

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04599

研究課題名(和文) コロナウイルスの変異機構と病原性獲得機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of mutation in coronaviruses and analysis of their pathogenesis

研究代表者

前田 健 (Maeda, Ken)

山口大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：90284273

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：1)解析のほとんどされていない国内のtype1 FIPV3株の性状の比較を行った。更に、全塩基配列を決定し、その配列を基に感染性クローンの作出に成功した。今後、遺伝子レベルでの猫コロナウイルスの病原性の解明が飛躍的に進むと期待される。

2)猫に最も致死性である猫伝染性腹膜炎の病原性に関与していると考えられるアミノ酸の変異を同定した。更に、これら変異はFIP多発多頭飼育施設においても証明された。今後は、この領域を調べることにより強毒ネココロナウイルスであるFIPVを診断できる。

研究成果の概要(英文)：1)Three Japanese FIPV were compared by examination of viral growth, ADE activity and reactivity with monoclonal antibodies. Furthermore, their complete genomes were determined. Successfully, infectious clone of C3663 was established. Now, it is expected that pathogenesis of FIP will be clarified using this infectious clone.

2)The mutations associated with pathogenesis of lethal FIPV were determined. These mutations were also confirmed in the shelter where FIP sporadically emerged. In future, it is possible to differentiate pathogenetic FIPV from less virulent feline coronaviruses by examination of this region.

研究分野：獣医微生物学

 キーワード：コロナウイルス 変異 病原性 ネココロナウイルス 猫伝染性腹膜炎 フェレットコロナウイルス
 イヌコロナウイルス

1. 研究開始当初の背景

コロナウイルスは遺伝子変異を繰り返し、新たな宿主や病原性を獲得している。SARS コロナウイルスにはコウモリやハクビシン、MERS コロナウイルスにはラクダなどがその発生に関わっているのは明らかである。動物の体内で増殖する際に変異が生じて人への感染性を獲得したと考えられている。生産動物では 2013 年より国内 38 都県で豚流行性下痢ウイルスが流行し、120 万頭が死亡または殺処分されている。伴侶動物においては、猫において致死であるにも関わらず予防法が未だ存在しない猫伝染性腹膜炎ウイルス (FIPV) が存在する。これらコロナウイルス感染症の最大の問題点は“ウイルスの変異”である。

申請者らは猫コロナウイルスの変異について研究を実施してきた。その結果、II 型猫コロナウイルスは猫の体内で、I 型猫コロナウイルスと II 型犬コロナウイルスが相同性組換えにより生じ、猫に致死を引き起こしていることを証明した。また、この II 型猫コロナウイルスは猫間であまり広がっていないことが確認された。申請者らは、「II 型猫コロナウイルスは、全身で増える能力を獲得したことにより致死的な病気を引き起こす能力を獲得したが、一方、腸から排泄され伝播する能力を失った」と考えている。

では「何故、遺伝子が欠損しても全身で増殖する能力を保持し、強毒に変異することが出来るのであろうか？」答えは「ADE (抗体依存性感染増強) 活性を保有する=抗体を利用して細胞に進入できる」からである。申請者は、幾つかの ADE 活性における発見をした。

1) 猫コロナウイルス感染猫血清には ADE 抗体が存在せず、猫伝染性腹膜炎を発症した猫血清にのみ ADE 抗体が存在する。ADE 抗体の出現が重症化に関与していることを示した。

2) ADE 抗体の存在により猫コロナウイルスは急速 (5 分以内) に細胞に感染することが可能になった。すなわち抗体の存在によりウイルスの細胞への伝播が加速することが分かった。

しかし、ADE 活性はデング熱などでも重要であるにも関わらず、未だ不明な点が多い。

更に、国内のペットとして飼育されているフェレットから新規コロナウイルス、実験動物として飼育されているシマリスからこれまでのコロナウイルスとは全く異なるコロナウイルス、和歌山県のユビナガコウモリから新規コロナウイルスの検出に成功している。まだまだ未知のコロナウイルスが国内にも存在することは明白である。

