

厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）

防疫上緊急を要するウイルス性出血熱等に対する病原体診断法の確立
及び予防・治療法の開発に関する研究

分担研究課題：リフトバレーウイルスの診断法と抗ウイルス薬の検討

分担研究者：富士秀悦 国立感染症研究所ウイルス第一部

研究要旨：本研究では、リフトバレー熱の病原ウイルスであるリフトバレー熱ウイルス(RVFPV)の構造蛋白質およびシュードタイプウイルスを用いた血清診断システムの開発と、抗ウイルス薬の検討を行う。平成19年度は、1) RVFPV のコア蛋白質(NP)およびエンベロップ蛋白質をコードする遺伝子をクローニングした。2) 組み替えバキュロウイルスを用いて RVFPV-NP を発現するシステムを構築した。3) これを抗原として RVFPV コア蛋白質に特異的に反応する単クローン抗体を作製した。また、4) エンベロップ蛋白質である Gn および Gc 蛋白質の哺乳動物細胞発現系を作製した。この細胞に組み換え水泡性口内炎ウイルス (VSV シュードタイプ) の種ウイルス(VSV-ΔG*-G)を接種し、RVFPV-Gn および Gc 蛋白質を被ったシュードタイプウイルス(VSV-RVFPV-Gn/Gc)を作製した。この VSV-RVFPV-Gn/Gc を用いることにより、RVFPV そのものを用いることのない、迅速、安全なウイルス中和抗体の測定法を開発することが可能となる。

A. 研究目的

リフトバレー熱は古くからアフリカに常在する、蚊により媒介されるウイルス感染症である。実験室内では、数多くの種の蚊がウイルスを媒介することが報告されており、いったんウイルスが侵入すると世界中どこでも流行する可能性が高い。2000年8月にはサウジアラビア、イエメンでリフトバレー熱が報告され、アフリカ大陸以外で初めて大流行を引き起こした。また、2006年から2007年にかけてタンザニア、ケニア、ソマリア、スーダンでそれぞれ数百人規模の患者が発生し高い致死率(20-40%)を示している。臨床症状や一般臨床検査所見からは、RVFPV 感染の確定診断はできないため、確定診断には実験室診断が必要となる。しかし現在のところ、我が国におけるリフトバレー

熱の実験室診断法は未整備である。病原ウイルスであるリフトバレー熱ウイルス(RVFPV)はブニヤウイルス科、フレボウイルス属に属するネガティブ鎖 RNA ウイルスである。米国では Select Agent に指定されている。日本では、家畜伝染病予防法により法定伝染病に指定され、ウイルスの取扱いが規制されている。本研究では、RVFPV 構造蛋白質を用いた血清中抗 RVFPV IgG および IgM 抗体の検出、RVFPV 抗原検出 ELISA およびシュードタイプウイルスを用いた血清中の中和抗体検出法の開発と、抗ウイルス薬の検討を行う。平成19年度は、RVFPV 抗原検出 ELISA を構築するためのRVFPVに対する単クローン抗体を作製し、これらの反応性を検討した。また、リバーシジェネティクス法を用いた擬似RVFPV粒子を作製し、ウイルス

そのものを用いることのない、ウイルス中和試験による血清診断法の検討を行った。

B. 研究方法

RVFVヌクレオキャプシド蛋白質に対する単クローン抗体の作製 (図1にフローチャートを示す)

1) RVFV(MPI12株)のヌクレオキャプシド蛋白質(NP)をコードする遺伝子をバキュロウイルス発現用トランスファーベクターpAcYM1にクローニングし、組換えバキュロウイルス作製用プラスミドpAcRVFV-NPを作製した。

2) 昆虫細胞Tn5にpAcRVFV-NPとバキュロウイルスAcNPV由来ゲノムをトランスフェクトし、RVFV-NPを発現する組換えバキュロウイルスAcRVFV-NPを得た。

3) AcRVFV-NPを感染させたTn5から組換えRVFV-NP蛋白質を精製した。この組換えRVFV-NP蛋白質を抗原としてマウスに免疫し、単クローン抗体を得た。

RVFVヌクレオキャプシド蛋白質に対する単クローン抗体の反応性の検討

1) 得られた単クローン抗体の反応性を調べるため、RVFV-NPの全長およびNPの欠失体をコードするcDNAを大腸菌発現ベクターにクローニングした。

2) 大腸菌で発現させたRVFV-NP全長および様々な欠失体に対する、単クローン抗体の反応性をウエスタンブロットで検討した。

RVFVエンベロープ蛋白質(Gn および Gc)を被ったVSVシュードタイプの作製

1) RVFV(MPI12株)のエンベロープ蛋白質(GnおよびGc)をコードするMセグメントを哺乳動物細胞発現用ベクターpKS336にクローニングし、RVFV-GnおよびGcを発現するプラスミド

pKS-RVFV-Mを作製した。

2) pKS-RVFV-Mを293T細胞にトランスフェクトしRVFV-GnおよびGcを一過性に発現する細胞を作製した。

3) この細胞にVSVシュードタイプの種ウイルスであるVSVΔG*-Gを接種した。24時間後培養上清を回収し、RVFV-GnおよびGcを被ったVSVシュードタイプ(VSV-RVFV-Gn/Gc)を得た。

4) 段階希釈したVSV-RVFV-Gn/GcをVero E6細胞に接種し限界希釈法により、VSV-RVFV-Gn/Gcの感染価を算出した。

C. 結果

RVFV-NPに対する単クローン抗体の作製

RVFV-NPを特異的に検出するELISAを構築するため、まず、バキュロウイルス発現系で組換えRVFV-NP蛋白質を作製し、これを抗原としてマウスに免疫して、単クローン抗体を5種類(F2-36, G2-36, D5-59, G6-21 および C10-54)得た。RVFV-NPに対する、これらの抗体の反応性およびエピトープ領域について検討するために、RVFV-NP全長および5種類の欠失体を大腸菌で発現させた(図2)。これらの蛋白質に対する、単クローン抗体の反応性をウエスタンブロットで調べた(図3)。単クローン抗体F2-36、G2-36 および D5-59はNPのC末端側領域のアミノ酸残基191-245を認識した。一方、単クローン抗体G6-21 および C10-54はNP全長にのみ反応したことから、これらの抗体はNP全長を含む高次構造を認識する可能性が考えられた(図2 および 3)。

RVFVGnおよびGcを被ったVSVシュードタイプの作製 (図4)

