

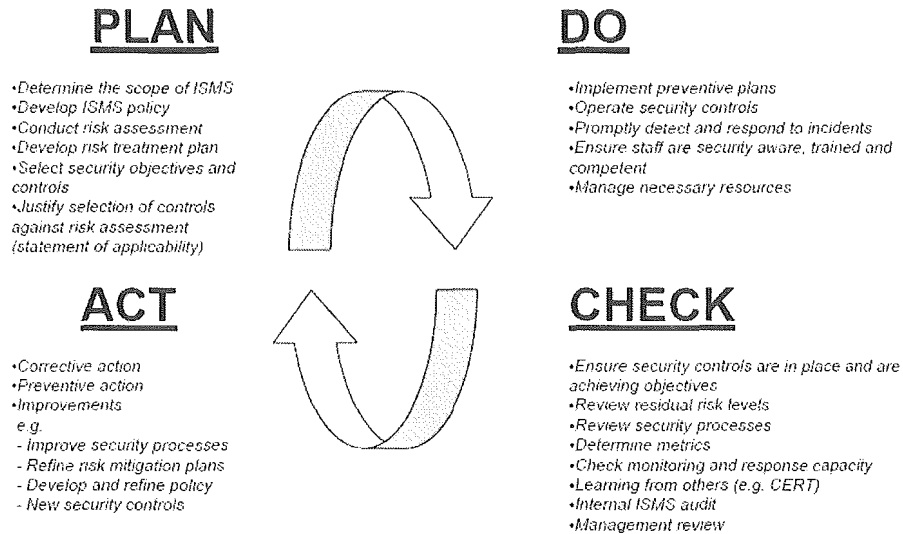
**Special note from authors:**

This paper solely reflects the views of the authors. It does not necessarily reflect the “official” views of the organization, WHO, or institutions they belong.

Figure 1

## Information Security Management System (ISMS) Cycle

### Information Security Management System (ISMS) cycle



(ref. ISO/IEC 27001 and BS7799-2:2002 ISMS standards)

Note: Information Security Controls and Best Practices are categorized by ISO/IEC17799:2005<sup>3</sup> as: 1) security policy, 2) organization of information security, 3) asset management, 4) human resources security, 5) physical and environmental security, 6) communications and operations management, 7) access control, 8) information systems acquisition, development and maintenance, 9) information security incident management, 10) business continuity management, and 11) compliance.

Security control measures would include: 1) governance, technical and end-user policies; standards and reference architecture, 2) auditing and compliance assessment, certification, 3) vulnerability management, anti-malware (virus, worms, Trojan horses, SPASMS, spyware) systems, 4) access-control enforcement (firewalls/IPS (intrusion prevention systems), authentication, authorization, accounting systems, etc.), 5) monitoring, surveillance and response, incident response teams, and 6) awareness and training programs.

## Inhibition of Virus Production in JC Virus-Infected Cells by Postinfection RNA Interference

Yasuko Orba,<sup>1,2</sup> Hirofumi Sawa,<sup>1,2,3\*</sup> Hiroshi Iwata,<sup>1,2</sup> Shinya Tanaka,<sup>1,2</sup>  
and Kazuo Nagashima<sup>1,2</sup>

Laboratory of Molecular and Cellular Pathology<sup>1</sup> and 21st Century COE Program for Zoonosis Control,<sup>3</sup>  
Hokkaido University Graduate School of Medicine, Kita-ku, Sapporo 060-8638, and  
CREST, JST, Sapporo,<sup>2</sup> Japan

Received 25 February 2004/Accepted 30 March 2004

**RNA interference has been applied for the prevention of virus infections in mammalian cells but has not succeeded in eliminating infections from already infected cells. We now show that the transfection of JC virus-infected SVG-A human glial cells with small interfering RNAs that target late viral proteins, including agnoprotein and VP1, results in a marked inhibition both of viral protein expression and of virus production. RNA interference directed against JC virus genes may thus provide a basis for the development of new strategies to control infections with this polyomavirus.**

JC virus (JCV) belongs to the polyomavirus family of double-stranded DNA viruses and causes progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) in humans (23). PML is often observed in immunosuppressed individuals, such as those with AIDS or advanced malignancies. Although highly active antiretroviral therapy, which includes treatment with protease inhibitors, improves the survival rate of patients with AIDS-related PML (2, 7), current therapeutic approaches to PML are not satisfactory. Treatment with cytosine arabinoside (8) or cidofovir (15) has failed to prove efficacious in individuals with PML. Trials of topotecan, which inhibits DNA topoisomerase and blocks JCV replication *in vitro* (11), are currently under way in such individuals. RNA interference (RNAi) with small interfering RNAs (siRNAs) has recently become a widely used approach for repressing cellular or viral gene expression (5, 6, 10, 16). Although several studies have shown that virus infections can be prevented by a prior or concomitant administration of siRNAs, the elimination of established infections from cells or tissues by RNAi has not been demonstrated (1).

To attempt to inhibit JCV production in infected cells, we designed the following siRNAs (Dharmacon) to target three different JCV proteins (Fig. 1a): VP274 and VP691 for VP1, Ag122 and Ag147 for agnoprotein, and LT78 and LT134 for the large T antigen (T-Ag). The JCV early and late RNAs are generated by alternative splicing. The early RNAs encode T-Ag and the small t antigen (14), whereas the major late RNA encodes both agnoprotein and VP1 (21). We introduced the JCV-specific siRNAs into cells of the SVG-A (simian virus 40 [SV40]-transformed human fetal glial cells) line (13) that had been inoculated with JCV (Mad-1/SVEA strain; 1,024 hemagglutination activity units per  $3 \times 10^5$  cells) 4 days previously. JCV late proteins, including VP1 and agnoprotein, were detected by an immunoblot analysis at 2 days postinfection (dpi)

and were abundant at 4 dpi (Fig. 1b). At 4 and 6 dpi, each siRNA (120 pmol per  $6 \times 10^4$  cells) was introduced individually into SVG-A cells by the use of Lipofectamine 2000 (Invitrogen) (Fig. 1c). About 80% of the SVG-A cells were successfully transfected with a fluorescein-conjugated Ag122 siRNA (data not shown). The abundance of JCV proteins in siRNA-transfected cells was examined 48 h after the second transfection by an immunoblot analysis with antibodies specific for agnoprotein (3, 18, 19), VP1 (12, 22), or SV40 T-Ag (Ab-2; Oncogene Research Products) (20). Cells transfected with Ag122, Ag147, or VP274 manifested a marked depletion of viral proteins compared with cells transfected with a control siRNA with a scrambled sequence which is not present in mammalian cells (Dharmacon) (Fig. 1d). Ag122 inhibited the expression of VP1 as well as that of agnoprotein in a dose-dependent manner, but it did not affect the abundance of T-Ag, lamin A/C, or actin (Fig. 1d and e). The antibodies to SV40 T-Ag did not allow for differentiation between JCV T-Ag and SV40 T-Ag in SV40-transformed cells, as these two proteins share >70% amino acid sequence identity (4). We therefore assessed the effects of LT78 and LT134 on JCV T-Ag expression by reverse transcription (RT) and PCR; the abundance of JCV T-Ag mRNA was not affected by the transfection of cells with either siRNA (data not shown).

We also examined the effects of Ag122 and VP274 siRNAs by an indirect immunofluorescence analysis in JCV-infected cells. At 48 h posttransfection, methanol-fixed cells were stained with antibodies to VP1 or agnoprotein and then with Alexa Fluor 488-conjugated goat antibodies to rabbit immunoglobulin G (Molecular Probes). Cells positive for VP1 or agnoprotein were visualized with a laser-scanning confocal microscope (Olympus) and counted in six fields of view. The proportion of agnoprotein-positive cells was significantly reduced for cells transfected with Ag122, VP274, or both siRNAs compared with the value for cells transfected with the scrambled siRNA (Fig. 2a). Similarly, the percentage of VP1-positive cells was also reduced by transfection with Ag122, VP274, or both Ag122 and VP274. We confirmed the inhibition of the expression of agnoprotein and VP1 in cells transfected with

\* Corresponding author. Mailing address: Laboratory of Molecular and Cellular Pathology, Hokkaido University School of Medicine, N15, W7, Kita-ku, Sapporo 060-8638, Japan. Phone: 81-11-706-5053. Fax: 81-11-706-7806. E-mail: h-sawa@patho2.med.hokudai.ac.jp.

