

201447019A

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

「顧みられない動物由来感染症」の  
対策及び検査法・治療法の確立に  
関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 森川 茂

平成27(2015)年3月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業による委託業務(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)として、森川 茂が実施した平成26年度「顧みられない動物由来感染症」の対策及び検査法・治療法の確立に関する研究」の成果を取りまとめたものです。

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)

(委託業務題目)

「顧みられない動物由来感染症」の対策及び検査法・  
治療法の確立に関する研究

(H26-新興実用化-一般-019)

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 森川 茂  
(国立感染症研究所)

平成27(2015)年3月

## 目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
「顧みられない動物由来感染症」の対策及び検査法・治療法の確立に関する研究.....	1
森川 茂（国立感染症研究所獣医科学部）	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. プロジェクトの研究総括.....	9
森川 茂（国立感染症研究所獣医科学部）	
2. 中東呼吸器症候群（MERS）のリスク評価と診断法.....	13
松山州徳（国立感染症研究所 ウイルス第二部）	
3. ニパウイルス感染症の血清診断法.....	19
加来義浩（国立感染症研究所 獣医科学部）	
4. コウモリレオウイルスのゲノム情報と診断法.....	29
下島昌幸（国立感染症研究所 ウイルス第一部）	
5. イシククル(Issyk-kul)熱の診断法と疫学.....	35
福士秀悦（国立感染症研究所 ウイルス第一部）	
6. 新規ブルセラ属菌の遺伝子情報と診断法.....	43
今岡浩一（国立感染症研究所 獣医科学部）	
7. 新規カプノサイトファーガ属菌の遺伝子情報と診断法.....	55
鈴木道雄（国立感染症研究所 獣医科学部）	
8. 野兎病弱毒株の作出とワクチン効果.....	67
宇田晶彦（国立感染症研究所 獣医科学部）	
III. 学会等発表実績.....	75
III. 研究成果の刊行物・別刷.....	77

## I. 委託業務成果報告（総括）

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（総括）

「顧みられない動物由来感染症」の対策及び検査法・治療法の確立に関する研究  
(H26-新興実用化-一般-019)

業務主任者： 森川 茂 国立感染症研究所獣医科学部長

研究要旨：多くの動物由来の新興・再興感染症は散発的に患者が発生するため「顧みられない動物由来感染症」として公衆衛生的にも臨床的にもあまり重視されていない。しかし、これらには重篤で重要なウイルス感染症や細菌感染症がある。本研究では、6ヶ月と短期間の研究であるため、ポイントを絞って「顧みられない動物由来感染症」の制御に繋がる成果を得るための研究を行い、以下の成果を得た。1) 中東呼吸器症候群(MERS)はアラビア半島全域で新興した重篤な MERS コロナウイルス(MERS-CoV)による急性呼吸器感染症で、ヒトコブラクダを感染源動物とする。本研究ではヒト、ラクダ以外の動物にも容易に感染することから、MERS-CoV の種特異性は低いと考えられた。ブタは感受性が高いため中東外の国で養豚場などに MERS-CoV が浸淫すると、ブタを感染源として流行が起きる可能性がある。現在開発された MERS の遺伝子診断法は、動物感染によりウイルスに変異が生じても対応可能であることも確認された。2) マレーシア、バングラデシュ、インドに加えてフィリピンでも流行が確認されたニパウイルス感染症は、ニパウイルスによる神経症状、呼吸器症状を主徴とし致死率が高いコウモリを感染源とする。これまでに整備されている遺伝子診断、中和試験に加えて、組換え抗原による IgG, IgM 抗体検出法 (ELISA, IF) 及び陽性対照サル血清を作製した。3) コウモリレオウイルスはヒトの重篤な急性呼吸器感染症の原因となり、東南アジアで感染者が発生しているがこれまで診断法がなかった。組換えウイルス蛋白質を用いた抗体検出系、保存性の高い領域を標的とする遺伝子診断法を開発した。4) イシクル熱はダニ媒介性ウイルス感染症で、中央アジアで流行している。国内のダニから分離されたイシクルウイルスの遺伝子配列を決定し、遺伝子診断法を開発した。遺伝子診断法は、患者の診断だけでなく、国内のダニ等におけるウイルス浸淫度を調査することに応用できる。5) カエルから分離された新規ブルセラ属菌2株のほぼ全塩基配列を決定した。既知のブルセラ属菌と遺伝的に異なる新規ブルセラ属菌の *B. inopinata* と同様、カエル由来株は既知のブルセラ属菌と遺伝的に異なること、これらの novel ブルセラ属菌間でも遺伝的にそれぞれ距離があったことからカエルが novel ブルセラ属菌の宿主の一つであると考えられる。これらを識別可能な遺伝子検査法を開発した。6) イヌ、ネコの咬傷等により感染するカプノサイトファーガ属菌感染症患者から、*C. canimorsus* とは遺伝子的に異なる新規菌株が3株分離された。これらは、*C. canimorsus* とは DNA hybridization で 12~15%と新

