

厚生労働科学研究費補助金「アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と共同研究体制の強化に関する研究」分担報告書

「Molecular analysis and control of acute respiratory virus infections」

分担研究者 松山州徳 国立感染症研究所 ウイルス第三部四室

研究要旨

急性呼吸器感染症 (ARI) ウイルスの多くは、咳を介して感染することから感染力が強く、瞬く間に世界中に広がる可能性を内包している。このような感染症に立ち向かうために、研究者は国際的なネットワークを構築し、情報を交換できる環境をつくることが必要不可欠であると考え。ARI ウイルスにはインフルエンザ、RS、パラインフルエンザ、メタニューモ、コロナ、アデノ、ライノ、ボカウイルスが知られており、95%はこれらを原因とするが、残り5%の原因は未だに不明である。今回、中国 CDC の Yuelong Shu 博士と情報を共有し、インフルエンザ以外の ARI ウイルスについて、原因不明病原体の解析、ウイルス分離技術の向上を試みた。まず、ARI の検査に利用するための、ウイルス高感受性細胞の作成を試みた。数種の ARI ウイルス (インフルエンザ、メタニューモ、コロナ) は肺に特異的に発現している膜貫通型セリンプロテアーゼ TMPRSS2 を利用して細胞に感染することが報告されており、TMPRSS2 の発現した細胞を作成し、既存のヒトコロナウイルス (229E, NL63, SARS) と新型コロナウイルス (MERS-HCoV) に対する感受性を比較した。TCID50、ウイルス増殖、感染細胞の免疫染色を行ったが、いずれのウイルスでも TMPRSS2 発現細胞の方が非発現細胞よりも感受性が高かった。特に新型コロナウイルスでは 100 倍もの高い感受性が見られた。またウイルス増殖が非常に低いと考えられている NL63 において、51 倍の増殖が見られた。TMPRSS2 細胞はコロナウイルスの研究とサーベイランスの分野に貢献できるものと考えられる。一方、近年の検査技術の向上、例えばウイルス高感受性細胞の開発や、マルチプレックス検査法、次世代シーケンサーの導入により、不明とされてきた病原体が明らかになる可能性がある。しかし、最新の技術を駆使してもなお、検出できない病原体があることも事実である。中国側の研究でも今のところ新規病原体の検出には成功していない。本年度我々は、実際に地方衛生研究所より原因不明の上気道炎検体を入手し、病原体の分離精製及び同定を行った。その結果検出された病原体は風疹のワクチン株であり、急性呼吸器感染症とは無関係の予防接種に由来するウイルスであることがわかった。本結果は、不明病原体の分離同定の難しさとリスクを示す一例である。

A. 研究目的

ARI ウイルスの研究を難しくしている原因は様々あるが、その一つは、肺胞の性質を維持している良い培養細胞株が無いことにある。培養細胞で増殖が可能なウイルスは研究が良く進み、

不可能なウイルスは研究が遅れる傾向がある。ヒト肺胞上皮細胞の初代培養は難しく、数代の継代で肺胞の性質が無くなってしまふことが知られている。最新の初代培養法を用いれば、肺胞の性質とインフルエンザウイルスの感受性を維

持したまま長時間培養できることが報告されているが、特殊な技術であり、簡単に扱えるものではない。また、よく研究に利用されている肺由来の細胞株は、肺胞の性質をある程度維持しており、低いながら様々な ARI ウイルスに感受性があるが、増殖が遅く性状が不安定であり、培養も難しい。肺胞の性質を維持しつつ扱いやすい培養細胞があれば、新たな ARI ウイルスの分離や既存の ARI ウイルスの基礎研究が劇的に進展することが期待できるだけでなく、病原体診断やサーベイランスの分野でも利用できるはずである。最近の我々の研究から、コロナウイルスは、肺胞特異的プロテアーゼ (TMPRSS2) を利用して感染することがわかっている。この知見を他の ARI ウイルスにも広げて、呼吸器ウイルスに対する高感受性細胞を樹立したい。一方、急性呼吸器感染症の検査の結果、原因を特定できない検体は多数存在する。このような検体を入手し、詳細に検査することで、新しい病原体を発見することが、本共同研究の目的である。我々は実際に、地方衛生研究所で診断できなかった患者由来の検体を入手し、病原体の特定をおこなうことで、ウイルスの分離同定を行う上で問題点を明確にした。

