

財団法人日中医学協会  
2005年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

平成18年 3月 14日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 生田 和良



所属機関名： 大阪大学

所属部署： 微生物病研究所 職名： 教授  
〒 565-0871

所在地： 大阪府吹田市山田丘3-1

電話： 06-6879-8307 内線： 8307

1. 助成金額： 910,000 円

2. 研究テーマ

中国における重症急性呼吸器症候群(SARS)コロナウイルス持続感染状況の把握

3. 成果の概要(100字程度)

重症急性呼吸器症候群(SARS)関連コロナウイルス(CoV)のルーツは不明である。私たちは、このSARS-CoVが培養細胞(Vero E6)で持続感染することを見出した。この持続感染細胞と反応する抗体スクリーニングを行い、現在の中国人はどの程度の抗体陽性率であるのかについて検討した。その結果、内モンゴと西安市由来の検体で高率に陽性反応が認められたが、哈爾濱市由来の検体ではいずれも陰性であった。これら陽性検体は、他のヒトコロナウイルス(229E)と交叉反応している可能性があるため、実際のCoVの実体を検出する努力を現在行っている。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 生田 和良 職名： 教授

所属機関： 大阪大学 部署： 微生物病研究所

中国側研究者氏名： 張 鳳民 職名： 教授

所属機関： 哈爾濱医科大学 部署： 微生物学講座

## 中国における重症急性呼吸器症候群(SARS)コロナウイルス 持続感染状況の把握

研究者氏名 張 鳳民  
中国研究機関 哈爾濱医科大学 微生物学講座

研究者氏名 李 桂梅、李 永剛、生田和良  
日本研究機関 大阪大学 微生物病研究所 ウイルス免疫分野

### 要 旨

重症急性呼吸器症候群 (SARS) コロナウイルス (CoV) に持続感染したVero E6細胞株を抗原として用いた蛍光抗体法により、現在の中国人におけるSARS-CoVに対する抗体保有者の割合を調査した。その結果、これまでにSARS患者が認められていた内蒙古や西安で高率に抗体陽性例が認められた (内蒙古の発熱者で32%、健常者で25%;西安の健常者で20%)。一方、SARS患者が認められていない哈爾濱においては抗体陽性例が認められなかった(0%)。今後、これら陽性例において、SARSアウトブレイクときにウイルスに曝されたが、発症しなかった場合なのか、SARS-CoVのルーツとなるような弱毒性のヒトCoVであるのか、検討が必要である。

Key Words SARS, コロナウイルス, 持続感染, Vero E6, 中国

### 緒 言:

2002年冬に始まった新型肺炎である重症急性呼吸器症候群 (SARS) の大流行は、世界を震撼させる大問題となった。現在においても、その原因ウイルスであるSARSコロナウイルス (SARS-CoV) の自然宿主動物の特定化ができておらず、その再流行が懸念されている。病態機序の詳細な解明、有効なワクチン・抗ウイルス薬の開発、確実に迅速な検査方法の確立など、再流行に備えて解決されなければならない重要課題が山積している。

ウイルス感染症は大きく急性感染症と持続感染症に分けられるが、SARSは、典型的な急性感染症と考えられている。急性感染症は、感染したウイルスが急激に複製することに伴う疾患であり、急性期症状が消えた後に抗ウイルス免疫応答が残り、ウイルスは体内から消失していると信じられてきた。しかし、最近の遺伝子増幅法による解析により、ごく微量に存在する体内ウイルス遺伝子についても極めて高感度に検出することが可能となり、急性感染症と考えられてきたものが、実は体内の一定部位に潜伏あるいは慢性状態で長期間持続感染していることがさまざまなウイルスについて明らかになっている。このような持続感染ウイルスは、急性期のような激しい臨床症状を示さないが、多様な慢性病態と関連していることが徐々に明らかにされつつある。

は認められなかったが、小児の方が、成人よりも高率であった。一方、これまでに SARS 患者が発生していない哈爾浜市では、50例試み、いずれも陰性であった。これら SARS-CoV 持続感染 Vero E6 細胞と反応する抗体陽性例はいずれも、SARS-CoV RNA の PCR 解析では陰性であった。