菌種であった。全遺伝子配列を決定した結果、3株は同一菌株であり、*Capnocytophaga* 属の新菌種であった。得られた遺伝子配列情報から PCR 法による鑑別診断系を確立した。  
7) バイオテロ対策上も極めて重要な野兔病菌には、生ワクチンがロシア、米国で開発されているが病原性復帰が大きな問題である。新規病原性遺伝子として同定した *pdpC* 遺伝子を KO した野兔病菌を用いて、その生ワクチンとしての有効性を検証した。

業務項目の担当責任者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名：

松山州徳（国立感染症研究所 ウイルス第二部）、加来義浩（国立感染症研究所 獣医科学部）、下島昌幸（国立感染症研究所 ウイルス第一部）、福士秀悦（国立感染症研究所 ウイルス第一部）、今岡浩一（国立感染症研究所 獣医科学部）、鈴木道雄（国立感染症研究所 獣医科学部）、宇田晶彦（国立感染症研究所 獣医科学部）

#### A. 研究目的：

多くの動物由来の新興・再興感染症は散発的に患者が発生するため、「顧みられない動物由来感染症」として公衆衛生的にも臨床的にもあまり重視されていない。本研究では、動物由来ウイルス感染症と動物由来細菌感染症に関して以下の研究を行い、これら「顧みられない動物由来感染症」の制御に繋がる成果を得ることを目的とする。

MERS: 中東で新興したコロナウイルスによる新興感染症で本年4月には急激に患者数が増加し、国内では指定感染症（病原ウイルスは特定3種）に指定された。MERS コロナウイルスは複数の動物に感受性がある。これらの動物由来細胞で継代培養して遺伝子変異がおきるかを調べ、変異による遺伝子検査法への影響が想定される場合には、事前に対応可能な遺伝子検査系を開発する。

ニパウイルス感染症: マレーシア、バンダラディッシュ等以外に、本年4月にフィリピンでニパウイルス感染症の発生が確認

された。サルにニパウイルス特異的 IgM 抗体を作製し、IgM 抗体検出系を確立する。

ネルソンベイオルソレオウイルス感染症: コウモリのレオウイルス (PRV) による重篤な呼吸器感染症であるが、診断法が開発されていない。そこで、PRV 遺伝子検査法と抗体検査法を確立する。

イシククル (Issyk-kul) 熱: クリミア・コンゴ出血熱ウイルスに近縁なイシククルウイルスによる感染症で高熱・頭痛を主徴とし、キルギスタン・タジキスタンに常在する。昨年、イシククルウイルスと非常に近縁なウイルスが分離され、国内にも同種のウイルスが常在する可能性が示唆された。本研究では、遺伝子診断法・血清診断法を開発し、国内の人や動物の疫学、ダニの分子疫学を行う手法を確立する。

ブルセラ症: 近年、新種のブルセラ属菌が種々の動物や人から分離されている。人からの分離株は無尾類由来菌と遺伝的に近縁と考えられる。そこで、愛玩用無尾類から分離したブルセラ属菌の遺伝子配列を決定し、新規遺伝子診断法、鑑別法を開発する。

カプノサイトファーガ感染症: イヌ、ネコの口腔内常在菌による重症敗血症で、近年患者数が増加している。カプノサイトファーガカニモルサスと遺伝的に異なる同種菌が分離されたことから、これらの遺伝子、生物学的解析を行う。

野兔病: 野兔病菌の新規病原性遺伝子 KO 株を作製した。本株のワクチンとしての有用性を、病原性解析、強毒株チャレンジ防御能を解析して明らかにする。

## B. 研究方法：

各業務項目の委託業務成果報告の研究  
方法に詳細を記載した。

## C. 研究結果：

### 1) 中東呼吸器症候群 (MERS) のリス ク評価と診断法：

2012 年に中東で新興した MERS は  
2014 年 4 月に急激に患者数が増加し、日  
本国内では 2 類感染症に指定された。  
MERS コロナウイルスは、中東とアフリ  
カ全域のヒトコブラクダに蔓延している  
ことから、容易には排除できない。ヒト  
は、ラクダからの直接感染以外に、ヒト-  
ヒト感染、ラクダ以外の動物を介した感  
染が疑われており調査が続けられている。  
本研究から、特にブタ、ウサギ、サル由  
来の細胞に MERS コロナウイルスが効率  
良く感染することがわかった。サル細胞  
での継代によりウイルスの細胞侵入に関  
わる部位に遺伝子変異が見られたが、他  
の細胞での継代培養では変異は認められ  
なかった。このことから、MERS コロナ  
ウイルスは宿主に対する種の壁が低く  
様々な動物由来細胞に感染できるが、そ  
れぞれの動物細胞における選択圧は低く  
遺伝子変異は起こり難いと考えられた。  
また、現行の遺伝子検査法に影響を及ぼ  
すような変異ではないことから、試験法  
の改良の必要性はなかった。