B. 研究方法

・呼吸器ウイルス高感受性細胞作成の試み
VERO 細胞に TMPRSS2 を発現させた細胞 (Shirogane Y J Virol. 2008) を譲り受け、感染実験に用いた。また HeLa 細胞でも同様に TMPRSS2 発現細胞を作成した。様々なヒトコロナウイルス (229E, NL63, OC43, SARS, EMC) を感染させ、細胞変性効果、TCID50、ウイルス増殖を比較した。また、細胞変性を示さなかった NL63 については、抗スパイク蛋白抗体を用いて免疫染色をおこない、感染価を比較した。

・不明病原体の解析

山形県衛生研究所より提供を受けた不明病原体について、500ml の培養上清を用い、常法の PEG 沈殿法にて濃縮後、PBS にて溶解し、ショ糖密度勾配遠心分離法 (15%、40% ショ糖) にて濃縮精製を行った。続いて濃縮画分の感染価を確認後、電子顕微鏡と次世代シーケンシングを行い、病原体を決定した。

C. 研究結果

・高感受性細胞について

HCoV-EMC は TMPRSS2 非発現細胞では感染 48 時間で細胞のラウンディングが起こるのに対し、発現細胞では 16 時間程度で、著しく大きい細胞融合が見られた。同じ感染価のウイルスを用いて TCID50 で比較した場合、TMPRSS2 発現細胞ではウイルス感受性が 100 倍程度高くなっていた (表)。SARS-CoV については、既に 2010 年に報告している結果と同様であるが、TMPRSS2 発現細胞で、TCID50 は 7.9 倍、ウイルス増殖は 2.5 倍であった (表)。鼻風邪、上気道炎のコロナウイルス NL63 については、細胞変性効果は見られなかったが、免疫染色による感染細胞の計測結果 (FFU) では TMPRSS2 発現細胞では 5.1 倍感受性が高くなっていた (表)。また他の鼻風邪、上気道炎コロナウイルス 229E には 1966 年に分離され、長年研究室で継代されているラボ株と、2008 年に分離された臨床株があるが、ラボ株で 1.4 倍、臨床株で 11.5 倍の HeLa/TMPRSS2 での感受性が見られた (表)。さらに、鼻風邪上気道炎コロナウイルスの OC43 は HeLa では全く細胞変性効果が見られなかったが HeLa/TMPRSS2 では細胞の浮遊が見られた。感受性細胞として知られる RD 細胞との比較では、HeLa/TMPRSS2 の方が 10 倍程度ウイルス感受性が高くなっていた (表)。

・不明病原体について

電子顕微鏡像では、エンベロープを有する直径 90nm 前後の円形粒子が見られた。さらに次世代シーケンスの結果、風疹ウイルスが、4796 read 検出された。この配列は風疹ワクチン株に 3 つの変異が含まれるものであった。RK 細胞での細胞変性の形態と、風疹抗体による中和、ウイルス増殖の温度感受性の試験の結果は、いずれもこの病原体が風疹ワクチン株であることを示すものであった。

D. 考察

・呼吸器ウイルス高感受性細胞について

コロナウイルスのスパイク蛋白の活性化にはプロテアーゼが必要と考えられており、本研究で用いた細胞では TMPRSS2 がスパイクを活性化したと考えられる。呼吸器ウイルスの多くがウイルスは肺胞特異的なプロテアーゼ、特に TMPRSS2 を利用して感染すると考えられるので、コロナウイルスと同様に、ARI ウイルスを分離するためには、TMPRSS2 発現細胞を使うことが望ましいと思われる。

・不明病原体の解析について

実際のウイルス分離作業に際して、まずは患者情報の詳細な検討の末に、可能性のある病原体を詳細に解析した後に、次世代シーケンス解析を行うべきである。本検体の採取から 22 日前に MR ワクチンが接種されていたことが分かっており、一回目の次世代シーケンスデータか

ら、風疹ウイルスを疑うことは可能であったと思われる。病原体検出の際には患者情報の事前の精査が重要である。一方、病原体不明と判断された検体であっても、そのほとんどが検体採取のタイミングや現行検査法の感度の限界による、既知のウイルスの検査漏れであると考えられ、詳細な病原体解析に進む前段階で、適切に検体をふるい分けするための経験の蓄積とそのプロトコル化が重要であると思われる。

