

動物由来感染症の対応に関する研究

分担研究課題：動物由来新興ウイルスの血清診断法と感染初期過程に関する研究

研究分担者：福士秀悦（国立感染症研究所ウイルス第一部）

研究要旨：中東呼吸器症候群（MERS）は2012年にサウジアラビアで最初に報告のあった、新型コロナウイルスによる感染症である。原因ウイルスである MERS コロナウイルス（MERS-CoV）はコウモリあるいはラクダがヒトへの感染源と推測されているが、これまでのところ調査された地域、動物種は限られており、ウイルスの分布が中東地域に局限するのか、また、ウイルスがどのように自然宿主動物からヒトへ伝播するのか、その経路は今でも不明な点が多い。本研究は、ハイスループットかつ特異性の高い MERS-CoV 抗体検出法を開発し、MERS 血清疫学の技術基盤を確立することを目的とし、MERS-CoV の N および S タンパク質の発現、精製を行った。さらに、MERS-CoV のモノクローナル抗体を作製し、これらの反応性を解析した。MERS-CoV の感染初期過程を解析するためのツールとして MERS-CoV の S タンパク質を外套した VSV シュードタイプの作製を試みた。

研究協力者：松山州徳、白戸憲也、谷 英樹、福岡藍子、吉河奈緒子、大西和夫、（国立感染症研究所）、梁 明秀（横浜市立大学）

A. 目的：

重篤な新興ウイルス感染症のほとんどは動物由来感染症である。動物由来新興ウイルスのヒトへの感染リスクを評価するためには、これらのウイルスの自然宿主動物を同定し、ヒトへの感染経路を解明しなければならない。2012年に中東地域で発生した中東呼吸器症候群(MERS)の原因ウイルス

である MERS コロナウイルス(MERS-CoV)はコウモリあるいはラクダがヒトへの感染源と推測されている。しかし、これまでのところ調査された地域、動物種は限られており、ウイルスの分布が中東地域に局限するのか、また、ウイルスがどのように自然宿主動物からヒトへ伝播するのか、その経路は今でも不明な点が多い。本研究は、ハイスループットかつ特異性の高い MERS-CoV 抗体検出法を開発し、これを利用した MERS 血清疫学の技術基盤を確立することを目的とする。また、MERS-CoV 感受性細胞域を調べ、感受性細胞への吸着・

侵入機構を明らかにすることは、動物からヒトへ伝播する分子メカニズムの解明に重要である。このため MERS-CoV の擬似ウイルス (VSV シュードタイプ) を作製し、これを利用したウイルス感染初期過程の解析を行う。

B. 材料と方法：

- 1) 組換えバキュロウイルス発現系を用いて MERS-CoV N および S タンパク質の発現および精製を行った。
- 2) BHK 細胞に MERS-CoV N および S タンパク質を発現させ、これらを用いて、MERS-CoV N および精製 MERS-CoV を免疫して得られたモノクローナル抗体(mAb)の反応性を解析した。
- 3) MERS-CoV の S タンパク質を 293T 細胞に発現させ、VSV シュードタイプの種ウイルスを接種し、MERS-CoV S タンパク質を外套した VSV シュードタイプ (MERSpv) を作製した。
- 4) MERS-CoV を感染させたラットから採取された血清を用いて、MERS-CoV および MERSpv に対する感染中和を解析した。

C. 研究成果：

- 1) 組換えバキュロウイルス発現系を用いて C 末端に His-tag を付加した MERS-CoV N および S タンパク質の発現を行った (図 1)。N タンパク質全長を発現する組換えバキュロウイル

スを昆虫細胞(Tn5)に感染させ、感染細胞中より 2M Urea 存在下で Ni カラムで精製した。また、MERS-CoV S タンパク質の膜貫通および細胞質内領域を欠損させ、細胞外領域のみ(Sect)を発現する組換えバキュロウイルスを Tn5 に感染させ、細胞培養液中より可溶性の Sect を Ni カラムで精製した。これらの精製タンパク質をウサギに免疫し、抗血清を作製中である。

