

厚生労働科学研究費補助金

平成18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-一般-037)

研究報告書

平成19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 15
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 21
分担研究者：横田恭子（国立感染症研究所免疫部）
3. 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 27
分担研究者：石井孝司（国立感染症研究所ウイルス第2部）
4. 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 35
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）
5. 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）
6. SARS-S タンパク質に対するモノクローナル抗体の単離 47
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）
7. 動物 ACE2 の SARS コロナウイルス受容体活性に関する研究 59
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（FIP）ウイルス感染における
抗体介在性感染増強作用と FIP 重症化機構 69
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 85
分担研究者：池田秀利（動物衛生研究所感染病研究部）

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：非病原性細菌 *Pasteurella* 菌（Pp）の感染によりマウス肺での SARS-CoV 増殖は著しく高くなり、ヒト SARS と同様の重症肺炎を引き起こすことが明らかにされ、SARS 動物病態モデルが樹立された。（2）ワクチン開発に関する研究：UV 不活化 SARS-CoV 粒子と、より安全性を高めた UV + formalin 不活化 SARS-CoV 粒子の免疫効果について、Pp と SARS-CoV 混合感染系で検討したところ、両者には差がなく、SARS に対する高い抵抗性を賦与した。また、SARS-CoV-S 遺伝子を持つ組換えワクシニアウイルスも同様に、マウス SARS 病態モデルにおいて、SARS に対する高い抵抗性を誘導した。SARS-CoV 遺伝子 cDNA を持つ発現ベクターは、ヒトリンパ球を持つ SCID-PBL/hu マウスの系で、液性、細胞性免疫反応を誘導した。（3）抗ウイルス剤開発に関する研究：既に認可されている薬剤や SARS-CoV のプロテアーゼ阻害剤の *in silico* screening で高い抗 SARS-CoV 活性を示す薬剤が発見された。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。（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 に対して比較的高い感受性を持つフェレット、ネコのアンジ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）感染では、抗体依存性感染増強（ADE）発現により産生が増加した TNF α はマクロファージに FIPV 受容体 アミノペプチダーゼ N（APN）の発現を上昇させ、FIP 発症に深く関与することが明らかにされた。豚伝染性胃腸炎ウイルス（TGEV）とその変異株豚呼吸器コロナウイルス（PRCV）はブタ APN（pAPN）を受容体として細胞侵入するが、pAPN 発現細胞での増殖に違いが認められ、感染細胞内での M（membrane）蛋白の産生量の違いがその原因であることが示唆された。

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病研究部）

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) 弱毒呼吸器細菌パスツレラ菌(Pp)との混合感染によりマウスに重症化肺炎を誘導する動物病態モデル系を確立する。

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、マウスの SARS 病態モデルを用いて、その抵抗性誘導能について検討する。SARS-CoV-S 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 能について、マウスの SARS 病態モデルを用いて検討する。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。

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。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。

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

ェレットやネコの 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、TNF- α の関与を検討する。TGEV では、その S 遺伝子変異体である豚呼吸器コロナウイルス (PRCV) との組織親和性や病原性の違いについて、両ウイルスの受容体 pAPN 発現細胞を樹立し、細胞レベルの解析を行なう。

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 Pp 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。6 週令雄 BALB/c に *Pasteurella pneumotropica* (Pp) MaM 株(6×10^6 cfu)を経鼻感染させ、その一日後 Fr-1 株又は Fr-1 株のマウス馴化株 (Fr-mo) を約 1×10^6 PFU を経鼻接種した。感染後のマウス体重とマウス体内でのウイルス増殖を調べた。ウイルス増殖は感染後マウスから肺やその他の主要臓器を採取し、10%乳剤を作成し、ウイルス感染価を VeroE6 細胞を用いたプラーク法で定量した。また、採取した組織の一部については、組織病理学的検索も行なった。

2) 不活化ワクチンの防御効果は以下の方法によった。UV 不活化ウイルス (UV-V) と UV + formalin 不活化ウイルス (UV-FV) ($10 \mu\text{g}/\text{head}$)をアラムアジュバントとともに、マウスの皮下に免疫した。4 週後ブースター免疫し、9 日目に Pp を感染させ、上記の方法により不活化ウイルスの感染防御効果を検討した。

組換えワクシニアウイルス DIs 作製方法については既に述べた。これらの組換え

DIs を CEF に感染させ、目的蛋白の発現をウエスタンブロット法および免疫蛍光抗体染色法で確認した。これらの組換えウイルス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、病態モデルに対するワクチン効果を検討するため、マウスに S を発現する組換え DIs を皮下接種して免疫誘導し、Pp と SARS-CoV を経鼻接種により共感染させて1週間経過を観察した。また、血液中の抗体価、中和抗体価、肺及び鼻腔洗浄液中の SARS-CoV 量の測定、各種サイトカイン濃度の測定を行った。

DNA ワクチン研究でのヒト免疫応答解析モデル (SCID-PBL/hu) マウスの作製は既にのべた。これに DNA ワクチン 50 μ g を M. Anterior tibia に注射し、3~5 回免疫した。最終免疫より、7 日後に採血。血清中のヒト中和抗体価を測定した。SCID-PBL/hu の系を用いたタンパク抗原に対するヒト・キラーT 細胞の誘導 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。さらに、SCID-PBL/hu の系を用いて、SARS(M)DNA ワクチン又は SARS(N)DNA ワクチンを1週毎に3回筋肉注射 (100mg DNA) した。最終免疫より1週後に spleen cell を投与し、effector 細胞とした。SARS(M)DNA 又は SARS(N)DNA を自己のヒト PBL プラスト (PWM でプラスト化) に導入した細胞を標的細胞とし、⁵¹Cr release 法でアッセイした。

3) 様々な観点から抗ウイルス剤の候補物質を収集し、それらの抗ウイルス活性を SARS-CoV の感染系において評価した。収集した化合物セットは、(1)すでに市販されヒトに用いられている抗ウイルス剤、(2) in silico screening によって選択された化合物、(3)スタキフリン誘導体、(4)ポリオキソメタレート群の4セットを用いた。それらの抗ウイルス活性の評価は、FFM-1 株を Vero E6 cell に感染させる系に MTT assay, リアルタイム RT-PCR 等

を適用して行った。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日目で材料を採取し、リアルタイム RT-PCR 等によってウイルスの定量を行った。

