

法は、遺伝子組み換えを要さないで遺伝子配列を決定できるため遺伝子組み換え申請が不要で、SARS の様な重篤な新興ウイルス感染症発生時の対応上極めて有用なウイルス同定法と考えられる。

#### E. 結論

ウイルスの遺伝子情報が無く特異的 primers を作製することができない状況でも、網羅的に、迅速にウイルス遺伝子配列情報を得ることができる Rapid Determination of Viral RNA Sequence (RDV) 法を開発した。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Mizutani T, Fukushi S, Kenri T, Sasaki Y, Ishii K, Endoh D, Zamoto A, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. (2007) Enhancement of cytotoxicity against Vero E6 cells persistently infected with SARS-CoV by Mycoplasma fermentans. Arch Virol. in press
2. Mizutani T, Endoh D, Okamoto M, Shirato K, Shimizu H, Arita M, Fukushi S, Saijo M, Sakai K, Limn CK, Ito M, Nerome R, Takasaki T, Ishii K, Suzuki T, Kurane I, Morikawa S, and Nishimura H. (2007) Rapid genome sequencing of RNA viruses. Emerg. Infect. Dis., 13(2): 322-4.
3. 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, Peiris JS, Chen PJ, Yamamoto N, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M. (2007) Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using SCID-PBL/hu mouse models. Vaccine. in press

4. Yu F, Le MQ, Inoue S, Hasebe F, Parquet MD, Morikawa S, Morita K. (2007) Development of immunoglobulin m capture enzyme-linked immunosorbent assay system for severe acute respiratory syndrom coronavirus by using recombinant truncated nucleocapsid proteion as antigen. Clin Vaccine Immunol. 2007 Jan 3; [Epub ahead of print]
5. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Fukushi S, Yokoyama M, Harashima A, Sato Y, Saijo M, Morikawa S, Sata T. (2006) Participation of both host and virus factors in induction of severe acute respiratory syndrome in F344 rats infected with SARS coronavirus. J Virol., 81(4):1848-57
6. Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Kurane I, Taguchi F, Tashiro M, Morikawa S. Evaluation of a novel vesicular stomatitis virus pseudotype-based assay for detection of neutralizing antibody responses to SARS-CoV. J Med Virol. 2006, 78 (12):1509-12.
7. Ishii K, Hasegawa H, Nagata N, Mizutani T, Morikawa S, Tashiro M, Suzuki T, Taguchi F, Takemori T, Miyamura T, Tsunetsugu-Yokota Y. Highly attenuated

- vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine. *Adv Exp Med Biol.* 2006; 581: 593-6.
8. 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 JS, DeMello DE, Chen PJ, Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M. Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS coronavirus using mouse and SCID-PBL/hu mouse models. *Adv Exp Med Biol.* 2006;581:561-6.
  9. Zamoto A, Taguchi F, Fukushi S, Morikawa S, Yamada YK. Identification of ferret ACE2 and its receptor function for SARS-coronavirus. *Adv Exp Med Biol.* 2006;581:519-22.
  10. 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. *Adv Exp Med Biol.* 2006; 581:515-8.
  11. Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama S, Taguchi F, Kurane I, Morikawa S. Pseudotyped vesicular stomatitis virus for functional analysis of SARS coronavirus spike protein. *Adv Exp Med Biol.* 2006;581:293-6.
  12. Matsuyama S, Ujike M, Ishii K, Fukushi S, Morikawa S, Tashiro M, Taguchi F. Enhancement of SARS-CoV infection by proteases. *Adv Exp Med Biol.* 2006; 581: 253-8.
  13. Mizutani T, Fukushi S, Ishii K, Sasaki Y, Kenri T, Saijo M, Kanaji Y, Shirota K, Kurane I, Morikawa S. Mechanisms of establishment of persistent SARS-CoV-infected cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;347(1):261-5.
  14. Ishii K, Hasegawa H, Nagata N, Mizutani T, Morikawa S, Suzuki T, Taguchi F, Tashiro M, Takemori T, Miyamura T, Tsunetsugu-Yokota Y. Induction of protective immunity against severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection using highly attenuated recombinant vaccinia virus DIs. *Virology.* 2006;351(2):368-80.
  15. Mizutani T, Fukushi S, Iizuka D, Inanami O, Kuwabara M, Takashima H, Yanagawa H, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Inhibition of cell proliferation by SARS-CoV infection in Vero E6 cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006; 46 (2) :236-43.
  16. Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Regulation of p90RSK phosphorylation by SARS-CoV infection in Vero E6 cells. *FEBS Lett.* 2006; 580 (5) :1417-24.
2. 学会発表