RVFVのGnおよびGcを一過性に発現させた293T細胞にVSVΔG*-Gを接種し、24時間後、培養上清中に含まれるシュードタ

イプ VSV-RV-FV-Gn/Gc を回収した。VSV シュードタイプの感染の有無は緑色蛍光蛋白質(GFP)の発光の有無で判別できる。段階希釈した VSV-RV-FV-Gn/Gc を RV-FV の増殖可能な培養細胞である Vero E6 に接種し GFP 陽性細胞の有無により VSV-RV-FV-Gn/Gc の感染価を算出したところ、 2×10^3 infectious unit (IU)/ml であった。一方、ネガティブコントロールとして pKS336 ベクターをトランスフェクションした 293 細胞に VSV Δ G*-G を接種した細胞の培養上清に含まれるシュードタイプウイルスの感染価は 2×10^2 IU/ml 以下であった。VSV シュードタイプを作製する際、VSV-G を被ったシュードタイプがキャリアオーバーにより含まれる可能性がある。VSV-RV-FV-Gn/Gc の Vero E6 への感染が、VSV-G のキャリアオーバーによる感染である可能性を否定するために、VSV-G に対する中和抗体 P2F3 を VSV-RV-FV-Gn/Gc と混合し 1 時間インキュベート後、混合液を Vero E6 細胞に接種した (図 5)。ネガティブコントロールとして用いたシュードタイプの感染は VSV-G に対する抗体によって完全に感染が阻害されたのに対し、VSV-RV-FV-Gn/Gc の感染はほとんど阻害されなかった。この結果から VSV-RV-FV-Gn/Gc の感染は VSV-G のキャリアオーバーによるものではなく、RV-FV-Gn および Gc に依存することが示唆された。

D. 考察

本研究で作製した RV-FV-NP に対する単クローン抗体のうち、F2-36、G2-36 および D5-59 は NP の C 末端側領域のアミノ酸残基 191-245 を認識した。N 末端のみを認識する単クローン抗体は現在のところ得られていないことから、NP の C 末端領域は強い抗原性を示すと考えられた。単クローン

抗体 G6-21 および C10-54 は NP 全長にのみ反応したことから、これらの抗体は NP 全長を含む高次構造を認識する可能性が考えられた。今後、合成ペプチドなどを用いてそれぞれの単クローン抗体のエピトープを詳細に検討する必要がある。さらに、これらの抗体を用いた抗原検出 ELISA の開発を進めていく予定である。

VSV シュードタイプによる中和試験はウイルスそのものを用いないため、安全性に優れている。また、VSV シュードタイプの感染は、感染後 7 時間で測定可能であることがすでに確認されている。従って、VSV シュードタイプを用いた中和試験法は、迅速な血清診断法として有用である。これまで報告のある SARS コロナウイルスやハンタウイルスなどの VSV シュードタイプの感染価 (1×10^5 IU/ml 以上) と比較し、本研究で作製した VSV-RV-FV-Gn/Gc 感染は 2×10^3 IU/ml と、低い感染価であった。中和抗体測定法として実用化するためさらに高い感染価の VSV-RV-FV-Gn/Gc の作製と、VSV-RV-FV-Gn/Gc の感染の特異性を検討する予定である。

E. 結論

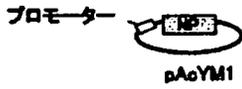
- (1) 本研究で RV-FV-NP に対する単クローン抗体を得た。これらの抗体が反応する NP の領域を同定できた。
- (2) これらの単クローン抗体を用いて RV-FV 抗原検出 ELISA を構築する予定である。
- (3) 本研究で RV-FV の Gn および Gc を被った VSV シュードタイプを作製することができた。ウイルスそのものを用いない、安全な中和抗体法の開発が可能となった。

F. 論文発表

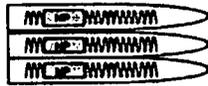
Fukushi S, Mizutani T, Sakai K, Saijo M, Taguchi F, Yokoyama M, Kurane I, Morikawa S. Amino acid substitutions in the s2 region enhance severe acute respiratory syndrome coronavirus infectivity in rat angiotensin-converting enzyme 2-expressing cells. J Virol.2007; 81, 10831-10834.

G. 知的財産権の出願・登録状況
現在出願予定はない。

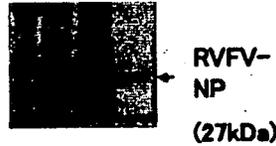
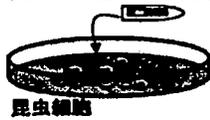
1. NP遺伝子をトランスファーベクターへクローニング