ファージ抗体ライブラリーをスクリーニングして中和抗体を得るための SARS-S タンパク質は、ナチュラルに近い構造を持つことが望ましい。この抗原としては、不活化した SARS-CoV ワクチンが考えられるが、入手が困難である。そこで、SARS-S タンパク質の ectodomain を動物細胞あるいは昆虫細胞を用いて分泌、発現、精製する方法、SARS-S タンパク質を細胞膜上に大量に強制発現させた動物細胞あるいは昆虫細胞を用いる方法が考えられる。これらの方法で抗原が得られれば、これを用いてファージ抗体ライブラリーをスクリーニングし、モノクローナル抗体を単離する。本研究においては、ファージ抗体ライブラリーとして、AIMS5 および ANYmix (A, N, Y ライブラリーを混合したもの) を用いることにした。

4) 各種動物の ACE2 塩基配列の決定はネコ、フェレット、ハムスター、スナネズミ、ハクビシン、アライグマおよびアフリカミドリザルからの mRNA を鋳型に RT-PCR にて増幅し、ダイレクトシークエンスにより決定した。また、ヒト、ネコ、フェレット、マウスの ACE2 発現 HeLa 細胞を作製した。各動物の ACE2-HeLa に SARS-CoV Frankfrut1 株を moi=0.1 で接種し、48 時間後の培養中のウイルス力価を、VeroE6 を用いたプラークアッセイで求めた。ACE2 発現 293T 細胞の作製し、S 蛋白質を導入したシュードタイプウイルス (VSV-SARS-S) (J. Gen. Virol. 2005 (86) Fukushi et. al) を感染し、24 時間後の GFP 発現を FACS で解析して、感染効率を定量的に解析した。

FIP 研究では以下の方法により研究を進めた。1) FIP 発症猫および SPF 猫のマクロファージにおける FIPV N 遺伝子、TNF- α および APN mRNA の発現量、2) 培養

feline macrophage における fAPN mRNA 発現と FIPV 感染の関係、3) FIPV 感染マクロファージ培養上清中における fAPN 誘導因子の存在、4) feline recombinant TNF- α 処理マクロファージにおける fAPN 発現量の変化、5) feline recombinant TNF- α 処理マクロファージでの FIPV 増殖について検討した。

TGEV 研究での pAPN-FLAG 発現 NIH3T3 細胞株の樹立については、既に述べた pAPN-FLAG 遺伝子導入細胞株の TGEV および PRCV に対する感受性は以下の様に行なった。各細胞に moi=0.01 で TGEV To163 株または PRCV CH45 株を接種後経時的にアセトン固定し抗 TGEV 兔血清を用いウイルス抗原を検出した。また同様に培養上清と培養細胞中のウイルス感染力価を経時的に測定した。ウイルス RNA 合成効率、感染細胞より RNA を抽出し cDNA を作製、S, M および N 遺伝子の subgenomic mRNA、genomic RNA を RT-PCR により検出した。各ウイルス構造蛋白も感染細胞から経時的に細胞溶解液を回収し、各ウイルス構造蛋白の産生性を抗 TGEV 兔血清を用いたウエスタンブロットティングにより観察した。

C. 研究成果

SARS-CoV 増殖はプロテアーゼ存在下で非存在下と比べ著しく高くなり、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。そこで、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 Pp 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、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、マウスに重症肺炎を誘発することはなかった。本年度は、マウス馴化 SARS-CoV と Pp との混合感染を検討した。その結果、マウスは感染後 4-6 日に

重症肺炎に陥り、著しい体重減少を示し、40-90%が死亡した。病理学的検索から、マウスの肺炎はヒト SARS の肺炎像と酷似する diffuse alveolar damage を呈していた。本研究によりマウスを用いた SARS 病態モデルが樹立された。

2) 上記のマウス SARS 病態モデルを用いて、不活化ウイルスの感染防御効果を検討した。UV-V と VU-FV ワクチンは同等の中和抗体誘導能があったことから、SARS 病態モデルにおける肺病変形成に対しても防御効果があるのかどうかをテストするため、UV-V あるいは UV-FV とアラム、対照としてアラムのみを 2 回接種したマウスに Pp を経鼻感染させ、1 日後マウスに馴化した SARS-CoV を感染させた。Pp 感染後から全てのマウスで体重減少が認められた。対照群のマウスはその後徐々に悪化して感染後 7 日での致死率が 90%以上であったのに対し、ワクチン接種群では感染 2 日後から顕著に体重、臨床症状の回復が見られ、感染後 7 日でほとんどのマウスが生存していた。ワクチン接種群のマウスでは非接種群マウスと比べ、ウイルス感染がほとんどなく、いずれの不活化ウイルスを使用しても、高い感染防御効果が認められた。また、肺洗浄液中の IL-6 と MCP-1 が非ワクチン接種群でのみ明らかに上昇していた。

Pp と SARS-CoV の共感染により惹起されるマウス重症肺炎 (SARS) モデルを用いて、組換え DIs の接種によるワクチン効果を検討した。組換えウイルスの皮下接種マウスは抗 SARS-CoV に対する強い中和活性を産生することは既に報告した。SARS 発症に対する防御効果を見るため、Pp と SARS-CoV を共感染させた。組換え DIs 接種群は全例が生存したのに対し、コントロール接種群では 5 日で約 80%が死亡した。また、体重減少でも組換え DIs 接種群には明らかなワクチン効果が認められた。また、組換え DIs 接種群では鼻腔及び肺洗浄液から SARS-CoV は全く検出されなかった。

組換え DNA ワクチンでは SCID-PBL/hu に DNA ワクチンを免疫し、血清中の SARS S、M、N、E に対するヒト中和抗体価を測定した。中和活性を示すヒト抗体を産生する SARS(M) DNA ワクチンが開発された。SARS(M) DNA ワクチンは SARS-CoV 感染 Vero 細胞に対し、ヒト中和活性及び SARS-CoV 増殖阻止活性を示した。また、SARS(N) DNA ワクチン及び 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)を増強することが明らかとなった。SARS(N)DNA ワクチンで免疫した SCID-PBL/hu より SARS N 蛋白に対して特異的・特異的なヒト・キラー T 細胞が誘導された。SARS M 蛋白に対するキラー活性は認められなかった。一方、SARS(M) DNA ワクチンで免疫した SCID-PBL/hu から SARS M 蛋白に特異的なヒト・キラー T 細胞が誘導された。これらのヒト・キラー T 細胞はヒト CD3⁺・CD8 陽性 T 細胞であった。

