

免疫組織化学によるウイルス抗原の検出は UV 不活化粒子 (HKU39849 株) をウサギに免疫して得られた抗 SARS-CoV 血清を用いて実施した。

ウイルス量の測定：

肺、肺胞洗浄液、鼻腔を含む上顎、鼻腔洗浄液を用いて感染性ウイルス量の測定を行った。肺、上顎は 20%組織乳剤を作製しその上清を用いた。これらは VeroE6 細胞における 50% 細胞培養感染量(TCID₅₀)を Kärber 法によって算出して表した。

なお、いずれの感染実験も国立感染症研究所村山分室高度安全実験施設においてバイオセーフティーレベル 3 病原体取り扱い規定および動物実験委員会規定に従い実施した。

C. 研究結果

ウイルスの感染、増殖を病理組織学的に解析した結果、継代によって肺、上顎でのウイルス抗原陽性細胞の増加と検出期間の延長が認められ、それに伴う炎症反応は増強し広範囲になった (図 1)。肺では炎症部位が細気管支から肺胞へと広がった。また、接種後 3, 5 日目の材料において組織中のウイルス量には継代前後で有意に増加が認められた (図 2)。10 代継代後のウイルス接種後 21 日目の血清を用いて Frankfurt 株による中和抗体価を測定したところ、中和抗体の誘導を確認した。

D. 考察

ラット経鼻接種による継代によって、

ウイルス感染、増加および病変形成の増加が認められた。なお、ウイルスゲノム遺伝子解析の結果、S 領域内のレセプター結合領域の 1325 番目の塩基の変異 (A → C) とアミノ酸置換 (チロシン → セリン) がみられた。ラット継代ウイルスでみられたレセプター結合領域のアミノ酸置換はラット ACE2 への結合能の増大に関連した (データは示さない)。

E. 結論

ラットを用いた SARS-CoV 感染モデルを作製した。今後、ウイルス動態とサイトカイン、病変形成の機序を解析していく予定である。また、本モデルを用いてより高齢な動物や、免疫抑制下でのウイルス動態を調べる事が可能である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Asahi-Ozaki Y, Sato Y, Harashima A, Morikawa S, Saijo M, Itamura S, Saito T, Odagiri T, Tashiro M, Ami Y, Sata T. Pathological and virological analyses of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infections in experimental animals. The Nidoviruses: Towards Control of SARS and Other Nidovirus Diseases. In press

学会発表

1. Nagata N., Iwata N., Hasegawa H., Asahi-Ozaki Y., Sato Y., Harashima A.,

Morikawa S., Saijo M., Itamura S., Saito T., Odagiri T., Tashiro M., Ami Y., Sata T. Pathological and virological analyses of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infections in experimental animals. Xth International Nidovirus Symposium: Toward Control of SARS and Other Nidovirus Diseases (2005.6. Colorado, USA)

2. 永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、福土秀悦、西條政幸、森川 茂、佐藤由子、佐多徹太郎。マウス、ラットを用いた継代による SARS-CoV の病原性の変化。第 53 回日本ウイルス学会総会 (2005 年 11 月横浜)。

3. 永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、佐藤由子、佐多徹太郎。SARS コロナウイルスの病原性と発症機序の解明。第 94 回日本病理学会総会 (2005 年 4 月横浜)

H. 知的財産権の出願、登録状況
なし。

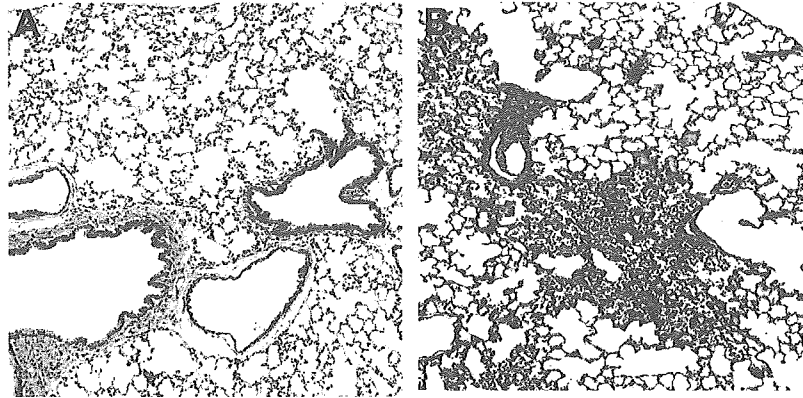


図1 ラット継代後の組織病変の変化。A. Frankfurt株経鼻接種後3日目の肺。細気管支周囲や肺胞に炎症反応は認められない。B. Frankfurt10代継代株経鼻接種後3日目の肺。細気管支腔内とその周囲、肺胞内に広範囲な炎症性細胞浸潤が認められる。

