

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
総括研究報告書

「2012年に発生した新型ヒトコロナウイルス侵入に備えた診断、治療法確立のための
動物モデル開発と SARS-CoV との鑑別に関する研究」

研究代表者 岩田 奈織子 国立感染症研究所 主任研究官

研究要旨：2012年9月に中東で重症呼吸器疾患を起こす新興感染症患者の発生が報告された。2003年冬季に大流行した重症急性呼吸器症候群（SARS）の再興かと疑われたが、患者からは新しいヒトコロナウイルス（MERS-CoV）が分離された。現在、日本ではその発生は報告されていないが、今後感染拡大があることを想定した対応が必要で、そのため病原性の解明、診断、治療、予防、防疫対策が急務である。また類似の症状を示す SARS 等との鑑別診断も公衆衛生学上、重要である。そこで、本研究では MERS-CoV に対し病原性の解明、ワクチンなどの有効性試験やウイルス増殖部位の同定、免疫応答を詳細に検討するため感染動物モデルの確立を試みる。本年度はマウスおよびラットに対する感受性を検討するため、新生仔、5週齢、半年齢の週齢の異なる二系統の動物に MERS-CoV の接種実験を行った。マウスでは脳内接種を行った新生仔以外はどの週齢においても感受性が見られなかった。ラットは新生仔および5週齢では感受性が見られなかったが、半年齢では再感染させると中和抗体の産生が確認された。今回の結果から、頭蓋内接種を行った新生仔マウスからマウス馴化株が得られる可能性はあるが、成マウスは病原性を示さず、またラットは感受性が低いいため、MERS-CoV の動物モデルとしての使用には適さないと示唆された。今後、モデルとして適した動物をさらに研究する必要がある。

研究協力者：

国立感染症研究所
感染病理部 鈴木忠樹、永田典代
ウイルス第三部 松山州徳

A. 研究目的

中東呼吸器症候群コロナウイルス（MERS-CoV）は、2012年に中東で発生が確認された新しいコロナウイルスで、重症呼吸器症状と腎不全が主徴とされている。その症状から重症急性呼吸器症候群（SARS）との鑑別診断が必要で、現在まで（2014年2月5日現在）に181人の確定患者がおり、そのうち79名が死亡し、そ

の流行は未だ続いている。今後の流行に備えて診断、治療、防疫対策が急務である。そこで本研究では MERS-CoV に対し病原性の解明、ワクチンなどの有効性試験やウイルス増殖部位の同定、免疫応答を詳細に検討するため感染動物モデルの確立を試みる。さらに、これを利用して診断、治療および予防法の検討を行い、MERS-CoV の侵入に備える。本年度はマウスおよびラットに対する MERS-CoV の感受性を解析した。

B. 研究方法

実験 1 : BALB/c マウスの MERS-CoV に対す

る感受性の検討

5週齢および6ヶ月齢のBALB/cマウスに 10^4 TCID₅₀のMERS-CoVを麻酔下で経鼻接種した。接種後10日まで体重測定および臨床症状の観察を行った。接種後1, 3, 6, 10日に全採血により一群6匹ずつ安楽殺した。ウイルス価測定用に肺の生材料、肺洗浄液を3匹から採取し、残りの3匹は病理解析用とし、脳、脊髄、鼻甲介、肝、脾、腎、心、肺、胃腸管を採取した。接種後10日の血清は中和抗体価の測定に用いた。

実験2：新生仔 ddY マウスの MERS-CoV に対する感受性の検討

新生仔 ddY マウスを用いて3つの接種経路で感染実験を行った。出生24時間以内に頭蓋内あるいは腹腔内に 10^3 TCID₅₀のMERS-CoVを接種し、経鼻接種は出生3日後の新生仔に 10^3 TCID₅₀のMERS-CoVを麻酔下で行った。接種後14日まで体重測定および臨床症状の観察を行った。各接種群は接種後3, 7, 19-21日で解剖し、病理解析を行った。脳、脊髄、鼻甲介、肝、脾、腎、心、肺、胃腸管を病理解析用に採取した。また経鼻接種群では接種後3, 7日にウイルス価測定用に肺の生材料を採取した。接種後3, 7, 21日の頭蓋内接種群のパラフィン包埋脳組織からRNAを抽出し、リアルタイムPCR法でウイルスの定量を行った。全ての接種群は接種後21日の血清で中和抗体価測定を行った。