1. Watanabe R, Maejima M, Fukushi S, Matsuyama S, Morikawa S, and Taguchi F. Cleavage of spike protein defines the entry pathway of severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV). Keystone Symposia, Respiratory viruses of animals causing diseases in humans, 2006年12月、Singapore
2. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Harashima A, Sato Y, Fukushi S, Saijo M, Morikawa S, and Sata T. Animal models of severe acute respiratory syndrome using rodent-passaged SARS-CoV. Keystone Symposia, Respiratory viruses of animals causing diseases in humans, 2006年12月、Singapore
3. Fukushi S, Mizutani T, Sakai K, Saijo M, Kurane I, and Morikawa S. Amino acid substitutions on S2 region responsible in enhancement of SARS-CoV infection to rat ACE2-expressing cells. Keystone Symposia, Respiratory viruses of animals causing diseases in humans, 2006年12月、Singapore
4. Mizutani,T., Fukushi,S., Kenri,T., Sasaki, Y., Endo,D., Zamoto,A., Saijo,M., Kurane, I., Morikawa, S. Molecular mechanism of cytotoxicity against Vero E6 cells persistently infected with SARS-CoV by *Mycoplasma fermentans*. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006年6月 Kyoto, Japan
5. 渡邊理恵、前島雅美、福士秀悦、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帰国に関する研究. 第54回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋, 2006年11月
6. 福士秀悦、水谷哲也、酒井宏治、西條政幸、緒方もも子、倉根一郎、森川茂. ラット ACE2 発現細胞で継代した SARS-CoV の S 遺伝子変異. 第54回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋, 2006年11月
7. 水谷哲也、福士秀悦、石井孝司、西條政幸、緒方もも子、酒井宏治、遠藤大二、座本綾、倉根一郎、森川茂. SARS-CoV と *Mycoplasma fermentans* の共感染が細胞に及ぼす影響. 第54回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋, 2006年11月
8. 永田典代、岩田奈織子、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、ラット馴化 SARS-CoV を用いた SARS 発症動物モデルの作製. 第54回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋, 2006年11月
9. 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学術集会, 名古屋, 2006年11月
10. 座元綾、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学術集会, 名古屋, 2006年11月
11. 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 回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋, 2006 年 11 月

12. 池尻昌宏, 西條政幸, 森川茂, 福士秀悦, 水谷哲也, 倉根一郎. 6-クロロプリンを塩基とした核酸誘導体の SARS-CoV 抑制作用. 第 16 回抗ウイルス科学療法研究会, 福島市, 2006 年 5 月

#### H. 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

図1. Rapid determination of viral RNA sequence (RDV法)の原理

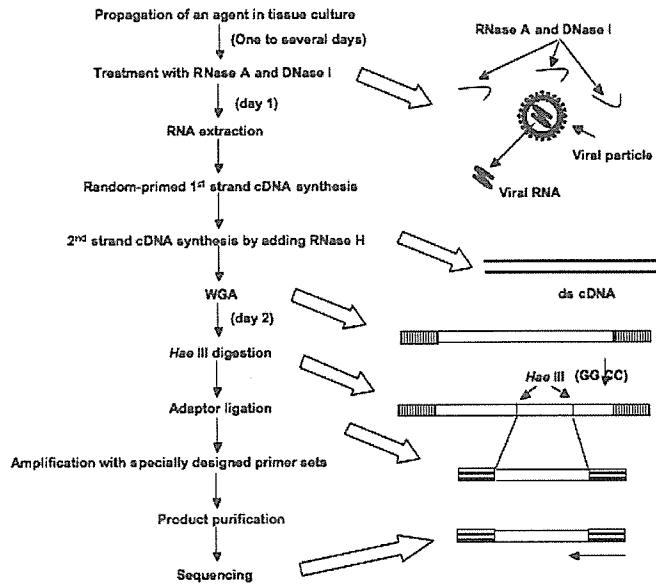
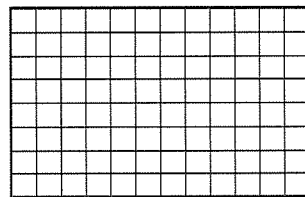


図2. RDV法によるウイルス遺伝子増幅

Amplification with specially designed primer sets

HP-1	5'-AATTGGGGGGGGGGGGGATGCCC	AG GG-3'
HP-2	AATTGGGGGGGGGGGGGATGCCC	AG GC
HP-3	AATTGGGGGGGGGGGGGATGCCC	AG GA
HP-4	AATTGGGGGGGGGGGGGATGCCC	AG GT
HP-5	AATTGGGGGGGGGGGGGATGCCC	AG GG
HP-6	AATTGGGGGGGGGGGGGATGCCC	AG GC
HP-7	AATTGGGGGGGGGGGGGATGCCC	AG CA
HP-8	AATTGGGGGGGGGGGGGATGCCC	AG CT
HP-9	AATTGGGGGGGGGGGGGATGCCC	AG GA
HP-10	AATTGGGGGGGGGGGGGATGCCC	AG AC
HP-11	AATTGGGGGGGGGGGGGATGCCC	AG AA
HP-12	AATTGGGGGGGGGGGGGATGCCC	AG AT



96 well PCR plate

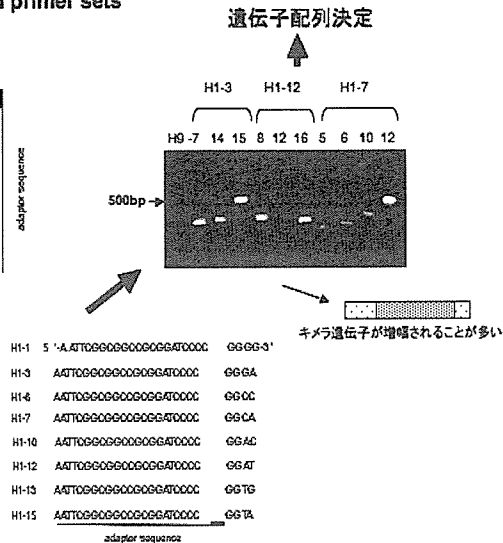
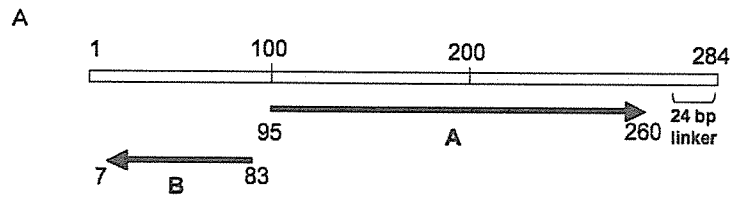
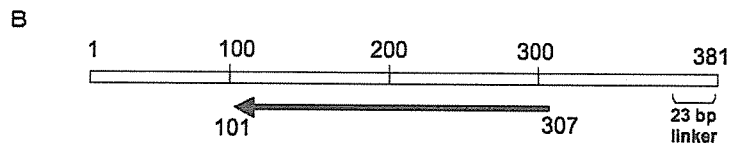


