

学位論文

「流行初期の新型コロナウイルス分離とその性状解析及び変異株
の効果的ウイルス分離法構築に関する研究」

指導教授名 久保 誠

申請者氏名 吉田 勲

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

要 旨

【背景と目的】

2019年12月、中華人民共和国湖北省武漢市において原因不明肺炎が報告され、原因ウイルスとしては新種のコロナウイルス（SARS-CoV-2）であることが報告された。SARS-CoV-2は、発生時の武漢株以降、R1株、アルファ株、デルタ株、現在ではオミクロン株が流行している。そこで、東京都内のCOVID-19患者の鼻腔ぬぐい液や糞便、あるいは、保健所等から搬入される臨床検体からのウイルス分離や、迅速抗原検査法の評価や培養細胞を用いたウイルス持続感染系について検討を行った。

【材料と方法】

1. 東京都における初めてのSARS-CoV-2感染者からのSARS-CoV-2の分離培養及び遺伝子解析

中国武漢市からの帰国者と濃厚接触者でリアルタイムRT-PCR法によりSARS-CoV-2 RNAが検出された3件の咽頭ぬぐい液を用いた。試料をVero E6細胞、Vero細胞に接種し、培養後、細胞変性効果（CPE）を示したものを分離

陽性とした。分離されたウイルスについて次世代シーケンサーにより遺伝子解析を試みた。

2. 下痢症を呈する COVID-19 患者の糞便を用いた SARS-CoV-2 の分離培養

下痢を呈する COVID-19 患者の糞便より RNA を抽出後、SARS-CoV-2 RNA の検出を試みると同時に SARS-CoV-2 のウイルス分離を試みた。

3. SARS-CoV-2 分離株を用いた SARS-CoV-2 迅速抗原検査法 (RAT) の有用性の検討

国立国際医療センターに入院した COVID-19 患者の鼻腔ぬぐい液の中で RT-qPCR 法によりウイルス RNA 量が Ct 値で 30 未満を確認した計 26 件の検体を試料とし、RT-qPCR 法によりウイルス量を測定するとともに RAT を実施した。

4. 株化細胞 Caco-2 細胞による SARS-CoV-2 持続感染系の構築

ヒト大腸がん細胞である Caco-2 細胞及び SARS-CoV-2 デルタ株が分離された咽頭ぬぐい液 2 検体を用いて、SARS-CoV-2 持続感染系の構築を試みた。

SARS-CoV-2 を感染させた Caco-2 細胞の継代培養を継続し、CPE の有無を顕

微鏡で観察し、上清中のリアルタイム RT-PCR 法によりウイルス量を確認した。

5. オミクロン株の Vero 系細胞を用いた分離率に関する基礎的研究

オミクロン株の分離培養は、デルタ株と比較すると分離率が低下しウイルス株を得る事が難しくなった。そのため、オミクロン株の分離率の向上を図るため、①基本的な維持培地、②低温度下（33℃）の増殖性、③アンフォテリシン B によるエンドサイトーシスを賦活化し、分離率の向上がみられるかなどの培養条件について検討を行った。

【結果と考察】

1. SARS-CoV-2 の分離培養と遺伝子解析

供試検体 3 件中 1 件から SARS-CoV-2 が分離され、このウイルスを次世代シーケンサーにより遺伝子解析したところ、COVID-19 発生時の武漢株とほぼ同じものが 2020 年 1 月下旬時点においても流行し、本邦へ持ち込まれたと考えられた。

2. 下痢症状のある COVID-19 患者の糞便からの SARS-CoV-2 の分離培養の検討

2020 年 1 月 30 日から 3 月 19 日に国際医療センター病院に入院した COVID-19 患者 13 名のうち下痢を呈している 6 名中 4 名 (66.7%) の糞便より SARS-CoV-2 RNA が検出されたが、ウイルス分離に至らなかった。この原因として、ウイルスが腸管内の酵素や糞便等に長時間接触し不活化したと推察された。

3. 分離株を用いた SARS-CoV-2 迅速抗原検査法 (RAT) の有用性の検討

ウイルス分離は、発症から 9 日以内に採取した検体が分離培養陽性となる傾向があり、RAT では、発症からの時間に関係がなくウイルス量が多い場合に陽性となった。RT-qPCR 法によるウイルス量と RAT、ウイルス分離それぞれの間に関連性がみられた。

4. Caco-2 細胞による SARS-CoV-2 持続感染系の構築

Caco-2 細胞は SARS-CoV-2 に感染しても、CPE などの大きな変化は観察できず、SARS-CoV-2 RNA は 6 世代まで継代を繰り返し継代毎に回収した培養上清及び、凍結保存した感染細胞株の再培養においても、その存在を確認でき

た。持続感染系の構築により、新しい検査法の検討を行う際などに有用と考えられた。

5. オミクロン株の Vero 系細胞を用いたウイルス分離率に関する基礎的研究

オミクロン株の分離培養に使用する維持培地に高グルコース濃度ダルベッコ変法イーグル培地を用いることで分離率の改善がみられた。培養温度については、33°C付近では増殖性が低く、従来通り 37°C付近に至適温度があることが明らかとなった。また、アンフォテリシン B によるエンドサイトーシスの賦活化により臨床検体からの分離率向上の可能性のあることが確認された。

【結論】

本研究では、SARS-CoV-2 遺伝子検査のみでなく、ウイルス分離法を応用し SARS-CoV-2 による感染症について流行当初東京都内に持ち込まれたウイルスの遺伝子的特徴や分離培養に使用するための培養細胞や培養条件、糞口感染が極めてまれであることより下水による感染を否定、迅速抗原検査法を用いた新型コロナ感染症の陰性確認に使用することの妥当性の確認など、本ウイルスによる流行初期にあった疑問を解明した。本研究により得られた結果は、

COVID-19 の診療の場及び東京都において，流行の動向を検証するために利用
されている。

目次

I. 序論	1
II. 本論	6
1. 背景と目的	7
2. 方法	8
2-1. 細胞培養	8
2-2. リアルタイム RT-PCR 法	9
2-3. ウイルス RNA の定量法	10
2-4. 透過型電子顕微鏡および走査型電子顕微鏡による観察法	10
2-5. 次世代シーケンサー (NGS) による遺伝子解析	11
2-6. SARS-CoV-2 分離培養	12
2-7. 蛍光抗体法によるウイルスタンパク質の検出	12
2-8. SARS-CoV-2 感染 Caco-2 細胞株の継代培養と持続感染細胞株の樹立	13
2-9. 迅速抗原検出キットによる鼻腔または咽頭ぬぐい液からの SARS-CoV-2 の検出	15
2-10. オミクロン株分離培養時に用いる維持培地の検討	16
2-11. 培養温度についての検討	17
2-12. オミクロン株分離培養における DMEM への添加剤添加の影響	17
2-13. オミクロン株分離に対するアンフォテリシン B 濃度の影響	18
2-14. 倫理的配慮	18
3. 結果	
3-1. SARS-CoV-2 分離培養についての検討	18
3-1-1. 帰国者臨床検体からの SARS-CoV-2 分離培養	18
3-1-2. 帰国感染者からの SARS-CoV-2 遺伝子検索	19

3-1-3. 東京都健康安全センターで分離されたウイルス株の 次世代シーケンサー (NGS) による遺伝子配列検索	20
3-1-4. 透過型電子顕微鏡 (TEM) による TKYE6182_2020 株の観察	20
3-2. COVID-19 患者の下痢糞便からの SARS-CoV-2 の分離培養の検討	21
3-3. 消化管株化細胞 Caco-2 細胞による SARS-CoV-2 持続感染系の構築	21
3-3-1. Caco-2 細胞を用いた SARS-CoV-2 の分離培養	21
3-3-2. SARS-CoV-2 感染 Caco-2 細胞の継代培養	23
3-3-3. SARS-CoV-2 感染 Caco-2 細胞の凍結保存と解凍後の再培養	23
3-3-4. 蛍光抗体法によるウイルスタンパク質の検出	24
3-3-5. SARS-CoV-2 感染 Caco-2 細胞と培養上清中のウイルス粒子の検出	25
3-3-6. SARS-CoV-2 持続感染 Caco-2 細胞における NGS 解析	25
3-4. SARS-CoV-2 分離株を用いた SARS-CoV-2 迅速抗原検査法 (RAT) の有用性	26
3-5. SARS-CoV-2 オミクロン株の Vero 系細胞を用いた分離率に関する 基礎的研究	27
3-5-1. オミクロン株の分離培養時に用いる維持培地の検討	27
3-5-2. オミクロン株分離時の培養温度についての検討	28
3-5-3. オミクロン株分離時に添加する添加剤の影響	28
3-5-4. オミクロン株分離時に添加するアンフォテリシン B 濃度の影響	29
3-5-5. 臨床検体からのオミクロン株の分離培養	30
3-5-6. アンフォテリシン B 添加によるウイルス変異の影響	31
4. 考察	31

III. 総括	40
IV. 謝辞	43
V. 参考文献	44
VI. 業績目録	50
VII. 図表	55

I. 序 論

2019年12月下旬に中華人民共和国湖北省武漢市において原因不明の肺炎の集団発生（Coronavirus disease 2019：COVID-19）が報告され、2020年1月9日に中国当局はその原因ウイルスが新しいタイプのコロナウイルス（Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2：SARS-CoV-2）であると同定し、それは今まで知られていたヒトコロナウイルスとは著しく異なっていた^{1, 11)}。COVID-19の主な症状は、発熱、倦怠感、息苦しさ、味覚異常、嗅覚異常、肺炎等を主とし、重症化すると生命が脅かされる可能性が報告された²⁾。

一般に、コロナウイルス属のウイルスは家畜や野生動物など、あらゆる動物に感染することが知られている。イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、ニワトリ、ウマ、ラクダなどの家畜に加え、シロイルカ、フェレット、コウモリ、スズメなどからも、それぞれの動物に固有のコロナウイルスが検出されている。多くの場合、軽症の呼吸器症状や下痢を引き起こす。一方、家畜では豚流行性下痢ウイルス（PEDV）、豚伝染性胃腸炎ウイルス（TGEV）、鶏伝染性気管支炎ウイルス（IBV）、実験動物ではマウス肝炎ウイルス（MHV）、ペットでは猫伝染性腹膜炎ウイルス（FIPV）など各動物で致死的症状を引き起こすウイルスの存在も知られている。これらのコロナウイルスの種特異性は高く、種の壁を越えて感染を起こすことは少ない³⁾。

ヒトに感染するコロナウイルスは、これまで知られているものとして、感冒を起こす 229E, OC43, NL63, HKU1 の 4 種類と重篤な重症急性呼吸器症候群 (SARS) を起こす SARS-CoV, 中東呼吸器症候群 (MERS) の起因ウイルス MERS-CoV が知られている⁴⁾。これらのうち, SARS, MERS は感染症法で二類感染症に指定されている。

コロナウイルス科に属するウイルスは約 27~32kb のポジティブセンス一本鎖 RNA からなるウイルスで, ウイルス外縁にスパイクタンパク質を有し, 透過型電子顕微鏡で観察すると特徴的な王冠のような形状を呈している³⁾。SARS-CoV-2 は 29,900 塩基からなり, 発生当初の武漢型をプロトタイプとし, 1 か月に 2 塩基程度変異し, アルファ型 (英国型), デルタ型 (インド型), オミクロン型と変異を繰り返しながら世界的な流行を起こしている⁵⁾。SARS-CoV-2 の伝搬速度は速く, 中国武漢市で第一例目の感染者が報告されてから, わずか数か月の間に世界的な大流行となった。

COVID-19 発生からほぼ 1 か月後, 中国武漢市からの出国又は帰国が困難になった邦人を保護するため日本政府によるチャーター便が運行された。その第 1 便が 2020 年 1 月 29 日に羽田空港 (東京国際空港) に到着し, その後, 第 5 便

まで運行が続けられ計 829 人の邦人が帰国した。このうち 815 人 (98%) に PCR 検査が実施され、帰国後 2 週間以内に陽性者が 14 人 (1.7%) 確認された⁶⁾。この時期の我が国での SARS-CoV-2 感染者は、武漢市からの帰国者並びにその濃厚接触者のみであった⁷⁾。

2 月 1 日に「新型コロナウイルス感染症」が感染症法における指定感染症（二類感染症相当）に指定され⁸⁾、3 月 11 日には、COVID-19 がパンデミック（世界的大流行）であると WHO が宣言した。

その後、5 月 12 日には 46 都道府県において 15,854 人の感染者、668 人の死亡者が確認された⁹⁾。これまでの累計は、陽性者 7,688,507 名、死者 29,344 名（令和 4 年 4 月 26 日現在）であり、未曾有の感染症となっている¹⁰⁾。

東京都健康安全研究センターでは、COVID-19 発生以前より、インフルエンザ患者の咽頭ぬぐい液、2014 年に代々木公園で発生したデング熱を媒介した蚊や海外渡航者でデング熱、チクングニア熱に感染した患者の血液より、それぞれの原因ウイルスを分離してきたが、本研究ではこれまでに培ってきたウイルス分離法を駆使して、東京都内で初めての SARS-CoV-2 感染者からウイルスを分離し、この感染症の検査法の改良・開発、下水や糞便からの感染の有無を検

討するための COVID-19 下痢症患者からのウイルス分離，消化器細胞に感染を
起こすのかを検討するためにヒト大腸がん細胞株である Caco-2 細胞を用いた
SARS-CoV-2 持続感染細胞系の構築等を検討した．さらに，新しく登場した
SARS-CoV-2 迅速抗原キット (RAT) の判定とウイルス分離結果の関係について
の検討や各種変異株の分離培養の向上を目指した分離培養の諸条件について検
討を行った．