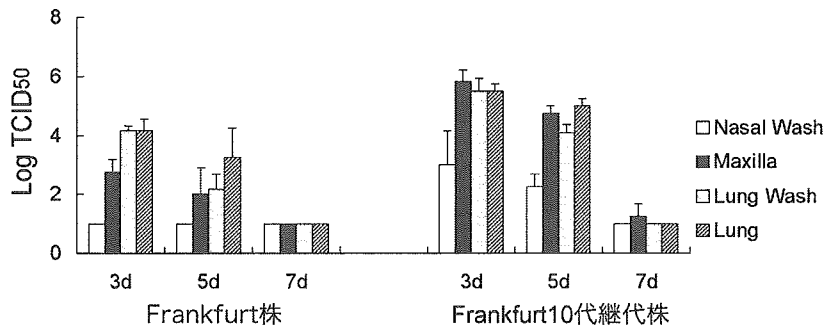


図2 ラット継代後の組織中のウイルス量 (Log TCID₅₀/ml)の変化。

「SARS コロナウイルス検査法の精度向上及び迅速化に関する研究」

10. 分担研究課題：SARS-CoV 感染動物モデルにおけるウイルスの動態と免疫応答の解析

分担研究者：長谷川秀樹（国立感染症研究所、感染病理部）

協力研究者：永田典代、岩田奈織子、佐藤由子、原嶋綾子、佐多徹太郎（同所、感染病理部）

森川茂、西條政幸（同所、ウイルス第一部）

板村繁之、西藤岳彦（同所、ウイルス第三部）

網 康至（同所、動物管理室）

研究要旨：サル等を用いた SARS-CoV 実験感染系で、感染後の抗体応答、抗原分布、ウイルス分布等を解析して、適切な診断材料、採取時期等に関して検討することを目的とした。今年度はサルを用いた感染実験材料のうち、臓器から Vero E6 細胞を用いた感染性ウイルスの分離および real-time PCR 法（LightCycler SARS-CoV Quantification kit）によるウイルスゲノムの検出を試みた。その結果、気管内接種後 7 日目の肺、肺門リンパ節の他、脾、腸間膜リンパ節および胃から直腸におよぶ腸管から感染性ウイルスあるいはウイルスゲノムを検出した。この結果は昨年度報告した直腸拭い液からのウイルスあるいはウイルスゲノム検出率が高かったことと関連した。

A. 研究目的

昨年度に引き続き、カニクイザル感染モデル実験からのサンプルを用いて感染後の抗体応答、ウイルス感染および抗原の分布などを解析し、適切な診断材料、材料採取時期に関して検討した。

B. 研究方法

材料：

SARS-CoV（HKU39849 株）を経鼻、気管内、静脈内、胃内接種したカニクイザル（筑波霊長類センター育成サル、雄、2-3 年齢）を接種後 7 日目あるいは 2—4 週間後に安楽殺後解剖に供した。ウイルス分離材

料として、肺、扁桃、脾、リンパ節、腎、肝、消化管とその内容物の一部を採取し、使用するまで -80℃に保存した。

ウイルス分離とウイルス量の測定：

臓器材料から 10%組織乳剤を作製しその上清を用いてウイルス分離およびウイルス量の測定を実施した。これらは VeroE6 細胞を用い、材料接種後に細胞変性効果（CPE）の有無を 3 日間観察して判定した。またウイルス量は VeroE6 細胞における 50% 細胞培養感染量(TCID₅₀)を Kärber 法によって算出して表した。

なお、いずれの感染実験も国立感染症研究所村山分室高度安全実験施設においてバ

イオセーフティレベル 3 病原体取り扱い規定および動物実験委員会規定に従い実施した。

ウイルスゲノムの定量：

10%組織乳剤の上清 100 μ l を Trizol 液 (Invitrogen) 900 μ l と混合し、使用まで-80 $^{\circ}$ C で保存した。プロトコールどおり核酸を抽出し、DNase 処理し RNA サンプルとした。Light Cycler SARS-CoV quantification kit (Roche) を用いて one-step RT-Real time PCR を行った。