2. NPを発現する組換えバキュロウイルス作製



3. 昆虫細胞での発現



4. マウスへ免疫

5. 単クローン抗体

F2-36、G2-36、D5-59、
G8-21、C10-54

6. 大腸菌で発現させたNPを用いてエピトープマッピング

図1) RVFV NPに対する単クローン抗体の作製

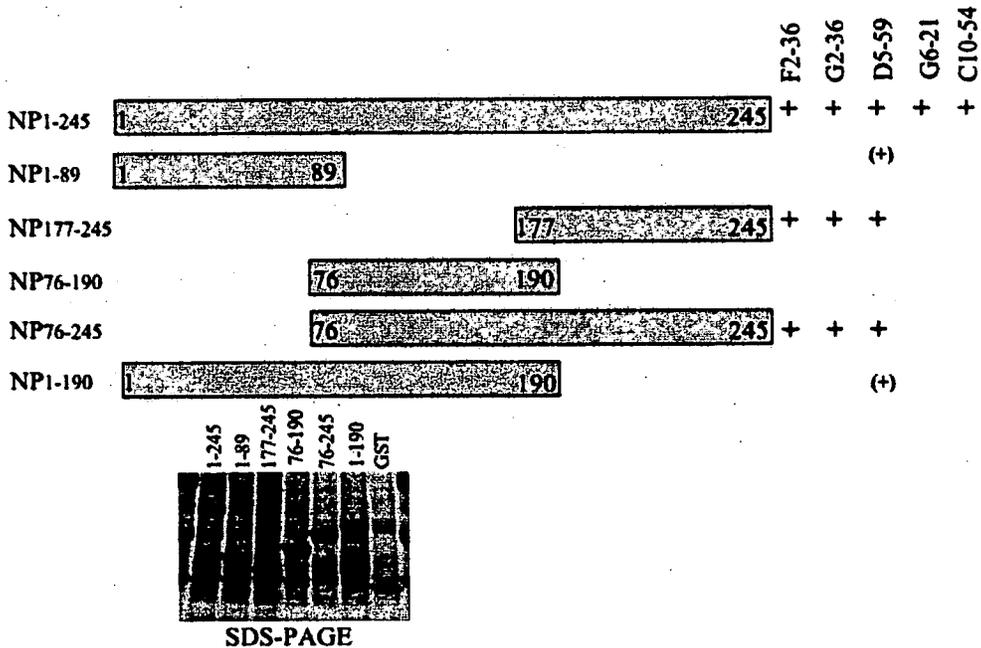


図2) 大腸菌による組換えNPの全長(NP₁₋₂₄₅)および欠失体の発現。単クローン抗体の反応性を右側に示す。

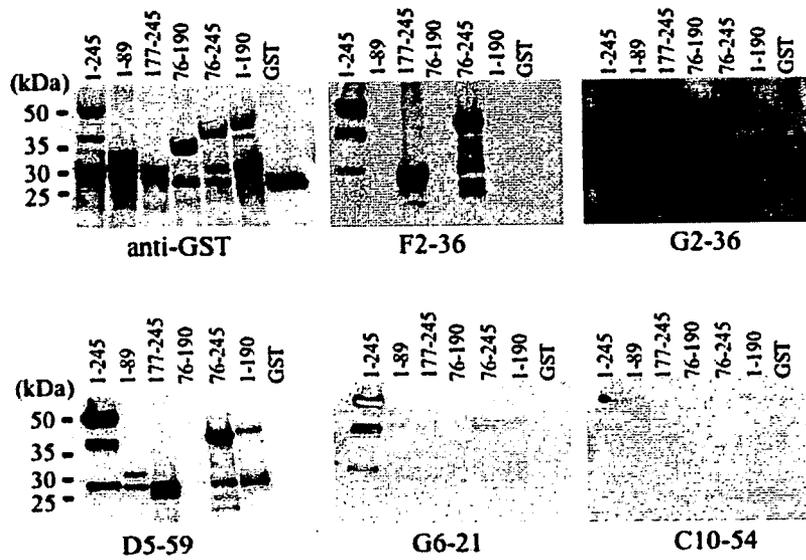


図3) 組換えNPの全長(NP₁₋₂₄₅)および欠失体に対する単クローン抗体の反応性

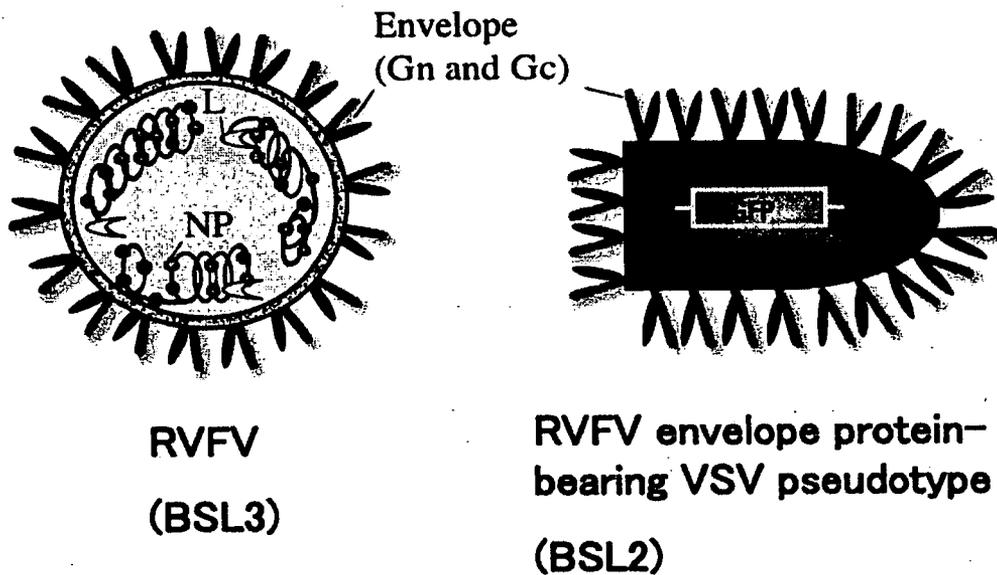


図4) RVFVおよびRVFVのGn,Gcを被ったVSVシュードタイプ

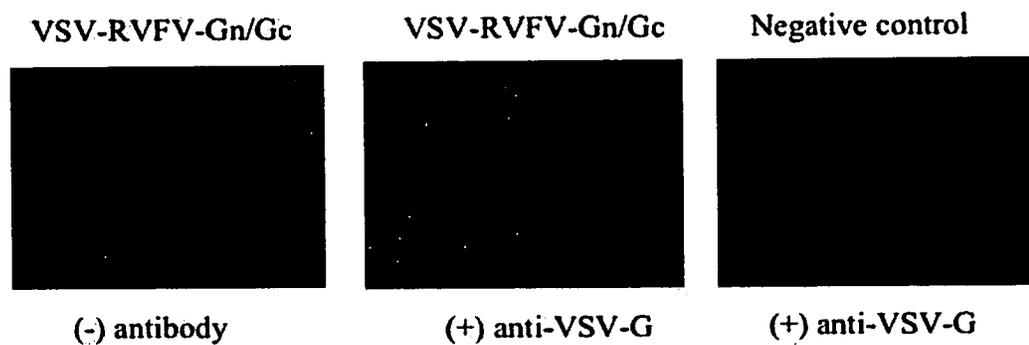


図5) RVFVのGn,Gcを被ったVSVシュードタイプをVero E6に感染させ、GFPの発光を検出した。

防疫上緊急を要するウイルス性出血熱等に対する病原体診断法の確立
及び予防・治療法の開発に関する研究

分担研究課題：敗血症を伴った劇症型サル痘に関する解析：
症状，ウイルス学的検査所見，病理

分担研究者：西條政幸（国立感染症研究所ウイルス第一部第三室・室長）

協力研究者：森川茂、網康至¹、永田典代²、長谷川秀樹²、倉根一郎

（同 ウイルス第一部、¹実験動物管理室、²感染病理部）

研究要旨：霊長類がサル痘ウイルスに感染すると、ヒトにおける天然痘類似感染症（サル痘）を発症する。サル痘ウイルスは病原性の比較的高いコンゴ盆地型と低い西アフリカ型に分類され、コンゴ盆地型と西アフリカ型はカニクイザルではそれぞれ重症（時に致死）サル痘と比較的軽症サル痘を発症する。しかし、3頭の西アフリカ型サル痘ウイルス感染カニクイザルの中で、1個体が感染10日目に死亡した。その個体では、典型的なサル痘症状は認められず、極めて高いウイルス血症を呈していることが認められた。サル痘ウイルス感染カニクイザルでは通常みられない、中枢神経感染症の存在も確認された。病理学的解析により、中枢神経組織、リンパ系臓器、消化器臓器、呼吸器臓器、内分泌組織、循環器臓器、泌尿生殖器系臓器など、調べられた臓器全てにウイルス抗原が存在した。また、本個体ではグラム陽性球菌の菌塊が肝臓や肺臓などの臓器に認められたことから、敗血症を伴っていたことも明らかにされた。西アフリカ型サル痘ウイルス感染カニクイザルの中でも、劇症型サル痘を発症する場合があり、その病態は全身臓器・組織にサル痘ウイルス感染が成立するという極めて特異的であった。この成績は、ヒトにおいてもサル痘ウイルス感染症により劇症型ヒトサル痘を発症する可能性があることを示している。特に敗血症を合併する場合に、劇症型ヒトサル痘を発症するリスクが高まると考えられる。