II. 本 論

1. 背景と目的

SARS-CoV-2 流行初期において、感染者が今後増加することが予想され効率的な遺伝子検査を実施するため、RT-PCR 法の改良等に用いるウイルスコントロールや次世代シーケンサー (NGS) による遺伝子解析を行うために臨床試料よりウイルスを分離する必要がある。また、遺伝子検査で SARS-CoV-2 検査陽性となった中国からの観光客の咽頭ぬぐい液からウイルス分離培養を試みたが、細菌や真菌のコンタミネーションが著しくウイルスを分離するに至らなかった。そこで、貴重な試料より確実にウイルスを分離するためのウイルス分離法の改良が必要となった。さらに、COVID-19 の患者が病院や療養施設で治療が終わり社会復帰する際、陰性確認を RT-PCR 法で行うと陰性化に日数を要する場合があった。そこで、新たに登場した迅速抗原診断キット (RAT) の有用性を評価する必要がある。その他、SARS-CoV-2 の変異に伴ってウイルス分離率の低下が指摘されたこともあり、分離培養法についても改善する必要がある。

本研究では、SARS-CoV-2 を確実に臨床試料より得ることを目的に分離培養法の改良を行うとともに、SARS-CoV-2 流行初期で不確実であった糞口感染の

可能性や迅速抗原検出キットの陰性確認の使用の可能性などについて検討を行った。

2. 方法

2-1. 細胞培養

Vero 細胞 (ATCC CCL-81™) 及び Vero E6 細胞 (大阪公衆衛生研究所より分与) はアフリカミドリザルの腎細胞であり, その培養は, 10%牛胎児血清 (FBS; Biosera, France), 1% Non-essential Amino Acids Solution (NEAA; ナカライテスク, 京都) 及び 100 単位/ml ペニシリン-0.1mg/ml ストレプトマイシン (MP Biomedicals, USA) を添加した Eagle's minimum essential medium (E-MEM; 日水製薬, 東京) を発育培地 (GM) として培養を行った。

Vero E6/ TMPRSS2 細胞 (JCRB1819) は, Vero E6 細胞に TMPRSS2 (膜貫通型セリンプロテアーゼ) を細胞膜に遺伝子導入技術によって多量に発現させた細胞で, 10% FBS, 1% NEAA 及び 100 単位/ml ペニシリン-0.1mg/ml ストレプトマイシンを添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM; 日水製薬, 東京) を GM として培養を行った。

Caco-2 細胞 (ATCC HTB-37) は、ヒト大腸がん由来の細胞で、10% FBS, 1% NEAA 及び 100 単位/ml ペニシリン-0.1mg/ml ストレプトマイシンを添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM; 日水製薬, 東京) を GM として培養を行った。

また、ウイルス分離培養で用いる維持培地 (MM) には、2% FBS 及び 100 単位/ml ペニシリン-0.1mg/ml ストレプトマイシンを添加した E-MEM (富士フィルム和光純薬工業, 大阪) を使用した。

2-2. リアルタイム RT-PCR 法

1) 鼻腔又は咽頭ぬぐい液などの臨床検体や培養上清からの RNA 抽出は、試料 (糞便の場合は糞便の 10% 乳剤) を 140 µl 採取し、QIAamp viral RNA mini Kit (QIAGEN, Netherlands) を用いて試料中の総 RNA を抽出した。

2) プライマー, プローブ

表 1 に示したプライマーとプローブを用いて LightCycler 480 (Roche, Basel, Switzerland) により RT-PCR を行った¹²⁾。

3) SARS-CoV-2 遺伝子検出キットによる RT-PCR 法

RT-PCR は、SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit (タカラバイオ, 滋賀)

を用い、取扱説明書に準じ、標準法（検体量 5 μ L, 最終反応量 25 μ L）で行った。ウイルス遺伝子の増幅は、42°C 10 分、95°C 1 分で逆転写反応させた後、94°C 5 秒、60°C 30 秒の PCR サイクルを 45 回繰り返した。検出には、N1 チャネルに ROX, N2 チャネルに FAM, IC チャネルに Cy5 を用いて行い、判定については、本キットの取扱説明書に準じた。

なお、検出機器は CronoSTARTM96 (Clontech, 滋賀) を使用した。

2-3. ウイルス RNA の定量法

表 1 に示したプライマー, orflab-13215F, orflab-13257-R, プローブ orflab-13238 を用いてウイルス遺伝子の定量を行った。また、定量のための陽性コントロールには、合成 DNA (ファスマック, 神奈川) を使用し, QuantStudio 12 K (Thermo Fisher Scientific, USA) を用いて RT-qPCR を行った。

2-4. 透過型電子顕微鏡および走査型電子顕微鏡による観察法

透過型電子顕微鏡 (TEM) での観察については, SARS-CoV-2 RNA が検出された培養上清 300 μ l に 8%パラホルムアルデヒド 75 μ l を添加し試料とした。この試料を支持膜が貼られたメッシュ上に 2 μ l 滴下し, モリブデン酸アンモニウムを用いて, 常法に従ってネガティブ染色を実施した。これを観察用の試料

とし TEM (JEM-2100 Plus, 日本電子, 東京) を用いて観察した.

走査型電子顕微鏡 (SEM) での観察については, SARS-CoV-2 感染細胞表面を 100 mM PBS で洗浄し培地を除去した後, 4%パラフォルムアルデヒドを用いて 4°Cで一晩固定した. 固定後, 100 mM リン酸緩衝液 (PB) にて 5 分間, 3 回洗浄を行った. 次に, 氷上で 50%と 70%エタノールの各濃度で 5 分間の浸漬を各 3 回, 80%と 90%エタノールを用いて室温で各々 10 分間, 100%エタノールを用いて室温で 10 分間 3 回の脱水操作を行った. その後, *tert*-ブチルアルコールとエタノール混合液 (1:1) を組織に十分馴染ませた後, *tert*-ブチルアルコールを用いて乾燥を行った. 乾燥後, 培養プレートを適当なサイズにトリミングし, 試料台に載せ, 金を蒸着し導電処理を行い, SEM (Quanta FEG 250, Thermo Fisher, USA) で細胞表面の二次電子像を観察した.

2-5. 次世代シーケンサー (NGS) による遺伝子解析

ライブラリー解析に使用したウイルス RNA は, QIAamp Viral RNA mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出した. NGS ライブラリーの調製は NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB, USA) を用い, データ取得は MiSeq (Illumina, USA) を用いて行った. 取得したデータは CLC genomics workbench (CLC bio,

愛知) を用いたコンティグを作成し, 参照株にマッピングした.

変異部位の検索には Wuhan-Hu-1 (NC_045512.2) を参照株として使用した.

2-6. SARS-CoV-2 分離培養

ウイルス分離は細胞を単層培養した細胞培養フラスコまたは細胞培養プレートより GM を除去し, 鼻腔または咽頭ぬぐい液などの臨床検体を 4°C で 7,800 ×g 10 分間の遠心操作を行い, 遠心分離した上清 100 μl を細胞に接種した. 接種後, 37°C の 5% CO₂ 孵卵器内で 10~20 分間の吸着反応を行った後, MM として 2%FBS, 抗生物質加イーグル MEM 培地 (E-MEM) を 8 ml/bottle または 1 ml/well 加え, 37°C, 5% CO₂ 孵卵器内でそれぞれ培養を行った.

これら, SARS-CoV-2 感染実験の全ては, バイオセーフティーレベル3 (BSL3) の実験室内で実施した.

2-7. 蛍光抗体法によるウイルスタンパク質の検出

SARS-CoV-2 に感染した細胞を培養したチャンバースライド (IWAKI, 静岡) の各セルの GM を除去し, 100 mM PB で細胞を洗浄後, 4%パラフォルムアルデヒドで 4 時間固定した. 固定後, 100 mM PB で十分洗浄し, 細胞膜の透過性を高めるために 0.5% Triton-X 加 PBS を加え 37°C の孵卵器内で 30 分間静置した. 反応後 100 mM PB を用いて 3 回洗浄を行った.

固定洗浄後，各セルに蒸留水で 10 倍希釈したブロックエース溶液（DS ファーマバイオメディカル，大阪）を用いて 200 倍希釈した抗 SARS-CoV-2 スパイク蛋白抗体（フナコシ，東京），または市販の COVID-19 患者血漿（SARS-CoV-2 Antibody Positive Plasma, seracare, USA）（1:100）を添加し，37°Cの孵卵器内で 1 時間反応させた．反応後，4 倍希釈したブロックエース溶液にて 5 分間，3 回洗浄を行った．

洗浄後，抗 SARS-CoV-2 スパイク蛋白抗体を反応させたチャンバーは，FITC 標識抗ウサギ IgG（H&L）抗体（abcam, UK）を，COVID-19 患者血漿を反応させたチャンバーは，FITC 標識抗ヒト IgM 抗体（Dako, USA）と FITC 標識抗ヒト IgG（H&L）抗体（Jackson Immuno Research, USA）を 1 : 1 で混合した抗体液を添加し，37°Cの孵卵器内で 30 分間反応を行った．反応後，100 mM PB で 5 分間，3 回洗浄を行った後，イオン交換水で軽く洗浄し，無蛍光グリセリンにより封入を行い蛍光顕微鏡で観察した．

2-8. SARS-CoV-2 感染 Caco-2 細胞株の継代培養と持続感染細胞株の樹立

1) 継代培養

培養 7 日目の SARS-CoV-2 感染 Caco-2 細胞培養プレートから培養上清を除去後，各 well を CELLOSION®溶液（ゼノジェンファーマ，福島）で洗浄し，

0.25%トリプシン-EDTA 溶液 1.5 ml を加え、37°Cの 5% CO₂ 孵卵器内でインキュベートし細胞を剥離した。細胞が剥離、分散したことを確認した後、各 well に 1.5 ml の GM を加えてトリプシンの酵素反応を停止させ、細胞浮遊液を調整した。新しい 6 well 細胞培養プレートに 3 ml/well の GM を加え、そこに、上記で調整した SARS-CoV-2 感染 Caco-2 細胞浮遊液 1 ml を加え、37°Cの 5% CO₂ 孵卵器で培養を行った。

継代培養開始から 3 日目と 7 日目に細胞変性効果 (CPE) を倒立顕微鏡により観察し、感染を確認できた細胞の培養上清 200 µl を採取、RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR により SARS-CoV-2 RNA の存在を確認した。培養から 7 日目に再び継代培養操作を行い、継代培養を 6 世代目まで繰り返し行った。さらに、6 世代目の培養上清を Vero E6/TMPRSS2 細胞に接種し、SARS-CoV-2 の CPE を確認した。また、SARS-CoV-2 感染 Caco-2 細胞株をチャンバースライドに接種して培養を行い、蛍光免疫染色と SEM 観察用の試料とした。

2) 凍結保存と解凍からの培養

6 世代目の細胞株の培養 7 日を経過した細胞をセルバンカー1 溶液 (ゼノジェンファーマ, 福島) に浮遊させ-150°Cの超低温冷凍庫で凍結保存した。凍結

保存から1ヶ月後に細胞を37°Cで解凍した。細胞浮遊液が完全に融解したことを確認した後、90×gで10分間の遠心分離を行い、上清を除去した。次に、37°Cに加温したGMを1ml加え細胞を浮遊させ、90×gで10分間の遠心分離を行った。この洗浄操作を3回繰り返した後、細胞を37°Cに加温したGM1mlに再浮遊させ、25cm²培養フラスコに接種した。

継代培養は、培養7日目に0.25%トリプシン-EDTA溶液2mlを加え37°Cの5%CO₂孵卵器内でインキュベートし細胞を剥離した。細胞が剥離、分散したことを確認した後、GMを2ml加え細胞浮遊液とした。新たな25cm²フラスコにGMを8ml加え、細胞浮遊液を1ml接種し、37°Cの5%CO₂孵卵器内で培養を行った。

2-9. 迅速抗原検出キットによる鼻腔または咽頭ぬぐい液からの SARS-CoV-2 の検出

迅速抗原検出キット（エスプライン SARS-CoV-2、富士レビオ、東京）に付属の綿棒で被験者の鼻腔又は咽頭を充分拭った後、付属のチューブに綿棒を浸し付着した粘液を溶出させた。キットに付属しているキャップをチューブに装着し、5分静置した。その後、キット本体の試料滴下口に溶出液を2滴滴下し、

キット本体の凸部を押し込み静置した。30 分後、キット本体の観察窓に出現したバンドを添付説明書に従って判定した。

迅速抗原検出キット (RAT) とウイルス分離結果の相関については、 χ^2 検定を用いて、 $P < 0.05$ を統計的に有意であるとした。また、RAT の結果とウイルスコピー数及びウイルス分離の結果とウイルスコピー数を基に連続確信度法を用いて受信者動作曲線 (ROC 曲線) を作成し、RAT 結果とウイルス分離の検査の有効性について判定を行った。

2-10. オミクロン株分離培養時に用いる維持培地の検討

検討に用いたオミクロン株は、東京都内保健所等から COVID-19 の疑いのある臨床検体 (唾液、咽頭ぬぐい液など) より分離された 2 株 (BA.1 ; Accession ID EPL_ISL_9847798 及び BA.2 ; Accession ID EPL_ISL_10117621) を用いた。

オミクロン株 2 株を 2%FBS, 抗生物質加 E-MEM により 10 倍段階希釈 ($10^1 \sim 10^7$) した。その希釈ウイルス液 (100 μ l/well) を 24 well 細胞培養用プレート (IWAKI, 静岡) に単層培養した Vero E6 細胞, Vero E6/ TMPRSS2 細胞にそれぞれ接種し、37°C 5% CO₂ 孵卵器内で 15 分間吸着反応を行った。吸着後、MM として、2%FBS, 抗生物質加 E-MEM (富士フィルム和光純薬 : 056-08385) 及

び、2% FBS, 抗生物質加高グルコース濃度 D-MEM (Sigma : D7777), 通常処方
の D-MEM (Nissui : 05915) をそれぞれ加え, 37°C の 5% CO₂ 孵卵器内で 7 日
間培養し, 倒立顕微鏡下で CPE を観察した.

2-11. 培養温度についての検討

ウイルスを 2%FBS, 抗生物質加 E-MEM により 10 倍段階希釈 ($10^{-1} \sim 10^{-6}$)
し, その, ウイルス希釈液を 24 well 細胞培養用プレートに単層培養した Vero
E6 細胞, Vero E6/ TMPRSS2 細胞, Vero 細胞に 50 μ l/well で接種し, 2% FBS,
抗生物質加高グルコース濃度 D-MEM を 1 ml/well で添加し, 37°C 或いは 33°C
の 5% CO₂ 孵卵器内で培養を行い CPE の有無を観察した.