#### 考 察：

今回、蛍光抗体法により陽性反応が認められた内蒙古および西安市の検体は、いずれも PCR 増幅することができなかった。したがって

- ① かつてのアウトブレイク時期に、不顕性に感染した結果、抗体上昇が認められているがウイルスは排除されている。
- ② SARS-CoV と血清学的交差する類似ウイルスに感染している。
- ③ SARS-CoV の持続感染が成立しているが、少なくとも血漿中にはウイルスは放出されていない状態にある。

などの可能性が考えられる。今後、今回のような蛍光抗体法で陽性反応が認められる検体で、PCR 陽性のサンプルが入手できれば、SARS-CoV との関連性を明らかにすることが可能と考えられる。

#### 参考文献：

1. Yamate, M., Yamashita, M., Goto, T., Tsuji, S., Li, Y.-G., Warachit, J., Yunoki, M., and Ikuta, K. Establishment of Vero E6 cell clones persistently infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbes Infect.* 7, 1530-1540, 2005.
2. Yamashita, M., Li, G.-M., Yamate, M., and Ikuta, K. Susceptibility of human and rat neural cell lines to infection by SARS-coronavirus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 334, 79-85, 2005.

表 1. 蛍光抗体法による、中国 3 地域からの検体の持続感染 SARS-CoV に対する抗体陽性率

中国内の サンプル 入手地域	サンプル入手した ヒトの発熱の有無	蛍光抗体法による SARS-CoV 陽性率
内蒙古	+	32% (18/55)
	-	25% (1/4)
哈爾浜	-	0% (0/50)
西安	-	20% (1/5)

ところで、SARS患者の臨床サンプルや剖検サンプルを用いた解析から、レセプターとして同定されたACE2の発現が認められない末梢血単核球（PBMC）中に、発熱後3カ月を経過してもウイルスが存続していることがRT-PCR法によって示されている。また、肺に比べ、腸管の剖検観察では、非細胞傷害性にウイルス感染が認められることが報告されている。これらの報告内容は、SARS-CoVが持続感染し得ることを示唆している。事実、私たちは培養細胞系において、SARS-CoVが、急性期の激しい細胞傷害後に一部の生き残る細胞の出現を許し、持続感染を成立させることを見出した。興味深いことに、このような細胞はSARS-CoV重感染に感受性であるが、感染時の細胞傷害がほとんど現れずに持続感染を成立させる。また、レセプターであるACE2の発現は完全にdown-regulationしていた。

本研究の目的は、これまでに培養細胞レベルで確認してきたSARS-CoV持続感染成立機序と同様の現象が、中国に於ける健常者の一部の間で成立しているか否かを検証することである。SARS-CoVの持続感染機序についての情報は皆無に等しく、本研究によって得られる情報は貴重なものになる。なお、実際の調査は、中国のハルビン医科大学の張鳳民教授のグループにより行われた。

#### 材料と方法：

##### 1) 血液サンプル

SARS-CoVに関する疫学的研究のため、中国の3地域からの血液サンプルを入手した。哈爾濱市から健常者50名、内蒙古から発熱患者55名（小児が41名、成人が14名）及び健常者4名、西安市から健常者5名からのサンプルを用いた。これらの血液から血漿を分画した。

##### 2) 間接蛍光抗体法

SARS-CoVに持続感染したVero E6細胞を無蛍光スライドグラスに塗末し、冷アセトンで5分間固定したものを抗原として用いた。血漿中の抗体は、100倍希釈したものを一時抗体として、2次抗体は市販のFITC結合ウサギ抗ヒトIgGを用いた。

##### 3) SARS-CoV RNA検出のためのPCR

血漿中RNAを用いて、プライマーとして5'-TCTTGATGGATCTGGGTAAGGC-3' (complementary to nucleotides 15857-15878 at open reading frame 1ab)を用いて SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen)で逆転写し、得られたcDNAは、プライマーとして5'-GAATCCTGACATCTTACGCG-3' (nucleotides 13871-13890)と5'-TGTTAGGCATGGCTCTGTCA-3' (nucleotides 15255-15236)を用いて1回目のPCR増幅を行った。2回目のPCRは、プライマーとして5'-TGCGTGATGCAGGCATTGTA-3' (nucleotides 13957-13976)と5'-CATAGCTGGATCAGCAGCAT-3' (nucleotides 14510-14491)を用いて増幅した。

