

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

オミクロン変異株の分離培養条件の検討

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

我々は、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）発生時初期からVero系細胞を用いて、原因ウイルスであるSevere acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)の分離培養を行ってきたが、オミクロン変異株は、従来の株（アルファ株、デルタ株等含む）とは異なり、分離培養しにくい事例も見られている。今回VeroE6、Vero細胞へのアンフォテリシンB添加の効果について検討し、分離率の向上を図った。その結果VeroE6、Vero細胞はアンフォテリシンB添加MMを使用することで、分離率が向上した。今後も登場するであろう、新たなSARS-CoV-2の変異株について、分離培養条件についても引き続き検討を続けていく必要があると考える。

キーワード：Vero系細胞，オミクロン変異株，エンドサイトーシス，インターフェロン誘導性膜貫通（IFITM）タンパク質，アンフォテリシンB

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肺炎の集団発生が報告され、原因ウイルスはSevere acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)と命名された¹⁾。我々は、SARS-CoV-2武漢株以降、R1株、アルファ株、デルタ株と多くの変異株を分離し報告してきた²⁾。このような中、2021年11月にオミクロン(B.1.1.529)株が南アフリカで最初に報告された³⁾。2021年12月頃からは都内でもオミクロン変異株が検出されるようになり、現在では流行株の主体となっている⁴⁾。

オミクロン株(BA.1及びBA.2)は、従来の流行株に比べて変異が非常に多く、スパイク部分だけでもアンジオテンシン変換酵素2(ACE2)親和性の増加(S:Q498R, N501Y)、感染性の増加(S:H655Y, N679K, P681H)、などの変異が知られている⁵⁾。また、オミクロン株は従来株のように細胞へ感染する際に受容体としてACE2を利用し、細胞内に侵入時には膜貫通型セリンプロテアーゼ2(TMPRSS2)を利用して細胞内へ侵入する経路のみならず^{6,7)}、さらに、TMPRSS2に依存せずにエンドサイトーシス(細胞の貪食作用)を利用して効率的に細胞内に侵入し、増殖することが出来ると報告されている^{8,9)}。

我々は、2020年1月以降、SARS-CoV-2による感染症(COVID-19)疑いの臨床検体(咽頭・鼻腔拭い液、唾液など)からVero E6細胞とVero E6/TMPRSS2細胞などを使用してSARS-CoV-2の分離培養を行ってきた^{10,11)}。実際に、これらの細胞を用いてデルタ株までは比較的容易に分離することが出来ていた。しかし、オミクロン株

(BA.1, BA.2)の中には、リアルタイムRT-PCR法の結果(Ct値)に関わりなく、分離培養が比較的困難なものも見られるようになってきた。

そこで、臨床検体からのオミクロン株の分離培養時に使用する維持培地や培養温度、また、エンドサイトーシス経路により細胞内へ侵入したウイルスの増殖を賦活化するための維持培地(MM)中へのアンフォテリシンBの添加について検討した¹²⁾。今回、Vero系細胞であるVero E6、Vero細胞にアンフォテリシンB添加MMを使用し、オミクロン株の分離培養の分離率の向上を目的に検討を行ったので、その結果について報告する。

材料と方法

1. 臨床検体からのSARS-CoV-2分離培養

2021年12月下旬から2022年5月20日までに供試された、東京都内保健所などから搬入されたCOVID-19の疑いのある臨床検体(唾液、咽頭拭い液など)151件をSARS-CoV-2分離用検体として用いた。

分離培養に使用した細胞は、Vero E6細胞、Vero E6細胞にTMPRSS2を発現させたVero E6/TMPRSS2細胞、及びVero細胞を用いた。

細胞の培養では、Vero E6細胞、Vero細胞については、10%牛胎児血清(FBS)、1%MEM用非必須アミノ酸(NEAA)、及び100単位/mLペニシリンと0.1 mg/mLストレプトマイシンなどを添加したEagle's Minimum Essential Media (E-MEM, 日水製薬: 05901)を発育培地(GM)として培養し、Vero E6/TMPRSS2細胞は、10%

^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

FBS, 1% NEAA, 抗生物質を添加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM, 日水製薬:05915) を用いそれぞれ培養を行った. SARS-CoV-2 分離培養には, 各細胞を 24 well 細胞培養用プレート(IWAKI)に単層培養したものを用いた.