- 2) MERS-CoV N および S タンパク質を BHK 細胞に発現させた。MERS-CoV N および精製 MERS-CoV を免疫して得られた mAb の反応性をウエスタンおよび蛍光抗体法で解析した。MERS-CoV N に対する mAb のうち、4 クローンは全て MERS-CoV N に特異的に反応した。ウエステンの反応パターンから、mAb#46 は他の 3 種類の mAb(mAb#1,41,45)とはエピトープが異なると考えられた (図 2)。精製 MERS-CoV を免疫して得られた mAb のうち、7 クローンが MERS-CoV S に特異的に反応した (図 3)。
- 3) MERS-CoV の S タンパク質を 293T 細胞に発現させ、MERS-CoV S タンパク質を外套した VSV シュードタイプ (MERSpv) を作製した (図 4)。MERS-CoV を接種したラットから血清を採取し、MERS-CoV および MERSpv に対する感染中和を解析した (図 5)。MERS-CoV そのものに対し

て中和活性を示したラット血清は MERSpv を中和しなかった。MERSpv は他のウイルス（例えばアレナウイルス）と比較し、感染価が 1 / 1 0 0 程度と低く（データ示さず）、このため、作製した MERSpv の感染の特異性は低いと考えられた。

D. 考察：

- 1) MERS-CoV の N および S タンパク質の発現及び精製を行った。従来、同様の手法で作製、精製されたタンパク質を抗原として用い、IgG-ELISA 等による新興ウイルス感染症の抗体検出法の開発を行ってきた。しかし、MERS-CoV の場合、ヒトの間で一般的に流行しているコロナウイルス OC43 や、コウモリコロナウイルス HKU4 と血清学的に交差するため、本研究で作製した N および S タンパク質を抗原として用いた ELISA では MERS-CoV 特異的抗体の検出は困難であると考えられる。そこで、MERS-CoV N あるいは S に対する mAb (図 2 および 3) を用いた競合 ELISA による MERS-CoV 特異的抗体検出法を開発予定である。また、本研究で得られた MERS-CoV の N および S タンパク質をウサギに免疫して抗血清を作製し、競合 ELISA の陽性コントロール血清として用いる予定である。
- 2) MERS-CoV 感染ラット血清を用いた

中和試験では、MERS-CoV そのものを用いた中和結果と MERSpv を用いた中和結果が一致しなかった。これは、MERSpv は他のウイルス（例えばアレナウイルス）と比較し、感染価が 1 / 1 0 0 程度と低く、このため、MERSpv の感染の特異性は低いためであると考えられた。重症呼吸器症候群コロナウイルス(SARS-CoV)の VSVS シュードタイプの場合、SARS-CoV S タンパク質の細胞質内ドメイン 19 アミノ酸を欠失させると、感染価が上がるということが知られている。今後、感染価の高い MERSpv を作製するため、MERS-CoV S の細胞質内ドメインの欠失変異体の作製を進める予定である。

E. 結論

- 1) ハイスループットかつ特異性の高い MERS-CoV 抗体検出法を開発するため、MERS-CoV N および S タンパク質の発現および精製を行った。
- 2) MERS-CoV N あるいは S に対する mAb を用いた競合 ELISA による MERS-CoV 特異的抗体検出法を開発する予定である。
- 3) MERS-CoV の S タンパク質を外套した VSV シュードタイプ(MERSpv)を作製した。MERS-CoV に対する中和試験のための十分な感染価が得られなかった。今後、MERS-CoV S の細胞質内ドメインの欠失変異体の作製を進め、感

染価の高い MERSpv の作製を行う。

Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome in Japan. J Infect Dis. Dec 12. 2013.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1 論文発表