実験3：Fischer 344 ラットの MERS-CoV に対する感受性の検討

5週齢および6ヶ月齢Fischer 344 (F344) ラットに 10^5 TCID₅₀のMERS-CoVを麻酔下で経鼻接種した。接種後10日ま

で体重測定および臨床症状の観察を行った。接種後1, 3, 6, 10日に全採血により一群6匹ずつ安楽殺した。ウイルス価測定用に肺の生材料、肺洗浄液を3匹から採取し、残りの3匹は病理解析用に脳、脊髄、鼻甲介、肝、脾、腎、心、肺、胃腸管を採取した。接種後10日の血清は中和抗体価測定に用いた。中和抗体産生を調べる実験では、5週齢および6ヶ月齢のラットが接種後14日で、同量のMERS-CoVをさらに経鼻接種し、初回接種から26日で解剖後、血清の中和抗体価を調べた。

実験4：新生仔 Lewis ラットの MERS-CoV に対する感受性の検討

新生仔 Lewis ラットを用いて感染実験を行った。新生仔ラットは出生24時間以内に頭蓋内あるいは腹腔内に 10^3 TCID₅₀のMERS-CoVを接種した。また経鼻接種は出生3日後に 10^3 TCID₅₀のMERS-CoVを麻酔下で行った。接種後14日まで体重測定および臨床症状の観察を行った。各接種群は接種後3, 7, 19-20日で解剖し、病理解析用とした。脳、脊髄、鼻甲介、肝、脾、腎、心、肺、胃腸管を病理解析用に採取した。経鼻接種群は接種後3, 7日にウイルス価測定用に肺の生材料を採取した。全ての接種群は、接種後19-20日の血清を中和抗体価測定に用いた。

(倫理面への配慮)

動物実験は国立感染症研究所実験動物委員会の審査と承認を得て、動物愛護の精神に則り遂行した。またMERS-CoVを取り扱う実験は全て国立感染症研究所病原体等安全管理委員会規則に従って、使用、保管等を行った。

C. 結果

実験 1: BALB/c マウスの MERS-CoV に対する感受性の検討

5 週齢および 6 ヶ月齢の BALB/c マウスは MERS-CoV 接種後、体重に変化はなく、臨床症状に変化も見られなかった (図 1A)。そして接種後 1, 3, 6 日のマウスから採取した肺洗浄液および肺乳剤では、接種後 1 日の肺洗浄液から $10^{1.75}$ TCID₅₀/ml のウイルスが検出されたが、肺乳剤からはウイルスの検出は見られなかった (図 1B)。また病理学的に解析した結果、諸臓器に変化はなかった。そして、接種後 10 日の血清に中和抗体価は調べたすべてのマウスで検出されなかった。

実験 2: 新生仔 ddY マウスの MERS-CoV に対する感受性の検討

頭蓋内、腹腔内、経鼻接種した新生仔 ddY マウスは体重変化、臨床症状ともに見られず、観察期間中、変化は全く見られなかった (図 2A)。また、経鼻接種後 3 日のマウスから採取した肺でウイルス価を調べたが、ウイルスは検出されなかった。腹腔内、経鼻接種群では、諸臓器の病理学的解析で著変は見られなかったが、頭蓋内接種をした新生仔マウスで接種 21 日目の脳に炎症が見られた (6 匹中 3 匹, 図 2B)。そこで、接種後 3, 7, 21 日のパラフィン包埋脳組織から RNA を抽出後、リアルタイム PCR を行い、ウイルスの定量を試みた。その結果、接種後 3, 7 日の脳からウイルスは検出されなかったが、21 日目の脳で脳炎を示したマウスからのみ 10^3 copies/g of total RNA のウイルスが検出された。また、頭蓋内接種群の 2 匹から中和抗体価が検出された (図 2C)。このうち 1 匹は脳炎が確認されたが、もう 1 匹は確認されなかった。

