

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患者が報告された。2003年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、患者からは新規のヒトコロナウイルスである中東呼吸器症候群コロナウイルス(MERS-CoV)が分離された。現在も流行は中東中心だが、欧州地域では輸出症例も頻発している。そのため、日本でも今後、国内侵入を想定した対応が必要で、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 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、ウイルス増殖部位の同定および免疫応答を詳細に検討するため感染動物モデルの確立と SARS-CoV と鑑別可能な病理診断系の確立を行う。昨年度はマウスおよびラットの MERS-CoV に対する感受性を検討し、これらの動物には感染が成立しない事を明らかにした。この結果から小動物感染モデルを確立するには、MERS-CoV のレセプターであるヒト CD26 発現遺伝子改変マウスの作製が必要となった。そこで、本年度はヒト CD26 発現遺伝子改変マウスの作製を行った。10匹のファウンダーマウスが獲得でき、現在、これらの系統を確立中である。系統化されたマウスの MERS-CoV 感受性を調べ、系統を選択していく予定である。さらに、ヒト CD26 発現遺伝子改変マウスの第二世代として、ノックインマウス作製を計画しており、本年度はマウスにノックインするヒト CD26 遺伝子について、MERS-CoV の感染性が得られる領域を調べるため、マウス CD26 とヒト CD26 のキメラ体を作製し、*in vitro* で検討を行った。ヒト CD26 では MERS-CoV の S 蛋白結合領域の一部に相当するマウス CD26 の aa326-340 をヒト型に置換するだけで、MERS-CoV のマウス細胞に対する感染性を獲得できた。この結果から、ノックインする領域は aa326-340 が最適である事が明らかになった。また、本年度は MERS-CoV の病理組織診断法を確立した。新生仔マウスに MERS-CoV を接種し、ウイルス分離ができた個体を陽性コントロールとし、*in situ* hybridization 法に用いるプローブの検討と MERS-CoV の N 蛋白に対する抗体の特異性を調べた。プローブで MERS-CoV 遺伝子の検出は可能であった。また、免疫組織化学法により、MERS-CoV タンパクの検出も可能であった。さらに、この抗体は SARS-CoV とは交差せず、MERS-CoV 特異的であった事から、SARS 患者との鑑別が可能であると示された。今回確立した方法により、今後の臨床検体検査の対応が可能となった。

研究協力者：

- 岡村匡史（国立国際医療研究センター
研究所感染症制御研究部）
永田典代（国立感染症研究所感染病理
部）
鈴木忠樹（国立感染症研究所感染病理
部）
中島典子（国立感染症研究所感染病理
部）
佐藤由子（国立感染症研究所感染病理
部）
福士秀悦（国立感染症研究所ウイルス
第一部）
松山州徳（国立感染症研究所ウイルス
第三部）
梁 明秀（横浜市立大学医学部）

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規のヒトコロナウイルスで、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 (2015 年 2 月 5 日現在) に 965 人の確定患者がおり、そのうち 357 名が死亡している。流行は未だ続いており、今後の日本で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、ウイルス増殖部位の同定および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。本年度はヒト CD26 発現遺伝子改変マウスの作製を行った。また、MERS-CoV は臨床症状が SARS と類似しており、鑑別診断が必要である。そのた

め、MERS と SARS の鑑別が可能なパラフィン包埋組織切片を用いた病理組織診断法を確立した。

B. 研究方法

(1) ヒト CD26 発現マウス培養細胞における MERS-CoV 感染性の検討：
マウス線維芽細胞由来の NIH3T3 細胞に FugenHD を用いて、ヒト CD26 発現プラスミドをトランスフェクションした。トランスフェクション後、24 時間で 10^7 TCID₅₀/ml の MERS-CoV を MOI=0.1 のウイルス量で感染させた。感染後 0、1、2、3 日の上清を回収し、VeroE6 細胞における 50% 細胞培養感染量 (TCID₅₀) を Kärver 法により算出し、感染性ウイルス量を測定した。