- 1) Sakai K, Yoshikawa T, Seki F, Fukushi S, Tahara M, Nagata N, Ami Y, Mizutani T, Kurane I, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Komase K, Morikawa S, Takeda M. Canine distemper virus associated with a lethal outbreak in monkeys can readily adapt to use human receptors. J Virol. 87(12):7170-7175. 2013.
- 2) Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T, Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M. The First Identification and Retrospective Study of

2. 著書

- 1) 福土秀悦、西條政幸 MERS コロナウイルス感染症 感染症内科 1(6),573-578, 2013

2. 学会発表

- 1) 吉河智城、福土秀悦、谷英樹、宇田晶彦、谷口怜、福間藍子、前田健、高橋徹、森川茂、下島昌幸、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の確定診断に使用されるコンベンショナルPCRの評価、及びリアルタイム定量PCRの比較 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日から12日、神戸
- 2) 福間藍子、福土秀悦、谷英樹、吉河智城、谷口怜、下島昌幸、森川茂、前田健、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の血清学的診断法の開発 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日から12日、神戸
- 3) 長谷川秀樹、亀井敏昭、高橋徹、鈴木忠樹、片野晴隆、中島典子、福土秀悦、下島昌幸、前田健、水谷哲也、森川茂、西條政幸 日本国内で発生した重症熱性血小板減少症候群の1剖検例 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日から12日、神戸

- 4) 西條政幸、高橋徹、前田健、水谷哲也、大松勉、吉河智城、谷英樹、福土秀悦、下島昌幸、福間藍子、緒方もも子、鈴木忠樹、中島典子、片野晴隆、永田典代、長谷川秀樹、山岸拓也、倉根一郎、森川茂 後方視的に重症熱性血小板減少症候群と診断された11名のウイルス学的・臨床的・疫学的研究 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日から12日、神戸
- 5) 森川茂、木村昌伸、福土秀悦、福間藍子、加来義浩、朴ウンシル、谷英樹、吉河智城、井上智、今岡浩一、下島昌幸、西條政幸、前田健 SFTS ウイルス抗体陽性動物の調査 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日から12日、神戸
- 6) 谷口怜、福土秀悦、Masangkay Joseoh、渡辺俊平、大松勉、下田宙、前田健、福間藍子、吉河智城、谷英樹、下島昌幸、西條政幸、明石博臣、吉川泰弘、久和茂、森川茂 フィリピンのコウモリからの重症熱性血小板減少症候群ウイルスに反応する抗体の検出 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日から12日、神戸
- 7) 宇田晶彦、福土秀悦、加来義浩、吉河智城、下島昌幸、新倉綾、井上智、安藤秀二、前田健、西條政幸、森川茂 マダニからのSFTS ウイルス遺伝子の検出 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日から12日、神戸
- 8) 下島昌幸、福土秀悦、谷英樹、吉河智城、福間藍子、谷口怜、前田健、高橋徹、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群ウイルスに対する ribavirin の in vitro 増殖抑制効果 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日から12日、神戸
- 9) 新倉綾、福土秀悦、森川茂、山田靖子 リフトバレー熱ウイルスL蛋白のポリメラーゼ機能におけるC末端領域の重要性 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日から12日、神戸
- 10) 福土秀悦、谷英樹、吉河智城、谷口怜、福間藍子、緒方もも子、下島昌幸、森川茂、西條政幸 ナイジェリアにおけるリフトバレー熱の血清疫学 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日から12日、神戸
- 11) 谷英樹、下島昌幸、福間藍子、谷口怜、吉河智城、福土秀悦、森川茂、前田健、高橋徹、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群ウイルスGPを外套したシュードタイプVSVの作製 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日から12日、神戸
- 12) 高橋徹、前田健、亀井敏昭、水谷哲也、下島昌幸、福土秀悦、谷英樹、吉河智城、森川茂、長谷川秀樹、中島典子、鈴木忠樹、永田典代、片野晴隆、山岸拓也、大石和徳、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の日本における初症例 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日から12日、神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