実験 3: F344 ラットの MERS-CoV に対する感受性の検討

MERS-CoV を経鼻接種した 5 週齢および半年齢 F344 ラットは共に体重変化、臨床症状は見られなかった (図 3A)。接種後 1, 3, 6 日の肺洗浄液および肺乳剤からウイルスは検出されなかった (図 3B)。諸臓器の病理解析では半年齢ラットの肺で、軽度の炎症細胞の浸潤が見られたが、ウイルスとの関連性は分からなかった (図 3C)。肺以外の臓器では著変は見られなかった。接種後 10 日の 5 週齢のラットの血清から中和抗体は検出されなかったが、半年齢のラットで非常に低い中和抗体が確認されたため、その現象が半年齢に特異的か確認するため、5 週齢および 6 ヶ月齢のラットに MERS-CoV を 2 回接種し、中和抗体の産生を確認した。その結果、MERS-CoV を 2 回接種したラットで半年齢のみ 9 匹中 3 匹で中和抗体の産生が見られた (図 3D)。

実験 4: 新生仔 Lewis ラットの MERS-CoV に対する感受性の検討

頭蓋内、腹腔内、経鼻接種した新生仔 Lewis ラットは体重変化も臨床症状も見られなかった (図 4A)。経鼻接種した新生仔ラットの接種後 3 日の肺乳剤からウイルス検出を試みたが、全て陰性だった。また全ての接種群で、諸臓器に変化は見られなかった。さらに接種後 19-20 日の血清から全ての接種群の新生仔ラットで、中和抗体は検出されなかった。

D. 考察

MERS-CoV に対する動物モデルを確立するため、今回、週齢の異なる二系統のマウスおよびラットの MERS-CoV に対す

る感受性を調べた。その結果、マウスは MERS-CoV に対して、週齢差や系統差は影響を与えず、頭蓋内接種した新生仔以外には感受性を示さない事が明らかとなった。ウイルスを頭蓋内接種した新生仔マウスは、接種後 21 日に調べた個体の半数の脳内に炎症反応が見られた。そして、これらのマウスのパラフィン包埋脳組織から抽出した RNA で行ったリアルタイム PCR 法でウイルスが検出された。さらに、この接種群では、脳炎が見られなかった個体にも血清中和抗体価の上昇があった。脳炎を示した結果も含め、新生仔マウスの脳では MERS-CoV の増殖が可能であると推察された。生後間もない新生仔マウスの脳は免疫系が不完全なため、ウイルスに対する排除機構が他の接種経路よりも遅く、ウイルスの増殖が可能だったと推察された。脳内接種群の病原性については、今後検証を行う。

ラットでは系統差の影響は見られなかったが、週齢において感受性にわずかな差が見られた。半年齢の F344 ラットでは MERS-CoV を 2 回感染させると血清に中和抗体が検出できた。これに対して 5 週齢の F344 ラットと新生仔 Lewis ラットでは血清中和抗体の産生はなく、感染には至っていない事が分かった。半年齢の F344 ラットでも肺局所でウイルスの増殖は確認できなかったが、中和抗体の産生がある事から、一過性に感染が起こっているのかもしれない。

マウスおよびラットにそれぞれ MERS-CoV 感染における所見は見られたが、MERS-CoV の動物モデルとしては適さない事が明らかとなった。今後、トランスジェニックマウスの作製に着手する必要があるが出てきた。そして新生仔マウスの頭蓋内接種ではウイルス分離ができる可能

性があるため、マウス馴化株作製の手がかりになるかもしれない。

E. 結論

本研究で、マウスおよびラットは MERS-CoV の動物モデルに適さない事が明らかとなった。今後、トランスジェニックマウス開発を念頭に入れ、MERS-CoV のレセプター発現マウス細胞での実験を行って行く予定である。また新生仔マウスの頭蓋内接種でのウイルス分離について検討を行う必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzuki Y, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Fukushi S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S. Lethal Canine Distemper Virus Outbreak in Cynomolgus Monkeys in Japan in 2008. *J Virol.* 2013 Jan;87(2):1105-14

2. 学会発表

1. 永田典代、佐藤由子、中島典子、岩田奈織子、清水博之、長谷川秀樹：脳炎・髄膜炎関連ウイルスの病理学的検索のための参照標本の作製と抗体の検討。第102回日本病理学会(札幌)、2013年6月
2. 片岡周子、西村順裕、鈴木忠樹 小谷治、岩田奈織子、永田典代 網康至、清水博之：エンテロウイルス71のカニ