2. 研究の目的

コロナウイルスは劇的な進化を遂げ、宿主域や病原性を変えている。その結果、SARS コロナウイルスや MERS コロナウイルスが出現した。獣医領域には、致死的な猫伝染性腹膜炎を引き起こす猫コロナウイルスが存在する。このウイルスは猫体内で変異することによって、感染性と病原性を変化させていることが判明してきた。重要な点は、我々は変異した後のウイルスを解析していたことである。自然界で存続する (できる) ために猫コロナウイルスが保持している機能を我々は見過ごしてきた。本申請研究ではコロナウイルスによる新興感染症の出現予測を可能にするために、自然界に存在するウイルスを知り、どのような変異を遂げて強毒化していくのかを解明する。

3. 研究の方法

1) TypeI FIPV3 株の培養細胞での増殖

TypeI FIPV である Yayoi 株、C3663 株、C3678 株を培養細胞 fcwf-4 細胞に感染させて培養上清におけるウイルス力価を測定した。

2) TypeI FIPV の ADE 活性の比較

TypeI FIPV と FIP 発症猫血清希釈液を 37°C1 時間反応後、fcwf-4 細胞を用いてプラークアッセイを実施した。プラーク出現後、ホルマリン固定し、クリスタルバイオレットで染色し、プラーク数を数え、コントロールと比較した。

3) TypeI FIPV とモノクローナル抗体との反応性

C3663 株をマウスに免疫し、作製したモノクローナル抗体を用いて、各種 FIPV 感染細胞の間接蛍光抗体法 (IFA) を実施した。二次抗体には FITC ラベル抗マウス IgG 抗体を用いた。

4) TypeI FIPV3 株の全塩基配列の決定

TypeI FIPV である Yayoi 株、C3663 株、C3678 株の感染細胞から QIAGEN RNAeasy Mini Kit を用いて RNA を抽出し、各種プライマーを用いて RT-PCR を実施し、得られた断片の塩基配列を決定した。末端配列は RACE 法にて決定した。

5) TypeI FIPV の変異部位の解析

S 蛋白のフリント開裂部位、1058 番目と 1060 番目のアミノ酸、3c 蛋白、7b 蛋白に注目してプライマーを作製し、これまで我々が保有している FIP 猫のサンプル、マルピーライフテックより分離された FIP 発症猫と健常猫からのサンプルを用いて RT-PCR を実施し、得られた産物の塩基配列を決定した。

6) 継続的 FIP 発生多頭飼育施設の調査

継続的に FIP が発生する多頭飼育施設の猫のサンプルを太刀川動物病院より 13 頭のサンプル（糞便、腹水、胸水、リンパ節など）を分与していただいた。N 遺伝子、3abc 遺伝子、7ab 遺伝子、S 遺伝子の RT-PCR を実施し、得られた断片の塩基配列の決定を行った。さらに C3663 株を用いた中和試験により、中和抗体価と ADE 活性を測定した。

7) TypeI FECV Tachikawa-12F 株の全塩基配列の決定

糞便サンプルから検出される Tachikawa-12F の全塩基配列を前述した TypeI FIPV の全塩基配列の決定に準じて決定した。

8) TypeI FECV の感染実験

Tachikawa-12F の糞便を DMEM で約 10% の乳剤として、0.45 μ m のフィルターで滅菌後、口腔より 4 頭の猫に接種した。経時的に体重、体温、血清・口腔拭い液・肛門拭い液・糞便を採集した。得られたサンプルはウイルス遺伝子の検出、中和抗体の検出などに供試した。

9) C3663 株感染性クローンの作出

大阪大学微生物学研究所の神谷先生の協力のもと、C3663 株の全長配列を Bac ベクターに挿入した。組み換えた Bacmid を fcwf-4 細胞にトランスフェクションして、上清を回収した。