図3. MHVの解析例



A: M55148|M55148.1 Murine coronavirus open reading frame 1a (gene 1), complete cds and open reading frame 1b (gene 1), 3' end. subject 660-825 [100%]

B: same with A subject 1914-1836 [97%]



X00990|X00990.1 Mouse Hepatitis Virus JHM mRNA7 for nucleocapsid protein. 199/208 [95%]

図4. RDV法によるMHVの解析

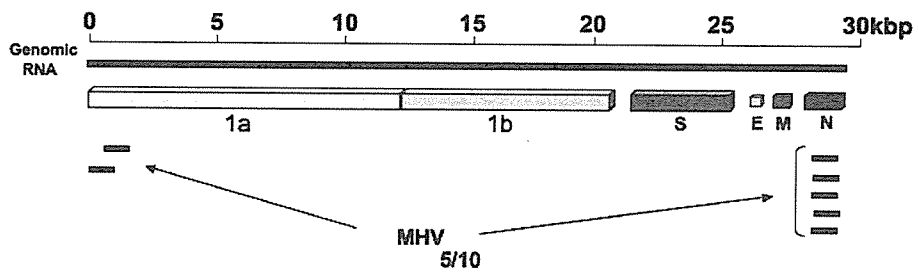
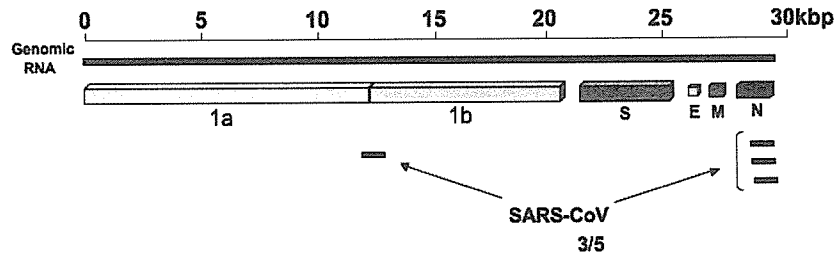


図5. RDV法によるSARSウイルスの解析



厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）

平成 18 年度分担研究報告書

「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」

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

-小動物を用いた感染モデルの開発-

分担研究者：永田典代（国立感染症研究所、感染病理部）

協力研究者：岩田奈織子、長谷川秀樹、佐藤由子、原嶋綾子、佐多徹太郎（同所、同部）

福士秀悦、西條政幸、森川 茂（同所、ウイルス第一部）

**研究要旨：**昨年度作製し報告した、ラットで継代し馴化した SARS-CoV を用いて 4 週齢と 8 ヶ月齢の動物に感染実験を行ったところ、8 ヶ月齢のラットで強い肺水腫を伴う SARS 様病変が観察された。このモデルにおけるウイルスの感染局在と抗体価について調べた結果、鼻腔粘膜上皮、気管と肺胞の上皮でのみウイルス抗原陽性細胞が検出され、リンパ節からウイルスが分離された。血清中からウイルスは分離されず、感染後 5 日以降から中和抗体価の上昇が観察された。ラット馴化 SARS-CoV 感染モデルを作製した。

#### A. 研究目的

重症急性呼吸器症候群コロナウイルス感染後の抗体応答、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するための動物モデルを作製することを目的とした。昨年度は、ラットで 10 代継代した SARS-CoV の病原性について解析したところ、その感染性と増殖性が増加したことを報告した。継代によって、このウイルスはラットに馴化したと考えられた。一方で、SARS 発症患者の疫学調査から、「高齢」がハイリスク因子の一つとして報告されている。そこで 7-8 ヶ月齢のラットに馴化株の感染実験を行ったところ、SARS 様の発症がみられた。本年度は、この動物モデルにおける病理とウ

イルス動態、免疫応答について解析した。

#### B. 研究方法

##### 継代と感染実験：

SARS 患者からの分離株である Frankfurt (Dr. Ziebuhr より分与)  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml をラット (F344, 4 週齢, 100 $\mu$ l 接種) に経鼻接種した。接種後 3 日目の肺洗浄液を用いて 10 回の継代接種を行い、得られたウイルスを VeroE6 細胞で一回継代した。このウイルス (F-ratX-VeroE6 株、 $10^{7.4}$  TCID<sub>50</sub>/ml) をラット (F344, 4 週齢および 8 ヶ月齢) 1 匹あたり 100 $\mu$ l の経鼻接種した。いずれも動物数は一群 6 匹 (病理用、ウイルス解析用を各 3 匹ずつ) として接種後 3, 5, 7 日目に解剖し材料を採取した。



### 病理学的解析：

過麻酔による安楽殺を行い心臓採血後解剖し組織を採取し常法どおり 10%ホルマリン緩衝液固定後にパラフィン切片組織を作製し病理学的解析を行った。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。