3) インフルエンザウイルス侵入阻害剤であるスタキフリンの誘導体について、抗 SARS-CoV 活性の評価を行った。リアルタイム PCR に用いるウイルス RNA の定量では、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。感染後 3 時間で薬剤を加えると抗ウイルス活性が大幅に低下した。また、SARS-CoV S 蛋白でシュードタイプされた HIV(SARS-S-NL-luc)を用いた解析から、スタキフリン誘導体の標的が S を介した entry の段階であることが示唆された。

ヒト型抗体の作製では以下の結果が得られた。バキュロウイルスの発現系で得られた SARS-S タンパク質を、Ni カラムを用いて精製し、精製 SARS-S タンパク質を用いてヒト抗体ファージライブラリーをスクリーニングを行った。その結果、7 種類の SARS-S タンパク質特異的モノクローナル抗体が得られた。しかし、それらの抗体は SARS-CoV 中和活性を有しないことがわかった。一方、これと並行して、2 匹の

マウスを精製 SARS-S タンパク質で免疫した。得られた抗血清は、SARS-S タンパク質に対して ELISA 陽性を示した。更に、これらの抗血清は、SARS-CoV 中和活性を有することが明らかになった。

4) ACE2 アミノ酸配列の比較と進化系統解析では、ネコ、フェレット、ハムスター、スナネズミ、アライグマおよびサル ACE2 はヒト、ハクピシンと同様 805 アミノ酸残基で、各動物は大きく 4 つのクラスターに分かれた。ヒト、ネコ、フェレット、マウスの ACE2-HeLa における SARS-CoV の増殖は、ヒト ACE2-HeLa で最も効率が高く、次いで、ネコ、フェレット、マウスの順であった。

FIP 発症由来の肺胞マクロファージでは FIPV N 遺伝子および TNF- α mRNA 発現量が増加していた。また FIP 発症由来の肺胞マクロファージでは FIPV 受容体 fAPN の mRNA 発現量も増加していた。FIPV または FIPV と抗 S 抗体の mixture を SPF 猫由来の肺胞マクロファージに接種したところ、細胞内 FIPV N 遺伝子の発現量の増加とともに fAPN mRNA 発現量の増加が認められた。FIPV 感染マクロファージ培養上清中に fAPN 誘導因子が存在するか否かを調べた。マクロファージ内 fAPN 発現量は対照のマクロファージと比較して、FIPV と抗 S 抗体を接種したマクロファージの培養上清を加えて培養した時に有意な増加が認められた。TNF- α と fAPN 発現の関係を探るために TNF- α を培養マクロファージに処理し、fAPN 発現量の変化を調べた。TNF- α を加えて培養したところ、対照群と比較して fAPN mRNA 発現量の有意な増加が認められた。また、マクロファージ表面の fAPN 発現量も、TNF- α を加えて培養したマクロファージで有意な増加が認められた。TNF- α を加えて培養したマクロファージに FIPV を接種した場合、対照群と比較して FIPV 産生量の有意な増加が認められた。その産生量は、培養液に加える TNF- α の濃度に依存して増加した。

豚コロナウイルス研究では、受容体 pAPN-FLAG 発現マウス細胞 2 株における増殖が、TGEV が PRCV より高いことが示され、そのウイルス産生性の差がウイルス増殖のどの段階で生じるか解析を行った。各細胞に TGEV または PRCV の結合性を観察した結果、受容体陰性細胞株 VB をはじめ全ての細胞株で TGEV 及び PRCV の結合が同程度に確認された。ウイルスを接種後培養し、RT-PCR で S、M および N 遺伝子合成効率を比較すると、pAPN-FLAG 発現マウス細胞株 7A および 7B と感受性 CPK 細胞において、TGEV と PRCV の各 mRNA の合成は同時期から同程度に確認された。ウイルス蛋白合成段階について解析した結果、TGEV 接種後の APN-FLAG 発現マウス細胞株 7A および 7B と CPK 細胞においてウイルス蛋白の合成が確認でき、その合成速度、合成開始時期は同程度であった。PRCV 接種後についてもほぼ同様の結果であったが、pAPN-FLAG 発現マウス細胞株 7B において、M 蛋白質に相当する分子量の蛋白の合成効率が他のウイルス蛋白合成効率に比べ低い結果が得られた。

D. 考察

1) マウス馴化ウイルスは、単独感染ではマウスに肺炎、体重減少等の臨床症状を示すことはなかったが、Pp との混合感染では、ヒト SARS と類似性の高い重症肺炎を引き起こし、マウス馴化 SARS-CoV と弱病原性呼吸器細菌により、SARS の動物病態モデルを作出することができた。SARS 患者の数例からは、SARS-CoV 以外の呼吸器感染微生物 Chlamydia, などが分離されている。SARS は感染者全てが重症の肺炎に陥る訳ではなく、感染者の約 20% が重症肺炎になり、その半数が死亡すると報告されているが、20% の重症肺炎に陥るケースには、上記の呼吸器微生物などとの混合感染が原因となっていることも完全に否定できるわけではない。SARS の重症化の一つの原因として、他の病原体

との混合感染が考えられる。

2) マウスには通常 SARS による病変は誘導されず、感染は一過性に経過するのみである。今回用いた Pp 混合感染による SARS 病態形成モデルでは、ワクチン投与していないマウスはほとんど死亡した。従ってこれまでに指摘されているように、肺病変の形成には、単に SARS-CoV が増殖するだけでなく何らかの宿主由来の像悪因子が関与していると思われる。今回、肺洗浄液中の IL-6 と MCP-1 が非ワクチン接種群でのみ明らかに上昇していたことから、これらサイトカインの病態形成への重要性が示唆された。

SARS-CoV の構造蛋白の全部または一部を発現する組換え 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。特に S を発現する組換え DIIs には SARS 発症を抑制する効果があることが示され、この組換えウイルスはワクチンとして有効であることが証明された。SARS の発症原因として、ウイルス感染による細胞傷害よりも、感染に伴って分泌される炎症性サイトカインによる傷害が主たる原因であるという説があるが、今回の実験でもワクチン接種群とコントロール群で IL-6、MCP-1 量に大きな差がある点は、SARS 発症におけるこれらのサイトカインの重要性を示唆しているのではないかとと思われる。