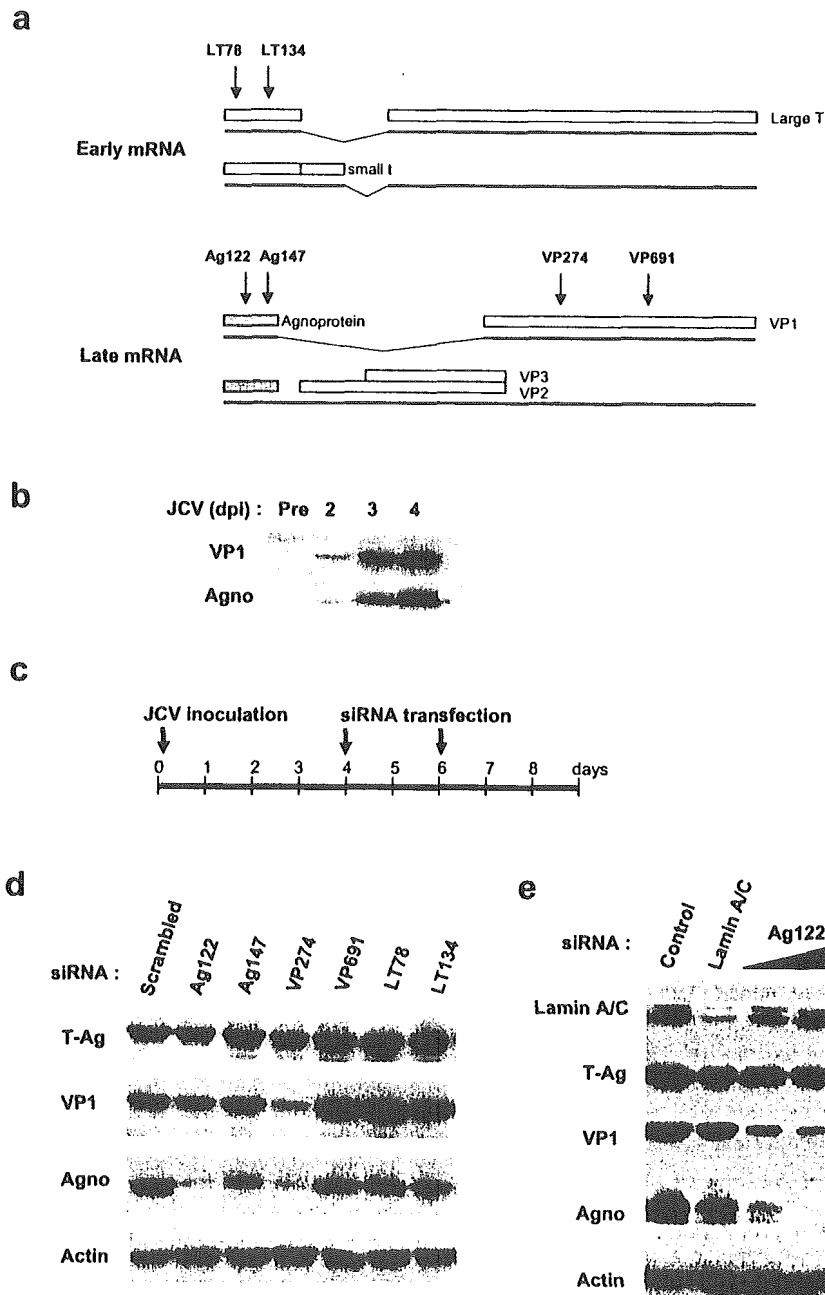


FIG. 1. Effects of postinfection RNAi on the abundance of JCV proteins in JCV-infected SVG-A cells. (a) Schematic representation of major early and late mRNAs of JCV. Major early mRNAs encode the small t antigen and T-Ag, which are translated as splicing variants. Two major forms of late mRNA encode either agnoprotein and VP1 or agnoprotein, VP2, and VP3. The regions of the viral RNAs targeted by the siRNAs are indicated by arrows. (b) Immunoblot analysis of the abundance of VP1 and agnoprotein of JCV in SVG-A cells at the indicated times after infection with JCV. (c) Schedule for JCV infection and siRNA transfection in SVG-A cells. (d) Immunoblot analysis of the indicated proteins in JCV-infected cells subjected to transfection with the indicated siRNAs. (e) Immunoblot analysis of the indicated proteins in JCV-infected cells subjected to transfection with the Ag122 siRNA at 60 or 120 pmol/well or with a lamin A/C-specific siRNA. Control (infected) cells were subjected to mock transfection.

Ag122, VP274, or both siRNAs by an immunoblot analysis (Fig. 2b). The extent of inhibition of viral protein expression achieved with the combination of Ag122 and VP274 did not differ significantly from that achieved with either siRNA alone. The observed inhibition of both agnoprotein and VP1 expression by either Ag122 or VP274 was likely due to the degrada-

tion of the polycistronic late RNA for both of these proteins induced by each siRNA.

It is thought that siRNAs target mRNAs containing the same sequences and induce their cleavage. We therefore examined the effects of Ag122 and VP274 on the abundance of JCV mRNAs. Total RNAs were isolated from cells 12 or 24 h

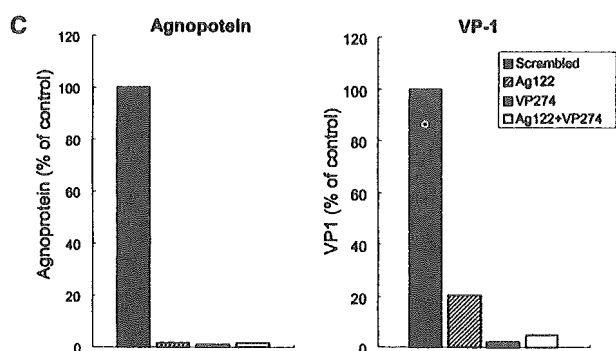
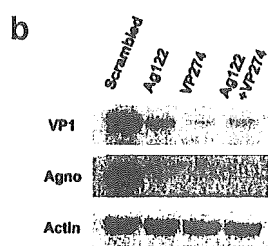
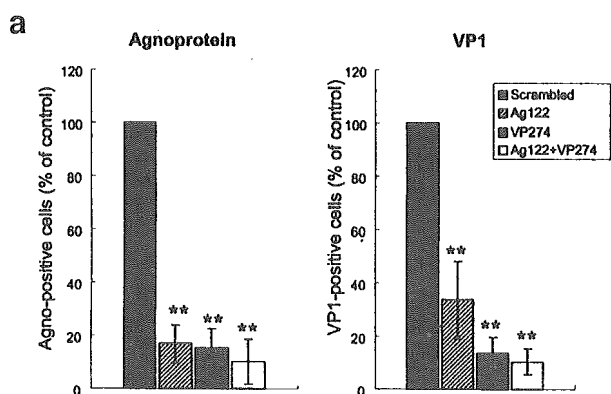


FIG. 2. Indirect immunofluorescence analysis of the effects of RNAi on viral protein expression in JCV-infected SVG-A cells. (a) The proportion of cells that were positive for agnoprotein or VP1 was determined by an indirect immunofluorescence analysis 48 h after transfection with the indicated siRNA(s). The data are expressed as percentages of the proportion determined for JCV-infected cells transfected with the scrambled siRNA (control) and are means  $\pm$  standard deviations (SD) of values from at least three independent experiments. \*\*,  $P < 0.02$  versus the value for cells transfected with the scrambled siRNA (Student's  $t$  test). (b) Immunoblot analysis of VP1, agnoprotein, and actin expression in JCV-infected cells transfected with the indicated siRNA(s). (c) The signals for agnoprotein and VP1 were quantified with an image analyzer and expressed as percentages of the value for cells transfected with the scrambled siRNA.

after transfection with a siRNA, treated with DNase I, and subjected to RT with a Superscript first-strand synthesis system (Invitrogen) followed by real-time quantitative PCR with a GeneAmp5700 instrument (Applied Biosystems). The amount of each viral mRNA was normalized to that of  $\beta$ -actin mRNA in the same sample. The abundance of agnoprotein and VP1 mRNAs was significantly reduced in JCV-infected cells transfected with Ag122, VP274, or both siRNAs (Fig. 3). The reduction in the amounts of viral mRNAs, however, was not as large as that in the amounts of the encoded proteins. We eliminated the possibility of contamination of the viral DNA in the RT-PCR samples by (i) performing a DNase I treatment prior to RT-PCR, without the reverse transcriptase, and (ii) performing an RNase A treatment prior to the reverse transcriptase reaction. For both treatments, the RT-PCR signal was lost, suggesting that there was no contamination of the viral DNA in the RT-PCR samples. Whereas siRNAs are known to be incorporated into an RNA-induced silencing complex and to direct RNA-induced silencing complex-mediated sequence-specific mRNA degradation (9), the detailed mechanism of this process remains unclear. One possible explanation for the difference in the magnitude of the effects of the JCV-specific siRNAs on the amounts of viral RNAs and pro-

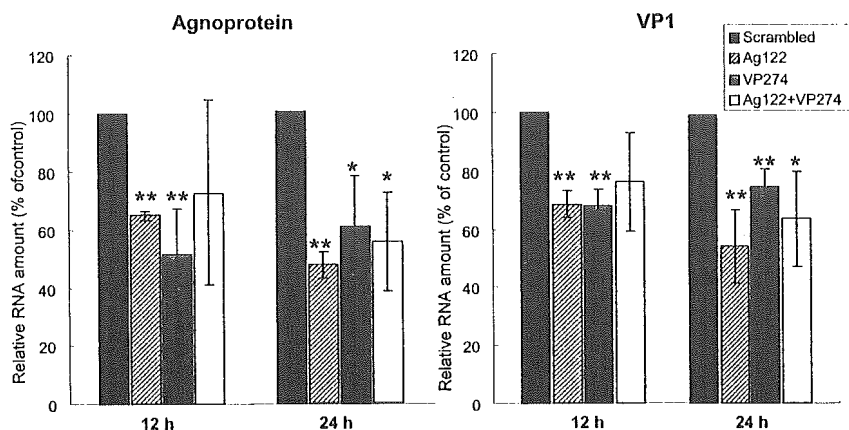


FIG. 3. Depletion of viral RNAs by RNAi in JCV-infected SVG-A cells. Total RNAs isolated from JCV-infected cells 12 or 24 h after transfection with the indicated siRNAs were subjected to an RT-PCR analysis of agnoprotein and VP1 mRNAs. The data were normalized to the amount of  $\beta$ -actin mRNA and are expressed as percentages of the normalized value for JCV-infected cells transfected with the scrambled siRNA (control); they are means  $\pm$  SD of values from at least three independent experiments. \*,  $P < 0.05$ , and \*\*,  $P < 0.02$  versus the value for cells transfected with the scrambled siRNA.

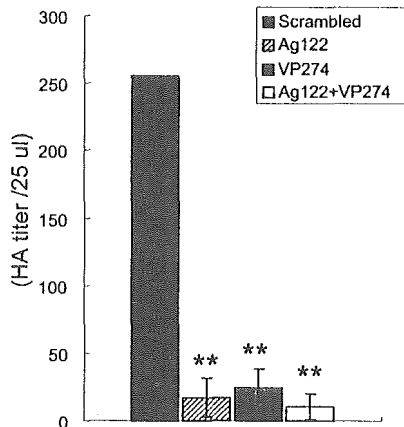


FIG. 4. Inhibition of JCV production by RNAi in SVG-A cells. Extracts prepared from JCV-infected cells 36 h after transfection with the indicated siRNAs were assayed for hemagglutination activity (HA). The data are expressed as HA titers per 25 µl of cell extract and are means  $\pm$  SD of values from at least three independent experiments. \*\*,  $P < 0.02$  versus the value for cells transfected with the scrambled siRNA.

teins is that the target mRNA bound with a siRNA might be detected by RT-PCR before its degradation.

To examine the effect of RNAi on JCV production, we measured the hemagglutination activity (17, 22) of JCV-infected SVG-A cells 36 h after siRNA transfection. The hemagglutination activities of cells transfected with Ag122, VP274, or both of these siRNAs were 6.7, 9.3, and 4.1%, respectively, of that for cells transfected with the scrambled siRNA (Fig. 4). Thus, siRNAs that target agnoprotein or VP1 greatly inhibited JCV production in infected cells.

In summary, we have achieved a marked inhibition of JCV production by RNAi in cells already infected with the virus. Our results may have important implications for the development of a new approach to the treatment of PML. The application of an RNAi-based antiviral strategy for PML will require an efficient and specific delivery of siRNAs to the central nervous system.

We thank Mayumi Sasada for technical assistance.

This study was supported in part by grants from the Ministry of Education, Science, Sports, and Culture and by grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.

#### REFERENCES

- Andino, R. 2003. RNAi puts a lid on virus replication. *Nat. Biotechnol.* 21:629–630.
- Clifford, D. B. 1999. Opportunistic viral infections in the setting of human immunodeficiency virus. *Semin. Neurol.* 19:185–192.
- Endo, S., Y. Okada, Y. Orba, H. Nishihara, S. Tanaka, K. Nagashima, and H. Sawa. 2003. JC virus agnoprotein colocalizes with tubulin. *J. Neurovirol.* 9(Suppl. 1):10–14.
- Frisque, R. J., G. L. Bream, and M. T. Cannella. 1984. Human polyomavirus JC virus genome. *J. Virol.* 51:458–469.
- Ge, Q., M. T. McManus, T. Nguyen, C. H. Shen, P. A. Sharp, H. N. Eisen, and J. Chen. 2003. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:2718–2723.
- Gitlin, L., S. Karelsky, and R. Andino. 2002. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature* 418:430–434.
- Giudici, B., B. Vaz, S. Bossolasco, S. Casari, A. M. Brambilla, W. Luke, A. Lazzarin, T. Weber, and P. Cinque. 2000. Highly active antiretroviral therapy and progressive multifocal leukoencephalopathy: effects on cerebrospinal fluid markers of JC virus replication and immune response. *Clin. Infect. Dis.* 30:95–99.
- Hall, C. D., U. Dafni, D. Simpson, D. Clifford, P. E. Wetherill, B. Cohen, J. McArthur, H. Hollander, C. Yainnoutsos, E. Major, L. Millar, and J. Timponi. 1998. Failure of cytarabine in progressive multifocal leukoencephalopathy associated with human immunodeficiency virus infection. *AIDS Clinical Trials Group 243 Team. N. Engl. J. Med.* 338:1345–1351.
- Hammond, S. M., E. Bernstein, D. Beach, and G. J. Hannon. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404:293–296.
- Jacque, J. M., K. Triques, and M. Stevenson. 2002. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 418:435–438.
- Kerr, D. A., C. F. Chang, J. Gordon, M. A. Bjornsti, and K. Khalili. 1993. Inhibition of human neurotropic virus (JCV) DNA replication in glial cells by camptothecin. *Virology* 196:612–618.
- Komagome, R., H. Sawa, T. Suzuki, Y. Suzuki, S. Tanaka, W. J. Atwood, and K. Nagashima. 2002. Oligosaccharides as receptors for JC virus. *J. Virol.* 76:12992–13000.
- Liu, C. K., G. Wei, and W. J. Atwood. 1998. Infection of glial cells by the human polyomavirus JC is mediated by an N-linked glycoprotein containing terminal  $\alpha(2-6)$ -linked sialic acids. *J. Virol.* 72:4643–4649.
- Lynch, K. J., and R. J. Frisque. 1991. Factors contributing to the restricted DNA replicating activity of JC virus. *Virology* 180:306–317.
- Marra, C. M., N. Rajcic, D. E. Barker, B. A. Cohen, D. Clifford, M. J. Donovan Post, A. Ruiz, B. C. Bowen, M. L. Huang, J. Queen-Baker, J. Andersen, S. Kelly, and S. Shriver. 2002. A pilot study of cidofovir for progressive multifocal leukoencephalopathy in AIDS. *AIDS* 16:1791–1797.
- Novina, C. D., M. F. Murray, D. M. Dykxhoorn, P. J. Beresford, J. Riess, S. K. Lee, R. G. Collman, J. Lieberman, P. Shankar, and P. A. Sharp. 2002. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat. Med.* 8:681–686.
- Nukuzuma, S., Y. Yogo, J. Guo, C. Nukuzuma, S. Itoh, T. Shinohara, and K. Nagashima. 1995. Establishment and characterization of a carrier cell culture producing high titres of polyoma JC virus. *J. Med. Virol.* 47:370–377.
- Okada, Y., S. Endo, H. Takahashi, H. Sawa, T. Umemura, and K. Nagashima. 2001. Distribution and function of JC virus agnoprotein. *J. Neurovirol.* 7:302–306.
- Okada, Y., H. Sawa, S. Endo, Y. Orba, T. Umemura, H. Nishihara, A. C. Stan, S. Tanaka, H. Takahashi, and K. Nagashima. 2002. Expression of JC virus agnoprotein in progressive multifocal leukoencephalopathy brain. *Acta Neuropathol. (Berlin)* 104:130–136.
- Safak, M., R. Barrucco, A. Darbinyan, Y. Okada, K. Nagashima, and K. Khalili. 2001. Interaction of JC virus agno protein with T antigen modulates transcription and replication of the viral genome in glial cells. *J. Virol.* 75:1476–1486.
- Shishido-Hara, Y., Y. Hara, T. Larson, K. Yasui, K. Nagashima, and G. L. Stoner. 2000. Analysis of capsid formation of human polyomavirus JC (Tokyo-1 strain) by a eukaryotic expression system: splicing of late RNAs, translation and nuclear transport of major capsid protein VP1, and capsid assembly. *J. Virol.* 74:1840–1853.
- Suzuki, S., H. Sawa, R. Komagome, Y. Orba, M. Yamada, Y. Okada, Y. Ishida, H. Nishihara, S. Tanaka, and K. Nagashima. 2001. Broad distribution of the JC virus receptor contrasts with a marked cellular restriction of virus replication. *Virology* 286:100–112.
- Weber, T., and E. O. Major. 1997. Progressive multifocal leukoencephalopathy: molecular biology, pathogenesis and clinical impact. *Intervirology* 40: 98–111.