クイザルにおける病原性の解析 第61回日本ウイルス学会(神戸)、2013年11月

3. 永田典代、小島朝人、鈴木忠樹、岩田奈織子、小谷治、高崎智彦、長谷川秀樹：デングウイルスVeroE6継代株のマウスに対する病原性 第61回日本ウイルス学会(神戸)、2013年11月
4. 潮田和佳、小谷治、岩田奈織子、鈴木忠樹、中島典子、長谷川秀樹、清水博之、永田典代：コクサッキーウイルスB2実験室株脳内接種後のマウスにおける水頭症の発症機序 第61回日本ウイルス学会(神戸)、2013年11月
5. 小谷治、Naeem Asif、鈴木忠樹、岩田奈織子、中島典子、片野晴隆、長谷川秀樹、田口文広、清水博之、永田典代：

新生仔マウスを用いたSaffold virus小脳継代株の作出とその病原性の解析 第61回日本ウイルス学会(神戸)、2013年11月

6. 岩田奈織子、宇田晶彦、佐藤由子、鈴木忠樹、横田恭子、森川茂、長谷川秀樹、永田典代：UV不活化SARS-CoV免疫BALB/cマウスのSARS-CoV感染肺における好酸球浸潤に対するToll-like receptor刺激の影響 第61回日本ウイルス学会(神戸)、2013年11月

