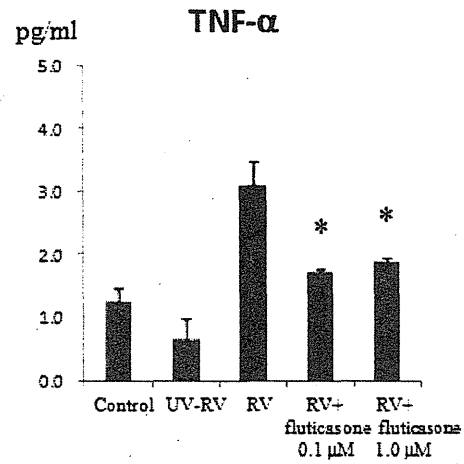
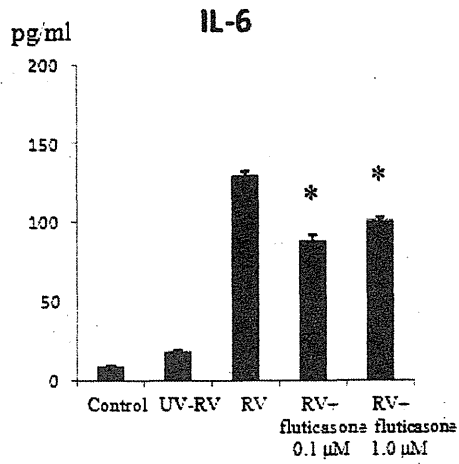


1 MOI/ 24 hour

* $P < 0.05$; RSV 1.0 MOI vs Fluticason

Proinflammatory cytokines



Th1 cytokines

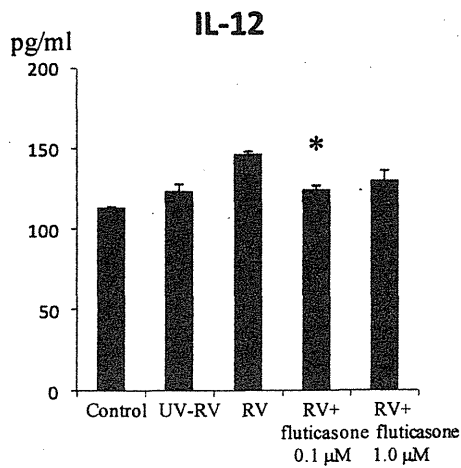
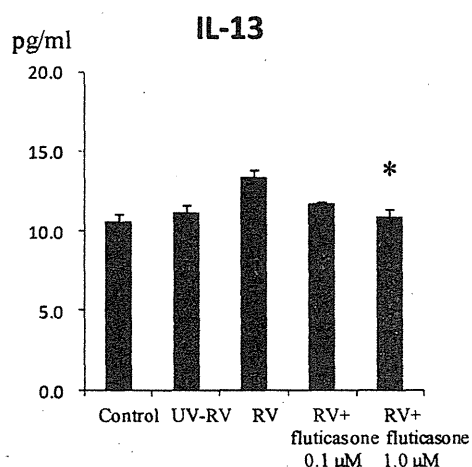
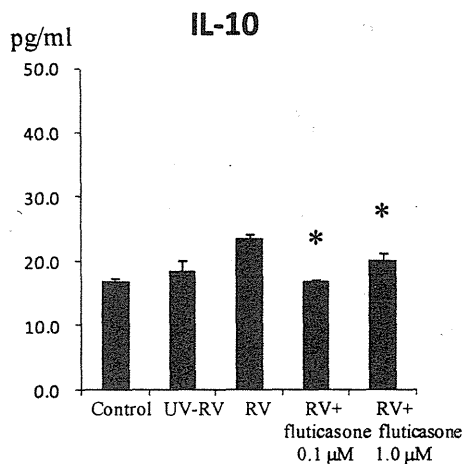
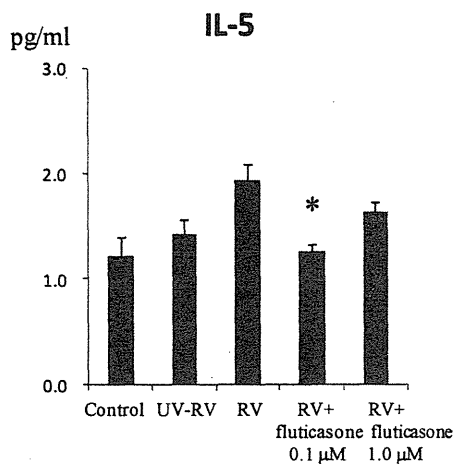


図1 HRV 感染肺線維芽細胞からのサイトカイン産生

Th2 cytokines



Neutrophil recruitment-inducing cytokines

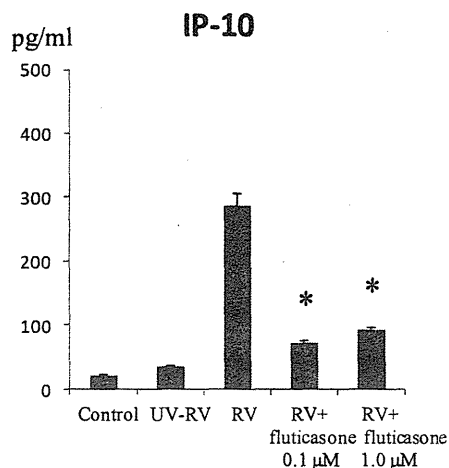
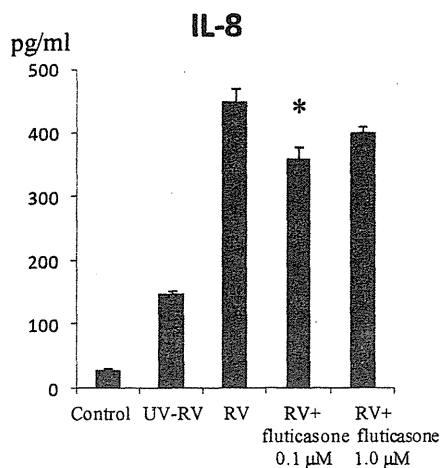
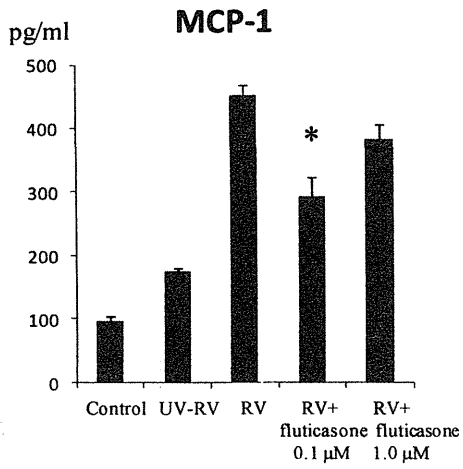


図1 HRV 感染肺線維芽細胞からのサイトカイン産生(続き)

Monocyte recruitment-inducing cytokine



Tissue remodeling-related cytokines

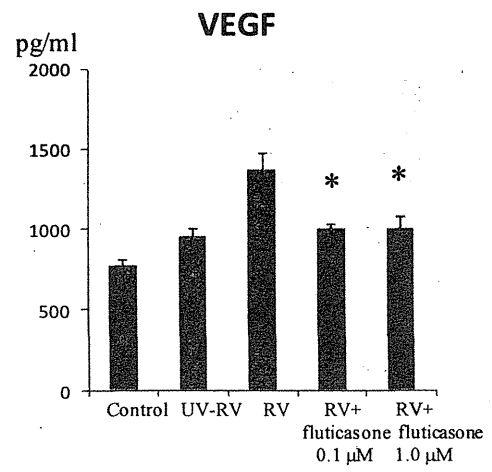
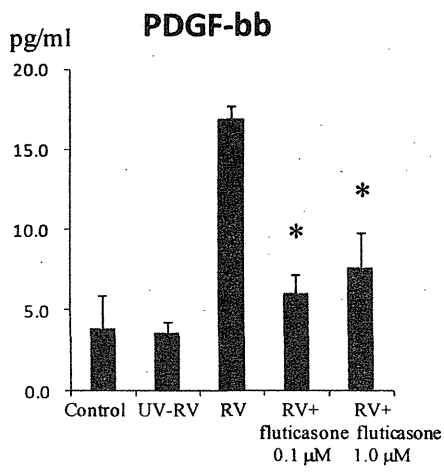


図1 HRV 感染肺線維芽細胞からのサイトカイン産生(続き)

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)
分担研究報告書

呼吸器感染ヒトパラミクソウイルス全般の病態解明・制御に関する研究

呼吸器感染症ウイルス増殖における TMPRSS2 の役割ならびに

膜融合タンパク P3 位保存グルタミンの重要性について

研究分担者

竹田 誠 (国立感染症研究所ウイルス第三部)

研究協力者

安部昌子、田原舞乃、酒井宏治、白戸憲也、松山州徳 (国立感染症研究所ウイルス第三部)

加納和彦、野田雅博、木村博一 (国立感染症研究所感染症情報センター)

網 康至 (国立感染症研究所動物管理)

加藤 篤 (国立感染症研究所放射能管理室)

水田克巳 (山形県衛生研究所)

前仲勝実、福原秀雄 (北海道大学薬学研究院)

江角眞理子 (日本大学医学部病態病理学系病理学分野)

研究要旨

多くの呼吸器感染症ウイルスの増殖には、プロテアーゼによるウイルス膜融合タンパクの開裂(活性化)が必要である。近年、呼吸器上皮に発現している膜貫通型セリンプロテアーゼ(特に TMPRSS2)が、この活性化に重要である可能性が指摘されている。実際にインフルエンザウイルス、ヒトメタニューモウイルス、SARS コロナウイルスが、TMPRSS2 で効率よく活性化を受けることが示されている。しかし、TMPRSS2 以外にも候補となるプロテアーゼは報告されており、*in vivo* での主要な活性化プロテアーゼは、不明である。本研究では、ヒトパラインフルエンザウイルス 1 型から 4 型ならびにマウスパラインフルエンザウイルス 1 型 (SeV) の F タンパクが TMPRSS2 で効率よく活性化されること、また、ヒトの TMPRSS2 のみならずマウス TMPRSS2 が、同様の活性を持つことを明らかにした。次に、TMPRSS2 ノックアウトマウスを作出し、SeV の感染実験を行った。その結果、TMPRSS2 の発現は、SeV の *in vivo* 感染において、必ずしも必要でないことが示された(より詳細な解析は現在実施中である)。TMPRSS2 を含む複数のプロテアーゼが呼吸器感染症ウイルスの *in vivo* 増殖に貢献していることを示している。基質(ウイルス膜融合タンパク)の開裂部周辺のアミノ酸配列が、プロテアーゼによる開裂性に大きな影響を与えることが知られている。われわれは、マイナス鎖 RNA ウイルスの中でも、特に呼吸器感染症を起こすウイルスが、特徴的はアミノ酸配列(あるいはその類似配列)を有していることを見出した。SeV の F タンパクの開裂部周辺に変異を導入し、変異導入ウイルスの増殖性を、ヒトの呼吸器上皮細胞株(TMPRSS2 等のプロテアーゼをもともと発現している)を用いて解析した。その結果、P3 位の保存グルタミン残基が、SeV のヒト呼吸器上皮細胞における増殖に重要であることが示された。これらの結果は、P3 位にグルタミン残基を持つことが、ヒトの呼吸器で増殖する上で重要であり、P3 位にグルタミンをもつ基質に特異性の高いプロテアーゼ(TMPRSS2

を含む) によって、多くの呼吸器感染症ウイルスが活性化を受けていることを示唆している。この性質がインフルエンザウイルスの宿主域や臓器トロピズムに影響を与えている可能性があり、現在、解析を行っている。

A. 目的

肺炎などの下気道感染症を起こすウイルスは、多数知られている。代表的なものは、RS ウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス (1 型、2 型、3 型、4 型) (HPIV1、HPIV2、HPIV3、HPIV4)、SARS (重症呼吸器症候群) コロナウイルス、インフルエンザウイルスなどである。多くの呼吸器感染症ウイルスにおいては、その増殖のために宿主のタンパク分解酵素 (プロテアーゼ) が必要であり、そのようなプロテアーゼの発現が、気道上皮に限局していることが、それら呼吸器感染症ウイルスが肺や気道などで増殖する主な理由のひとつと考えられている。ウイルスの増殖にプロテアーゼが必要である理由は、ウイルスの膜融合タンパクが、プロテアーゼによって開裂を受けることによって、はじめて膜融合活性を発揮することができるからである。しかしながら、*in vivo* において実際にこの働きを担っているプロテアーゼが何であるのかについては、依然として明確な答えは示されていない。2004 年に Garten らが (International Congress Series 1263:218-221)、ならびに 2006 年に Bottcher らが (J Virol 80:9896-8)、季節性インフルエンザウイルスの膜融合タンパク質 (HA タンパク質) を開裂する宿主プロテアーゼが、肺に発現している膜貫通型プロテアーゼ TMPRSS2 であることを発見した。2008 年にわれわれは、ヒトメタニューモウイルスの膜融合タンパク質 (F タンパク質) もまた、TMPRSS2 で活性化 (開裂) されること (Shirogane et al. J Virol 82:8942-6)、さらに 2009 年に、スペイン風邪インフルエンザウイルスの HA タンパク質が、TMPRSS2 ならびに TMPRSS4 で活性化されることを明らかに

した (Chaipan et al. J Virol 83:3200-11)。SARS コロナウイルスや NL63 コロナウイルスもまた、TMPRSS2 を利用して増殖することをわれわれは証明している (Matsuyama et al. J Virol 2010. 84:12658-642010; Kawase et al. J Virol 2012. 86:6537-45)。

本研究では、(1) HPIV1、HPIV2、HPIV3、HPIV4 ならびにマウスパラインフルエンザウイルス 1 型 (セндаイウイルス) (SeV) の TMPRSS2 の利用率について、(2) セндаイウイルスの F タンパク質の開裂部のアミノ酸配列の重要性について解析を行った。

B. 方法

【ウイルス株と細胞】HPIV1 (09-2272 株)、HPIV2 (09-2331 株)、HPIV3 (09-1835 株) は、HMV-II 細胞を用いて分離した臨床分離株を用いた。HPIV4 は、ATCC より標準株を購入した。SeV は、感染を容易に検出するために赤色蛍光タンパク質 (RFP) を発現する組換えセндаイウイルス (SeV-RFP(wt)) を用いた。細胞は、通常の Vero 細胞、ヒト TMPRSS2 を発現する Vero 細胞 (Vero/TMPRSS2)、通常の HeLa 細胞、ならびにマウス TMPRSS2 を発現する HeLa 細胞 (HeLa/mouseTMPRSS2) を利用した。

【変異 SeV の作成】Reverse genetics 手法を用いて、SeV F タンパク質の P3 位のアミノ酸 (Q) を A、S、I、V に変異させた変異株 4 種 (SeV-RFP-Q114A、-Q114S、-Q114I、-Q114V) ならびに P2 位のアミノ酸 (S) を R、V に変異させた変異株 2 種 (SeV-RFP-S115R、-S115V) を作成した。

【ウイルス増殖】HPIV1 (09-2272 株)、HPIV2 (09-2331 株)、HPIV3 (09-1835 株)、HPIV4 (ATCC)、SeV-RFP(wt) を Vero、Vero/TMPRSS2 細胞へ、

SeV-RFP(wt)をHeLa、HeLa/mouseTMPRSS2細胞へ、SeV-RFP(wt)、SeV-RFP-Q114A、-Q114S、-Q114I、-Q114V、-S115R、-S115Vをヒト肺上皮細胞株Calu3細胞、ヒト腸管上皮細胞株Caco2細胞へ感染させて、経時的にウイルス増殖を解析した。

【Fタンパク質の開裂解析】HIPV1、HPIV2、HPIV3、HPIV4、SeVそれぞれのFタンパク質の細胞質内領域のペプチドを合成し、ウサギを免疫して抗血清を作成した。HIPV1(09-2272株)、HPIV2(09-2331株)、HPIV3(09-1835株)、HPIV4(ATCC)、SeV-RFP(wt)をVero、Vero/TMPRSS2細胞へ感染させて、SDS-PAGEならびにWestern blot解析によって、Fタンパク質を検出し、Fタンパク質の開裂について解析した。

C. 結果

【HIPV1(09-2272株)、HPIV2(09-2331株)、HPIV3(09-1835株)、HPIV4(ATCC)、SeV-RFP(wt)のVero、Vero/TMPRSS2細胞におけるプラーク形成能】HIPV1(09-2272株)、HPIV2(09-2331株)、HPIV3(09-1835株)、HPIV4(ATCC)、SeV-RFP(wt)は、トリプシン非添加の状態では、Vero細胞では、プラークを形成できないが、Vero/TMPRSS2細胞においては、トリプシン非添加の状態でも明瞭なプラークを形成することが明らかになった(図1)。

【HIPV1(09-2272株)、HPIV2(09-2331株)、HPIV3(09-1835株)、HPIV4(ATCC)、SeV-RFP(wt)のVero、Vero/TMPRSS2細胞における多段階増殖能】HIPV1(09-2272株)、HPIV2(09-2331株)、HPIV3(09-1835株)、HPIV4(ATCC)は、トリプシン非添加の状態では、Vero細胞では、多段階増殖できないが、Vero/TMPRSS2細胞においては、トリプシン非添加の状態でも多段階増殖することが明らかになった(図2)。

【SeV-RFP(wt)のVero、Vero/TMPRSS2、HeLa、HeLa/mouseTMPRSS2細胞における多段階増殖能】SeV-RFP(wt)は、トリプシン非添加の状態では、VeroやHeLa細胞には、感染はするものの、最初に感染した細胞から次の細胞へと感染が拡大することはいできない(多段階増殖できない)が、Vero/TMPRSS2やHeLa/mouseTMPRSS2細胞においては、トリプシン非添加の状態でも、感染が効率よく拡大し、多段階増殖することが明らかになった(図3)。

【Fタンパク質の開裂性の解析】HIPV1(09-2272株)、HPIV3(09-1835株)、HPIV4(ATCC)、SeV-RFP(wt)をVeroあるいはVero/TMPRSS2細胞に感染させて培養液にトリプシン添加、あるいは非添加の状態で培養後、Fタンパク質をSDS-PAGEならびにWestern blot法にて解析した。その結果、HIPV1(09-2272株)、HPIV3(09-1835株)、HPIV4(ATCC)、SeV-RFP(wt)のすべてのFタンパク質が、トリプシン非依存的にTMPRSS2によって開裂することが明らかになった(図4)。

【アミノ酸変異導入SeVの増殖性の解析】Calu3細胞、Caco2細胞でも類似の結果を得た。P2位のアミノ酸(S)をR、Vに変異させた変異株2種(SeV-RFP-S115R、-S115V)の増殖はSeV-RFP(wt)とほぼ同様であった。一方、P3位のアミノ酸(Q)をA、S、I、Vに変異させた変異株4種(SeV-RFP-Q114A、-Q114S、-Q114I、-Q114V)では、増殖性の低下がみられ、とくにその傾向はSeV-RFP-Q114I、-Q114Vで顕著であった。

D. 考察、結論

今回の研究から、HIPV1、HPIV2、HPIV3、HPIV4、ならびにSeVもまた、TMPRSS2を自身の膜融合タ

ンパク質の活性化（開裂）に利用できることが明らかになった。ところで、TMPRSS2 は、自身の活性化のために自己開裂する酵素である。自身の開裂部位のP1-P2-P3位のアミノ酸はそれぞれR-S-Qであり、SeV や、ヒトメタニューモウイルス、インフルエンザウイルス H1 亜型の膜融合タンパク質のそれらと同一である。また、インフルエンザウイルス H2 亜型、H3 亜型、ヒトパラインフルエンザ1型のそれらも、アミノ酸の性質や構造上、R-S-Q と非常に似通ったもの (R-S-E または R-T-Q) で構成されている。一方、ヒトへの感染性を持たないウイルスでは、それらのアミノ酸は、TMPRSS2 のものと類似性をあまり有していない。また、TMPRSS2 以外の膜貫通型セリンプロテアーゼの P1-P2-P3 位のアミノ酸は、R-S-Q とは、性質の異なるアミノ酸で構成されている。すなわち、P1-P2-P3 位のアミノ酸に R-S-Q あるいは、それらと類似性をもつアミノ酸を有することが、TMPRSS2 による開裂ならびにヒトの呼吸器上皮での増殖に重要であると推測した。そこで、SeV の Reverse genetics の系を用いて、そのことを検証した。その結果、P2 位の S 残基の変異は、SeV の増殖に大きな影響を与えなかったが、P3 位の Q 残基の変異は、SeV の増殖に顕著な低下を引き起こした。すなわち、TMPRSS2 のウイルス性肺炎発症に重要であることの可能性、ならびに、ヒトの呼吸器ウイルスの膜融合タンパク質が、P3 位に Q を持つ意義、を強く示唆する結果が示された。

E. 健康危機情報

なし

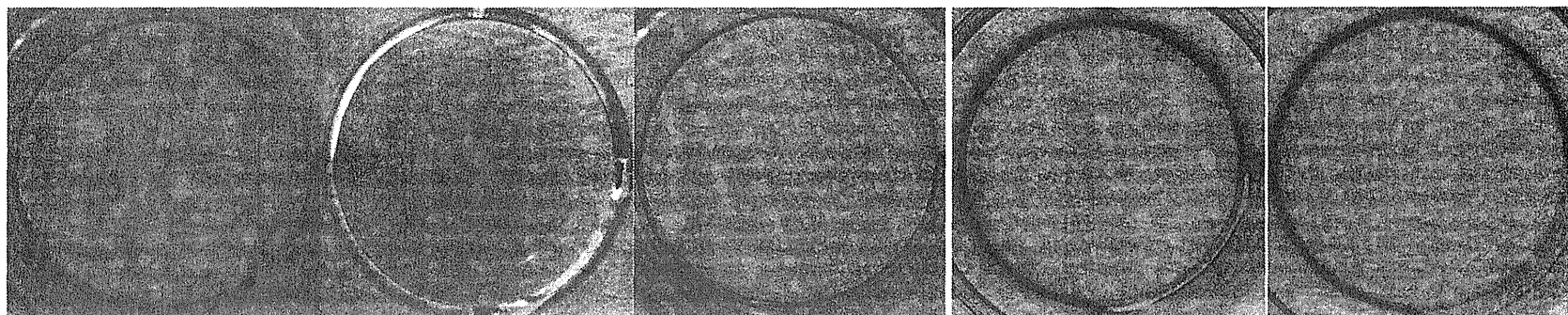
F. 研究発表（本研究に直接関係した学会発表）

1. Abe M, Kato A, Tahara M, Sakai K, Kanou K, Shirato K, Noda M, Kimura H, Ami Y, Matsuyama S, Mizuta K, Takeda M. (2012 September 11-14.

Awaji Island, Hyogo, Japan) Importance of the P3 glutamine residue for proteolytic activation of the fusion protein of parainfluenza viruses by TMPRSS2. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity.

2. Abe M, Kato A, Sakai K, Kanou K, Mizuta K, Shirato K, Matsuyama S, Takeda M. (2012 July 21-25. Madison, WI, USA) Proteolytic activation of the fusion protein of human and murine parainfluenza viruses by the type II transmembrane serine protease TMPRSS2. 31st Annual Meeting for American Society for Virology.
3. 安部昌子、加藤篤、田原舞乃、酒井宏治、加納和彦、白戸憲也、野田雅博、木村博一、網康至、松山州徳、水田克巳、竹田誠、膜貫通型セリンプロテアーゼ TMPRSS2 はパラインフルエンザウイルス F 蛋白を活性化し増殖を促進する、第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 年 11 月 13-15 日
4. 安部昌子、加藤篤、酒井宏治、網康至、加納和彦、水田克巳、河岡義裕、白戸憲也、福原秀雄、前仲勝実、松山州徳、竹田誠 パラインフルエンザウイルス及びインフルエンザウイルス感染における膜貫通型セリンプロテアーゼ TMPRSS2 の生体内での役割解明、First Negative Strand Virus-Japan Symposium、2012 年 1 月、長崎
5. 安部昌子、田原舞乃、酒井宏治、加納和彦、白戸憲也、野田雅博、木村博一、松山州徳、水田克巳、網康至、加藤篤、竹田誠、呼吸器感染症ウイルス増殖における TMPRSS2 の役割ならびに膜融合タンパク P3 位保存グルタミンの重要性について、Second Negative Strand Virus-Japan Symposium、2013 年 1 月、沖縄

Vero細胞



HPIV1

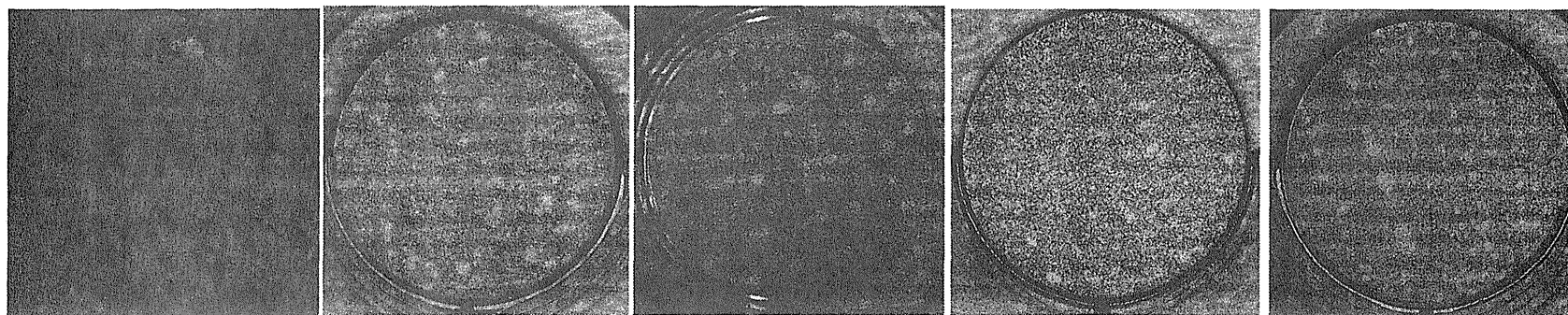
HPIV2

HPIV3

HPIV4

SeV

Vero/TMPRSS2細胞



HPIV1

HPIV2

HPIV3

HPIV4

SeV

図1 Vero細胞ならびにVero/TMPRSS2細胞におけるプラーク形成

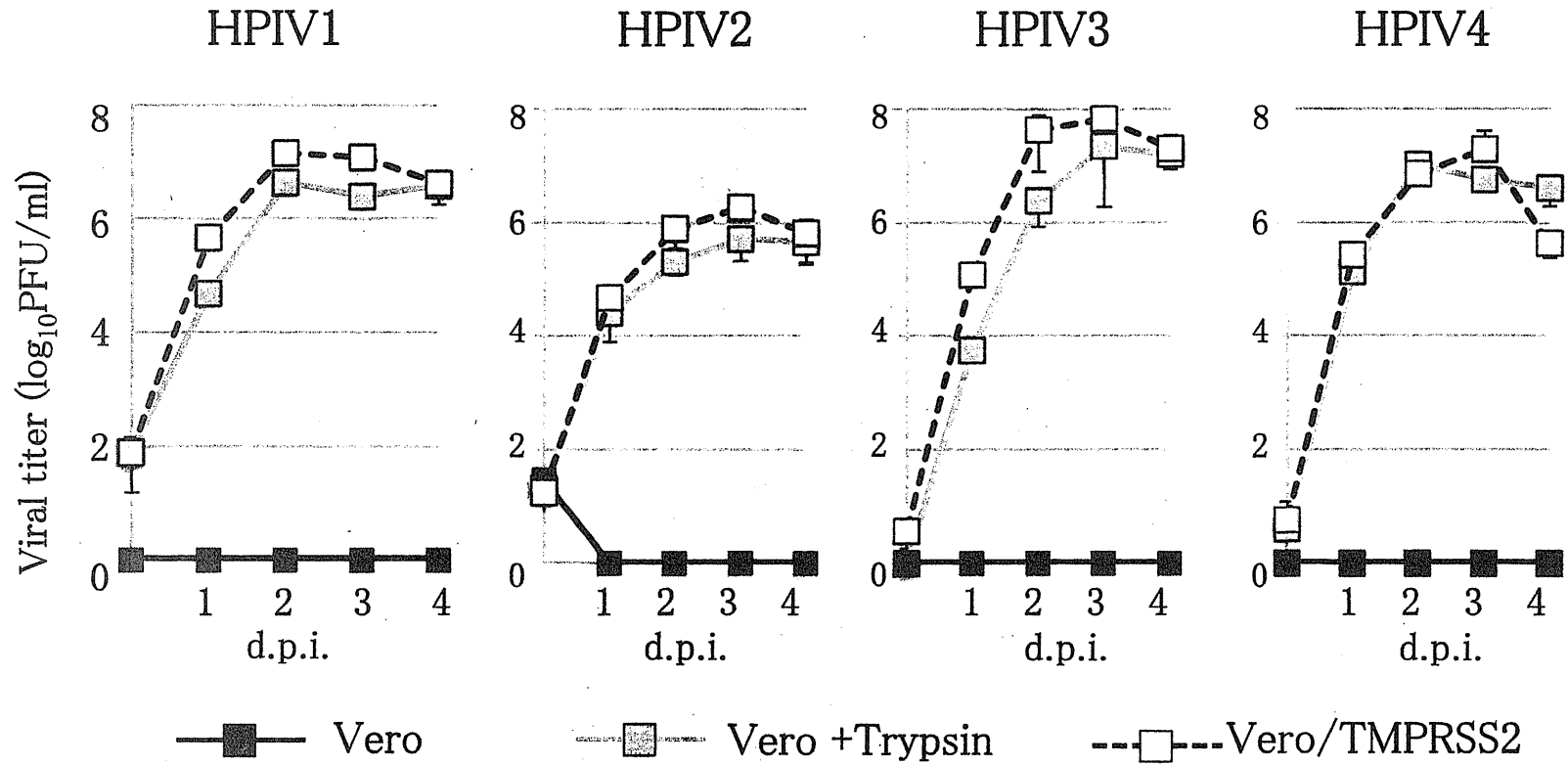


図2 Vero細胞ならびにVero/TMPRSS2細胞における多段階増殖

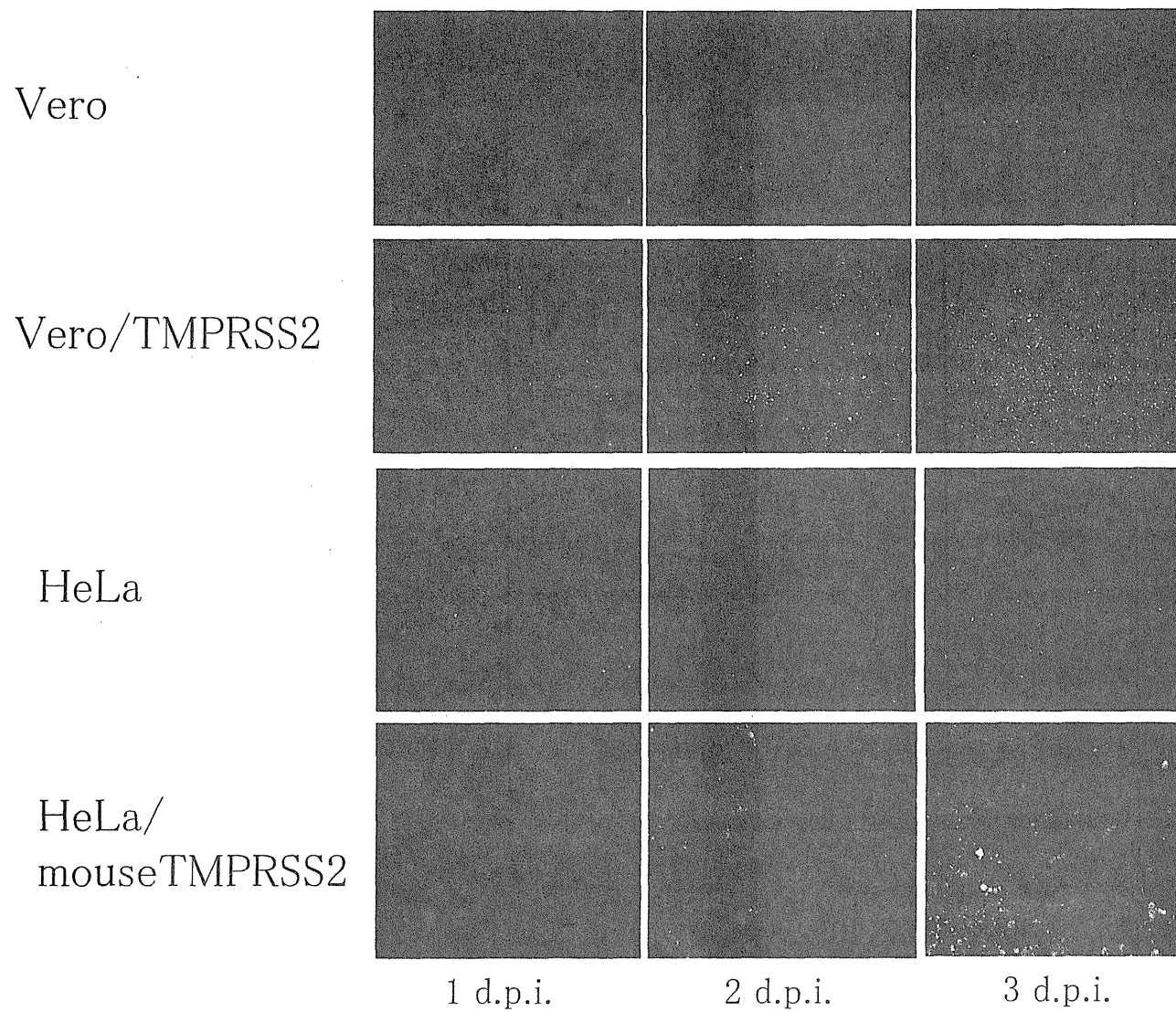


図3 各種培養細胞におけるSeV-RFP(wt)の多段階増殖

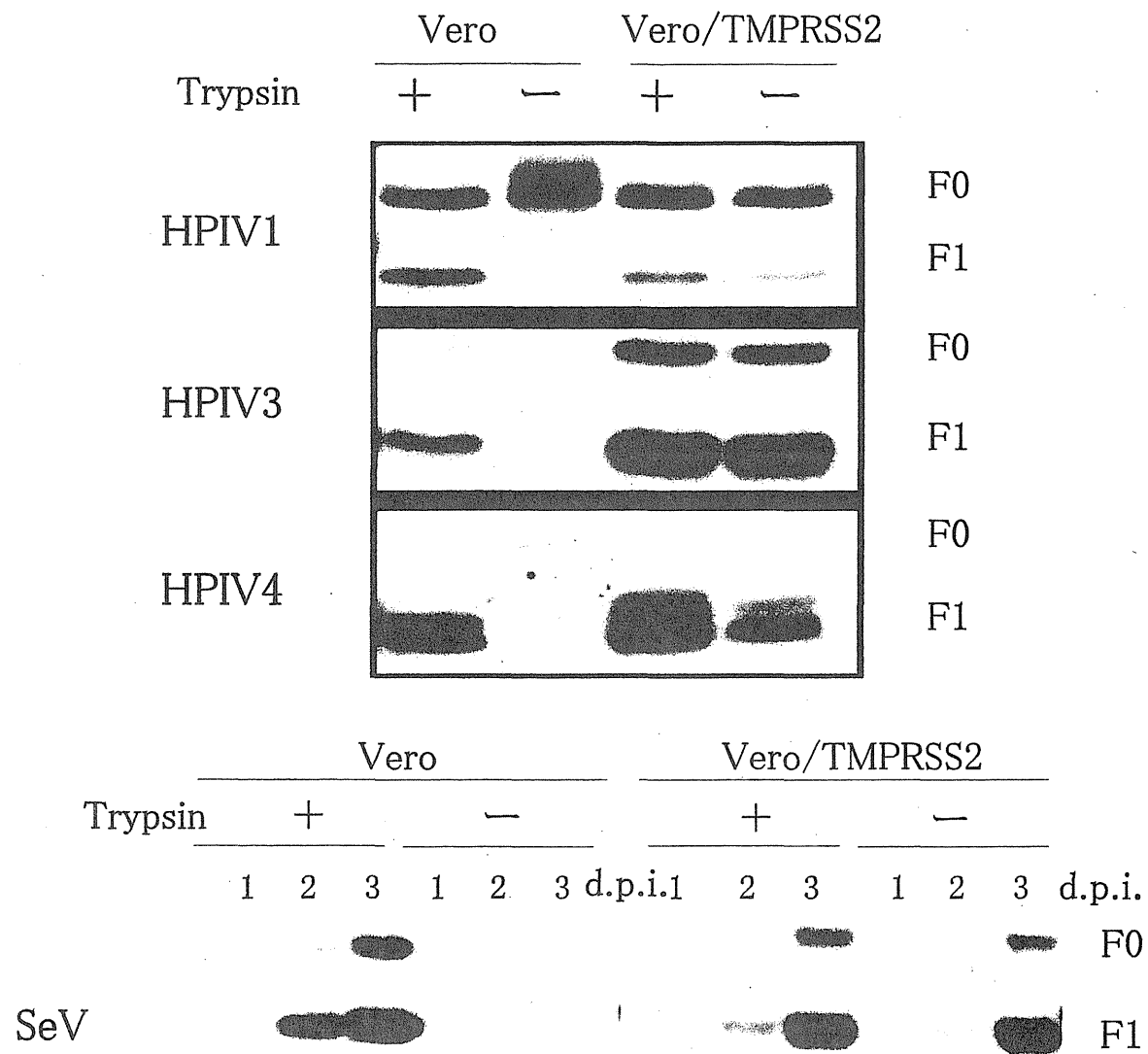
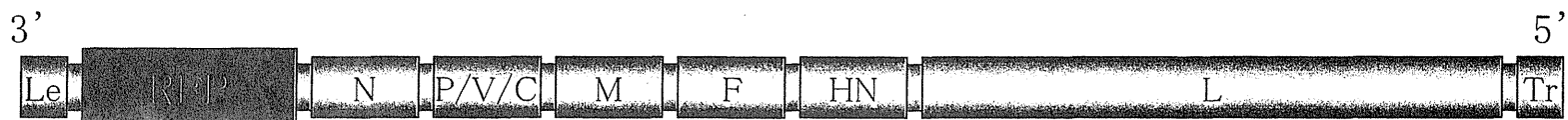