(2) ヒト CD26 発現遺伝子改変マウスの作製：

BDF1 マウス雌 20 匹に馬血清性性腺刺激ホルモンおよびヒト絨毛性性腺刺激ホルモンを投与し、過排卵処理を施した。その後、雄の C57BL/6 マウスと交配させ、前核期受精卵を得た。そして、環状のヒト CD26 遺伝子を含む細菌人工染色体 (Bacterial Artificial Chromosome; BAC) を受精卵前核に注入し、注入後の受精卵を偽妊娠仮親 ICR マウスの卵管に移植した。得られた産仔の尾から DNA を抽出し、ヒト CD26 遺伝子の有無を PCR 法で確認した。

(3) ヒト CD26 とマウス CD26 cDNA キメラ体作製とそれらを発現させたマウス培養細胞での MERS-CoV 感染実験：

ヒト CD26 において、MERS-CoV の S タンパクが結合する領域にあたる cDNA

をマウス CD26 cDNA に置換したキメラ体を作製した。マウス CD26 の aa273-340 あるいはヒトとマウスでアミノ酸相同性が低い領域である aa273-290 または aa326-340 をヒト CD26 cDNA に置換したものをそれぞれ設計した(図 2A)。これらのキメラ体は PCR 法で作製し、発現プラスミドに組み込み、クローニングした。これらを NIH3T3 細胞に FugeneHD を用いてトランスフェクションし、24 時間後に 10^7 TCID₅₀/ml の MERS-CoV を MOI=0.1 のウイルス量で感染させた。感染後 0、1、2、3 日の上清を回収し、VeroE6 細胞における TCID₅₀ を Kärver 法により算出し、感染性ウイルス量を測定した。

(4) MERS-CoV の病理組織診断法に使用する MERS-CoV 陽性コントロールの作製:

MERS-CoV 10^7 TCID₅₀/ml を生後 24 時間以内の新生仔 ddY マウスに接種(10 μ l)した。接種後 14 日で解剖、組織を採材し、常法どおり 10%ホルマリン緩衝液固定後、パラフィン切片組織を作製し、病理学的解析を行った。また病変の見られた個体のパラフィン包埋組織から RNA を抽出し、MERS-CoV 遺伝子に対するリアルタイム RT-PCR を行い、感染を確認した。

(5) MERS-CoV に対する病理組織診断法の確立:

In situ hybridization 法によるウイルス遺伝子の検出には、MERS-CoV の E あるいは N 遺伝子を検出する二種類のプローブを混合して使用した。

免疫組織化学法によるウイルス抗原の検出は、MERS-CoV N タンパクに対するマウスモノクローナル抗体を用いて行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は各研究機関および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、使用および保管等を行った。遺伝子組換え実験は、遺伝子組換え生物等の使用(第二種使用)の承認を得た。

C. 結果

(1) ヒト CD26 発現マウス培養細胞における MERS-CoV 感染性の検討:

ヒト CD26 を発現させた NIH3T3 細胞に MERS-CoV を感染させると、感染 1 日目からウイルスの増殖が確認された(図 1)。感染量は VeroE6 細胞に MERS-CoV を感染させた場合より低かったが、ヒト CD26 が発現していない NIH3T3 細胞では、ウイルス増殖が全く見られなかったため、レセプターが発現していれば、マウス細胞で MERS-CoV は感染、増殖が可能であると確認された。

(2) ヒト CD26 発現遺伝子改変マウスの作製:

雌の BDF1 マウスから受精卵を回収し、ヒト CD26 遺伝子を含んだ BAC プラスミドを受精卵前核に挿入した後、それを 3 匹の仮親に子宮内移植した。移植後、15 匹の産仔が得られ、そのうち 10 匹でヒト CD26 遺伝子が PCR 法により確認できた。現在、これらの次世代マウスから産仔が得られたため、3-4 週齢に成長した後、ヒト CD26 の発現を確認し、感染実験を行う予定である。

