

東京都において分離された Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)

オミクロン株の分離培養に用いる培養細胞の検討

吉田 勲^a, 浅倉 弘幸^b, 小林 甲斐^a, 長谷川 乃映瑠^a, 磯貝 まや^b, 藤原 卓士^b,
長島 真美^b, 鈴木 淳^a, 貞升 健志^c

SARS-CoV-2オミクロン株は、当初の武漢株からデルタ株などに比べスパイク蛋白に多くの変異を持っており、デルタ株までの分離培養において最も分離成績が良好であったVero E6/TMPRSS2細胞を用いても分離が困難になってきた。そこで、オミクロン株の分離率の向上を目的に、維持培地にアムホテリシンBを添加したVero E6細胞では、添加前の分離率が35.7% (91/255検体) から45.9% (111/242検体) まで向上した。しかしながら、更なる変異株の出現により分離できない変異株も散見されるようになってきたことから、Vero E6/TMPRSS2/T2A/ACE2細胞を用いた分離培養を試みたところ、Vero E6/TMPRSS2細胞で35.7% (91/255検体) の分離率が、Vero E6/TMPRSS2/T2A/ACE2細胞では52.6% (120/228検体) まで向上した。このことから、オミクロン株を分離するために用いる細胞としてVero E6/TMPRSS2/T2A/ACE2細胞が现阶段では最も適していると考えられた。

キーワード: SARS-CoV-2, デルタ株, オミクロン株, Vero E6細胞, Vero E6/TMPRSS2/T2A/ACE2細胞

はじめに

2019年12月中華人民共和国湖北省武漢市において原因不明の肺炎の集団発生が報告^{1,2)}され (Coronavirus disease 2019: COVID-19), 2020年1月9日に中国当局はその原因ウイルスが新しいタイプのコロナウイルス (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: SARS-CoV-2) であると同定した。東京都においても、SARS-CoV-2 武漢株, アルファ株, デルタ株と多くの変異株が検出され報告してきた。2021年12月頃になると都内においてもオミクロン株³⁾が検出され始めた。オミクロン株は、武漢株やアルファ株などの従来株と比べ、スパイクタンパク質部分だけでもACE2親和性増加 (S:Q498R, N501Y) や感染性の増加 (S:H655Y, N679K, P681H) などの変異が報告されている⁴⁾。

オミクロン株が流行の主体となってくると、リアルタイム RT-PCR 法による Ct 値が 30 未満であっても、これまで使用してきた Vero E6 細胞や Vero E6/TMPRSS2 細胞などではオミクロン株の分離が困難となってきた。

これまでにオミクロン株の分離培養時に VeroE6 細胞とアムホテリシンBを添加した維持培地を用いることによりオミクロン株の分離率の改善を報告してきた⁵⁾。しかし、アムホテリシンBを添加した維持培地を用いても分離できない変異株もあり、更なる培養条件の改良を行う必要性がでてきた。今回、Vero E6 細胞に SARS-CoV-2 のレセプターである ACE2 を細胞膜上に多数発現させた Vero E6/TMPRSS2/T2S/ACE2 細胞が入手できたので、実際にオ

ミクロン株の分離培養に用いたところ、オミクロン株の分離に良好な成績が得られたので、その結果を報告する。

材料と方法

1. 供試検体

2021年12月下旬より2023年5月末までにSARS-CoV-2変異株スクリーニング検査で搬入された臨床検体 (鼻腔・咽頭ぬぐい液及び唾液) 266検体を用いて検討を行った。

2. 細胞培養

Vero 細胞 (CCL-81), Vero E6 細胞 (大阪健康安全基盤研究所より分与) は、アフリカミドリザルの腎細胞由来の細胞である。その培養に用いる発育培地 (GM) は、10% 牛胎児血清 (FBS; Biosera, France), 1% Non-essential Amino Acids Solution (NEAA; ナカライテスク, 京都) 及び 100 単位/mL ペニシリン-0.1 mg/mL ストレプトマイシン (MP Biomedicals, USA) を添加した Eagle's minimum essential medium (E-MEM; 日水製薬, 東京) を使用した。

