

粒子凝集/凝集阻止試験による新型コロナウイルス抗原性解析

研究分担者 中村一哉

国立感染症研究所・インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センター・主任研究官

研究要旨

2019年に出現した新型コロナウイルス（SARS-CoV2）は世界的な感染拡大を引き起こしたのち、変異によって性状を変化させながら各地での流行を続けている。SARS-CoV2 感染対策の一環としてワクチン接種が普及しているがワクチンの有効性はワクチン抗原と野外流行株の抗原性が合致することで担保されるため、野外株の抗原性状変化は常に懸念、注視されている。本研究では、粒子凝集・凝集阻止試験を応用した SARS-CoV2 抗原性解析法を樹立した。この新規手法によって出現当初の株と最近の主流行のオミクロン系統株との抗原性差異が明確に認められた。SARS-CoV2 野外流行株の抗原性状把握に際しての本手法を用いた分離株抗原性解析の有用性が示唆された。

A. 研究目的

2019年に出現した新型コロナウイルス(SARS-CoV2)は世界的な感染拡大を引き起こしたのち、変異によって性状を変化させながら各地での流行を続けている。SARS-CoV2 感染対策の一環としてワクチン接種が普及しているがワクチンの有効性はワクチン抗原と野外流行株の抗原性が合致することで担保されるため、野外株の抗原性状変化は常に懸念、注視されている。現在野外流行株の抗原性状の把握は主に交差中和試験を応用した抗原性解析法により行われているが、この手法は時間的・人的負担が大きく、抗原性解析手法の改良・開発が求められている。本研究では、SARS-CoV2 の感染受容体分子であるヒトアンギオテンシン変換酵素 (hACE2) を吸着させた人工微粒子を作出し、ウイルスによる粒子凝集活性を利用して粒子凝集 (particle agglutination, PA)・凝集阻止 (particle agglutination-inhibition, PAI) 試験を樹立した。この PA/PAI 試験を応用した SARS-CoV2 抗原性解析法の有用性を検討し、出現当初の株と以降に出現した変異株群との抗原性差異を明確

に示した。

B. 研究方法

1) 供試ウイルス株

国立感染症研究所で入手した出現初期株および各変異系統（アルファ、ベータ、デルタ、カッパ、オミクロン）株を TMPRSS2 発現 VeroE6 細胞で継代増殖したものをを用いた。各供試ウイルスの感染力価の測定は TCID₅₀ 試験により行った。

2) ACE2 吸着人口微粒子の作製

粒子径の異なる (0.2、0.8、9.8 μm) 複数種の人口微粒子（ビーズ）について、組替え発現後精製した hACE2 を一定条件下で吸着させた。作製したビーズの懸濁液を濃度 0.003 から 0.8% で調製したものをそれぞれを 96 穴プレートに分注した。ウイルス液混合・非混合下で一定時間経過後のビーズの凝集像ないし沈降像を観察し、視認性の良否に基づき PA/PAI 試験実施に至適なビーズ径、ビーズ液懸濁濃度および静置反応時間を決定した。

3) PA 試験

96 穴プレート上で各供試ウイルス 50 μL /ウェルの 2 倍階段希釈列を作製し、ウイルス液と

等量のビーズ懸濁液を各ウェルに添加した。沈降像対照としてウイルス液に替えて希釈液を添加混合したウェルを設定した。一晚静置後、ビーズの完全凝集像を示すウイルス希釈倍数に基づいて供試ウイルスの凝集力価 (PA 価) を算出した。

4) ハムスター抗血清

5 週齢のシリアンハムスターに各種供試ウイルスそれぞれを 10^3 TCID₅₀/匹、鼻腔内接種により感染させた。感染後 14-16 日に麻酔下で全採血し、定法に従い血清分離を行った。得られた抗血清は 56°C 36 分の非動化処理ののち、PAI 試験の被験抗血清として使用した。

5) PAI 試験

被験抗血清の使用にあたり抗血清中成分によるビーズの非特異凝集が生じないことを事前に確認した。96 穴プレート上で各被験抗血清 25 μ L/ウェルの 2 倍階段希釈列を作製し、4 PAI/25 μ L に調製した供試ウイルス液を等量混合した。1 時間静置により抗血清とウイルスを反応させたウェルにビーズ懸濁液 50 μ L/ウェル量添加した。沈降像対照として抗血清もウイルス液も加えていないウェル、凝集像対照として抗血清は加えずウイルス液を加えたウェルを設定した。一晚静置後、ウイルスによるビーズ凝集の完全阻止像を示す抗血清希釈倍数に基づいて被験抗血清の凝集阻止力価 (PAI 価) を算出した。

(倫理面への配慮)