臨床検体は, 4°C 9,500 rpm 15 分間, 遠心分離した後の上清を 100 µL/well で各細胞に接種した. 細胞に接種した後, 37°C 5% CO₂ 孵卵器内で 15 分間静置し, 吸着反応を行った. その後, 各 well に維持培地 (MM) として 2% FBS, 抗生物質を添加した High glucose D-MEM (Sigma : D-7777) を 1 mL 加え 37°C 5%CO₂ 孵卵器内で培養を行った. 培養開始後, 3 日目あるいは, 4 日目と 7 日目に倒立顕微鏡で細胞変性効果 (CPE) を観察し, CPE の現れたものを分離培養陽性と判断し, 培養上清を回収した.

2. 維持培地へのアンフォテリシン B 添加の効果

Vero E6, Vero 細胞では, 試料を接種し, 吸着反応後, 3.125 µg/mL のアンフォテリシン B (富士フィルム和光純薬) 含む MM を 1 mL/well 加え, 37°C 5%CO₂ 孵卵器内で培養を行った. 培養開始後, 3 日目あるいは, 4 日目と 7 日目に倒立顕微鏡で CPE を観察し, CPE の現れたものを分離培養陽性と判断し, 培養上清を回収した.

3. NGS 解析

アンフォテリシン B を MM に加え Vero E6 細胞で培養を行ったオミクロン変異株の全長配列を NGS で決定し, Vero E6 細胞で MM にアンフォテリシン B を加えていないもので分離培養した同一由来のウイルスの全長配列と比較検討した.

ライブラリーに使用した RNA は, QIAmp Viral RNA mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出した. NGS ライブラリー調製は NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB) を用い, データ取得は MiSeq (Illumina) を用いて行った. 取得したデータは CLC genomics workbench (CLC bio) を用いてコンティグを作成し, 参照株へマッピングした. 変異部位の検索には Wuhan-Hu-1 (NC_045512.2) を参照株として使用した.

4. 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: 3 健研健第 465 号 2021 年 5 月 31 日) を取得した.

結 果

1. 臨床検体からの SARS-CoV-2 分離培養

供試された臨床検体 151 件から分離された SARS-CoV-2 は, オミクロン株 (BA.1, BA.2) 58 件 (38.4%), デルタ株 13 件 (8.6%), 型別不能株 1 件 (0.7%), 計 72 件 (47.7%) であった (Table 1). 分離されたオミクロン変異株を分離された細胞別に見ると, Vero E6 細胞のみで分離されたもの 4 株 (6.9%), Vero E6/TMPRSS2 細胞のみで分離されたもの 20 株 (34.5%), Vero E6 細胞

と Vero E6/TMPRSS2 細胞の両方で分離されたもの 23 株 (39.7%) であった. また, Vero 細胞は, 供試検体 53 件を接種し 13 株 (24.5%) を分離した (Table 2). 各細胞での細胞変性効果 CPE を Fig. 1 に示した. Vero E6/TMPRSS2 細胞 Fig.1 (E) では, やや大きな合胞体 (syncytium, 矢印) が見られた.

2. 維持培地へのアンフォテリシン B 添加の効果

アンフォテリシン B を添加した維持培地を使用した Vero E6 細胞での分離率は, 接種検体 92 件中 42 件 (45.7%) であった. また, オミクロン株が分離された検体で見ると, 接種検体数 45 株中 36 株 (80.0%) が分離された. Vero 細胞に同様にアンフォテリシン B を添加した MM を使用し分離培養を行ったところ, 接種検体 87 件中 26 件 (29.9%), オミクロン株が分離された検体では, 39 件中 21 件 (53.8%) であった (Table 3).

3. NGS による解析

Vero E6 細胞に 3.125 µg/mL アンフォテリシン B 添加 MM を用いてオミクロン変異株を培養したウイルスと, アンフォテリシン B を添加していない MM で培養したウイルスのゲノムを比較したところ, ウイルスゲノムの全長領域で, すべての領域において配列が一致した.