### ウイルス分離：

解剖時に得られた肺、鼻腔を含む上顎、頸部リンパ節、血清を用いて VeroE6 細胞によるウイルス分離を行った。

### 中和抗体価の測定：

心臓採血後の血液から血清を分離し、56°C30 分で非働化した。96 穴プレートに VeroE6 細胞を準備し、1:2<sup>1</sup> から 1:2<sup>8</sup> まで希釈した血清と 100 TCID<sub>50</sub> 量の Frankfurt 株を 1 時間 36°C 反応した。PBS 洗浄後、新しい培地を加え CO<sub>2</sub> インキュベータで 3 日間培養し SARS-CoV による CPE の発現を観察した。CPE 発現 100%阻止の血清希釈倍率を中和抗体価とした。

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

### 齢による病変の相違

4 週齢のラットに F-ratX-VerE6 株を経鼻接種

した場合、接種後 3 日目には気管支から肺胞管までの上皮細胞におけるウイルス増殖とそれに伴う単核系細胞浸潤(主にリンパ球)と軽い水腫がみとめられるのみである(図 A-C)。一方で、8 ヶ月齢のラットに同様に接種した場合は肉眼的に複数の肺葉に肝変化をとまなう非常に強い水腫と炎症が認められた (図 D-F)。細気管支での閉塞性細気管支炎(BOOP)とびまん性肺胞傷害(DAD)を伴っており、組織学的に SARS 類似の病変が形成された。接種後 5 日目、7 日目になると出血、肺胞内の硝子膜の形成、泡沫マクロファージの浸潤、上皮の再生像あるいは線維化がみられる。これらはヒトの DAD 像の経過と同様であった。ウイルス抗原は 7 日目には検出されない(データは示さない)。

### 8 ヶ月齢ラットにおけるウイルス動態と中和抗体価

免疫組織化学法によりウイルス抗原が検出された組織は、肺、鼻腔組織の上皮細胞と肺胞マクロファージのみであった。このほか心、腎、肝、脾、腸管、脳を検索したがいずれも病変、ウイルス抗原はみられなかった。肺、鼻腔を含む上顎と頸部リンパ節、血清からのウイルス分離を試みたところ、接種後 3, 5 日目の肺、鼻腔と 3 日目の頸部リンパ節で陽性であった(表)。このリンパ節は組織学的にリンパ洞の拡張と形態的にアポトーシスをおこしたリンパ球が存在した(データは示さない)。血清からウイルスは分離されなかった。血清中の中和抗体価は接種後 5 日から上昇が確認された(表)。

#### D. 考察

8 ヶ月齢ラットにラット馴化株を経鼻接種すると細気管支上皮と肺胞上皮でウイルスが増殖し、強い肺水腫を伴う炎症反応を引き起こし、SARS 類似の肺病変を呈することを示した。ウイルス増殖と病変が確認された部位は病理学的に上気道、下気道のみであり、消化管や神経で病変は観察されなかった。4 週齢と 8 ヶ月齢のラットにおける感染後の病変は水腫の程度が強く異なっているが、少なくとも接種後 3 日目のウイルス量に相違は認められなかった(データは示さない)。しかしながら、血清中のサイトカイン量を比較したところ、8 ヶ月齢ラットにおいて有意な上昇がみられ、サイトカインストームの様相を呈した(データは示さない)。ウイルス感染後の過剰なサイトカイン発現は血管透過性の亢進を引き起こし、病変の形成の要因となっていると考えられた。また、血清からウイルス分離はできず、リンパ節から分離が可能であった。この所見は昨年度までに解析したサルモデルでの結果と一致した。

#### E. 結論

ラットを用いた SARS-CoV 感染モデルを作製した。ラット馴化株を用いた本モデルは、SARS-CoV が感染後に引き起こす肺病変の BOOP と DAD の病理学的解析およびウイルス感染動態と宿主の免疫応答の詳細な検索を可能とした。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Fukushi S, Yokoyama M, Harashima A, Sato Y, Saijo M, Morikawa S and Sata T. Participation of both host and virus factors in induction of severe acute respiratory syndrome (SARS) in F344 rats infected with SARS coronavirus. 2007. J. Virol. 81:1848-1857.

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

##### 学会発表

1. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Harashima A, Sato Y, Fukushi S, Saijo M, Morikawa S, and Sata T. Animal models of severe acute respiratory syndrome using rodent-passaged SARS-CoV. Keystone Symposia 'Respiratory viruses of animals causing disease in humans' (2006.12. Singapore, Singapore)

2. 永田典代、岩田奈織子、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、ラット馴化 SARS-CoV を用い

た SARS 発症動物モデルの作製。第 54 回日本ウイルス学会総会（2006 年 11 月名古屋）。

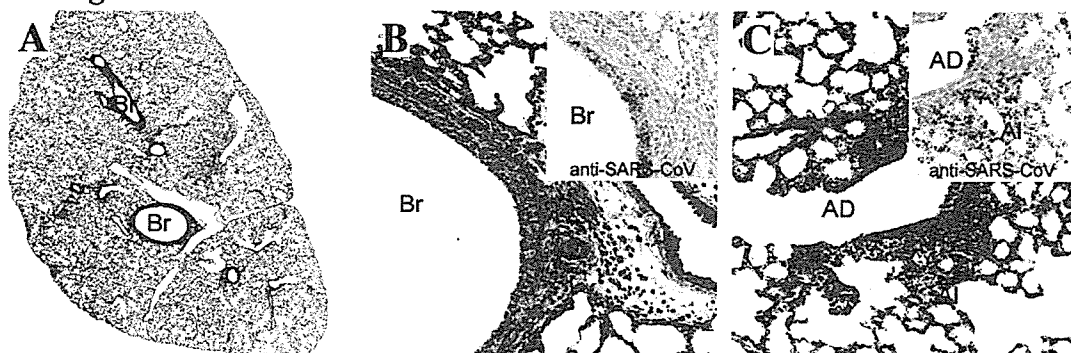
3. 永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、佐藤由子、佐多徹太郎。SARS コロナウイルス感染動物モデルにおける肺病変。第 95 回日本病理学会総会（2006 年 4 月新宿）