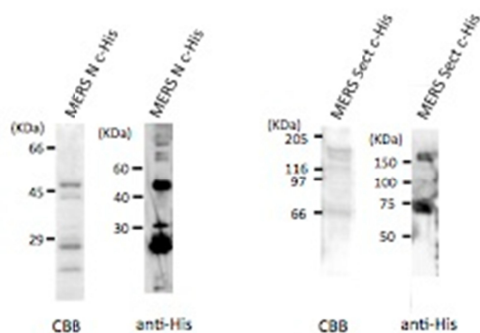
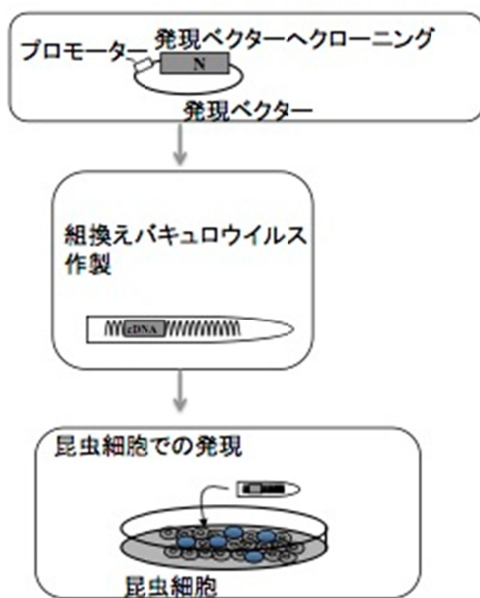
なし