考 察

SARS-CoV-2 が細胞に感染する際には, 受容体として ACE2 に結合し, TMPRSS2 を利用し細胞内に侵入する^{6,7)}. しかし, オミクロン変異株の場合は細胞内に侵入時に TMPRSS2 を利用しなくても, 宿主細胞のエンドサイトーシスによる経路でも効率的に細胞内に侵入することが出来ると報告されている^{8,9)}. そのため, オミクロン株は TMPRSS2 の少ない咽頭付近の細胞にも広範囲にウイルスが感染し, 臨床症状として激しい咽頭痛が先んじてある^{6,7)}. 一方で, 肺炎に至るケースがデルタ株に比べて少ないとの報告がある⁸⁾. 肺深部よりも咽頭部の方が, 温度が低いことから, 既報¹²⁾のように上気道感染を主とするライノウイルスと同じ低温度下 (33°C) の温度条件下¹³⁾での培養を試みた. しかし, オミクロン変異株では従来株と同様 37°C 付近が増殖の至適温度であった. また, オミクロン株が, エンドサイトーシス経路を利用した細胞侵入時, エンドソームの膜上には, ウイルスの増殖を抑制するインターフェロン誘導性膜貫通型型 (IFITM) タンパク質が存在していることが知られているが^{8,14,15)}, アンフォテリシン B により IFITM のウイルス抑制効果を阻害されることが知られている^{8,14)}. 今回, アンフォテリシン B を添加した Vero E6 細胞では分離率が 37.8% から 80.0% への向上がみられ, アンフォテリシン B による賦活化効果を確認できた. 同様に, Vero 細胞においてもアンフォテリシン B の効果は確認できたが, Vero E6 細胞に比べると分離率は Vero E6 細胞の 6 割程度であった. これは, Vero 細胞表面に存在する ACE2 受容体の量の差と推察される.

NGS 解析により, アンフォテリシン B 添加 MM で培

Table 1. Number of SARS-CoV-2 Variant Strains Isolated from Clinical Specimens from December 2021 to May 2022

No. of samples	Delta variants (%)	Omicron variants (%)	Unknown (%)	Non-isolated (%)
151	13 (8.6)	58 (38.4)	1 (0.7)	79 (52.3)

Table 2. Number of SARS-CoV-2 Omicron Variant Strains Isolated by Cell Types

No. of samples	Vero E6 and Vero E6 / TMPRSS2 (%)	Vero E6 (%)	Vero E6 / TMPRSS2 (%)	Vero (%)
58	23 (39.7)	4 (6.9)	20 (34.5)	13* (24.5**)

*: Of the 53 inoculations, 11 strains were isolated.

** : 53 clinical samples were tried for Vero cell line.

Table 3. Results of Isolation of the Omicron Variant Strains from Clinical Specimens by the MM with Amphotericin B

Cell type	Samples	MM with amphotericin B		MM without amphotericin B		
		Isolated		Vero E6	Vero E6/ TMPRSS2	Vero E6 and Vero E6/TMPRSS2
Vero E6	45	36		1	17	16
	Isolation rate	80.0%		2.2%	37.8%	35.6%
Vero	39	21		2	14	16
	Isolation rate	53.8%		5.1%	35.9%	41.0%