4. 永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、佐藤由子、佐多徹太郎。SARS 発症動物モデルにおける肺病変。第 95 回日本病理学会総会（2007 年 3 月大阪）

#### H. 知的財産権の出願、登録状況

なし。

Young rats



Adult rats

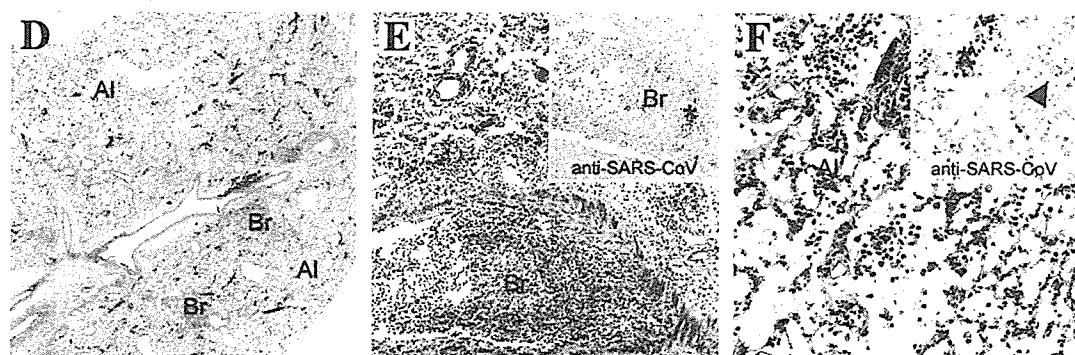


図 ラット馴化株経鼻接種後の4週齢 (A-C) および8ヶ月齢ラット (D-F) の肺組織病変。いずれも経鼻接種後3日目の像。Br: 細気管支、AD: 肺胞管、Al: 肺胞。\*ウイルス抗原陽性細胞。矢頭: 肺胞マクロファージ。

表 8ヶ月齢ラットにおけるウイルスと中和抗体価の上昇

経鼻接種後	ウイルス分離 (n=3)			血清中の中和抗体価 (n=3)	
	肺	鼻腔	頸部リンパ節		
3日目	3*	3	3	0*	1:<2 <sup>1</sup> , <2 <sup>1</sup> , <2 <sup>1**</sup>
5日目	3	3	0	3	1:2 <sup>2</sup> , 2 <sup>2</sup> , 2 <sup>4</sup>
7日目	0	0	0	3	1:2 <sup>6</sup> , 2 <sup>7</sup> , 2 <sup>7</sup>

\*陽性動物数。 \*\*Frankfurt 株に対する中和抗体価

厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）

平成 18 年度分担研究報告書

「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」

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）

**研究要旨：** マウス馴化 SARS-CoV の感染実験を行ったところ、ラットと同様に齢による病態の相違がみられた。また、半年齢マウスでは強い肺水腫とびまん性肺胞傷害を呈す SARS 類似の病態を示し、かつ、30-50%の致死率であった。高齢者における SARS 発症機序やウイルス動態、免疫応答を解明するための有用な動物モデルを確立した。

**A. 研究目的**

動物を用いた 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。

本年度はマウス馴化株を用いた SARS 発症モデルにおけるウイルスの動態を検索し、これまでわれわれが作製した動物モデルにおけるウイルスの動態と抗体応答について考察した。

**B. 研究方法**

**材料：**

BALB/c マウスにヒト分離株の Frankfurt 株（Dr. Ziebuhr より分与）を経鼻接種し、3 日後に解剖して得た肺洗浄液を用いて繰り返し 10 回の継代接種を行った。その後、VeroE6 細胞で一回継代し、得たウイルス液（F-musX-VeroE6 株、 $10^{8.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml）を 4 週齢と 6 ヶ月齢の BALB/c に 20 $\mu$ l 経鼻接種した。接種後 1-5 日目に経時的に材料を採取し、ウイルス学のおよび病理学的解析を行った。

**ウイルス分離：**

過麻酔による安楽殺を行い心臓採血後解剖し組織を採取し、臓器材料から 10%組織乳剤を作製した。その上清を用いて VeroE6 細胞を用いてウイルス分離を実施した。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。なお、一回の blind passage を行い、最終的なウイルス分離の有無を判定した。

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。

**病理学的解析：**

過麻酔による安楽殺を行い心臓採血後解剖し組織を採取し常法どおり 10%ホルマリン緩衝液固定後にパラフィン切片組織を作製し病理学的解析を行った。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。

## C. 研究結果

### 臨床症状と病理学的変化

ウイルス接種後、4週齢、半年齢ともに一過性に体重減少がみられたが、半年齢で体重減少率が高く、接種1日目から激しい呼吸器症状を呈し、3日目以降に30-50%が瀕死となった。組織学的に4週齢では肺胞に抗原陽性細胞がみられ、わずかな炎症性細胞浸潤を伴った。一方で、半年齢では重度な肺水腫と出血を伴う急性肺炎像を呈し、死亡例では肺全体に広がる重篤な肺水腫を伴うびまん性肺胞傷害を認めた(図1)。

### ウイルス分離

4週齢、半年齢ともに接種後1日目から肺、頸部リンパ節、脾、肝、腎でウイルスを分離した。4週齢では3日目以降、肺以外の臓器でウイルスは分離されなくなったが、半年齢動物では分離されるものもあった(表)。ウイルス量は接種4日目の肺と鼻腔を含む上顎組織において半年齢で有意に高かった(データは示さない)。