H. 知的財産の出願・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

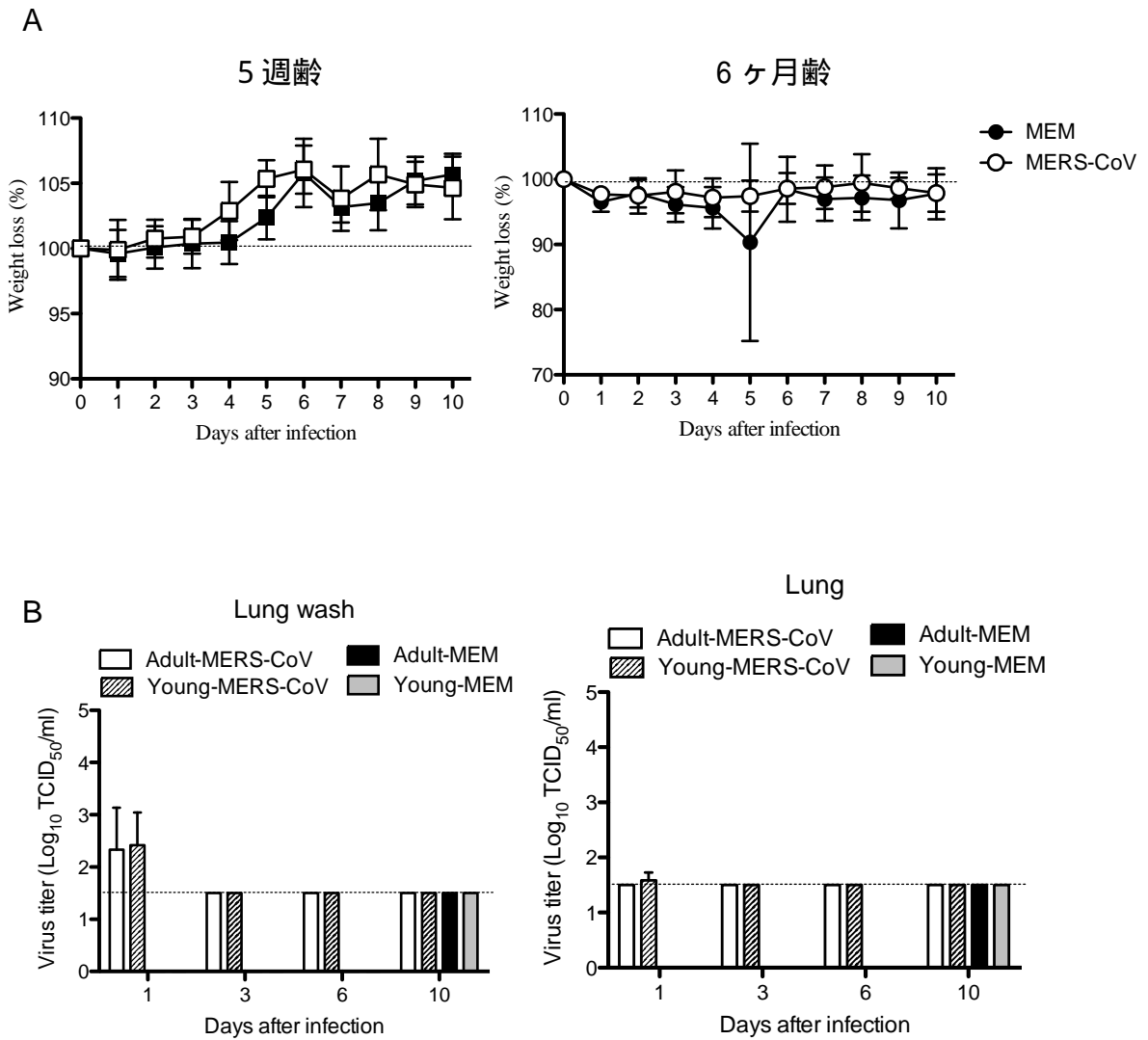


図 1 (A) 5 週齡および 6 ヶ月齡の MERS-CoV 接種後の BALB/c マウスの体重変化。
 (B) 肺洗浄液および肺乳剤のウイルス価。