本研究において、SARS-CoV2 の取扱いについては国立感染症研究所病原体等安全管理規定に従い、病原体取扱申請を行い承認を得た。動物 (ハムスター) 抗血清作製にかかる動物実験倫理に関しては、国立感染症研究所動物実験委員会の審査を経て承認を受けた。

C. 研究結果

1) ACE2 吸着人口微粒子作製と懸濁液調製

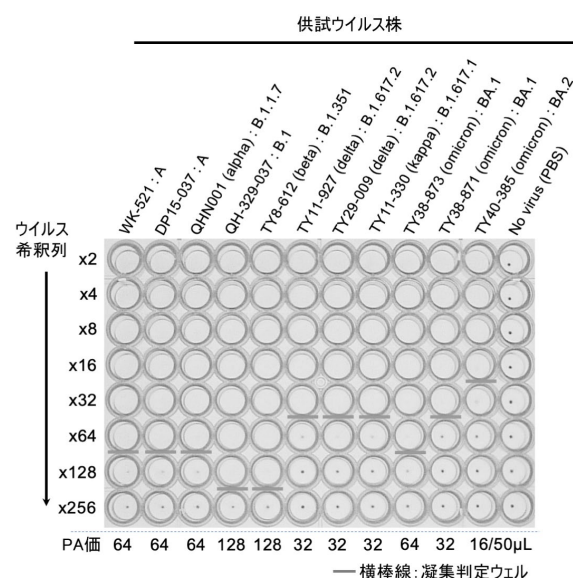
予備検討試験の結果、0.8 μ m 径ビーズ懸濁

液を最終濃度 0.005% で使用した場合に明瞭な沈降・凝集像が観察され、ウイルスによる凝集感度も高かった。以降の PA および PAI 試験においてはこの条件で調製したビーズ懸濁液を用いることとした。

2) PA 試験

ウイルス液とビーズ懸濁液を混合後一晚静置した PA 試験プレートの一例を示す (図 1)。

図 1 PA 試験プレートの一例



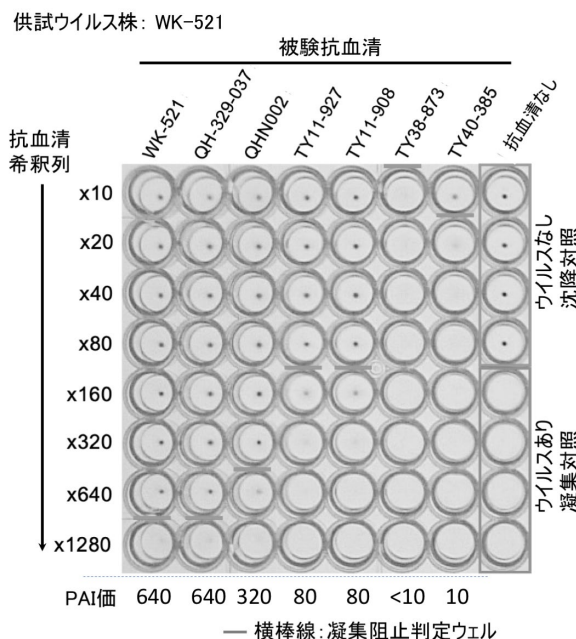
右端列の沈降像対照列およびウイルスの希釈倍数の高いウェルで認められる点状物が凝集していないビーズが沈降してできたものである。ウイルスの希釈倍数が低いウェルではウイルスにより凝集したビーズが膜様浮遊物を形成し、点状沈降像は認められない。この添乗物が一切認められない状態を完全凝集と定義し、完全凝集が認められる最大希釈倍数をもって供試ウイルスの PA 価とする (図 1 中の横棒線)。左端 WK-521 株のウイルス希釈列において完全凝集像が 64 倍希釈されたウイルス液とビーズ懸濁液が混合されたウェルで観察されており、この場合 WK-521 株の PA 価は 64 と判定される。他の供試ウイルス株の PA 価も同様に判定した。