Vero E6/TMPRSS2 細胞 (JCRB1819) は、Vero E6 細胞の細胞膜に TMPRSS2 (膜貫通型セリンプロテアーゼ 2) を遺伝子導入技術によって多く発現させた細胞で、10% FBS, 1% NEAA 及び 100 単位/mL ペニシリン-0.1 mg/mL ストレプトマイシンを添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM; 日水製薬, 東京) を GM として培養を行った。

Vero E6/TMPRSS2/T2A/ACE2 細胞 (東京大学医学研究所 河岡義裕先生より分与) は、遺伝子導入技術により

^a 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科

^c 東京都健康安全研究センター微生物部

TMPRSS2 だけではなく SARS-CoV-2 が細胞に侵入する際に結合する ACE2 受容体 (angiotensin-converting enzyme 2) も細胞膜上に多く発現させた細胞で、10% FBS, 1 mmol/L ピルビン酸ナトリウム及び 100 単位/mL ペニシリン- 0.1 mg/mL ストレプトマイシン, 5 mg/mL ピューロマイシンを添加した高グルコース濃度 (4,500 mg/L) Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM; Sigma, USA) を GM として培養を行った。

オミクロン株の分離培養で用いる維持培地 (MM) には、2% FBS 及び 100 単位/mL ペニシリン- 0.1 mg/mL ストレプトマイシンを添加した高グルコース濃度 (4500 mg/L) D-MEM (Sigma, USA) を使用した。また、既報⁵⁾で報告した通りに MM にアムホテリシン B を 3.125 µg/mL の濃度に添加したものをアムホテリシン B 添加 MM とした。

3. SARS-CoV-2 分離培養

ウイルス分離は各細胞を単層培養した 24 well 細胞培養プレートより GM を除去し、変異株スクリーニング検査により SARS-CoV-2 デルタ株またはオミクロン株陽性となった唾液や鼻腔または咽頭ぬぐい液などを 1.5 mL のチューブに分取し、4°C下で 7,800×g, 10 分間の遠心分離を行い、上清 100 µL を各細胞に接種した。細胞に接種後、37°C, 5% CO₂ 孵卵器内で 10~20 分間吸着反応を行った。吸着反応後、MM を 1 mL/well 加え、37°C, 5% CO₂ 孵卵器内でそれぞれ培養を行った。また、Vero 細胞, Vero E6 細胞においては、2 well を用いて一方には他の細胞と同様に MM を、もう一方には、アムホテリシン B 添加 MM を加えて分離培養を行った。検体接種後、3 日目及び 7 日目に倒立顕微鏡を用いて、接種した細胞に出現する細胞変性効果 (CPE) の有無を確認し、ウイルス分離について判定を

行った。これらの SARS-CoV-2 感染実験の全ては、バイオセーフティーレベル 3 (BSL3) の実験室内で実施した。

4. 統計処理

各細胞での分離率の比較には、2 つの比率の差の検定を用いた。帰無仮説は「2 つの比率はおなじ ($P_1=P_2$)」として、帰無仮説が棄却できるか否かについて検定を行った (5%有意水準)。

5. 倫理的配慮

本研究を実施するに当たり、東京都健康安全研究センター倫理委員会の承認 (承認番号: 31 健研健第 2007 号 2020 年 3 月 2 日, 3 健研健第 465 号 2021 年 5 月 31 日) を取得した。