A. 研究目的

サル痘は、霊長類における天然痘様疾患として1958年に初めて報告された。サル痘の病原体であるサル痘ウイルスは、天然痘の病原体である痘瘡ウイルスと同様に、ポックスウイルス科オルソポックスウイルス

属に分類される2本鎖DNAウイルスである。

ヒトのサル痘ウイルス感染症（ヒトサル痘）は、1970年にコンゴ民主共和国（旧ザイール）において天然痘様疾患としてはじめて報告された。中央および西アフリカにおいてヒトサル痘が流行している。サル痘ウイル

スはコンゴ盆地型と西アフリカ型に分類され、前者の病原性は後者のそれよりも高く、コンゴ盆地型サル痘ウイルスによるヒトサル痘では致死的な場合がある。一方、西アフリカ型では死亡例は報告されていない。しかし、カニクイザル (*Macaca fuscicularis*) が西アフリカ型である Liberia 株に感染し、劇症かつ致死性のサル痘を発症した。本研究では、この個体の症状の観察、ウイルス学的解析、病理学的解析を通して、劇症型サル痘の病態を明らかにした。

B. 研究方法

- 1) ウイルス. 国立感染症研究所に保存されているサル痘ウイルス Liberia 株 (西アフリカ型) を用いた。
- 2) 劇症型サル痘発症カニクイザル個体. 3 頭のカニクイザルに 10^6 plaque forming unit (pfu) のサル痘ウイルス Liberia 株を、皮下接種経路で感染させた。Liberia 株感染 3 個体では、2 頭 (通常型個体) が比較的軽症のサル痘を発症し、残る 1 頭 (劇症型個体, ID 番号: #4567) が感染 10 日目に急激に衰弱し、安楽殺された。
- 3) 臨床症状の観察およびウイルス学的解析. サル痘ウイルス皮下接種後、食餌摂取量、体重、体温、糞便性状等、臨床症状を観察した。また、2 から 4 日毎に全身麻酔下で約 5ml の末梢血液を採取し、末梢血液検査、生化学的検査、ウイルスゲノム血症レベル、末梢血液からのウイルス分離、病理学的検査を施行した。ウイルス

ゲノム血症レベルは、サル痘ウイルス ATI-遺伝子の特異配列を利用した定量的 LightCycler-PCR (qLC-PCR) 法によった。

- 4) 抗体検出. ワクチニアウイルスを抗原とした IgG-ELISA により、感染個体における IgG 抗体反応の推移を解析した。
- 5) 病理学的解析. 安楽殺された全ての個体から、皮膚、呼吸器、循環器、消化器、泌尿生殖器、リンパ系臓器、中枢神経臓器を採取し、病理学的解析のためにホルマリン固定した。それらの臓器は、HE 染色および抗ワクチニアウイルス抗体を用いて、サル痘ウイルス抗原検出目的に免疫組織化学染色が施された。
- 6) 感染実験. カニクイザルを用いたサル痘ウイルスの感染実験は、国立感染症研究所の高度安全研究施設内で行われた。この感染実験は、国立感染症研究所実験動物委員会の承認のもとに行われた。

(倫理面からの配慮について)

動物愛護の立場に配慮し、国立感染症研究所実験動物委員会の承認を得た上で実験を実施した。

C. 研究結果

- 1) 臨床症状. Liberia 株感染 3 個体では、第 6 病日から食欲が低下し、第 7 病日には活動性が低下した。劇症型サル痘発症個体では第 9 病日までに約 5% の体重が低下した。劇症型個体の皮膚には、水疱や膿疱の伴わない紅斑性病変が出現し、残る 2 個体では水疱性紅斑性病変が認めら

れた (図 1) .

- 2) ウイルス血症レベル. 劇症型個体では, 第 3 病日にはウイルス血症が認められ, その後ウイルス血症レベルが高まり続け, 第 9 病日には約 10^9 コピー/ml にまで達した (図 2) . それに比べ, 残る通常型 2 個体では第 7 病日に最高値 (約 10^6 コピー/ml) に達し, 徐々に低下した.
- 3) 抗体反応. 劇症型個体は第 10 病日に安楽殺されたが, 第 10 病日には IgG 抗体の上昇は確認されなかった. 一方, 通常型 2 個体では, 第 10 病日には IgG 抗体の上昇が確認された (図 2) .
- 4) 病理学的所見. 劇症型個体では, サル痘ウイルス抗原が調べられた臓器 [中枢神経組織, リンパ系臓器, 消化器臓器 (食道, 胃, 小腸, 大腸, 肝臓, 膵臓), 呼吸器臓器 (肺臓), 内分泌組織 (副腎), 循環器臓器 (心臓), 泌尿生殖器系臓器 (腎臓, 膀胱, 子宮)] 全てにおいて認められた. また, 肺臓, 肝臓, 心臓, 腎臓などの主要な臓器に, 球菌からなる菌塊が存在することが確認された. その菌塊はグラム染色により陽性を呈したことから, グラム陽性球菌であることが確認された. 一方, 通常型個体では, 調べられた臓器の中で, リンパ系臓器, 皮膚以外の臓器にはウイルス抗原が認められず, また, 劇症型個体に認められた菌塊も確認されなかった. 劇症型個体の各臓器にはウイルス抗原が存在することが明らかにされたが, 炎症性細胞の浸潤は全く認められなかった.