### 2) ニパウイルス感染症の血清診断法：

ニパウイルス (NiV) 感染症は、1998-99  
年のマレーシアで新興感染症として発生  
した後、バングラデシュ、インドで発生  
し、2014 年にはフィリピンでも流行が確  
認された。国内での患者発生はないが、  
アジア・アフリカ各地で、自然宿主のオ  
オコウモリから NiV 抗体が確認されてい

ることから NiV は広範囲に分布すると考  
えられる。NiV 感染症の感染拡大の阻止  
には発症初期の迅速診断がきわめて重要  
となる。国立感染症研究所では、シュー  
ドタイプによる代替中和試験、不活化し  
た NiV 抗原による IgG-ELISA は確立し  
ているが、IgM 検出系は確立していない。  
そこで、組換え NiV-N 蛋白質をカニクイ  
ザルに免疫して IgM 陽性対照血清、IgG  
陽性対照血清を作製した。また、組換え  
NiV-N 蛋白質を用いて IgM 抗体検出系、  
IgG 抗体検出系を開発し、作製した IgM、  
IgG 陽性対照血清を用いて評価した。そ  
の結果、組換え抗原を用いた IgM-ELISA、  
IgG-ELISA が開発された。また、NiV-N  
蛋白質を恒常的に発現する HeLa 細胞を  
樹立し、これを用いた蛍光抗体法による  
IgM、IgG 抗体検出法も開発した。

### 3) コウモリレオウイルスのゲノム情報 と診断法：

近年、コウモリレオウイルス Pteropine  
orthoreovirus (PRV) によるヒトの呼吸器疾  
患 (PRV 感染症) がマレーシアおよびイン  
ドネシアにおいて新興し、日本国内への輸  
入例も 1 例発生した。ヒトからヒトへの感  
染事例も知られており、国内で流行を起こ  
すことも懸念される。PRV 感染症の診断法  
が確立されていないことから、PRV の遺伝  
子検査法と抗体検査法を確立することを  
目的とした。遺伝子検査法では PRV の遺伝  
子配列情報を比較し、保存性の高い S2  
segment 内にプライマーを設計し、遺伝子  
検出系を開発した。抗体検査法では、複数  
ある PRV 株のウイルス蛋白質のアミノ酸  
配列を比較し、保存性が高い major outer  
capsid (MOC) 蛋白質を抗原に用いること  
とした。組換えバキュロウイルスにより発



現した組換え MOC 蛋白質を抗原とした ELISA を開発した結果、日本への輸入症例の回復期血清の IgG 抗体を効率よく検出できた。

#### 4) イシククル(Issyk-kul)熱の診断法と疫学：

イシククル熱は高熱、頭痛、筋肉痛を主徴とする、ダニあるいは蚊媒介性のイシククルウイルスによる感染症で、中央アジア（タジキスタンなど）で患者が報告されているがウイルス学的に詳細な解析がなされていない。2011年、国内で採取されたコウモリマルヒメダニからイシククルウイルスと遺伝的に非常に近縁なウイルスがダニから分離され、国内にもイシククルウイルスまたは近縁ウイルスが常在することが示唆された。本研究では、国内で分離されたイシククル様ウイルスの全遺伝子配列を決定し、感受性細胞を同定した。また、リアルタイム PCR による遺伝子検出法を確立し、患者発生時の診断法として、また国内のダニおよびイシククル様ウイルスの分子疫学を行う手法としても有用である。

#### 5) 新規ブルセラ属菌の遺伝子情報と診断法：

既知のブルセラ属菌とは異なる新種のブルセラ属菌 *B. inopinata* が患者から同定されているがその起源は不明である。近年、カエル類から新規ブルセラ属菌が相次いで分離された。本研究では2株のカエル由来ブルセラ属菌の全遺伝子配列を決定した。その結果、Classic species (*B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. canis*, *B. neotomae*)、

Marine species (*B. ceti*, *B. pinnipedialis*) と Novel species のげっ歯類由来 *B. microti* は単一クレードを形成し、カエル分離株は、*B. microti* 以外の Novel species、*B. inopinata* BO1、*B. inopinata*-like BO2、*B. sp.* 83/13、*B. sp.* NF2653 と別のクレードを形成した。また、遺伝子配列情報を基にカエル由来ブルセラ属菌特異的遺伝子検出法を開発した。

#### 6) 新規カプノサイトファーガ属菌の遺伝子情報と診断法：

イヌ・ネコに咬傷・搔傷を受けた際に感染する *Capnocytophaga canimorsus* 感染症の重症敗血症例3例から *C. canimorsus* とは遺伝子的に異なる菌株が分離された。この新規 *Capnocytophaga* 属菌の全遺伝子配列を決定した。また、生物学的解析を行った。その結果、新規 *Capnocytophaga* 属菌3菌株は、*C. canimorsus* との DNA-DNA ハイブリッド形成試験において、同一菌種の基準である相同値 70%以上を大きく下回る 12~15%であった。さらに 16S rRNA および *gyrB* 遺伝子の相同値、また各種の生理・生化学的性状および理化学分析の結果から、3株同士は同一菌種であり、*Capnocytophaga* 属の新菌種であると考えられた。新規 *Capnocytophaga* 属菌特異的な 16S rRNA および *gyrB* 遺伝子を標的とする PCR 法を開発し、*C. canimorsus* を含む既知の *Capnocytophaga* 菌種との鑑別診断法を確立した。

#### 7) 野兔病弱毒株の作出とワクチン効果：

野兔病菌は非常に高い感染性を示し、致死率も高いことから、生物兵器として使用

されることが懸念されている。日本国内では、2008年に5症例報告されたのみであるが、動物の疫学的調査から国内にも以前広範囲に病原菌が存在していることが分かっている。野兎病菌のワクチンは、かつて米国で実験従事者用の生ワクチンが用いられたが病原性復帰等の問題から現在では用いられていない。ロシアでは、旧ソ連時代に開発された生ワクチンがある。これら以外に、野兎病菌のワクチンはない。そこで、既に我々が作製した新規病原性遺伝子 (*pdpC* 遺伝子) を挿入破壊により KO した野兎病菌株 ( $\Delta pdpC$  株) の生ワクチン効果を検証した。 $\Delta pdpC$  株は、マウスに対する病原性を消失しているがカニクイザルでの病原性は不明である。そこで、カニクイザルに  $\Delta pdpC$  株を感染させたところ弱毒化が確認された。サルに強毒株を感染させると、2頭いずれも野兎病を発症し致死性的であった。一方、 $\Delta pdpC$  株感染3週間後に強毒株を接種すると、2頭中1頭が非致死性的野兎病を発症したが、1頭は発症しなかった。いずれも3週間生残した。この結果から、カニクイザルにおいて  $\Delta pdpC$  株は生ワクチンとして有効であることが示唆された。今後、 $\Delta pdpC$  株の接種量、接種回数、有効免疫期間等の検討が必要である。

#### D. 考察：

多くの動物由来の新興・再興感染症は散発的に患者が発生するため、「顧みられない動物由来感染症」として公衆衛生的にも臨床的にもあまり重視されていない。本研究では、動物由来ウイルス感染症と動物由来細菌感染症に関して以下の研究を行い、これら「顧みられない動物由来感染症」の

制御に繋がる成果を得ることを目的とした。なお、本研究は6ヶ月と短期間の研究であるため、ポイントを絞って「顧みられない動物由来感染症」の制御に繋がる成果を得るための研究を行なった。その結果、1) MERS-CoV はヒトコブラクダ、ヒト以外動物にも感受性を有するものが多く、その種特異性は低いと考えられた。ブタは感受性が高いため中東外の国で養豚場などに MERS-CoV が浸淫すると、ブタを感染源として流行が起きる可能性がある。一方、国立感染症研究所で開発された MERS の遺伝子診断法は、動物感染によりウイルスに変異が生じても対応可能であることも確認された。2) マレーシア、バングラデシュ、インドに加えてフィリピンでも流行が確認されたニパウイルス感染症に関して、これまでに整備されているウイルス遺伝子診断、中和試験に加えて、組換え抗原による IgG, IgM 抗体検出法 (ELISA, IF) 及び陽性対照サル血清を作製した。3) コウモリレオウイルスはヒトの重篤な急性呼吸器感染症の原因となり、東南アジアで感染者が発生しているがこれまで診断法がなかった。今回、組換えウイルス蛋白質を用いた抗体検出系、保存性の高い領域を標的とする遺伝子診断法が開発された。4) イシクル熱はダニ媒介性ウイルス感染症で、中央アジアで流行している。国内のダニから分離されたイシクル様ウイルスの遺伝子配列を決定し、高感度な遺伝子診断法を開発した。遺伝子診断法は、患者の診断だけでなく、国内のダニ等におけるウイルス浸淫度を調査することに応用できる。5) カエル由来新規ブルセラ属菌2株のほぼ全塩基配列を決定した。既知のブ

ルセラ属菌と遺伝的に異なる新規ブルセラ属菌の *B. inopinata* と同様、カエル由来株は既知のブルセラ属菌と遺伝的に異なること、これらの novel ブルセラ属菌間でも遺伝的にそれぞれ距離があったことからカエルが novel ブルセラ属菌の宿主の一つであると考えられた。これらを識別可能な遺伝子検査法も開発した。6) カプノサイトファーガ属菌感染症患者から分離された、新規菌株3株の性状と遺伝子配列解析を行った結果、これら3株は同一菌株であり、*C. canimorsus* とは異なる新菌種であった。これらの鑑別診断可能な PCR 法を開発した。7) 野兎病菌の新規病原性遺伝子として同定した *pdpC* 遺伝子を KO した野兎病菌株を用いて、その生ワクチンとしての有効性が検証された。

これらの研究成果は、目的に合致するものであり、今後の実用化に向けてさらに詳細な検討が必要であるが、当初の目標は達成できた。

#### E. 結論

- 1) MERS-CoV はラクダ、ヒト以外動物にも感受性を有する動物が多く、その種特異性は低いと考えられた。国立感染症研究所で開発された MERS の遺伝子診断法は、動物感染によりウイルスに変異が生じても対応可能であることを確認した。
- 2) ニパウイルス感染症の血清診断に用いられる IgG, IgM 抗体検出法 (ELISA と IF) を組換え抗原を用いて開発した。また、陽性対照血清として、組換え抗原免疫サル血清を作製した。
- 3) コウモリレオウイルス感染症の組換えウイルス蛋白質を用いた抗体検出系と遺伝子診断法を開発した。

- 4) イシククル熱はダニ媒介性ウイルス感染症で、中央アジアで流行している。国内のダニから分離されたイシククル様ウイルスの遺伝子配列を決定し、高感度な遺伝子診断法を開発した。遺伝子診断法は、患者の診断だけでなく、国内のダニ等におけるウイルス浸透度を調査することに応用できる。
- 5) カエル由来ブルセラ属菌株は既知のブルセラ属菌と遺伝的に異なること、最近分離同定された novel ブルセラ属菌との間でも遺伝的にそれぞれ距離があることから、カエルが novel ブルセラ属菌の宿主の一つであると考えられた。これらを識別可能な遺伝子検査法も開発した。
- 6) カプノサイトファーガ属菌感染症患者から *C. canimorsus* とは異なる新菌種を分離・同定した。これらの鑑別診断可能な PCR 法を開発した。
- 7) *pdpC* 遺伝子を KO した野兎病菌株が生ワクチン候補株として有用であることが示された。

#### F. 健康危険情報

MERS は国内では輸入症例の報告はない。ニパウイルス感染症は、2014年にフィリピンで初めて流行した。コウモリレオウイルスによる急性呼吸器感染症は、2006年以降東南アジアでの感染による患者発生が7回報告され、家族内感染も起きている。タジキスタン等の中央アジアで流行しているイシククル熱の病原ウイルスに非常に近縁なウイルスが国内で分離・同定されたが、患者は確認されていない。新規ブルセラ属菌がカエルより分離された。これによる患者発生は報告がない。カプノサイトファーガ属菌感染症患者3名から *C. canimorsus* とは異なる新菌種を分離・同定した。野兎病は北米で

は強毒型による患者が発生しているが、国内では患者は2008年以降発生がない。

G. 研究発表

各研究分担者及び「III. 研究成果の刊行に関する一覧表」に記載した。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

## II. 業務委託成果報告（業務項目）

別紙 3

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（業務項目）

「顧みられない動物由来感染症」の対策及び検査法・治療法の確立に関する研究

(H26-新興実用化-一般-019)

プロジェクトの研究総括

担当責任者： 森川 茂 国立感染症研究所獣医科学部長

研究要旨：多くの動物由来の新興・再興感染症は散発的に患者が発生するため「顧みられない動物由来感染症」として公衆衛生的にも臨床的にもあまり重視されていない。しかし、これらには重篤で重要なウイルス感染症や細菌感染症がある。本研究では、6ヶ月と短期間の研究であるため、ポイントを絞って「顧みられない動物由来感染症」の制御に繋がる成果を得るための研究を行なった。業務主任者は、プロジェクトの研究総括として、これらの研究の方針を個別に担当責任者と協議し、研究の方針と進め方を決定した。また、短期間の研究を効率良く推進するため、担当責任者に研究協力者を配置して、期間内に研究成果が出るよう調整した。その結果、当初の研究目的を達成できた。

A. 研究目的：

多くの動物由来の新興・再興感染症は散発的に患者が発生するため、「顧みられない動物由来感染症」として公衆衛生的にも臨床的にもあまり重視されていない。本研究では、動物由来ウイルス感染症と動物由来細菌感染症に関して以下の研究を行い、これら「顧みられない動物由来感染症」の制御に繋がる成果を得ることを目的とする（図1）。業務主任者は、プロジェクトの研究総括として、これらの研究の方針を個別に担当責任者と協議し、研究の方針と進め方を決定し、気管内に研究成果が得られるよう調整した。