マウスやサルにおいて SARS-CoV 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-CoV 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。このような状況において、我々が世界に先駆けて確立した 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。このことより 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。

3) 我々は抗 SARS-CoV 活性を持つ化合物として HIV プロテアーゼインヒビターのひとつであるネルフィナビル、in silico screening によって見出したプロテアーゼインヒビター、スタキフリン誘導體、ポリオキソメタレートと同定した。これらの薬剤はそれぞれ異なる分子を標的としてウイルスの複製を抑制していると推測される。例えばネルフィナビルの作用点は post-entry step、スタキフリン誘導體の作用点は entry step であると考えられている。作用点の異なるこれらの薬剤を組み合わせることで、より効果的な抗 SARS-CoV 薬となることが期待される。今後はそれぞれの薬剤の抗ウイルス活性発現の詳細なメカニズム解析、in vivo での安全性や体内動態の解析を行いたいと考えている。

パキユロウイルスの発現系を用いて得た精製抗原で、ヒト抗体ファージライブラリーをスクリーニングした結果、7種類のモノクローナル抗体が得られたが、これらは SARS-CoV 中和活性を有しなかった。その原因としては、抗原との結合活性が十分強くない可能性が考えられる。また、7種類しかモノクローナル抗体が取れていないので、仮にヒト抗体ファージライブラリーの中に中和抗体が含まれていても、それらを単離できていない可能性もある。しかし、単純にスクリーニングしただけでは、これら7種類の抗体が重複して取れてくるので、更に別の種類の抗体を単離するには、それら7種類以外の抗体を単離するための工夫が必要と考えられる。

4) Martina (Nature 2003 (425) 915) らは、ネコやフェレットが SARS-CoV に感受性が高いことを示している。本研究においても、ネコおよびフェレットの ACE2 発現細胞における SARS-CoV の増殖や VSV-SARS-S 感染効率が、ヒトに近いことが示された。各動物の ACE2 の アミノ酸配列の違いが、SARS-CoV の S 蛋白質

との親和性や SARS-CoV の増殖に関連すると思われるが、ネコやフェレットではヒトと比較して ACE2 の S 蛋白質結合部位に多数のアミノ酸置換が認められた。これらの動物種の ACE2 のキメラや変異導入により、結合に関与するアミノ酸がより詳細に明らかに出来ると考えられる。

5) 本研究の結果から、FIPV に感染した猫では、液性免疫が誘導されると、ADE 発現によりマクロファージでのウイルス増殖が増加すると共に TNF- α の過剰発現を招き、その結果、1) リンパ球の apoptosis 誘導、2) マクロファージでのウイルスレセプター (fAPN) 発現増加によるウイルス感受性の up-regulate などにより FIP 発症を早めているのではないかと思われた。FIP の病態発生機序は複雑であり未解明な点が多い。今回の報告は FIP への発症過程をマクロファージでのウイルス増殖という視点から捉えたものであり、FIP の病態を理解する上で重要な発見と思われる。今後は細胞性免疫誘導との balance を含めた検討が望まれる。

コロナウイルスの M 蛋白質はヌクレオカプシドとの結合、viral core の形成やウイルス粒子形成の誘起などに関与しているとされている。TGEV と PRCV の受容体発現マウス細胞株と感受性 CPK 細胞におけるウイルス増殖の各ステップにおける増殖能は、M 蛋白質の合成効率の低下以外がほとんど同程度であることが今回確認されたことから、CPK 細胞にくらべ受容体発現マウス細胞株で PRCV の産生ウイルス力価が低い原因のひとつとしてこの M 蛋白質の合成効率の低下が関与している可能性が考えられた。

E. 結論

1) SARS 重症化機構に関する研究：微弱な呼吸器炎症を引き起こす Pp とマウス馴化 SARS-CoV 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、感染マウスはヒト SARS と類似した重症肺炎を発症した。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が示唆された。また、
SARS の重症化機構の一つとして、病原性
の低い呼吸器感染症との混合感染の可能
性が示唆された。本研究により確立され
たマウスの重症肺炎は、SARS に対す
るワクチン、抗ウイルス剤などの予防治療薬の
開発に貢献出来ると考えられる。

2) SARS ワクチンに関する研究：マウス
SARS 病態モデルにおいて UV+formalin
処理不活化ワクチンは UV 不活化ワクチ
ンと比べ、同様の高い感染防御効果を示
した。したがって UV+formalin 処理不活
化ワクチンは、より安全性の高いワクチン
として有望であると思われる。この動物モ
デルでは特定のサイトカインが肺に大量に
産生され、このことが肺病変形成に関与
している可能性が示唆された。

SARS-CoV の S 蛋白を発現する組換え
ワクシニアウイルス DIs は、マウスに接
種した場合、中和抗体産生を誘導し、また、
SARS 病態モデルでは SARS 発症を完全
に抑制する効果があることが示され、この
組換えウイルスはワクチンとして極めて有
効であることが証明された。

健常人 PBL を SCID マウスに投与して作
製した SCID-PBL/hu を免疫し、
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。

3) 抗ウイルス剤開発に関する研究：本
研究により複数の抗 SARS-CoV 活性を持
つ化合物が同定された。これらの中から実
用的な抗 SARS-CoV 剤が開発される可
能性がある。またこれらの薬剤を組み合
わせて用いることにより、さらに高い抗
ウイルス効果が期待できる。

SARS-S タンパク質を、バキュロウ
イルスの発現系を用いて発現させ、精製す
るこ

とができた。精製した SARS-S タンパ
ク質を用いて、ヒト抗体ファージライブラ
リーをスクリーニングした結果、7 種類
のモノクローナル抗体が単離された。し
かし、これらはいずれも SARS-CoV を
中和できなかった。

4) SARS 動物モデル及び動物コロナウ
イルスを用いた研究：フェレット、ネコ
の ACE2 は SARS-CoV のレセプターと
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。

FIPV 感染における ADE 発現と FIP
発症に関して、1) ADE 発現にはウ
イルスレセプターは関与せず、同じ血
清型の FIPV の再感染で誘導されるこ
と、2) FIP の病態形成には TNF α
による T リンパ球のアポトーシスが
関与しているが、マクロファージから
の TNF α の産生は ADE 発現によ
って増強されること、3) ADE 発
現により産生が増加した TNF α は
autocrinally または paracirinally
にマクロファージに作用しウイルスレ
セプターであるアミノペプチダーゼ N
の発現を upregulate することを
明らかにした。

TGEV と PRCV の臓器指向性機構を
解明することを目的とし、受容体発
現マウス細胞株を樹立、TGEV およ
び PRCV の感染性について解析した
結果、受容体発現マウス細胞株では
PRCV 産生量が低かった。感受性の
CPK 細胞と受容体発現マウス細胞
株を用い TGEV と PRCV のウイル
ス増殖の各段階について比較解析を
行った結果、ウイルス結合、ウイル
ス RNA 合成効率では TGEV と
PRCV 間に差は認められなかった
が、ウイルス蛋白合成について解析
したところ、受容体発現マウス細胞
株 1 株において PRCV 接種時の M
蛋白合成効率低下が観察された。M
蛋白質はウイルス粒子形成に関与す
るとされていることから、PRCV の
産生ウイルス力価が低い原因の
ひとつとしてこの M 蛋白質の合成
効率の低下が関与している可能性が
考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 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.* 581: 253-258.

Watanabe R, Suzuki K, and Taguchi F. (2006) Receptor independent infection of mouse hepatitis virus : analysis by spinoculation *Adv. Exp. Med. Biol.* 581: 331-334.

Nakagaki K, Nakagaki K and Taguchi F. (2006) Receptor-independent spread of a neurotropic murine coronavirus MHV-JHMV in mixed neural culture. *Adv. Exp. Med. Biol.* 581: 327-330

Ishii K, Yokota Y, Takemori T, Hasegawa H, Mizutani T, Morikawa S, Taguchi F, Miyamura T. (2006) Highly attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 581: 593-596

Zamoto A, Taguchi F, Fukushi S, Morikawa S and Yamada YK. (2006) Identification of ferret ACE2 and its receptor function for SARS-coronavirus. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 581: 519-522.

Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama S, Taguchi F, Kurane I and Morikawa S. (2006) Pseudotype vesicular stomatitis virus for functional analysis of

SARS coronavirus spike protein *Exp. Med. Biol.*, 581: 293-296.

Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Kanaji Y, Kurane I, Taguchi F, Tashiro M, and Morikawa S (2006) Evaluation of a novel vesicular stomatitis virus pseudotype-based assay for detection of neutralizing antibody responses to SARS-CoV. *J Med Virol.* 78: 1509-1512.

Ishii K, Hasegawa H, Nagata N, Mizutani T, Morikawa S, Suzuki T, Taguchi F, Tashiro M, Takemori T, Miyamura T and Tsunetsugu-Yokota Y. (2006) Induction of protective immunity against severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection using highly attenuated recombinant vaccinia virus DIs. *Virology* 351: 368-380.

Watanabe R, Matsuyama S and Taguchi F (2006) Receptor-independent infection of murine coronavirus:analysis by spinoculation. *J. Virol.* 80: 4901-4908

Tsunetsugu-Yokota Y, Ato, M., Takahashi, Y., Hashimoto, S-I., Kaji, T., Kuraoka, M., Yamamoto, K-I., Mitsuki, Y-Y., Yamamoto, T., Ohshima, M., Ohnishi, K., Takemori, T. Formalin-treated UV-inactivated SARS coronavirus vaccine retains its immunogenicity and promotes Th2-type immune responses. *Jap. J. Infect. Dis.*, in press, 2007.

Ishii K, Hasegawa, H., Nagata, N., Mizutani, T., Morikawa, S., Tashiro, M., Suzuki, T., Taguchi F, Takemori, T., Tsunetsugu-Yokota Y, Miyamura, T. Induction of Protective Immunity against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) infection using highly attenuated recombinantvaccinia Virus DIs. *Virology.* 2006;351:368-380.

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;16:117-131.

Mizutani T., Fukushi S., Kenri T., Sasaki Y., Ishii K., Endoh D., Zamoto A., Saijo M., Kanaji H., Shiota K., Kurane I. And Morikawa S. Mechanisms of establishment of persistent SARS-CoV-infected cells. *Archives of Virology*, in press.

Mizutani T., Endoh D., Shirato K., Shimizu H., Fukushi S., Saijo M., Sakai K., Kwang L., Ito M., Nerome R., Takasaki T., Ishii K., Suzuki T., Kurane I., Morikawa S. and Nishimura H. System for rapid determination of viral RNA sequence by ligation-mediated amplification and direct sequencing technology for emerging viral infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases*, in press.

Ishii K. Vaccines for severe acute respiratory syndrome. SARS, Mizutani T. ed.: 107-117, Transworld Research Network, Kerala, India (2006).

Mizutani T., Fukushi S., Ishii K., Sasaki Y., Kenri T., Saijo M., Kanaji Y., Shiota K., Kurane I. And Morikawa S. Mechanisms of establishment of persistent SARS-CoV-infected cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 347: 261-265 (2006).

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 351: 368-380 (2006).

Okada M., Okuno Y, Hashimoto S, Kita Y, Kanamaru N, Nishida Y, Tsunai Y, Inoue R, Nakatani H, Fukamizu R, Namie Y, Yamada J, Takao K, Asai R, Asaki R, Kase T, Takemoto Y, Yoshida S, JSM Peiris, Pei-Jer Chen, Yamamoto N, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M.: Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using SCID-PBL/hu mouse models. *Vaccine* (in press)

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 Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M. : Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using mouse and SCID-PBL/hu mouse models. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2006; 581-566

Yamamoto N., Yamamoto N. RNAi and SARS. *RNAi Therapeutics.* 2006: 79-99

Shigeta S, Mori S, Yamase T, Yamamoto N., Yamamoto N. Anti-RNA virus activity of polyoxometalates. *Biomed Pharmacother.* 2006 60:211-9.

Takano T, Hohdatsu T., Hashida Y, Kaneko Y, Tanabe M, Koyama H. 2007. A "possible" involvement of TNF-alpha in apoptosis induction in peripheral blood lymphocytes of cats with feline infectious peritonitis. *Vet. Microbiol.* 119: 121-131.

Takano T, Hohdatsu T., Toda A, Tanabe M, Koyama H. 2007. TNF-alpha, produced by feline infectious peritonitis virus (FIPV)-infected macrophages, upregulates expression

of type II FIPV receptor feline aminopeptidase N in feline macrophages. *Virology*, In press.

田口文広：コロナウイルスの細胞侵入機構：病原性発現との関連 *ウイルス* 第56巻 第2号 165-172 2006

田口文広：SARS コロナウイルスの特徴とワクチン開発 *化学療法の領域* 第22巻 第12号 33-38 2006

田口文広：重症急性呼吸器症候群 (SARS) 分子呼吸器病 第11巻 第1号 42-47 2007

田口文広：SARS コロナウイルス感染症 臨床とウイルス 第43巻 第5号 423-428 2006

石井孝司、水谷哲也 SARS コロナウイルス研究の最前線 *医学のあゆみ* 218：839-844 (2006)

2. 学会発表

Okada M. (Symposist): Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using SCID-PBL/hu mouse models. Fifth World Congress on Vaccines, Immunization and Immunotherapy (WCVII), November 6-9, 2006. Montreal, Canada.

Okada M. (Symposist) : Novel Vaccines Against Tuberculosis and SARS Corona Virus.; Non-antibiotic Strategy for Pulmonary Infection. 46th JRS-International Symposium (Japanese Respiratory Society). June 1-3, 2006. Tokyo, JAPAN.

Hashimoto S, Okada M., Takemoto Y, Okuno Y, Fukunaga Y, Kita Y, Kanamaru N, Teramoto S, Nishida Y, Namie Y, Tsunai Y, Inoue R, Nakatani H, Kase T, J.S.M. Perris, Pei jer Chan, Nomura T, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M: Development of Vaccines and Passive Immunotherapy Against SARS Corona Virus using Mouse and SCID-PBL/hu Mouse model. The 11th congress of the Asian pacific society of respirology(11th APSR) 19-22 November 2006, Kyoto

Hashimoto S, Okada M., Takemoto Y, Okuno Y, Kita Y, Kanamaru N, Fukamizu R, Nishida Y, Namie Y, Tsunai Y, Inoue R, Nakatani H, Yamada J, Takao K, Peiris, J.S.M.: Development of three distinct vaccines against SARS corona virus infection using SCID-PBL/hu mouse models. 6th Awaji International Forum on Infection and immunity. 4-7 September 2006 Awaji

Miyazaki, A. Ikeda H. et al. First evidence of a high prevalence of porcine respiratory coronavirus infection in Japan. 40th UJNR, 2005

田口文広、永田典代、岩田奈織子、網 康至：呼吸器系細菌とSARSウイルスとの混合感染によるマウスの重症化肺炎に関する研究 第54回日本ウイルス学会総会、名古屋 2006.11.19-21

氏家誠、西川裕輝、大高 章、山本直樹、山本典生、松岡雅雄、児玉栄一、藤井信孝、田口文広 SARSウイルス スパイク(S)蛋白質の Heptad Repeat(HR)由来 Peptideは細胞表面からのウイルス侵入を効果的に抑制する 第54回日本ウイルス学会総会、名古屋 2006.11.19-21

渡辺理恵、前島雅美、福土州悦、松山州徳、森川茂、田口文広：SARS コロナウイルス 解裂性スパイク蛋白を持つ pseudotype ウイルスの細胞内侵入機構に関する研究 第54回日本ウイルス学会総会、名古屋 2006. 11.19 -21

中垣慶子、田口文広：マウス肝炎ウイルスのJHM変異株srr7のマウス大脳分離細胞での受容体非依存性感染拡大のメカニズムに関する研究

田口文広、川瀬みゆき：ヒトコロナウイルス 229E の細胞内侵入機構に関する研究 第54回日本ウイルス学会総会、名古屋 2006.11.19-21

渡辺理恵、田口文広：細胞表面へパラン硫酸のマウス肝炎ウイルス感染における役割について 第54回日本ウイルス学会総会、名古屋 2006.11.19-21

氏家誠、福士秀悦、森川茂、田口文広：SARS-CoV スパイク (S) 蛋白質の Cys-rich 領域は細胞間融合及びウイルス細胞侵入活性に重要な働きを持つ 第54回日本ウイルス学会総会、名古屋 2006.11.19-21

座本綾、福士秀悦、田口文広、森川茂、山田靖子：フェレット ACE2 と SARS-CoV S 蛋白質の親和性の解析 第54回日本ウイルス学会総会、名古屋 2006.11.19-21

光木裕也、大島正道、山本拓也、高木弘隆、森川茂、山岡昇司、永井美之、大西和夫、横田 (恒次) 恭子：SARS-CoV Spike に対する中和抗体のエスケープ変異ウイルスの単離と感染防御に重要な抗体エピトープの同定。第54回ウイルス学会、名古屋、平成18年11月。

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

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、宮村達雄：高度弱毒化ワクチニアウイルス D I s の組換え SARS ワクチンとしての検討。第53回ウイルス学会、横浜、平成17年11月

石井幸司、横田恭子、長谷川秀樹、水谷哲也、森川茂、田口文広、田代真人、吉崎佐矢香、鈴木哲朗、宮村達男。高度弱毒化ワクチニアウイルス株 D I s の SARS 生ワクチンとしての応用。第52回ウイルス学会、横浜、平成16年11月

高須賀直美、藤猪英樹、高橋宜聖、大島正

道、坂口雅弘、大西和夫、橋本修一、竹森利忠、横田 (恒次) 恭子。UV 不活化 SARS ウイルス全粒子ワクチンの経皮免疫は、強く持続的な液性免疫を誘導する。第34回日本免疫学会、札幌、平成16年12月

大西和夫、坂口雅弘、加地友弘、横田恭子、大島正道、葛西正孝、谷山忠義、赤川清子、高須賀直美、橋本修一、山本紀一、阿戸学、藤猪英樹、高橋宜聖、竹森利忠。SARS コロナウイルスに対するモノクローナル抗体の確立とウイルス抗原検出法への応用。第34回日本免疫学会、札幌、平成16年12月

橋元里実、喜多洋子、深水玲子、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 に対するヒト・キラーT細胞免疫反応の解析 第36回日本免疫学会総会 2006年12月11日-13日、2006

