

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

協力研究報告書

「2012年に発生した新型ヒトコロナウイルス侵入に備えた診断、治療法確立のための
動物モデル開発と SARS-CoV との鑑別に関する研究」

MERS コロナウイルスのストックウイルスの作製と
電子顕微鏡を用いた超微細構造の解析

協力研究者：永田 典代 国立感染症研究所 感染病理部 第二室長

研究要旨： エラスムス医学研究所より分与いただいた MERS-CoV を、VeroE6 細胞に接種し、研究に必要なワーキングウイルスを準備した。また、透過型電子顕微鏡を用いてウイルス粒子および感染細胞の超微細構造解析を行った。その結果、超微細形態学的に SARS-CoV との明らかな相違点は無かった。

代表研究者：

国立感染症研究所

感染病理部 岩田奈織子

研究協力者：

国立感染症研究所

感染病理部 鈴木忠樹、竹内佳子、会田
萌子、片岡紀代、長谷川秀樹

ウイルス第三部 松山州徳

A. 研究目的

2012年に中東で発生した重症の呼吸器症候群の原因は、新型ヒトコロナウイルスであり、中東呼吸器症候群コロナウイルス(MERS-CoV)と命名された。このウイルス感染症は重度の肺炎、下痢、腎障害等を主徴とするため、すでに2003年に世界的な流行を引き起こした重症急性呼吸器症候群コロナウイルス(SARS-CoV)との鑑別が重要である。

そこで本研究では、このウイルスの診断法・治療法の確立を目的として、MERS-CoVのストックウイルスの作製と電子顕微鏡を用いた超微細構造の解析を行った。

B. 研究方法

1. ワーキングウイルスの調整

オランダのエラスムス医療センターより松山州徳博士に分与いただいた HCoV-EMC 株から 100 μ l を本研究のストックウイルスとして使用した。このうち 20 μ l を 5 ml の 2%牛胎仔血清添加細胞培養液に懸濁し、培養面積 75 cm^2 の培養フラスコに培養した VeroE6 細胞に接種した。1時間 37 $^{\circ}$ で感染後、リン酸緩衝液で 1回洗浄し、20 ml の 2%牛胎仔血清添加細胞培養液を加え 37 $^{\circ}$ の CO₂ インキュベーターで培養した。ウイルス量は VeroE6 細胞における 50% 細胞培養感染量(TCID₅₀)を Kärber 法によって算出して表した。VeroE6 細胞は事前にマイコプラズマ培養試験で陰性であることを確認済である。

なお、いずれの感染実験も国立感染症研究所村山分室高度安全実験施設においてバイオセーフティーレベル 3 病原体取り扱い規定に従い実施した。

2. 透過型電子顕微鏡用サンプル調整 (ネガティブ染色)

EMC Ve6 p1 株を前述と同様の手順で VeroE6 細胞に接種し、2 日目の細胞上清を用いてネガティブ染色用サンプルを作製した。培養上清を 300 μ l 採取し、8% グルタルアルデヒドを 100 μ l 添加した。その後、5 分以上紫外線 (UV) 照射して、不活化処理を行った。10,000 rpm 1 分間遠心後、Grid-on-Drop 法により 2% リンタングステン酸によるネガティブ染色を実施した。ネガティブ染色後に再度、安全キャビネットの UV を利用して、UV 照射を 10 分以上行った。観察は、透過型電子顕微鏡 JEM-1400 (日本電子) で行い、撮影は付属の CCD カメラを用いた。

なお、残りのウイルス液はワーキングウイルス EMC Ve6 p2 として -80 に保管した。

3. 走査型電子顕微鏡用サンプル調整 (臨界点乾燥法)