C. 研究結果

ウイルス分離とゲノム検出結果

感染性ウイルスおよびウイルスゲノムの検出結果を表に示した。気管内接種後 7 日目に解剖したサルにおいて肺、肺門リンパ節の他、脾、腸間膜リンパ節および胃から直腸におよぶ腸管から感染性ウイルスあるいはウイルスゲノムを検出した。接種後 21 日目のサルでは肺門リンパ節以外すべて検出限界以下であった。また、経鼻接種後のサルでは頸部リンパ節と胃から感染性ウイルスが検出され、腸管膜リンパと一部の消化管からウイルスゲノムが検出された。静脈内接種後のサルの脾からウイルスゲノムが検出された。さらに静脈内接種後 14 日目の盲腸と直腸からウイルスゲノムあるいは感染性ウイルスが検出された。

D. 考察

上気道感染後のウイルスは胃、腸管を通過するあいだに感染性を失い、ゲノムのみが検出されることが臓器からのウイルス分離とゲノム解析によって、明らかとなった。また、感染臓器の所属リンパ節において感

染性ウイルスが検出された。リンパ系組織におけるウイルス動態は SARS の病態で何らかの役割を担っている可能性がある。

E. 結論

経鼻、気管内接種あるいは静脈内接種後のウイルス動態と臓器分布を明らかにした。これらの一部は開発中の診断法の陽性コントロールとして使用できる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

学会発表

論文発表

1. Hasegawa H, Ichinohe T, Strong P, Watanabe I, Ito S, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T. Protection against influenza virus infection by intranasal administration of HA vaccine with chitin microparticles as an adjuvant. **Journal of Medical Virology**, 2005 Jan; 75:130-136.
2. Ichinohe T, Watanabe I, Ito S, Fujii H, Moriyama M, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, and Hasegawa H*, Synthetic double-stranded RNA [poly (I:C)] combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection. **Journal of Virology**, 2005 Mar;79(5):2910-9.
3. Takahashi H, Maeda M, Sawa H, Hasegawa H, Moriyama M, Sata T,

Hall WW, Kurata T. Dicer and positive charge of proteins decrease the stability of RNA containing the AU-rich element of GM-CSF. *Biochem Biophys Res Commun*, in press.

学会発表

1. Noriyo Nagata, Naoko Iwata, Hideki Hasegawa, Yasuko Asahi-Ozaki, Yuko Sato, Ayako Harashima, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, Shigeyuki Itamura, Takehiko Saito, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Yasushi Ami, Tetsutaro Sata. Pathological and virological analyses of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infections in experimental animals. Xth International Nidovirus Symposium: Toward Control of SARS and Other Nidovirus Diseases (2005.6. Colorado, USA)
2. 一戸猛志、尾崎泰子、板村繁之、田村慎一、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 アジュバント併用経鼻 H5N1 インフルエンザワクチンの有効性の検討 第 9 回日本ワクチン学会学術集会 平成 17 年 10 月 15 日-16 日 大阪
3. 田村慎一、尾崎泰子、長谷川秀樹、谷本武史、鈴木雄次郎、山本三郎、佐多徹太郎、倉田毅 経鼻不活化インフルエンザワクチンの開発 第 9 回日本ワクチン学会学術集会 平成 17 年 10 月 15 日-16 日 大阪
4. 永田典代、岩田奈緒子、長谷川秀樹、加藤篤、網康至、田代真人、小船富美夫、倉田

毅、佐多徹太郎 弱毒生おたふくかぜワクチンの神経毒力試験に用いる動物モデルの開発—各種実験動物におけるムンプスウイルスの感受性についての病理学的検討—第 9 回日本ワクチン学会学術集会 平成 17 年 10 月 15 日-16 日 大阪

5. 一戸猛志、田村慎一、千葉丈、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 NKT 細胞活性化による粘膜免疫応答の誘導と高病原性鳥インフルエンザウイルスに対するワクチンへの応用 第 53 回日本ウイルス学会学術集会 2005 年 11 月 20-22 日 横浜
6. 永田典代、岩田奈緒子、長谷川秀樹、福士秀悦、西條政幸、森川茂、佐藤由子、佐多徹太郎 マウス、ラットを用いた継代による SARS-CoV の病原性の変化 第 53 回日本ウイルス学会学術集会 2005 年 11 月 20-22 日 横浜