(3) ヒト CD26 とマウス CD26 cDNA
キメラ体作製とそれらを発現させたマウス培養細胞での MERS-CoV 感染実験：

作製したキメラ体を NIH3T3 細胞に発現させ、MERS-CoV を感染させると、aa273-340 をヒト型に置換したキメラ体はヒト CD26 を発現させた場合と同等の感染性および増殖性を獲得した (図 2B)。aa279-340 の領域でヒトとマウスのアミノ酸配列を比較した場合、相同性が低い aa273-290 または aa326-340 部位をそれぞれヒト型に置換したキメラ体の感染性は、aa273-290 置換型では、ほとんど感染性を示さなかったが、aa326-340 置換型はヒト CD26 を発現させた場合と同等のウイルス価を得た (図 2B)。この結果から、aa279-340 全域をヒト型にしなくても、aa326-340 の配列をマウスにノックインする事により、マウスは MERS-CoV に対してヒト CD26 を発現させた場合と同等の感染性を獲得できると考えられた。

(4) MERS-CoV の病理組織診断法に使用する MERS-CoV 陽性コントロールの作製：

生後 24 時間以内に MERS-CoV を接種した新生仔マウスは、感染 14 日後に 6 匹中 1 匹の割合で、ウイルス分離ができた。病変が確認できた個体のパラフィン包埋組織から RNA を抽出し、MERS-CoV のリアルタイム RT-PCR を行った。その結果、ウイルスゲノムが検出できたため、この個体は病理組織診断法の陽性コントロールに使用可能と考えられた。

(5) MERS-CoV に対する病理組織診断法の確立：

MERS-CoV の E あるいは N 遺伝子を検

出する antisense および sense プローブを用いて、パラフィン包埋組織からウイルスゲノムが検出できた新生仔マウスの組織切片で *in situ* hybridization を行った。その結果、変性細胞の細胞質にウイルスゲノムおよび mRNA を検出する antisense プローブのシグナルが検出された。Sense プローブのシグナルは検出できなかった。この結果から、今回使用したプローブは MERS-CoV 遺伝子の検出が可能であると考えられた。

また、同じ個体の組織切片を用いて、MERS-CoV の N タンパクに対するマウスモノクローナル抗体で免疫組織化学法を行った。*In situ* hybridization と同様の細胞で抗原が検出された。さらに、この抗体を臨床症状が類似する SARS-CoV 感染患者の肺組織で免疫組織化学法を行ったところ、抗原は検出されず、SARS-CoV と交差しない事が明らかとなった。これらの結果を Table 1 にまとめた。

今回使用した陽性コントロールは SARS-CoV を検出するプローブや抗体には反応せず、MERS-CoV 検出の陽性コントロールとして適している事も明らかとなった。

D. 考察

ヒト CD26 発現遺伝子改変マウスは、次世代マウスのヒト CD26 タンパクの組織発現および局在を確認した後、感染実験に用いる予定である。ファウンダーマウスが 10 匹得られたが、ヒト CD26 を発現している系統が多かった場合は、発現量の異なる 2、3 系統を感染させ、MERS を発症する最適な系統を選択する。また、遺伝子改変マウスの第二世代として、ノックインマウスの開発に取り組むが、本年度に行った *in vitro* の基礎実験から、

aa326-340 をヒト型に置換するとマウス細胞で MERS-CoV の感染性を得られる事が分かったため、この部分をノックインしたマウスの作製を行う予定である。

本年度は MERS-CoV の病理組織診断法を確立できた。パラフィン包埋組織の陽性コントロールの作製、プローブの検討、抗体の特異性の検討が達成された。抗体に関しては SARS-CoV と鑑別可能であることも分かった。今後、臨床検体に対する検査依頼があった場合、対応が可能となった。その他の診断法と合わせて、MERS-CoV に対する有効な診断法と言える。

E. 結論

昨年度の研究で、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。しかし、本年度にヒト CD26 発現遺伝子改変マウスが作製できたことにより、MERS-CoV 感染動物モデル確立の可能性は非常に高くなった。また次年度にノックインマウスが作製できれば、より理想的なモデルとなり得る。