## D. 考察

マウス馴化SARS-CoV感染によって引き起こされる病態は、ラットのそれと同様に週齢によって異なった(Nagata et al., 2007)。さらに、半年齢マウスでは強い肺水腫を伴ったびまん性肺胞傷害を引き起こし致死であった(30-50%)。瀕死期の動物を解剖すると、強い肺水腫と肺胞傷害が全葉に広がっている。これらの動物は肺の一部でも呼吸可能な肺胞が残存していれば致死ではないようである。ラットモデルが致死でない原因はまだ明らかではないが、ラットは細気管支と肺胞野に病変がみられ、マウスは肺胞野が主体である。感染部位がやや異なることが重症度の差の原因かもしれない。あるいは接種液量の問題も考えられる。

本モデルではマウスで肺に到達する十分な液量(20 $\mu$ l)を経鼻接種している。

本研究班で実施した感染実験ではいずれの動物においても、肺の一部にSARS-CoV感染が広がった状態からの感染動態をみていることになる。図2にはこれまで我々が検討した動物モデル(カニクイザル、ラット、マウス)を総合して、肺胞内感染後のSARS-CoV感染動態と組織病変形成、中和抗体価の時間的経過と関連性について示した。なお、本モデルにおける臓器からのウイルス分離の結果は、SARS患者でこれまで報告された臓器とほぼ一致した。

## E. 結論

マウス馴化SARS-CoVを用いてSARS発症モデルを作製した。本モデル動物は、高齢者におけるSARS発症機序やウイルス動態、免疫応答を解明するための有用なモデルである。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Nagata N, Iwata N, [Hasegawa H](#), Fukushi S, Yokoyama M, Harashima A, Sato Y, Saijo M, Morikawa S and Sata T. Participation of both host and virus factors in induction of severe acute respiratory syndrome (SARS) in F344 rats infected with SARS coronavirus. 2007. J. Virol. 81:1848-1857.
2. Ishii K, [Hasegawa H](#), Nagata N, Mizutani T, Morikawa S, Suzuki T, Taguchi F, Tashiro M, Takemori T, Miyamura T, Tsunetsugu-Yokota Y. Induction of protective immunity against severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection using highly attenuated recombinant vaccinia virus DIs. Virology.

2006. 351:368-380.

3. Ichinohe T, Ito S, Kawaguchi A, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Moriyama M, Chiba J, Kurata T, Sata T, and Hasegawa H\* Protection against influenza virus infection by intranasal vaccine with Surfclam Powder as a mucosal adjuvant. **J Med Virol**, 2006 78:954-963.
4. Asahi-Ozaki Y., Itamura S., Ichinohe T., Strong P., Tamura S., Takahashi H., Sawa H., Moriyama M., Tashiro M., Sata T., Kurata T., Hasegawa H\*., Intranasal administration of adjuvant-combined recombinant influenza virus HA vaccine protects mice from the lethal H5N1 virus infection. **Microbes and Infection** 2006 Oct;8(12-13):2706-14. 2006 Aug 28; [Epub ahead of print]

#### 学会発表

1. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Harashima A, Sato Y, Fukushi S, Saijo M, Morikawa S, and Sata T. Animal models of severe acute respiratory syndrome using rodent-passaged SARS-CoV. Keystone Symposia 'Respiratory viruses of animals causing disease in humans' (2006.12. Singapore, Singapore)
2. 永田典代、岩田奈織子、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、ラット馴化 SARS-CoV を用いた SARS 発症動物モデルの作製。第 54 回日本ウイルス学会総会 (2006 年 11 月名古屋)。
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 コロナウイルス感染動物モデルにおける肺病変。第 95 回日本病理学会総会 (2006 年 4 月新宿)
4. 永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、佐藤由子、佐多徹太郎。SARS 発症動物モデルにおける肺病変。第 95 回日本病理学会総会 (2007 年 3 月大阪)
5. 一戸猛志、田村慎一、板村繁之、小田切

孝人、田代真人、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 アジュバント併用経鼻 H5N1 高病原性鳥インフルエンザワクチンの交叉防御効果の検討 第 10 回日本ワクチン学会学術集会 平成 18 年 10 月 21 日-22 日 大阪

6. 長谷川秀樹、一戸猛志、網康至、永田典代、川口晶、岩田奈織子、須崎百合子、田村慎一、二宮愛、今井正樹、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎 カニクイザルを用いた高病原性鳥インフルエンザ (H5N1) 経鼻ワクチンによる感染防御 第 54 回日本ウイルス学会学術集会 平成 18 年 11 月 19 日-21 日 名古屋

7. 一戸猛志、伊藤智史、田村慎一、二宮愛、今井正樹、小田切孝人、田代真人、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 自然免疫による高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) の感染抑制効果 第 54 回日本ウイルス学会学術集会 平成 18 年 11 月 19 日-21 日 名古屋

8. 一戸猛志、田村慎一、二宮愛、今井正樹、小田切孝人、田代真人、千葉丈、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交叉防御効果の検討 第 54 回日本ウイルス学会学術集会 平成 18 年 11 月 19 日-21 日 名古屋

9. Hasegawa H, Ichinohe T, Nagata N., Iwata N, Kawaguchi A., Ami Y, Suzaki Y., Tamura S., Ninomiya A., Imai M., Itamura S., Odagiri T., Tashiro M. Sata T., Kurata T., Intranasal immunization of H5N1 vaccine with TLR3 agonist, PolyI:PolyC<sub>12</sub>U protects cynomolgus monkey against HPIV challenge. Keystone Symposia 'Respiratory viruses of animals causing disease in humans' (2006.12. Singapore)