D. 考察

サル痘ウイルスは, 比較的病原性の高いコンゴ盆地型と低い西アフリカ型に分類される. カニクイザルは, コンゴ盆地型サル痘ウイルス (Zr599 株) 10^6 pfu に皮下接種経路で感染すると, 重症で致死的なサル痘を発症し, Liberia 株では比較的軽いサル痘を発症する. しかし, 感染ウイルスが西アフリカ型サル痘ウイルスであっても, 劇症型サル痘を発症することが明らかにされた. 劇症型個体においては, 病理学的解析によりグラム陽性球菌菌塊が主要な臓器に存在することが明らかにされた. Liberia 株感染自体が劇症型サル痘を発症させた可能性も否定できないが, 敗血症を合併したことが劇症型サル痘を発症させたことの原因であると考えられる. ウイルス血症レベルは極めて高く, また, 全身臓器にウイルス抗原が確認された. 特に中枢神経臓器, 心筋細胞や肝細胞, そして, 尿細管細胞, 等にサル痘ウイルス抗原が認められたことは, 極めて特異的で興味深い所見である.

天然痘には, 致死率の高い全身感染症 (出血型や扁平型) の病型が知られている. これらの病型では細菌感染症の合併している場合が多い. つまり本症例における解析結果は, 天然痘における扁平型や出血型の病態を反映する可能性を示している. 本症例が, 劇症型天然痘の病態を反映するか否かを判断するには, さらなる検討を要する.

劇症型サル痘ウイルス感染症において中枢神経感染症を伴うことがあることが明ら

かにされた。ウイルス血症レベルは高く、感染個体の多くの臓器においてサル痘ウイルスが増殖していた。抗体反応も認められなかった。菌血症・敗血症の合併が、劇症型サル痘を発症するリスクであると推測される。劇症型サル痘の病態は、劇症型天然痘（出血型や扁平型）の病態を反映する可能性がある。

E. 結論

カニクイザルにおける敗血症を伴った劇症型サル痘の臨床的に、また、ウイルス学的かつ病理学的に解析した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

1. Shirato, K., Nishimura, H., Saijo, M., Okamoto, M., Noda, M., Tashiro, M., Taguchi, F.: Diagnosis of human respiratory syncytial virus infections using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *J. Virol. Methods* 139:78-84, 2007
2. Ike, F., Bourqade, B., Sato, H., Saijo, M., Kurane, I., Morikawa, S., Yamada, Y., Jaubert, J., Berard, M., Nakata, H., Hiraiwa, N., Mekada, K., Takakura, A., Itoh, T., Obata, Y., Yoshiki, A., Montagutelli, X.: LCMV infection in a wild-derived mouse inbred strain undetected by dirty bedding sentinel health monitoring and revealed after embryo transfer. *Comp. Med.* 53:272-281, 2007
3. Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Fukushi, S., Yokoyama, M., Harashima, A., Sato, Y., Saijo, M., Morikawa, S., Sata, T.: Participation of both host and virus factors in induction of severe acute respiratory syndrome in F344 rats infected with SARS coronavirus. *J. Virol.* 81:1848-1857, 2007
4. Sakai, K., Mizutani, T., Fukushi, S., Saijo, M., Endoh, D., Kurane, I., Takehara, K., Morikawa, S.: An improved procedure for rapid determination of viral RNA sequences of avian RNA viruses. *Arch. Virol.* 152:1763-1765, 2007
5. Morikawa, S., Saijo, M., Kurane, I.: Current knowledge on lower virulence of Reston Ebola virus (in French: Connaissances actuelles sur la moindre virulence du virus Ebola Resoton). *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis* 30:391-398, 2007
6. Saijo, M., Georges-Courbot, M.C., Marianneau, P., Romanowski, V., Fukushi, S., Mizutani, T., Georges, A.J., Kurata, K., Kurane, I., Morikawa, S.: Recombinant nucleoprotein-based diagnostic systems for Lassa fever: development of diagnostic assays, which do not require infectious virus for antibody and antigen detection. *Clin. Vac. Immunol.* 14:1182-1189, 2007
7. Fukushi, S., Mizutani, T., Sakai, K., Saijo, M., Taguchi, F., Yokoyama, M., Kurane, I.,

- Morikawa, S.: Amino acid substitutions in S2 region enhance SARS-CoV infectivity in rat ACE2-expressing cells. *J. Virol.* 81: 10831-10834, 2007
8. Morikawa, S., Saijo, M., Kurane, I.: Recent progress in molecular biology of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 30:375-389, 2007
9. Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Sato, Y., Morikawa, S., Saijo, M., Itamura, S., Saito, T., Ami, Y., Odagiri, T., Tashiro, M., Sata, T.: Pathology and virus dispersion in cynomolgus monkeys experimentally infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus via different inoculation routes. *International J. Exp. Pathol.* 88:403-414, 2007
- 2.学会発表
- 1) Saijo, M: Cytokine responses in monkeys infected with monkeypox virus: xSAMPLES Japan seminar. Yokohama (2007. 5)
- 2) Saijo M: Highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, lacking B5R membrane protein expression, protects monkeys from monkeypox: The 1st US-Japan Biodefence Meeting, Washington (2007. 6)
- 3) 西條政幸：国立感染症研究所における新興ウイルス感染症対策と感染動物実験：第4回北海道実験動物研究会，札幌(2007, 7)
- 4) Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Hasegawa, H., Iwata, N., Ogata, M., Fukushi, S., Mizutani, T., Kurane, I., Kurata, T., Morikawa, S.: Therapeutic vaccination with a highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, for protection of nonhuman primates from monkeypox: 41st annual meeting of the US-Japan Cooperative Medical Science, Baltimore (2007. 7)
- 5) 西條政幸、網康至、須崎百合子、永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、緒方もも子、福士秀悦、水谷哲也、佐多徹太郎、倉田毅、倉根一郎、森川茂：高病原性コンゴ盆地型サル痘ウイルス（MPXV）と低病原性西アフリカ型MPXVの鑑別可能な定量的PCR法によるMPXV感染症の診断：第55回日本ウイルス学会・学術集会，札幌（2007.10）
- 6) 佐藤朝光、江下優樹、酒井宏治、見明史雄、牛島廣治、高崎智彦、小滝徹、遠藤大二、福士秀悦、西條政幸、緒方もも子、倉根一郎、森川茂、水谷哲也：タイで採集されたネッタシマカからのRDV法によるRNAウイルスの検出：第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌（2007.10）
- 7) 水谷哲也、西村秀一、酒井宏治、前田健、清水博之、遠藤大二、福士秀悦、西條政幸、緒方もも子、倉根一郎、森川茂：新興ウイルス感染症の網羅的検出方法の確立と応用：第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌（2007.10）
- 8) 酒井宏治、水谷哲也、福士秀悦、西條政幸、緒方もも子、遠藤大二、倉根一郎、森川茂：網羅的ウイルスゲノム検出方法