©「現代医療」Vol. 36 No. 11 2004. 別刷

臨 床

# SARS の臨床像

大 石 和 徳

長崎大学熱帯医学研究所 宿主病態解析部門感染症予防治療研究分野 (助教授)

---

株式会社 現代医療社



# SARS の臨床像

大石 和徳

長崎大学熱帯医学研究所 宿主病態解析部門感染症予防治療研究分野 (助教授)

## はじめに

Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)は新種のコロナウイルスによる新興ウイルス感染症であり、2002年11月から2003年7月にかけて全世界で8,422名に及ぶ感染連鎖が認められた。その後には2003年末から2004年1月にかけて、再び中国広東省において発生源の不明な4例のSARS患者の発生が確認されている事実である。このことは、SARSが冬期にこの地域の特異的に発生するウイルス性疾患であることを示唆している。本稿では、SARSの臨床像について記述する。

## 初発症状

高熱(ほぼ100%)と全身倦怠感(19~70%)、筋肉痛(45~68%)などの症状で発症する<sup>1-4)</sup>。上気道の症状は20~25%以下と比較的低く、咳嗽も高率(29~75%)に認めている。一方、入院時における呼吸困難の頻度は低い(4%)。また、下痢の頻度は25~73%と報告によりかなり異なる。初発症状からはSARSとインフルエンザとの鑑別は困難である。

## 呼吸器症状と画像所見

病初期の38°Cを超える高熱は一旦解熱し、第14病日頃まで37°C台の微熱となる<sup>1,5)</sup>(図1)。この解熱傾向には、ほとんどの症例で投与されている副腎皮質ステロイドの影響も考えられる。胸部X線上の肺炎陰影は、入院時には大半の症例(78.3%)において認められる<sup>6)</sup>。入院時に肺炎陰影が認められない場合にも、その後平均3.1日に胸部X線上に浸潤影が出現している。病初期には低酸素血症の頻度は少ないが、その1週間後には低酸素血症が高率に認められ<sup>1)</sup>、肺炎の広がりも第10日病日前後にピークがある<sup>5)</sup>。この肺炎陰影のピークは、前述の気道におけるウイルス量のピーク時期とほぼ一致していると考えられる。その後急性呼吸不全が進展し、10~20%の患者は急性呼吸窮迫症候群(ARDS)を合併する。図2Aに、発病10日後にARDSを合併したSARS可能性例(28歳、男性)の胸部X線所見を示す。また、広東省で経験されたARDS患者の剖検肺の組織所見では、肺胞・間質にマクロファージ、リンパ球浸潤、肺胞における硝子膜形成が認められている<sup>7)</sup>(図2B)。所見はdiffuse alveolar damage

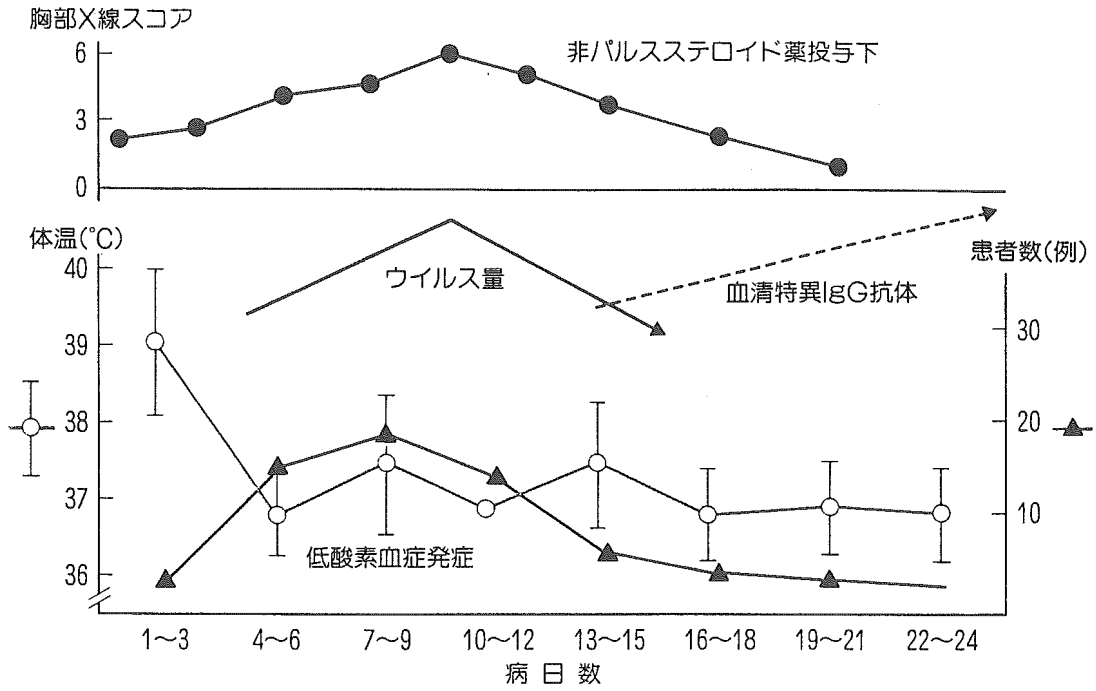


図 1. SARS の臨床病態

(文献 1, 5 より改変引用)

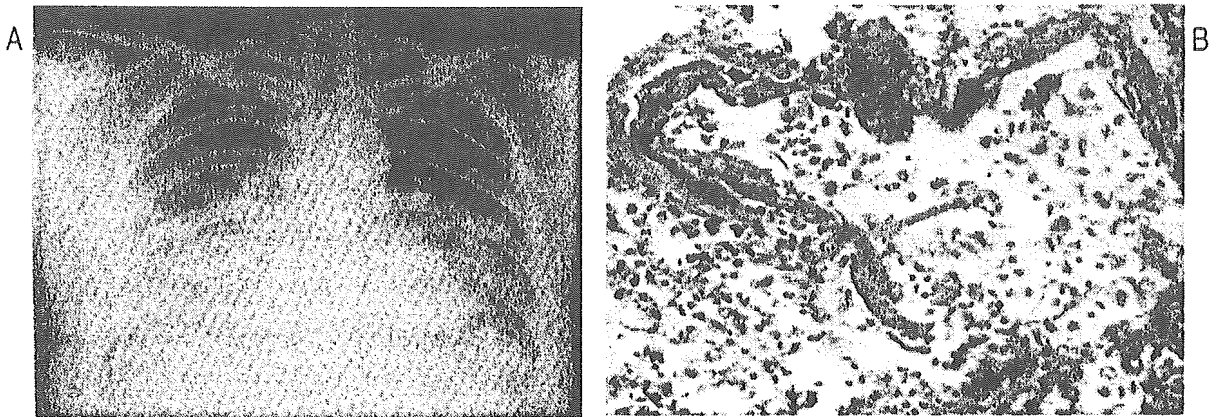


図 2. ARDS を合併した SARS 可能性例(A)と ARDS 患者の剖検肺組織所見(B)

A : ARDS を合併した SARS 可能性例(第 10 病日).

B : ARDS を合併した SARS 可能性例の剖検肺(矢印は硝子膜形成).

(B : 文献 7 より引用)

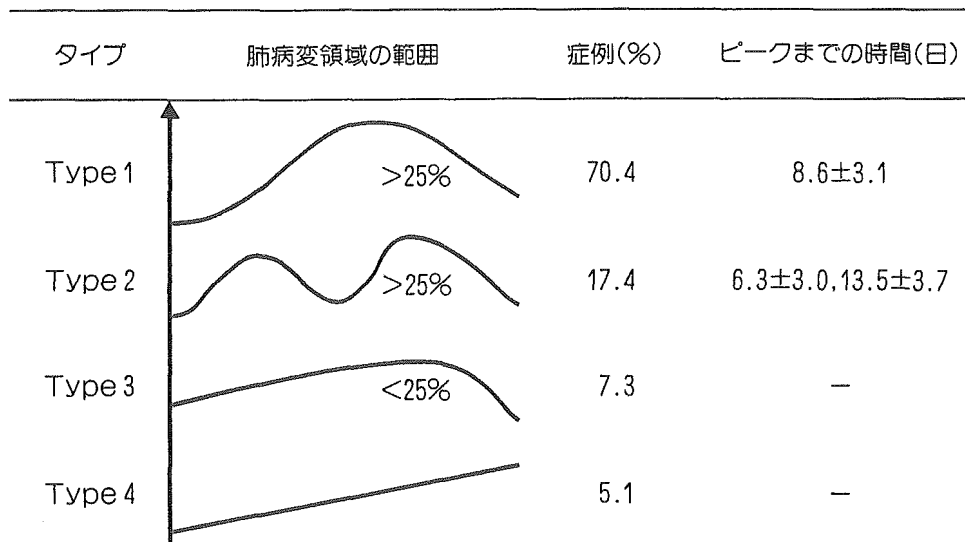


図 3. SARS 症例の胸部 X 線所見のパターン

(文献 6 より改変引用)