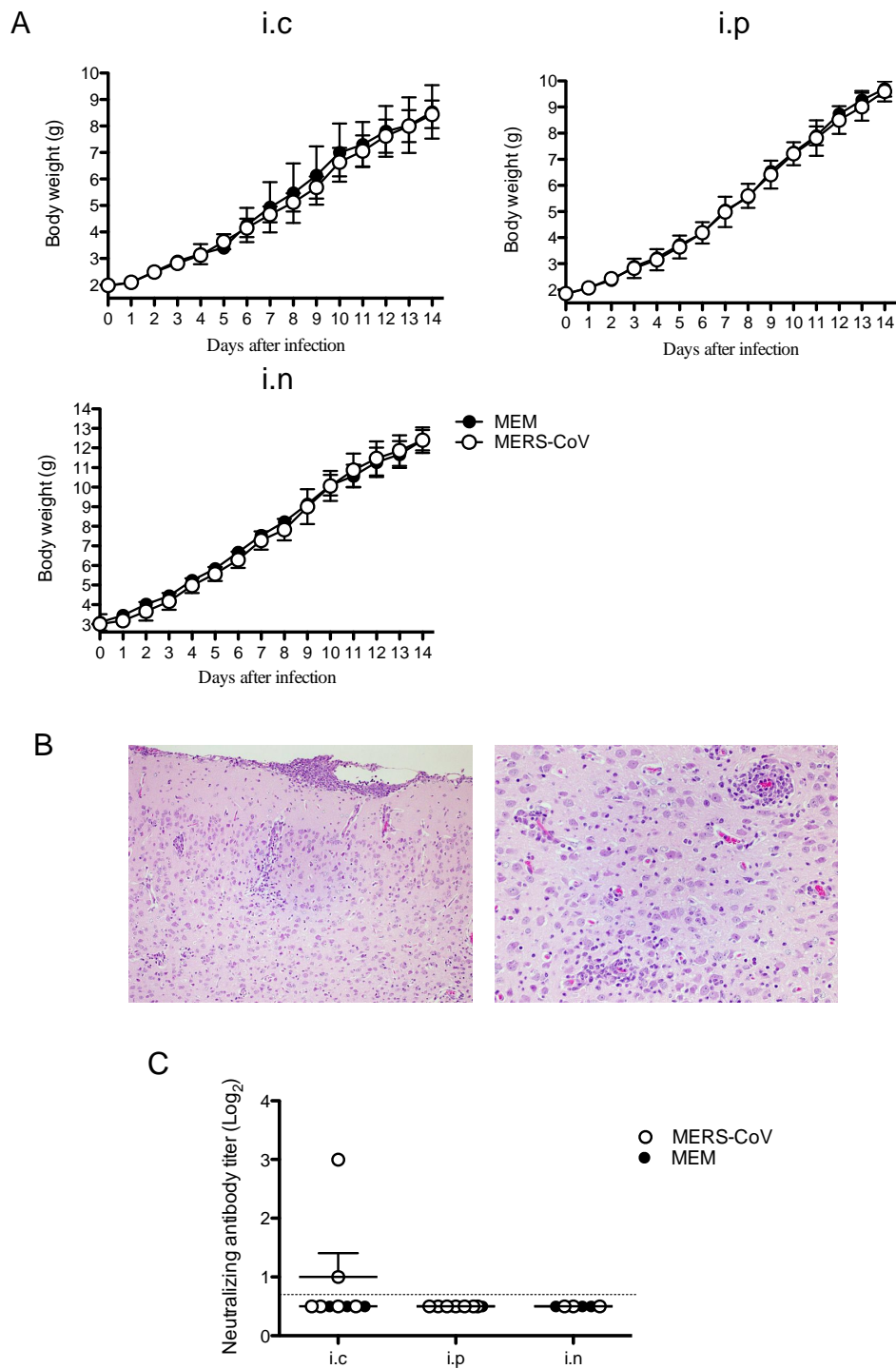


図2 (A) MERS-CoV を頭蓋内、腹腔内、経鼻接種した新生仔 ddY マウスの体重変化。(B) MERS-CoV 頭蓋内接種新生仔マウスの 20 日目の脳の病理組織像。左図 (x10, HE 染色)、右図 (x20, HE 染色)。(C) MERS-CoV 接種後 19-21 日の血清中和抗体価。