を用いたリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス
(LCMV) の同定：第 55 回日本ウイルス
学会学術集会、札幌（2007.10）

- 9) 福士秀悦、前田健、平井明香、新倉綾、
山田靖子、横山勝、吉川泰弘、水谷哲也、
酒井宏治、西條政幸、倉根一郎、森川
茂：コウモリ由来 ACE2 を用いた SARS
コロナウイルスの感染性の解析：第 55
回日本ウイルス学会学術集会、札幌
（2007.10）
- 10) 西條政幸、網康至、永田典代、長谷川秀
樹、福士秀悦、水谷哲也、飯塚愛恵、佐
多徹太郎、倉田毅、倉根一郎、森川茂：
高度弱毒化天然痘ワクチン LC16m8 の暴
露後使用時の天然痘予防効果：霊長類に
おけるサル痘モデルによる検討：第 11
回日本ワクチン学会学術集会、横浜
（2007.12）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

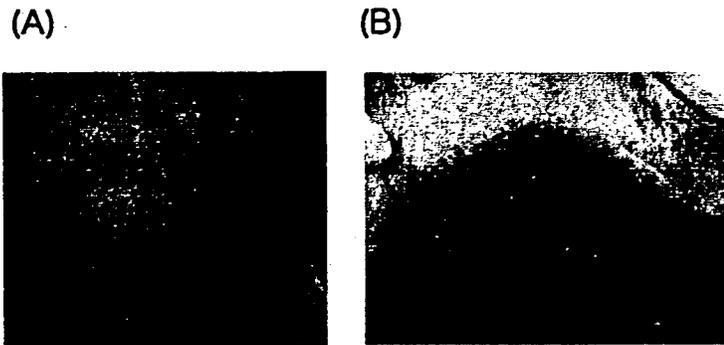


図 1. 劇症型個体の皮膚病変（第 9 病日, A）と通常型個体の皮膚病変（第 10 病日, B）.

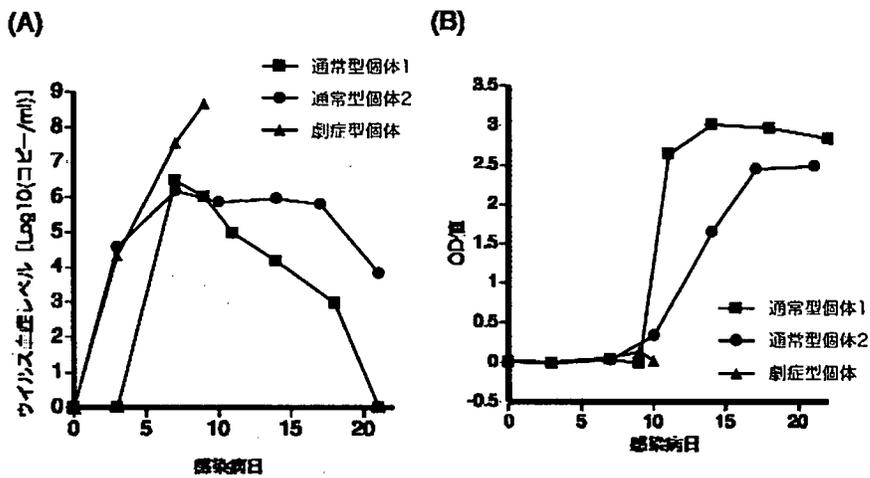


図 2. 劇症型および通常型個体における末梢血液中ウイルスゲノム血症レベル (A) と IgG-ELISA による IgG 抗体反応 (B)

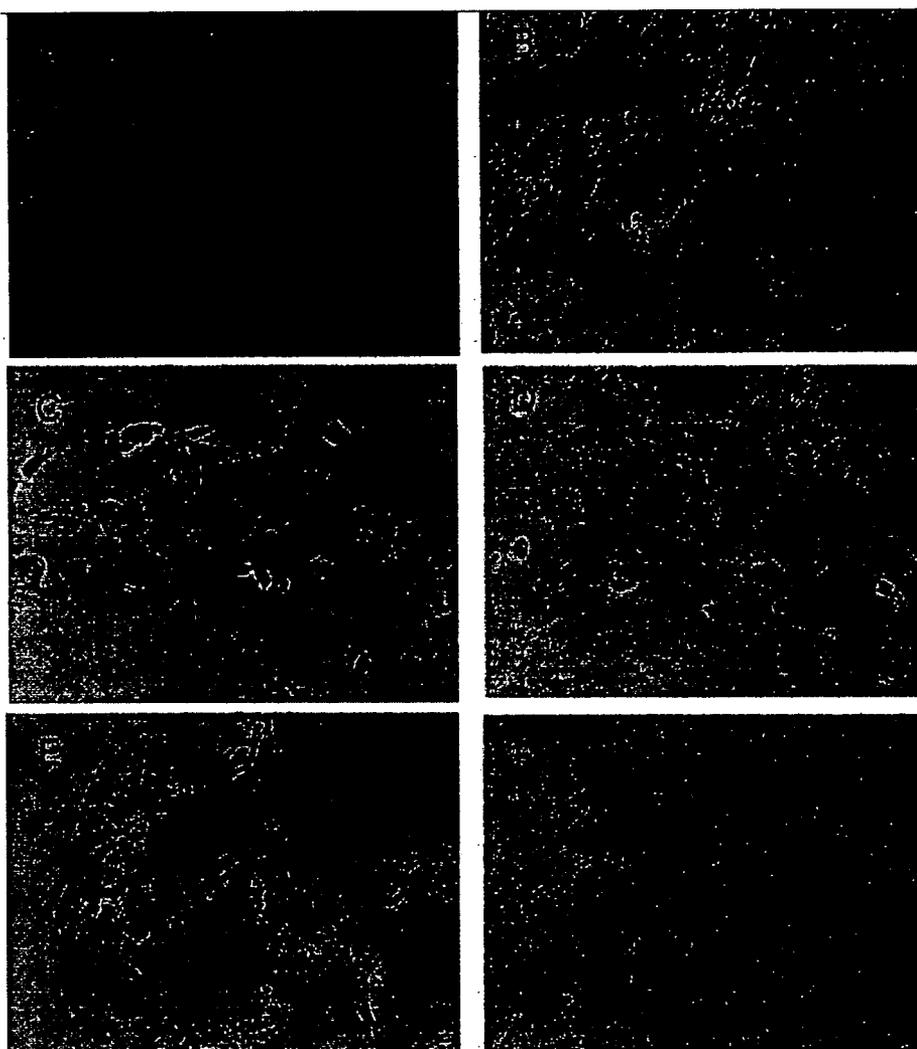


図 3. 劇症型個体から採取された臓器 (A: 肝臓; B: 心臓; C: 肺臓; D: 腎臓; E: 脈絡膜叢; F: 頸部脊髄) における免疫組織化学検出法によるサル痘ウイルス抗原の検出.