B. 研究方法：

各業務項目の推進にかかる打合せと研究の進め方を協議し、プロジェクトの取りまとめを行った。なお、各委託業務項

目毎の研究方法に関しては、各委託業務成果報告の研究方法に詳細を記載した。

C. 研究結果：

各委託業務項目の研究方針が決定され、短期間のうちに研究目的、方針に沿った研究が適切に実施された。各項目の研究成果は以下の各委託業務成果報告に記載した。新種のブルセラ属菌、カプノサイトファーガ属菌の全遺伝子配列決定に関しては、次世代シーケンサー Miseq (illumina 社)による解析を実施したが、研究協力者として奥谷晶子、木村昌伸(国立感染症研究所獣医科学部)、吉河智城(同ウイルス第一部)の協力を得た。また、組換えニパウイルス抗原の作成・精製には、朴ウンシル、木村昌伸(国立感染症研究所獣医科学部主任研究官)らの協力を得た。これらの協力により期間内

に研究を遂行できた。

#### D. 考察：

多くの動物由来の新興・再興感染症は散発的に患者が発生するため、「顧みられない動物由来感染症」として公衆衛生的にも臨床的にもあまり重視されていない。本研究は、研究期間6ヶ月と限定されたことから、研究対象とした感染症は、MERS等の公衆衛生上重要だが診断法・実態把握等が十分ではない感染症であり、かつ国内で発生するリスクがあるか実際に発生している感染症を選択し対象とした。また、研究計画が6ヶ月で可能とするため、ポイントを絞って「顧みられない動物由来感染症」の制御に繋がる成果を得るための研究を行なった。業務主任者は、プロジェクトの研究総括として、これらの研究の方針を個別に担当責任者と協議し、研究の方針と進め方を決定した。また、短期間の研究を効率良く推進するため、担当責任者に必要に応じて研究協力者を配置して、期間内に研究成果が出るよう調整した。その結果、当初の研究目的を達成できた。

これらの研究成果は、目的に合致するものであり、今後の実用化に向けてさらに詳細な検討が必要であるが、当初の目標は達成できた。

これらの成果により、1) MERS コロナウイルスが、動物に感染して遺伝子変異が導入されても、現行の遺伝子検査法で対応可能であることが確認された。2) ニパウイルス感染症の輸入症例が発生した場合に、複合的な診断検査が可能となった。3) コウモリレオウイルス感染症の遺伝子診断法、血清診断法が確立され、疑い患者の検査を可能とした。4) イシククルウイルス感染症の遺伝子診断法が開発された。5) 新たに同定されたカエ

ル由来新規ブルセラ属菌の鑑別診断が開発され疑い患者の検査が可能となった。

6) 患者から分離された新規カプノサイトファーガ属菌の鑑別診断が開発され、患者の検査が可能となった。7) 野兔病の新規生ワクチン候補の有効性が明らかになった。

#### E. 結論

多くの動物由来の新興・再興感染症は散発的に患者が発生するため、「顧みられない動物由来感染症」として公衆衛生的にも臨床的にもあまり重視されていない。これらの内、特に重要と考えられる感染症に関してポイントを絞った研究計画を作成し、期間内に当初の研究計画に沿った成果を得ることができた。詳細は、各委託業務成果報告に詳細を記載した。

#### F. 健康危険情報

MERS は国内では輸入症例の報告はないが、中東などでの患者発生は現在も終息していない。ニパウイルス感染症は、2014年にフィリピンで初めて流行した。コウモリレオウイルスによる急性呼吸器感染症は、2006年以降東南アジアでの感染による患者発生が7回報告され、家族内感染も起きている。タジキスタン等の中央アジアで流行しているイシククル熱の病原ウイルスに非常に近縁なウイルスが国内で分離・同定されたが、患者は確認されていない。新規ブルセラ属菌がカエルより分離された。これによる患者発生は報告がない。カプノサイトファーガ属菌感染症患者3名から *C. canimorsus* とは異なる新菌種を分離・同定した。野兔病は北米では強毒型による患者が発生しているが、国内では患者は2008年以降発生がない。

