞
 下図：IFA陽性細胞（RVC接種後2日目）

た（表3, 図2, 図3）ことから、RVCの分離に至ったと判定した。また、本法によって分離したRVCは静置培養でも増殖可能であった。さらに、これらRVCの分離に至った検体は、スフェロイド培養中、成長過程や形態において、陰性対照との差異や、CPEも認めなかった。

スフェロイド培養（方法2）：2検体（No. 4, 5）を接種したwellでは、それぞれ1wellがスフェロイドの形成に至らなかった（表2）。その後の回転培養において

は、いずれの検体にもCPEを認めず、PCR、IFAもすべて陰性であった(表3、図2、図3)ことから、RVCの分離には至らなかったと判定した。なお、方法1及び2とも、検体を接種しなかった陰性対照のwellでは、培養3日目までにはすべてのwellで細胞のスフェロイド形成を確認することができ、計14日間の培養期間中に崩壊するようなものは認められなかった。

考 察

スフェロイド培養のウイルス分離への応用性を検討するため、分離が非常に困難とされているRVCを対象として、従来の接着培養及びスフェロイド培養を経た接着培養によるウイルス分離を実施した。その結果、接着培養のみではまったくウイルス分離に至らなかったのに対し、スフェロイド形成前に細胞と同時に検体を接種した方法1では、5検体のうち3検体でRVCの分離に成功し、その分離率は大きく向上した。一方、スフェロイドの形成後に検体を接種した方法2では、いずれの検体もRVCの分離には至らなかった。

今回、静置培養をする際にはトリプシン濃度 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ で検体処理及び細胞への感作を行ったが、既報[8]では $100\mu\text{g}/\text{ml}$ での処理を行った際にRVCの分離に至ったとされている。ロタウイルスは、トリプシン処理を施すことでVP4がVP5及びVP8に開裂し、感染能力が増すことが報告されている[12, 13]。今回用いたMA104細胞は、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ での処理を行った際にはウイルス分離を継続することが困難であったため、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ にて処理を行ったが、この濃度の差異が静置培養への分離率への低さに影響を与えている可能性が考えられた。また、スフェロイド培養の方法1, 2間にも分離率の差異を認めた。*in vitro*におけるロタウイルスA(RVA)の接種試験では、基底膜側から効率的に感染するという報告[14]や、細胞間の結合を破壊することでレセプターへの結合が促進されるという報告[15]があり、後者の報告は、既報[8, 12, 13]のトリプシン処理による分離率及び感染能力の向上を支持するものと考えられる。これらのことから、RVCにおいても、分化した管腔側よりも、基底膜側から効率に感染している可能性が考えられ、スフェロイドを形成し、極性を持った細胞(方法2)よりも、未分化かつ分散している状態の細胞(方法1)の方で効率的に感染増殖した可能性が考えられた。いずれにせよ、本法によるRVCの分離を試みる上では、スフェロイドが形成されるより前に、細胞と検体を同時に接種することが重要と考えられた。

陰性対照wellにおいては、方法1, 2ともにすべてのwellでスフェロイドの形成を確認でき、形成に至らなかったものや、培養中に崩壊したものは認められなかった。このことから、MA104細胞については、今回検証

した培養条件が適していると考えられた。また、今回は適切な培養期間についての検討は行っていないものの、陰性対照wellでは接種後14日目まで培養を継続してもスフェロイドの形態は保たれており、既報[2]のとおりに長期間の培養も可能であると考えられた。

一方、検体として糞便を接種した場合、方法1では3検体で、方法2では2検体でスフェロイドの形成に至らない、あるいは培養中にスフェロイドが崩壊してしまった。本法の手法上、検体接種後に細胞を洗浄することは困難なため、ウイルス分離にスフェロイドを用いる場合には、検体の種類や状態並びに分離対象とするウイルス種によって接種well数を増やすか、メンブランフィルターや有機溶剤等による処理が必要と考えられた。