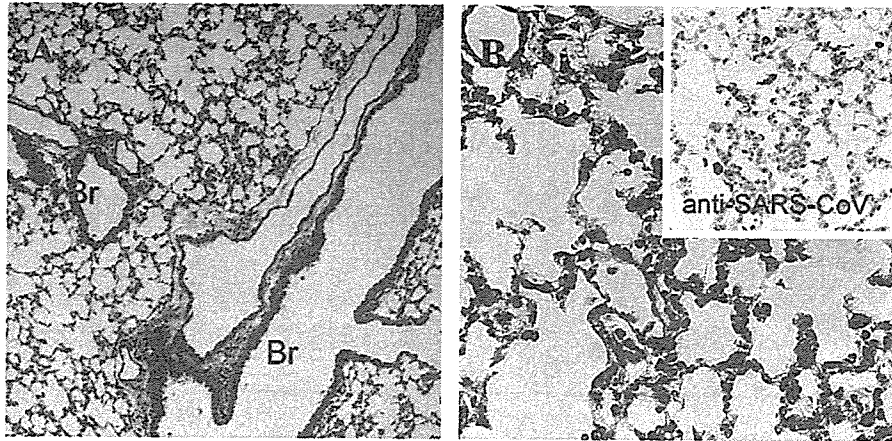
10. Ichinohe T., Tamura S., Ninomiya A. Imai M., Itamura S., Odagiri T., Tashiro M. Sata T.,

Kurata T., Hasegawa H. Intranasal immunization of H5N1 vaccine with TLR3 agonist, PolyI:PolyC<sub>12</sub>U protects mice against homologous and hetelorogous challenge. Keystone Symposia 'Respiratory viruses of animals causing disease in humans' (2006.12. Singapore)

H. 知的財産権の出願、登録状況  
なし。



### Young mice



### Adult mice

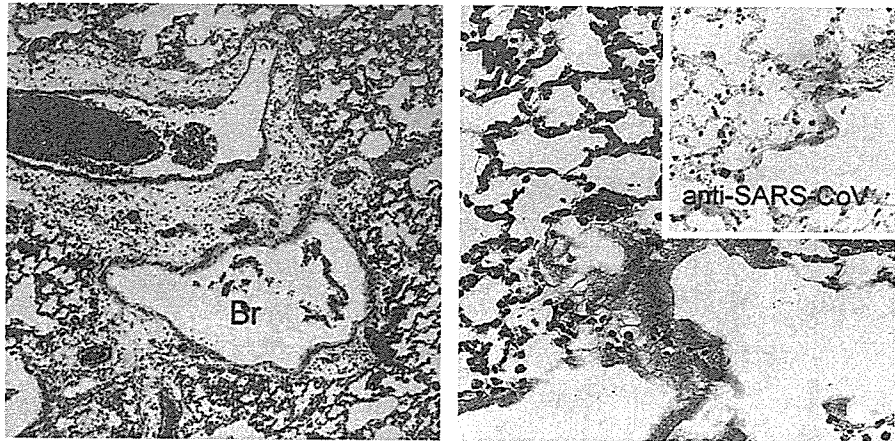


図1 マウス馴化株接種後の4週齢 (A,B) および半年齢動物 (C,D) における肺組織病変。  
半年齢動物においては血管周囲の強い水腫と硝子膜形成を伴ったびまん性肺胞傷害がみられる。

表 マウスにおけるウイルス増殖

	4週齢 (n=3)					6ヶ月齢 (n=3)				
	肺	頸部 リンパ節	脾	肝	腎	肺	頸部 リンパ節	脾	肝	腎
0d	0*	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1d	3	3	3	1	0	3	3	3	3	0
2d	3	3	2	2	0	3	3	2	2	1
3d	3	0	0	0	0	3	2	1	1	1
4d	3	0	0	0	0	3	2	0	0	0
5d	3	0	0	0	0	3	0	1	0	0

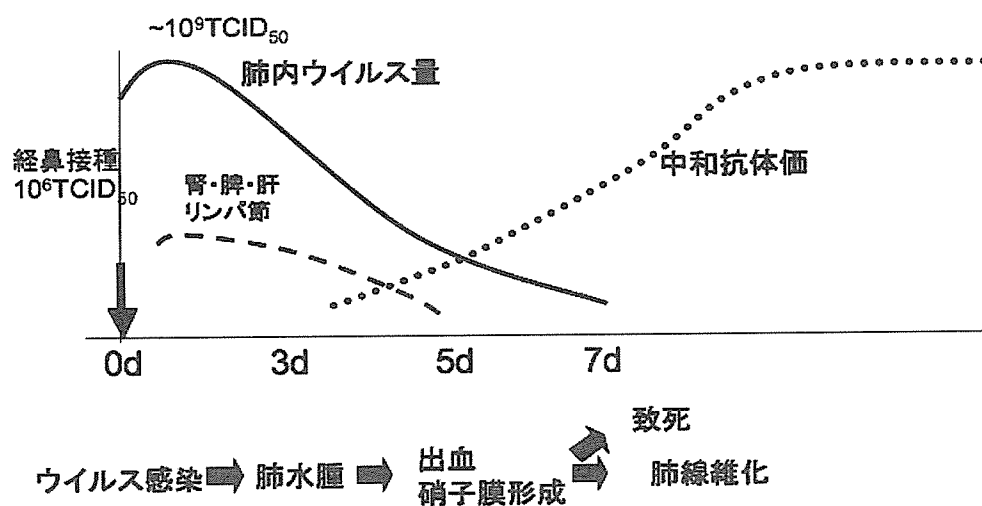


図2これまでの動物モデルの解析から想定したウイルス動態、  
抗体応答および組織病変の形成

厚生労働科学研究費補助金(新興再興感染症研究事業)  
分担研究報告書

ヒト ACE2 発現トランスジェニックマウスへの 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
	永田典代	国立感染症研究所	感染病理部	主任研究官
	長谷川秀樹	国立感染症研究所	感染病理部	室長