2-12. オミクロン株分離培養における D-MEM への添加剤添加の影響

ウイルス分離をするため試料接種後に Vero E6 細胞及び Vero E6/ TMPRSS2 細
胞に添加する MM の基礎培地として, 通常処方の D-MEM を用いた. 基礎培地
にピルビン酸ナトリウムを 0.11 mg/ml 添加したもの, グルコースを 2 mg/ml も
しくは 4 mg/ml 添加したものの 3 種類の D-MEM と高グルコース濃度 D-MEM
の計 4 種類の D-MEM を, 従来から MM として使用されてきた E-MEM と比較
し, 添加剤のオミクロン株の発育に対する影響について, CPE の発現を観察し

判定を行った。

2-13. オミクロン株分離に対するアンフォテリシン B 濃度の影響

2% FBS, 抗生物質加高グルコース濃度 D-MEM (Sigma) 中に 3.125 µg/ml, 6.25 µg/ml, 12.5 µg/ml のアンフォテリシン B(富士フィルム和光純薬 :019-23891) を添加したものと, アンフォテリシン B を無添加の 2% FBS, 抗生物質加高グルコース濃度 D-MEM (Sigma) を用いて培養を行い CPE の観察を行った。

2-14. 倫理的配慮

本研究は, 東京都健康安全研究センター倫理委員会で審査を行い, 承認を得て実施した (承認番号 : 31 健研健第 2007 号 2020 年 3 月 2 日, 3 健研健第 465 号 2021 年 5 月 31 日)。

3. 結 果

3-1. SARS-CoV-2 分離培養についての検討

3-1-1. 帰国者臨床検体からの SARS-CoV-2 分離培養

SARS-CoV-2 PCR 検査陽性となった武漢市からの帰国者 2 名 (無症状) とその濃厚接触者 1 名 (無症状) より SARS-CoV-2 を分離する目的で, Vero E6 細胞及び Vero 細胞を用いてウイルス分離培養を行った。その結果, 咽頭ぬぐい液を

接種した細胞 3 件のうち 1 件（無症状帰国者）から接種後 3 日目の Vero E6 細胞に感染特有の死細胞や合胞体などの細胞変性効果（CPE）が観察された。また Vero E6 細胞で CPE が観察された同一の検体を接種した Vero 細胞においても、接種から 5 日目に CPE が観察された。Vero E6 と Vero 細胞の培養上清からは SARS-CoV-2 RNA が検出され、東京都健康安全研究センターにおいても帰国邦人臨床検体から SARS-CoV-2（TKYE6182_2020 株）が初めて分離された。

3-1-2. 帰国感染者からの SARS-CoV-2 遺伝子検索

帰国邦人臨床検体の分離培養開始 3 日目に Vero E6 細胞、5 日目に Vero 細胞に CPE が観察された。Vero E6 及び Vero 細胞中で SARS-CoV-2 のウイルス複製が起きているのかを確認するために、培養開始から 3 日目と 4 日目の培養上清をそれぞれ回収し、培養上清中に検出された SARS-CoV-2 RNA のリアルタイム RT-PCR による Ct 値の比較を行った。その結果、4 日目に回収した培養上清は 3 日目に回収したものと比較して Ct 値が低下したことが明らかとなり、Vero E6 及び Vero 細胞内でそれぞれ SARS-CoV-2 が増殖していることが明らかとなった（図 1-1）。一方、CPE が観察されなかった細胞の培養上清におけるリアルタ

イム RT-PCR 増幅曲線は、陰性対照と同様にベースラインを示し、SARS-CoV-2 が増殖していないことが明らかとなった。

3-1-3. 東京都健康安全センターで分離されたウイルス株の次世代シーケンサー (NGS) による遺伝子配列検索

帰国邦人の臨床検体から分離された SARS-CoV-2 (TKYE6182_2020 株) が中国武漢市で分離された SARS-CoV-2 と同一であるか確認するために、帰国邦人から分離した TKYE6182_2020 株から抽出した RNA を用いて次世代シーケンサー (NGS) 解析を行った。その結果、ウイルスの全ゲノム配列 29,903 塩基を決定することができた。分離した TKYE6182_2020 株と COVID-19 の発生当時に流行していた武漢株との全塩基配列を比較したところ、全塩基配列中 ORF1 領域の 15,324 番目の塩基が C から T (アミノ酸変異無し) に、ORF3a 領域の 25,810 番目の塩基が C から G (L140V) に、N 領域の 29,303 番目の塩基が C から T (R344S) に変異していることが明らかとなった。

3-1-4. 透過型電子顕微鏡 (TEM) による TKYE6182_2020 株の観察

帰国邦人から分離できた TKYE6182_2020 株のウイルス形状を確認する目的で、TEM による観察を行った。その結果、ウイルスは直径約 100 nm で、周囲

に王冠状のスパイク様構造を持つことが確認され、既に国立感染症研究所から報告されていたコロナウイルスに特徴的なエンベロープ構造¹³⁾を有していることを確認した (図 1-2).

3-2. COVID-19 患者の下痢糞便からの SARS-CoV-2 の分離培養の検討

2020 年 1 月 30 日から 3 月 19 日に国際医療センター病院に入院した COVID-19 患者の糞便試料を用いて、糞便より SARS-CoV-2 RNA が検出されるのか、また糞便中に感染性を有するウイルスが存在するのかを検証するために、RT-qPCR 法によるウイルス RNA 検出及び Vero E6/ TMPRSS2 細胞によるウイルス分離培養を試みた。その結果、患者 13 名の中で下痢症状を訴えている者は 6 名 (6/13, 46%) あり、その内 4 名の下痢糞便中 (4/6, 66.7%) から SARS-CoV-2 RNA を検出した (表 2-1)。SARS-CoV-2 RNA を検出した 4 名の中で患者 1 名は最も長い 22 日間に渡って下痢症状を呈しており糞便中のウイルス RNA 量が最も高い結果 ($8.28 \log_{10} 10 \text{copies/g}$) となった (表 2-2)。しかしながら、SARS-CoV-2 RNA が検出された全ての患者糞便試料からはウイルス分離に至らなかった。

3-3. 消化管株化細胞 Caco-2 細胞による SARS-CoV-2 持続感染系の構築

3-3-1. Caco-2 細胞を用いた SARS-CoV-2 の分離培養

下痢糞便中からウイルス遺伝子が検出されたことから、消化管に由来する細胞においても SARS-CoV-2 は増殖し得ることが推察された。そこで、ヒト大腸がん由来の Caco-2 細胞で SARS-CoV-2 の感染成立と増殖が可能かを検証するために、Vero 系細胞を用いた分離培養により SARS-CoV-2 デルタ株が分離された患者 2 名から採取した咽頭ぬぐい液 (A, B) を用いてウイルスの分離培養を実施した。その結果、咽頭ぬぐい液の接種から 3 日目と 7 日目の Caco-2 細胞には死細胞や合胞体形成といった明らかな CPE を観察しなかった。しかしながら、培養上清を試料とした RT-PCR の結果では、全ての試料から SARS-CoV-2 RNA が検出されたことから、感染が成立し培養上清中には多くの SARS-CoV-2 が放出されていることが明らかとなった。感染 3 日目の培養上清から抽出した RNA を用いた RT-PCR の結果、ウイルス RNA の Ct 値は 13 程度であり、7 日目では 12 程度であった (表 3-1)。

ウイルスを感染させた Caco-2 細胞と非感染 Caco-2 細胞を倒立顕微鏡像により比較した結果、非感染細胞では数種類の形状に分化した細胞が観察されたが (図 3-1A)、ウイルス感染細胞では細胞質が大きく、カエルの卵状になった上皮様細胞が多く観察された (図 3-1B)。Vero E6 で観察される球形の死細胞が剥

離する CPE とは異なった形状を示していた (図 3-1H).

3-3-2. SARS-CoV-2 感染 Caco-2 細胞の継代培養

Vero E6 細胞とは異なり Caco-2 細胞では SARS-CoV-2 が感染しても細胞は死滅しないことが考えられたことから, SARS-CoV-2 持続感染細胞株樹立の可能性を検証するため, SARS-CoV-2 感染を実施した Caco-2 細胞の継代培養を行った. その結果, 2 継代目から 6 継代目までの全ての Caco-2 細胞から採取した培養上清中に SARS-CoV-2 RNA を検出した. また, 6 継代目の Caco-2 細胞から採取した培養上清 50 μ l を Vero E6/ TMPRSS2 細胞に接種し培養したところ, デルタ株に見られる特徴的な大きな合胞体を観察した (図 3-2). また, 継代培養した SARS-CoV-2 感染 Caco-2 細胞株から採取した培養上清中のウイルス RNA 量は, 継代 3 日目では Ct 値が 13~20, 7 日目には Ct 値が 12~18 であった (表 3-1)

3-3-3. SARS-CoV-2 感染 Caco-2 細胞の凍結保存と解凍後の再培養

SARS-CoV-2 感染 Caco-2 細胞の継代培養が可能であったことから, 一度凍結保存した後に再培養した SARS-CoV-2 感染 Caco-2 細胞からも持続的なウイルス産生が可能であるのか, また再培養した SARS-CoV-2 感染 Caco-2 細胞が継

続的に培養可能であるのかを検証するために、SARS-CoV-2 感染 Caco-2 細胞をセルバンカーに浮遊した後に-150°Cの超低温下で 1 ヶ月間凍結保存した。凍結保存後に、解凍し再培養した結果、再培養から 3 日目 (7G) に SARS-CoV-2 感染 Caco-2 細胞の増殖を確認した。再培養後に採取した培養上清から抽出した RNA を用いたリアルタイム RT-PCR では Ct 値が 16~19, 再培養から 7 日目に採取した培養上清では Ct 値 14~16 のウイルス RNA を検出した (表 3-2)。また、イムノクロマト法を用いて SARS-CoV-2 の存在を確認した結果、採取した培養上清中に SARS-CoV-2 抗原の存在を確認し、再培養した SARS-CoV-2 感染 Caco-2 細胞からもウイルス産生が持続していることを確認した (図 3-3)。さらに、9 継代目 (9G) まで培養した SARS-CoV-2 感染 Caco-2 細胞から採取した全ての世代の培養上清で SARS-CoV-2 RNA を検出した (表 3-2)。

3-3-4. 蛍光抗体法によるウイルスタンパク質の検出

SARS-CoV-2 感染 Caco-2 細胞内におけるウイルス増殖を明らかにするため、抗 SARS-CoV-2 スパイク蛋白抗体及び COVID-19 患者血漿を用いた間接蛍光抗体法を実施した (図 3-1D-G)。その結果、抗 SARS-CoV-2 スパイク蛋白抗体が反応したのは Caco-2 の細胞膜表面および細胞質内で (図 3-1D), スポット状の

蛍光像が広範囲に観察された。一方, COVID-19 患者血漿が反応したのは, SARS-CoV-2 感染 Caco-2 細胞全体で (図 3-1E), ブロードな蛍光像が観察された。

3-3-5. SARS-CoV-2 感染 Caco-2 細胞と培養上清中のウイルス粒子の検出

SARS-CoV-2 感染 Caco-2 細胞の培養上清中にウイルス粒子が存在しているかを明らかにするために, TEM を用いて培養上清の観察を行った。その結果, 直径約 100 nm で周囲にコロナウイルスの特徴である王冠状のスパイクを有するウイルス (SARS-CoV-2) 粒子像を観察した (図 3-4)。

また, SARS-CoV-2 感染 Caco-2 細胞表面に産生ウイルスによる形態変化が見られるのかを確認するために, SEM を用いて SARS-CoV-2 感染 Caco-2 細胞の観察を行った。その結果, SARS-CoV-2 感染 Caco-2 細胞の細胞表面は滑らかであり, Vero E6/TMPRSS2 細胞のような合胞体 (図.3-5A) などの CPE を形成した形跡は観察されなかった。しかしながら, SARS-CoV-2 感染 Caco-2 細胞では, ドームが形成されたと思われるクレーター様陥没像などが観察された (図 3-5B)。

3-3-6. SARS-CoV-2 持続感染 Caco-2 細胞における NGS 解析

SARS-CoV-2 が Caco-2 細胞に持続感染することでウイルスの遺伝子に変異を

起こすのかを確認するために、Vero E6/TMPRSS2 細胞で単回培養し回収したウイルスと持続感染細胞から回収したウイルスの全遺伝子配列を NGS により遺伝子解析した。Vero E6/ TMPRSS2 細胞と Caco-2 細胞に SARS-CoV-2 を感染させ単回培養のみで回収したウイルスにおいては、SARS-CoV-2 遺伝子全領域の塩基配列が一致し変異は確認されなかった。一方、SARS-CoV-2 感染 Caco-2 細胞で継代培養を繰り返した 6 継代目（6G）以降のウイルスからは変異が出現し、A は 24,507 と 26,408 番目の塩基が C から T に置換していた。また、B においては 24,621 番目の塩基が C から T へと変異したウイルスと変異を持たないウイルスがほぼ 50% ずつ混在していた。これらの塩基変異によるアミノ酸変異はなかった。

3-4. SARS-CoV-2 分離株を用いた SARS-CoV-2 迅速抗原検査法（RAT）の有用性

国立国際医療センターに入院した COVID-19 患者の鼻腔ぬぐい液の中で、RT-qPCR 法によりウイルス RNA 量が Ct 値で 30 未満を確認した計 26 件の検体を用いた RAT の結果は、COVID-19 発症からの経過時間には関係せず、鼻腔内から採取された試料中に含まれるウイルス（RNA コピー数）量が多い場合

(400copies/test) に陽性となった。また、同じ検体を用いて同時に実施したウイルス分離の結果は、発症日から 9 日以内までに採取し、ウイルス RNA が 10^5 copies/ml 以上の検体からウイルスが分離された (図 4-1)。

鼻腔ぬぐい液中に存在し感染性を有する SARS-CoV-2 は、RAT 陽性の 20 検体中 9 検体 (45%)、RAT 陰性検体では 6 検体中 1 検体 (17%) の計 10 検体から分離された (表 4-1)。検討に使用できた試料数が少なかったが、ウイルス分離が陽性であれば RAT が陽性となるとの仮説をたて、 χ^2 検定を行ったが $p=0.211$ となり仮説は棄却され統計的に有意であるとの結果を示すことはできなかった。

