

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：わが国で製造される血液製剤は、抗体検査やNAT等極めて精度の高い方法によって病原体スクリーニングが実施され、その安全性が担保されてきた。しかし、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にはSARS-CoV-2に対する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、その安全性を評価する必要があるが、適切な評価系が十分ではない。そのような評価にはSARS-CoV-2の感染アッセイ系が必要となるが、SARS-CoV-2自身はBSL3の取り扱いが必要であり、使用に対する制限が非常に大きい。そこで本研究では、BSL2での実施が可能な抗ウイルス活性物質等の安全性評価系を構築し、血液製剤の安全性確保と安定供給に貢献することを目的に、BSL2での使用が可能な組換え水疱性口内炎ウイルス(VSV)を用いたSARS-CoV-2代理ウイルス感染系の構築を試みた。

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

わが国で製造される血液製剤は、抗体検査やNAT等極めて精度の高い方法によって病原体スクリーニングが実施され、その安全性が担保されてきた。しかし、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には病原体であるSARS-CoV-2に対する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、これらの安全性について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の感染アッセイ系が必要であるが、SARS-

CoV-2はBSL3レベルでの取り扱いが求められるため、生ウイルスの使用は容易ではない。そこで、BSL2/P2レベルでの取り扱いが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する。この代理ウイルス表面にはSARS-CoV-2スパイクタンパク質が発現しており、この代理ウイルスの*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。

B. 研究方法

・組換えVSV感染性クローンのプラスミドの作成

SARS-CoV-2（オリジナル株、アルファ株、オミクロン株）よりスパイクタンパク遺伝子をクローニングし、野生型VSVのGタンパ

ク遺伝子と置換した。

・組換えVSVの産生

293T細胞あるいはVeroE6/TMPRSS2細胞にT7発現ワクシニアウイルスを感染させたのち、組換えVSVプラスミドおよびVSV-N, P, G, L発現ヘルパープラスミドをトランスフェクションし、組換えVSVを含む上清を回収した。

・プラークアッセイ

VSVあるいはSARS-CoV-2を感染させた後、メチルセルロース含有培地を添加して2日間培養し、メタノール固定してクリスタルバイオレットで染色した。

C. 研究結果

SARS-CoV-2各株よりスパイクタンパク遺伝子をクローニングし、VSV感染性クローンプラスミドへのサブクローニングを行った。これらを用いて組換えVSV産生実験を施行したところ、対照の野生型VSVおよびEGFP発現組換えVSV(VSV-EGFP)に関してはVSV特有のコメットサインあるいはEGFP発現が目視あるいは蛍光顕微鏡で観察され、ウイルス産生が確認できた。(図1、図2)



図1.野生型VSV感染による

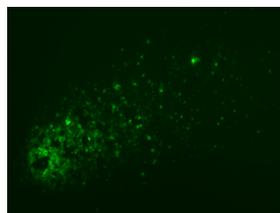


図2.VSV-EGFP 感染細胞に

SVに関してはウイルス産生が確認できなかった。この原因として、VSV粒子は細胞表面でエンベロープタンパク質を纏うが、SARS-CoV-2スパイクタンパク質のC末にER retention signalが存在するために、ウイルス粒子へのスパイクタンパク質の供給がうまくいかない可能性が考えられた。そこで、ER retention signal を含むC末の18アミノ酸を欠失したスパイクタンパク遺伝子をサブクローニングした。さらにウイルス感染を可視化し、観察を容易にするためにEGFP発現ユニットをスパイク発現組換えVSVプラスミドに組み込んだ。現在、ウイルス産生の可否を検討中である。

また、SARS-CoV-2各株のウイルスゲノムを回収するために、VeroE6/TMPRSS2細胞に感染させてウイルスを増幅させた。その際に、オリジナル株に比べてオミクロン株ではウイルス感染により生じるプラーク径が顕著に小さいことが明らかとなった。プラークが小さいことでプラーク数の計数が困難になるため、感染力価の測定の障害になると考えられた。プラーク形成は主にスパイクタンパク質により生じるため、スパイクタンパク質発現VSVでも同様の結果になると考えられる。そこで、プラークアッセイに用いるメチルセルロース(MC)を一般的に用いられるMC#4000から微結晶メチルセルロースAvicelに変更してプラークアッセイを行った。その結果、Avicel使用時にはオミクロン株によるプラーク径はより大きくなり、プラーク数もより多くなった。(図3)

しかし、スパイクタンパク質発現組換えV

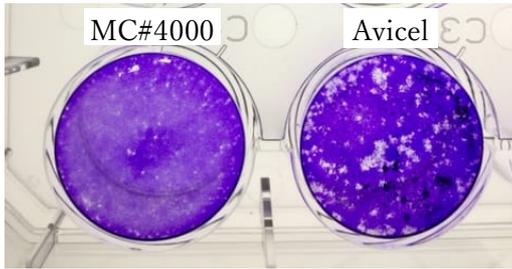


図3. SARS-CoV-2オミクロン株によるプラーク形成に対する

これにより、オミクロン株等の各種変異株でも安定的に感染力価を測定することができると考えられた。

D. 考察

VSVはスパイクタンパク質に相当するGタンパク質を細胞表面でウイルス粒子に取り込んだ後に細胞外へ放出されるが、SARS-CoV-2は主にER-Golgi周辺でウイルス粒子にスパイクタンパク質を取り込み、エクソサイトーシスにより細胞外へ放出される。従って、SARS-CoV-2スパイクタンパク質をVSV粒子により効率良く取り込ませるためには、スパイクタンパク質を細胞表面に発現させる必要がある。そのためスパイクタンパク質のC末に存在するER retention signalを欠失させることで、VSV粒子への取り込み効率が上がると考えられる。

SARS-CoV-2およびスパイクタンパク質発現組換えVSVは細胞変性効果(CPE)あるいは感染細胞死を観察することで感染を確認するが、EGFP発現組換えVSVを用いることでCPE等の細胞の変化が生じる以前からウイルス感染の存在を確認可能で、感染細胞死の誘導およびその広がりを観察できるようになる。

SARS-CoV-2オミクロン株が形成するプラークは非常に小さいため顕微鏡を用いて

も計数が困難であり、感染力価の測定が不安定であった。MCを変更することでプラークがより大きくなり、計数が容易となった。これによりオミクロン株を含む変異株でも感染力価を安定的に測定することができると考えられる。

E. 結論

SARS-CoV-2スパイクタンパク質を発現する組換えVSVを作成中である。尚、スパイクタンパク質全長にはC末にER retention signalが存在するため、細胞表面でエンベロープ(スパイク)を受け取るVSV粒子にスパイクタンパク質をより効率良く供給するために、ER retention signalを含む領域を欠失させたスパイクタンパク質を作成してVSVゲノムに組み込んだ。

また、SARS-CoV-2オミクロン株が形成するプラークは非常に小さいので、MCを変更することでプラークをより大きくし、感染力価の測定を安定化させた。

これらの改善により、VSVを用いたSARS-CoV-2代理ウイルス感染系が確立され、様々なSARS-CoV-2変異株においても、抗ウイルス活性物質を含む可能性のある血液について安全性を検証できるよう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