4. 研究成果

1) TypeI FIPV3 株の性状解析

TypeI FIPV は分離が困難であり、国内での分離株は少ない。我々が保有する 1970 年代にマウスの脳で高継代後に分離された Yayoi 株、鹿児島で 1994 年に FIP の猫から分離された C3663 株、また近所の猫から分離された C3678 株を MOI 0.001 で fcwf-4 細胞に感染させ増殖性を比較した（図 1）。その結果、C3663 株と Yayoi 株は感染後 3 日目にピークに達するのに対して、C3678 株は 2 日目をピークとしてその後急速に感染性を失った。C3663 株と Yayoi 株は比較的増殖がよく、C3678 株は急速に感染性が失活することが判明した。C3678 株は刺激に対して高感受性だと推測された。

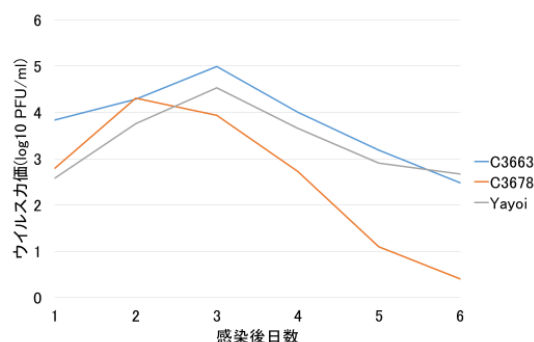


図1 TypeI FIPVのfcwf-4細胞での増殖性の比較

FIPV 発症猫の血清には、fcwf-4 細胞への感染を増強する ADE 活性が存在している。同一 FIP 発症猫血清を用いて 3 株の ADE 活性を比較した結果、C3678 株は 5120 倍希釈で 7 倍以上の感染増強が認められた。一方、Yayoi 株では 81920 倍希釈で 5 倍以上、C3663 株では 163840 倍希釈で 3 倍の感染増強が認められた（図 2）。ADE 活性においても株間で大きな違いが認められた。これらの違いが、用いた抗血清の反応性にも依存すると考えているが、ウイルスが失活しやすい C3678 株で ADE 活性が上がっているのは興味深い。

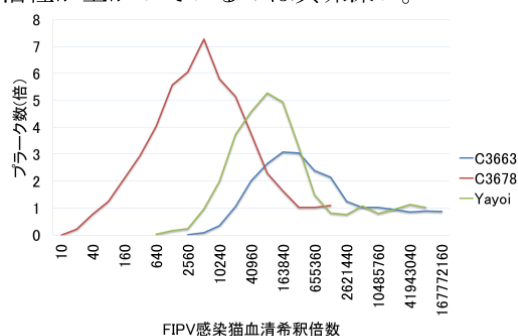


図2 TypeI FIPV3株のADE活性の比較

Yayoi 株と C3663 株を経口・経鼻感染した結果、C3663 株は 2 頭が接種後 40 日以内に死亡し、91 日目に 1 頭 FIP の発症が剖検時に観察された。一方、Yayoi 株接種猫は 3 匹とも FIP を発症することはなかった（寺田ら、図 3）。経口感染により 75% が発病し、50% が死亡する TypeI FIPV はほとんど存在しておらず、C3663 株は高病原性であった。また、自然感染経路で発症することに成功し、発症モデルの確立にも成功したのと考えている。一方、Yayoi 株はマウスの脳内で馴化されており、弱毒化したものと考えている。

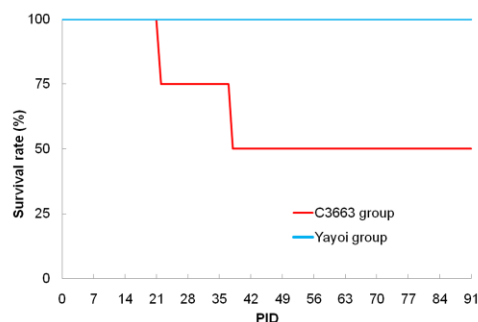


図3 Yayoi株とC3663株の猫における病原性の比較

我々はC3663株をマウスに免疫して6種類のモノクローナル抗体の作出に成功した(表1)。それら単クローナル抗体をC3678株感染細胞とYayoi株感染細胞を用いてIFAを実施した。その結果、C3678株は2種類、Yayoi株は3種類のモノクローナル抗体と反応することが確認された。遺伝的に最も近縁なC3678株に2種類のモノクローナル抗体しか反応しなかったのは予想外であったが、3種類の株に反応する3A8-C12も存在しており、診断に有用である可能性が示唆された。