VeroE6 細胞に前述と同様の手順でウイルスを接種し (M.O.I. = 0.1)、感染 1 日目の細胞を電子顕微鏡観察用サンプルとした。ただし、事前に培養細胞を円形のガラスシートに 1 日培養したものをを用いた。細胞上清を廃棄後、0.2M スクロース添加 0.1M カコジル酸緩衝液で 3 回洗浄し、2.5% グルタルアルデヒド 1% パラホルムアルデヒド混合 0.1M カコジル酸緩衝液で固定した。2 次固定は 1% 四酸化オスミウムを使用した。常法どおり臨界点乾燥処理まで行い、観察は、走査型電子顕微鏡 JSM-6700F (日本電子) で行い、撮影は付属の CCD カメラを用いた。

4. 感染細胞を用いた透過型電子顕微

鏡用サンプル調整 (樹脂包埋法)

VeroE6 細胞に前述と同様の手順でウイルスを接種し (M.O.I. = 0.1)、感染 1 日目の細胞を電子顕微鏡観察用サンプルとした。細胞上清を廃棄後、0.2M スクロース添加 0.1M カコジル酸緩衝液で 3 回洗浄し、スクレーパーで細胞をはがして 15 ml チューブに回収した。これを 2,000rpm、10 分室温で遠心し、上清を廃棄した。その後、2.5% グルタルアルデヒド 1% パラホルムアルデヒド混合 0.1M カコジル酸緩衝液で懸濁し、すぐに 1.5 ml チューブに移して 10,000 rpm 1 分間遠心し 1-2 mm³ 程度の細胞ペレットを得た。新しい固定液に交換し 1 時間固定を行った。2 次固定は 1% 四酸化オスミウムを使用し 4 1 時間固定とした。常法どおり Epon 樹脂包埋ブロックを作製し、超薄切片を準備した。鉛染色後、観察は、透過型電子顕微鏡 JEM-1400 (日本電子) で行い、撮影は付属の CCD カメラを用いた。

C. 結果

MERS-CoV EMC 株を接種した VeroE6 細胞はおよそ 2 日後 (52 時間後) に約 50% の細胞で細胞変性効果 (CPE) を示した (図 1A)。これを -80 に保管し、その後、37 にて溶解した。2,000 rpm、4 20 分間遠心し、この上清をワーキングウイルス (EMC Ve6 p1 株) として分注し、-80 に保管した。EMC Ve6 p1 株のウイルス感染価は 10^{6.5} TCID₅₀/ml であった。MERS-CoV の CPE は単一細胞が丸くなって変性・壊死するものであり、感染の広がりには比較的遅かった。

EMC Ve6 p1 株感染 VeroE6 細胞培養上清を用いた、ウイルス粒子の透過型電子顕微鏡観察では典型的なコロナウイ

ルスの形状が認められ（図 1B）、SARS-CoV 等、他のコロナウイルスとの鑑別は不可能であった。

EMC Ve6 p1 株感染 VeroE6 細胞の走査型電子顕微鏡では細胞表面に無数のウイルス粒子が出芽する様子が観察された（図 2）。透過型電子顕微鏡観察では細胞質内での旺盛なウイルス粒子の増殖が観察された（図 3）。種々の形成段階のウイルス粒子像が確認された（図 3）。ウイルス粒子の観察のポイントとしては、まず低倍で細胞周囲のウイルス粒子の有無を確認して、粒子が細胞周囲に付着している細胞の核と細胞質の変化を確認すると観察がスムーズであった。

D. 考察

MERS-CoV は VeroE6 細胞に感染し、細胞は CPE を示すため感染の有無の判断は比較的容易で TCID₅₀ 算出によるウイルス感染量の測定に応用することが出来た。ただし、増殖速度は SARS-CoV と比べて遅い。分与後のウイルス調整条件は、すでに我々が所有している SARS-CoV とほぼ同様である。

また、MERS-CoV は細胞培養上清にウイルスが浮遊するため、ネガティブ染色法による電子顕微鏡学的迅速診断が可能な病原体の一つであった。しかしながら、電子顕微鏡検査でコロナウイルスの種を判断することは出来ないため、遺伝子学的検索と併行で行う必要がある。