結果

変異株スクリーニング検査でオミクロン株が検出された臨床検体からは、Vero 細胞では 205 検体中 30 検体 (14.6%)、Vero E6 細胞では 255 検体中 91 検体 (35.7%)、Vero E6/TMPRSS2 細胞では 257 検体中 80 検体 (31.1%)、Vero E6/TMPRSS2/T2A/ACE2 細胞では 228 検体中 120 検体 (52.6%) 分離することができた。また、Vero 細胞および Vero E6 細胞の MM として、アムホテリシン B 添加 MM を用いたものでは、Vero 細胞では 193 検体中 68 検体 (35.2%)、Vero E6 細胞では 242 検体中 111 検体 (45.9%) 分離された (Table 1)。また、オミクロン株が流行し始めていた期間に搬入された試料の中には、少数ではあったがデルタ株も含まれていた。それらデルタ株とされた試料もオミクロン株の分離と同様の培養細胞を用いて分離培養を行った。その結果、Vero E6 細胞では 10 検体中 7 検体 (70.0%)、Vero E6/ TMPRSS2 細胞では、10 検体中 10 検体

Table 1. Isolation Results of SARS-CoV-2 Omicron Variants by Vero Lineage Cells

Usage Cells	Vero	Vero E6	Vero E6/ TMPRSS2	Vero E6/ TMPRSS2/ T2A/ACE2	Vero E6 + amphotericin B	Vero + amphotericin B
Number of inoculated samples	205	255	257	228	242	193
Number of isolates	30	91	80	120	111	68
Isolation Ratio %	14.6	35.7	31.1	52.6	45.9	35.2

Table 2. Results of Delta Strains Isolation Using Vero Lineage Cells During the Omicron Variants Epidemic

Usage Cells	Vero	Vero E6	Vero E6/ TMPRSS2	Vero E6/ TMPRSS2/ T2A/ACE2	Vero E6 + amphotericin B	Vero + amphotericin B
Number of inoculated samples	10	10	10	6	7	6
Number of isolates	6	7	10	6	6	5
Isolation Ratio %	60	70	100	100	85.7	83.3

(100%) , Vero 細胞では 10 検体中 6 検体 (60.0%) , Vero E6/TMPRSS2/T2A/ ACE2 細胞では 6 検体中 6 検体 (100%) 分離された。また, アムホテリシン B 添加 MM を用いた Vero E6 細胞では 7 検体中 6 検体 (85.7%) , Vero 細胞では 6 検体中 5 検体 (83.3%) 分離された (Table 2) .

しかし, オミクロン株においては, 分離率の検定結果から Vero E6/ TMPRSS2 細胞と Vero E6 細胞の分離率は同程度の分離率になった ($P_1=P_2$) . また, オミクロン株分離培養において Vero E6/TMPRSS2/T2A/ACE2 細胞の結果と Vero E6 細胞などの他の培養細胞の結果を「2 つの比率の差の検定」でそれぞれ検定を行ったところ帰無仮説 ($P_1=P_2$) は棄却され, Vero E6/TMPRSS2/T2A/ACE2 細胞がオミクロン株の分離成績が最も良好であった。また, Vero E6 細胞にアムホテリシン B 添加 MM を用いて分離培養を行った場合と Vero E6/TMPRSS2/T2A/ACE2 細胞との分離率を比較検定した結果, それぞれ 45.9%と 52.6%で, 後者の方が高率であったが, 帰無仮説 ($P_1=P_2$) は棄却されず, 分離培養結果がほぼ同等となった。

考 察

SARS-CoV-2 デルタ株までは, これまでの経験的にリアルタイム-PCR 法で陽性で, Ct 値 30 未満であれば, ウイルス分離がほぼ可能であった。しかし, オミクロン株の分離培養では Ct 値が 30 未満であっても分離することが困難な場合が散見されるようになった。当センターでは分離培養に用いる MM をデルタ株流行期まで, イーグル MEM 培地 (E-MEM) を使用してきたが, オミクロン株になると分離率の低下がみられた。そこで, 既報⁵⁾の通り, MM の検討を行い高グルコース濃度ダルベッコ改変イーグル培地 (D-MEM) に変更することによりオミクロン株の分離率はやや向上したが, 劇的な分離率の向上には至らなかった。デルタ株の分離培養においては MM の変更や細胞による分離結果の差はほとんど認められず, どの細胞においても良好に分離培養ができた。

一方, Vero E6/TMPRSS2/T2A/ACE2 細胞を用いたオミクロン株の分離培養結果は, 今回検討に使用した 5 種類の細胞中最も分離率が高い結果が得られた。また, オミクロン株流行時に検出されたデルタ株の分離培養においても良好な成績を示し, オミクロン株だけではなく他の変異株の分離培養においても有用な細胞であることが判明した。

オミクロン株は, 細胞に感染する際に細胞膜上の ACE2 に結合した後 TMPRSS2 による開裂を受けずにエンドサイトーシスにより細胞内に侵入するとされている^{6,7)}。そのため, 今回のオミクロン株分離培養において Vero E6 細胞と Vero E6/TMPRSS2 細胞の分離成績が同程度であったのは, 細胞膜上の TMPRSS2 に依存せずに細胞膜表面上に存在する ACE2 の量が分離成績を左右する因子としての影響が大きいと推察された。以上のことから, オミクロン株を効率的に分離培養するためには細胞膜上に ACE2 が多く存在している細胞を使用することが重要であると考えられた。

オミクロン株は, エンドサイトーシスで細胞内に侵入し効率的に増殖するとされており^{6,7,8)}, アムホテリシン B がエンドサイトーシス経路でのウイルス増殖を賦活化する可能性があることを既報⁵⁾で報告した。今回も既報に従い Vero E6 細胞とアムホテリシン B 添加 MM による分離培養の結果, 接種検体 242 検体中 111 検体 (45.9%) のオミクロン株を分離することができた。同様に Vero 細胞を用いた結果は Vero 細胞と通常の MM の組み合わせで行った場合よりも分離結果は向上したが劇的な効果は得られなかった。アムホテリシン B 添加 MM を用いた Vero E6 細胞でのオミクロン株の分離率は, 今回新たに用いた Vero E6/TMPRSS2/T2A/ ACE2 細胞の分離率にはほぼ匹敵する結果が得られた。

現在も SARS-CoV-2 は変異を重ね新たな変異株が登場し流行を起こしている。例えば, Vero 系細胞以外にも SARS-CoV-2 の分離培養に用いられる細胞は幾つかあり, ヒト肺がん由来株化細胞の Calu-3 細胞やヒト結腸がん細胞である Caco-2 細胞などがある。これらの細胞はいずれもヒト由来の細胞であり, 細胞膜上にも ACE2 や TMPRSS2 の存在が確認されている。特に Calu-3 細胞は呼吸器由来の細胞で, オミクロン株など SARS-CoV-2 の分離培養に用いる細胞としての適否を検討する必要があると考える。今後も, 新たな変異株の高率的な分離培養を行うために, 使用する培養細胞や培地など総合的に検討を継続して行う必要がある。

まとめ

臨床検体を用いて SARS-CoV-2 オミクロン株の分離培養の検討を行ったところ, Vero E6/TMPRSS2/T2A/ACE2 細胞では, 228 検体中 120 検体 (52.6%) , Vero E6 細胞では, 255 検体中 91 検体 (35.7%) であった。また, アムホテリシン B を添加した MM を用いた Vero E6 細胞では, 242 検体中 111 検体 (45.9%) で, アムホテリシン B を添加した MM により Vero E6 細胞では明らかな分離率の向上が見られた。分離培養に使用した細胞の中でもっとも分離率の高かった Vero E6/TMPRSS2/T2A/ACE2 細胞の分離率と MM にアムホテリシン B を添加した Vero E6 細胞での分離率は, ほぼ同等の分離率であった。以上のことから, オミクロン株の分離培養には, Vero E6/TMPRSS2/ T2A/ACE2 細胞を用いることでより効率的に分離培養を行うことができると考えられた。

文 献

- 1) WHO: WHO advice for international travel and trade in relation to the outbreak of pneumonia caused by a new coronavirus in China
<https://www.who.int/news-room/articles-detail/who-advice-for-international-travel-and-trade-in-relation-to-the-outbreak-of-pneumonia-caused-by-a-new-coronavirus-in-china/> (2023 年 5 月 25 日現在, なお, 本 URL は変

- 更または抹消の可能性がある)
- 2) WHO: WHO advice for international travel and trade in relation to the outbreak of pneumonia caused by a new coronavirus in China
<https://www.who.int/news-room/articles-detail/who-advice-for-international-travel-and-trade-in-relation-to-the-outbreak-of-pneumonia-caused-by-a-new-coronavirus-in-china/> (2023年5月25日現在, なお, 本URLは変更または抹消の可能性がある)
 - 3) WHO News—Classification of Omicron (B.1.1.529): SARS-CoV-2 Variant of Concern. 2021.
[https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-\(b.1.1.529\)-sars-cov-2-variant-of-concern](https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-(b.1.1.529)-sars-cov-2-variant-of-concern).
(2023年5月25日現在, なお, 本URLは変更または抹消の可能性がある)
 - 4) Yadav, D.P., Gupta, N., Potdar, V., *et al.*: An in vitro and in vivo approach for the isolation of Omicron variant from human clinical specimens.
<https://doi.org/10.1101/2022.01.02.474750> (2023年5月25日現在, なお, 本URLは変更または抹消の可能性がある)
 - 5) Yoshida, I., Nagashima, M., Asakura, H., *et al.*: *Kitasato Med J.*, **52**, 105–111, 2022.
 - 6) Peacock, T.P., Brown, J.C., Zhou, J., *et al.*: The SARS-CoV-2 variant, Omicron, shows rapid replication in human primary nasal epithelial cultures and efficiently uses the endosomal route of entry. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.12.31.474653v1#:~:text=At%20the%20end%20of%202021,re%20infection%20and%20vaccine%20breakthroughs>. (2023年5月25日現在, なお, 本URLは変更または抹消の可能性がある)
 - 7) Zhao, H., Lu, L., Peng, Z., *et al.*: *Emerging Microbes & Infections*, **11**, 277–283, 2022.
 - 8) Smith, S.E., Weston, S., Kellam, P., *et al.*: *Curr Opin Virol.*, **4**, 71–77, 2014.

Investigation of Culture Cells Used for Isolation and Culture of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, Omicron Variant, Isolated in Tokyo

Isao YOSHIDA^a, Hiroyuki ASAKURA^b, Kai KOBAYASHI^a, Noeru HASEGAWA^a, Maya ISOGAI^b, Takushi FUJIWARA^b, Mami NAGASHIMA^b, Jun SUZUKI^a, and Kenji SADAMASU^c

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, Omicron variant, demonstrated more mutations in the spike protein than the original Wuhan strain, Delta variant, etc. Furthermore, isolating it has become difficult despite using Vero E6/TMPRSS2 cells, which had the best performance in isolation culture up to the Delta variant. Amphotericin B was added to the maintenance medium to improve the isolation rate of the Omicron variant, and the isolation rate of Vero E6 cells increased from 35.7% (91/255 samples) to 45.9% (111/242 samples). However, we attempted an isolation culture using Vero E6/TMPRSS2/T2A/ACE2 cells because some mutants could not be isolated because of the appearance of additional variants, and we revealed that the isolation rate of 35.7% (91/255 samples) in Vero E6/TMPRSS2 cells was higher than that of Vero E6/TMPRSS2/T2A/ACE2 cells, which increased to 52.6% (120/228). This indicates that Vero E6/TMPRSS2/T2A/ACE2 cells should be used to isolate Omicron strains.

Keywords: SARS-CoV-2, Delta variant, Omicron variant, Vero E6 cell, Vero E6/ TMPRSS2/T2A/ ACE2 cell

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan