

200500639A

厚生労働科学研究費補助金

平成17年度

新興・再興感染症研究事業

SARS コロナウイルスに対するワクチン開発に関する研究
(H16-新興-9)

研究報告書

平成18年3月

主任研究者 田口文広
(国立感染症研究所)

目 次

I. 総括研究報告書

- SARSコロナウイルスに対するワクチン開発に関する研究 1
主任研究者：田口文広（国立感染症研究所ウイルス第3部）

II. 分担研究報告書

1. SARSの重症化機構に関する研究 13
分担研究者：田口文広（国立感染症研究所ウイルス第3部）
2. 不活化ウイルス粒子ワクチンの免疫効果の解析 19
分担研究者：横田恭子（国立感染症研究所免疫部）
3. SARSコロナウイルスに対するDNAワクチンの開発に関する研究 27
分担研究者：岡田全司（国立病院機構近畿中央胸部疾患センター）
4. 高度弱毒化ワクシニアウイルス株DIsのSARS生ワクチンとしての応用 33
分担研究者：石井孝司（国立感染症研究所ウイルス第2部）
5. 中和エピトープの解析 39
分担研究者：黒澤良和（藤田保健衛生大学総合医科学研究所）
6. 抗SARS-CoV剤の開発に関する研究 43
分担研究者：山本典生（東京医科歯科大学）
7. ヒトおよびマウスと比較したフェレットACE2のSARS-CoVレセプターとしての
機能 45
分担研究者：山田靖子（国立感染症研究所動物管理室）
8. 猫コロナウイルス感染症に関する研究－猫伝染性腹膜炎ウイルス感染における
apoptosis誘導と抗体介在性感染増強作用－ 49
分担研究者：宝達勉（北里大学獣医畜産学部）
9. 受容体遺伝子導入マウス細胞株を用いた豚伝染性胃腸炎ウイルス感染性の
解析 57
分担研究者：池田秀利（動物衛生研究所感染症研究部）

総括研究報告書

SARS コロナウイルスに対するワクチン開発に関する研究

主任研究者：田口文広（国立感染症研究所ウイルス第三部）

研究要旨：重症急性呼吸器症候群（SARS）は新型コロナウイルス（SARS-CoV）によって引き起こされる新興感染症である。本研究は、SARS ワクチン、抗ウイルス剤開発のための包括的研究を行うものである。本年度の研究では以下の成果が得られた。（1）重症化機構に関する研究：SARS の重症肺炎の発生機構について、非病原性細菌の感染によりマウス肺での SARS-CoV 増殖は著しく高くなることが明らかにされた。（2）ワクチン開発に関する研究：UV 照射のみの SARS-CoV 粒子と、より安全性を高めた UV 照射＋formalin 処理 SARS-CoV 粒子の皮下免疫効果について比較検討した結果、両者では免疫反応に著しい差がないことが明らかにされた。SARS-CoV S)遺伝子 cDNA を持つ発現ベクターはマウスで中和抗体産生を誘導し、N、M 遺伝子を持つベクターは強力な T 細胞活性化を誘導した。また、SCID-PBL/hu を用い、SARS-CoV 増殖阻止活性を示すヒト抗体を誘導するワクチンを作製した。SARS-CoV S 遺伝子を持つ組換えワクチニアウイルス DIs は、マウスで液性、細胞性免疫及び粘膜免疫を誘導し、マウスは SARS-CoV 感染に抵抗性を示した。SARS-CoV S 蛋白を宿主細胞に強制発現し、発現された分子に対する抗体をヒト抗体ライブラリーから効率的に単離するシステム開発を実施した。（3）抗ウイルス剤開発に関する研究：In silico screening で高い抗 SARS-CoV 活性を示す薬剤が発見された。その抗ウイルス活性はマウス感染でも認められた。（4）SARS 動物モデル及び動物コロナウイルスを用いた研究：SARS-CoV に対して高い感受性を持つフェレットのアンギオテンシン変換酵素 2 (ACE2)がヒト ACE2 と同程度の SARS 受容体活性があることが明らかになった。猫伝染性腹膜炎ウイルス (FIPV) の lymphopenia が peripheral blood mononuclear cells(PBMC)の apoptosis に起因することおよびマクロファージから産生される TNF- α が apoptosis 誘導因子の一つであることを明らかにした。豚伝染性胃腸炎ウイルス (TGEV) とその宿主受容体、プタアミノペプチダーゼ N(pAPN)の相互作用を解析することのため、pAPN-FLAG 発現細胞株を得、TGEV 感受性を検討した。

分担研究者

横田恭子（国立感染症研究所免疫部）
岡田全司（国立病院機構近畿中央胸部疾患センター）
石井孝司（国立感染症研究所ウイルス第二部）
黒澤和良（藤田保健衛生大学総合医科学研究

研究所）

山本典生（東京医科歯科大学医学部）
山田靖子（国立感染症研究所動物管理室）
宝達勉（北里大学獣医畜産学部）
池田秀利（動物衛生研究所感染症研究部）

A. 研究目的

本研究班の主要な目的は、致死率の極めて高い新興感染症である SARS に対する有効で安全性の高いワクチン及び抗ウイルス剤を開発することである。この目的を達成するために、SARS-CoV に関する包括的な研究を以下の4点に焦点を当てて行う。

1) SARS の重症化機構の解明、2) 不活化 SARS-CoV、SARS-CoV 遺伝子を持つ組み換え DNA や組み換えワクシニアウイルスによる有効なワクチンの開発及びその基礎的な研究、3) 抗ウイルス剤の開発、及び4) ワクチンの有効性を評価する動物モデルの作成及び SARS-CoV のワクチン開発モデルとしての他の動物コロナウイルス研究である。1) 重症化機構解明のために、肺炎時に産生される各種プロテアーゼについて検討する。2) SARS-CoV に対する不活化ワクチンに関する研究では、UV 不活化及びホルマリン不活化 SARS-CoV をマウスに免疫し、液性及び細胞性免疫の誘導について比較する。DNA ワクチン研究では、SARS-CoV の spike (S), envelope (E), membrane (M), nucleocapsid (N) 遺伝子を持つ組み換えベクターを作成し、その DNA ワクチンによる抗体産生、細胞性免疫の誘導について、検討する。更に、ヒトの生体内免疫解析モデルとして SCID-PBL/hu を用いる。同様に SARS-CoV 遺伝子を持つ組み換えワクシニアウイルスを用いた抗 SARS-CoV 液性、細胞性免疫能の誘導について検討する。また、抗体ライブラリーを用いて、SARS-CoV に対して中和活性の高い抗体を得る条件検討を行う。3) SARS-CoV に対する抗ウイルス剤開発では、in silico スクリーニングにより有効な薬剤を見出すことが目的である。4) SARS-CoV に極めて感受性が高く、重篤な症状を示すことが報告されているフェレット ACE2 の SARS-CoV 受容体活性を検討する。また、FIPV の抗体による感染増強機構(ADE)が SARS でも危惧されている背景から、FIPV の ADE 機構の解明や感染後に起こる leukopenia の発症機序について、検討す

る。TGEV では、コロナウイルスの一般的な受容体との結合に関する基礎的な研究を行うため、受容体発現細胞を樹立し、ウイルス-受容体結合に関する基礎的研究を行う。

B. 研究方法

本研究班では香港で分離された SARS-CoV 株 HKU39849 及びドイツ Ziebuhr 博士から分与された SARS-CoV Frankfurt-1 株とこれらから分離された S, M, E 及び N 遺伝子を用いた。

1) 重症化機構解明のための実験では、マウスを用いて、非病原性細菌感染がマウス肺での SARS-CoV にどの様に影響を与えるかを検討した。

2) 不活化ウイルスの作成は昨年度の報告書で述べた。免疫には、マウスに不活化 SARS-CoV 粒子を皮下にアラムアジュバント有り無しで投与した。7週後同じ免疫を繰り返した。その後7日目にマウスの脾臓および所属リンパ節を採取して T 細胞機能を解析した。また、これらのマウスの血中抗体価を測定した。抗体は感染細胞 1 溶解物を用いた ELISA で行った。また骨髄中の抗体産生細胞、サイトカイン測定を行った。

SARS-CoV の S, M, N, E の各ウイルス構造タンパク cDNA を持つ発現ベクターを構築した。発現蛋白を選別する目的で His tag 利用し、真核細胞と大腸菌に S, M, N, E の各 cDNA を導入して蛋白を発現させた。これらをヒト免疫グロブリン染色体導入マウス (KM マウス) に免疫した。BALB/c、C57BL/6 マウスに S, M, N, E DNA ワクチンを筋肉注射し、血清中の抗体価を SARS DNA を導入した Cos 細胞に対する抗体結合反応と Vero 細胞を用いた感染中和抗体活性で測定した。中和試験は 96 穴 plate に撒いた Vero-E6 細胞を用いて、常法に従って行った。細胞性免疫 (キラー T 細胞) 活性は以下の方法によった。マウス II 型肺胞上皮 cell line (T7) に S, M, N DNA を導入し、これを抗原として

用い、IFN- γ 産生によるキラーT活性を測定した。また、T細胞の増殖反応をBrdUで測定した。ヒト免疫応答解析モデル

(SCID-PBL/hu)は、IL-2レセプター γ 鎖ノックアウトNOD-SCIDマウスに健康人PBLを投与し、作製した。これにDNAワクチンを注射しヒト中和抗体価を測定した。SCID-PBL/huを用いた抗原に対するヒト・キラーT細胞の誘導はSARS蛋白-パルス自己Bプラスト cellを標的細胞として用いた。

HKU39849株由来の各構造蛋白遺伝子を、トランスファーベクターを用い、相同組換え法により組み換えワクシニアウイルスDIsを取得した。これらの組換えDIsをマウスに皮下あるいは経鼻接種し、SARS-CoV構造蛋白に対する液性、細胞性および粘膜免疫の誘導能を検討した。また、組換えDIsで免疫したマウスへのSARS-CoV感染実験を行った。

抗体ライブラリー(AIMS)をスクリーニングして中和抗体を得るには、標的抗原であるSタンパク質が必要となる。Sタンパク質を膜上に大量発現した細胞、またはなるべくナチュラルに近い構造をした形でSタンパク質の膜外部分のみを動物細胞から分泌させる等いずれかの方法により抗原を入手した後、ライブラリーをスクリーニングする。

3) 抗ウイルス剤開発研究では、in silico screeningの結果に基づいて抗SARS-CoV剤の候補となる物質を集め、それらの抗ウイルス活性をin vitroの系を用いて評価した。SARS-CoVの株としてはFFM-1株を用い、評価方法としてはMTT assay, リアルタイム RT-PCR等を用いた。In vivoアッセイはBALB/cマウスにFFM-1を感染させる系を使用した。感染後3日目て材料を採取し、リアルタイム RT-PCR等によってウイルスの定量を行った。

4) フェレット ACE2 発現クローンの作成は、HeLa229細胞にフェレットのACE2全長を含む哺乳類細胞発現ベクターを導入

し、恒常発現細胞を得た。得られたクローンについて発現部位とそのサイズを、Goat anti-humanACE2 (R&D systems)を用いた IFA およびウエスタンブロットで確認した。フェレット ACE2 発現細胞、マウス、ヒト ACE2 発現細胞に SARS-CoV を MOI 0.1 で接種し、感染後の培養上清中のウイルス力価を、VeroE6 を用いたプラークアッセイで測定した。FIP発症猫とFIP発症を耐過した猫のPBMCにおけるapoptosis細胞の検出はTUNEL法に依った。FIP発症猫由来材料の末梢血CD4⁺細胞、CD8⁺細胞およびCD21⁺細胞に対するapoptosis誘導能、FIP発症猫のPECおよびPBMCにおけるTNF- α mRNAの発現とPEC培養上清およびplasma中のTNF- α 、FIP発症猫およびSPF猫のPBMCにおけるTNF receptor (TNFR) 1および2 mRNA発現量、PBMCにおけるTNFR1およびTNFR2 mRNA発現に対するPEC培養上清の効果について検討した。TGEV pAPNの発現にはpAPN-FLAG導入した発現ベクター(pAPN-FLAG/pCAGGS)を用い、恒常的発現細胞は、NIH3T3細胞にpAPN-FLAG/pCAGGSを導入することにより作成した。pAPN-FLAG発現は、抗FLAG抗体を用いIFA、WB法、フローサイトメトリー法によった。遺伝子導入細胞のTGEV感受性は、TGEV TO163株を接種し、抗TGEV豚血清を用いたIFAによって鏡検した。受容体発現細胞のTGEV感受性は、ウイルス抗原の発現、増殖ウイルスの感染性、ウイルスRNAレベルで測定した。

C. 研究成果

1) 昨年度の実験から、trypsinによりSARS-CoVは細胞膜から直接細胞内へ侵入する可能性が強く示され、elastase等が同様の効果を示すことを解った。更に、SARS-CoV増殖はプロテアーゼ存在下で非存在下と比べ100-1000倍高くなることが判明した。このウイルス増殖亢

進効果は、肺炎時に産生される elastase についても認められた。これらのことから、SARS-CoV の肺炎重傷化には肺で産生される炎症性プロテアーゼが大きく関与していることが示唆された。本年度は、マウスを用いて上記仮説について検討した。我々は、マウスに病原性を示さないが、軽度の呼吸器炎症を引き起こす細菌、パストレラ菌 (pp) と肺炎球菌 (sp) について、これらの感染が SARS-CoV の肺での増殖を増強する可能性について検討した。マウスに pp, sp を経鼻感染させ、その 1 日後に SARS-CoV を経鼻感染させた。pp 感染マウスは感染後 1 日~3 日に軽度の体重減少を示し、逆毛が見られたが、sp、SARS-CoV の単独感染では、そのような変化は認められなかった。3 日目の肺に於けるウイルス力価を比較すると、SARS-CoV 単独感染と比べ pp 混合感染では、約 100 倍高い価を示したが、sp 感染では単独感染と同様のウイルス価であった。即ち、SARS-CoV の肺での増殖は pp との混合感染で著しく増強されることが明らかとなった。

2) UV または UV/form 不活化 SARS-CoV をアラム有り無しで皮下に接種し、接種後 4 週目と 7 週目およびブースター免疫後 1 週目の血中の IgG 抗体価を比較した。アラム無しの UV/form ワクチンの効果は若干弱いものの、ブースター後には UV のみと UV/form ワクチンはほぼ同等の効果であった。アラムを添加すると、両者の免疫効果は有意な差がなかった。また、どちらの群でも中和抗体が誘導されていた。一方、血中抗体をサブクラス毎に測定すると、全 IgG 抗体と IgG1 抗体はほぼ同じ傾向を示していたが、IgG2a 抗体はアラムアジュバント有無にかかわらず formalin 処理したワクチン接種群でかなり低値を示した。これら不活化ワクチンの T 細胞に対する効果を解析するため、リンパ節からの T 細胞のサイトカイン産生量を測定した。IL-2 は virion 添加有り無しに関わらず誘導されたが、IFN- γ 、IL-4、IL-5

の産生は virion 添加によってより高まった。これらのサイトカインの産生量は formalin 処理ワクチンが未処理ワクチンよりも高く、特に、IL-4 産生は formalin 処理ワクチンで常に高い傾向があった。SARS-CoV の S、M、E、N 蛋白を大腸菌及び培養細胞で発現するベクターを作成した。マウスに S、M、N、E DNA ワクチンを筋肉注射し、血清中の抗体価をと感染中和抗体活性を測定した。SARS (S) DNA ワクチンが SARS-CoV に対する中和抗体産生を誘導した。マウス T7 細胞に S、M、N DNA を導入し、これを抗原として用い SARS(S) DNA キラー T 活性を測定した。その結果、T 細胞免疫 (増殖反応と IFN- γ 産生) を増強する SARS(N) 及び SARS(M) DNA ワクチンが活性を示した。SCID-PBL/hu の系でヒト・キラー T 細胞の誘導系を確立した。SARS(N) 及び SARS(M) DNA ワクチンが SARS に対するヒト T 細胞免疫 (増殖反応と IFN- γ 産生) を増強した。SARS 蛋白-パルス自己 B プラスト cell を標的細胞として用い、SARS(N) DNA ワクチンは、ヒト・キラー T 依存性ワクチンであることを明らかにした。組換え DIs を経鼻あるいは皮下接種されたマウスは SARS-CoV を認識する抗体が誘導され、細胞性および粘膜免疫も同様に誘導されていた。S を発現するウイルス接種群の血清は、SARS-CoV の哺乳類細胞への感染を阻止した。一方、組換え DIs を経鼻投与した場合、鼻腔洗浄液中に IgA 抗体が誘導された。E/M/S あるいは E/M/N/S を発現する組換え DIs を経鼻あるいは皮下接種された群は、SARS-CoV を経鼻感染させた場合感染から完全に防御された。一方、N 発現組換え DIs を接種された群は SARS-CoV に対する強い抗体価が誘導されたが、SARS-CoV を経鼻感染させた場合に感染を防御することはできなかった。E/M/S または E/M/N/S を発現する DIs を経鼻または皮下接種されたマウスは、呼吸器にリンパ球の強い浸潤が見られた。免疫組織学的解析では、この部分から SARS-CoV 抗原は

検出されなかった。浸潤したリンパ球は、CD3 positive T-cells であった。

S 遺伝子を動物細胞発現ベクターに組み込んだものを 293T 細胞上または培養上清中に発現させることを試みた。全長あるいはフラグメントを動物細胞発現ベクター (pKS336, pcDNA3.1, pSecTag2, pDisplay) に組み込んで発現実験を行った。その結果、抗体単離に必要な十分な発現量が得られなかった。大腸菌発現系の pET ベクターに NX フラグメントを組み込んで発現させた。その結果、NX フラグメントは発現したが発現量が非常に少なく、SDS-PAGE で単一バンドを得られる程度まで精製することはできなかった。現在、昆虫細胞の発現系での発現を試みている。

3) in silico screening により約 100 万種類の化合物の中から SARS-CoV3CL プロテアーゼ阻害剤の候補物質を約 100 種類に絞り込み、抗ウイルス活性を測定したところ、強い抗 SARS-CoV 活性を持つ化合物の同定に成功した。この化合物存在下ではウイルス量がコントロールと比較して 1% 未満まで減少した。この物質は recombinant proteinase を用いた実験においても阻害活性を示した。同定された化合物の類縁体で、さらに強い抗ウイルス活性を持つ化合物を同定できた。マウス感染モデルでこれらの薬剤の評価を行ったところ、ウイルスの増殖が抑制されていることが明らかとなった。

4) フェレット ACE2 恒常的発現細胞の 3 クローンで発現が良好であり、感染実験に用いた。培養上清中のウイルス力価はフェレット ACE2 発現細胞ではマウス ACE2 恒常的発現細胞と比べ 10 倍以上高く、ヒト ACE2 恒常的発現細胞とは同等あるいは高い価を示した。

FIP 発症猫と発症を耐過猫の PBMC における apoptosis 細胞のを比較すると、FIP 発症猫では $23.4 \pm 16.7\%$ であり、発症耐過した猫の $0.9 \pm 1.3\%$ および SPF 猫の $2.5 \pm 2.8\%$ と比較して有意に高かった。FIP

発症猫由来材料の末梢血 CD4⁺ 細胞、CD8⁺ 細胞および CD21⁺ 細胞に対する apoptosis 誘導能について、FIP 発症猫由来材料は、PBMC およびそのリンパ球サブセットである CD4⁺ 細胞、CD8⁺ 細胞および CD21⁺ 細胞に対して容易に apoptosis を誘導した。特に、CD8⁺ 細胞において強く apoptosis が誘導された。また、PEC 培養上清では、CD4⁺ 細胞と CD8⁺ 細胞との間にも有意差が認められた。腹水および PEC 培養上清の SPF 猫の PBMC に対する apoptosis 誘導能は、caspase-3 inhibitor、caspase-8 inhibitor および p38-MAPK inhibitor で濃度依存的に抑制された。FIP 発症猫の PEC および PBMC における TNF- α mRNA の発現量は、FIP 発症猫の PEC で顕著に増加しており、SPF 猫の肺胞マクロファージと比較して有意な差が認められた。ADE 発現とリンパ球への apoptosis 誘導の関係では、ウイルス単独接種より抗体とウイルスを反応させて接種した場合に、ウイルス産生量と共に TNF- α mRNA 発現量および TNF- α 産生量が増加した。さらに、マクロファージ培養上清の SPF 猫 PBMC に対する apoptosis 誘導能を比較したところ、ウイルスと抗体を反応させて接種した場合に apoptosis 誘導率が明らかに増加していた。pAPN-FLAG/pCAGGS を NIH3T3 細胞に導入し 2 株の pAPN-FLAG 発現細胞株を得た。2 株は IFA、WB、FACS 解析により pAPN の発現、細胞膜上における発現が確認されたが、2 細胞株間の発現様態の差違が認められた。2 細胞株間での TGEV に対する感受性は異なり、また TGEV 感受性の CPK 細胞に比べて低かった。ウイルス増殖のどの段階で TGEV 産生性に差が生じるのかを調べるために、ウイルス RNA の転写効率、各ウイルス構造蛋白の産生について経時的に観察した結

果、2株とCPKとの間には大差は見られなかった。

D. 考察

1) マウスに軽度の呼吸器炎症を引き起こす細菌感染が SARS-CoV 感染を増強するのかを検討したところ、パスツレラ菌との混合感染で、ウイルス増殖は約 100 倍高くなった。これは、パスツレラ菌による炎症の結果 elastase が産生され、それによりウイルス増殖が亢進したのではないかと推測される。肺での高い増殖は肺組織の直接破壊というより、むしろサイトカインを誘導し、その結果による組織障害がもたらされるのではないかと考えられる。今回行った実験では、ウイルス力価が 100 倍程高くなったのにも関わらず、重症肺炎を引き起こすマウスは認められなかった。SARS の重症化のメカニズムとしては、肺での elastase 以外にも大きく関与する因子があると思われる。

2) これまで用いた UV 照射に formalin による不活化を加え、より安全性の高いワクチンとしてその免疫効果を比較した。中和活性のある血中 IgG 抗体誘導という点では formalin 処理を加えても変わらないため、UV/form はワクチンとして十分利用可能であると思われる。現状では、マウスにおける SARS-CoV は一過性の感染にとどまり、ヒトの病態モデルにならないことがワクチンを開発する上で大きな問題である。マウスで一過性の感染後にウイルスが排除されるメカニズムも未だ明らかでなく、B 細胞、T 細胞、NK 細胞のいずれかがないマウスでもその感染様式は変わらないことが知られている。一方、SARS-CoV に対しては受動免疫が有効であることが明らかとなっており、少なくとも UV と formalin 処理で不活化したワクチンで中和活性の高い抗体を誘導すれば、SARS-CoV に対する防御効果を十分期待できるであろう。

マウスやサルではウイルスに対する中和抗

体産生を誘導する SARS(S) DNA ワクチンが報告されている。しかしながら最も重要なヒトの生体内ヒト抗体産生やヒト・キラーT 誘導において SARS ワクチンが SARS ウイルスに対する免疫応答による制御を発揮するか全く不明である。我々は SCID-PBL/hu の系(Cancer Res, 1997)を SARS DNA ワクチンの開発に応用し、キラーT 依存性 SARS ワクチンのみならず抗体依存性 SARS ワクチンを作製しえた。SCID-PBL/hu の系は、SARS ワクチンにより活性化されるヒトキラーT、ヒト B 細胞生体内ヒト免疫応答を解明する上で、強力な武器を提供することが示された。

DIIs は副作用のない種痘の候補としてヒトへの接種実験も行われ、安全性の高さは既に確認されている。SARS-CoV の構造蛋白を発現する組換え DIIs は、SARS に対する安全な組換え生ワクチンとなり得ると考えられる。しかしながら、組換え DIIs のうち S を発現するものを接種された群では、感染局所に T-cell の強い浸潤がみられ、炎症反応がおこっていることが示唆された。この結果から、ワクチン実験に使用する組換えウイルスの選択や、組換えウイルスの接種量にはさらなる検討が必要であると考えられる。

3) In silico screening から同定されたこの化合物は、recombinant SARS-CoV main proteinase による in vitro cleavage assay においても阻害活性を示した。この結果から少なくともこの化合物が SARS-CoV main proteinase の活性を直接抑制できることが示唆された。また、この類縁化合物は in vitro、in vivo で高い抗ウイルス活性を示した。今後は in vivo における薬物動態等も検討していく予定である。

4) フェレットの ACE2 発現細胞を用いたウイルス増殖はヒトと同様に高かったことから、フェレット ACE2 と SARS-CoV の親和性が高い事が示唆される。動物実験

において致死的である理由として、心臓、腎臓など殆どの臓器で ACE2 の発現が認められること（16年度に報告）に加え、フェレットのウイルスレセプターにウイルスが効率よく吸着することが、考えられる。

本研究で、FIP 発症猫で認められる lymphopenia が apoptosis に起因すること、さらに、この apoptosis 誘導には、マクロファージから放出される TNF- α とリンパ球での TNFR1 および TNFR2 mRNA の発現が深く関与していることを明らかにした。これまでも、FIP 発症猫のリンパ節や脾臓において apoptosis が検出されることが報告されているが、末梢血リンパ球での検出は行われていなかった。この報告で得られた結果は、FIP 発症猫の lymphopenia が apoptosis に起因することを直接的に証明した最初の報告と思われる。FIP 発症猫の腹水中にはマクロファージ、リンパ球、好中球などの細胞が含まれる。これらの細胞はいずれも TNF- α を産生する。我々が用いた PEC は、adherent cells で、マクロファージの形態を示し、この細胞から RT-PCR により FIPV 遺伝子が検出された。FIPV はマクロファージを標的細胞の 1 つとしており、この FIPV のマクロファージへの感染が、FIP 病態形成にとって重要な要因の 1 つと考えられている。さらに、ADE の発現によってウイルス産生量だけでなくマクロファージからの TNF- α 産生量も増加し、リンパ球の apoptosis 誘導が強まることが明らかとなった。

非感受性のマウス NIH3T3 細胞に TGEV 受容体 pAPN 遺伝子を導入したことにより TGEV への感受性を獲得したことから、受容体が TGEV 感染性を決定する主要因子であることが確認できた。今回 pAPN の発現様態の異なる 2 つの遺伝子導入細胞株間では、TGEV 感染後のウイルス RNA の転写・蛋白合成においては差が見られなかったものの、産生するウイルス力価

に差が見られた。このような受容体の発現様態の差によるウイルス産生性の違い、また感受性細胞である CPK 細胞と pAPN-FALG 遺伝子導入細胞株間で観察された感染効率の違いが TGEV の臓器指向性にどのような影響を与えているのか、次年度はさらなる解析を進めていく。

E. 結論

1) SARS 重症化機構に関する研究：プロテアーゼ存在下での SARS-CoV 増殖亢進が培養細胞を用いた研究から明らかにされたので、マウスを用いて検証した。微弱な呼吸器炎症を引き起こすパストツレラ菌との混合感染により、肺での SARS-CoV 感染の著しい増強が認められた。このことは、炎症時に産生される elastase などが肺でのウイルス増殖増強に関与している可能性を示唆している。

2) SARS ワクチンに関する研究：マウスモデルで UV と formalin 処理で不活化した SARS-CoV ワクチンは中和抗体や T 細胞応答を長期に誘導可能な安全性の高いワクチンとして有望であることが示唆された。また、formalin 処理によって IL-4 の産生が高まり、Th2 型に偏る傾向があることが明らかとなった。

マウスで SARS(S)DNA ワクチンが中和抗体産生を誘導した。SARS(N) DNA ワクチンと SARS(M) DNA ワクチンが強力な T 細胞活性化 SARS ワクチンであることが示された。SCID-PBL/hu マウスで、SARS(S)DNA ワクチンのみでなく SARS(M)DNA ワクチンでも SARS ウイルスに対するヒト中和抗体産生を誘導した。SCID-PBL/hu を用い、SARS(N)、SARS(M) DNA ワクチンは、ヒト・キラー T 細胞分化及び増殖機能を示し、ヒト T 細胞活性化 SARS ワクチンであることを示した。

SARS-CoV の構造蛋白を発現する組換え DIs は、マウスに液性、細胞性免疫及び粘膜免疫を誘導し、S 蛋白発現 DIs は中和抗体も誘導した。また、E/M/S または

E/M/M/S を発現する組換え DIIs を接種したマウスは、SARS-CoV 感染に抵抗性を示し、組換え DIIs に強いワクチン効果があることを示すことができた。

3) 抗ウイルス剤開発に関する研究：本研究により抗 SARS-CoV 活性を持つ化合物が同定され、新規抗 SARS-CoV 薬開発のリード化合物として有望であると考えられる。

4) SARS 動物モデル及び動物コロナウイルスを用いた研究：フェレット ACE2 はレセプターとしての親和性が高く、SARS-CoV 感染に関して、ヒトと同様の機能を持つことが強く示唆された。

FIP 発症猫で見られる lymphopenia が PBMC の apoptosis に起因することおよびマクロファージから産生される TNF- α が apoptosis 誘導因子の一つであることを明らかにした。また、抗体介在性感染増強 (ADE) の発現によってウイルス産生量だけでなくマクロファージからの TNF- α 産生量も増加し、リンパ球の apoptosis 誘導が強まることを明らかにした。

1. 論文発表

Matsuyama S, Ujike M, *Ishii I*, Fukushi S, Morikawa S, Tashiro M, and Taguchi F. (2006) Enhancement of SARS-CoV infection by proteases. *Adv. Exp. Med. Biol.* In press.

Watanabe R, Suzuki K, and Taguchi E. (2006) Receptor independent infection of mouse hepatitis virus : analysis by spinoculation *Adv. Exp. Med. Biol.* In press.

Nakagaki K, Nakagaki K and Taguchi E. (2006) Receptor-independent spread of a neurotropic murine coronavirus MHV-JHMV in mixed neural culture. *Adv. Exp. Med. Biol.* In press

Watanabe R, Matsuyama S and Taguchi F. (2006) Receptor-independent infection of murine coronavirus: analysis by spinoculation. *J. Virol.* 80 (in press)

Matsuyama S, Ujike M, Morikawa S, Tashiro M, and Taguchi F. (2005) Protease-mediated enhancement of SARS coronavirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 102: 12543-12547

Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama S, Miyajima N, Taguchi E, Itamura S, Kurane I, Morikawa S. (2005) Vesicular stomatitis virus pseudotyped with severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *J Gen Virol* 86:2269-2274.

Saijo M, Ogino T, Taguchi E, Fukushi S, Mizutani T, Notomi T, Kanda H, Minekawa H, Matsuyama S, Long HT, Hanh NTH, Kurane I, Tashiro M, Morikawa S. (2005) Recombinant nucleocapsid protein-based IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of SARS. *J. Virol. Methods.* 125, 181-186

Nakagaki K, Nakagaki K, and Taguchi E. (2005) Receptor-independent spread of a highly neurotropic murine coronavirus JHMV from initially infected microglial cells in mixed neural culture. *J. Virol.* 79, 6102-6110.

Ohnishi, K., Sakaguchi, M., Kaji, T., Akagawa, K., Taniyama, T., Kasai, M., Tsunetsugu-Yokota, Y., Ohshima, M., Yamamoto, K., Takasuka, N., Hashimoto, S., Ato, M., Fujii, H., Takahashi, Y., Morikawa, S., Ishii, K., Sata, T., Takagi, H., Itamura, S., Odagiri, T., Miyamura, T., Kurane, I., Tashiro, M., Kurata, T., Yoshikura, H. and Takemori, T. Immunological detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by monoclonal antibodies. *Jap. J. Infect. Dis.*, 58:88-94, 2005.

Tsunetsugu-Yokota, Y., Ohnishi, K., and Takemori, T. Severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus: application of monoclonal antibodies and development of an effective vaccine. *Rev. Med. Virol.*, 2006, in press.

Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Yoshida S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K,

Matsumoto M, Kase T, Demello D.E., Peiris JSM, Chen P.J., Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M.: The Development of vaccines against SARS Corona Virus in Mice and SCID-PBL/hu Mice. *Vaccine* 2005; 23:2269-72.

Masaji Okada, Yuji Takemoto, Yoshinobu Okuno, Satomi Hashimoto, Yukari Fukunaga, Takao Tanaka, Yoko Kita, Noriko Kanamaru, Hiroko Takai, Yayoi Sakaguchi, Izumi Furukawa, Miwa Izumiya, Shigeto Yoshida, Makoto Matsumoto, Tetsuo Kase, JSM Peiris, Daphne E. deMello, Pei-Jer Chen, Naoki Yamamoto, Yoshiyuki Yoshinaka, Tatsuji Nomura, Isao Ishida, Shigeru Morikawa, Masato Tashiro, and Mitsunori Sakatani*: Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS Corona Virus using mouse and SCID-PBL/HU mouse models. *Adv. Exp. Med. Biol.* In press

Ishii K., Hasegawa H., Nagata N., Mizutani T., Morikawa S., Tashiro M., Suzuki T., Taguchi E., Takemori T., Tsunetsugu-Yokota Y. and Miyamura T. Induction of Protective Immunity against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) Infection using Highly Attenuated Recombinant Vaccinia Virus DIs. *Virology* in press (2006)

Ishii K., Hasegawa H., Nagata N., Mizutani T., Morikawa S., Tashiro M., Suzuki T., Taguchi F., Takemori T., Miyamura T. and Tsunetsugu-Yokota Y. Highly attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine. *Adv. Exp. Med. Biol.* in press. (2006)

M.Sato, R.Iwaya, K.Ogihara, R.Sawahata, H. Kitani, J. Chiba, Y. Kurosawa K. Sekikawa, Intrabodies against EVH1 domain of wiskott-Aldrich syndrome protein inhibit T cell receptor signaling in transgenic mice T cells. *FEBS J.* (2005) 272, 6131-6144.

田口文広 : SARS コロナウイルス 獣医畜産新報 第 58 巻、129-134、2005

田口文広 : SARS 「ネオエスカ感染症・アレルギーと生体防御」 同文書院 27-31、2005

田口文広 : SARS SARS コロナウイルス : 特集「動物由来ウイルス感染症」日本臨床 63 巻 12 号 2113-2120 2005

田口文広 : マウス肝炎ウイルスおよび SARS コロナウイルスの細胞侵入機構 : 病原性発現への関与 実験医学 第 23 巻 No. 17 28-33 (増刊) 2005

岡田全司、橋元里実 : SARS ワクチン. 医学のあゆみ vol.214 No.12, 1025-1026 2005

2. 学会発表

Taguchi F. Cell entry mechanism of SARS and murine coronaviruses; implication in pathogenesis. German-Japanese Symposium on Emerging and Reemerging Viruses. May 17, 2005, Toyama, Japan

Taguchi F. and Matsuyama S. Protease-mediated enhancement of ARS-CoV infection. Xth International Nidovirus symposium. June 25-30, 2005, Colorado Springs, USA

Watanabe R. and Taguchi F. Receptor-independent infection of mouse hepatitis virus; analysis by spinoculation. Xth International Nidovirus symposium. June 25-30, 2005, Colorado Springs, USA

Nakagaki K., Nakagaki K. and Taguchi F. Receptor-independent spread of a murine coronavirus JHMV in mixed neural cell culture. Xth International Nidovirus symposium. June 25-30, 2005, Colorado Springs, USA

Fukushi S, Mizutani T., Saijo M, Matsuyama S, Taguchi F., Kurane I, and Morikawa S. Pseudotyped vesicular stomatitis virus for functional analysis of SARS-CoV spike protein. Xth International Nidovirus symposium. June 25-30, 2005, Colorado Springs, USA

Taguchi F. Protease-mediated enhancement of SARS-CoV infection . The 5th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Sep. 5-8, 2005, Awaji Japan

Watanabe R., Taguchi F. Receptor-independent infection of JHMV: analysis by spinoculation. The 5th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Sep. 5-8, 2005, Awaji Japan

Yamamoto, T., Tachikawa-Kawana, A., Iwamoto, A., Autran, B., Tsunetsugu-Yokota, Y. Characterization of virus-specific T cell activation in human by a potent antigen-presenting activity of dendritic cells: an evaluation *in vitro* for the vaccine development, 第35回日本免疫学会、横浜、平成17年12月。

Okada M., : DNA and Recombinant Vaccines: Novel vaccination (HVJ-liposome / HSP65 DNA+ IL-12 DNA and recombinant 72f BCG) against tuberculosis and DNA vaccines against SARS corona virus. 13th Annual Congress of the ESGT, 29th Oct – 1st Nov, 2005 Prague, Czech Republic (Symposist)

Okada M., Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Izumiya M, Yoshida S, Matsumoto M, Kase T, , Peiris M, Ishida I Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M ; Development of vaccines against the severe acute respiratory syndrome(SARS) corona virus. Groval Vaccinology International Forum(7th), Disease immunization and Immunotherapy. 5thMar-7th Mar, 2005, Dubai,UAE (Symposist)

Okada M., Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Izumiya M, Yoshida S, Matsumoto M, Kase T, Peiris M, deMello D, Chen P.J, Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M ; Xth International Nidovirus symposium. June 25-30, 2005, Colorado Springs, USA

Okada M., Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kanamaru N, Takai H, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Izumiya M, Yoshida S, Matsumoto M, Kasa T, Peiris M, deMello D, Chen P.J, Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M ; Development of vaccines against SARS corona virus infection using mouse and SCID-PBL/hu mouse models. The 5th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 5th Sep-8th Sep, 2005, Awaji Island, Hyogo

Ishii K., Yokota Y., Takemori T., Hasegawa H., Nagata N., Mizutani T., Morikawa S., Tashiro M., Suzuki T., Taguchi F. and Miyamura T. Highly attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine. Xth International Nidovirus Symposium, Colorado Springs, USA, June 25-30. 2005.

Zamoto A, Taguchi F., Fukushi S, Morikawa S and Yamada YK. Identification of ferret ACE2 and its recertor function for SARS-coronavirus. Xth International Nidovirus symposium. June 25-30, 2005, Colorado Springs, USA

Miyazaki, A. Ikeda, H., et al. First evidence of a high prevalence of porcine respiratory coronavirus infection in Japan. 40th UJNR

中垣慶子、田口文広：マウス肝炎ウイルス (MHV-JHM) のマウスとラット大脳分離細胞での感染様式の比較 第9回日本神経ウイルス研究会、浜松 2005. 6.9-6.11

渡辺理恵、田口文広：マウス肝炎ウイルスの受容体非依存性感染に関する研究：spinoculation 法を用いた解析 第53回日本ウイルス学会総回、横浜 2005.11.21-23

松山州徳、氏家誠、森川茂、田代真人、田口文広：プロテアーゼによる SARS コロナウイルスの感染増強 第53回日本ウイルス学会総回、横浜 2005.11.21-23

中垣慶子、田口文広：マウス肝炎ウイルス変異株(JHM-srr7)のマウス大脳分離培養細胞への感染に関する研究 第53回日本ウイルス学会総回、横浜 2005.11.21-23

横田(恒次)恭子、高木弘隆、山本拓也、大島正道、水谷哲也、森川茂：VeroE6 における SARS-CoV の増殖とアポトーシスに関する解析。第53回ウイルス学会、横浜、平成17年11月。

洋子、金丸典子、田中高生、高井寛子、岡田知佳、坂口弥生、古川いづみ、山田恭子、和泉谷美和、桑山さち子、山本喜三子、白石尚子、橋本雄太、坂谷光則、岡田全司；SARS ウイルスに対する DNA ワクチンの開発研究。第59回国立病院総合医学会 2005(10/14-

10/15), 広島

橋元里実、福永有可里、喜多洋子、田中高生、武本優次、奥野良信、加瀬哲男、吉田栄人、坂谷光則、岡田全司；SARS ウイルスに対する DNA ワクチンと SARS ウイルスレセプター遺伝子導入マウス作製による T 細胞・B 細胞免疫応答機構の解明. 第 35 回日本免疫学会総会. 2005 (12/13-12/15). 横浜

