

新型コロナウイルスの代理ウイルス感染系の確立と中和活性解析系への応用

研究分担者 大隈 和 関西医科大学 医学部微生物学講座 教授

研究要旨：新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）感染後の回復者やワクチン接種者の献血血液中には種々の抗ウイルス活性物質等が存在すると考えられるが、その安全性の評価は十分ではない。その評価にはSARS-CoV-2感染実験が必要であるが、本来BSL3レベルで行う必要があるため実施可能施設等の制限がある。そこで、BSL2レベルで取り扱い可能な水疱性口内炎ウイルス（VSV）を用いた代理ウイルスを開発し、SARS-CoV-2を用いたウイルス感染系との比較を行い、BSL2レベルで実施可能な感染評価系構築を目指す。本年度は、臨床検体からのSARS-CoV-2分離や、臨床検体由来あるいは国立感染症研究所から分与された複数の変異株等からのSARS-CoV-2スパイク遺伝子のクローニングを行った。

研究協力者：

上野孝治 関西医科大学 医学部微生物学講座  
助教

A. 研究目的

新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）について、感染後の回復者やワクチン接種者の献血血液の安全性が現在の検討課題の一つとなっている。これらの献血血液には中和抗体をはじめ種々の抗ウイルス活性物質が含まれると考えられるが、現状ではそれらの安全性の点が十分に評価されているとは言えない。この安全性評価のためには、SARS-CoV-2の感染実験による評価系が必要であるが、SARS-CoV-2はBSL3レベルでの取り扱いが求められるため、実施可能施設に限られる等の様々な制約があり、生ウイルスの使用は容易ではない。そこで本研究では、BSL2レベルでの取り扱いが可能な水疱性口内炎ウイルス（VSV）のエンベロープタンパク質（Gタンパク質）をSARS-CoV-2スパイクタンパク質に置き換えた代理ウイルスを開発する。この代理ウイルスによる *in vitro* 感染系は、血液中の中和抗体の検出等に有用であり、これらの性状を解析することで血液の安全性確保に貢献できる。

（倫理面への配慮）

本研究に用いる臨床検体は、関西医科大学のヒト倫理審査で承認後、同大学総合医療センターでインフォームドコンセントを取得して採取された、臨床検査や研究を目的とする検体の一部である。

B. 研究方法

・臨床検体からのSARS-CoV-2分離

臨床検体（患者由来咽頭ぬぐい液等）をVeroE6/TMPRSS2細胞に接種し、48～96時間後にウイルスを含む培養上清を回収した。回収した培養上清からRNAを抽出し、SARS-CoV-2特異的なRT-

PCRを用いてウイルスゲノムを増幅しコピー数を測定した。また、ゲノムの塩基配列解析を行った。

・SARS-CoV-2スパイク遺伝子のクローニング

各種SARS-CoV-2から抽出したウイルスRNAを用いて逆転写反応によりcDNAを合成した後、特異的PCRにてSARS-CoV-2スパイク遺伝子を増幅した。

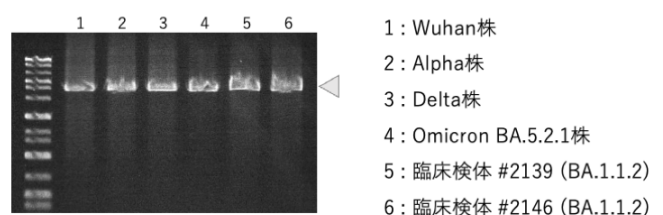
C. 研究結果

・臨床検体からのSARS-CoV-2分離

臨床検体11検体からSARS-CoV-2のウイルス分離を試み、うち10検体についてウイルスRNAの増加が認められた。これらのゲノムの塩基配列解析から、当時感染流行の中心であったOmicron BA.1.1.2株をはじめ、Omicron BA.1.1.1株やDelta AY.29株が分離できたことが分かった。

・SARS-CoV-2スパイク遺伝子のクローニング

SARS-CoV-2は株によりスパイクタンパク質の性質が大きく異なるため、各変異株のスパイクタンパク質を有する代理ウイルスが必要となる。国立感染症研究所から分与された各種SARS-CoV-2（Wuhan株、Alpha株、Delta株、Omicron BA.5.2.1株）および臨床検体由来Omicron BA.1.1.2株（2検体）から抽出したウイルスRNAを用いてスパイク遺伝子を増幅し電気泳動した結果、いずれのウイルスRNAからも予想された3.8kbp付近にバンドが検出された。（下図参照）



#### D. 考察

上記のように、臨床検体 11 検体中 10 検体でウイルス RNA が増幅でき、Omicron 株や Delta 株等の複数の変異株を分離することができた。国立感染症研究所から分与された Wuhan 株から Omicron XE 株までの 20 種の変異株を含む従来株も感染増殖させることができた。以上の結果から、今後、新規の変異株が出現した場合でも臨床検体からのウイルス分離が可能であると考えられた。

また、6 種類のウイルス株からのスパイク遺伝子のクローニングに関しても問題なく実行できており、ウイルス分離と同様にスパイク遺伝子のクローニングに関しても新規の変異株に対して速やかに対応可能であると考えられた。

#### E. 結論

今回、臨床検体からのウイルス分離、および各種ウイルス株からのスパイク遺伝子のクローニングを行った。現在、文部科学省へ組換えウイルス作成等に関する遺伝子組換え実験の大臣確認を申請しており、確認され次第、VSV ゲノムへのサブクローニングおよび SARS-CoV-2 代理ウイルスとしての組換え VSV の産生、それをを用いた感染系の構築を行い、SARS-CoV-2 生ウイルス感染系と比較し代理が可能かどうか検討する予定である。

本研究により、これまでBSL3レベルでの対応が必要であった献血血液に含まれる成分のSARS-CoV-2感染への影響の評価が、BSL2レベルで対応可能になると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし