

Title	Establishment of Vero E6 cell clones persistently infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus
Author(s)	山手, 政伸
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/48908">https://hdl.handle.net/11094/48908</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	山 手 政 伸
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 1 8 2 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 20 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学 位 論 文 名	Establishment of Vero E6 cell clones persistently infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS コロナウイルス持続感染細胞クローンの樹立とその解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 生 田 和 良  (副査) 教 授 松 浦 善 治 教 授 塩 田 達 雄

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

重症急性呼吸器症候群 (SARS) は重篤な呼吸器疾患を引き起こす新興感染症であり、その原因ウイルスとして SARS コロナウイルス (SARS-CoV) が分離された。一般にコロナウイルスにおいては急性感染だけでなく、持続感染を成立させることが知られている。SARS 患者において本ウイルスが持続感染をする可能性については不明であるが、発熱が観察された 2-3 カ月後においてもウイルス RNA が検出される場合が多いとの報告もある。そこで、本研究では SARS コロナウイルスが持続感染を成立させるかについて培養細胞系を用いて検討を行い、そこから得られた SARS-CoV について解析を行った。

#### 【方法ならびに成績】

SARS-CoV Frankfurt 1 株を感受性細胞であるアフリカミドリザル腎由来 Vero E6 細胞に感染させ、急性感染期の細胞障害が現れた後も付着細胞を維持することによって SARS-CoV 持続感染細胞 (Vero/SARS-CoV) が得られた。この持続感染細胞は形態・細胞増殖において非感染 Vero E6 細胞との差異は認められなかったが、1 年以上の長期に渡って安定的に感染性のウイルス粒子を産生し続けた。しかし、抗 SARS-CoV モノクローナル抗体による間接蛍光抗体法による結果から、ウイルス抗原陽性の細胞は徐々に減少していき、10%程度の抗原陽性率で安定することが明らかになった。

Vero/SARS-CoV から持続感染細胞クローンを樹立する目的で、持続感染後 1 ケ月の段階で限界希釈によるクローニングを試みた。87 個の細胞クローンが得られ、ウイルスゲノム RNA に対する RT-PCR によるスクリーニングの結果、4 クローンはウイルスゲノム陽性であった。しかし、1 つを除いた 3 つのクローンはクローニング後、速やかにウイルスゲノムが消失した。ウイルスゲノムを保持していたクローン (#21) は、Vero/SARS-CoV と同様の性状を有していた。

これらの持続感染細胞のウイルスタンパク質発現量をウエスタンブロットによって検討したところ、スパイクタンパク質 (S) とヌクレオカプシドタンパク質 (N) の発現量の比が急性感染細胞と比較して著しく低下していた。mRNA

の転写量について RT-PCR で検討した結果も同様であることから、転写レベルから S 遺伝子の発現が低下していることが明らかになった。ウイルス粒子の電子顕微鏡写真からも、持続感染細胞由来のウイルスではコロナウイルスに特徴的なコロナ様の構造がみられないことから、S 遺伝子の発現の低下がウイルス形態に影響を及ぼしていることが示唆された。

S 遺伝子と N 遺伝子の配列について転写調節領域 (TRS) を含めて確認したところ、S 遺伝子自体には変異がみられたものの TRS には変異が認められなかった。N 遺伝子については TRS を含めて変異は認められなかったが、上流の ORF8 領域に大幅な欠失が起こっており、N タンパク質と in frame で融合している構造が認められた。

#### 【総括】

本研究において、SARS-CoV は高感受性の Vero E6 細胞に持続感染を成立させ、さらに近縁であるマウス肝炎ウイルスとは異なり持続感染細胞クローンが樹立できることが明らかになった。持続感染細胞からは長期間にわたって安定的に感染性のウイルス粒子が産生されており、*in vivo* でも同様の現象が起こりうることを示唆している。

SARS-CoV の持続感染機構については不明な点が多いが、今回樹立した持続感染細胞は今後の研究を進める上で有用なツールとなることが期待される。

### 論文審査の結果の要旨

SARS コロナウイルス (SARS-CoV) は、重篤な呼吸器症状を引き起こす。一般にコロナウイルスは急性感染のみならず、持続感染も成立させることが知られているが、SARS-CoV については不明であった。

そこで申請者は感受性細胞 Vero E6 を用いた系で検討を行い、培養細胞系において持続感染の成立することを明らかにし、さらに他のコロナウイルスでは報告されていなかった持続感染細胞クローンの樹立にも成功している。

また申請者はこれらの持続感染細胞の性状について解析を行い、受容体分子 ACE2 の発現が低下することや産生されるウイルス粒子に形態的な変化が起こっていることなどを見出した。さらに、持続感染細胞で粒子形態の変化は Spike (S) 遺伝子発現量の転写レベルからの低下に起因していることを明らかにした。

以上のことから、申請者は SARS-CoV の持続感染細胞系を樹立し、新たな知見を明らかにしたことから学位の授与に値すると思われる。