今回の結果から、ウイルス分離の際には接着培養法での分離を実施する前に、スフェロイド培養を実施することで分離率を向上させることが可能で、分離が困難とされるウイルス種の確保に大きく貢献することが可能と思われた。今回はMA104細胞及びRVCのみでの検証であるが、牛胎子の腎臓初代培養細胞であるBK細胞や、ヒト結腸癌由来の株化細胞であるHRT-18G細胞においてもスフェロイド培養を試みたところ、MA104細胞と同条件にて、培養3日目までにスフェロイド形成を確認でき、14日間培養を継続してもその形態は保たれたままであった。したがって、これらの細胞を用いたウイルス分離への利用についても大きく期待でき、今後もさまざまなウイルス種の確保を試みていきたい。

3次元的な培養系については、実際に、これまで人工的な増殖培養が不可能であったヒトノロウイルスでは、スフェロイドよりも*in vivo*に近いとされる腸管オルガノイドシステムを用いることで培養が可能となっており[16]、獣医学的領域においてもこれら培養系を活用することで、ウイルス学的研究がより発展することが期待される。

なお、本検証では、スフェロイド培養前後におけるウイルス性状の比較等は実施していない。今回スフェロイド培養後に回転培養にて分離したRVCは、静置培養でも増殖可能となっていた。また、*in vitro*での培養を行うことで、生体内とは異なるウイルス集団が選択的に分離されている報告[17, 18]もある。静置培養でも増殖可能となったことについては、分離後のRVCを用いているため、初期感作時のウイルス量に依存している可能性もあるが、今後の課題として、スフェロイド培養を経ることでマイナー集団の選択がなされていないか等も含め、より詳細に検証を行う必要があると考えられた。

引用文献

- [1] Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L: Three-dimensional cell culture systems and their applica-

