

厚生労働行政推進調査事業費（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）  
分担研究年度終了報告書

新型及び季節性インフルエンザに係る流行株の予測等に資する  
サーベイランス及びゲノム解析に関する研究

研究分担者 竹田 誠  
国立感染症研究所・ウイルス第三部・部長

### 研究要旨

申請者らは呼吸器ウイルスの病原体検査の実務担当者として、1月16日に国内で最初の SARS-CoV-2 感染患者を特定し、同時に国内の PCR 検査法を確立し、自治体へ向けてマニュアルの作成や検査試薬の配布などを行い、また、検査法の改良や精度の確認などを行ってきた。本研究においても、国際的遺伝子情報登録データベース等から入手した SARS-CoV-2 の配列を解析し、ミスマッチの傾向を把握し、各種変異に対する PCR 検査法の精度や感度の確認を行ってきた。また、変異株の性質を把握するために、特に感染に重要なスパイク蛋白の性状を解析し、培養細胞 (in vitro) における実験では、アルファ変異株、デルタ変異株が細胞のゴルジ装置に遍在するフーリンによるスパイク蛋白の開裂性が高まることによって、別の宿主プロテアーゼ TMPRSS2 を介した細胞への早期侵入経路を効率良く利用できる性質を獲得していることを明らかにした。一方、オミクロン株については、TMPRSS2 を介した細胞への早期侵入経路を利用する能力は低く、エンドサイトーシスで細胞へ侵入しリソソーム内のカテプシンの活性を使って感染することを明らかにした。マウスを用いた実験では、その結果の一部を補強するデータを得ることができた。

### A. 研究目的

2019 年末に新型コロナウイルス（重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 型：SARS-CoV-2）感染症が発生し、申請者らは病原体担当部の実務担当者として、1月16日に国内で最初の患者を特定し、2月1日の指定感染症への指定に合わせて、リアルタイム RT-PCR 法による検査法をセットアップし、検査コントロールとともに全国地方衛生研究所へ配布した。当該検査法は感染研法として現在も広く利用されており、以後改良を続けて現在では N 遺伝子を対象とした N2 セット、S 遺伝子を対象とした S2 セットによる検査法がマニュアル記載されている。リアルタイム RT-PCR 法による検査法の精度を担保するにはプライマー・プローブにおけるミスマッチの発生を探

索することが欠かせない。SARS-CoV-2 は発生以後も進化を続け、様々な変異体が発生している。本研究ではインフルエンザウイルスならびに SARS-CoV-2 の国際的遺伝子情報登録データベース (GISAID) 等から入手した配列を解析し、ミスマッチの傾向を把握し、必要に応じて変異株の検査コントロールを作製し、検出感度への影響を調べる。検出感度への影響のあるミスマッチが行政検査へ影響を与えると想定されるケースでは、プライマー・プローブ配列改良あるいは新たな領域での検出系を構築する。

SARS-CoV-2 の感染では、ウイルス表面のスパイクタンパク (S タンパク) と宿主細胞膜上のウイルスレセプターとの結合、次に複数の宿

主プロテアーゼによる S タンパク質の開裂と構造変化による膜融合、その後、ゲノム RNA が細胞内へ侵入というステップを経て、感染が成立する。よって、ウイルスレセプター分子と宿主プロテアーゼが宿主特異性と臓器指向性を決定しており、かつ、病原性に関与する。我々はこれまでに、インフルエンザウイルスや重症肺炎関連コロナウイルスの肺における感染と病原性において II 型膜貫通型セリンプロテアーゼの一種 (TMPRSS2) が主要な役割を担っていることを *in vivo* モデルで明らかにしてきた。そこで、SARS-CoV-2 変異株の性質を培養細胞レベルで評価を行うとともに、性質評価法の一つとして TMPRSS2 ノックアウトマウスと野生型マウスを用いた *in vivo* 評価系を構築・整備し、その変異株の性状について検討する。

## B. 研究方法

ウイルスの変異に対する核酸検出系の評価と改良 (研究協力者 白戸憲也 (国立感染症研究所ウイルス第三部))