研究要旨：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 (hACE2) を発現するトランスジェニックマウスの作出を試み、hACE2 の発現が確認された 3 ラインのマウスへ SARS コロナウイルスの経鼻的感染を行った。いずれのラインでも 3 日目に神経症状を呈し、肺および脳で高力価のウイルス増殖を伴い 4 から 5 日目に斃死した。作出された Tg マウスは本ウイルスに高い感受性であることが明らかになり、今後さらに詳細な感染病態解析を行い SARS 感染モデルとしての有用性を評価する必要がある。

#### 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(Tg)マウスの作出を試みた。これまでに、遺伝子導入が認められ、かつ hACE2 タンパクの発現が確認できたトランスジェニックマウス 3 ラインが得られた。さらに、本トランスジェニックマウスの肺および腎の摘出組

織からの初代培養に SARS-CoV を感染させると明らかな感受性を示すことが明らかになっている。本研究では in vivo においても本トランスジェニックマウスが SARS-CoV 感染に感受性であるかを検証するためにウイルス感染実験を試みた。

#### B. 研究方法

hACE2 発現トランスジェニックマウスの作出：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ティング法により hACE2 発現が確認できた 3 ラインのマウスを繁殖して用いた。

トランスジェニックマウスへのウイルス感染：Tg マウスへの感染実験は VeroE6 細胞で調製した SARS-CoV (フランクフルト株) を用いた (国立感染症研究所ウイルス一部 森川茂博士より提供)。hACE2 発現 Tg マウスは 7.5 週令から 13 週令のオスまたはメスで各ライン 2 匹または 4 匹を用いた。また、対照として遺伝子導入が認められなかった同腹マウス(non-Tg マウス) 2 匹を用いた。マウスを麻酔後  $20 \mu\text{l}$  ( $2 \times 10^5$  PFU) のウイルス液を経鼻的に滴下接種した。ウイルス接種後、臨床的観察を行うとともに体重の変化を測定した。ウイルス接種後 3 日目には各ライン 1 または 2 匹を安楽殺し、鼻腔洗浄液を回収するとともに各種臓器を摘出し、ウイルス量の測定ならびに病理学的検索に供した。

ウイルス感染価の測定は、臓器 10% 乳剤または鼻腔洗浄液を 10 倍階段希釈して VeroE6 細胞に接種し 3 日目に CPE を観察して Reed-Muench 法にて感染価を算出した。

病理学的検索は 10% 中性緩衝ホルマリン液に固定後、定法に従って切片を作製し、HE 染色ならびに抗 SARS-CoV 抗体を用いた免疫組織染色を行いウイルス抗原の有無と分布を検索した。

(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

hACE2 発現が認められた Tg マウス 3 ライン (#5、#16、#17) ならびに non-Tg マウスに SARS-CoV を経鼻的に感染させた。いずれの Tg マウスにおいて 2 日目までは著変は認められなかったが、3 日目には体毛粗剛となり震戦が認められた。4 日から 5 日目にはいずれの Tg マウスも斃死した。対照の non-Tg マウスでは 7 日間著変は認められなかった。

ウイルス接種後の体重の変化を測定した結果を図 1 に示す。いずれの Tg マウスのラインにおいてもウイルス接種後 20% から 25% の体重減少が見られ斃死した。non-Tg マウスでは 7 日間ほとんど体重減少は認められなかった。

採材したウイルス接種後 3 日目の鼻腔洗浄液および各種臓器に含まれる感染性のウイルス量を測定した (図 2)。鼻腔洗浄液にはライン 17,18 において  $10^{4.5}$  から  $10^5$ /ml のウイルス増殖が認められた。また、脳および肺ではいずれのラインでも  $10^{7.5}$  から  $10^{8.5}$  TCID<sub>50</sub>/g の高いウイルス増殖が認められた。肺においては non-Tg でも  $10^{6.5}$  TCID<sub>50</sub>/g のウイルスが測定された。他の臓器で脾臓、小腸、大腸では少量のウイルス増殖が認められることもあったが腎臓では認められなかった。

Tg マウスの感染後 3 日目の病理学的検索をした結果、いずれのラインのマウスにおいても硝子膜形成を伴う慢性肺障害が認められ、感染は抹消に拡大しており、ウイルス抗原は肺胞上皮および血管内皮細胞に認められた。non-Tg マウスでは肺胞上皮にウイルス抗原は認められるものの傷害は軽微であった (図 3)。鼻腔においては粘膜上皮および嗅上皮細胞でウイルス抗原陽性となっていた。脳において炎症所見は見られないものの脳、脳幹脊髄を含む神経細胞にウイルス抗原が認められた (図 4)。少数個体での結果ではあるが hACE2 発現マウスは SARS-CoV 感染に高い感受性を示すことが明らかになった。

### D. 考察

SARS の実験用小動物モデルの開発は本感染症の感染発症メカニズムの解明、診断治療法や治療薬の開発、ワクチン開発のために必須である。しかしながら通常の実験用マウスへの感染では一過性の肺でのウイ