G. 研究発表

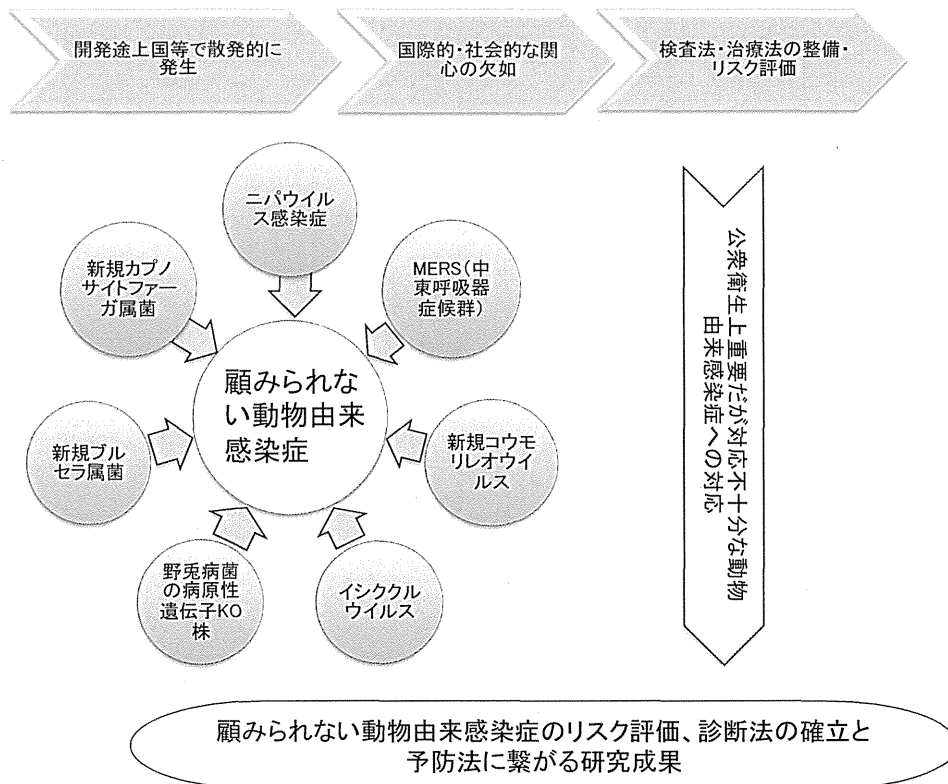
なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。



図1. 「顧みられない動物由来感染症」の対策及び検査法・治療法の確立に関する研究のスキーム



## 中東呼吸器症候群（MERS）のリスク評価と診断法

担当責任者： 松山州徳 国立感染症研究所 ウイルス第三部四室長

研究要旨：2012年に中東で新興した MERS コロナウイルスは2014年4月には急激に患者数が増加し、日本国内では2類感染症に指定された。このウイルスは中東とアフリカ全域のヒトコブラクダに鼻風邪の病原体として蔓延していることが明らかとなっており、簡単には排除できない病原体であることがわかってきた。ほとんどの感染者はラクダ接触歴が無いことから、ヒトからヒトへ不顕性感染している可能性と、ヒトとラクダ以外の動物が媒介している可能性が疑われており、調査が続けられている。本研究において、様々な動物由来の培養細胞を使った実験では、特にブタ、ウサギ、サル由来の細胞にこのウイルスがよく感染することがわかった。サル由来の細胞では、ウイルスの細胞侵入に関わる部位に遺伝子変異が見られたが、現行の遺伝子検査法に影響を及ぼすような変異は見られなかった。本研究の結果から MERS コロナウイルスは宿主に対する種の壁が低く、様々な動物由来細胞によく感染でき、それぞれの動物細胞における選択圧は低く、遺伝子変異は起こり難いと考えられる。現行のリアルタイム PCR 検査法を変更する必要は無いと考えられる。

### A. 研究目的：

中東呼吸器症候群コロナウイルス（MERS-CoV）はヒトに感染して重症の肺炎を引き起こす。アラビア半島全域で散発的な発生がみられるが、昨年4月には急激に患者数が増加し（1ヶ月に500人以上）、日本国内では2類感染症に指定された。今までに MERS-CoV が検出された動物は、ヒトとコウモリとヒトコブラクダである。コウモリについては、サウジアラビアのコウモリ（*Taphozous perforatus*）から MERS-CoV と同一の190ntの遺伝子断片が検出されているが、コウモリとヒトの直接

の接触は少なく、ヒトへの感染源であるとは考え難い。ヒトコブラクダについては、中東とアフリカの広範囲に棲息する大多数の個体から MERS-CoV に対する抗体が検出されている。それぞれの患者発生地域でヒトから見つかるウイルス遺伝子の特徴と、ラクダから見つかるウイルス遺伝子の特徴が一致することから、ラクダが感染源の一つで有ることは、疑いのない事実である。ラクダの出産から哺乳の時期である冬季にラクダの鼻腔や咽頭からウイルスが検出されることが多く、ヒトへはラクダとの接触やラクダミルクを飲むことによ

って感染すると考えられている。しかし、ほとんどの感染者はラクダ接触歴が無いこともわかっている。症状の無い感染（不顕性感染）者も多く見つかり、感染に気づかないうちにヒトからヒトへウイルスが広がっている可能性が疑われている。一方、MERS-CoV はヒトとラクダだけでなく、サル、ウマ、ウサギ、ブタ、コウモリ等が感染可能であることが、ウイルス受容体（DPP4）の配列情報と培養細胞での感染実験からと予想されており（図2）、これらの動物に定着し蔓延する可能性がある。そこで、本研究では日本に棲息する種々の動物の細胞で継代したウイルスの遺伝子変異を調べ、動物種により変異の入り方に違いが生じるかどうかを明らかにする。また、変異により、現在の遺伝子検査法（PCR、LAMP）への影響が想定される場合には、事前に対応し遺伝子検査系を改良する。