厚生労働科学研究費 新興・再興感染症研究事業

防疫上緊急を要するウイルス性出血熱等に対する病原体診断法の確立
及び予防・治療法の開発に関する研究

分担研究課題：重症急性呼吸器症候群の発症モデル動物系による発症機構と
ワクチン、治療法の開発

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（国立感染症研究所・動物管理室）

研究要旨：重症急性呼吸器症候群（SARS）は野生動物由来の新興感染症であり、原因病原体は新型コロナウイルス（SARS-CoV）である。SARS 病態は重症肺炎であり、致死率は約 10%と極めて高い。SARS-CoV はその受容体を発現している種々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により著しく亢進することを見だし、重症肺炎の引き金となる原因の一つとして、肺でのエラスターゼ産生に注目し、研究を進めている。これまでの研究では、弱毒細菌感染により肺でのエラスターゼ産生が誘導され、更に SARS-CoV 感染が増強され、重症化肺炎に至ることを明らかにしてきたが、本年度はエラスターゼ誘導物質として、大腸菌由来の LPS を用いて検討した。その結果、LPS 投与によりマウス肺でのエラスターゼ産生と SARS-CoV の増殖亢進、及び重症化肺炎が観察された。これらのことから、SARS 発症には肺でのエラスターゼなど、SARS-CoV 増殖を亢進させる機構が発症原因の一つである可能性が示唆された。

A. 研究目的

重症急性呼吸器症候群（SARS）は 2002 年晩秋から 2003 年春にかけて中国広東省から香港を経て、東南アジアを中心とする全世界へと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ているが、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な

点が多い。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 SARS-CoV 受容体 angiotensin converting enzyme 2 (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あり、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、その結果重症肺炎が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、弱毒細菌 *Pasteurella pneumotropica* 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、マウス馴化 SARS-CoV を用いた場合、Pp 感染後 SARS-CoV 感染が亢進され、重症肺炎を誘導することを報告した。本年度は、エラスターゼ誘導能が報告されている大腸菌由来の lipopolysaccharide (LPS) を用いて、Pp 同様に肺炎の重症化を誘導できるかについて検討した。

B. 研究方法

SARS-CoV は Ziebuhr 博士から分与された Frankfurt-1 株をマウス馴化した Fr-mo を用いた。分与された Fr-1 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。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。ウイルスの定量は既に報告した plaque assay により行った。Pp は MaM 株を用い、リン酸緩衝液 (PBS) に 10^6 - 10^7 cfu/20ml に溶解し、その 20ml を経鼻接種した。LPS (*E. Coli*055:B5, Sigma) は 1 mg/ml の濃度で PBS に溶解し、その 20ml を経鼻接種した。SARS-CoV も同様に 20ml を経鼻接種した。本実験には、静岡実験動物 (株)、日本チャールスリバー (株) から購入した 6 週齢雄 BALB/c を使用し、感染マウスは BSL 3 実験室陰圧アイソラック内で飼育した。

エラスターゼの定量は Yoshimura 等の報告に従った。

C. 研究成果

我々はこれまで、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、Pp を用いて、その感染がマウス肺中のエラスターゼ産生を促し、また同時に SARS-CoV の肺での増殖を増強すること、更に重症肺炎を引き起こすことを報告した。即ち、これまでのマウスを用いた動物実験から、肺中のエラスターゼ産生が重症化肺炎のトリガーになる可能性が考えられた。本年度は、エラスターゼが重症化への関与を検証する目的で、エラスターゼ誘導活性のある LPS を用いて検討した。

マウスに LPS を経鼻投与し、その後 1 日、2 日にマウス肺中のエラスターゼ活性を調べた。対照として、非投与マウスおよび Pp 投与マウスを用いた。非投与対照マウス肺からはエラスターゼ活性は検出されなかったが、LPS 投与マウス肺からは Pp 感染と同程度のエラスターゼ活性が認められ (図 1)、LPS はエラスターゼ誘導活性があることが明らかとなった。そこで、LPS 投与マウスに約 10^6 pfu のマウス馴化株 Fr-mo を接種し、感染マウスの体重、臨床症状について検討した。LPS 投与マウスは感染後 1 日-3 日に軽度の体重減少を示し、逆毛が見られたが、その後速やかに回復した。Fr-mo 単独感染では体重減少や臨床症状を示すことはなかった。しかしながら、LPS + Fr-mo 感染では体重減少が著しく、感染後 4-5 日で 30% 以上の減少が見られる個体も出現した。更に、感染後 5 日までに約半数のマウスが死亡した (図 2)。死亡及び瀕死マウスの剖検

及び病理組織学的検索の結果、重度の肺炎が認められた。これらの臨床症状、病理組織学的所見などから、LPS 投与は Pp 感染同様の重症化肺炎を引き起こすことが明らかとなった。

LPS 投与マウスの重症肺炎がウイルスの増殖亢進に因るものかを検討した。LPS 投与し Fr-mo を感染させたマウスでは、感染後 4 日で LPS 非投与マウスと比べ、肺におけるウイルス感染価は高く、Pp 感染マウスと同様であった (図 3)。これらのことから、LPS 投与は Pp 感染と同様、肺中でのエラスターゼを誘導し、SARS-CoV 増殖を亢進させ、マウスの重症肺炎を引き起こすものと考えられた。本研究でも、エラスターゼが SARS-CoV 病原性発現のトリガーとなる可能性が示唆された。

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。このことから、SARS-CoV の標的臓器を規定する受容体以外の因子の存在が予想される。

我々が示した培養細胞での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。その結果、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。

本年度の研究では、細菌又は細菌増殖が直接肺炎の重症化に関与しているのか、或いはエラスターゼ等の細菌感染に対する宿主側因子が重要なのかを検討するため、エラスターゼ誘導活性のある LPS を用いて解析を行った。本研究報告で示されたように、LPS でも Pp 感染同様のウイルス増殖亢進及び重症化肺炎の誘導が可能であり、LPS によって誘導される宿主因子がトリガーとなる可能性が示唆された。その最有力候補として、エラスターゼ等の SARS-CoV 増殖促進作用のあるプロテアーゼが考えられる。今後、エラスターゼ阻害剤等を用いて、その役割について検討したい。