橋元里実、福永有可里、武本優次、喜多洋子、桑山さち子、金丸典子、田中高生、村木裕美子、高井寛子、岡田知佳、坂口弥生、古川いづみ、山田恭子、和泉谷美和、奥野良信、加瀬哲男、吉田栄人、坂谷光則、岡田全司；SARS ウイルスに対するキラー T 細胞分化誘導機構. 第 45 回日本呼吸器学会. 2005 (4/14-4/16). 幕張

橋元里実、福永有可里、武本優次、喜多洋子、桑山さち子、金丸典子、田中高生、村木裕美子、高井寛子、岡田知佳、坂口弥生、古川いづみ、山田恭子、和泉谷美和、奥野良信、加瀬哲男、吉田栄人、坂谷光則、岡田全司；SARS ウイルスに対する DNA ワクチンの開発研究. 第 45 回日本呼吸器学会. 2005 (4/14-4/16). 幕張

石井孝司、横田恭子、竹森利忠、長谷川秀樹、永田典代、森川 茂、水谷哲也、田口文広、田代真人、鈴木哲朗、宮村達男：高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DI_s の組換え SARS ワクチンとしての検討、第 53 回日本ウイルス学会、平成 17 年 11 月、横浜。

石井孝司、横田恭子、大西和夫、竹森利忠、長谷川秀樹、永田典代、森川茂、水谷哲也、田口文広、田代真人、鈴木哲朗、宮村達男：高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DI_s の組換え SARS ワクチンとしての検討、第 9 回日本ワクチン学会、平成 17 年 10 月、大阪。

山本典生、山本直樹

In silico screening による SARS-CoV 増殖抑制薬剤の同定 第 53 回日本ウイルス学会学

術集会抄録、138 ページ、2004

黒澤良和 「感染症および癌治療薬としてのヒト抗体の開発状況」 人工血液を作る(6)、 於：日本科学未来館、平成 18 年 2 月 11 日

高野友美、宝達 勉、橋田好兼、金子泰広、田邊真紀、小山弘之：猫伝染性腹膜炎 (FIP) 発症ネコにおける apoptosis 因子の検出 第 140 回日本獣医学会学術総会、鹿児島、2005 年 9 月。

SARS の重症化機構に関する研究

分担研究者：田口文広（国立感染症研究所ウイルス第3部）

協力研究者：氏家 誠（国立感染症研究所ウイルス第3部）

協力研究者：渡辺理恵（国立感染症研究所ウイルス第3部）

研究要旨

重症急性呼吸器症候群（SARS）は新型コロナウイルス（SARS-CoV）によって引き起こされる重症肺炎であり、その死亡率は約 10%と極めて高い。SARS-CoV は angiotensin converting enzyme 2（ACE2）を受容体とし、ヒト体内の ACE2 を発現している多くの臓器でウイルス増殖が報告されているが、重症肺炎の病理発生機構についてはよく分かっていない。我々は、SARS の重症肺炎が SARS-CoV の肺組織内での高い増殖が原因ではないかと考え研究を進めてきた。昨年度は、トリプシン、サーモリジンなどと共に、炎症時に肺で産生分泌されるエラスターゼが培養細胞に於ける SARS-CoV 増殖を増強することを報告した。本年度は、昨年度得られた結果を踏まえ、弱毒細菌による肺炎がプロテアーゼ産生を促し、このことにより肺での SARS-CoV 感染が増強されるのではないかと考え、その可能性について検討した。その結果、パストツレラ感染がマウス肺に於ける SARS-CoV の増殖を促進することが明らかにされた。

A. 研究目的

SARS は 2002 年から 2003 年にかけて中国広東省から香港に飛び火し、その後東南アジアを中心とする全世界へ伝播した。SARS は死亡率が高い事から世界を震撼させた新興感染症である。世界各国の共同研究により、原因病原体はそれまで報告されたウイルスとは異なる新たなコロナウイルス SARS-CoV であることが明らかにされた。SARS-CoV に関する研究は驚くべき速さで進行中し、ワクチンや抗ウイルス剤の開発も進展している。しかしながら、なぜ SARS-CoV が重症で致死率の高い呼吸器疾患を引き起こすのかについては不明である。昨年度は、トリプシンなどのプロテアーゼが SARS-CoV の新たな細胞侵入経路を活性化することを突き止め、更にプロテアーゼ存在下での SARS-CoV 増殖は非存在下と比べると 10-100 倍高いことを明ら

かにした。このような活性を示すプロテアーゼとしては、トリプシン、サーモリジン、デイスパーゼと共に、炎症時に肺で産生分泌されるエラスターゼが証明された。本年度は、弱毒細菌による肺炎がプロテアーゼ産生を促し、このことにより肺での SARS-CoV 感染が増強されるのではないかと考え、その可能性について検討した。

B. 研究方法

SARS-CoV はドイツヴェルツブルグ大学 Ziebuhr 博士から分与された Frankfurt-1 株を用いた。分与された SARS-CoV を VeroE6 細胞で 1 回増殖させた 1×10^8 PFU/ml の力価の種ウイルスを使用した。ウイルス増殖及び定量には VeroE6 細胞を用い、細胞培養には DMEM+5%牛胎児血清を用いた。ウイルスの定量は以下のような plaque assay により行った。VeroE6 細胞を 24 well plate に培養し、confluent 細胞

の培養液を除き、10倍階段希釈したウイルス液を50 μ l/wellで、それぞれを2wellに接種した。37 $^{\circ}$ Cで1時間吸着後、1% FCS, 0.75% methyl celluloseを含むDMEM 0.5 mlを加え、37 $^{\circ}$ Cで更に2日間培養した。更に、10%ホルマリンを各wellに0.5 ml加え、2時間固定した後、UVで細胞をovernight照射し、完全にウイルスを不活化させた。その後、細胞をcrystal violetで染色し、SARS-CoVによるplaqueを光学顕微鏡で算定した。本実験には、静岡実験動物(株)から購入した6週齢雄BALB/cを使用した。また、パスツレラ菌としては、*Pasturella pneumotropica*を用い、20 μ lを経鼻接種した。SARS-CoVも同様に20 μ lを経鼻接種した。感染マウスはP3実験室陰圧アイソラック内で飼育した。

C. 研究成果

SARS-CoVの細胞侵入機構に関しては、最初その受容体であるACE2に結合後、細胞内のendosomeに取り込まれ、endosome内のプロテアーゼによりSARS-CoV S蛋白が活性化され、ウイルスエンベロープがendosome膜と融合し、細胞内侵入するというendosomal pathwayの可能性が提唱されている。更に、S蛋白活性化のプロテアーゼとしては、cathepsin Lが候補に挙げられている。もしこの仮説が正しいとすると、bafilomycin処理VeroE6細胞にSARS-CoVを氷温で吸着させ、その後trypsin処理により、細胞表面からのSARS-CoVの細胞内侵入を可能にできると考えた。昨年度の実験から、trypsinによりSARS-CoVは細胞膜から直接細胞内へ侵入する可能性が強く示され、上の仮説が正しいことを示唆した。更に我々は、trypsin以外にもサーモリジン、エラスターゼ等が同様の効果を示すことを見だし、

SARS-CoVは環境にプロテアーゼがあると、本来のendosomal pathwayではなく直接細胞膜から細胞内侵入する潜在能力があることを明らかにした。更に、SARS-CoVの増殖をプロテアーゼ存在下と非存在下で比較すると、プロテアーゼ存在下ではウイルス増殖は100-1000倍高くなることが判明した。このウイルス増殖亢進効果は、肺炎時に産生される主要プロテアーゼのエラスターゼについても認められた。これらのことから、本研究ではSARS-CoVの肺炎重傷化には肺で産生される炎症性プロテアーゼが大きく関与していることが示唆された。そこで本年度は、マウスを用いて上記仮説について検討した。エラスターゼは肺炎時に好中球から産生される肺の主要プロテアーゼである。我々は、マウスに病原性を示さないが、軽度の呼吸器炎症を引き起こす細菌、パスツレラ菌(pp)と肺炎球菌(sp)について、これらの感染がSARS-CoVの肺での増殖を増強する可能性について検討した。マウスにpp, spを約 10^6 個経鼻感染させ、その後1日、2日に約 10^6 pfuのSARS-CoVを経鼻感染させた。ウイルス感染後のマウスの臨床症状と感染後3日、7日の肺に於けるウイルス力価を調べた。Pp感染マウスは感染後1日~3日に軽度の体重減少を示し、逆毛が見られたが、sp、SARS-CoVの単独感染では、そのような変化は認められなかった。3日目の肺に於けるウイルス力価を比較すると、SARS-CoV単独感染およびspとの混合感染では、約 10^4 pfu/50 micro gであったが、ppとSARS-CoVの混合感染では、 10^6 pfuと約100倍高い価を示した。即ち、SARS-CoVの肺での増殖はppとの混合感染で著しく増強されることが明らかとなった。