そして、本年度はこれまで感染培養細胞でしか検討できなかった病理組織診断法を MERS-CoV 感染マウスの組織切片を陽性コントロールとする事により、パラフィン包埋組織切片での検討を可能にした。その結果、MERS-CoV の *in situ* hybridization 法や免疫組織化学法が確立でき、臨床検体の検査対応を可能とした。また免疫組織化学法については、SARS-CoV との鑑別診断に応用可能で、非常に有用な診断法である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Iwata-Yoshikawa N, Uda A, Suzuki T, Tsunetsugu-Yokota Y, Sato Y, Morikawa S, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H, Nagata N. Effects of Toll-like Receptor Stimulation on Eosinophilic Infiltration in Lungs of BALB/c Mice Immunized with UV-inactivated Severe Acute Respiratory Syndrome-related Coronavirus Vaccine. J Virol. 2014 Aug;88(15):8597-614.
2. Nagata N, Saijo M, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Sato Y, Iwata-Yoshikawa N, Ogata M, Kurane I, Morikawa S, Sata T, Hasegawa H. Pathogenesis of fulminant monkeypox with bacterial sepsis after experimental infection with West African monkeypox virus in a cynomolgus monkey. Int J Clin Exp Pathol. 2014 Jun 15;7(7):4359-70.
3. Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Sato Y, Nakajima N, Koike S, Iwasaki T, Sata T, Yamashita T, Minagawa H, Taguchi F, Hasegawa H, Shimizu H, Nagata N. Establishment of a panel of in-house polyclonal antibodies for the diagnosis of enterovirus infections. Neuropathology. 2014 Sep 28.

学会発表

1. 福士秀悦、永田典代、岩田奈織子、谷英樹、吉河智城、谷口怜、福間藍子、下島昌幸、西條政幸 高齢マウスにおける重症熱性血小板減少症候群ウイ

ルスの感染感受性の解析 第62回日本ウイルス学会(横浜)、2014年11月

2. 永田典代、岩田奈織子、鈴木忠樹、高橋健太、佐多徹太郎、長谷川秀樹、網康至、久保田耐、加藤篤、田代真人、竹田誠、木所稔 動物モデルを用いたムンプスウイルスの神経病原性に関する病理学的検討 第62回日本ウイルス学会(横浜)、2014年11月
3. 小谷治、藤井健、鈴木忠樹、岩田奈織子、網康至、須崎百合子、長谷川秀樹、田口文広、清水博之、永田典代 カニクイザルを用いたSaffold virusの神経病原性の病理学的解析 第62回日本ウイルス学会(横浜)、2014年11月

4. 岩田奈織子、福士秀悦、福間藍子、鈴木忠樹、竹田誠、田代真人、長谷川秀樹、永田典代 中東呼吸器症候群コロナウイルスに対するマウスおよびラットの感受性について 第62回日本ウイルス学会(横浜)、2014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