表1 FIPV3株の単クローナル抗体との反応性

単クローナル抗体	Isotype	各感染細胞におけるIFA			イムノブロット解析
		C3663	C3678	Yayoi	
1E4-G10	IgG2a	+	-	-	+
3A8-C12	IgG2a	+	+	+	+
2D7-D9	IgG2a	+	+	-	-
2B4-G11	IgG2a	+	-	+	-
1B10-D4	IgG2a	+	+	+	-
1C1-A9	IgG2a	+	-	-	+

2) FIPV 3株の全塩基配列の決定

全塩基配列決定の結果、C3663株は28,567塩基、C3678株は29,324塩基、Yayoi株は29,308塩基であった。C3663株とC3678株は遺伝的に非常に近縁であることが確認された。3株の全塩基配列を並べて比較すると、C3663株はORF1a遺伝子に30塩基、S遺伝子の5'末端側に735塩基、M遺伝子に3塩基、N遺伝子に3塩基の欠損が認められた。C3678株はS遺伝子に6塩基、3c遺伝子に2塩基、M遺伝子のC3663株の欠損部位と同じ部位に3塩基、N遺伝子もC3663株と同じ位置に3塩基の欠損が認められた。Yayoi株は5'UTRに1塩基、3c遺伝子に29塩基の欠損が認められた(図4)。その結果、ORF構造に関してC3663株は遺伝子欠損により1a蛋白の10アミノ酸、S蛋白の245アミノ酸、M蛋白及びN蛋白のそれぞれ1アミノ酸が欠損していた。C3678株はS蛋白の2アミノ酸、3c蛋白は欠損によりコドンの読み枠がずれたため終始コドンが出現してN末端側の36アミノ酸のみになった。また、M蛋白及びN蛋白はそれぞれ1アミノ酸が欠損していた。Yayoi株は塩基置換により3c蛋白に終始コドンが出現し、N末端側の46アミノ酸となった(図5)。

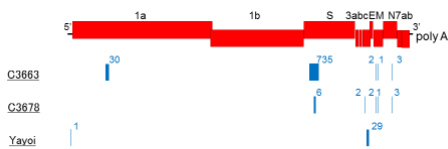


図4 Type I FIPV3株の塩基配列の比較

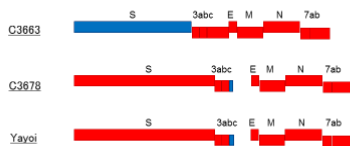


図5 Type I FIPV3株のORF構造の比較

また、C3678株とYayoi株ならびにC3663株をSimplot解析した結果、TRS配列領域が工取に保存されていることが示された。また、C3663株とC3678株は全長に渡り相同性が高いことから由来が同じであることが再確認

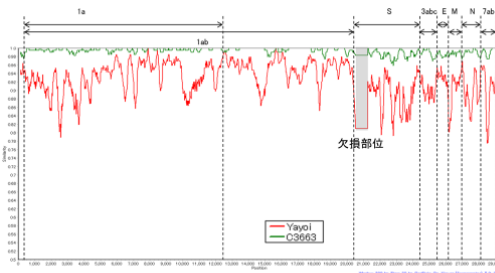


図6 Type I FIPV3株の全塩基配列相同性(Simplot解析)

された(図6)。

FIPVに特異的に認められるとされるプリン開裂部の変異がC3663株とYayoi株で、S蛋白の1058番目の変異が3株すべてに認められた。全塩基配列、ORF1aおよびS遺伝子の系統学的解析によって、3株は1つのクレードを形成することがわかった(図7)。