図4 Fタンパク質の開裂性の解析



	P3	P2	P1
Wild-type	Q	S	R
Q114S	S	S	R
Q114A	A	S	R
Q114I	I	S	R
Q114V	V	S	R
S115R	Q	R	R
S115V	Q	V	R

図5 SeV Fタンパク質に導入したアミノ酸変異

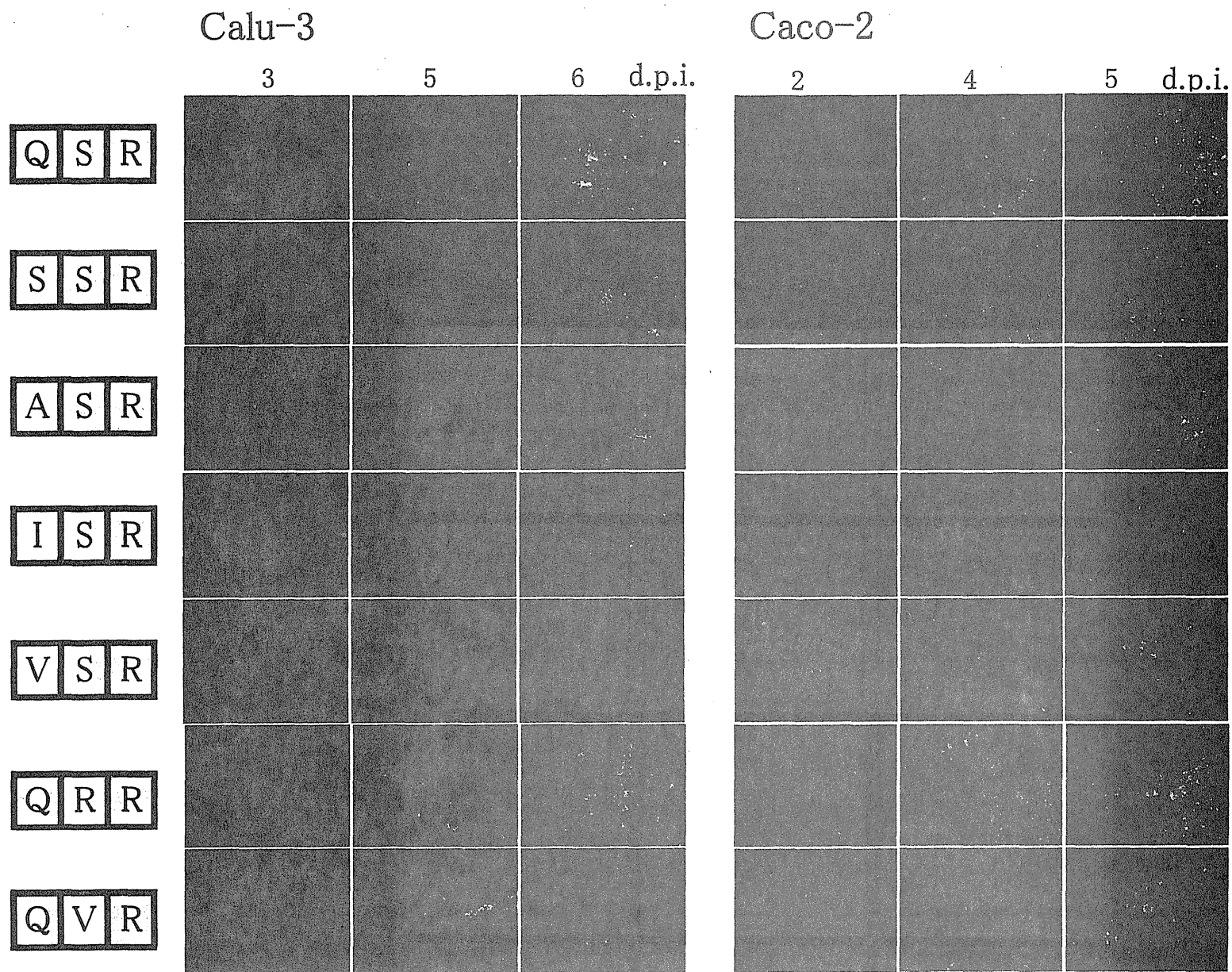


図6 変異SeVのCalu3、Caco2細胞での増殖性

呼吸器感染ヒトコロナウイルス全般の感染機序解明、分離技術の向上、制御に関する研究

研究分担者 松山州徳 ウイルス第三部四室 室長

要旨

ヒトコロナウイルス 229E (HCoV-229E) は、鼻風邪と上気道炎を引き起こす原因病原体である。このウイルスが細胞侵入する時2つの経路を通ることが報告されている。一つは、エンドソーム内酵素であるカテプシンにウイルスのスパイク (S) 蛋白が解裂を受けることにより活性化し、エンドソームの膜とウイルスの膜が融合して、細胞侵入が成立する経路である。もう一つは、細胞外あるいは細胞表面のプロテアーゼにより S 蛋白が活性化され、細胞表面付近で膜融合が起こり、侵入が成立する経路である。本研究では、1966年に分離され研究室で長年維持されている「ATCC 株」と2008年に臨床検体から分離された「臨床株」の二種類の HCoV-229E について、プロテアーゼ感受性を調べた。臨床株は肺胞のプロテアーゼ TMPRSS2 を利用して細胞表面から感染するのに対し、ATCC 株はエンドソームのプロテアーゼを利用する傾向が見られた。我々は、臨床株は生体内の TMPRSS2 を常に利用できる環境にあったためプロテアーゼ感受性を維持しているが、ATCC 株は長年プロテアーゼの無い環境で飼われていたために、プロテアーゼの無い環境に馴化したウイルスに変わったと考えている。HCoV-229E のプロテアーゼ感受性の変化を再現検証するために、臨床株を HeLa 細胞で20回継代したところ、ATCC 株に性質の似た、エンドソームプロテアーゼをより利用できる性質に変わっていた。さらに、臨床株と ATCC 株を混合して継代すると、プロテアーゼの発現した細胞では、両ウイルスは共に同じように増殖するのに対し、プロテアーゼの無い細胞では、3回の継代で臨床株は消失し、ATCC 株だけが残った。これらの結果は、臨床検体から分離したコロナウイルスの維持には、適度な濃度のプロテアーゼあるいは TMPRSS2 発現が必要であることを示唆している。

A. 研究目的

数種の ARI ウイルス（インフルエンザ、メタニューモ、コロナ）は肺に特異的に発現している膜貫通型セリンプロテアーゼ TMPRSS2 を利用して細胞に感染することが報告されている。TMPRSS2 が発現した細胞は、ウイルスの分離技術向上に寄与できるとともに、感染機序の解明及

びウイルス細胞侵入阻害薬の開発にも利用できる可能性がある。一方、我々はセリンプロテアーゼ阻害剤のカモスタットが TMPRSS2 の活性を特異的に阻害し、SARS コロナウイルスの感染を抑える事を報告している。一方我々のこれまでの研究で、ヒトコロナウイルス 229E は1966年に分離された ATCC 株と2008年に分離された臨床株で

は、血清学的性質が異なることを報告している。本研究では、これらのウイルス株の感染経路とカテプシン、TMPRSS2 それぞれの感受性を比較し、臨床株と ATCC 株の性質の違いを明らかにし、実際のヒトの中で流行しているウイルス株のプロテアーゼ感受性と、プロテアーゼ阻害剤による感染阻止効果を明らかにする。

B. 研究方法

TMPRSS2 を発現した細胞(HeLa- TMPRSS2) と、TMPRSS2 非発現細胞(HeLa)に ATCC 株(lab) と臨床株 (ci-N, ci-S) を感染させ感染価を比較した。また、VSV シュードタイプウイルスの表面に、ATCC 株と臨床株の S 蛋白をもたせたものを作成し、細胞侵入実験に用いた。これらのシュードタイプウイルスは感染細胞で GFP を発現するので、緑色の細胞の数をかぞえることにより容易に感染価を調べることができる。さらに、それぞれ ATCC 株と臨床株を 10 の 3 乗 PFU 混合して細胞に感染させ、培養液中のウイルスを Real-time PCR で検出することにより、それぞれのウイルスの存在比を定量した。

C. 研究結果

ATCC 株のウイルス増殖は TMPRSS2 発現細胞と非発現細胞では変わりは無かったが、臨床株では非発現細胞で 10 分の 1 程度低かった(図 1 A)。臨床株はカテプシン感受性が低いと考えられる。同様の結果は VSV シュードタイプウイルスを用いた感染実験でも見られた(図 1 B)。ウイルスの宿主プロテアーゼ利用を解析するために、カテプシンの阻害剤 (EST) と TMPRSS2 の阻害剤 (camostat) を用いてウイルスの細胞侵入阻止効果を調べたところ、ATCC 株では EST に阻止される傾向に、臨床株ではカモスタットに阻止される傾向にあった(図 2)。つまり ATCC 株はエンドソームのカテプシンを、臨床株は細胞表面の TMPRSS2 を利用する傾向があることを示してい

る。この傾向がウイルスの増殖に及ぼす影響を調べるために、ATCC 株と臨床株を混合して増殖させ、その存在比をリアルタイム PCR で定量したところ、TMPRSS2 の無い細胞では、臨床株は 3 回の継代で消失してしまうことがわかった(図 3)。このような ATCC 株の TMPRSS2 非依存的な傾向が、ウイルス分離の時あるいは継代の時にトリプシンの不在に由来すると予想し、これを検証するために、臨床株を HeLa 細胞 (TMPRSS2 非発現細胞) で 2 0 回継代したところ、HeLa 細胞でよく増えるウイルスに変わっていた。つまり、臨床株は ATCC 株のように、カテプシンを利用出来るように馴化したと考えられる。

D. 考察

上記の結果は、臨床分離株は ATCC 株と比較して TMPRSS2 をエンドソームのカテプシンよりも好んで利用し、細胞侵入することを示唆している。しかし、ATCC 株も元は 1966 年に分離された臨床株である。当時の論文を調べると、培養液の組成にはトリプシンが含まれておらず、また継代にもトリプシンが含まれないことから、このウイルスはプロテアーゼの無い環境に馴化したと考えられる。一方、近年分離されたウイルスの培養液にはトリプシンが含まれていた記載がある。生体内のウイルスは肺胞特異的なプロテアーゼ、特に TMPRSS2 を利用して感染すると考えられるので、生体内にあるウイルスそのものを分離するためには、TMPRSS2 発現細胞を使うことが望ましいと思われる。

E. 結論

HeLa-TMPRSS2 細胞は HCoV-229E の臨床株の分離と維持に良い培養細胞である。また、プロテアーゼ阻害剤のカモスタットは、SARS や NL63 と同様に 229E の感染も抑えることができることが解った。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kawase M, Shirato K, van der Hoek L, Taguchi F, Matsuyama S. Simultaneous treatment of human bronchial epithelial cells with serine and cysteine protease inhibitors prevents severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. J Virol. 2012 Jun;86

(12):6537-45.