E. 結論

1 . HeLa 及び Vero の TMPRSS2 発現細胞はコロナウイルスの分離に有効な細胞である。

2 . 本研究では次世代シーケンス、細胞培養、病原体精製、電子顕微鏡などで多くの人員と費用を費やしたが、得られた結果は取るに足らないものであった。しかし行った過程は不明病原体を明らかにするためには必要な作業であり、さらに我々がワクチン株の特定に至ったことは、今回、新規病原体の検出システムを構築できたことを意味する。

F. 研究発表

無し

G. 知的所有権の取得状況

無し

カウンターパートの研究計画

中国インフルエンザサーベイランスネットワーク
(441インフルエンザ実験室、556定点病院)

10~15臨床検体(インフルエンザ様疾患)/年/定点病院

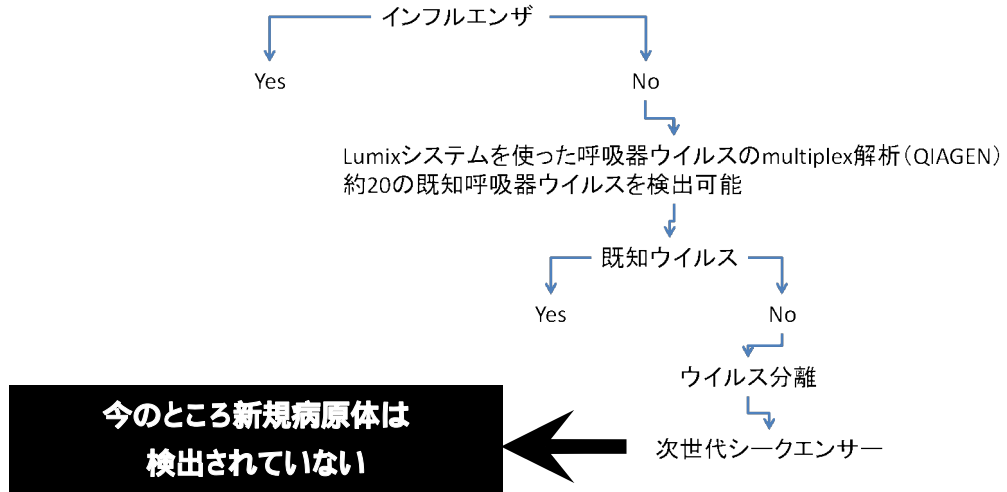


図1 中国 CDC インフルエンザセンター (Dr. Yuelong Shu) との共同研究
インフルエンザサーベイランスネットワークで得られる検体の中から、道の病原体を検出する試み。

表 . TMPRSS2 発現細胞のコロナウイルス感受性

Virus	Assay	VERO	VERO/TMPRSS2	倍率
EMC	T CID 50	4.3 ± 0.5	6.3 ± 0.5	100
	growth @ 24h	3.8 ± 0.4	4.3 ± 0.7	3.2
SARS	T CID 50	6.3 ± 0.5	7.2 ± 0.9	7.9
	growth @ 48h	5.7 ± 0.3	6.1 ± 0.2	2.5
NL63	FFU	2.1	3.8	51
	growth	Not done	Not done	-

Virus	Assay	HeLa	HeLa/TMPRSS2	倍率	
229E	ラボ株	growth @ 48h	5.0	5.1	1.4
	臨床株	growth @ 48h	3.7	5.0	11.5
OC43	T CID 50	No CPE	4.5	RD細胞の10倍	
	growth	Not done	Not done	-	