RAT の結果とウイルスコピー数及びウイルス分離の結果とウイルスコピー数から受信者動作曲線 (ROC 曲線) を作成した結果、RAT 法とウイルス分離培養は、どちらも検査の有効性が認められ、カットオフ値は約 10^5 copies/ml であった (図 4-2)。

3-5. SARS-CoV-2 オミクロン株の Vero 系細胞を用いた分離率に関する基礎的

研究

3-5-1. オミクロン株の分離培養時に用いる維持培地の検討

オミクロン株は、デルタ株までの従来株と比較してウイルス分離効率が悪く、分離率の向上を図る必要があった。初めに、ウイルス分離時に使用する細胞株の維持培地について検討を行った。その結果、従来から使用されていた E-MEM と比較して、高グルコース含有 D-MEM (Sigma) の使用により、Vero E6 細胞と Vero E6/ TMPRSS2 細胞で観察される CPE に 10 倍の差が認められた (表 5-1)。Nissui 社の D-MEM を使用して同様な実験を行ったが、ウイルス分離の結果は高グルコース含有 D-MEM には及ばず E-MEM と同程度であった。

3-5-2. オミクロン株分離時の培養温度についての検討

デルタ株までと異なり、オミクロン株感染者の主症状は上気道症状に変遷してきた。そこで、ウイルス分離時の培養温度を変えることでウイルス分離率に変動があるのかを検証するために、ウイルス感染細胞を 33℃ 或いは 37℃ の条件下で培養した。その結果、Vero E6 細胞への感染では培養温度の違いによって差は認められなかったが、Vero E6/ TMPRSS2 細胞への感染では 33℃ に比べて 37℃ でウイルス量が 10 倍、Vero 細胞への感染においては 100 倍多いことが明らかとなった (表 5-2)。

3-5-3. オミクロン株分離時に添加する添加剤の影響

オミクロン株の分離培養では高グルコース含有 D-MEM 使用の成績が良かったことから、培地中のグルコース濃度がウイルス分離に影響を与える主因となり得るのかを検討した結果、グルコースを添加した Nissui 社の D-MEM で培養した Vero E6 細胞においてはウイルス分離に対する影響は見られなかった。一方、ピルビン酸ナトリウムを添加した Nissui 社の D-MEM はウイルス量が 10 倍多く産生されていた。

また、Vero E6/ TMPRSS2 細胞の検討においては、グルコース添加（終濃度 3mg/ml, 5mg/ml）及びピルビン酸ナトリウムを添加した Nissui 社の D-MEM での培養結果は、無添加の D-MEM での培養結果よりも 10 倍高くなった（表 5-3）。

3-5-4. オミクロン株分離時に添加するアンフォテリシン B 濃度の影響

オミクロン株の主症状は上気道症状であり、TMPRSS2 が乏しいとされる咽頭部の細胞に広範囲に感染していることが考えられるため、感染時のスパイクタンパク質の開裂に必要とされるセリンプロテアーゼである TMPRSS2 を使用した経路によるエントリーよりもエンドサイトーシス経路によるエントリーが優位となっている可能性がある。そこで、エンドソームの膜上に存在する、ウイルスの増殖抑制因子であるインターフェロン誘導性膜貫通型 (IFITM) タンパ

ク質の阻害薬であるアンフォテリシン B を培養液中に添加して、オミクロン株が感染時に TMPRSS2 が必要であるのかエンドサイトーシスを主に利用しているかについての検討を行った。

その結果、Vero E6 細胞では、アンフォテリシン B の濃度に関係なく 10^{-4} 希釈まで CPE が出現し、Vero E6/TMPRSS2 細胞は、 10^{-5} 希釈まで CPE が出現し、ウイルス培養におけるアンフォテリシン B の効果はみられなかった (表 5-4)。

3-5-5. 臨床検体からのオミクロン株の分離培養

これまでの検討結果から、温度は 37°C 、高グルコース含有 D-MEM を用いて臨床検体から SARS-CoV-2 分離を試みた。遺伝子検査によりオミクロン株と確定された臨床検体を分離培養の検討に用いた。その検体の内訳は、咽頭または鼻腔ぬぐい液が 45 検体、唾液が 21 検体、不明が 4 検体であった。これらの 70 検体からオミクロン株は 40 検体 (57.1%) から分離された。

検体種別では、咽頭と鼻腔ぬぐい液については 31 検体 (44.3%) が、唾液については 7 検体 (10.0%) が、不明については 2 検体 (2.9%) がオミクロン株分離陽性となった (表 5-5)。また分離培養に使用した細胞別では、Vero E6 細胞および Vero E6/TMPRSS2 細胞の両方で分離できたものが 20 検体 (28.6%)、Vero E6 細胞のみ分離できたものが 6 検体 (8.6%)、Vero E6/TMPRSS2 細胞のみ

分離できたものが 15 検体 (21.4%) となった (表 5-6)。Vero 細胞から分離できたものについては 12 検体 (17.1%) あったが、これら 12 検体については Vero E6 細胞や Vero E6/ TMPRSS2 細胞からも共通して分離された。

3.125 µg/ml のアンフォテリシン B を添加し Vero E6 細胞で分離培養を行った 25 検体においてはオミクロン株が 21 検体 (84.0%) から分離され、分離されたオミクロン株の亜型は BA.1 が 18 株、BA.2 が 3 株であった。また、分離された 21 検体のうち 19 検体はアンフォテリシン B を添加していない MM を用いた Vero E6 と Vero E6/ TMPRSS2 細胞により分離された (表 5-7)。アンフォテリシン B 添加 MM を使用した Vero E6 細胞でのみ分離されたのは 2 検体で、分離された亜型は、それぞれ BA.1 と BA.2 であった。

3-5-6. アンフォテリシン B 添加によるウイルス変異の影響

培地にアンフォテリシン B を添加して分離したオミクロン株の全領域配列と、アンフォテリシン B 無添加の培地で分離したオミクロン株を比較した結果、分離したウイルス全ての領域において塩基配列が一致した。

4. 考 察

2019 年 12 月下旬、中華人民共和国湖北省武漢市において COVID-19 が発生

し、その1ヵ月後、武漢市からの帰国希望者の為に、日本政府がチャーター便を運航した。この帰国者のうち東京都健康安全研究センターで遺伝子検査した210検体の咽頭ぬぐい液のうち、陽性であった2検体と帰国者の濃厚接触者1検体より SARS-CoV-2 を分離する目的で Vero 系細胞を用いて分離培養を行った。その結果、3検体のうち1検体の咽頭ぬぐい液より COVID-19 の原因ウイルスである SARS-CoV-2 (TKYE6182_2020 株) を分離した¹⁴⁾。

これまで臨床検体からインフルエンザウイルスなどの分離を行う場合、試料100 µl を細胞に接種し、37°Cで1時間インキュベーションを行ってウイルスを吸着させた後、細胞に接種した試料を除去し、1 ml の維持培地を添加し37°C、5%CO₂ 存在下で培養が行われてきた¹⁵⁾。このウイルス分離に使用する維持培地にはペニシリンなどの抗菌剤が添加されているため、細菌汚染が起こることは稀である。しかしながら、本研究で当初実施したウイルス分離培養においては、臨床検体試料を接種した翌日には細菌と真菌による極めて夥しいコンタミネーションによりウイルス分離用の細胞が死滅したため、インフルエンザウイルス分離などで行ってきた従来のウイルス分離培養法では対処が困難であることが明らかとなった。また、SARS-CoV-2 変異株の出現に伴って、培養細胞への

感染感受性にも変化が出てきたことが明らかとなった。さらに、培養温度や維持培地の選定などウイルス分離と感染感受性の変化にも対応するべくウイルス分離手法最適化のための種々の検討を行い、分離率の向上を目指すこととした。

当初、ウイルスが多く含まれる臨床検体は鼻咽頭ぬぐい液、喀痰等の他、糞便が該当すると報告された¹⁶⁾。そのため、SARS-CoV-2の感染経路は糞便を経由した糞口（経口）感染も疑われていた。糞便を介したSARS-CoV-2感染の可能性については東京都における下水の安全性確保に直結するため、SARS-CoV-2感染者糞便中に検出されるウイルスを確認することは非常に重要である。そこで、国際医療センターに入院した患者糞便中のSARS-CoV-2の存在を確認するためにRT-qPCR法によるSARS-CoV-2 RNAの検出を行ったところ、糞便からSARS-CoV-2 RNAが検出され、糞便中にSARS-CoV-2 RNAを検出した患者は検出しなかった患者よりも下痢を起こしている割合が高かったことも判明した。特に、下痢を呈している患者の中には22日間下痢症が継続している症例もあり、その糞便中のSARS-CoV-2 RNA量は、対象となった患者の中で最も高い値を示していた（ $8.28 \log_{10} 10 \text{ copies/g}$ ）。しかしながら、ウイルスRNAを検出した糞便試料からは感染性を有するウイルスは分離されなかったことから、糞

便を介した糞口（経口）感染が主要な感染経路である可能性は低いことが考えられた。

一方、患者消化管中には SARS-CoV-2 が存在し得ることは明らかであり、患者糞便を通じてトイレ排水から下水道へ SARS-CoV-2 が流入すると考えられた。

実際、長島らは、下水中から SARS-CoV-2 RNA を検出したことを報告している

17). 従って、下水中の SARS-CoV-2 RNA の存在は地域の COVID-19 患者の存在と流行状況を示すマーカーと成り得ることが示唆された。実際に、下水の流れを基に選定したマンホールから下水をサンプリングし、SARS-CoV-2 RNA を検出することで、感染者の広がりを把握することに利用できることが報告されている¹⁸⁾。糞便試料からの SARS-CoV-2 RNA の検出は、このような地域内における SARS-CoV-2 感染者の存在を確認する場合において重要な手法となることが示唆された。

また、このことは、SARS-CoV-2 が消化管細胞に感染し得ることを示唆している。通常、ウイルス分離に使用する細胞は Vero 細胞に代表されるアフリカミドリザルの腎臓由来の細胞であり、消化管に由来する細胞とは異なる。下痢症状を呈する患者検体からウイルス分離が困難であった理由の一つに、感染に使

用した細胞の選択に問題があったことも考えられた。そこで、ウイルス分離培養用の細胞として、ヒト消化管細胞由来の株化細胞であるヒト結腸がん細胞の Caco-2 細胞を候補の一つとすることとした。Caco-2 細胞は、1974 年に J. Fogh らにより樹立された¹⁹⁾。通常の培養条件下において、小腸上皮様細胞に分化する過程を通じて種々の形状が見られる細胞である。また、Caco-2 細胞は分化により水や電解質の輸送が開始され、その結果ドーム様構造が培養皿底面との間に形成される性質が知られており^{20,21)}、腸管系ウイルスのみならず、インフルエンザウイルス等の分離が可能である^{22,23)}。

Vero E6/ TMPRSS2 細胞で SARS-CoV-2 デルタ株が分離できることを確認した臨床検体 2 検体を用いて Caco-2 細胞に SARS-CoV-2 感染実験を実施したところ、Vero 系細胞のような細胞死は誘発されないが、培養上清中に SARS-CoV-2 RNA が検出されたこと、蛍光抗体法が陽性となったことから Caco-2 細胞に SARS-CoV-2 が感染し細胞内でウイルス増殖が起こっていることが示唆された。また、SARS-CoV-2 感染 Caco-2 細胞から採取した培養上清を感染感受性の高い Vero E6/ TMPRSS2 細胞に添加したところ、デルタ株特有の典型的な大きな合胞体の形成が確認されたことから、Caco-2 細胞から放出されたウイルス粒子は感

染性を有することが示唆された。

なお、この実験系を通じて観察した特徴的な大きな合胞体はデルタ株に特有であることが示唆されたため、Caco-2 感染細胞から分離したウイルス株を共同研究先である東京大学医科学研究所に分与して精査したところ、スパイク蛋白をコードする遺伝子に P681R の変異があることを確認した。この変異は合胞体形成と病原性の増強に寄与していることが明らかとなり²⁴⁾、Caco-2 細胞の感染系を通じて回収したウイルス株によってデルタ株の病原性解明に貢献することができた。デルタ株以降の変異株においては、P681R 変異がないため同様の現象は確認されていない。

Caco-2 細胞に感染させたウイルスと Caco-2 細胞から産生されたウイルスの遺伝子変異を比較したところ、変異は 2 箇所に残っていた。この変異によるアミノ酸変異は無かった。Caco-2 細胞を用いた持続感染細胞から産生されるウイルスが研究用途に使用することが可能であると考えられた。

迅速抗原検査 (RAT) は現在では広く使用されているが、当初の利用は極めて限定的であった。RAT 陽性とウイルスが分離の成績とウイルスのコピー数にそれぞれ関連性が認められ、SARS-CoV-2 感染者の感染性の判定に RAT の有用

性が高いことを明らかにした。このことから、RATは感染後からの時間経過を追跡していく上で、感染性のある排出ウイルス残量を判定するために有用であることが考えられた。現在、RATの検討から得られた成果は、COVID-19患者の陰性確認などの診断基準の根拠として用いられている。

デルタ株からオミクロン株への置き換わりが始まった頃、SARS-CoV-2感染を疑う臨床検体試料（鼻腔・咽頭ぬぐい液や唾液など）からウイルス分離が困難となってきた。分離困難な事例において、その多くはオミクロン株であることが明らかとなってきた。インフルエンザウイルス分離において、グルコース添加培地で難分離性ウイルスを分離するケースが報告されていることから、高グルコース含有培地を調製使用した。高グルコース含有培地の使用によりオミクロン株の分離率が改善したことから、オミクロン株はそれ以前の株と比較してグルコースの要求性が高まっていることが示唆された。オミクロン株感染者の主症状が上気道炎と変遷してきたことから、上気道炎起因ウイルスであるライノウイルス増殖の至適温度である33℃付近におけるオミクロン株の増殖について検討した。しかしながら、温度の違いは分離率の向上に寄与せず、オミクロン株の増殖は温度に依存しないことが示唆された。