#### B. 研究方法：

ウサギ及びブタの上気道細胞培養：

ウサギ（JW メス、SPF、500-600g）の上気道を細かく切り分け、2mm サイズの破片を専用培地（Lifeline cell tech, LM-0007）の中で一週間培養し、カルチャープレート（IWAKI、4810-010）に浸出してくる細胞を二週間培養、トリプシンで剥離し、気相液相界面培養器具（Greiner, Thin Certs-TCC Inserts 24 well）の中でレチノイン酸入り培地で2週間培養した。得られた細胞に MERS-CoV (EMC strain) を 10 の 2 乗 PFU 感染させて1日後、培地中のウイルスの感染価を VERO/TMPRSS2 細胞を用いて調べた。同様の操作をブタの気道（東京芝浦臓器株式会社より購入）を用い、専用培地（Promocell、C-21070）中で培養した。種々の細胞への感染実験：

表2に示した様々な動物由来細胞株を準備し、100PFU の MERS-CoV(EMC strain)を感染させ、24時間後の培地中のウイルス価を調べた。ウイルス価の測定には VERO/TMPRSS2 細胞（MERS-CoV の感染後に明確な細胞融合を示す）を用いた。

動物由来細胞株では数回の継代を行い、ウイルスを回収した。表2に書いた継代回数後、遺伝子配列を解析したが、遺伝子検査に影響する部位であるN遺伝子、E遺伝子、ORF1a 遺伝子、及び病原性に影響する部位であるS遺伝子を調べた。

#### C. 研究結果：

サルに由来する細胞では MERS-CoV は非常によく増殖し、1000 倍以上のウイルス価の上昇が見られた。またブタとウサギ由来細胞でも 100 倍以上のウイルス増殖が見られた。この時、これらの細胞での細胞変性効果は見られなかった。イヌとハムスターとマウス由来の細胞には全く感染しなかった。感受性の高い細胞において、MERS-CoV を数代継代し、上記の N、E、ORF1a、S の遺伝子配列を調べたところ、Vero 細胞で継代したウイルスの S 遺伝子に変異が見られた。この変異はスパイク蛋白の膜融合に関わる部位であるため、ウイルスの性質が変わる可能性があり、今後解析する予定である。この変異による現行の遺伝子検査法への影響は無い。

ヒト由来細胞である Calu-3 細胞と HBTE 細胞に、MERS-CoV はよく感染したが、HeLa 細胞へは全く感染しなかった。HeLa 細胞は MERS-CoV のレセプターを発現していないため、MERS が感染しないことは既に報告されているので、MERS-CoV 非感受性のコントロール細胞として用いた。

特にウイルス増殖が高いウサギとブタについて、動物検体から上気道細胞を分離し、感染実験をおこなった。100PFUのMERS-CoVを感染させたウサギの上気道細胞（気相液相界面培養）から培地を回収し、ウイルス価を測定したところ、11,000PFUのウイルスが検出され、100倍程度のウイルス価の上昇が見られた（表1、図2）。この時、上気道細胞での細胞変性効果は見られなかった。気相液相界面に至っていない単層培養のブタ上気道細胞では、感染後一日目で32,000PFUのウイルスが検出された（図2）。これら細胞で継代されたウイルスのN、E、ORF1a、Sの遺伝子配列に変異は見られなかった（表1）。

#### D. 考察：

MERS-CoVはブタとウサギの細胞で十分感染できることが解った。MERS-CoVはヒトとラクダ以外の動物にも容易に感染できることから、MERS-CoVの感染宿主の種特異性が低いことを再確認できた。この感染症が日本で蔓延する可能性として、ブタを宿主とし、ブタの中に蔓延する場合が考えられる。現在アメリカ大陸と東アジアのブタで流行しているPEDV（ブタ流行性下痢症ウイルス）もコロナウイルスの一種であるが、排除することが極めて難しい病原体である。MERS-CoVがPEDVと同様にブタで蔓延した場

合、終息させることの難しさが懸念される。

またMERS-CoVはマウスやラット等の小動物に感染しないため、動物実験ができず、治療薬やワクチンの効果を確認することができない。本研究はブタとウサギを用いる感染実験の可能性をはかるものでもある。

#### E. 結論

本研究の結果から、日本に棲息する動物のうち少なくともウサギとブタには、呼吸器にMERS-CoVが感染する可能性があることが示唆された。また、MERS-CoVは宿主に対する種の壁が比較的強く、様々な動物由来細胞に効率よく感染できるが、その反面それぞれの動物細胞に感染しても選択圧はかからず、遺伝子変異は起こり難いと考えられる。このため、動物に感染したMERS-CoVを検出するために、現行のリアルタイムPCR検査法を変更する必要は無いと考えられる。

#### F. 研究発表

無し

#### G. 知的所有権の取得状況

無し