#### 結 果：

表1に示すとおり、これまでにSARS患者発生が認められた内蒙古と西安市で高率に、抗SARS-CoV抗体保有者が見つかった。内蒙古での調査では、発熱患者と健常者間では顕著な差異

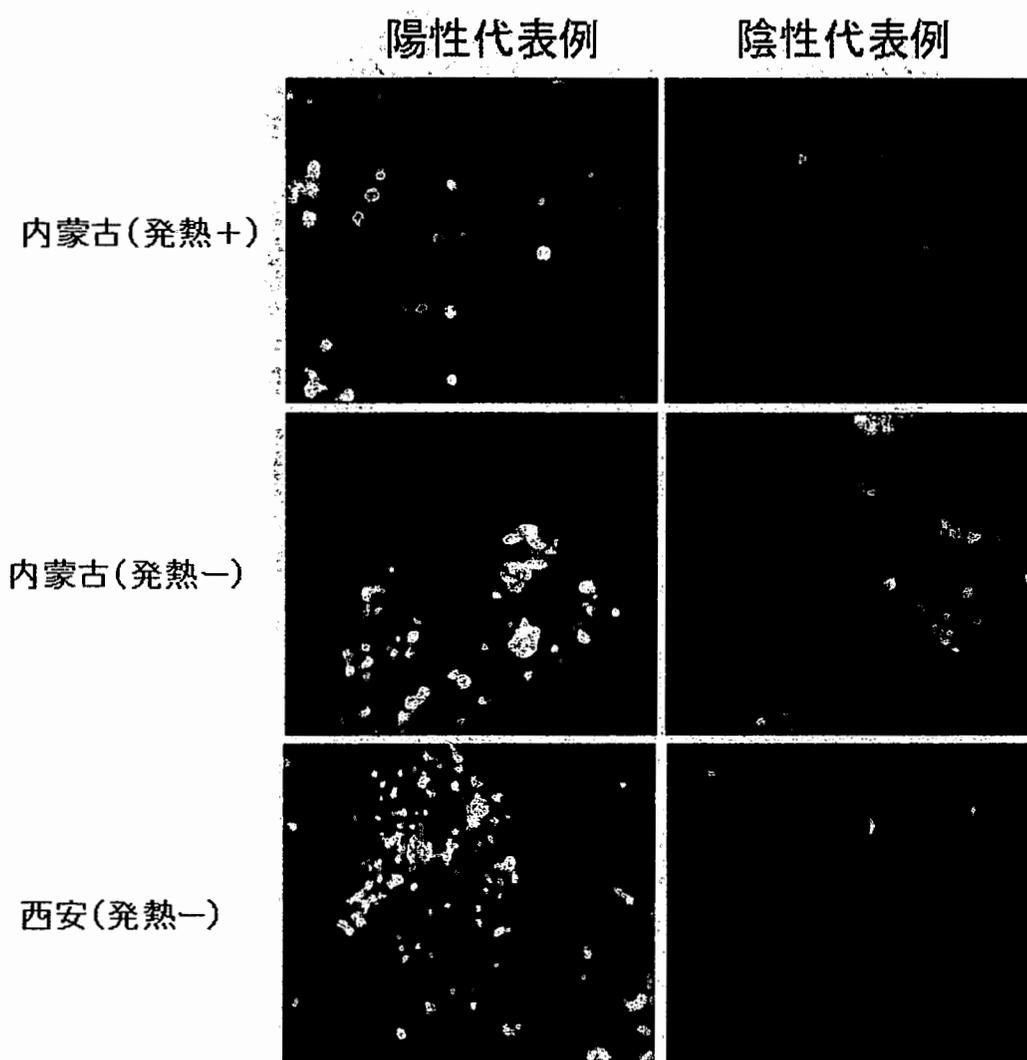


図1. 蛍光抗体法により、中国の内蒙古および西安由来の検体血漿中に認められた、持続感染SARS-CoV に対する抗体陽性例と陰性例。

作成日：2006年3月14日