感染細胞の超微細構造解析の結果、SARS-CoV と同様なウイルス増殖様式であることが形態学的に明らかとなった（参考文献 Qinfen Z *et al.*, J Med Virol 2004. 73:332-337）。VeroE6 細胞を用いた感染実験は今後、SARS-CoV との

比較解析の際に汎用性があると考えられた。

なお、本研究の一環で作製したウイルス粒子のネガティブ染色像は、感染症研究所ホームページに一般公開している（<http://www.nih.go.jp/niid/ja/diseases/alpha/merm.html>）。

E. 結論

VeroE6 細胞を使用して MERS-CoV のワーキングウイルスを作製し、電子顕微鏡学的解析を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kotani O, Shirato K, Nagata N, Ikeda H, Takahashi K, Taguchi F. Neuropathogenesis of a mouse-adapted porcine epidemic diarrhea virus infection in suckling mice. J Gen Virol. 2013. 94:831-836.

2. Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T, Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M. The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever With

Thrombocytopenia Syndrome in Japan. J Infect Dis. 2013. Advance access on line

2. 学会発表

1. 永田典代、岩田奈織子、鈴木忠樹、佐藤由子、中島典子、片野晴隆、長谷川秀樹：脳炎・髄膜炎関連ウイルスの病理学的検索のための参照標本の作製と抗体の検討。第102回日本病理学会（札幌）2013年4月

2. 永田典代、小島朝人、鈴木忠樹、岩田奈織子、小谷治、佐藤由子、佐多徹太郎、長谷川秀樹：デングウイルス VeroE6 継代株のマウスに対する病原性。第61回日本ウイルス学会（神戸）2013年11月。

3. Nagata N, Kotani O, Iwata N Suzuki T, Sato Y, Koike S, Iwasaki T, Taguchi F, Hasegawa H, Shimizu H. A comparison of human enterovirus detection in experimentally infected neonatal mice using immunohistochemistry. Europic 2014, (Belgium) 2014. 3.

4. 岩田奈織子、宇田晶彦、佐藤由子、鈴木忠樹、横田恭子、森川茂、長谷川秀樹、永田典代：UV不活化SARS-CoV免疫BALB/cマウスのSARS-CoV感染肺における好酸球浸潤に対するToll-like receptor 刺激の影響 第61回日本ウイルス学会（神戸）、2013年11月