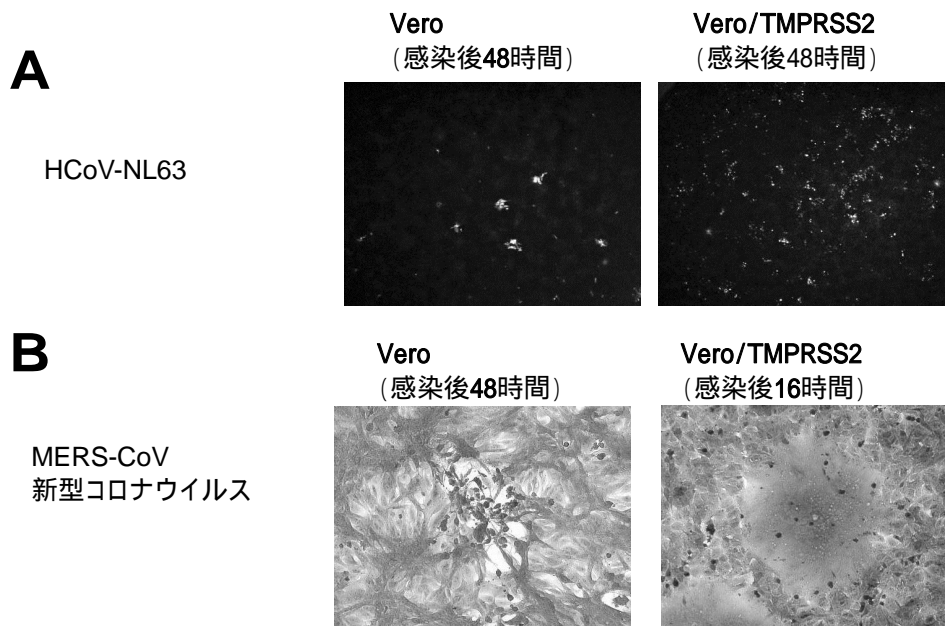


図2 . TMPRSS2 発現細胞へのコロナウイルスの感染

- A. HCoV-NL63 感染細胞は、抗スパイク蛋白抗体で検出した
 B. 新型コロナウイルスの感染細胞の光学顕微鏡写真

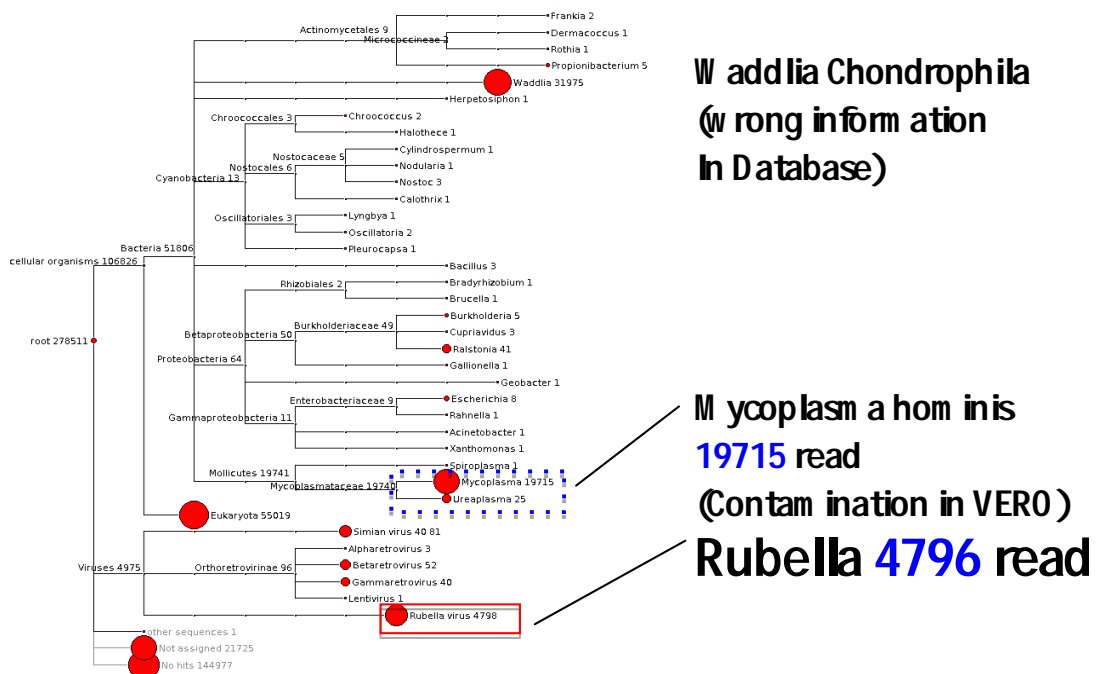


図3 不明病原体の次世代シーケンス

山形県衛生研究所から提供された VERO-E6 細胞でよく増殖する病原体は、発熱、呼吸器症状を示す小児の咽頭拭い液に由来する。この不明病原体を精製し同定したところ、MR ワクチンに由来する風疹のワクチン株であった。