H. 知的財産権の出願、登録状況

経鼻ワクチン（感染研発277号）出願中

表 SARS-CoV 感染後のサルにおけるウイルス分離とゲノム検出の結果

動物番号	#4589	#4590	#4591	#4592	#4593	#4594
接種経路	i.n. and i.t. ^a	i.n. and i.t. ^a	i.n.	i.n.	i.g. and i.v. ^a	i.g. and i.v. ^a
ウイルス量 (TCID ₅₀)	10 ³ and 10 ⁸	10 ³ and 10 ⁸	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁸ and 10 ⁸	10 ⁸ and 10 ⁸
臨床症状	No	No	No	No	Rash	No
解剖日 (接種後日数)	7d p.i.	21d p.i.	7d p.i.	28d p.i.	7d p.i.	14d p.i.
組織病変	positive ^b	slight ^b	slight ^c	negative	negative	negative
ウイルス抗原	positive ^b	negative	positive ^c	negative	positive ^d	negative
臓器材料	Viral RNA (copies/100ng RNA)					
肺	2.23E+06 ^e	ND	Not Examined	ND	ND	ND
扁桃	ND	ND	ND	ND	ND	ND
脾	2.24E+01	ND	ND	ND	5.94E+01	2.85E+01
肺門リンパ節	3.64E+03	9.90E+01	ND	ND	ND	ND
深頸部リンパ節	ND	ND	3.61E+02 ^e	ND	ND	ND
浅頸リンパ節	ND	ND	2.01E+02	Not Examined	Not Examined	Not Examined
腸管間膜リンパ節	2.54E+03 ^e	ND	1.80E+02	ND	ND	ND
腎	ND	ND	ND	ND	ND	ND
肝	ND	ND	ND	ND	ND	ND
胃	1.25E+02	ND	2.84E+02 ^e	ND	ND	ND
胃内容物	2.41E+02	ND	7.79E+02	ND	ND	ND
十二指腸	1.19E+01	ND	ND	1.73E+01	ND	ND
空腸	1.07E+01	ND	ND	ND	ND	ND
回腸	1.25E+04 ^e	ND	1.46E+01	ND	ND	ND
盲腸	4.41E+03	ND	ND	Not Examined	ND	1.07E+02
結腸	2.46E+03 ^e	ND	6.02E+03	Not Examined	ND	ND
直腸	7.37E+02	ND	1.78E+01	Not Examined	ND	1.41E+03 ^e

^a サル#4591, #4589, #4593 は再感染後7日目に解剖した。^b 肺において組織病変とウイルス抗原陽性細胞がみとめられた。^c 鼻腔において組織病変とウイルス抗原陽性細胞が認められた。^d ウイルス抗原陽性細胞が直腸粘膜上皮に認められた。^e ウイルス分離陽性。ND, not detectable (<10 copies)

11. 分担研究課題：ヒト ACE2 発現トランスジェニックマウス組織への SARS-CoV 感染

分担研究者	棚林 清	国立感染症研究所	獣医科学部	室長
協力研究者	宇田晶彦	国立感染症研究所	獣医科学部	研究員
	山本美江	国立感染症研究所	獣医科学部	研究員

SARS コロナウイルスの感染モデル動物を開発するために、本ウイルスのレセプターであるヒトのアンギオテンシン変換酵素 2 (ACE2) を発現するトランスジェニックマウスの作出を試みている。目的遺伝子 DNA が導入されたマウスの SARS コロナウイルス感染の感受性を調べるために摘出肺および腎臓の初代培養細胞へのウイルス感染を試みた。いずれの細胞でもウイルス増殖がみられ、今後、本マウスにおける各種組織における ACE2 の発現状況の検索や個体でのウイルス感受性の検討をする必要がある。

A. 研究目的

重症急性呼吸器症候群(SARS)の原因ウイルスである SARS コロナウイルス (SARS-CoV)感染による発症機構の解析や診断および検査方法の開発や検証のためには適した小動物感染モデルの開発が重要である。これまでのマウスでの感染実験では、SARS-CoV に感染するもののウイルスは比較的速やかに排除され発症しない。本研究では、有用な SARS-CoV 感染モデル動物を開発するために本ウイルスのレセプターであるヒトのアンギオテンシン変換酵素 2 (human angiotensin converting enzyme 2, hACE2)を発現するトランスジェニックマウスの作出を試みた。遺伝子導入が認められたマウスにおける SARS-CoV 感受性を検証するために摘出組織の初代培養におけるウイルス増殖性を調べることを目的とした。