G. 知的財産の出願・登録状況

なし

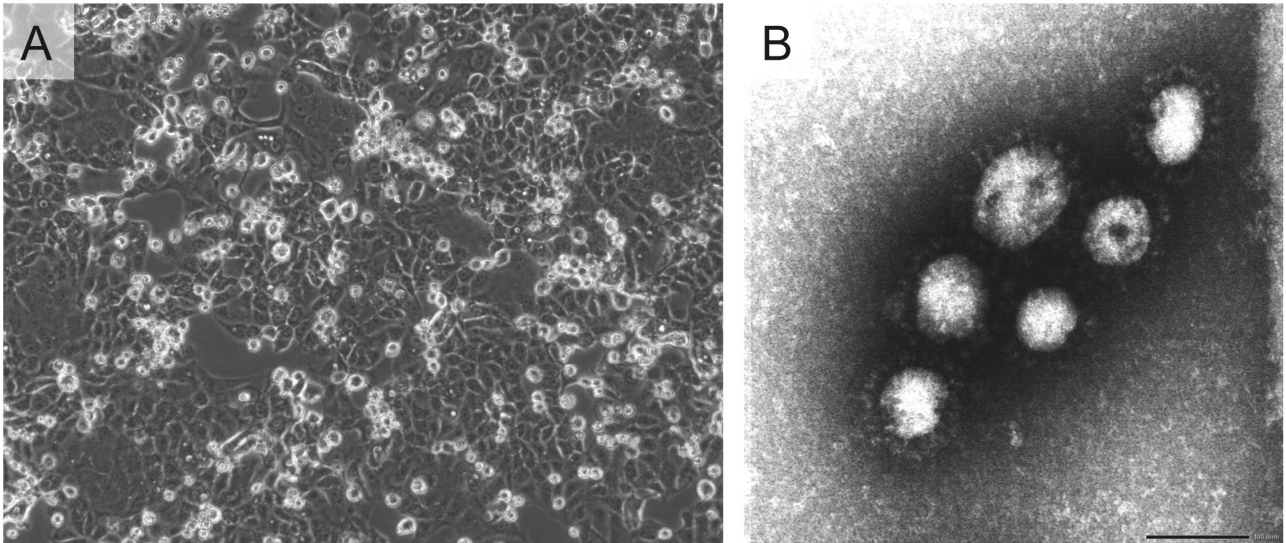


図 1A MERS-CoV 感染 52 時間後の細胞変性効果。細胞は丸くなり萎縮し、剥離するが、すべての細胞が剥離する様子は未だ見られない。この撮影後、フラスコごと-80 で凍結し 37 で溶解後、その上清を得てワーキングウイルス液 (EMC Ve6 p1 株) とした。
 B EMC Ve6 p1 株感染細胞培養上清から得られた MERS-CoV のネガティブ染色像。典型的なコロナ状のスパイクを有する円形のウイルス粒子。直径 100 nm。リンタンゲステン酸 (pH7.0) 染色、室温 30 秒。2%パラフィルムアルデヒド固定、紫外線照射によるウイルス不活化処理を行った。

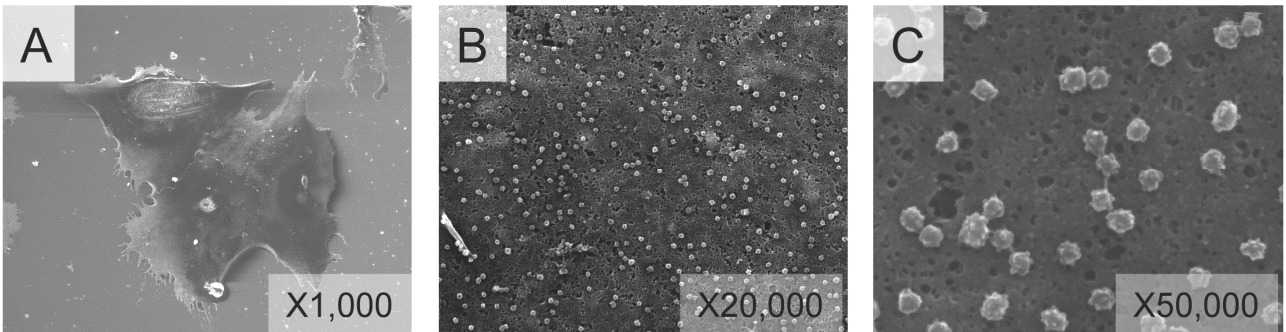


図 2 MERS-CoV 感染 2 日目の VeroE6 細胞の走査電子顕微鏡像。細胞は一見正常だが (A)、表面に無数のウイルス粒子が出芽している (B)。ウイルス粒子は金平糖様の突起がみられる。直径 100 nm。