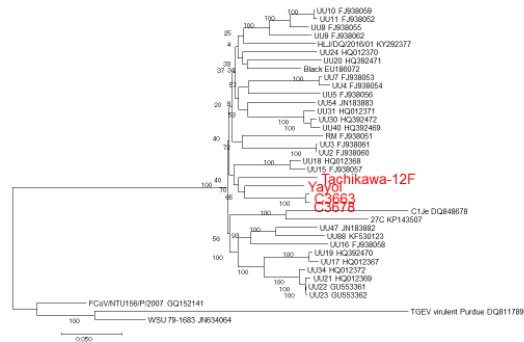


図7 Type I FCoV4株の全塩基配列を基にした系統解析

3) Type I FIPVに認められる変異

これまでS蛋白のプリン開裂部位の変異、1058・1060番目のアミノ酸の変異、3abc蛋白の欠損、7b蛋白の変異などがFIPVに特徴的な変異として報告されている(図8)。

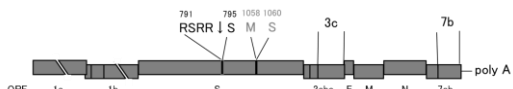


図8 Type I FIPVのFIP発症に関わると考えられている変異部位

マルピーライフテック社からサンプルの提供を受け、1058/1060番目のアミノ酸に焦点を絞って解析した結果、国内FIPV 160検体中147検体(91.9%)、FCoV 40検体中4検体(10%)でS蛋白のアミノ酸1058あるいは1060番目に変異が確認された(表2)。更に、国内の株には1042番目のアミノ酸の変異も特異的と考えられた。国内FIPVの98.1%が1042/1058/1060番目のどこかに変異があることが判明した。FIPVの診断が可能になったと考えている。

表2 FIPV と FECV に認められる変異の比較

変異	FECV	FIPV
D1042(Q/G/A/H/S/Y)	5.0%	56.3%
M1058L	10.0%	86.3%
S1060(A/T)	0%	5.6%
M1058L+S1060(A/T)	10.0%	91.9%
D1042(Q/G/A/H/S/Y)+M1058L	10.0%	93.1%
D1042(Q/G/A/H/S/Y)+M1058L+S1060(A/T)	10.0%	98.1%

今回得られた結果と遺伝子登録されている FIPV と FECV を用いて系統樹を作成した結果、FIPV 特有のクラスターは存在せず、FECV の中に散在していた(図 12)。このことは、FIPV が野外で流行しておらず、FECV からそれぞれが変異して出現してことを意味している。FIPV は FECV が猫体内で持続感染した結果として変異を起こして出現し、FIP を引き起こしたことが再確認された。仮説ではあるが、図 1 のウイルスの増殖性で示すように FIPV は急速に失活する。排泄されてもすぐに失活するために感染が成立しないのかもしれない。

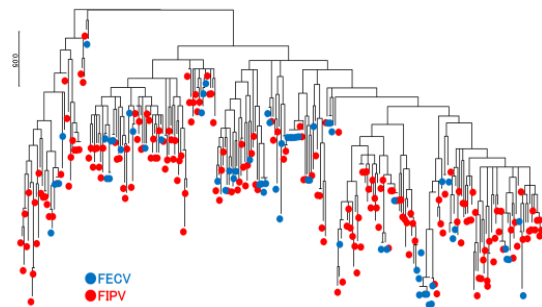


図12 S蛋白遺伝子(123bp)に基づいた系統樹

4) 継続的 FIP 発生多頭飼育施設のネコにおける FCoV 遺伝子解析

太刀川動物病院の協力を得て FIP が断続的に発生する多頭飼育施設内の健常猫 10 頭と FIP 発症猫 3 頭の FCoV を比較した(表 3)。

表3 継続的 FIP 発生多頭飼育施設のネコにおける FCoV 遺伝子検出状況

No.	年齢	性別	検査サンプル	RT-PCR				備考
				N	3abc	7ab	S	
1	4M	♂	糞便	×	×	×	×	
2	7M	♂	糞便/腹水	腹水:○ 糞便:×	腹水:○ 糞便:×	腹水:○ 糞便:○	腹水:○ 糞便:×	FIP
3	7M	♀	糞便	×	○	○	○	
4	7M	♀	リンパ節	○	○	○	○	FIP
5	13Y4M	♂	糞便	○	○	△	○	
6	10Y3M	♀	糞便	×	×	×	×	
7	5Y2M	♂	糞便	○	○	○	○	
8	3Y9M	♀	糞便	○	○	○	○	
9	2Y4M	♂	糞便/胸水	○	○	○	○	
10	1Y2M	♂	糞便	○	○	○	○	
11	7M	♀	糞便	○	○	○	○	
12	6M	♀	糞便	○	○	○	○	
13	9M	♀	糞便/胸水	胸水:×	胸水:○ 糞便:×	胸水:○ 糞便:×	胸水:○ 糞便:×	FIP

その結果、解析した 3 株の FIPV は全て S 蛋白のアミノ酸 1058 番目に変異を有していた(表 4)。また、2 株にはプリン開裂部位に変異があった。

表4 S蛋白 1042/1058/1060 番のアミノ酸に認められた変異

No.	サンプル	プリン開裂部位 (RSRRS)	変異		
			D1042	M1058	S1060
1	糞便	FCoV (-)	-	-	-
2	腹水	TSRMS	D⇒A	M⇒L	-
3	糞便	-	-	-	-
4	リンパ節	RSRNS	D⇒G	M⇒L	-
5	糞便	-	D⇒Q	-	-
6	糞便	FCoV (-)	-	-	-
7	糞便	-	-	-	-
8	糞便	-	D⇒A	-	-
9	糞便	-	-	-	-
10	糞便	-	-	-	-
11	糞便	-	-	-	-
12	糞便	-	-	-	-
13	胸水	-	D⇒A	M⇒L	-

系統樹解析により、多頭飼育施設内の FIPV は健常猫間で維持されている FCoV と同じクラスターを形成していることが判明した(図 13)。このことは、FIPV は健常猫で蔓延している FCoV が変異することによって生じていることを証明している。

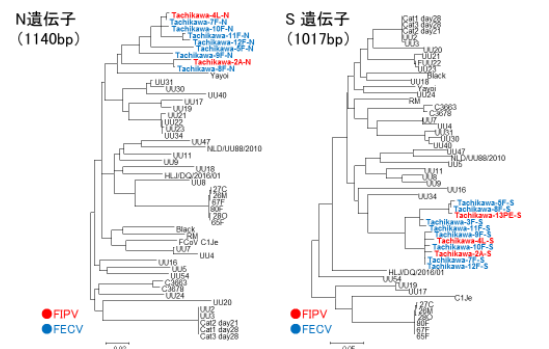


図13 NおよびS遺伝子に基づいた系統解析

5) 継続的 FIP 発生多頭飼育施設のネコの抗体検査

FIP を発症した猫の抗体価は、発症していない猫に比べて上昇していた。FCoV 感染猫は 1:160-1:1280 であるのに対して、FIP 発症猫は 1:6400 で有意に高かった。FIP 発症猫における高い抗体価も発症の指標になることが分かる。加えて、FIP 発症猫 No. 2 には ADE 活性が認められた。しかし、No. 13 には認められなかった。FCoV 感染健常猫には ADE 活性が認められなかった。ADE 活性の検出は FIP の診断に有用であるかも知れない。

6) FCoV 感染実験

FECV 感染から変異による FIP 発症を証明するために、前述の継続的 FIP 発生多頭飼育施設の猫の No. 12 の糞便を用いて 4 頭のネコに経口感染を行った。その結果、FECV の持続感染系の作出に成功した。現在まで 1 年以上の持続が一部の猫で観察されている。抗体価の推移も検討しているが、現在まで高い状態で

抗体価の維持されていることが分かる(図16)。今後も観察を続ける予定である。

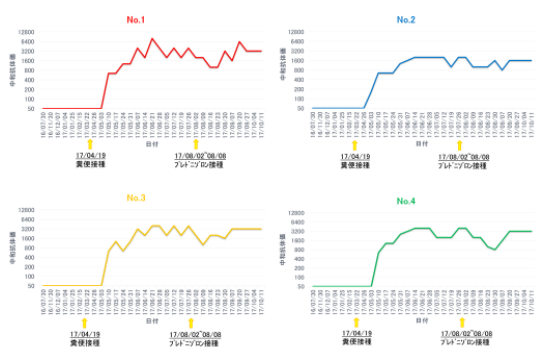


図16 持続感染猫における中和抗体価の推移

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

1. Nguyen VD, Terada Y, Minami S, Yonemitsu K, Nagata N, Le DHT, Kuwata R, Shimoda H and Maeda K*. Characterization of canine coronavirus spread among domestic dogs in Vietnam. *Journal of Veterinary Medical Science* 2017 Feb 14;79(2):343-349. 査読有 doi: 10.1292/jvms.16-0538.
2. Minami S, Kuroda Y, Terada Y, Yonemitsu K, Nguyen DV, Kuwata R, Shimoda H, Takano A, Maeda K*. Detection of novel ferret coronaviruses and evidence of recombination among ferret coronaviruses. *Virus Genes* 2016 Dec;52(6):858-862. 査読有 DOI: 10.1007/s11262-016-1365-3
3. Minami S, Terada T, Shimoda H, Takizawa M, Onuma M, Ota A, Ota Y, Akabane Y, Tamukai K, Watanabe K, Naganuma Y, Kanagawa E, Nakamura K, Ohashi M, Takami Y, Miwa Y, Tanoue T, Ohwaki M, Ohta J, Une Y, Maeda K*. Establishment of serological test to detect antibody against ferret coronavirus. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2016 Jul 1;78(6):1013-7. 査読有 doi: 10.1292/jvms.16-0059.

[学会発表] (計8件)

1. 黒田雄大ら「II型猫コロナウイルス感染猫の存在？」第160回日本獣医学会学術集会 2017.09 (鹿児島)
2. 神先芽衣ら「遺伝子変異と猫伝染性腹膜炎発症の相関；多頭飼育施設での証明」第160回日本獣医学会学術集会 2017.09 (鹿児島)
3. Dung Nguyen Van ら “Characterization of canine coronaviruses in Vietnam” 第159回日本獣医学会学術集会 2016年9月 (神奈川県藤沢市)

4. 神先芽衣ら「変異により出現する猫伝染性腹膜炎ウイルス (FIPV)」第159回日本獣医学会学術集会 2016年9月 (神奈川県)
5. 黒田雄大ら「I型猫伝染性腹膜炎ウイルス (FIPV) の遺伝子解析」第159回日本獣医学会学術集会 2016年9月 (神奈川県)
6. 寺田 豊ら「実験動物スニクスにおける新規コロナウイルスの探索」第70回岡山実験動物研究会例会、2015.12.11 (岡山)
7. 南 昌平ら「新規血清型フェレットコロナウイルスの発見から推測される未知のコロナウイルスの存在」第158回日本獣医学会学術集会) 平成27年9月 (十和田)
8. 南 昌平ら「新規血清型フェレットコロナウイルスの解析」第30回中四国ウイルス研究会 2015年6月 (岡山県)

[図書] (計4件)

1. 前田 健、南 昌平、黒田雄大「猫伝染性腹膜炎を知る」*Veterinary Immunology for Practitioners*. (ウイルスの不思議) 2018 10号 19-26 査読無査読無
2. 黒田雄大、神先芽衣、南 昌平、前田 健「猫伝染性腹膜炎ウイルスの病態に関する最新知見」*NJK* 2017 Vol.192 24-31 査読無
3. 前田 健「感染と免疫」*InfoVets* 特集2 『免疫と疾病・治療』2016. JAN. Vol.19 No.1 34-38. 査読無
4. 前田 健「猫のウイルス感染症の病態生理と疫学情報」特集『猫のウイルス感染症』*J-VET (Interzoo)* 2015. 28(10)8-14. 査読無

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

講演会 (計4件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 健 (MAEDA, Ken)
山口大学・共同獣医学部・教授
研究者番号：90284273

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

寺田 豊 (TERADA, Yutaka)
大阪大学・微生物病研究所・博士研究員