また、オミクロン株は咽頭周辺の細胞に広範囲に感染可能であり、この感染機序にはエンドサイトーシスが関与し、細胞内に効率良く侵入し増殖しているとの報告がある²⁵⁾。しかしながら、エンドソームの膜上にはウイルス増殖を抑制するインターフェロン誘導性膜貫通型タンパク質 (IFITM)^{25,26,27)}の存在が明らかとなっている。そこで、IFITM を阻害^{25,26)}する目的でアンフォテリシン B²⁵⁾を培地に添加し、ウイルス分離率が向上するののかについて検討した。Vero E6 細胞においては、25 検体中 21 検体 (84.0%) と高率で分離することができた。このことから、IFITM 阻害剤の 1 つであるアンフォテリシン B が Vero E6 細胞のエンドソームに存在している IFITM のウイルス抑制作用を阻害し、エンドサイトーシス経路により細胞に感染したウイルスの増殖の抑制が緩和されたことで、ウイルス分離率が向上した可能性があるかと推察された。

本研究は、SARS-CoV-2 の分離条件の様々な検討を行い、持続感染系の確立、デルタ株の合胞体形成能やオミクロン株の分離率向上には、高グルコース D-MEM を維持培地に用いることなど多くの知見を得ることができた。今後も、COVID-19 の起因ウイルスである SARS-CoV-2 は多くの変異を重ねながら我々の脅威となり続けると考えられる。ウイルス分離技術は、本ウイルスの病原性

を明らかにし、ワクチンや治療薬開発に必要不可欠なものである。今後も、SARS-CoV-2 の性質に基づいた効率的な培養法の検討など引き続き調査と研究を行っていく必要があると考える。

III. 総 括

2020年1月、東京都内で初めて SARS-CoV-2 が分離され、遺伝子解析の結果、武漢市で発生したウイルスが本邦へ持ち込まれたことを明らかにした。SARS-CoV-2 は、現在まで武漢株、R1 株、アルファ株、デルタ株などの多くの変異株が出現しており、東京都内における SARS-CoV-2 の初分離以降、ウイルス分離を継続し NGS による遺伝子解析を行ってきた。その後も多くの変異株が出現してきたが、それら変異株の分離培養及び遺伝子解析に対応し、東京都内における流行の動向やその起源についての解明に大きく貢献した。

東京都内の下水からは SARS-CoV-2 RNA が検出され、下水からの感染拡大が危惧された。しかしながら、本研究を通して COVID-19 患者の糞便から感染性ウイルスは分離されないことを明らかにし、糞便や下水が新たな感染源となる可能性が限りなく低いことを明らかにした。一方、下水道より検出される SARS-CoV-2 RNA の追跡により、感染者の分布をはじめとした疫学調査などの公衆衛生分野に応用が可能であることを示した。

新しく登場した迅速抗原検査（RAT）は、ウイルス分離可能なウイルス量を迅速に検出できることが判明し、SARS-CoV-2 感染者の感染性の判定に RAT の有用性が高いことを示した。RAT の検討により得られた成果は、COVID-19 患

者の陰性確認などの診断基準の根拠として用いられている。

糞便中から SARS-CoV-2 RNA が検出されたことから、SARS-CoV-2 が消化管細胞に感染し得るとの仮説を立て、ヒト結腸がん細胞である Caco-2 細胞を用いた持続感染細胞の構築を行い樹立した。これにより、新しい検査法の開発や遺伝子解析法の開発などに貢献しうると考える。

オミクロン株は、細胞表面上に発現している酵素である TMPRSS2 を利用し細胞内に侵入する経路から、エンドサイトーシスを利用する経路に変異した可能性があり、これによりウイルス分離率が低下したことが考えられた。高グルコース D-MEM の使用とアンフォテリシン B の添加によりオミクロン株の分離率が向上する可能性があることが判明した。

ウイルス粒子は、新たな検査法の開発や評価、抗ウイルス剤の検索などに必要不可欠であり、今後も SARS-CoV-2 の変異に対応しながら引き続きウイルス分離技術の向上を図っていく必要がある。

IV. 謝 辞

本論文の作成にあたり，御指導，御鞭撻を賜りました北里大学大学院医療系研究科・環境医科学群 環境微生物学 久保 誠 教授に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり，御指導，御鞭撻を賜りました東京都健康安全研究センター 微生物部長 貞升健志博士，ウイルス研究科長 長島真美博士に深く感謝いたします。

V. 参考文献

1. WHO: WHO advice for international travel and trade in relation to the outbreak of pneumonia caused by a new coronavirus in China
<https://www.who.int/news-room/articles-detail/who-advice-for-international-travel-and-trade-in-relation-to-the-outbreak-of-pneumonia-caused-by-a-new-coronavirus-in-china/> (2022年10月7日現在)
2. Tsang HF, Chi Chan LW, Cho WCS, Yu ACS, Yim AKY, Chan AKC, et al. : An update on COVID-19 pandemic: the epidemiology pathogenesis, prevention and treatment strategies.
Expert Rev Anti Infect Ther 2021; 19(7): 877 – 88.
3. 国立感染症研究所：コロナウイルスとは
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/9303-coronavirus.html>
(2022年10月7日現在)
4. Kim JM, Chung YS, Jo HJ, Lee Nj, Kim MS, Woo SH, et al. : Identification of coronavirus isolated from a patient in korea with COVID-19.
Osong Public Health Res Perspect 2020; 11: 3 – 7.
5. 厚生労働省：新型コロナウイルス感染症の世界の状況報告
<https://www.forth.go.jp/topics/20210815.html>
(2022年10月7日現在)
6. 国立感染症研究所：中国武漢市からのチャーター便帰国者について：新型コロナウイルスの検査結果と転帰（第四報：第4, 5便について）および第1～5便帰国者のまとめ（2020年3月25日現在）
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/diseases/ka/corona-virus/2019-ncov/2488-idsc/iasr-news/9557-483p04.html#:~:text=2020%E5%B9%B4%E6%9C%8817,%E3%81%82%E3%81%A3%E3%81%9F%EF%BC%88%E6%82%A3%E8%80%8515%EF%BC%89%E>

3%80%82

(2022年10月7日現在)

7. 厚生労働省：About Coronavirus Disease 2019（COVID-19），
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/newpage_00032.html

(2022年10月7日現在)

8. 厚生労働省：感染症法上の指定感染症について

<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000664825.pdf>

(2022年10月7日現在)

9. 国立感染症研究所：東京都での新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の
流行（2020）

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/diseases/ka/corona-virus/2019-ncov/2502-idsc/iasr-in/9818-486d01.html>

(2022年10月7日現在)

10. 厚生労働省：国内の発生状況など

<https://www.mhlw.go.jp/stf/covid-19/kokunainohasseijoukyou.html>

(2022年10月7日現在)

11. WHO: WHO advice for international travel and trade in relation to the outbreak of

pneumonia caused by a new coronavirus in China

<https://www.who.int/news-room/articles-detail/who-advice-for-international-travel-and-trade-in-relation-to-the-outbreak-of-pneumonia-caused-by-a-new-coronavirus-in-china/>

(2022年10月7日現在)

12. 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル（新型コロナウイルス感染症）

<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/2019-nCoV20200319.pdf>

13. 国立感染症研究所：新型コロナウイルス：国立感染症研究所が開発した細胞
で分離に成功

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/basic-science/virology/9369-2020-virology-sl.html>

（2022年10月7日現在）

14. Nagashima M, Kumagai R, Yoshida I, Kawakami M, Nagano M, Asakura H, et al. :
Characteristics of SARS-CoV-2 isolated from asymptomatic carriers in Tokyo
Jpn J Infect Dis. 2020; 73: 320 – 22.

15. 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル インフルエンザ診断マニュアル
（第4版）

<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/influenza20190116.pdf>

16. 国立感染症研究所：2019-nCoV(新型コロナウイルス)感染を疑う患者の検体
採取・輸送マニュアル

https://www.niid.go.jp/niid/images/pathol/pdf/2019-nCoV_200131.pdf

（2022年10月7日現在）

17. Nagashima M , Kawakami M , Hayashi M , Kumagai R , Kasuya F , Yoshida I , et

- al. : RNA detection using RT-qPCR and non-isolation of SARS-CoV-2 in concentrated wastewater (June - August 2020, Tokyo).
- Jpn J Infect Dis 2022; 75: 212 – 15.
18. Larson RC, Berman O, Nourinejad M. : Sampling manholes to home in on SARS-CoV-2 infections
- PLoS ONE 2020; 15: e0240007.
19. Fogh J, Tempe G : New human tumor cell lines. In: Fogh J, ed. Human Tumor Cells in vitro.
- Plenum Publishing Corp, New York, 1975, pp115-141.
20. 原歩, 日比紀文, 吉岡正洋, 戸田京子, 渡辺憲明, 森田稔, 他 : 大腸癌細胞株 Caco-2 の分化機序の検討.
- 日消誌 1992; 89: 588 – 95.
21. Hauri HP, Sterchi EE, Bienz D, Fransen JAM, Marxer A. : Expression and intracellular transport of microvillius membrane hydrolases in human intestinal epithelial cells.
- J Cell Biology 1985; 101: 838 – 51.
22. 吉野修司, 山本正悟, 川畑紀彦 : Caco-2 細胞を用いたインフルエンザウイルスの分離
- 感染症誌 1998; 72: 347 – 35.

23. Wieczorek M, Ciacka A, Witek A, Litwinska B. : The Utility of Caco-2 cells in Isolation of Enterovirus from Environmental and Clinical Material. Pol J Microbiol 2014; 63: 69 – 73.
24. Saito A, Irie T, Suzuki R, Maemura T, Nasser H, Uriu K, et al. : Enhanced fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Delta P681R mutation. Nature 2021; 602: 300 – 6.
25. Peacock TP, Brown JC, Zhou J, Thakur N, Newman J, Kugathasan R, et al. : The SARS-CoV-2 variant, Omicron, shows rapid replication in human primary nasal epithelial cultures and efficiently uses the endosomal route of entry. biorxiv 2022; January 03.
26. Smith SE, Weston S, Kellam P, et al. : IFITM proteins - cellula inhibitors or viral entry. Curr Opin Virol. 2014; 4: 71 – 7.
27. Dowran R, Nabavi SF, Habtemariam S, Banach M, Shahmohamadneiad S, Cismaru CA, et al. Various interferon(IFN)-inducible transmembrane (IFITM)proteins for COVID-19, is there a role for the combination of mycophenolic acid and interferon? Biochimie 2020; 177: 50 – 2.

VI. 業績目録

(I) 原 著

1. Yoshida I, Nagashima M, Asakura H, Hasegawa N, Shinkai T, Sadamasu K : The Isolation Rate of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Omicron Variant Strains Using Vero Lineage Cells.
Kitasato Med J 52(2):105 - 111, 2022
2. Yoshida I, Nagashima M, Asakura H, Shinkai T, Sadamasu K : Construction of Persistently Infected Cells of SARS-CoV-2 Delta Strain Using Caco-2 Cells.
Kitasato Med J 52(2):73 - 80, 2022
3. Nagashima M, Kawakami M, Hayashi M, Kumagai R, Kasuya F, Yoshida I, Kashihara N, Morita K, Yamada K, Fujiwara T, Kitamura K, Yoshida H, Chiba T, Sadamasu K : RNA Detection Using RT-qPCR and Non-Isolation of SARS-CoV-2 in Concentrated Wastewater (June – August 2020, Tokyo).
Jpn J Infect Dis 75: 212 - 215, 2022
4. Akiyama Y, Kinoshita N, Sadamasu K, Nagashima M, Yoshida I, Kusaba Y, Suzuki T, Nagashima M, Ishikane M, Takasaki J, Yoshimura K, Ohmagari N : A Pilot Study on Viral Load in Stool Samples of Patients with COVID-19 Suffering from Diarrhea.
Jpn J Infect Dis. 75(1): 36 - 40, 2022
5. Ueno M, Iwata-Yoshikawa N, Matsunaga A, Okamura T, Saito S, Ashida S, Yoshida I, Nagashima M, Asakura H, Yaoita Y, Suzuki J, Sadamasu K, Yoshimura K, Kutsuna S, Shiwa-Sudo N, Nagata N, Suzuki T, Suzuki A, Okamoto M, Kimura M, Ohmagari N, Miura R, Ishizaki Y : Isolation of human monoclonal antibodies with neutralizing activity to a broad spectrum of SARS-CoV-2 viruses including the Omicron variants.
Antiviral Res 201: 105297, 2022
6. Saito A, Irie T, Suzuki R, Maemura T, Nasser H, Uriu K, Kosugi Y, Shirakawa K, Sadamasu K, Kimura I, Ito J, Wu J, Iwatsuki-Horimoto K, Ito M, Yamayoshi S,

Loeber S, Tsuda M, Wang L, Ozono S, Butleratanaka PE, Tanaka LY, Shimizu R, Shimizu K, Yoshimatsu K, Kawabata R, Sakaguchi T, Tokunaga K, Yoshida I, Asakura H, Nagashima M, Kazuma Y, Nomura R, Horisawa Y, Yoshimura K, Takaori-Kondo A, Imai M, The Genotype to Phenotype Japan (G2P-Japan) Consortitium, Tanaka S, Nakagawa S, Ikeda T, Fukuhara T, Kawaoka Y, Sato K : Enhanced fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Delta P681R mutation.

Nature 602: 300 - 306, 2022

7. Mlcochova P, Kemp S, Shanker Dhar M, Papa G, Meng B, Ferreira ATM I, Datir R, Collier AD, Albecka A, Singh S, Pandey R, Brown J, Zhou J, Goonawardane N, Mishra S, Whittaker C, Mellan T, Datta M, Sengupta S, Ponnusamy K, Radhakrishnan S V, Abdullahi A, Charles O, Chattopadhyay P, Devi P, Caputo D, Peacock T, Wattal C, Goel N, Satwik A, Vaishya R, Agarwal M, The Indian SARS-CoV-2 Genomics Consortium(INSACOG), The Genotype to Phenotype Japan (G2P-Japan) Consortium, The CITIID-NIHR BioResource COVID-19 Collaboration, Mavousian A, Lee HJ, Bassi J, Silacci-Fegni C, Saliba C, Pinto D, Irie T, Yoshida I, Hamilton L W, Sato K, Bhatt S, Flaxman S, James C L, Corti D, Piccoli L, Barclay S.W, Rakshit P, Agrawal A, Gupta K R. : SARS-CoV-2 B.1.617.2 Delta variant replication and immune evasion.

