

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）

委託業務成果報告書

「アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と共同研究体制の強化に関する研究」

「Molecular analysis and control of acute respiratory virus infections」

分担研究者 松山州徳 国立感染症研究所 ウイルス第三部四室

研究要旨

原因病原体を特定出来ない急性呼吸器疾患の検体が多数存在する。これらを再度詳しく解析すると、その数十パーセントからヒトのコロナウイルスが検出されることが明らかとなっている。一方で健康人からコロナウイルスが検出されることもあり、病原性とコロナウイルスとの関係は今のところ明らかではない。このように近年のマルチプレックス検査、次世代シーケンサーの進歩により、不明病原体が検出されるケースが増えてきた。しかし、最新の技術を駆使してもなお、検出できない病原体があることも事実である。昨年度までの中国側のカウンターパートである中国疾病予防センター CCDC のインフルエンザセンターでは、この不明病原体の検出を目的としていたが、今のところ特定には至っていない。本研究班のような国際的な研究者間のコミュニケーションは、検査技術の向上、および新型コロナウイルス発生のような緊急の国際的な感染症発生時において担当者の円滑な情報交換を可能とする。本年度我々は、呼吸器ウイルスの分離効率の向上を目指して気道由来細胞の気相液相界面培養を開始した。この培養を汎用化することにより、ウイルス分離技術の向上に貢献したい。さらに、中東呼吸器症候群(MERS)コロナウイルスの宿主動物はヒトコブラクダであることが明らかとなっており、我々は国内のヒトコブラクダへの感染の有無を調査したので、これも合わせて報告する。

A. 研究目的

急性呼吸器感染症(ARI)は小児死亡原因の第一位であり、世界では毎日 5,000 人の子供が死亡しているといわれている。ARI ウイルスは咳を介して感染することから感染力が強く、瞬く間に世界中に広がる可能性を内包している。このような感染症に立ち向かうために、我々研究者は国際的なネットワークを構築し、情報を交換できる環境をつくることが必要不可欠であると

考える。我々は中国 CDC の新興感染症研究者の Wenjie Tan と呼吸器感染症研究者の Xu Wenbo と連絡をとり、ARI の共同研究体勢の構築を試みる。

一方、急性呼吸器感染症の検査の結果、原因を特定できない検体は多数存在する。このような病原体の分離技術の向上のための研究をおこない、中国研究者と情報交換することが、本共同研究の目的である。

我々はヒト上気道由来の細胞を入手し、気相液相界面培養を開始した。ヒトコロナウイルス HKU1 は、この培養においてのみ増殖できることが知られているため、この HKU1 の増殖を指標として、呼吸器ウイルスに高い親和性を示す培養細胞の構築を目指す。

さらに中東呼吸器症候群 (MERS) コロナウイルスの宿主動物であるヒトコブラクダについて、日本国内に生息する個体全てについて検査をおこなったので、ここに合わせて報告したい。

これらの課題について中国の研究者と検査体制の現状について意見交換することの意義は大きいと思われる。

B. 研究方法

1. 昨年度までに作成した、コロナウイルス高感受性細胞である HeLa-TMPRSS2 細胞を山形県衛生研究所に提供し、ウイルス分離を試みている。

2. ATCC よりヒト上気道初代培養の HBTE 細胞し、およびヒトの上気道由来の Calu-3 細胞を用い、気相液相界面培養 (air-liquid interface culture) をおこなった。HKU1 コロナウイルスの増殖を指標として、この細胞の上気道への分化を調べた。

3. 日本国内のヒトコブラクダについて MERS コロナウイルスの検査をおこなった。ラクダ検体採取にあたり、厚生労働省結核感染症課から日本動物園水族館協会にラクダ個体数と検体採取の承諾を依頼し、飼育担当者、獣医に協力をお願いした。鳥取砂丘の駱駝屋については、直接協力を依頼した。日本国内に生息するヒトコブラクダ 20 個体から、糞 18 検体、唾液 10 検体、鼻腔拭い液 4 検体、血液 5 検体を採取し、リアルタイム PCR 法と LAMP 方によりウイルス病原体を検出した。またウイルス中和法により血中

の MERS 抗体価を測定した。

C. 研究結果

1. 今のところ、HeLa-TMPRSS2 細胞を用いたコロナウイルスの分離には成功していない。

2. HBTE 細胞と Calu-3 細胞の気相液相界面培養をおこない (図 1)、細胞分化培地添加後 2 週間後に HKU1 コロナウイルス検体の接種を試みているが、この培養によるウイルスの上昇は見られていない。細胞をトリパンブルーで染色し、細胞の生死を確認したところ、僅かな細胞の生存しか確認できなかった。細胞密度を低めにすることでこの細胞を培養できると考え、現在検討中である。

3. 日本国内に生息するヒトコブラクダ 20 個体は全ての検査において、陰性、と判断された。(表 1、表 2)

D. 考察

コロナウイルスによる呼吸器症状は比較的軽度と考えられているため、通常、急性呼吸器症状を示す患者からの検体では、コロナウイルスの検査を行われることは無い。最近では健常なコントロール群の検体からもコロナウイルスが数パーセント検出されることが報告されている。しかし、症状の重さに比例してコロナウイルスのウイルス価は高く、呼吸器症状の重症化に関わっている可能性がある。このような知見はコロナウイルスがこれまでのように無視できない病原体であることを示唆している。さらに海外では中東呼吸器症候群 (MERS) と重症急性呼吸器症候群 (SARS) という、重症肺炎を引き起こすコロナウイルスも見つかっていることから、これらウイルスとの普通のコロナウイルス (229E、OC43、NL63、HKU1) の違いを明らかにし、検査法の精度を高め、疫学的知見を蓄積しておくことは、