山本典生、小林雅典、佐藤彰彦、山本直樹。スタキフリンによる SARS コロナウイルス複製の抑制。日本ウイルス学会第54回学術集会 2006年11月

座本綾、福士秀悦、田口文広、森川茂、山田靖子：フェレット ACE2 と SARS-CoV S 蛋白質の親和性の解析。第54回日本ウイルス学会、平成18年11月、名古屋。

山田靖子、田原口元子、座本綾、平井明香、滝本一広：マウス肝炎ウイルスの流行株分離の実例。第32回日本実験動物技術者協会関東支部懇話会、平成19年2月、東京。

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

石井孝司
2004-242937・石井孝司他12名・財団法人ヒューマンサイエンス振興財団・SARS-コロナウイルスタンパク質の全部もしくは一部のタンパク質をコードする DNA をゲノム DNA 上に保有し、該タンパク質を発

現し得る組換えワクチニアウイルス DIs
株。・2004年8月23日出願

2004-225043・石井孝司他4名・独立行政
法人医薬品医療機器総合機構・HCV ウ
イルスタンパク質をコードする DNA を保
有する組換えワクチニアウイルス DIs 株、
およびその利用・2004年8月2日出願

山本典生

特願 2006-215485、抗ウイルス材及び環
境反応型抗ウイルス材、2006年8月8日

PCT/JP2006/303905、プロテアーゼイン
ヒビター、2006年3月1日

PCT/JP2005/016151、抗 SARS ウイル
ス剤、2005年9月2日

特願 2005-064664、プロテアーゼインヒ
ビター、2005年3月8日

特願 2004-255819、抗 SARS ウイルス剤、
2004年9月2日

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：網康至（同・動物管理室）、

協力研究者：永田典代、岩田奈織子（同・感染病理部）

協力研究者：氏家 誠、渡辺理恵（同・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、その致死率は約 10%と極めて高い。SARS-CoV はその受容体 *angiotensin converting enzyme 2*（ACE2）を発現している多くの組織で増殖するが、肺での高い増殖と重症肺炎の発症機構についてはよく分かっていない。我々は、培養細胞での SARS-CoV 感染がトリプシンやエラスターゼなどのプロテアーゼ存在下では非存在下と比べ、100 倍以上も高いことを明らかにした。このことから、SARS の重症肺炎が肺炎時に産生されるエラスターゼなどにより感染が亢進され、その結果重症肺炎となる可能性が考えられた。そこで、昨年度はマウスに軽度の肺炎を引き起こす細菌感染の SARS-CoV 感染に対する影響を検討したところ、*Pasteurella* 菌の感染により肺での SARS-CoV 増殖は著しく上昇した。しかしながら、マウスはヒト SARS のような重症化に至ることはなかった。SARS-CoV の病原性発現については、ウイルスの進化（変異）によるヒトへの馴化が極めて重要であると考えられている。そこで、マウス馴化 SARS-CoV 株を用いて *Pasteurella* 菌との混合感染を検討したところ、ヒトの SARS と極めて類似した重症肺炎の発症が観察された。この感染系は SARS 動物病態モデルとして有望であり、今後の SARS 重症化機構の解明と共にワクチン、抗ウイルス剤等の予防治療法開発に貢献することが期待される。

A. 研究目的

重症急性呼吸器症候群（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動物由来の新興感染症であり、その致死率の高さから世界を震撼させた。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し、ワクチンや抗ウイルス剤の基礎的な研究も進展している。

しかしながら、SARS-CoV がどのような機構で重症肺炎を引き起こすのかについては不明である。我々は、培養細胞 VeroE6 における SARS-CoV 感染がトリプシンなどの様々なプロテアーゼにより亢進することを報告した。その分子機構としては、細胞表面の ACE2 に結合した SARS-CoV のスパイク（S）蛋白がプロテアーゼにより活性化され、その結果、本来エンドゾーム経路で感染する SARS-CoV が細胞表面から直接侵入することが可能になったためと考えられた。この様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ある。このことは、SARS-CoV 感染時に、他の原因による微弱な肺炎により産生されるエラスターゼが、感染亢進を誘導し、その結果重症肺炎を引き起こされる可能性が示唆された。このことを検証するため、昨年度は、弱毒細菌 *Pasteurella* 菌 (Pp) がマウス肺中で SARS-CoV 感染を増強するかに付いて検討し、Pp 感染後の SARS-CoV 感染が亢進されるものの重症肺炎を誘導することが出来ないことを報告した。SARS のヒト肺炎の重症化に関して、SARS-CoV の進化 (変異) が極めて重要であることは、既に報告されている。SARS アウトブレイクの初期のウイルスがヒトからヒトへの感染を経て進化 (変異) して、香港から全世界に拡散した病原性の高いウイルスになったと考えられている。本年度は、昨年行なった Pp 感染系で、マウスに馴化した SARS-CoV を用いて検討した。

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 をマウスに経鼻接種後、感染肺の洗浄液中のウイルスを更にマウスに 10 回継代接種することにより、マウス馴化ウイルス (Fr-mo) を得た。このウイルスの増殖及び定量には 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 2 well に接種した。37°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°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、*Pasteurella 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 の細胞侵入は、受容体 ACE2 に結合後、endosome に取り込まれ、endosome 内のプロテアーゼにより S 蛋白が解裂、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侵入機構が提唱されている。S 蛋白活性化のプロテアーゼとしては、cathepsin L が考えられている。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、細胞表面からの細胞内侵入が可能になると考えられた。これまでの我々の実験から、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、上の仮説と矛盾しない結果を得ている。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。また、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、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、パストレラ菌 (pp) について、その感染が 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 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。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。しかしながら、SARS-CoV の感染上昇にも拘らず、マウスは重症肺炎に陥ることはなかった。そこで、マウスに馴化させたウイルス Fr-mo を用いて、同様の感染を行なった。Fr-mo 株は親株である Fr-1 株と比べ、S 蛋白にアミノ酸の点変異を持っていた (H641W)。また、このウイルスは Fr-1 株と比べ、マウス肺中で 10—50 倍増殖が高いが、その単独感染では感染マウスの体重減少、重症肺炎は認められなかった。Pp 感染後 1 日に Fr-mo を約 10^6 PFU 経鼻感染させると、感染後 pp 単独感染と同様に体重減少が観察された。Pp 単