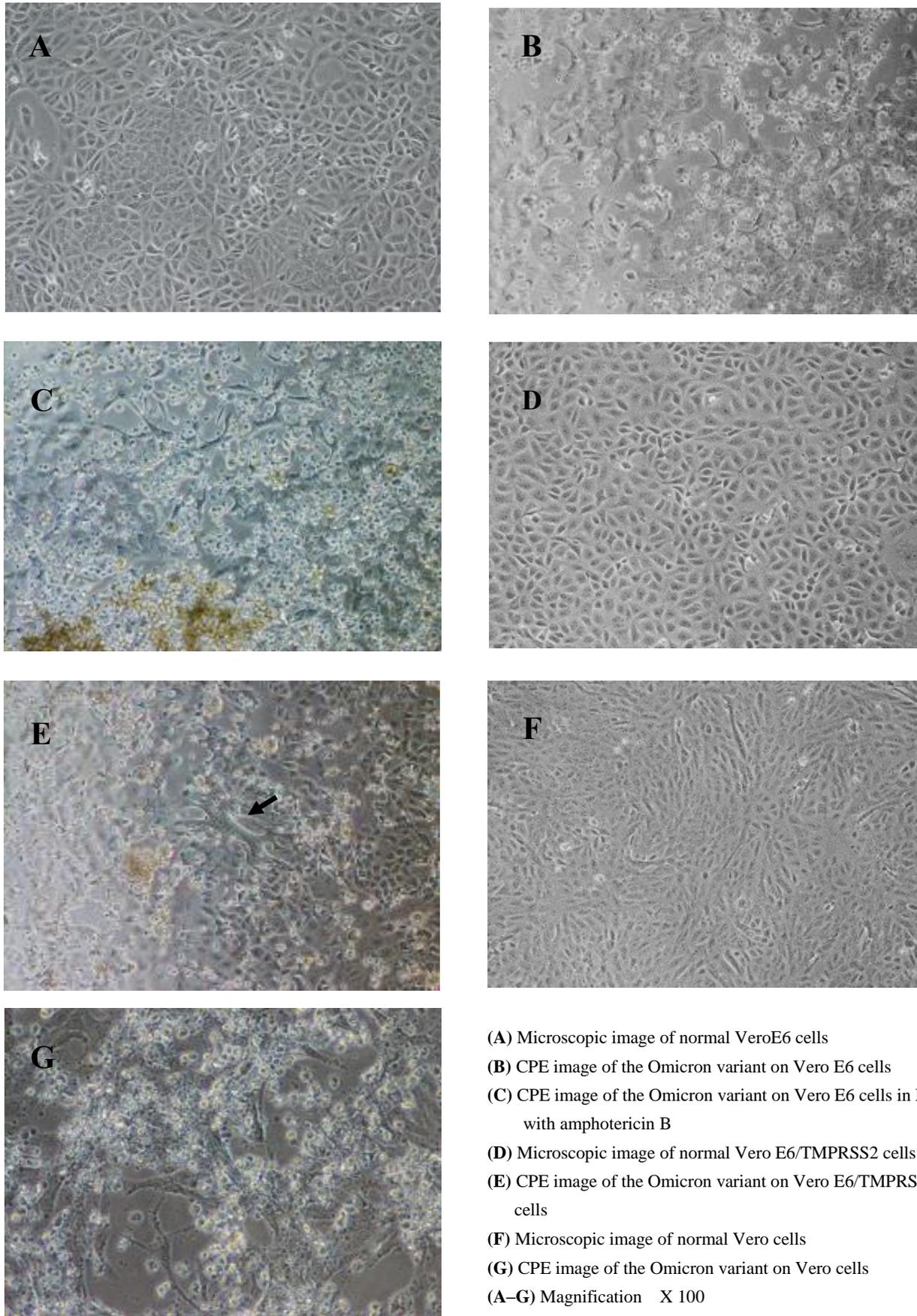
養した SARS-CoV-2 と、通常の MM で培養したものとの比較で、全長領域において 100%一致した。よって、分離培養にアンフォテリシン B を添加した場合でも、分離ウイルスの遺伝子解析等には問題がないことが明らかとなった。

また、オミクロン株は Vero E6/TMPRSS2 細胞においてデルタ株に比べて複製効率が低いとの報告もある⁸⁾。しかし、今回の研究結果から、Vero E6/TMPRSS2 細胞が関与した分離数は、Table 2. の VeroE6 and Vero E6/TMPRSS2 の分離数と Vero E6/TMPRSS2 の分離数の合計数から、43/58 (74.1%) となり、分離株数から見ると Vero E6/TMPRSS2 細胞の分離率は引き続き良好といえた。また、Vero E6 細胞、Vero 細胞において、アンフォテリシン B を加えた MM

を使用した場合のみ分離できた株が 4 株に過ぎなかった。

本研究で、Vero E6/TMPRSS2 細胞は、SARS-CoV-2 が細胞膜上の TMPRSS2 を利用して細胞への侵入経路を賦活化した細胞として、また、もう一方の侵入経路、エンドサイトーシス経路を賦活化したアンフォテリシン B 添加 MM を使用した Vero E6 細胞との複数の侵入経路の細胞を用いた分離法により、オミクロン株の分離培養がより効率的に行うことができると考える。

今後も種々の変異株が出現してくると予想される中、SARS-CoV-2 変異株の効率的な分離培養の諸条件について検討を行うことが重要である。



(A) Microscopic image of normal VeroE6 cells
(B) CPE image of the Omicron variant on Vero E6 cells
(C) CPE image of the Omicron variant on Vero E6 cells in MM with amphotericin B
(D) Microscopic image of normal Vero E6/TMPRSS2 cells
(E) CPE image of the Omicron variant on Vero E6/TMPRSS2 cells
(F) Microscopic image of normal Vero cells
(G) CPE image of the Omicron variant on Vero cells
(A–G) Magnification X 100
Arrows point to syncytia.