日本に上陸する可能性のある MERS コロナウイルスの検査体制の確立、危険度の評価に役立つ知見となる。

2012年以来、アラビア半島では MERS コロナウイルスによる肺炎患者の発生が続いており、簡単に終息しそうな病気であることがわかってきた。このウイルスは1980年代には既にヒトコブラクダに感染しており、現在ではアフリカと中東のヒトコブラクダの殆ど全てに感染していることがわかっている。このウイルスは、培養細胞を用いた実験ではヒトコブラクダのみならず豚や馬、ウサギにも感染する可能性が報告されている。つまり、一旦このウイルスが日本に入ってきた場合、これらの動物で蔓延して、長期的に存続する可能性がある。ブタの下痢症コロナウイルス (PEDV) が2年前に発生し、未だに存続し続けていることから考えても、コロナウイルスが一旦蔓延すると終息させることは困難と思われる。本研究では、国内のヒトコブラクダには MERS が感染していないことを確認できた。このような調査を断続的にでも続けることで、世界の何処かで突発的に現れる高病原性のコロナウイルスの、危険度を正しく評価するための情報源としたい。

E. 結論

急性呼吸器ウイルス検出の感度を高めるための研究をおこなうことと、自然界全体に蔓延するコロナウイルスを指標として調査することで、検査体制を構築し、これを隣国と情報共有することで、新興感染症に対抗するための国際連携に繋がりたい。

F. 研究発表

無し

G. 知的所有権の取得状況

無し

表1. 国内ヒトコブラクダ由来検体による MERS コロनावirus の遺伝子検査

Zoo	Age	Sex	Specimens	upE	ORF1a	RT-LAMP	RT-PCR
A	22	Female	Feces	Neg	Neg	Neg	Neg
			Saliva	Neg	Neg	Neg	Neg
	19	Male	Feces	Neg	Neg	Neg	Neg
			Saliva	Neg	Neg	Neg	Neg
B	4	Female	Feces	Neg	Neg	Neg	Neg
			Saliva	Neg	Neg	Neg	Neg
			Nasal swab	Neg	Neg	Neg	Neg
C	20	Female	Feces	Neg	Neg	Neg	Neg
			Saliva	Neg	Neg	Neg	Neg
			Nasal swab	Neg	Neg	Neg	Neg
D	19	Female	Feces	Neg	Neg	Neg	Neg
	8	Male	Feces	Neg	Neg	Neg	Neg
E	1	Male	Feces	Neg	Neg	Neg	Neg
			Saliva	Neg	Neg	Neg	Neg
	14	Female	Feces	Neg	Neg	Neg	Neg
			Saliva	Neg	Neg	Neg	Neg
	2	Female	Feces	Neg	Neg	Neg	Neg
			Saliva	Neg	Neg	Neg	Neg
	18	Male	Feces	Neg	Neg	Neg	Neg
			Saliva	Neg	Neg	Neg	Neg
1	Female	Feces	Neg	Neg	Neg	Neg	
		Saliva	Neg	Neg	Neg	Neg	
3	Female	Feces	Neg	Neg	Neg	Neg	
		Saliva	Neg	Neg	Neg	Neg	
F	15	Male	Feces	Neg	Neg	Neg	Neg
	29	Female	Feces	Neg	Neg	Neg	Neg
	20	Female	Feces	Neg	Neg	Neg	Neg
	17	Female	Feces	Neg	Neg	Neg	Neg
G	10	Male	Feces	Neg	Neg	Neg	Neg
			Nasal swab	Neg	Neg	Neg	Neg
	9	Female	Feces	Neg	Neg	Neg	Neg
			Nasal swab	Neg	Neg	Neg	Neg

Neg: negative for MERS-CoV RNA

表 2. 国内ヒトコブラクダの血清による MERS コロナウイルスの中和

Zoo	Age	Sex	Antibody titer	Comment
B	4	Female	<20	Trained for riding
E	0	Female	<20	Died
F	26	Female	<20	Died
G	10	Male	<20	Trained for riding
	9	Female	<20	Trained for riding

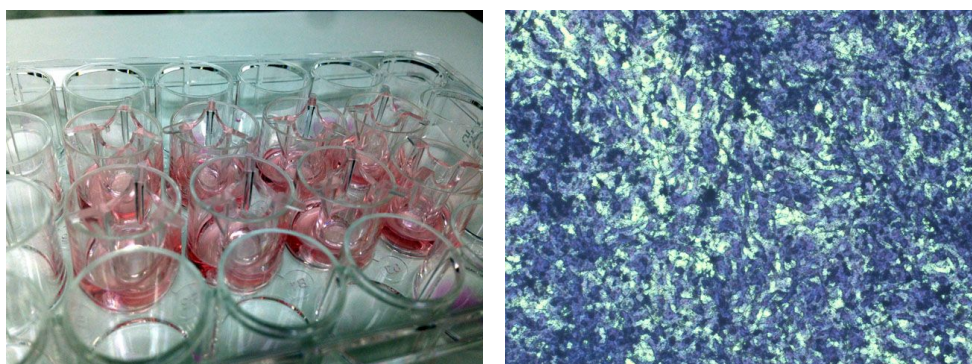


図1 上気道細胞の気相液相界面培養プレートと顕微鏡写真