B. 研究方法

ヒト腎細胞由来 293 T 細胞の hACE2 遺伝子 cDNA を発現プラスミドベクター pCAGGS-P7 にクローニングした。この発現プラスミド DNA 断片をマウス(C57BL/6J)の受精卵にマイクロインジェクションした後、仮腹マウスに移植し子孫マウスを得た。得られたマウスのうちウエスタンブロット法により骨格筋、心臓及び弱いながら肺での蛋白の発現の認められた 1 ラインのマウスを用いた。

8 週または 10 週令のマウスの肺および腎臓を摘出し、細切組織片を 120U/ml コラゲナーゼ及び 0.005%トリプシンインヒビターを含む培養液にて 37°C で 15 分間処理し滅菌メッシュを通過させて細胞を回収した。これらの細胞を 20%FCS 添加 DME 培

地で培養して初代培養細胞を作成した。対照として同腹の導入遺伝子陰性マウスについて同様の処理をして初代培養細胞を調製した。

VeroE6 細胞で調製した SARS-CoV (HKU39849 株)を MOI 約 0.1 でマウス初代培養細胞に接種し、37°Cで1時間吸着、洗浄後培養液を加え3日間培養した。経時的に培養上清を回収した。

ウイルス感染価の測定は、培養上清を10倍階段希釈して96穴マイクロプレートに調製した VeroE6 細胞に接種し3日目に CPE を観察し Reed-Muench 法にて感染価を算出した。

(倫理面への配慮) 本研究における動物実験は国立感染症研究所の規定に従い実施した。

C. 研究結果

得られたトランスジェニックマウスの1ラインについて目的遺伝子が導入された8週令または10週令マウス及び同腹の遺伝子導入陰性マウスの摘出肺及び腎臓からの分離細胞の初代培養を行った。24穴培養プレートで5から7日間培養してほぼ全面に単層付着細胞が調製できた。

これらの細胞に SARS-CoV を接種し、3日間の観察と培養上清の回収及びウイルス感染価の測定を行った。陽性マウス由来肺及び腎細胞では2日から3日目には細胞の培養面からの剥離が見られたが、対照マウス由来細胞では見られなかった。

培養細胞上清中のウイルス力価を VeroE6 細胞で測定した(図)。8週令(図A)または6週令(図B)各1頭の肺由来初代培養細胞ではウイルス接種後24時間目で $2 \times 10^{5.67}$ から $2 \times 10^{7.5}$ TCID50/mL のウイルス増

殖が認められた。また、腎由来細胞では 2×10^5 から $2 \times 10^{6.67}$ TCID50/mL の増殖が認められた。ウイルス接種後3日目では、ウイルス量の減少が見られた。一方、同腹の対照マウス由来培養細胞では腎細胞で3日目に少量のウイルスが認められたが、ほとんど検出限界以下であった。これらのことから、本ラインのトランスジェニックマウス由来細胞では SARS-CoV が増殖可能であることが分かった。

D. 考察

SARS-CoV のウイルス受容体であるヒト ACE2 発現トランスジェニックマウスの作出を試み、発現が見られたマウスの肺及び腎臓の初代培養細胞へのウイルス感染を試みた。肺由来細胞及び腎由来細胞ともに24時間までに高いウイルス増殖が認められた。対照マウス由来細胞ではほとんどウイルス増殖が見られないことから、このトランスジェニックマウスが SARS-CoV 感染に感受性である可能性が高いことが期待される。しかし、ウエスタンブロット法で各種組織の hACE2 発現を調べた結果では腎臓での検出はされておらず、検出限界以下の細胞群が初代培養を行うことで増幅された可能性が考えられた。詳細な hACE2 発現状況を検索するために免疫組織化学染色による検索が必要と思われた。今後、マウス個体への感染実験を行い、個体レベルでのウイルス感受性と感染モデル動物としての有用性を評価する必要がある。

E. 結論

SARSCoVのレセプターであるhACE2を発現するトランスジェニックマウスの肺及

び腎臓由来初代培養細胞を調製し、ウイルス増殖を調べた結果、いずれの細胞でもウイルス増殖が認められ、本マウスがSARS-CoVに感受性である可能性があると考えられ、個体への感染実験を行いSARS-CoV感染モデルマウスとしての有用性の検証をする必要がある。