Nature 599: 114 - 119, 2021.

8. Yamamoto K , Nagashima M , Yoshida I , Sadamasu K , Kurokawa M , Nagashima M , Kinoshita N , Maeda K , Takasaki J , Teruya K , Ohmagari N : Does the SARS-CoV-2 rapid antigen test result correlate with the viral culture result?.

J Infect Chemother 27(8): 1273 - 1275, 2021

9. Nagashima M , Kumagai R , Yoshida I , Kawakami M , Nagano M , Asakura H , Kaku E , Kitamura Y , Hasegawa M , Hayashi Y , Chiba T , Sadamasu K , Yoshimura

K : Characteristics of SARS-CoV-2 Isolated from Asymptomatic Carriers in Tokyo.

Jpn J Infect Dis 73(4): 320 - 322, 2020

10. 吉田 勲, 長島真美, 千葉隆司, 秋場哲哉 : 2014年に都内の公園が感染拡大の原因となったデング熱について.
小児科, 57(4):395 - 400, 2016.
11. 吉田 勲, 林 志直, 片山佳奈子, 山田澄夫 : 東京都多摩地区における散発下痢症の細菌学的・ウイルス学的検索成績 (1991-1996).
感染症誌, 72(6):599 - 608, 1998.

(II) 著 書

な し

(III) 総説・講座

な し

(IV) 症例・臨床治験・その他

1. 浅倉弘幸, 吉田 勲, 熊谷遼太, 小林甲斐, 長谷川乃映瑠, 三宅啓文, 藤原卓士, 長谷川道弥, 林 真輝, 永野美由紀, 根岸あかね, 山崎貴子, 河上麻美代, 矢尾板 優, 黒木絢士郎, 北村有里恵, 加來英美子, 磯貝 まや, 森功次, 原田幸子, 鈴木 愛, 糟谷 文, 天野有紗, 小杉知宏, 林 志直, 長島真美, 鈴木 淳, 貞升健志 : 東京都内で検出された新型コロナウイルスの次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析 (2020年6月~2021年5月).
東京健安研七年报, 72: 101 - 108, 2021
2. 吉田 勲, 加來英美子, 鈴木 愛, 内田悠太, 森 功次, 千葉隆司, 横山敬子, 貞升健志 : 東京都内山間部において採取したマダニ類における病原微生物の検

索(2019年度).

東京健安研七年報, 71:49 - 53, 2020

3. 内田悠太, 森 功次, 吉田 勲, 原田幸子, 鈴木 愛, 糟谷 文, 小杉知宏, 千葉隆司, 貞升健志: 感染症媒介蚊サーベランスにおけるウイルス検査法の検討.

東京健安研七年報, 71: 55 - 59, 2020

4. 吉田 勲, 加來英美子, 根岸あかね, 鈴木 愛, 内田悠太, 長谷川道弥, 長島真美, 森 功次, 高橋久美子, 井口智義, 小西浩之, 新開敬行, 貞升健志: 東京都内山間部において採取したマダニ類における病原微生物の検索 (2017年度).

東京健安研七年報, 69:65 - 69, 2018

5. 吉田 勲, 加來英美子, 根岸あかね, 北村有里恵, 熊谷遼太, 長島真美, 高橋久美子, 井口智義, 小西浩之, 新開敬行, 貞升健志: 東京都内山間部において採取したマダニ類における病原微生物の検索 (2016年度).

東京健安研七年報, 68:61~64, 2017

6. 吉田 勲, 加來英美子, 根岸あかね, 神門幸大, 北村有里恵, 長島真美, 新開敬行, 秋場哲哉, 貞升健志: 東京都山間部で2005年に採取されたダニ類における病原微生物の検索.

東京健安研七年報, 67:901 - 904, 2016

VII. 図 表

表 1. SARS-CoV-2 リアルタイム RT-PCR に用いたプライマー・プローブセット

部位	プライマー・プローブ名	配列
ORF 1a/b	orf1ab-13215-F	5'-CCGGAAGCCAATATGGATCA-3'
	orf1ab-13257-R	5'-GCAACGGCAGTACAGACAACA-3'
	orf1ab-13238-Probe	FAM-5'-ATCCTTTGGTGGTGCATC-3'-MGB
Np	N-28336-F	5'-CGTTTGGTGGACCCTCAGA-3'
	N-28374-R	5'-CCCCACTGGGTTCTCCATT-3'
	N-28356-Probe	VIC-5'-TCAACTGGCAGTAACC-3'-MGB

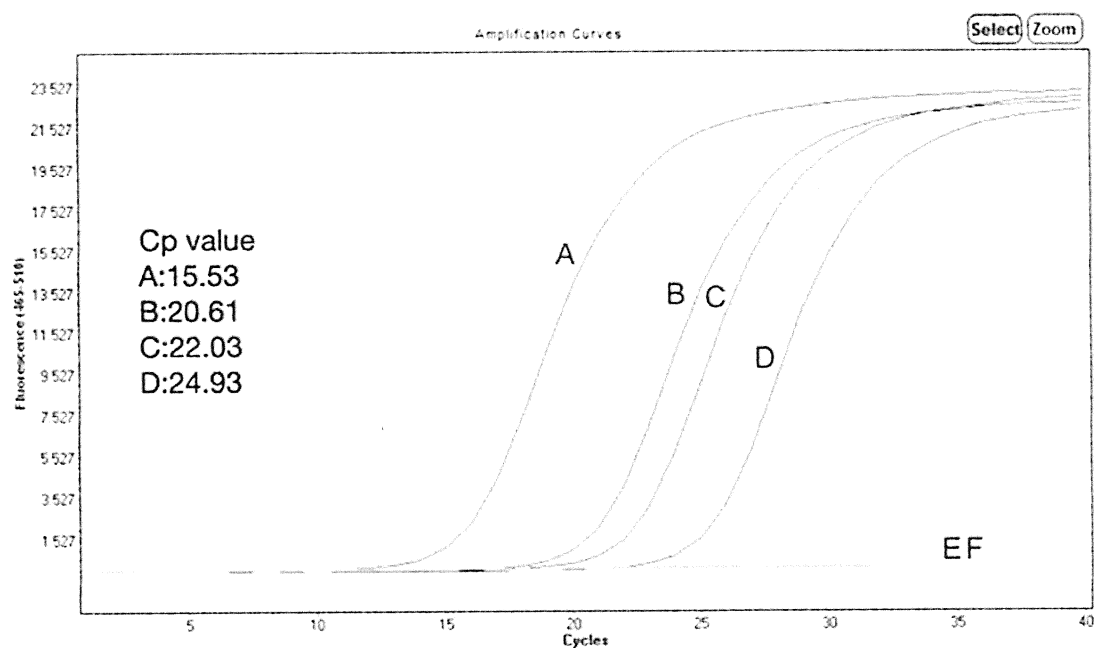


図 1-1. RT-qPCR 法による Vero 細胞及び Vero E6 細胞培養上清中の SARS-CoV-2 RNA 増幅曲線

プライマー-プローブセットは、ORF a/b を用いて測定した

(A) Vero 細胞 接種後 4 日目, (B) Vero 細胞 接種後 3 日目,

(C) Vero E6 細胞 接種後 4 日目, (D) Vero E6 細胞 接種後 3 日目,

(E) 3 日目および (F) 4 日目のウイルス陰性であった Vero E6 細胞の培養上清

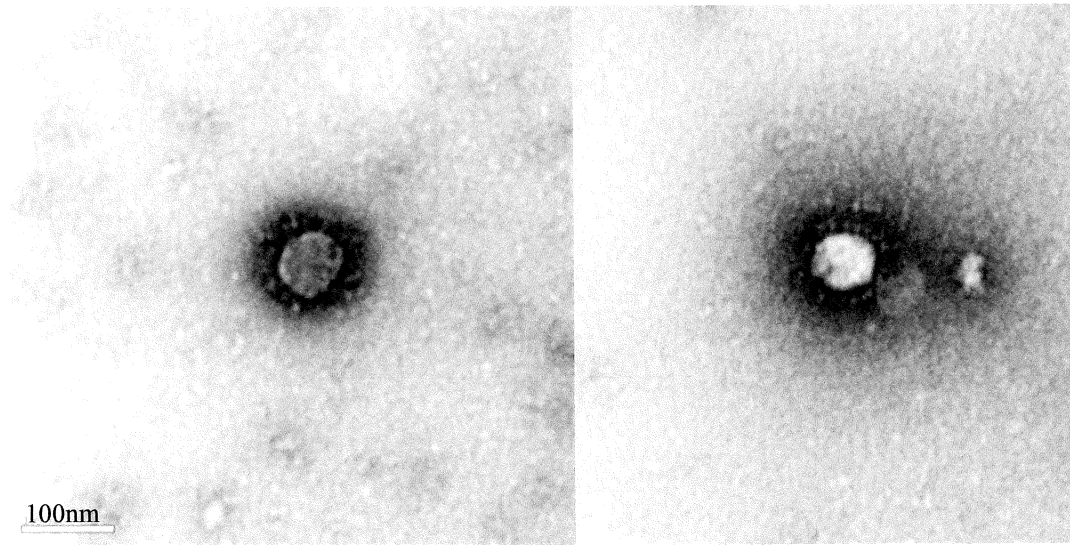


図 1-2. 東京で分離された SARS-CoV-2 (TKYE6182_2020) の透過型電子顕微鏡像
ビリオンの直径は約 **100nm** で, コロナウイルスに特徴的なエンベロープ構造を持つ.

表 2-1. 糞便等の試料を採取した COVID-19 患者の臨床データについて

患者	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
糞便のRT-PCR	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
年齢	83	63	74	53	53	29	61	42	44	21	61	46	50
性別	M	M	M	M	M	F	M	M	M	F	M	M	F
人種	アジア	白人	アジア	白人	アジア	アジア	アジア	アジア	アジア	アジア	アジア	アジア	アジア
臨床的分類	重症	危険	危険	中等度	重症	中等度	中等度	重症	中等度	中等度	重症	危険	中等度
下痢	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
下痢 期間(日)	22	10	3	-	3	-	-	-	1	-	-	-	6
感染経路	クルーズ船	クルーズ船	クルーズ船	市中感染	クルーズ船	市中感染	市中感染	市中感染	市中感染	市中感染	市中感染	市中感染	市中感染
既往歴	高血圧	-	糖尿病	-	COPD	-	-	糖尿病	-	-	-	糖尿病	-
治療	ロピナビル /リトナビル	ロピナビル /リトナビル ペグ・イン ターフェロン レムデシビル	ロピナビル /リトナビル ビドロキシ クロロキン	ロピナビル /リトナビル ペグ・イン ターフェロン	ロピナビル /リトナビル ビドロキシ クロロキン	-	-	ロピナビル /リトナビル	-	-	ロピナビル /リトナビル	ビドロキシ クロロキン	-
						特別医療	特別医療		特別医療	特別医療			特別医療

表 2-2. 糞便検体および咽頭検体の SARS-CoV-2 RT-PCR 結果の推移

日数	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	
患者 1								P(+) 5.14	S(+) 3.51		S(+) 7.83	S(+) 8.28	S(-)				S(-)	
患者 2			P(+) 5.56	P(+) 5.02				S(+) 4.16	P(+) 2.76	P(-)								S(-)
患者 3			P(+) 4.95	P(+) 5.29				P(+) 4.01	P(+) 2.69	S(+) 5.36					S(+) 3.2			P(-)
患者 4	S(+) 5.17		S(+) 4.39		P(+) 4.2	P(-)	P(+) 2.12											
			P(+) 7.53							P(+) 3.08								

・日数：発症してからの日数

・下段の数字はコピー数： $X \log_{10}$

P (+) : 咽頭ぬぐい液 RT-PCR 陽性, P (-) : 咽頭ぬぐい液 RT-PCR 陰性, S (+) : 糞便 RT-PCR 陽性, S (-) : 糞便 RT-PCR 陰性

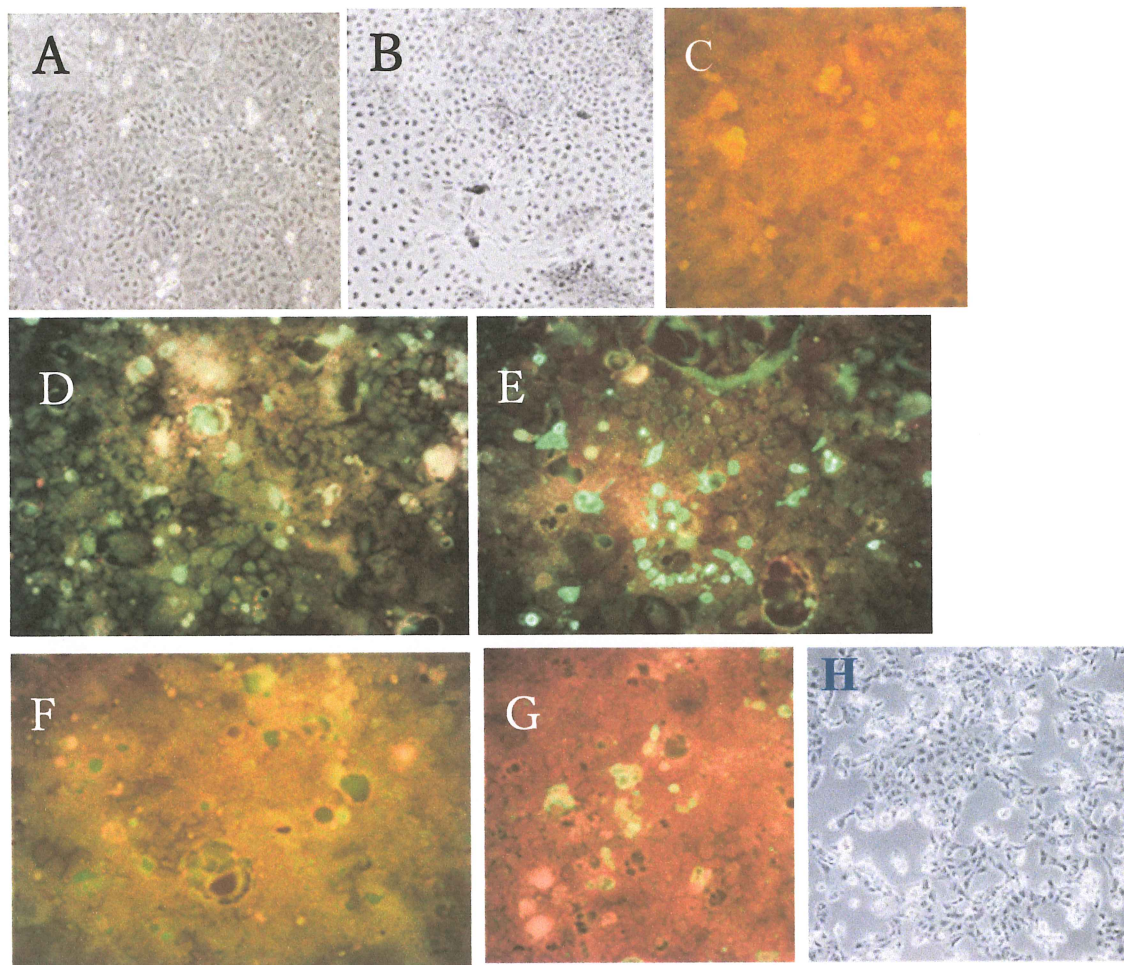
表 3-1. SARS-CoV-2 感染 Caco-2 細胞培養上清の real-time RT-PCR 結果 (Ct 値)