E. 結論

マウスを用いた SARS-CoV 感染による重症化肺炎が呼吸器細菌 Pp との混合感染で誘導できることを報告したが、本研究では、細菌由来の LPS により同様の病態を誘導できることが示された。LPS は Pp と同様、マウス肺中のエラスターゼ産生を誘導し、SARS-CoV 感染を亢進させ、重症化肺炎を引き起こすことが示唆された。本研究は、肺中でのエラスターゼなどプロテアーゼが重症化肺炎誘導のために重要な役割を果たしているということ、これまでの研究に加え、更に強く示唆した。今後、エラスターゼ阻害剤などを用いて、

SARS 重症肺炎の病態機構について検討する必要がある。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Ami Y, Nagata N, Shirato K, Watanabe R, Iwata N, Nakagaki K, Fukushi S, Saijo M, Morikawa S and Taguchi F (2008) Co-infection of respiratory bacterium with SARS coronavirus induces an exacerbated pneumonia in mice. *Microbiol. Immunol.* In press
2. Ujike M, Nishikawa H, Otaka A, Yamamoto N, Yamamoto N, Matsuoka M, Kodama E, Fujii N and Taguchi F (2008) Heptad repeat-derived peptides block the protease-mediated direct entry from cell surface of SARS coronavirus but not entry via endosomal pathway. *J. Virol.* 82: 588-592
3. Watanabe R, Sawiki S, and Taguchi F (2007) Heparan sulfate is a binding molecule but not a receptor for CEACAM1-independent infection of murine coronavirus. *Virology* 366: 16-22.
4. Fukushi S, Mizutani T, Sakai K, Saijo M, Taguchi F, Yokoyama M, Kurane I and Morikawa M. (2007) Amino acid substitutions in S2 region enhances SARS-CoV infectivity in rat ACE2-expressing cells. *J. Virol.* 81: 10831-10834

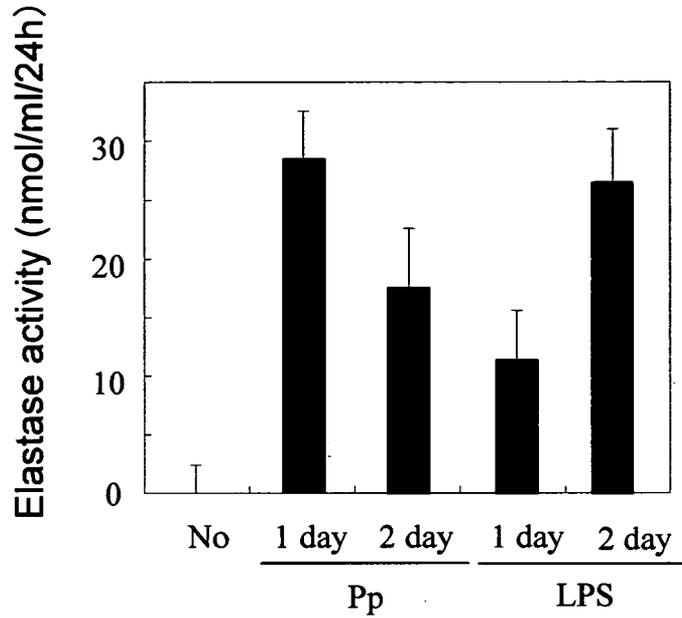
2. 学会発表

1. 中垣 慶子、野村 理沙、渡辺里仁、田口 文広：マウス肝炎ウイルス MHV-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 第11回神経ウイルス研究会、草津、2007.7.5-7

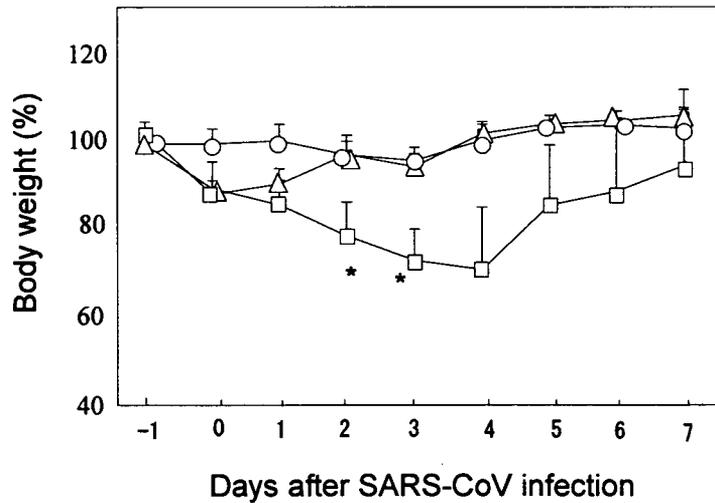
2. 野村理沙、渡辺里仁、田口文広：JHMV srr7 のマウス脳内における感染の広がり 第11回神経ウイルス研究会、草津、2007.7.5-7
3. 白戸憲也、川瀬みゆき、田口文広：ヒトコロナウイルス (HCoV)229E のスパイク(S)蛋白をもつ VSV シュードタイプウイルスの作製と HCoV の細胞侵入機構解析 第55回に本ウイルス学会総会、札幌 2007.10.21-23
4. 高月英恵、野村理沙、田口文広、渡辺里仁：srr7 のマウス脳内における感染の広がり 第55回に本ウイルス学会総会、札幌 2007.10.21-23
5. 野村理沙、渡辺里仁、田口文広：マウス脳内における srr7 の変異に寄る感染拡大 第55回に本ウイルス学会総会、札幌 2007.10.21-23
6. 石井孝司、横田恭子、長谷川秀樹、永田典代、森川茂、福士秀悦、水谷哲也、鈴木哲朗、田代真人、田口文広：高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DIIs の組み換え SARS ワクチンとしての検討 第55回に本ウイルス学会総会、札幌 2007.10.21-23

図 1



LPS 投与による肺でのエラスターゼ誘導：LPS 投与マウス (LPS) Pp 感染マウス (Pp) の処理 1 日後、2 日後に肺中のエラスターゼ活性を測定した。No は非処理マウス。

図 2



LPS 投与マウスの SARS-CoV 感染後の体重変化：LPS を経鼻投与し、1 日後に Fr-mo 株を経鼻感染させ、その後の体重変化を観察した。LPS 投与直前の全マウス体重の平均値を 100% として、その後のマウス体重を示した。LPS 単独投与マウス (Δ)、Fr-mo 単独感染マウス (○)、LPS 投与後 Fr-mo 感染マウス (□)。米印は LPS 投与マウスと比べ、有為な差 ($P < 0.001$) を示した群。