A

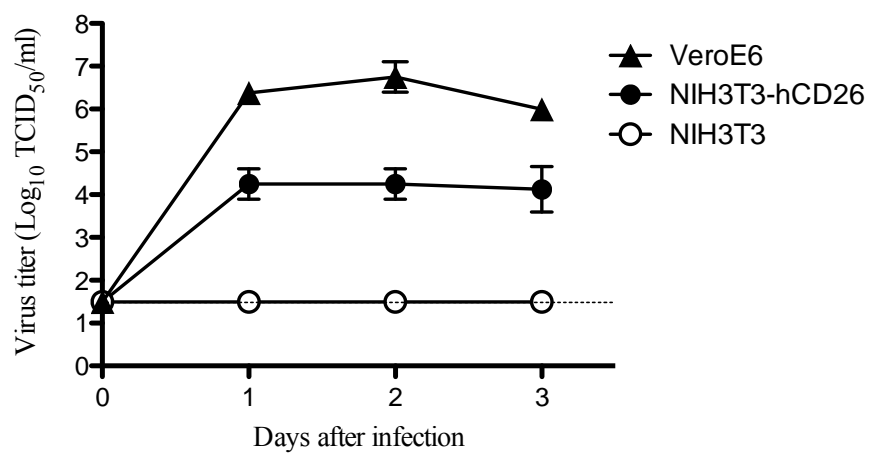
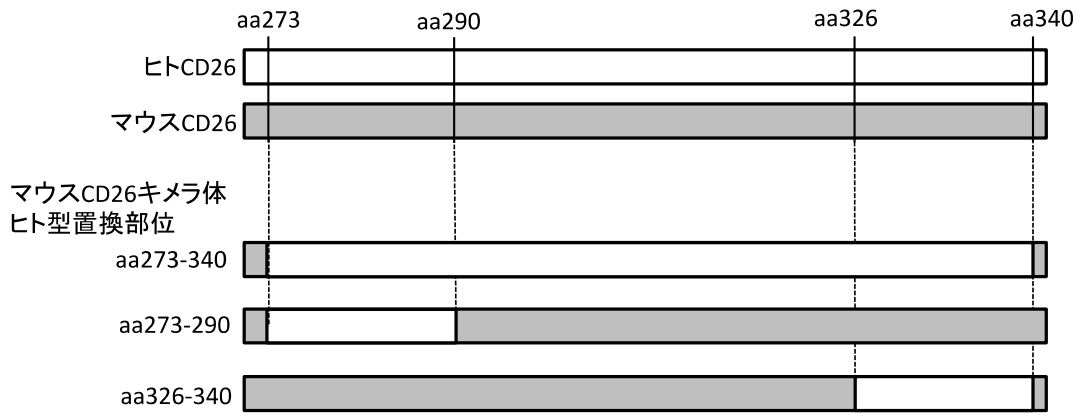


図1 (A) VeroE6 細胞、ヒト CD26 発現 NIH3T3 細胞および NIH3T3 細胞の MERS-CoV 感染後 1, 2, 3 日に回収した上清のウイルス価。

A



B

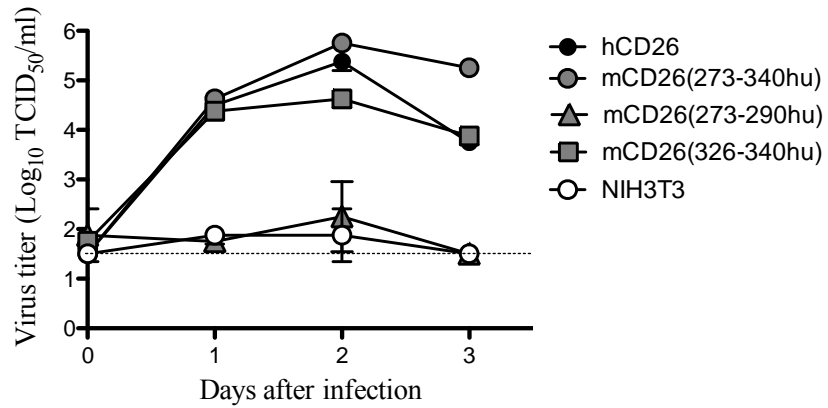


図2 (A) マウス CD26 cDNA にヒト CD26 の MERS-CoV 結合部位を置換したキメラ体 3 種類。(B) マウス CD26 cDNA とヒト CD26 cDNA のキメラ体をトランスフェクションした NIH3T3 細胞に MERS-CoV を感染し、感染後 1, 2, 3 日の上清のウイルス価。ヒト CD26 cDNA をトランスフェクションしたものを陽性コントロールとした。

Table 1. MERS-CoV に対する病理学的診断法に用いた抗体およびプローブの特異性について

使用組織	MERS-CoV		SARS-CoV	
	Antibody	Probe	Antibody	Probe
MERS-CoV 感染マウス	+	+	-	-
SARS-CoV 感染患者	-	NA	NA (+) ¹	NA (+) ²

¹ N. Nakajima *et al.*, JJID, 56, 139-141, 2003

² 中島典子 他 3 名、病理と臨床、vol.32 (no.10)、201