独感染では、体重は感染後 3—4 日から次第に回復し、感染後 5—6 日では、非感染マウスと同様の体重に戻るが、pp 及び Fr-mo の混合感染では、感染 3—4 日から体重減少が著しくなり、30—80% のマウスが感染後 6—7 日以内に死亡した。これらのマウス肺中では、SARS-CoV の高い増殖を伴う、重症肺炎が観察され、病理組織学的には SARS 患者の重症肺炎と似た病像が得られた。肺での pp 感染は極めて低く、また、SARS-CoV は脳、肝臓、脾臓、腎臓、血中など肺以外の組織では殆ど認められず、肺が唯一の増殖組織であると思われた。これらの事実から、混合感染後のマウスの死亡は、重症化肺炎によるものと判定された。以上のように、弱病原性呼吸器細菌とマウスに馴化した SARS-CoV の混合感染で、ヒト SARS に類似性の高い、重症肺炎を誘導することが可能となった。

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変が認められる組織以外にも、肝臓、腎臓、小脳、脾臓など多くの組織で検出されている。これらの組織では、SARS-CoV の受容体 ACE2 が発現されており、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。我々が示したプロテアーゼ存在下で 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、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。しかしながら、マウスに重症肺炎を発症させるには至らなかった。SARS 重症化因子の一つにウイルスの進化が挙げられる。今回の研究では、マウスに馴化し増殖性の高いウイルスとの混合感染を試みた。マウス馴化ウイルスは、単独感染ではマウスに肺炎、体重減少等の臨床症状を示すことはなかったが、pp との混合感染では、ヒト SARS と類似性の高い重症肺炎を引き起こした。即ち、マウス馴化 SARS-CoV と弱病原性呼吸器細菌により、SARS の動物病態モデルを作出することが可能となった。

SARS 患者の数例からは、SARS-CoV 以外の呼吸器感染微生物が分離されている。Chlamydia, metapneumovirus, rhinovirus などが報告されていて、SARS-CoV が原因病原体として同定される以前には、これらの病原体も原因病原体として候補に上がったこともある。SARS は感染者全てが重症の肺炎に陥る訳ではなく、感染者の約 20% が重症肺炎になり、その半数が死亡すると報告されているが、20%の重症肺炎に陥るケースには、上記の呼吸器微生物などとの混合感染が原因となっていることも完全に否定できるわけではない。即ち、SARS の重症化の一つの原因として、他の病原体との混合感染があることを、本研究で示唆することができると考えられる。

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ツレラ菌とマウス馴化 SARS-CoV 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、感染マウスはヒト SARS と類似した重症肺炎を発症した。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。また、SARS の重症化機構の一つとして、病原性の低い呼吸器感染症との混合感染の可能性が示唆された。本研究により確立されたマウスの重症肺炎は、SARS に対するワクチン、抗ウイルス剤などの予防治療薬の開発に貢献出来ると考えられる。

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.* 581: 253-258.

Watanabe R, Suzuki K, and Taguchi E. (2006) Receptor independent infection of mouse hepatitis virus : analysis by spinoculation *Adv. Exp. Med. Biol.* 581: 331-334.

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.* 581: 327-330

Ishii K, Yokota Y, Takemori T, Hasegawa H, Mizutani T, Morikawa S, Taguchi F. Miyamura T. (2006) Highly attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 581: 593-596

Zamoto A, Taguchi F. Fukushi S, Morikawa S and Yamada YK. (2006) Identification of ferret ACE2 and its receptor function for SARS-coronavirus. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 581: 519-522.

- Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama S, Taguchi F, Kurane I and Morikawa S. (2006) Pseudotype vesicular stomatitis virus for functional analysis of SARS coronavirus spike protein Exp. Med. Biol., 581: 293-296.
- Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Kanaji Y, Kurane I, Taguchi F, Tashiro M, and Morikawa S. (2006) Evaluation of a novel vesicular stomatitis virus pseudotype-based assay for detection of neutralizing antibody responses to SARS-CoV. J Med Virol. 78: 1509-1512.
- Ishii K, Hasegawa H, Nagata N, Mizutani T, Morikawa S, Suzuki T, Taguchi F, Tashiro M, Takemori T, Miyamura T and Tsunetsugu-Yokota Y. (2006) Induction of protective immunity against severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection using highly attenuated recombinant vaccinia virus DIs. Virology 351: 368-380.
- Watanabe R, Matsuyama S and Taguchi F (2006) Receptor-independent infection of murine coronavirus: analysis by spinoculation. J. Virol. 80: 4901-4908
- 田口文広：コロナウイルスの細胞侵入機構：病原性発現との関連 ウイルス 第56巻 第2号 165-172 2006
- 田口文広：SARS コロナウイルスの特徴とワクチン開発 化学療法の領域 第22巻 第12号 33-38 2006
- 田口文広：重症急性呼吸器症候群(SARS) 分子呼吸器病 第11巻
- 田口文広：SARS コロナウイルス感染症 臨床とウイルス 第43巻 第5号 423-428 2006
2. 学会発表
- 田口文広、永田典代、岩田奈織子、網 康至：呼吸器系細菌とSARSウイルスとの混合感染によるマウスの重症化肺炎に関する研究 第54回日本ウイルス学会総会、名古屋 2006.11.19-21
- 氏家誠、西川裕輝、大高 章、山本直樹、山本典生、松岡雅雄、児玉栄一、藤井信孝、田口文広 SARSウイルススパイク(S)蛋白質のHeptad Repeat(HR)由来Peptideは細胞表面からのウイルス侵入を効果的に抑制する 第54回日本ウイルス学会総会、名古屋 2006.11.19-21
- 渡辺理恵、前島雅美、福士州悦、松山州徳、森川茂、田口文広：SARS コロナウイルス解裂性スパイク蛋白を持つ pseudotype ウイルスの細胞内侵入機構に関する研究 第54回日本ウイルス学会総会、名古屋 2006.11.19-21
- 中垣慶子、田口文広：マウス肝炎ウイルスのJHM変異株srr7のマウス大脳分離細胞での受容体非依存性感染拡大のメカニズムに関する研究
- 田口文広・川瀬みゆき：ヒトコロナウイルス 229E の細胞内侵入機構に関する研究 第54回日本ウイルス学会総会、名古屋 2006.11.19-21
- 渡辺理恵・田口文広：細胞表面へパラン硫酸のマウス肝炎ウイルス感染における役割について 第54回日本ウイルス学会総会、名古屋 2006.11.19-