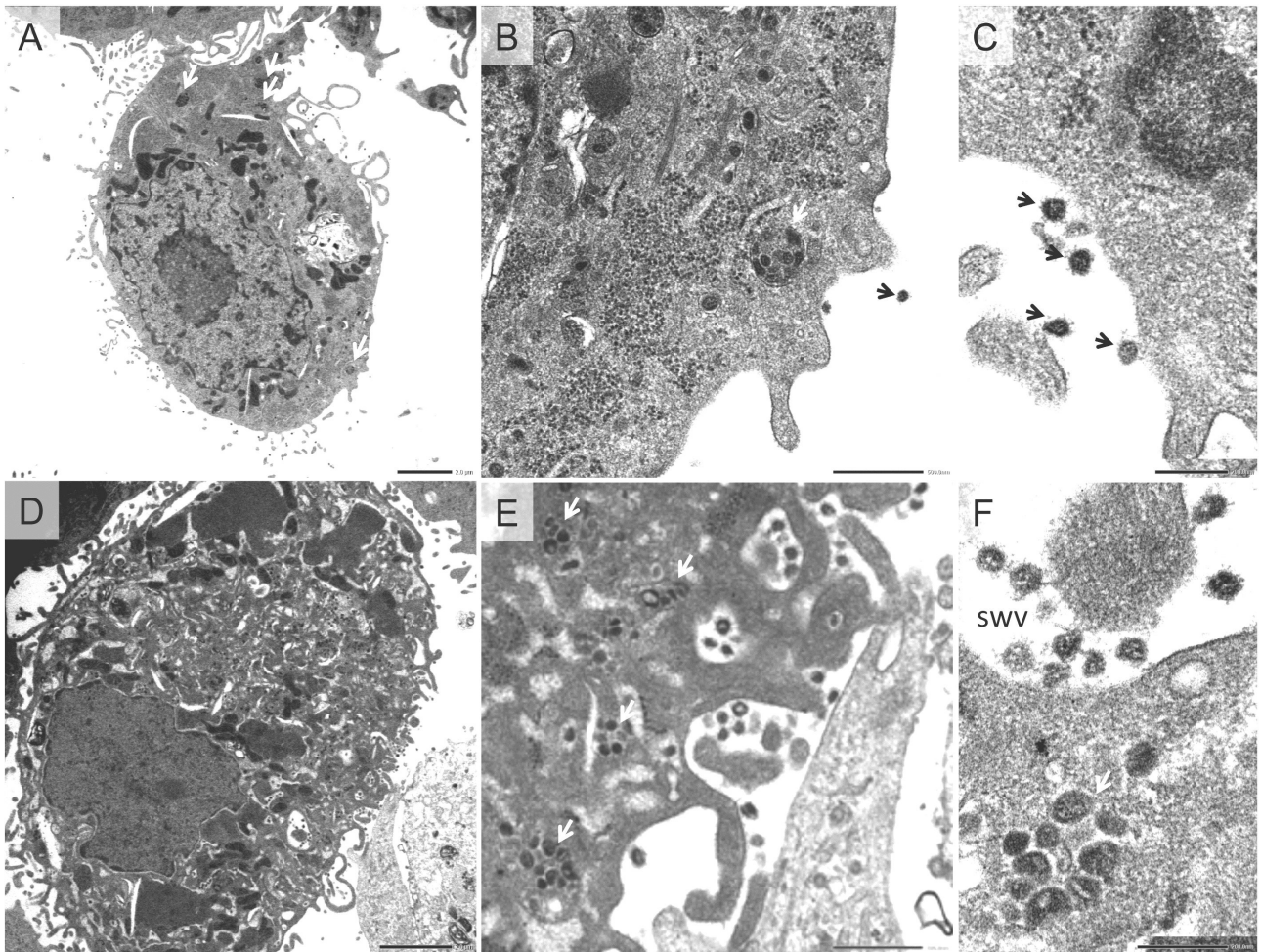


図3 MERS-CoV感染2日目のVeroE6細胞の透過型電子顕微鏡解析像。A-C 比較的感染初期の細胞。核小体が明瞭な核で、細胞質の構造は比較的保たれているが、細胞質内に数箇所（白矢印）ウイルス粒子形成基質（virus morphogenesis matrix vesicae, VMMV）がみられる。細胞周囲には明らかなスパイクを持つウイルス粒子が散見される（B, C, 黒矢印）。D-F 比較的感染後期の細胞。核小体は消失し、クロマチン構造は不明瞭である。細胞質の構造は破綻し、細胞変性が観察される（D）。細胞質内にはヌクレオカプシドの集合から成るVMMV（白矢印）とスパイクを有するウイルス粒子を含む空胞（smooth-wall vesicle, SWV）が多数形成されている（E, F）。