	1G		2G		3G		4G		5G		6G	
	3日目	7日目	3日目	7日目	3日目	7日目	3日目	7日目	3日目	7日目	3日目	7日目
検体 A	13.0	12.4	14.3	14.0	16.6	15.5	18.2	16.6	19.0	17.7	18.6	17.9
検体 B	12.9	12.2	15.2	14.7	17.2	14.7	18.9	16.5	20.1	17.9	18.5	16.7

表 3-2. SARS-CoV-2 感染 Caco-2 細胞の凍結保存後の再培養した培養上清の
real-time RT-PCR 結果 (Ct 値)

試料番号	7G (1G)		8G (2G)		9G (3G)	
	3 日目	7 日目	3 日目	7 日目	3 日目	7 日目
検体 A	19.5	15.6	14.3	14.0	16.6	15.5
検体 B	18.7	16.4	15.2	14.7	17.2	14.7

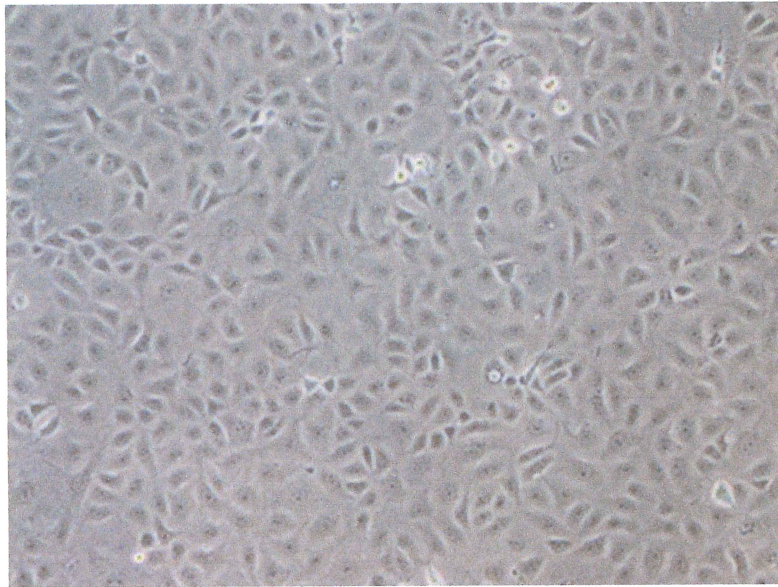
()内は、解凍後再培養の世代数



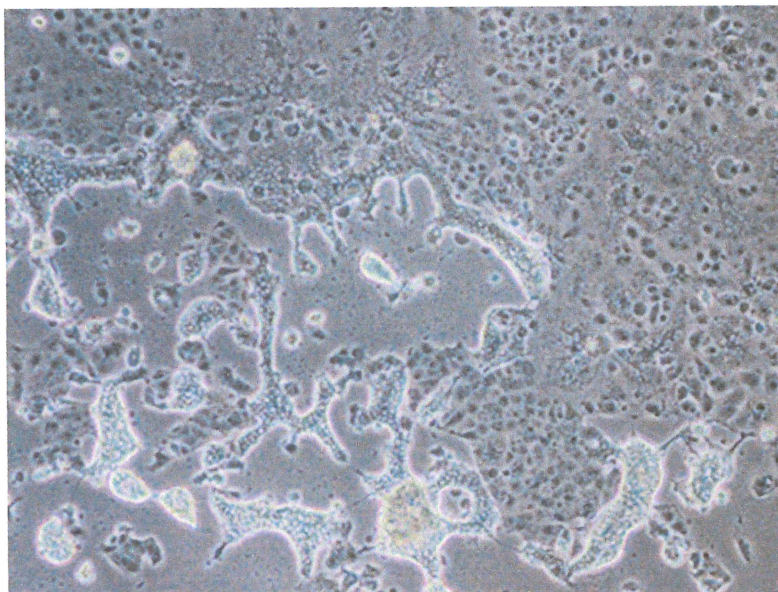
A : 非感染 Caco-2 細胞 (第 1 世代培養 3 日目, 100 倍) B : SARS-CoV-2 感染細胞 (第 1 世代, 感染 3 日目, x100) C : 非感染正常 Caco-2 細胞の患者血漿による蛍光像 (第 4 世代 培養 3 日目, x200) D : 抗スパイクタンパク質抗体による蛍光像 (第 4 世代, 培養 3 日目, x100) E : 患者血漿による蛍光像 (第 4 世代, 培養 3 日目, x200) F : 抗スパイクタンパク質抗体による蛍光像 (第 7 世代*, 培養 3 日目, x100) G : 患者血漿による蛍光像 (第 7 世代*, 培養 3 日目, x200) H : SARS-CoV-2 に感染した Vero E6 細胞に発現した CPE 像 (感染 3 日目, x100)

* : SARS-CoV-2 感染 Caco-2 細胞を 1 ヶ月間凍結保存した後、再培養した細胞

図 3-1. 倒立顕微鏡及び蛍光顕微鏡による正常 Caco-2 細胞と SARS-CoV-2 感染した Caco-2 細胞像

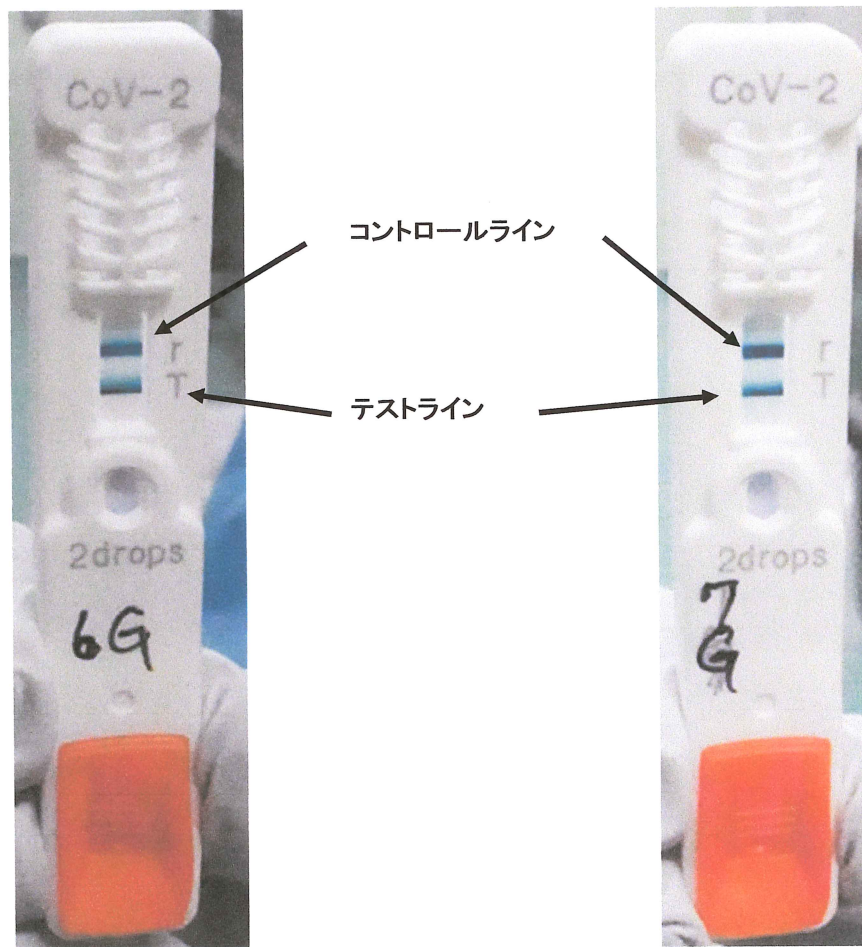


Vero E6/ TMPRSS2 細胞（正常細胞）x100
（培養 3 日目）



Vero E6/ TMPRSS2 細胞（SARS-CoV-2 接種 3 日目）
x100

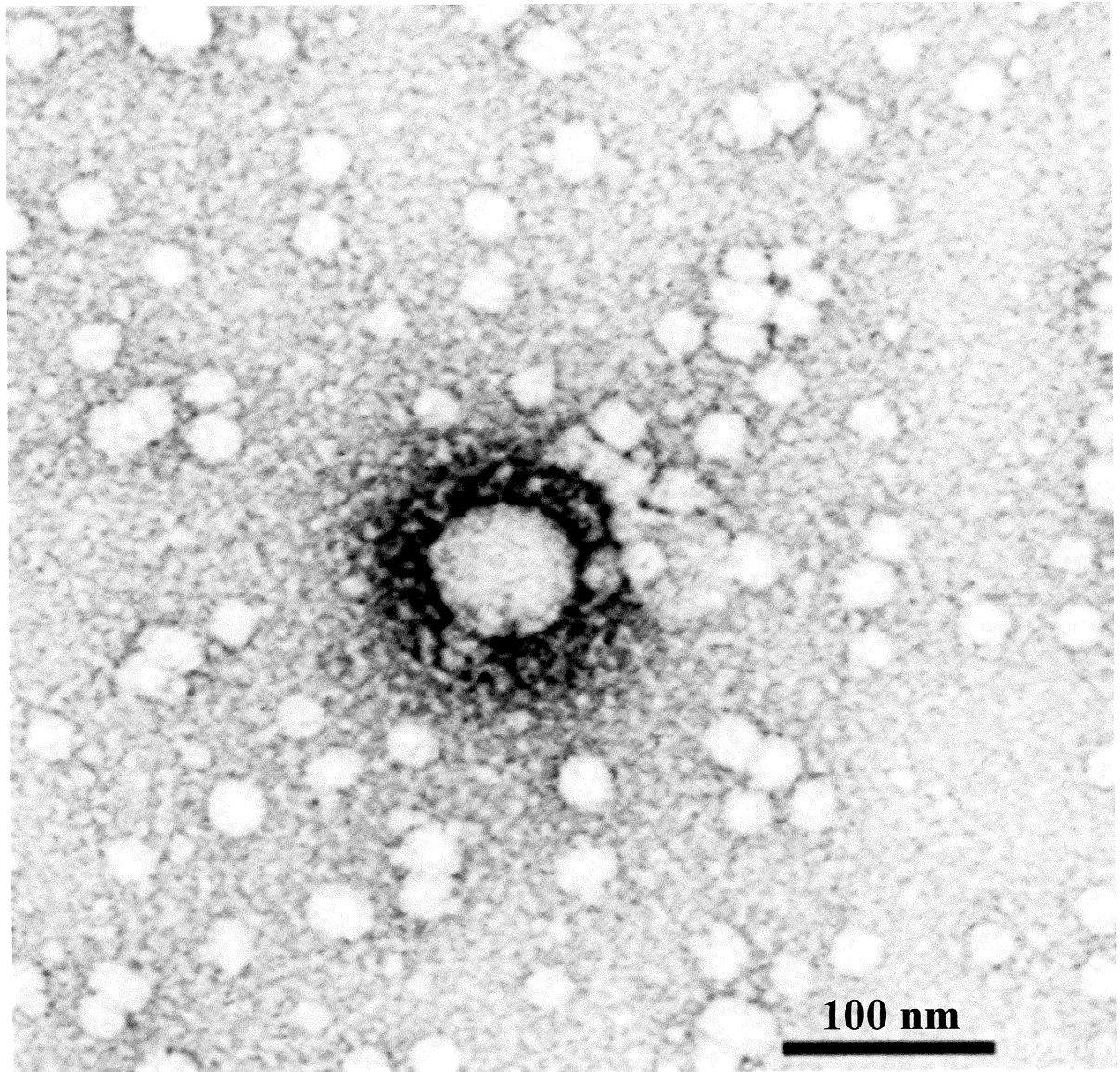
図 3-2. SARS-CoV-2 に感染した Caco-2 細胞の第 6 世代培養上清を Vero E6/ TMPRSS 2 細胞に接種し発現した細胞変性効果（CPE）像



継代6世代の培養上清
(培養7日目, 凍結保存前)

継代7世代の培養上清
(凍結保存1ヶ月後, 再培養7日目)

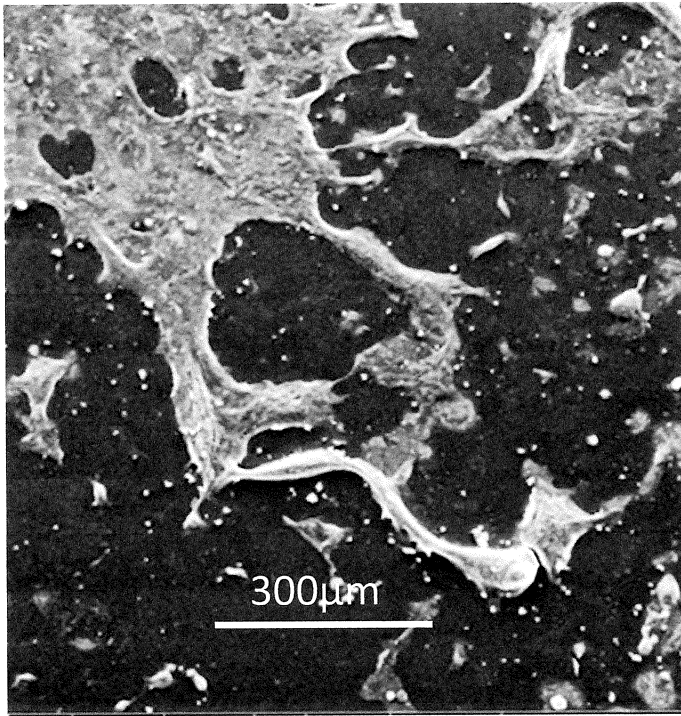
**図 3-3. SARS-CoV-2 感染 Caco-2 細胞培養上清の迅速抗原検査
キット結果**



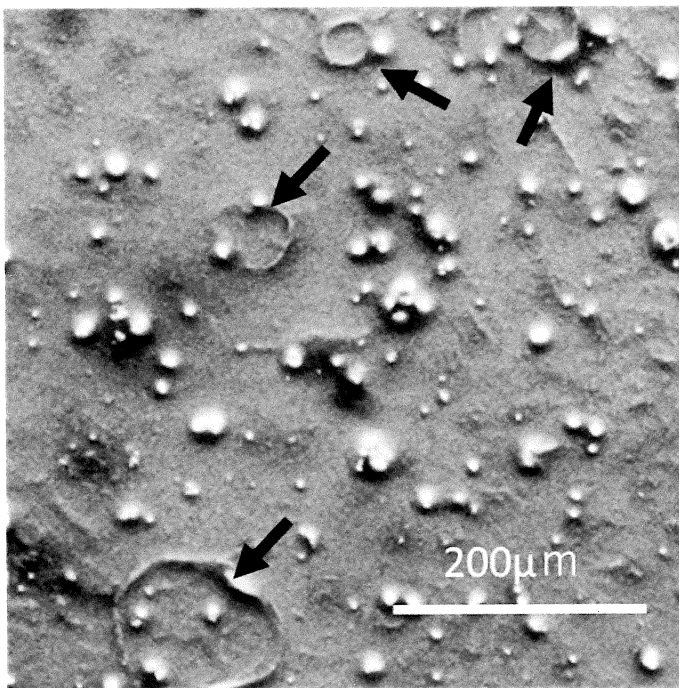
x50,000

小さな球状のものはエクソソーム（細胞外小胞）

図 3-4. 感染 **Caco-2** 細胞の培養上清中の **SARS-CoV-2** の透過型電子顕微鏡像
(第6世代, 培養7日目)



**A : SARS-CoV-2 感染で生成された合胞体 (Syncytium)
Vero E6/TMPRSS2 細胞
(培養 3 日目, x308)**



**B : SARS-CoV-2 感染 Caco-2 細胞の表面
(第 4 世代, 培養 3 日目, x486)
矢印はドームを示す**

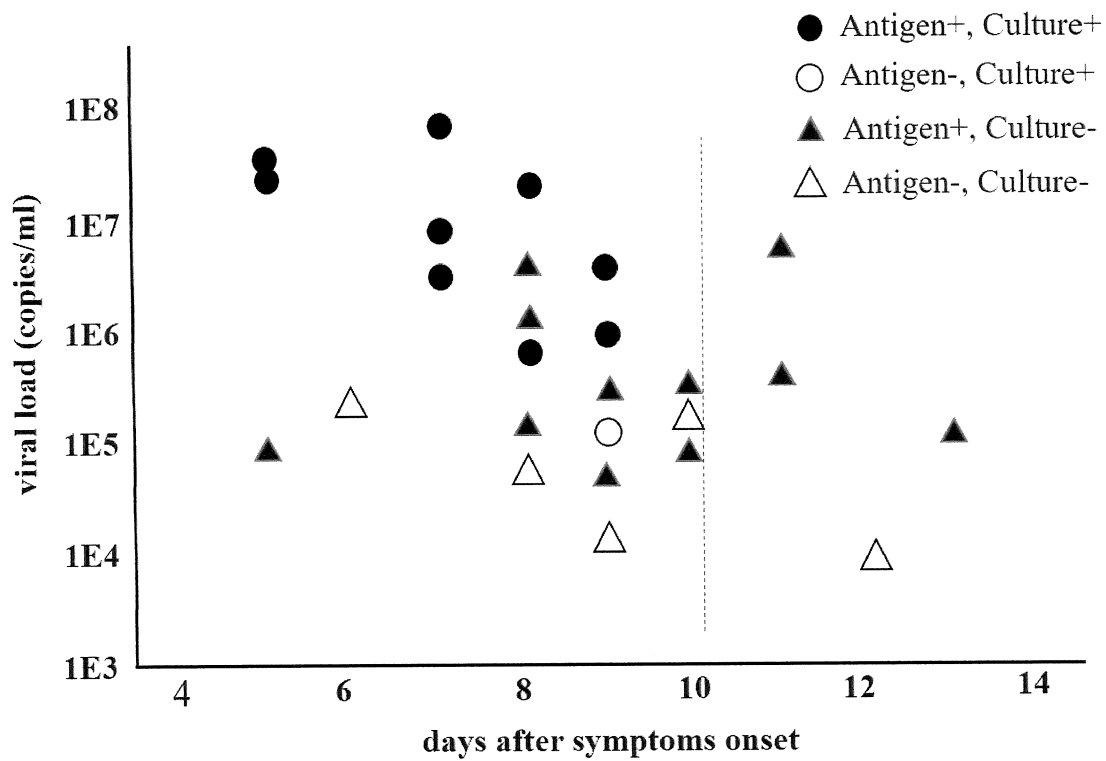
図 3-5. SARS-CoV-2 を感染させたVeroE6 / TMPRSS2およびCaco-2 細胞の走査型電子顕微鏡像

表 4-1. 迅速抗原検査法 (RAT) とウイルス分離培養結果

	RAT (+)	RAT (-)	計
分離培養(+)	9	1	10
分離培養(-)	11	5	16
計	20	6	26

迅速抗原検査法 (RAT) : エスプライン SARS-CoV-2

ウイルス分離培養 : Vero E6 細胞, Vero E6/TMPRSS2 細胞を用いた



破線：療養期間 10 日を示す

図 4-1. SARS-CoV-2 迅速抗原検査とウイルス培養の結果

発症からの経過時間に応じて、ウイルス量の測定とウイルス分離培養を実施した。すべての検査は鼻、咽頭ぬぐい液で実施した。ウイルス量はRT-PCR法を用いて決定した。迅速抗原としてエスプライン® SARS-CoV-2を使用した。

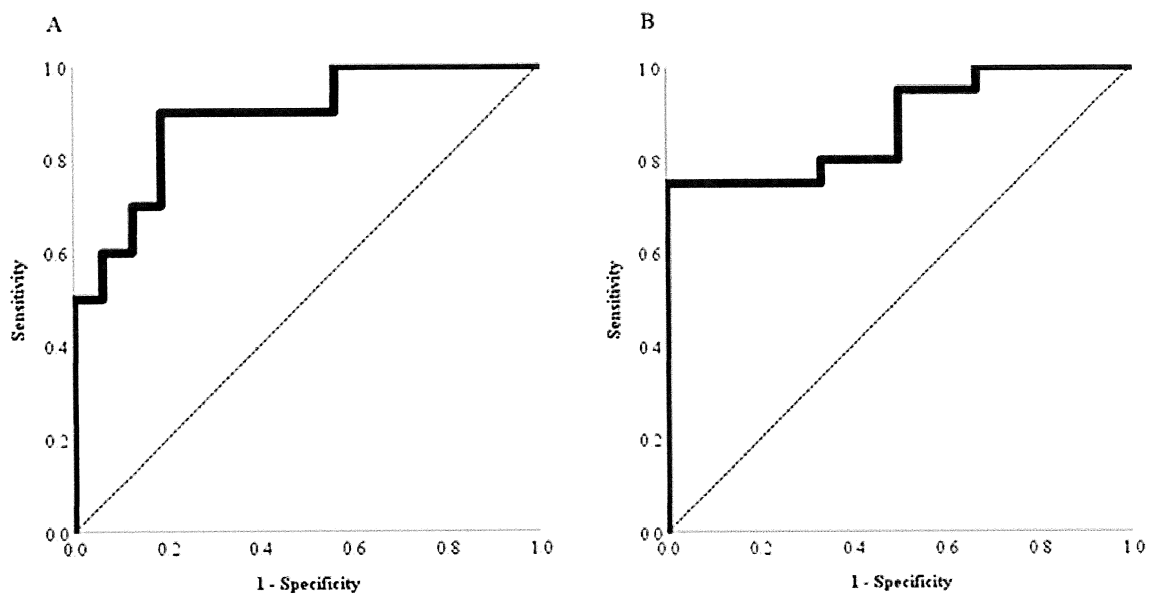


図 4-2. SARS-CoV-2迅速抗原検査キットの受信者動作特性曲線

A：SARS-CoV-2ウイルス量に基づくウイルス培養結果

B：SARS-CoV-2ウイルス量に基づく迅速抗原検査結果

ウイルス量は、RT-PCR法により測定した

エスプライン® SARS-CoV-2を迅速抗原検査キットとして使用

表 5-1. オミクロン変異株 (BA.1, BA.2) の培養に及ぼす維持培地の影響

細胞名	培地名	ウイルス希釈倍率						
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
Vero E6	D-MEM (Sigma)	+	+	+	+	-	-	-
	D-MEM (Nissui)	+	+	+	-	-	-	-
	E-MEM	+	+	+	-	-	-	-
Vero E6 /TMPRSS2	D-MEM (Sigma)	+	+	+	+	+	-	-
	D-MEM (Nissui)	+	+	+	+	-	-	-
	E-MEM	+	+	+	+	-	-	-

D-MEM (Sigma) : 高グルコース含有

表 5-2. オミクロン変異株 (BA.1, BA.2) の培養温度の違いによる増

培養温度	細胞名	ウイルス希釈倍率						
		10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
37°C	Vero E6	+	+	+	+	+	-	-
	TMPRSS2	+	+	+	+	+	+	+
	Vero	+	+	+	+	+	+	-
33°C	Vero E6	+	+	+	+	+	-	-
	TMPRSS2	+	+	+	+	+	+	-
	Vero	+	+	+	+	-	-	-

D-MEM (Sigma) : 高グルコース含有

表 5-3. オミクロン変異株 (BA.1, BA.2) の増殖に及ぼす維持培地への添加剤の影響

細胞名	添加剤	ウイルス希釈倍率					
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
Vero E6	D-MEM (Sigma:グルコース濃度.4.5mg/ml)	+	+	+	+	+	-
	なし	+	+	+	+	-	-
	D-MEM グルコース添加. 濃度 3mg/ml (Nissui)	+	+	+	+	-	-
Vero E6	D-MEM グルコース添加. 濃度 5mg/ml (Nissui)	+	+	+	+	-	-
	ピルビン酸ナトリウム添加	+	+	+	+	+	-
	E-MEM	+	+	+	+	-	-
Vero E6 /TMPRSS2	D-MEM (Sigma:グルコース濃度.4.5mg/ml)	+	+	+	+	+	-
	なし	+	+	+	+	-	-
	D-MEM グルコース添加. 濃度 3mg/ml (Nissui)	+	+	+	+	+	-
Vero E6 /TMPRSS2	D-MEM グルコース添加. 濃度 5mg/ml (Nissui)	+	+	+	+	+	-
	ピルビン酸ナトリウム添加	+	+	+	+	+	-
	E-MEM	+	+	+	+	-	-

表 5-4. オミクロン変異株 (BA.1, BA.2) の増殖に対するアンフトテリシン B の影響

細胞名	アンフトテリシン B 濃度	ウイルス希釈倍率						
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	
Vero E6	0 µg/ml	+	+	+	+	-	-	-
	3.125 µg/ml	+	+	+	-	-	-	-
	6.25 µg/ml	+	+	+	-	-	-	-
	12.5 µg/ml	+	+	+	-	-	-	-
Vero E6 /TMPRSS2	0 µg/ml	+	+	+	+	-	-	-
	3.125 µg/ml	+	+	+	+	-	-	-
	6.25 µg/ml	+	+	+	+	-	-	-
	12.5 µg/ml	+	+	+	+	-	-	-

基礎培地：高グルコース D-MEM

表 5-5. オミクロン変異株の分離に用いた臨床サンプルの内訳と分離株数

試料種別	咽頭又は鼻腔 ぬぐい液	唾液	種別不明	計
試料数	45	21	4	70
分離株数	31	7	2	40
分離率%	44.3%	10.0%	2.9%	57.1%

表 5-6. 臨床検体からのオミクロン変異株の分離結果

試料総数	内 訳			
	分離数 合計	Vero E6 のみ	Vero E6 /TMPRSS2 のみ	Vero E6 と Vero E6/TMPRSS2 併用
70	40	5	15	20
分離率%	57.1%	7.1%	21.4%	28.6%
				Vero 17.1%

維持培地：高グルコース含有 D-MEM

Vero 細胞で分離された株は、Vero E6, Vero E6/TMPRSS2 細胞から全て分離された。

表 5-7. アンフオテリシン B 添加 MM と MM による臨床検体からのオミクロン変異株分離結果の比較

分離に使用した 維持培地	アンフオテリシン B 加 高グルコース D-MEM	高グルコース D-MEM		
		Vero E6 のみ	Vero E6 /TMPRSS2 のみ	Vero E6 と VeroE6/TMPRSS 2の併用
試料総数	Vero E6			高グルコース D-MEM 分離数計
25	21	1	11	7
分離率 (%)	84.0%	4.0%	44.0%	28.0%
内訳				
BA.1	18	1	9	7
BA.2	3	0	2	0
				17
				2
				76.0%