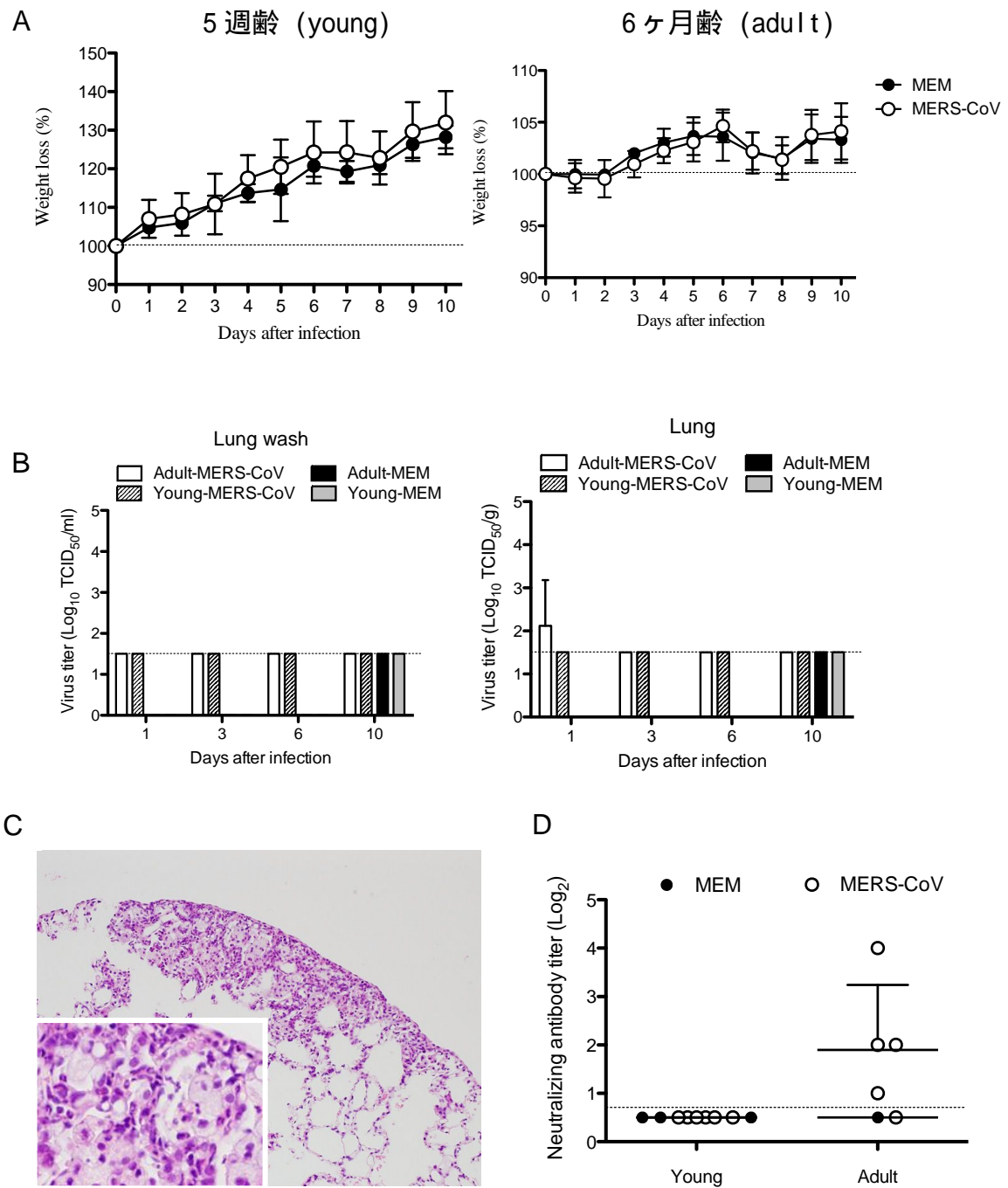


図3 (A) MERS-CoV を経鼻摂取した5週齢 (young) および6ヶ月齢 (adult) のF344ラットの体重変化。(B) 肺洗浄液および肺乳剤のウイルス価。(C)ウイルス接種3日目の6ヶ月齢、F344ラットの肺病変。(D) MERS-CoV 2回接種後12日のF344ラットの血清中和抗体価。

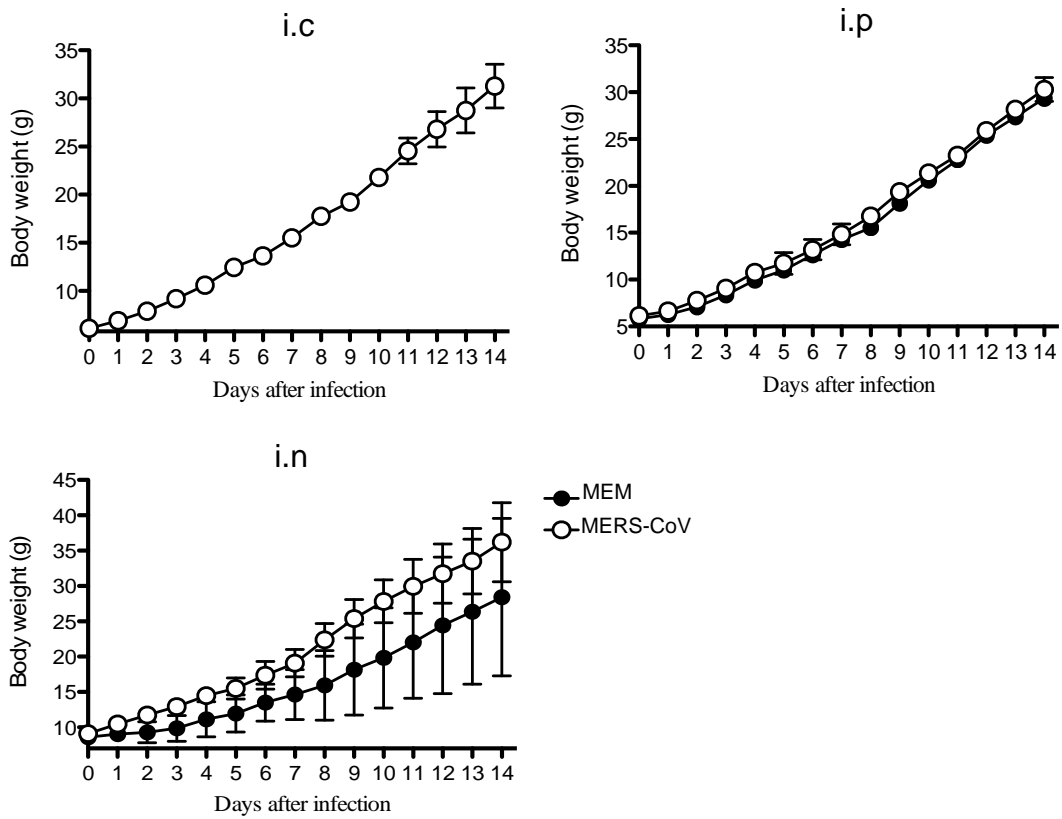


図4 (A) MERS-CoV を頭蓋内、腹腔内、経鼻接種した新生仔 Lewis ラットの体重。