Fig. 1. Inverted Microscopic Images of CPEs on the Omicron Variant Strains on Different Types of Cells

まとめ

2021年12月下旬より2022年5月20日までに供試された臨床試験検体151件を用いてSARS-CoV-2の分離培養を行ったところ、オミクロン株58件(38.4%)、デルタ株13件(8.6%)、型別不能株1件(0.7%)、計72件が分離された。分離されたオミクロン株を細胞別に見るとアンフォテリシンBを添加したMMを用いたVero E6細胞では、45件中36件(80.0%)、Vero細胞では39件中21件(53.8%)であった。アンフォテリシンBを添加したMMによりVero E6細胞、及びVero細胞で明らかな分離率の向上が見られた。その一方で、Vero E6細胞とVero E6/TMPRSS2細胞で分離されたものが23株(39.7%)、Vero E6/TMPRSS2細胞20株(34.5%)であり、これらを合わせると58件中43件(74.2%)とオミクロン株においてもTMPRSS2が細胞への感染に利用されていることも示唆された。以上のことから、オミクロン株の分離培養には、アンフォテリシンB添加MMを使用したVero E6細胞及びVero E6/TMPRSS2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) Rabaan, A.A., Al-Ahmed, S.H., Haque, S., *et al.*: *Infez. Med.*, **28**, 174–184, 2020.
- 2) 浅倉弘幸, 吉田 勲, 熊谷涼太, 他: 東京健安研七年報, **72**, 101–108, 2021.
- 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). (2022年8月7日現在, なお, 本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 4) 東京都健康安全研究センターホームページ: Whole genome analysis of novel coronaviruses detected in Tokyo (Omicron BA strain), https://www.tmiph.metro.tokyo.lg.jp/lb_virus/sars2ngstree/ (2022年8月7日現在, なお, 本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 5) CoVariants.: Variant: 21K (Omicron)/ <https://covariants.org/variants/21K.Omicron> (2022年8月7日現在, なお, 本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 6) Tsang, H.F., Chan, L.W.C., Cho, W.C.S., *et al.*: *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, **19**, 877–888, 2021.
- 7) Koch, J., Uckeley, Z.M., Doldan P, *et al.*: *EMBO J.*, **40**, e107821, 1–20, 2021.
- 8) Peacock, T.P., Brown, J.C., Zhou, J., *et al.*: *bioRxiv.*, 13, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1101/2021.12.31.474653>.
- 9) Zhao, H., Lu, L., Peng, Z., *et al.*: *Emerg. Microbes. Infect.*, **11**, 277–283, 2022.
- 10) Nagashima, M., Kumagai, R., Yoshida, I., *et al.*: *Jpn. J. Infect. Dis.*, **73**, 320–322, 2020.
- 11) Matsuyama, S., Nao, N., Shirato, K., *et al.*: *E Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **117**, 7001–7003, 2020.
- 12) Yoshida, I., Nagashima, M., Asakura, H., *et al.*: *Kitasato Med. J.* **52**, 105–111, 2022.
- 13) Terajima, M., Yamaya, M., Sekizawa, K., *et al.*: *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, **273**, 749–759, 1997.
- 14) Smith, S., Weston, S., Kellam, P., *et al.*: *Curr. Opin. Virol.*, **4**, 71–77, 2014.
- 15) Dowran, R., Nabavi, S.F., Habtemariam, S., *et al.*: *Biochimie*, **177**, 50–52, 2020.

Investigation of Isolation and Culture Conditions for Omicron Variant Strains of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Isolated in Tokyo, Japan.

Isao YOSHIDA^a, Mami NAGASHIMA^a, Hiroyuki ASAKURA^a, Ryota KUMAGAI^a, Noeru HASEGAWA^a, Maya ISOGAI^a,
Takushi FUJIWA^a, Jun SUZUKI^a, and Kenji SADAMASU^a

Since the beginning of the outbreak, we have been isolation culturing severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), the causative virus of COVID-19, using Vero lineage cells. Omicron variants, on the other hand, differ from conventional strains (including alpha and delta variants) and can be challenging to isolation culture in some cases. In this research, we looked at how adding amphotericin B to Vero E6 and Vero cells affected the isolation rate. As a result, using amphotericin B added MM improved the viral isolation rate of Vero E6 and Vero cells. We believe that further research into isolation and culture conditions for new SARS-CoV-2 variants that are likely to emerge in the future is required.

Keywords: Omicron variant strain, endocytosis, interferon-induced transmembrane proteins, amphotericin B

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