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

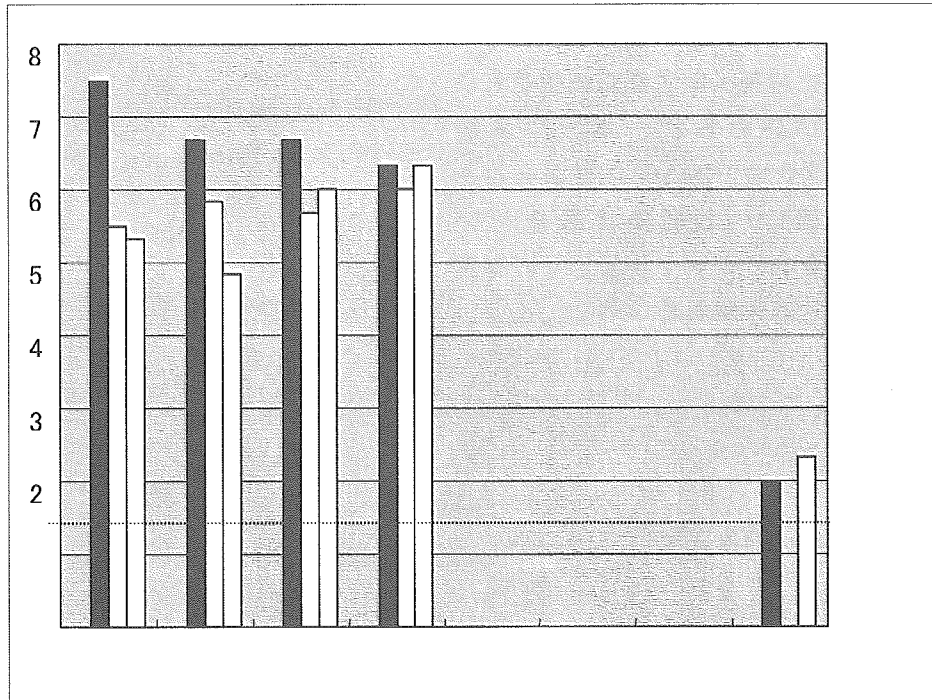
なし

2. 実用新案登録

なし

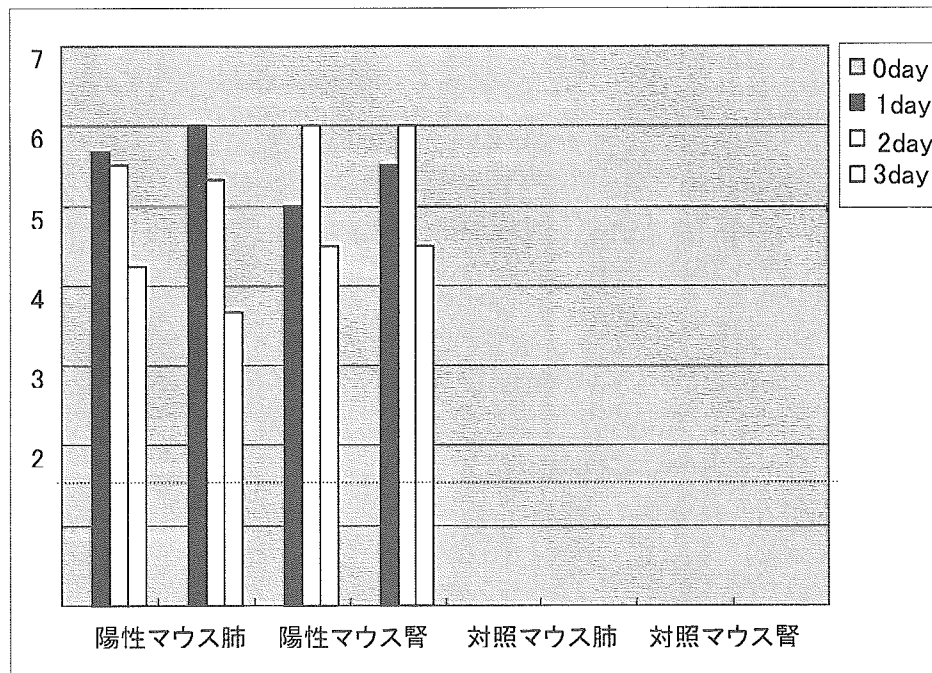
A

2×10^7 TCID50/0.1ml



B

2×10^7 TCID50/0.1ml



hACE2発現マウス肺及び腎由来初代培養細胞におけるSARSコロナウイルスの増殖

A: 8週令マウス由来初代細胞(7日間培養)

B: 10週令マウス由来初代培養細胞(5日間培養)