新型コロナウイルス遺伝子配列は GISAID (Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data, <https://www.gisaid.org>) に集約されているため、GISAID より流行の中心となっている変異体の全長配列データを入手する。Fasta 形式でダウンロードしたデータをコマンドラインで約 15000 配列毎にファイルを整理し、WH-human1(MN9008947)を元に、MAFFT(Multiple alignment program for amino acid or nucleotide sequences) version 7([https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/add\\_fragments.html?frommanual](https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/add_fragments.html?frommanual)) を用いてアライメントを作成し、Sequencher(ver.5.4.6)を使用してプライマー・プローブ配列におけるミスマッチ配列を検索する。データは月ごとに整理し、トレンドを把握する。存在比率が数%となるようなミスマッチや、プライマーの 3' 末端付近に見られる場合は、検査コントロール用テンプレ

ート配列と site direct mutagenesis 技術を用いて変異体と同様の配列を持つ RNA コントロールを作成し、吸光度あるいは蛍光値をもとにして定量し、段階希釈列を作製してリアルタイム RT-PCR 法による検出を行い、ミスマッチが検出感度に与える影響を調べる。必要に応じて

Primer3(<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)等のプライマー・プローブ設計ソフトを用い、N2、S2 セットの対象領域以外の配列を用いて新たなセットを検索し、検出感度、特異的反応性の評価を行う。

### SARS-CoV-2 の性質評価

培養細胞での評価 (研究協力者 柿崎正敏 (国立感染症研究所ウイルス第三部))

SARS-CoV-2 の細胞への侵入機構には 2 種類 (早期侵入経路と後期侵入経路) あり変異株毎にどちらの感染経路により依存しているかの程度が異なっている。また、その違いが SARS-CoV-2 の変異株毎の伝染力の違いの主な原因のひとつになっている。早期侵入経路は TMPRSS2 に依存した侵入経路であり、後期侵入経路はエンドサイトーシスに依存した経路である。TMPRSS2 阻害剤、エンドサイトーシス阻害剤を用いるなどして、変異株の侵入経路の変化を明らかにし、流行株の伝染力の評価に役立てる。

TMPRSS2 ノックアウトマウスを用いた動物モデル (*in vivo*) 評価系の構築 (研究協力者 岩田奈織子、坂井祐介、永田典代 (国立感染症研究所感染病理部))

TMPRSS2 ノックアウトマウスの生産・維持に関わるプロトコルを整備し、評価が必要となった際にすぐに供給できるように生産体制を整える。また、SARS-CoV-2 感染実験とその評価方法 (ウイルス感染価、ウイルス関連 RNA の定量、中和抗体価測定、病理学的解析法、免疫組織化学、サイトカイン・ケモカイン評価、統計処理法) についてプロトコルを整備する。

これらの2点について問題点、改善点を整理し、対応する。

動物モデル (In vivo) 評価系による変異株の性状解析 (研究協力者 岩田奈織子、坂井祐介、永田典代 (国立感染症研究所感染病理部))

上記で準備した TMPRSS2 ノックアウトマウスと野生型マウスを用いて SARS-CoV-2 変異株の in vivo 性状解析を行う。マウスに対して感染性を発揮しない変異株については培養細胞系 (in vitro) および動物モデル系 (in vivo) によるマウス継代株の作製を試み、その性状解析を行う。

(倫理面への配慮)

ウイルス分離に用いた人の臨床検体については、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (平成26年文部科学省・厚生労働省告示第3号)、遺伝子治療等臨床研究に関する指針 (平成27年厚生労働省告示第344号) 及び国立感染症研究所で定めた倫理規定を遵守し、あらかじめ国立感染症研究所の人を対象とする生命科学・医学系研究倫理審査委員会の承認を得て研究を実施した (令和2年1月28日、番号1091)。全ての動物実験計画書は、国立感染症研究所の動物実験委員会の審査の後、承認を得て実施した。実施にあたっては“厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針”および機関内規程を遵守した。また動物に無用な苦痛を与えないよう、獣医師の指導の下、麻酔薬の投与・保安等に留意するとともに、実験動物の状態を定期的に観察し、必要に応じて適切な処置を講じた。遺伝子組換え実験に関しては、“遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性確保に関する法律”を遵守し、国立感染症研究所の指針に則って実施した。本研究では SARS-CoV-2 ウイルスを用いるため、感染実験を実施する国立感染症研究所においては、「国立感染症研究所・病原体等安全管理規定」に従いバイオセーフティレベルを遵守して実施した。マウスなど、