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

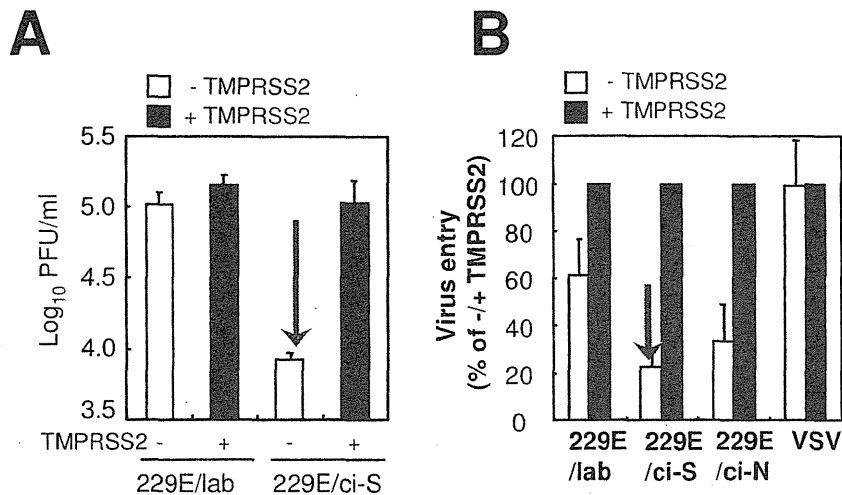


図1. HCoV-229EのTMPRSS2発現細胞への感受性

- A. 10^5 PFUのATCC株(229E/lab)と臨床株(229E/ci-S)をそれぞれHeLa、HeLa-TMPRSS2細胞に感染させた。
- B. ATCC株(229E/lab)と臨床株(229E/ci-S, 229E/ci-N)のVSVシュードタイプをHeLa、HeLa-TMPRSS2細胞に感染させた。

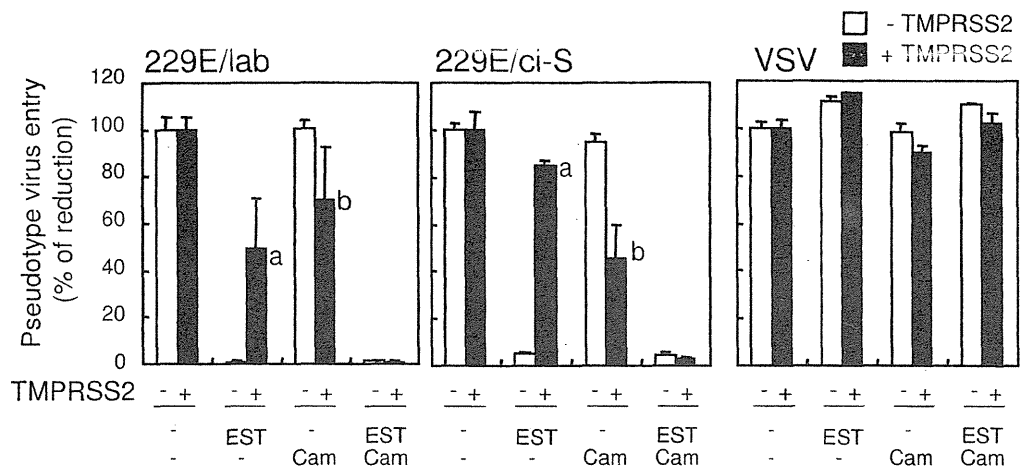


図2. プロテアーゼ阻害剤によるHCoV-229Eの細胞侵入阻止
 カテプシン阻害剤 (EST) とTMPRSS2阻害剤カモスタット (Cam) で細胞を処理し、それぞれのウイルスを感染させた。

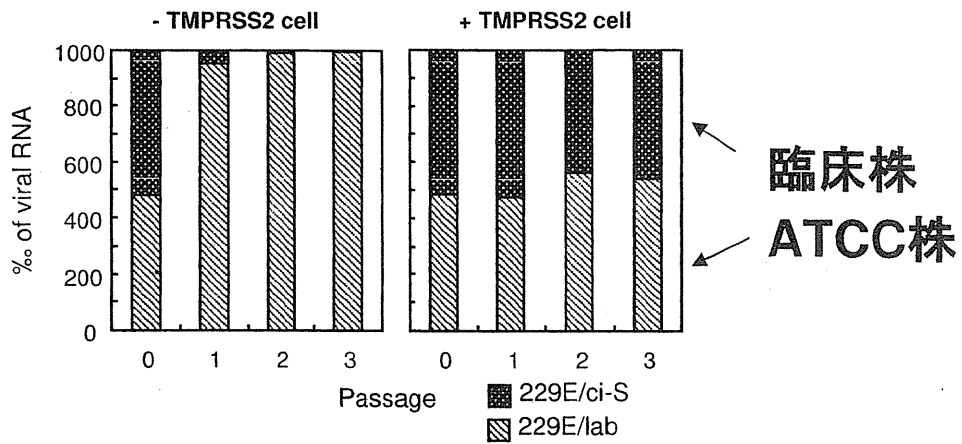
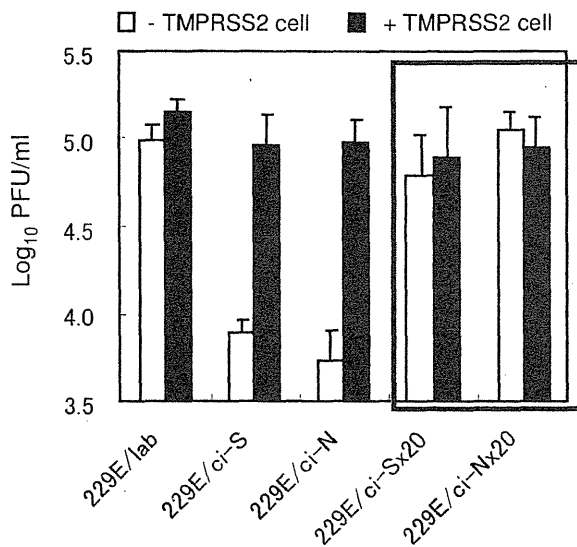


図3. 臨床株とATCC株のプロテアーゼ依存性比較
 10^3 PFUのATCC株(229E/lab)と臨床株(229E/ci-S)を混ぜあわせHeLa、HeLa-TMPRSS2細胞で3回継代し、メジウム中のウイルスの存在比をリアルタイムPCRで測定した。



20回継代臨床株
HeLa細胞で継代

図4. 臨床株の継代によるプロテアーゼ感受性の変化
臨床株(229E/ci-S、229E/ci-S)をHeLa細胞で20回継代し、得られたウイルスのHeLa及びHaLa-TMPRSS2細胞での感染価を調べた。