(DAD)を示し、ARDSに矛盾しない所見であった。

Wongらは、138例の胸部X線所見を詳細に報告している<sup>6)</sup>。SARS患者の胸部X線所見として辺縁の不鮮明なスリガラス状陰影(ground-glass opacities; GGO)が特徴的で、網状陰影(reticular pattern)、空洞陰影(cavitation)、胸水貯留は認められない。マイコプラズマ肺炎などの非定型肺炎との画像上の鑑別は困難である。他の病変の分布としては、一側肺が54.6%、多肺葉は38.0%、多肺葉、両側肺葉は7.4%であった。胸部X線所見の経過として四つのパターンが認められている(図3)。この中で、全体の70.4%を占めるのが一峰性パターン(肺病変が肺全体の25%を超え、ピークまでの時間は $8.6 \pm 3.1$ 日: Type 1)で、二峰性パターンが17.4%を占めていた(Type 2)。肺病変が全体の25%を超えずに遷延するタイプが7.3%(Type 3)、急速に進行するタイプが5.1%に認められている(Type 4)。

また、SARS症例の胸部 High-resolution

CT(HRCT)の有用性について、多くの香港の研究者が報告している。胸部HRCTの利点は、胸部X線で検出できない微細な変化を検出できること、継時的変化をHRCTパターンによって観察できることである<sup>8)</sup>。Ooiらは、病初期に認められる主要な所見はスリガラス状陰影と浸潤影(consolidation)であり、発症2週間以降に網状陰影が顕著になり、遷延することを報告している<sup>9)</sup>(図4)。さらに、Antonioらは、24例のSARS患者(入院後平均36.5日目)の胸部HRCT所見について報告している<sup>10)</sup>。この研究において、24症例は線維化所見(牽引性気管支拡張など)の認められるグループ1(15例)と、線維化所見のないスリガラス状陰影と間質の肥厚の残存するグループ2(9例)に2分された。グループ1は、患者年齢(45歳 vs. 30.3歳)、ICU入院率(27% vs. 11%)、ピーク血清LDH値(438.9 U/L vs. 355.6 U/L)などがグループ2に比べて高かったとしている。これらの成績から筆者らは、高齢者ほど重症化傾向を示し、HRCT所見で線維化を呈すると結論している。

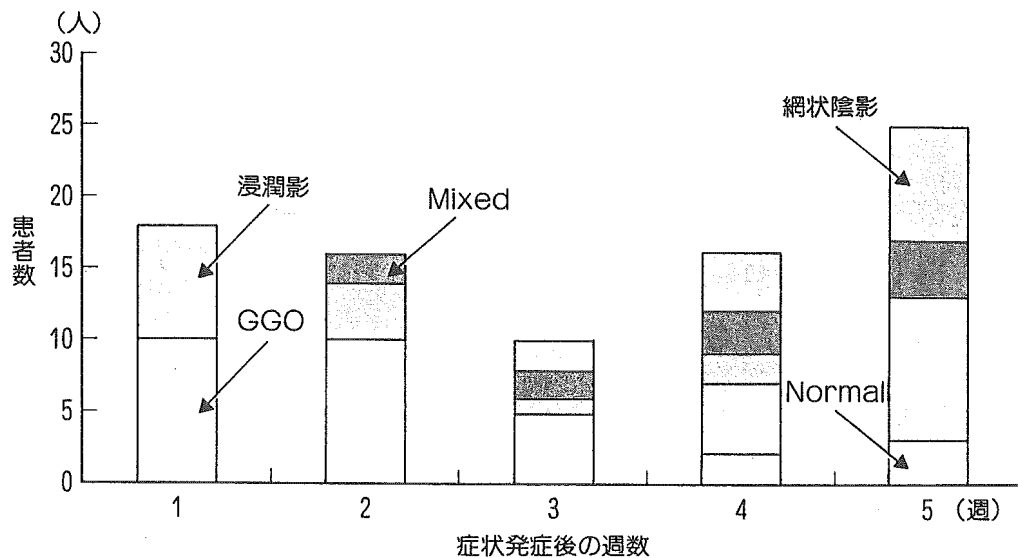


図 4. SARS 患者における胸部 HRCT パターンの継時的推移

GGO：スリガラス状陰影，Mixed：GGO+浸潤影+網状陰影

(文献 9 より改変引用)

### 消化器症状

発熱期に一致して 20～70%の頻度で 1～6 日続く水様性下痢が認められ、第 7 病日以降は 5%以下の頻度となる<sup>11)</sup>(図 5)。下痢は血性・粘液性となることはないとしている。Cheng らの検討では、下痢の頻度は 1 日平均 5 回 (3～24 回)であり、下痢症状の有無は致命率には関連しなかった<sup>4)</sup>。また、下痢症状を有した SARS 患者の大腸粘膜生検、剖検時の組織学的検討では、大腸粘膜下のマクロファージの浸潤、電子顕微鏡所見では大腸の微絨毛表層に多数のウイルス粒子と考えられる所見が認められている<sup>11)</sup>。また、大腸粘膜下にもウイルス粒子を入れた小胞が存在することを示している。これらの所見は、下痢症状が大腸粘膜、粘膜下への SARS CoV 感染によるものであることを示唆しており、分泌性(非炎症性)下痢症と考えられる。

### 血液学的所見

SARS 患者の急性期における末梢血所見では、一般にリンパ球減少が認められる<sup>12)</sup>(図 6)。1,000/ $\mu$ L 以下のリンパ球減少が病初期には約 60%程度に認められ、第 10～14 病日頃には 80～90%に達するとしている。感染 4～5 週後でも 30%程度にリンパ球減少が認められている。リンパ球分画では CD 4 細胞(平均 286/ $\mu$ L)と CD 8 細胞(平均 242/ $\mu$ L)の双方が第 5～14 病日に減少し、B 細胞の変化は認められていない。したがって、SARS CoV 感染の急性期には細胞性免疫が一過性に低下することが考えられる。さらに、軽度の血小板減少(14 万/ $\mu$ L 以下)も 55%に認められている。

### SARS の予後因子

Choi らは、香港における 267 例の SARS 患者における臨床経過および予後に関して報告している<sup>13)</sup>。32 名の死亡例の検討では、急性呼吸

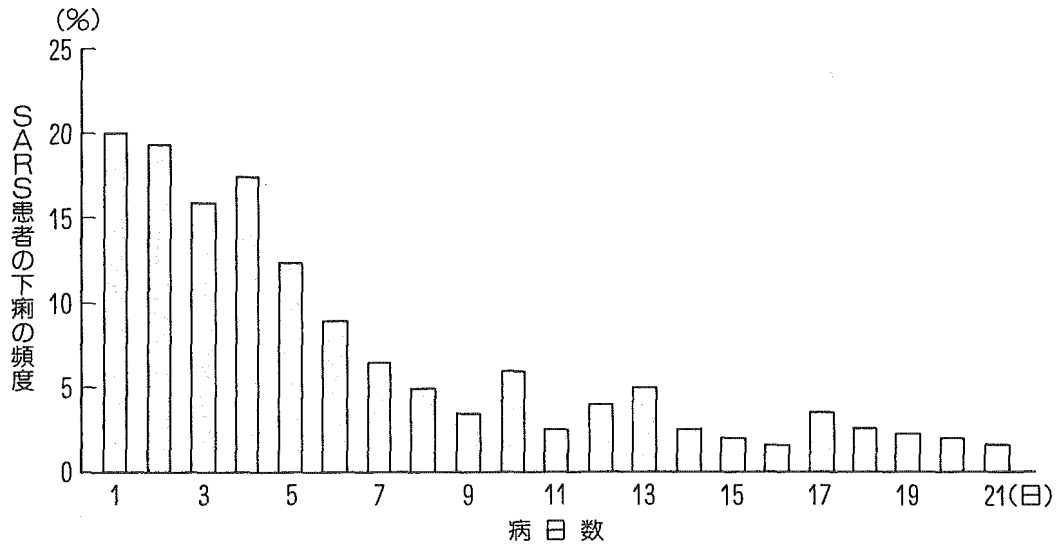


図 5. SARS 患者の下痢症状

(文献 11 より引用)

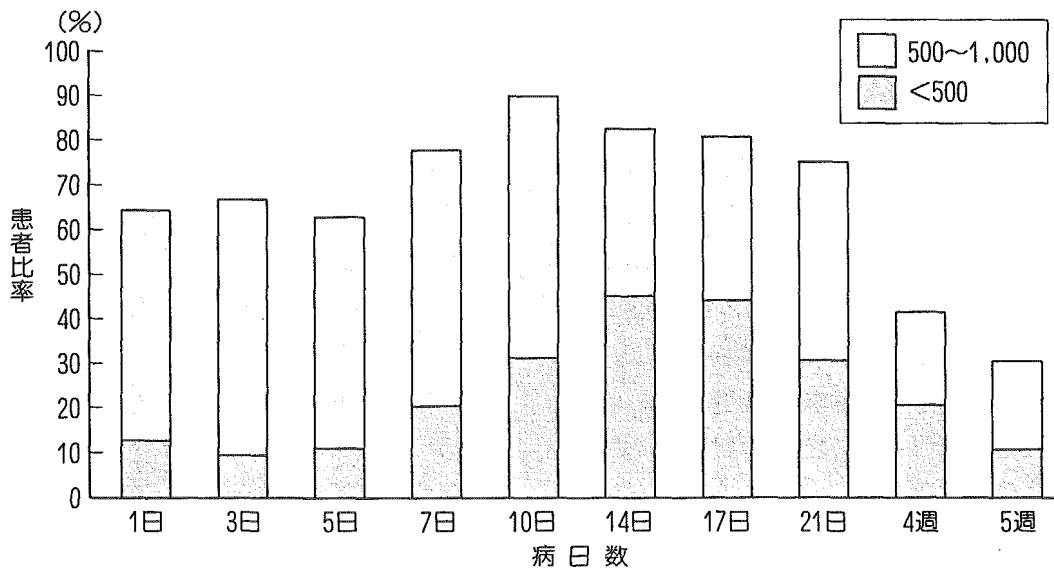


図 6. SARS 患者におけるリンパ球減少

(文献 12 より改変引用)

不全(100%)，急性腎不全(44%)，院内感染，敗血症(25%)がその予後に関与したと考えられる。また，予後予測因子の解析では，60歳以上の年齢と発症時の血清LDH値の高値が有意であった。また，Honらは小児におけるSARSが成人に比較すると重症化が少ないことを報告している<sup>14)</sup>。

#### おわりに

SARSの臨床像の特徴は，①おもに飛沫感染や接触感染を介してヒト-ヒト感染伝播が認められ，②高率に肺炎を発症し，高い致命率を示すことである。本症に対するいまだ確立された予防法や治療法はなく，今後の有効なワクチンや抗ウイルス薬の開発に期待がかかっている。

#### 文 献

- 1) Peiris JS *et al* : Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia : a prospective study. *Lancet* **361** : 1767, 2003.
- 2) Tsang KW *et al* : A cluster of cases of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med* **348** : 1977, 2003.
- 3) Hsu LY *et al* : Severe acute respiratory syndrome (SARS) in Singapore : clinical features of index patient and initial contacts. *Emerg Infect Dis* **9** : 713, 2003.
- 4) Cheng VC *et al* : Viral replication in the nasopharynx is associated with diarrhea in patients with severe acute respiratory syndrome. *Clin Infect Dis* **38** : 467, 2004.
- 5) Ho JC *et al* : High-dose pulse versus nonpulse corticosteroid regimens in severe acute respiratory syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* **168** : 1449, 2003.
- 6) Wong KT *et al* : Severe acute respiratory syndrome : radiographic appearances and pattern of progression in 138 patients. *Radiology* **228** : 401, 2003.
- 7) 劉 晋新, 唐 小平 : SARS胸部影像診断図譜. 「SARS—重症急性呼吸器症候群」賀 福初編, 科学出版社, 北京, 2003.
- 8) Muller NL *et al* : High-resolution CT findings of severe acute respiratory syndrome at presentation and after admission. *AJR Am J Roentgenol* **182** : 39, 2004.
- 9) Ooi GC *et al* : Severe acute respiratory syndrome : temporal lung changes at thin-section CT in 30 patients. *Radiology* **230** : 836, 2004.
- 10) Antonio GE *et al* : Thin-section CT in patients with severe acute respiratory syndrome following hospital discharge : preliminary experience. *Radiology* **228** : 810, 2003.
- 11) Leung WK *et al* : Enteric involvement of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection. *Gastroenterology* **125** : 1011, 2003.
- 12) Wong RS *et al* : Haematological manifestations in patients with severe acute respiratory syndrome : retrospective analysis. *BMJ* **326** : 1358, 2003.
- 13) Choi KW *et al* ; Princess Margaret Hospital SARS Study Group : Outcomes and prognostic factors in 267 patients with severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *Ann Intern Med* **139** : 715, 2003.
- 14) Hon KL *et al* : Clinical presentations and outcome of severe acute respiratory syndrome in children. *Lancet* **361** : 1701, 2003.

## 特集

## 知っておきたい呼吸器感染症

## SARS\*

大石和徳\*\*

Key Words : SARS, SARS corona virus, RT-LAMP method, infection control

## 病因ウイルス

## はじめに

Severe acute respiratory syndrome (SARS) は新種のコロナウイルスによる新興ウイルス感染症であり、2002年11月16日に中国・広東省、佛山市で第1例目が確認された。その後、2003年2月には広東省におけるアウトブレイクへと発展した。さらに、2月下旬には広東省の医師が香港のホテル9階で12人の宿泊客に感染させ、ここから国際的な感染拡散に発展した。WHOは3月12日にはベトナムにおける異型肺炎の報告を受けて、異型肺炎に関するGlobal Alertを発令するに至った。2003年7月に入って、全世界で8,422人に及ぶSARS corona virus (SARS CoV) 感染の連鎖は一応終息した。

その後、シンガポール、台湾、中国における散発的な実験室感染事例の報告があった。注目すべきは、このような実験室感染事例以外に2003年末～2004年1月にかけて、再び広東省において発生源の不明な4例のSARS患者の発生が確認されている事実である。このことは、SARSが冬期にこの地域に特異的に発生するウイルス性疾患であることを示唆している。

SARS患者から新種のコロナウイルス、SARS CoVがその原因ウイルスとして同定された<sup>1)</sup>。このSARS CoVのゲノムは29,727塩基からなる一本鎖RNAから成っている<sup>2)</sup>。これまでに、①感染患者からの本ウイルスの分離、②宿主細胞におけるウイルス培養、③病原体のフィルター通過性が確認された。さらにはサルでの感染実験において、④同ウイルスの再分離、⑤同ウイルスに対する特異免疫応答、⑥ヒトに相当する病態が確認された<sup>3)</sup>。これらの所見はウイルス疾患のために改訂されたコッホの6原則を満たしている。Guanらによると、広東省の動物市場における調査において、ハクビシンをはじめとする野生動物からSARS CoV類似のウイルスが分離された<sup>4)</sup>。これらの分離ウイルスには、ヒト由来のSARS CoVのORF10にヒトコロナウイルスには認められない29塩基の挿入が確認されていた。さらに、CDCは広東省の動物取扱業者において、一般人に比較してより高率にSARS CoVに対するIgG抗体が検出されたことを報告した<sup>5)</sup>。これらの調査結果は、SARS CoVが動物由来である可能性を示唆している。しかしながら、自然界における宿主についてはいまだ結論が出ていない。

## ウイルス学的診断

遺伝子診断としてのRT-PCR法は、簡便さや迅

\* SARS.

\*\* Kazunori OISHI, M.D., Ph.D.: 長崎大学熱帯医学研究所内科 [〒852-8523 長崎市坂本1-12-4]; Department of Internal Medicine, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, Nagasaki 852-8523, JAPAN

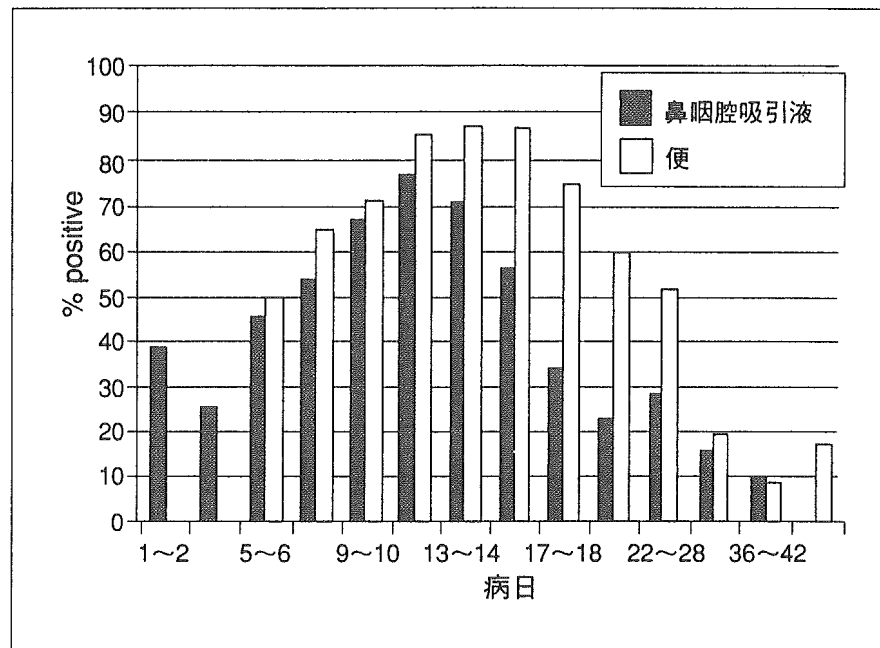


図1 SARS患者の鼻咽腔吸引液, 便のRT-PCR陽性率(文献<sup>8)</sup>より引用改変)

速性には有用な検査であるが, 感度は必ずしも高くない。さらに高感度, かつより迅速な遺伝子検出方法として, RT-LAMP法が開発された<sup>6)</sup>。このRT-LAMP法の検出感度が0.01 PFUであるのに対し, RT-PCR法では1.0 PFUであった。この結果からRT-LAMP法はRT-PCR法に比較して, 約100倍感度が高いといえる。さらにベトナムにおけるSARS患者検体を用いてRT-PCR法との比較を行ったところ, RT-PCR法では27%が陽性であったのに対し, RT-LAMP法による陽性率は67%と有意に高かった。

一方, 血清学的診断系としては中和試験およびSARS CoVを抗原としたIFA法, ELISA法が利用できる。これらの血清学的検査により発症後15日から血清中特異IgG抗体が検出されるが, 発症20日後においても感染者の陽性率は95%にとどまっている<sup>7)</sup>。したがって, IFA法, ELISA法の迅速診断としての有用性は低い。

## 感染病態と臨床像

### 1. ウイルスの体内動態

ヒトがSARS CoVに感染すると, 2~10日の潜伏期後に, 38℃以上の高熱, 全身倦怠感, 筋肉痛などの初期症状で発症する。この時期における感染力は一般に低いとされている。初期症状が出現して4日目以降に, 咳嗽, 喀痰, 呼吸困

難などの下気道症状が現れる。この時期にはその高い感染性を示すとされている。PeirisらはSARS患者の鼻咽腔吸引液と便中のSARS CoVの遺伝子をRT-PCR法で検出した成績を示している(図1)<sup>8)</sup>。病初期には上気道中にはウイルス遺伝子の陽性率は低いが, 第10病日にはピークに達し, その後減衰する。また, 便中にも第5~6病日からウイルス遺伝子は検出され, 第14病日をピークに鼻咽腔吸引液より遅れてウイルス検出率は低下する。また, Peirisらは鼻咽腔吸引液におけるウイルス遺伝子量もやはり第10病日にピークに達して, その後15病日には低下したと報告している<sup>7)</sup>。

### 2. 臨床症状と肺病態形成

高熱はほぼ100%に認められる。上気道の症状は20~25%以下と比較的低く, 咳嗽は頻繁に認められる。一方, 入院時における呼吸困難の頻度は低い。また, 下痢の頻度は25~73%と報告によりかなり異なる。Peirisらによれば病初期の38℃を越える高熱はいったん解熱し, 第14病日頃まで37℃台の微熱となる(図2)<sup>7)</sup>。この解熱傾向にはほとんどの症例で投与されている副腎皮質ステロイドの影響も考えられる。胸部X線上の肺炎陰影は, 入院時には大半の症例(78.3%)において認められる<sup>9)</sup>。入院時に肺炎陰影が認められない場合にも, その後平均3.1日に胸部X線上に浸潤影が出現し



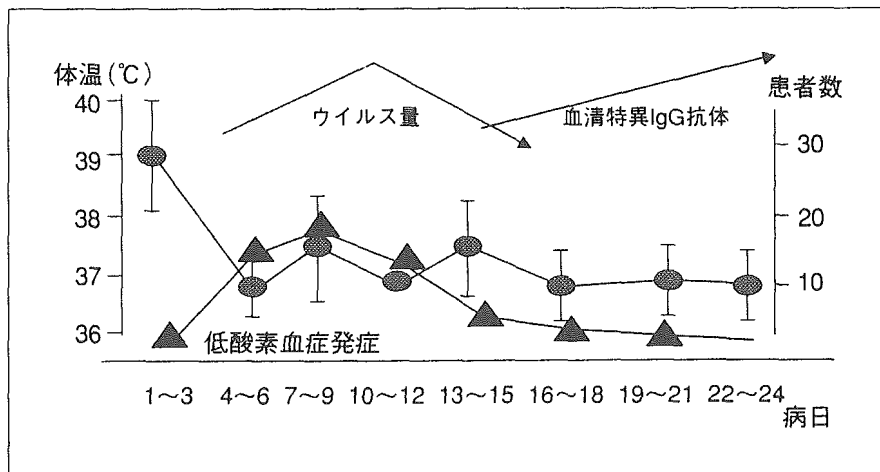


図2 SARSの臨床病態

ている。病初期には低酸素血症の頻度は少ないが、その1週間後には低酸素血症が高率に認められ、肺炎の広がりも第10病日前後にピークがある<sup>10)</sup>。この肺炎陰影のピークは前述の気道におけるウイルス量のピーク時期とほぼ一致していると考えられる<sup>7)</sup>。その後急性呼吸不全が進展し、10~20%の患者は急性呼吸窮迫症候群(ARDS)を合併する<sup>7)</sup>。広東省で経験されたARDS患者の剖検肺の組織所見では、肺胞・間質にマクロファージ、リンパ球浸潤、肺胞における硝子膜形成が認められた(図3)<sup>11)</sup>。所見はdiffuse alveolar damage (DAD)を示し、ARDSに矛盾しない所見である。また、KsiazekらによればSARS患者の剖検肺では肺胞上皮細胞の剥離、マクロファージ由来と考えられる多核合胞体細胞が、末梢気道に認められている<sup>12)</sup>。さらに、サルでのSARS CoV感染実験ではII型肺胞上皮細胞と多核合胞体細胞にウイルス抗原が認められている<sup>13)</sup>。

### 3. 消化器症状

発熱期に一致して20~70%の頻度で1~6日続く水様性下痢が認められ、第7病日以降は5%以下の頻度となる<sup>14)</sup>。下痢は血性、粘液性となることはなく、最長で10週間のウイルス排泄を認めたとしている。また、下痢症状を有したSARS患者の大腸粘膜生検、剖検時の組織学的検討では大腸粘膜下のマクロファージの浸潤、電子顕微鏡所見では大腸の微絨毛表層に多数のウイルス粒子と考えられる所見が認められている。また、大腸粘膜下にもウイルス粒子を入れた小胞が存在することを示している。これらの所見は、

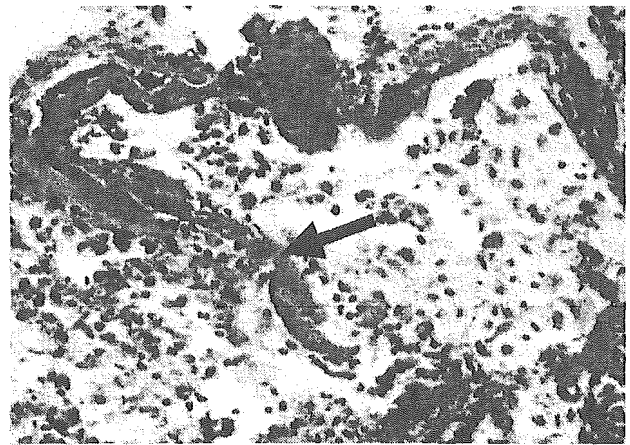


図3 ARDSを合併したSARS可能性例の剖検肺 矢印は硝子膜形成。

下痢症状が大腸粘膜、粘膜下へのSARS CoV感染によるものであることを示唆している。

### 4. 血液学的所見

SARS患者の末梢血所見では一般に白血球数増多はなく、リンパ球減少が認められる<sup>15)</sup>。1,000/ $\mu$ l以下のリンパ球減少が病初期から約60%程度に認められ、第10~14病日頃には80~90%に達するとしている。感染4~5週後でも30%程度にリンパ球減少が認められている。リンパ球分画ではCD4細胞(平均286/ $\mu$ l)とCD8細胞(平均242/ $\mu$ l)の双方が第5~14病日に減少し、B細胞の変化は認められていない。したがって、SARS CoV感染の急性期には細胞性免疫が一過性に低下することが考えられる。さらに、軽度の血小板減少(14万/ $\mu$ l以下)も55%に認められている。

表1 ロピナビル/リトナビルの臨床効果

	対照群 (n=111)	カレトラ <sup>®</sup> 群 (n=41)	p 値
平均年齢	42.1	39.4	0.32
男女比	48:3	10:31	0.039
平均血小板数	169	199	0.023
平均LDH値	401	276	<0.001
21日以内ARDS/死亡	32(28.8%)	1(2.4%)	<0.001
21日の死亡/ARDS	7(6.3%)/25(22.5%)	0(0%)/1(2.4%)	-

対照群：リバビリン，ステロイド使用，カレトラ<sup>®</sup>群：カレトラ<sup>®</sup>とリバビリン，ステロイド使用。  
(文献<sup>21)</sup>より引用改変)

## 治 療

### 1. 抗ウイルス剤

リバビリンはDNAウイルスやRNAウイルスに広範な抗ウイルス活性を有する薬剤である。2003年3月には香港やトロントでSARS患者にリバビリンが頻繁に使用された。トロントにおいては4g/日の投与にもかかわらず、明らかな臨床的な効果は得られなかった<sup>16)</sup>。むしろ、溶血性貧血や肝機能障害などの副作用が認められた。これまでに、試験管内ではグリチルリチン、インターフェロン $\alpha$ 、インターフェロン $\beta$ などの薬剤による抗SARSコロナウイルス活性が示されている<sup>17)~19)</sup>。リバビリンの臨床効果が認められなかったことは、本剤を1g静注時に得られる血中濃度が $24\mu\text{g/ml}$ であることと試験管内の抗SARS CoV活性が $(50\mu\text{g/ml})$ であることから理解できる<sup>20)</sup>。

一方、香港のグループは抗HIVプロテアーゼ阻害剤であるロピナビル/リトナビル(カレトラ<sup>®</sup>)のSARSに対する有効性を報告している<sup>21)</sup>。この研究においては2003年4月16日以前にカレトラ<sup>®</sup>を含まない治療を実施された111症例を対照群として、その後の41症例にカレトラ<sup>®</sup>の1.2g, 1日3回を14日間内服投与した(もしくは8mg/kgを1日3回静注)。リバビリンとメチルプレドニソロンは両群において同様に併用投与した。本研究において、ロピナビルの試験管内の抗SARSウイルス活性( $4\mu\text{g/ml}$ )はリバビリン( $50\mu\text{g/ml}$ )のそれより優れていた。21日間の両群における治療結果として、ARDSを発症するか死亡した症例は対照群では28.8%であったのに対し、カレトラ<sup>®</sup>治療群では2.4%と有意に少なかった(表1)。また、対照群における患者の鼻咽頭スワブにおけ

るウイルス遺伝子量は第15病日以降に緩やかに減衰したのに対し、カレトラ<sup>®</sup>治療では6人中5人の患者において鼻咽頭スワブにおけるウイルス遺伝子量はすみやかに検出感度以下まで減少することが確認された。これらの結果から、SARSに対するカレトラ<sup>®</sup>とリバビリンの併用の有効性が示唆され、今後前向き試験において臨床効果の確認が必要である。

### 2. ステロイド療法

香港におけるSARSアウトブレイクの初期において、Soらはメチルプレドニソロン投与を3mg/kg/日から始めて21日間かけて減量する方法を推奨した<sup>22)</sup>。その後、HoらはSARS患者に対するメチルプレドニソロンのパルス療法(500mg/日の5~7日間)が非パルス療法(500mg/日未満)と比較して、患者の酸素吸入期間を短縮し、14~21病日における胸部X線所見上の浸潤陰影の広がりを軽減することを報告している(図4)<sup>10)</sup>。さらに、著者らはパルス療法では非パルスに比較して副作用としての過血糖の頻度も少なかったとしている。

### 3. 呼吸管理

SARSの治療において、急性呼吸不全例に対してはnon-invasive positive pressure ventilation (NIPPV)を含むベンチレーターが必要である。しかしながら、NIPPV装着時、ベンチレーターのための挿管時に感染リスクが高まるため、挿管時には鎮静剤を用いて咳嗽の誘発を最小限にし、より嚴重な感染防御装具(personal protective equipment; PPE)をもって対処することが望ましい。また、長期にわたる挿管下のベンチレーター管理ではベンチレーター関連肺炎の合併に注意が必要である。

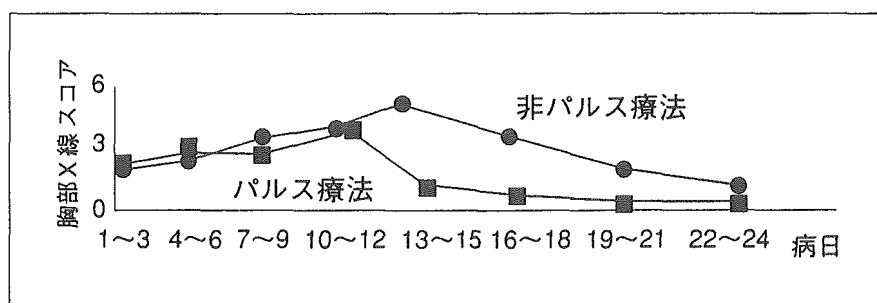


図4 メチルプレドニソロンのパルス療法と非パルス療法の効果の違い  
(文献<sup>10</sup>より引用改変)

### 院内感染対策

SARSは、そのアウトブレイクの初期には院内感染として感染が拡大した。その感染伝播様式は飛沫感染と接触感染が主体である<sup>23)</sup>。しかしながら、最近になって香港のアモイガーデンにおけるアウトブレイクには空気感染が関与する証拠が報告されている<sup>24)</sup>。飛沫感染を最小限にするため、SARS患者には可能な限りサージカルマスクを装着していただくことが望ましい。患者を早期に検出し、一般患者や家族から確実にトリアージし、SARS専用病院(施設)に隔離することが二次感染を防止する上で重要である。医療従事者には手袋、ガウン、N95マスク、ゴーグルなどのPPEを正しく装着することが必須である。N95マスクの装着にはフィットテストで空気の漏れがないことを確認することが必要である。SARS患者の管理には陰圧室が最適である。しかしながら、陰圧室がない場合は、個室病室の入り口のドアを閉め、窓も閉めた状態で、窓型換気扇を使用し病室内から外側への一定の換気を保つことで、SARS患者の対応が可能と考えられる。

病室や医療器具の消毒については、患者が頻繁に接触するベッド柵、ドアノブ、便器などの表面を対象とする。基本的には温水と洗剤で清掃した後に1%次亜塩素酸ナトリウムを浸した布で消毒し、30分以内に水でリンスして乾燥させる。強く汚染した部分は清掃前に消毒液でウイルス量を減じる。

### おわりに

現時点における対策としてはSARSの海外における流行情報に対して素早く対応し、国際空港

などの水際でその国内進入を阻止することが重要な感染対策と考えられる。

また、多くの研究成果を基礎にSARSに対する有効な治療法を確立することが急務である。今後、国内では各自治体において感染症専門家と行政が協力して有効なSARS対策を構築していく必要がある。

### 文 献

- 1) Doresten C, Gunther S, Preiser W, et al. Identification of a novel corona virus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003 ; 348 : 1967.
- 2) Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, et al. Characterization of a novel coconavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* 2003 ; 300 : 1394.
- 3) Fouchier RM, Kuiken T, Schutten M, et al. Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature* 2003 ; 423 : 240.
- 4) Guan Y, Zheng BJ, He YQ, et al. Isolation and characterization of virus related to the SARS coronavirus from animals in Southern China. *Science* 2003 ; 302 : 276.
- 5) Centers for Disease Control and Prevention. Prevalence of IgG antibody to SARS-associated coronavirus in animal traders—Guandong Province, China, 2003. *MMWR* 2003 ; 52 : 986.
- 6) Hong TCT, Mai QL, Cuong DV, et al. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Clin Microb* 2004 ; 42 : 1956.

- 7) Peiris JSM, Chu CM, Chan KS, et al. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia : a prospective study. *Lancet* 2003 ; 361 : 1767.
- 8) Peiris JSM. WHO International Conference on SARS, Kuala Lumpur, Malaysia. 17-18/June 2003.
- 9) Wong KT, Antonio GE, Hui DS, et al. Severe acute respiratory syndrome : radiographic appearances and pattern of progression in 138 patients. *Radiology* 2003 ; 228 : 401.
- 10) Ho J C, Ooi GC, Mok TY, et al. High dose pulse versus non-pulse corticosteroid regimens in severe acute respiratory syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2003 ; 168 : 1449.
- 11) 劉 晋新, 唐 小平 · 編. SARS 胸部影像診斷圖譜. 北京 : 科学出版社 ; 2003.
- 12) Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith C, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003 ; 348 : 1953.
- 13) Kuiken T, Fouchier RAM, Schutten M, et al. Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 2003 ; 362 : 263.
- 14) Leung WK, To K-F, Chan PKS, et al. Enteric involvement of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection. *Gastroenterology* 2003 ; 125 : 1011.
- 15) Wong RSM, Wu A, To KF, et al. Haematological manifestations in patients with severe acute respiratory syndrome : retrospective analysis. *BMJ* 2003 ; 326 : 1358.
- 16) Booth CM, Matukas LM, Tomlinson GA, et al. Clinical features and short-term outcomes of 144 patients with SARS in the Great Toronto area. *JAMA* 2003 ; 289 : 2801.
- 17) Cinatl J, Morgenstern B, Bauer G, et al. Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus. *Lancet* 2003 ; 361 : 2045.
- 18) Cinatl J, Morgenstern B, Bauer G, et al. Treatment of SARS with human interferons. *Lancet* 2003 ; 362 : 293.
- 19) Stroher U, DiCaro A, Li Y, et al. Severe respiratory syndrome-related coronavirus is inhibited by interferon  $\alpha$ . *J Infect Dis* 2004 ; 189 : 1164.
- 20) Koren G, King S, Knoles A, et al. Ribavirin in the treatment of SARS : a new trick for an old drug? *CMAJ* 2003 ; 168 : 1289.
- 21) Chu CM, Cheng VCC, Hung IF, et al. Role of lopinavir/ritonavir in the treatment of SARS : initial virological and clinical findings. *Thorax* 2004 ; 59 : 252.
- 22) So L K-Y, Lau ACW, Yam LYC, et al. Development of a standard treatment for severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 2003 ; 361 : 1615.
- 23) Seto WH, Tsang D, Yung RWH, et al. Effectiveness of precautions against droplets and contact in prevention of nosocomial transmission of severe acute respiratory syndrome (SARS). *Lancet* 2003 ; 361 : 1519.
- 24) Yu ITS, Li Y, Wong TW, et al. Evidence of airborne transmission of the severe acute respiratory syndrome virus. *N Engl J Med* 2004 ; 359 : 1731.

\* \* \*