2. 実用新案登録

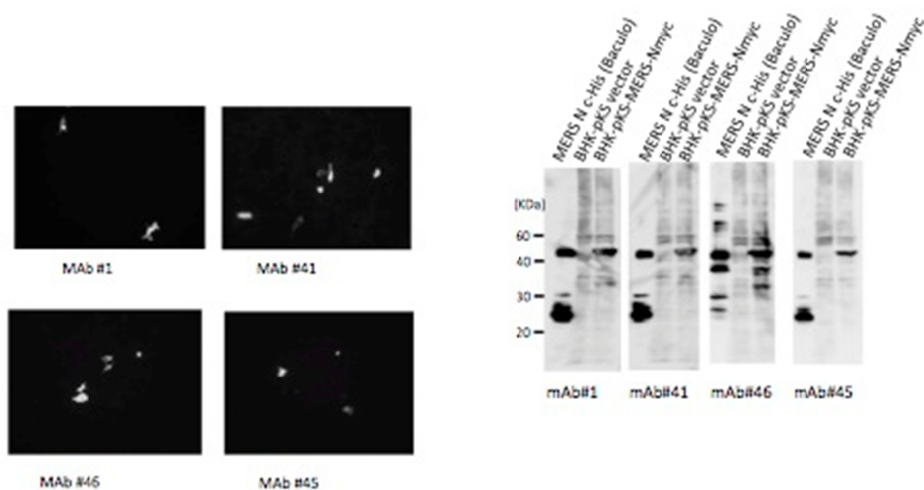
なし

3. その他

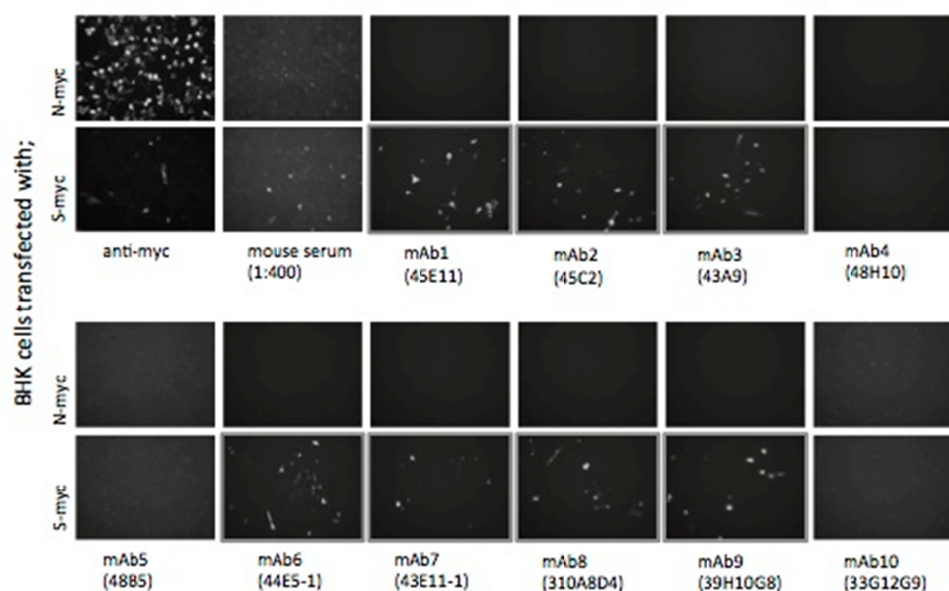
なし



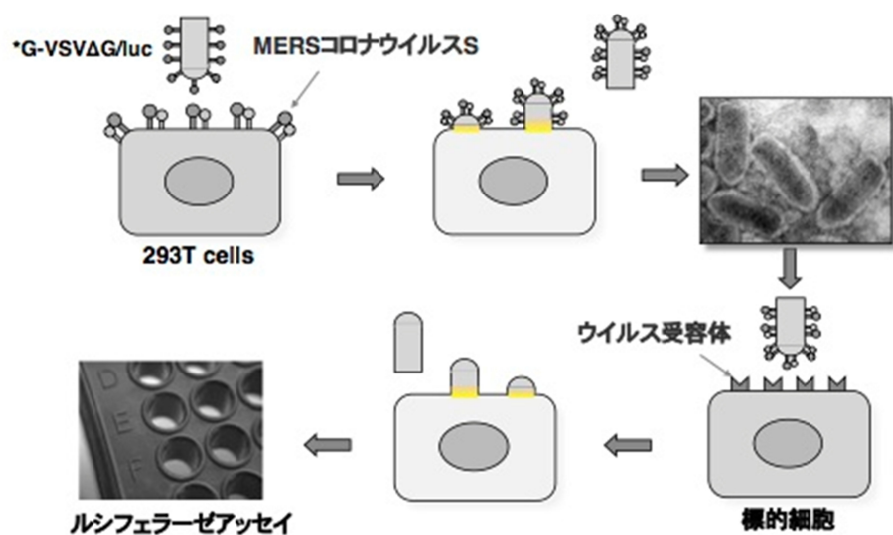
(図1)バキュロウイルス発現系を用いた MERSコロナウイルスN, Sの発現



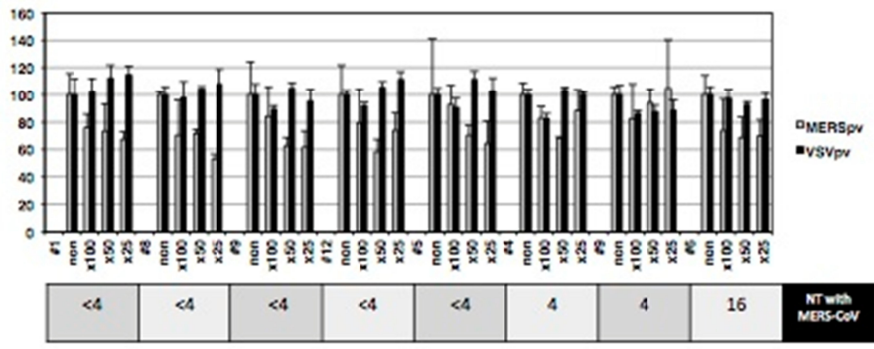
(図2) MERS-CoV Nに対するmAbの反応性の解析



(図3) MERS-CoV Sに対するmAbの反応性の解析



(図4) MERS-CoVシュードタイプVSV(MERSpV)



MERS-CoV感染ラット血清

(図5) MERS-CoVとMERSpvの中和