D. 考察

SARS-CoVのウイルスゲノムや抗原

は呼吸器や腸管など激しい病原が認められる組織以外にも、肝臓、腎臓、小脳、膵臓など多くの組織で検出されている。しかしながら、これらの組織では SARS-CoV による顕著な病変は報告されていない。SARS-CoV の受容体 ACE2 は、体内の殆どの臓器で発現され、特に心臓、腎臓では高い発現が認められる。これらのことから、SARS-CoV の標的臓器を規定する因子として、受容体以外の関与が考えられてきた。我々が示した protease 存在下で SARS-CoV 増殖が高くなることは、肺、特に炎症が誘発されている肺では、エラスターゼ等の protease が産生されることなどと考え合わせると、SARS-CoV の標的臓器決定に重要な役割を果たしているものと推測される。この仮説を検証するため、今回マウスに軽度の呼吸器炎症を引き起こす細菌感染が SARS-CoV 感染を増強するのかを検討したところ、パストツレラ菌との混合感染で、ウイルス増殖は約 100 倍高くなった。この原因としては、パストツレラ菌による炎症の結果エラスターゼが産生され、それによりウイルス増殖が亢進したのではないかと推測される。パストツレラ菌によりエラスターゼが誘導されるか否かを検討することが極めて重要であり、現在検討中である。肺での高い増殖は肺組織の直接破壊というより、むしろサイトカインを誘導し、その結果による組織障害がもたらされるのではないかと考えられる。今回行った実験では、ウイルス力価が 100 倍程高くなったのにも関わらず、重症肺炎を引き起こすマウスは認められなかった。SARS の重症化のメカニズムとしては、肺でのエラスターゼ以外にも大きく関与する因子があると思われる。

E. 結論

プロテアーゼ存在下での SARS-CoV 増殖亢進が培養細胞を用いた研究から

明らかにされたので、マウスを用いて検証した。微弱な呼吸器炎症を引き起こすパストツレラ菌との混合感染により、肺での SARS-CoV 感染の著しい増強が認められた。このことは、炎症時に産生されるエラスターゼなどが肺でのウイルス増殖増強に関与している可能性を示唆している。今後、どの様な機構によりウイルス増殖亢進が起こるのかについて解析したい。

E. 研究発表

1. 論文発表

Matsuyama S, Ujike M, Ishii I, Fukushi S, Morikawa S, Tashiro M, and Taguchi F. (2006) Enhancement of SARS-CoV infection by proteases. *Adv. Exp. Med. Biol.* In press.

Watanabe R, Suzuki K, and Taguchi E. (2006) Receptor independent infection of mouse hepatitis virus : analysis by spinoculation *Adv. Exp. Med. Biol.* In press.

Nakagaki K, Nakagaki K and Taguchi E. (2006) Receptor-independent spread of a neurotropic murine coronavirus MHV-JHMV in mixed neural culture. *Adv. Exp. Med. Biol.* In press

Ishii K, Yokota Y, Takemori T, Hasegawa H, Mizutani T, Morikawa S, Taguchi E. Miyamura T. (2006) Highly attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine. *Adv. Exp. Med. Biol.* In press

Zamoto A, Taguchi E. Fukushi S, Morikawa S and Yamada YK. (2006) Identification of ferret ACE2 and its receptor function for SARS-coronavirus. *Adv. Exp. Med. Biol.* in press.

Watanabe R and Taguchi F (2006)
Receptor-independent infection of murine
coronavirus: analysis by spinoculation. *J.*
Virology. 80 (in press)

Matsuyama S, Ujike M, Morikawa S,
Tashiro M, and Taguchi F. (2005) Protease-
mediated enhancement of SARS
coronavirus infection. *Proc. Natl. Acad.*
Sci., U.S.A. 102: 12543-12547

Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama
S, Miyajima N, Taguchi F, Itamura S,
Kurane I, Morikawa S. (2005) Vesicular
stomatitis virus pseudotyped with severe
acute respiratory syndrome coronavirus
spike protein. *J Gen Virol* 86:2269-2274.

Saijo M, Ogino T, Taguchi F, Fukushi S,
Mizutani T, Notomi T, Kanda H, Minekawa
H, Matsuyama S, Long HT, Hanh NTH,
Kurane I, Tashiro M, Morikawa S. (2005)
Recombinant nucleocapsid protein-based
IgG enzyme-linked immunosorbent assay
for the serological diagnosis of SARS. *J.*
Virology Methods. 125, 181-186

Nakagaki K, Nakagaki K, and Taguchi F
(2005) Receptor-independent spread of a
highly neurotropic murine coronavirus
JHMV from initially infected microglial
cells in mixed neural culture. *J. Virology*. 79,
6102-6110.

田口文広：SARS コロナウイルス 獣
医畜産新報 第 58 巻、129-134、
2005

田口文広：SARS「ネオエスカ感染症・
アレルギーと生体防御」同文書院
27-31、2005

田口文広：SARS SARS コロナウイル
ス：特集「動物由来ウイルス感染

症」日本臨床 63 巻 12 号 2113
-2120 2005

田口文広：マウス肝炎ウイルスおよ
び SARS コロナウイルスの細胞侵
入機構：病原性発現への関与 実
験医学 第 23 巻 No. 17 28-33
(増刊) 2005

2. 学会発表

Taguchi F. Cell entry mechanism of SARS
and murine coronaviruses; implication in
pathogenesis. German-Japanese
Symposium on Emerging and
Reemerging Viruses. May 17, 2005,
Toyama, Japan

Taguchi F. and Matsuyama S. Protease-
mediated enhancement of ARS-CoV
infection. Xth International Nidovirus
symposium. June 25-30, 2005, Colorado
Springs, USA

Watanabe R. and Taguchi F. Receptor-
independent infection of mouse
hepatitis virus; analysis by
spinoculation. Xth International
Nidovirus symposium. June 25-30,
2005, Colorado Springs, USA

Nakagaki K., Nakagaki K. and Taguchi F.
Receptor-independent spread of a
murine coronavirus JHMV in mixed
neural cell culture. Xth International
Nidovirus symposium. June 25-30,
2005, Colorado Springs, USA

Zamoto A, Taguchi F, Fukushi S, Morikawa
S and Yamada YK. Identification of
ferret ACE2 and its receptor function
for SARS-CoV. Xth International
Nidovirus symposium. June 25-30,
2005, Colorado Springs, USA

Fukushi S, Mizutani T., Saijo M,
Matsuyama S, Taguchi E, Kurane I, and
Morikawa S. Pseudotyped vesicular
stomatitis virus for functional analysis
of SARS-CoV spike protein. Xth
International Nidovirus symposium.
June 25-30, 2005, Colorado Springs,
USA

Ishii K., Yokota Y, Takemori T, Hasegawa H,
Mizutani T, Morikawa S, Taguchi E,
and Miyamura T. Highly attenuated
vaccinia virus DIs as a potential SARS
vaccine. Xth International Nidovirus
symposium. June 25-30, 2005,
Colorado Springs, USA

Taguchi E. Protease-mediated enhancement
of SARS-CoV infection . The 5th Awaji
International Forum on Infection and
Immunity. Sep. 5-8, 2005, Awaji Japan

Watanabe R., Taguchi E Receptor-
independent infection of JHMV:
analysis by spinoculation. The 5th Awaji
International Forum on Infection and
Immunity. Sep. 5-8, 2005, Awaji Japan

中垣慶子、田口文広：マウス肝炎ウイル
ス（MHV-JHM）のマウスとラッ
ト大脳分離細胞での感染様式の比較
第9回日本神経ウイルス研究会、浜
松 2005. 6.9-6.11

渡辺理恵、田口文広：マウス肝炎ウイル
スの受容体非依存性感染に関する研
究：spinoculation 法を用いた解析
第53回日本ウイルス学会総回、横
浜 2005.11.21-23

松山州徳、氏家誠、森川茂、田代真人、
田口文広：プロテアーゼによる
SARS コロナウイルスの感染増強第
53回日本ウイルス学会総回、横浜

2005.11.21-23

中垣慶子、田口文広：マウス肝炎ウイル
ス変異株(JHM-srr7)のマウス大脳
分離培養細胞への感染に関する研究
第53回日本ウイルス学会総回、横浜
2005.11.21-23

石井孝司、横田恭子、長谷川秀樹、永田
典代、水谷哲也、森川茂、田口文広、
田代真人、鈴木哲朗、宮村達男：高
度弱毒化ワクシニアウイルス株DIs
の組換えSARSワクチンとしての検
討 第53回日本ウイルス学会総回、
横浜 2005.11.21-23

不活化ウイルス粒子ワクチンの免疫効果の解析

分担研究者 横田恭子（国立感染症研究所）

協力研究者 大西和夫・高橋宜聖・阿戸学

大島正道・竹森利忠・他感染研免疫部

研究要旨 マウスモデルにおいて、UV 照射のみの SARS-CoV 粒子と、より安全性を高めた UV 照射+formalin 処理 SARS-CoV 粒子の皮下免疫効果について比較検討した。誘導される血中抗体価や骨髄中の抗体産生細胞数に有意な差はなかった。一方、formalin 処理群では所属リンパ節 T 細胞によって産生されるサイトカインのうち、特に IL-4 が高い傾向にあり、血中の IgG2a クラスの抗体価も明らかに低下していた。従って formalin 処理を加えた不活化ワクチンはより Th2 型に偏った免疫反応を誘導しやすいことが示唆された。

A. 研究目的

マウス (BALB/c) をモデルとして UV 照射不活化 SARS-CoV 粒子 (UV-V) と更にフォルマリン処理して不活化した SARS-CoV 粒子 (UV/form) ワクチンの免疫効果、安全性について検討し、ヒトへの迅速な応用を図る。

B. 材料と方法

1. 不活化ウイルスの作成

VeroE6 細胞はマイコプラズマフリーの細胞を ATCC より購入した。SARS-CoV (香港株) をこの細胞に感染させてマイコプラズマフリーのウイルスを plaque purify した。このウイルスを MOI=1 で VeroE6(ATCC)に感染させ、翌日培養上清を回収して UV で 20 分照射し、PEG 沈殿後蔗糖密度勾配で超遠心してウイルス粒子を精製した。この濃縮 UV 不活化ウイルス粒子を 2 つに分け、一方に最終濃度 0.02%になるように formalin を添加し、室温で一晩放置して自然蒸発させた。更にウイルス粒子を PBS で 10 倍に希釈した後再度濃縮し、BCA 蛋白測定 (ピアス) 後 SDS-PAGE で濃度を確認して免疫抗原とした。

2. 免疫

各群 5 匹のマウスに UV-V あるいは UV/form を 10 μ g/head で皮下にアラムアジュバント有り無しで投与した。対照としてアラムのみを皮下に免疫下。7 週間後同じ免疫を繰り返した。その後 7 日目にマウスの脾臓、骨髄細胞および所属リンパ節を採取して TB 細胞機能を解析した。また、これらのマウスの血清を経時的に採取して血中抗体価を測定した。

3. 血中抗体価の測定

SARS-CoV 感染および非感染 VeroE6 細胞を 1% NP40/PBS に溶解して 2000 倍に希釈し、エライザプレート (Maxi-sorp, Nunc) にコーティングした。プレートを 10%FCS/PBS-Tween でブロッキング後、希釈したマウスの抗血清を加えて 1 時間反応させ、HRP 標識抗マウス IgG 抗体で更に 1 時間反応させた。発色は OPD を基質として加え、その吸光度 (OD490) を測定した。標準として設定したマウスの抗血清の吸光度をもとに抗体量をユニットで表した。同様に、サブクラス特異的 HRP 標識抗体を用いて各サブクラス毎の抗体価をエライザで測定した。

4. 骨髄中の抗体産生細胞数の計測

SARS-CoV の組換え nucleocapsid 蛋白をコートした membrane plate と、対照としてコーティングなしの membrane plate を用意し、各膜上で骨髄細胞 (106 cells per well) を 37°C で 5 時間培養した。洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識した抗マウス IgG1 抗体を反応させた。Fast BB blue を基質としてスポットを発色させ、nucleocapsid 蛋白に特異的なスポット数を計測した。

4. サイトカインの測定

Axillar lymph node の T 細胞を分画し (95% 以上)、Thy1 陰性の脾臓細胞の存在下に UV-V を 10 µg/ml の濃度で加えて培養した。4 日後の培養上清を採取し、上清中のサイトカイン (IL2, IL4, IL5, IFN-γ, TNF-α) 量を CBA kit (BD) で測定した。

C. 研究結果

(1) 液性免疫効果

UV-V あるいは UV/form SARS-CoV ワクチンを一群 5 匹としてアラム有り無しの条件で皮下に接種した。初回接種後 4 週目と 7 週目およびブースター免疫後 (8 週目) の血中の SARS-CoV 特異的 IgG 抗体価の推移を比較した (図 1)。アラム無しの UV/form ワクチンの効果は若干弱いものの、ブースター後には UV のみと UV/form ワクチンはほぼ同等の効果であった。アラムを添加すると、UV のみと UV/form ワクチンによる免疫効果は初回免疫後から有意な差がなかった。また、どちらの群でも中和抗体が誘導されていた。一方、血中抗体をサブクラス毎に測定すると、全 IgG 抗体と IgG1 抗体はほぼ同じ傾向を示していたが、興味あることに、IgG2a 抗体はアラムアジュバント有無にかかわらず formalin 処理したワクチン接種群でかなり低値を示した (図 2)。他のサブクラスに関しては解析中である。

UV-V あるいは UV/form ワクチンをアラムアジュバントとともに接種したマウスにおいて、

骨髄中に存在して B 細胞の免疫記憶に関与すると考えられている抗体産生細胞数を測定したが、両群で有意な差は認められなかった (図 3)。

(2) 細胞性免疫効果

これら不活化ワクチンの T 細胞に対する効果を解析するため、UV-V あるいは UV/form ワクチンをアラムアジュバントとともに接種したマウスのブースター免疫後 1 週間目の所属リンパ節 (Axillar LN) より T 細胞を分画し、脾臓細胞 (APC) とともに 4 日間培養して培養上清中のサイトカイン産生量を測定した。図 3 に示すように、IL-2 は APC の存在下で virion 添加有り無しに関わらず誘導されたが、IFN-γ、IL-4、IL-5 の産生は virion 添加によってより高まった。これらのサイトカインの産生量は formalin 処理ワクチンが未処理ワクチンよりも高く、特に、IL-4 産生は formalin 処理ワクチンで常に高い傾向があった。

D. 考察

ヒトへの応用を考慮に入れ、マイコプラズマフリーに純化したウイルスクローンを調整した。これまで用いた UV 照射に formalin による不活化を加え、より安全性の高いワクチンとしてその免疫効果を比較した。中和活性のある血中 IgG 抗体誘導という点では formalin 処理を加えても変わらないため、UV/form はワクチンとして十分利用可能であると思われた。

UV 照射により不活化した SARS-CoV 粒子はウイルスの 3 次元構造を本来の形に近い状態で維持していると期待される。formalin 処理を加えることにより実際にどの蛋白がどのように変化しているのかは不明であるが、今回の実験で生物学的な効果には若干の違いがあることが明らかとなった。すなわち、formalin 処理群では IL-4 の産生が高くなり、それに関連して IgG2a 産生が低下して Th2 型に偏る。これがどのような機構によるものか、興味深い。

IL-2 産生や T 細胞の増殖は抗原非依存性に