- tions in drug discovery and cell-based biosensors, *Assay Drug Dev Techn*, 12, 207-218 (2014)
- [2] Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G : Three-dimensional cell culture: a breakthrough *in vivo*, *Int J Mol Sci*, 16, 5517-5527 (2015)
- [3] Soares CP, Midlej V, Oliveira MEWd, Benchimol M, Costa ML, Mermelstein C : 2D and 3D-organized cardiac cells shows differences in cellular morphology, adhesion junctions, presence of myofibrils and protein expression, *PLoS One*, 7, e38147 (2012), (online), (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3360656/>), (accessed 2019-12-23)
- [4] Bokhari M, Carnachan RJ, Cameron NR, Przyborski SA : Culture of HepG2 liver cells on three dimensional polystyrene scaffolds enhances cell structure and function during toxicological challenge, *J Anat*, 211, 567-576 (2007)
- [5] Arai K, Eguchi T, Rahman MM, Sakamoto R, Masuda N, Nakatsura T, Calderwood SK, Kozaki K, Itoh M : A novel high-throughput 3D screening system for EMT inhibitors: a pilot screening discovered the EMT inhibitory activity of CDK2 inhibitor SU9516, *PLoS One*, 11, e0162394 (2016), (online), (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27622654>), (accessed 2019-12-23)
- [6] Schmeichel KL, Bissell MJ : Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions, *J Cell Sci*, 116, 2377-2388 (2003)
- [7] 恒光 裕 : ロタウイルス病, 動物の感染症, 明石博臣編, 第3版, 103-104, 近代出版, 東京 (2011)
- [8] Tsunemitsu H, Saif LJ, Jiang BM, Shimizu M, Hiro M, Yamaguchi H, Ishiyama T, Hirai T : Isolation, characterization, and serial propagation of a bovine group C rotavirus in a monkey kidney cell line (MA104), *J Clin Microbiol*, 29, 2609-2613 (1991)
- [9] 大竹祥紘, 米山州二, 大関綾子, 猿山由美, 戸崎香織, 小松亜弥子, 鈴木 亨 : 牛ロタウイルス C の関与が疑われた子牛の集団下痢症, *日獣会誌*, 71, 697-701 (2018)
- [10] Fukuda M, Kuga K, Miyazaki A, Suzuki T, Tasei K, Aita T, Mase M, Sugiyama M, Tsunemitsu H : Development and application of one-step multiplex reverse transcription PCR for simultaneous detection of five diarrheal viruses in adult cattle, *Arch Virol*, 157, 1063-1069 (2012)
- [11] Kuzuya M, Fujii R, Hamano M, Nakamura J, Yamada M, Nii S, Mori T : Molecular analysis of outer capsid glycoprotein (VP7) genes from two isolates of human group C rotavirus with different genome electropherotypes, *J Clin Microbiol* 34, 3185-3189 (1996)
- [12] Estes MK, Graham DY, Mason BB : Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms, *J Virol*, 39, 879-888 (1981)
- [13] Arias CF, Romero P, Alvarez V, López S : Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity, *J Virol*, 70, 5832-5839 (1996)
- [14] Porta DC, López S, Arias CF, Isa P : Polarized rotavirus entry and release from differentiated small intestinal cells, *Virology*, 499, 65-71 (2016)
- [15] Cui T, Theuns S, Xie J, Nauwynck HJ : Porcine rotavirus mainly infects primary porcine enterocytes at the basolateral surface, *Vet Res*, 50, 110 (2019)
- [16] Ettayebi K, Crawford SE, Murakami K, Broughman JR, Karandikar U, Tenge VR, Neill FH, Blutt SE, Zeng XL, Qu L, Kou B, Opekun AR, Burrin D, Graham DY, Ramani S, Atmar RL, Estes MK : Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids, *Science*, 353, 1387-1393 (2016)
- [17] Sa-Carvalho D, Rieder E, Baxt B, Rodarte R, Tanuri A, Mason PW : Tissue culture adaptation of foot-and-mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle, *J Virol*, 71, 5115-5123 (1997)
- [18] Aita T, Kuwabara M, Murayama K, Sasagawa Y, Yabe S, Higuchi R, Tamura T, Miyazaki A, Tsunemitsu H : Characterization of epidemic diarrhea outbreaks associated with bovine torovirus in adult cows, *Arch Virol*, 157, 423-431 (2012)

Isolation of Rotavirus C from Bovine Feces by Spheroid Culture Method

Yoshihiro OTAKE[†] and Shuji YONEYAMA

**Central Tochigi Prefectural Livestock Health and Hygiene Center, 6-8 Hiraidekogyodanchi, Utsunomiya-shi, 321-0905, Japan*

SUMMARY

Spheroids are three-dimensional cell colonies, and spheroid culture enables cell culture in an environment that resembles an in vivo environment more closely than adhesion cell culture. In the field of veterinary medicine, there have been no reports on the application of spheroid culture for the isolation of viruses. We verified the possibility of using this culture technique for virus isolation by comparing the results obtained from the isolation of viruses in adherent culture and spheroid culture, using five bovine stool samples that tested positive for rotavirus C (RVC) based on the detection of a specific gene. As a result, RVC was successfully isolated from three of the five samples by spheroid culture method. In addition, it was possible to isolate the virus at a higher rate when it was inoculated before spheroid formation. Therefore, inoculation of the specimen before spheroid formation was considered important for implementing this method. There are only two cases of RVC isolation reported in Japan, and improvement of the virus isolation rate can be expected by using spheroid cultures. Moreover, this spheroid culture method can be beneficial for studying virus species that are difficult to isolate. — Key words : Rotavirus C, Spheroid, Three-dimensional cell culture.

[†] *Correspondence to (Present address) : Yoshihiro OTAKE (R&D Center, NH Foods Ltd)*

3-3 Midorigahara, Tukuba, 300-2646, Japan

TEL 029-847-7811 FAX 029-847-7902 E-mail : y.otake@nipponham.co.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 73, 443 ~ 448 (2020)