3) PAI 試験

被験抗血清希釈列と供試ウイルスを混合後、ビーズ懸濁液を添加、一晚静置後の PAI 試験プ

プレート上の1例を図2に示す。

図2 PAI試験プレートの一例



この試験プレートでは供試ウイルスWK-521株と各被験抗血清との反応性が評価できる。左端列のWK-521抗WK-521血清を例にした場合、血清希釈倍数の低い(血清濃度が高い)ウェルでは供試ウイルスと抗血清が反応し、ウイルスによるビーズ凝集活性が阻害された結果、ビーズの沈降像が明瞭に認められる(凝集阻止)。抗血清希釈倍数が高い(x1280)ウェルにおいては抗血清とウイルスの反応が十分ではなくウイルスによるビーズ凝集が生じた結果、凝集像が観察される。凝集の完全阻止が認められる最大血清希釈倍数に基づいてPAI値が判定され、抗WK-521血清のWK-521株に対するPAI値は640である。図中の各被験抗血清のWK-521に対するPAI値は同様に判定された。また、抗WK-521血清はWK-521株をハムスターに感染させて作製されたものであり、このように血清作製用抗原と供試ウイルスが一致している場合のPAI値は相同PAI値と定義され、通常高い値を示す。左2列目の抗QH-329-037血清は供試ウイルスWK-521株に対して、相同PAI値と同等のPAI値を示していることから、WK-521株に対しての交差反応性が高い、すなわち両株間で抗原性が類似していると解釈される。一方で抗TY38-873血

清あるいは抗TY40-385血清(プレート左から6、7番目の希釈列)は供試ウイルスWK-521株に対して低いPAI値を示している。これは両血清がWK-521株との交差反応性に乏しく株間での抗原性が大きく異なっていると解釈される。

4) PAI試験を用いたウイルス抗原性解析

前項のPAI試験を複数のウイルス株と抗血清の組み合わせで実施し、供試ウイルス株の抗原性評価を行い表1に結果をまとめた。

表1 PAI試験による抗原性解析結果

抗血清 抗原	WK-521 A	QH-329-037 B.1	QHN002 Alpha B.1.1.7	TY11-927 Delta B.1.617.2	TY11-908 Delta B.1.617.2	TY38-873 Omicron BA.1	TY40-385 Omicron BA.2
WK-521 A	640	640	320	80	80	<10	10
DP15-037 A	640	640	320	80	80	<10	10
QH-329-037 B.1	640	640	640	160	160	<10	10
QHN001 Alpha B.1.1.7	640	640	640	80	80	<10	10
TY8-612 Beta B.1.351	80	320	320	<10	20	<10	10
TY11-927 Delta B.1.617.2	320	320	160	160	160	<10	<10
TY29-009 Delta B.1.617.2	160	160	160	80	80	<10	<10
TY11-330 Kappa B.1.617.1	320	320	160	80	40	<10	<10
TY38-873 Omicron BA.1	10	<10	<10	<10	<10	160	40
TY38-871 Omicron BA.1	<10	<10	<10	<10	<10	80	40
TY40-385 Omicron BA.2	20	40	40	<10	<10	10	160

太字斜体: 相同PAI値

抗WK-521血清はTY38-873、TY38-871、TY40-385株に対して低いPAI値を示した。抗TY38-873血清、抗TY40-385血清のWK-521株に対するPAI値はそれぞれの相同PAI値に比して低く、株間の抗原性差異が明瞭に認められた。WK-521はSARS-CoV2出現初期の分離株であり、TY38-873、TY38-871、TY40-385株はオミクロン系統株であることから、オミクロン系統株は出現初期の分離株から抗原性が大きく変化していることが確認できた。アルファ系統株は初期分離株からあまり抗原性が変化しておらず、ベータ、デルタ系統株に抗原性変化の傾向が認められている。またオミクロン系統株間でもBA.1グループのTY38-873株とBA.2グループのTY40-385株で互いに相同PAI値からの低値を示しており、BA.1グループ株とBA.2グループ株で抗原性変

化が生じていることが示唆された。

ここまでの結果から、PA/PAI 試験を用いた分離株の抗原性評価の有用性が示唆された。

D. 研究発表

1. 論文発表

J. Kobayashi, S. Matsuyama, M. Shirakura, T. Arita, Y. Suzuki, H. Asanuma, S. Watanabe, H. Hasegawa, K. Nakamura.

“Use of the particle agglutination/particle agglutination-inhibition test for antigenic analysis of SARS-CoV-2” *Influenza Other Respir Viruses*,17(2):e13093, 2023.
doi: 10.1111/irv.13093.

2. 学会発表

S. Watanabe, N. Kishida, S. Fujisaki, K. Nakamura, M. Shirakura, E. Takashita, A. Sato, M. Akimoto, H. Miura, H. Morita, H. Sugawara, H. Hasegawa, The Influenza Surveillance Group of Japan.

“Characterizations of circulating influenza viruses in the 2021/22 season and selection of vaccine viruses for the 2022/23 season.”
第 69 回日本ウイルス学会学術集会 2022 年 11 月

E. 知的財産権の出願・登録状況

中村一哉、小林淳、松山州徳

「微粒子の凝集反応または凝集阻害反応を用いたウイルスの力価の判定方法、およびウイルス分離株の抗原性解析法」

「特願 2022-153084」2022 年 9 月 6 日出願

F. 健康危険情報

なし