

学位論文要旨

氏名 吉田 勲



論文題目

「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」

指導教授承認印

久保 誠



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

氏名： 吉田 勲

【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（COVID-19）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

中国武漢市からの帰国者と濃厚接触者でReal-time 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

COVID-19患者の鼻腔ぬぐい液を試料とし、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細胞に試料を用いて、SARS-CoV-2持続感染系の構築を試みた。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Real-time-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、分離率が向上す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

供試試料 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現時点でも流行し、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

国内での感染者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 10 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相関がみられた。

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℃付近では増殖性が低く、従来通り 37℃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が向上す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不明な点を解明した。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。