実験動物を用いた場合には、国立感染症研究所が定める「実験動物管理運営規定」を遵守して実施した。実験動物を取り扱う際には苦痛の軽減や、安楽死の方法など、3R に配慮し、また、動物愛護上の配慮を行って実施した。マウスなどのウイルス接種の実験では、鎮静・鎮痛・筋弛緩剤を混合した塩酸ケタミンの投与もしくはガス麻酔 (イソフルラン) を用いた。安楽殺時には致死量以上の麻酔薬の投与を確実に行った。

### C. 研究結果

N2 および S2 セットについて、GISAID に登録されている SARS-CoV-2 を用いてミスマッチ検索を行い、特徴的なミスマッチと由来国のピックアップ、それらの検出感度への影響の検討を行った。一部の株にみられたミスマッチは感度を数十倍低下させる、もしくは、検出感度への影響はないが、波形が寝る傾向にあったが、依然として、SARS-CoV-2 を十分な感度で検出することができた。

培養細胞 (in vitro) における実験で、アルファ変異株、デルタ変異株がフーリンによる S タンパクの開裂性が高まることによって、TMPRSS2 を介した細胞への早期侵入経路を効率良く利用できる性質を獲得していることが明らかになった。一方、オミクロン株については、TMPRSS2 を介した細胞への早期侵入経路を利用する能力は低く、エンドサイトーシスで細胞へ侵入しカテプシンの活性を使って感染することが明らかになった。TMPRSS2 ノックアウトマウスを用いた実験では、その結果の一部を補強するデータを得ることができた。

### D. 研究発表

#### 1. 論文発表

- ・ 竹田誠 SARS-CoV-2 のウイルス学 周産期医学 51:319- 317, 2021
- ・ 竹田誠 海外における新型コロナワクチンの開発- 世界の治験状況と展望 感染

- と抗菌薬 24:200- 206, 2021
- ・ 竹田誠 パンデミック感染症としての COVID-19 と SARS-CoV-2 の特性 病理と臨床 39:1182- 1189, 2021
  - ・ 竹田誠 新型コロナウイルス SARS-CoV-2 の特性、変異ウイルスの出現 JBSA Newsletter 11:42- 50, 2021
  - ・ 竹田誠 SARS-CoV-2 とヒトコロナウイルスのウイルス学的特徴 小児内科 54:12-17, 2022.
  - ・ Takeda M: Proteolytic activation of SARS-CoV-2 spike protein. Microbiol Immunol 66:15-23, 2022.
2. 学会発表
- ・ 中嶋章悟, 大橋啓史, 竹田誠, 豊田哲也, 渡士幸一 新型コロナウイルス感染細胞実験を用いたハイスループット化合物スクリーニング系の構築 第 44 回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜, 2021 年 12 月 1-3 日
  - ・ 塩野谷果歩, 山崎雅子, 岩波翔也, 伊藤悠介, 福士秀悦, 大橋啓史, 佐宗若菜, 田中智博, 青木 伸, 倉持幸司, 岩見真吾, 高橋宜聖, 鈴木忠樹, 村松正道, 竹田誠, 脇田隆宇, 渡士幸一 抗マラリア薬メフロキンの強力な新型コロナウイルス感染阻害活性 第 68 回日本ウイルス学会学術集会 神戸国際会議場(ハイブリッド開催), 2021 年 11 月 16-18 日
  - ・ 竹田誠 SARS-CoV-2 と宿主プロテアーゼによる活性化 第 68 回日本ウイルス学会学術集会 神戸国際会議場 (ハイブリッド開催) , 2021 年 11 月 16-18 日
  - ・ 竹田誠 新型コロナウイルス SARS-CoV-2 の特性、変異ウイルスの出現 第7回バイオセーフティシンポジウム ウェブ開催 2021 年 9 月 16 日

#### E. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし