

令和 2 年 4 月 10 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04642

研究課題名(和文) エチオピアにおけるヒトコブラクダの中東呼吸器症候群コロナウイルスの調査

研究課題名(英文) Studies on the Middle East Respiratory Coronavirus in dromedary camels in Ethiopia

研究代表者

白戸 憲也 (Shirato, Kazuya)

国立感染症研究所・ウイルス第三部・主任研究官

研究者番号：40415477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,600,000円

研究成果の概要(和文)：MERS-CoVの宿主はヒトコブラクダである。中東、北、西、東アフリカのヒトコブラクダが抗体陽性を示し、これらの地域で蔓延していることがあきらかであるにも関わらず、ヒトでの発症例は中東に限定している。その原因がウイルスのほうにもあるのではないかと考え、エチオピアにおいてヒトコブラクダの鼻水からMERS-CoVのアフリカ株配列を取得し、組み換えウイルスを使って解析を行った。結果としてエチオピア株のS蛋白質を持つウイルスは中東株であるEMC株と比べて低いウイルス複製、易中和性を示した。これらのウイルス学的特徴の差がヒトでの発症差に関連している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MERSの発症例が中東に限定され、アフリカから報告されていない原因は公衆衛生状態の差、検査体制の差など社会的な差であると考えられていた。今回の報告でそれぞれの地域で存在しているウイルスのウイルス学的特徴が違うことも、ヒトで報告がない原因である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：MERS-CoV is common in dromedaries throughout the Middle East, North Africa, and East Africa as evidenced by neutralizing antibodies against MERS-CoV; however, human cases have remained limited to the Middle East. To study the cause of this difference, the virological properties of African camel MERS-CoV were analyzed based on the spike (S) protein in Ethiopia. Nasal swabs were collected from 258 young dromedaries in the Afar region, of which 39 were positive for MERS-CoV, as confirmed by genetic tests. Recombinant EMC isolates of MERS-CoV, in which the S protein is replaced with those of Amibara isolates, were generated. Amibara S recombinants replicated more slowly in cultured cells than in EMC S recombinants. In neutralizing assays, Amibara S recombinants were neutralized by lower concentrations of sera from both Ethiopian dromedaries and EMC isolate-immunized mouse sera. These results suggest that these differences may account for the absence of human MERS-CoV cases in Ethiopia.

研究分野：ウイルス学

キーワード：MERS MERS-CoV ヒトコブラクダ エチオピア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

中東呼吸器症候群(MERS)はサウジアラビアを中心とした中東地方で流行している MERS コロナウイルス(MERS-CoV)によって引き起こされる重症の肺炎である。ヒトに重篤な致死性疾患を引き起こすコロナウイルスの発生は、2002年から2003年にかけて流行し、全世界で8,098名の患者と774名の死者を出した重症急性呼吸器症候群(SARS)以来である。現在でもサウジアラビアと中心として散発的に流行が続いており、中東からの旅行者が訪問先で発症するケースも見られる。成人で重症化しやすく高齢は1つのリスクである。重症化した患者のほとんどが基礎疾患を持っており、糖尿病、がん、慢性の心、肺、腎疾患がリスクである。また喫煙も重症化のリスクとして挙げられている。現在のところ治療薬やワクチンはなく、対症療法が主となる。幸いなことにこれまでに国内での発生例は見られない。しかし2015年の5~8月にかけて、韓国において大規模な院内感染が発生し、アラビア半島から帰国した1名から186名に感染が拡大し、そのうち37名が死亡した。隣国の、特に韓国での発生という事で、日本国内でもメディアやネットによるパニックが見られた。

MERS-CoVの宿主はヒトコブラクダであり(N Engl J Med. 2014. 370:2499)、ヒトコブラクダにおいては成熟すると抗体価があがり、ほぼ100%となる。そのためウイルス遺伝子検出率やウイルス分離率は幼若なほど高く、2~4歳ではそれぞれ2.9%と7.1%。1歳未満ではそれぞれ35.3%と13.6%を示したことが報告されている(Emerg Infect Dis. 2014. 21:1019)。これは幼若な個体との接触がMERS-CoV暴露の危険性が高いことを示している。

MERS-CoVはサウジアラビアを含め、アラビア半島のヒトコブラクダに蔓延しているが、Reuskenらの調査によるとアラビア半島と紅海を挟んだ対岸のアフリカ諸国、ナイジェリア等の中央アフリカでは非常に高い抗体保有率を示す一方、チュニジアでは30~54%、カナリア諸島では13~14%であることがわかった(Emerg Infect Dis. 2014. 20:1370)。さらにMüllerらの調査により、スーダンやソマリアなどの東アフリカでは、1983年にまで遡ってヒトコブラクダにおいてMERS-CoV陽性であること明らかとなった(Emerg Infect Dis. 2014 20:2093)。従って、ヒトコブラクダにおけるMERS-CoVは30年以上も前から中近東、中央、東アフリカ地域で流行しているということ、地域性があるということが明らかとなった。しかし、30年以上も前からMERS-CoVが存在していることが明らかであるのに、アフリカではヒトのMERSケースが1件も出ていない。

## 2. 研究の目的

これまでに2013年に東アフリカのエチオピアにおいて採取されたヒトコブラクダの血清を用いた中和試験では95%の陽性率を示し、エチオピアにおいてもヒトコブラクダにおいてMERS-CoVが蔓延していることが分かっているが、ヒトにおける報告例は1件もない。本研究では交流のあるエチオピアのDr. Melakuらの協力のもと、ヒトコブラクダから採取された鼻汁、拭い液等の検体を用いてMERS-CoVに対する遺伝子検査を行い、陽性となった検体から全長ゲノム遺伝子の解読を行い、解読された配列をアラビア半島で流行中の株と比較し、エチオピアでヒトのMERSケースが見られない原因がウイルスに起因するか否かについて、リバーシジェネティクス法を用いて作製したウイルスを用いた実験により解明すること目的とした。

## 3. 研究の方法

検体採取はAfar州で行った。上述のように、ウイルス遺伝子は4歳未満の個体で検出率が高く、1歳未満で特に高い。従って2歳未満のヒトコブラクダから鼻腔ぬぐい液を採取した。ぬぐい液は直接FTAカード(GEヘルスケア)にドロップし、不活化処理をしたうえでアジスアベバ大学にてRNAを抽出し、蛍光RT-LAMP法(J Virol Method. 2018. 258:41-48)による検出を行

った。WHO のガイドンスに従い、RT-LAMP 法の ORF1a、N、2 系統ともに陽性であるものを陽性とし、1 つのみの陽性検体は帰国後にリアルタイム RT-PCR 法(WHO 法)による検出を行い、2 つの異なる遺伝子標的で陽性となった検体を陽性とした。陽性検体 RNA を用いて RNA sequencing により全長遺伝子配列の解読をお行った。解読された遺伝子配列をもとに、中東株である EMC 株配列で作製された BAC プラスミドベースの MERS-CoV リバースジェネティクス系を用いて S 蛋白質配列のみを入れ替えた組み換えウイルスを作製し、各種解析をおこなった。

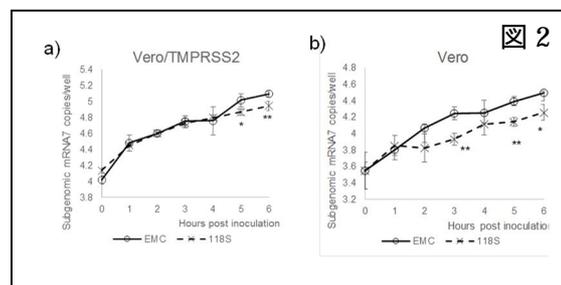
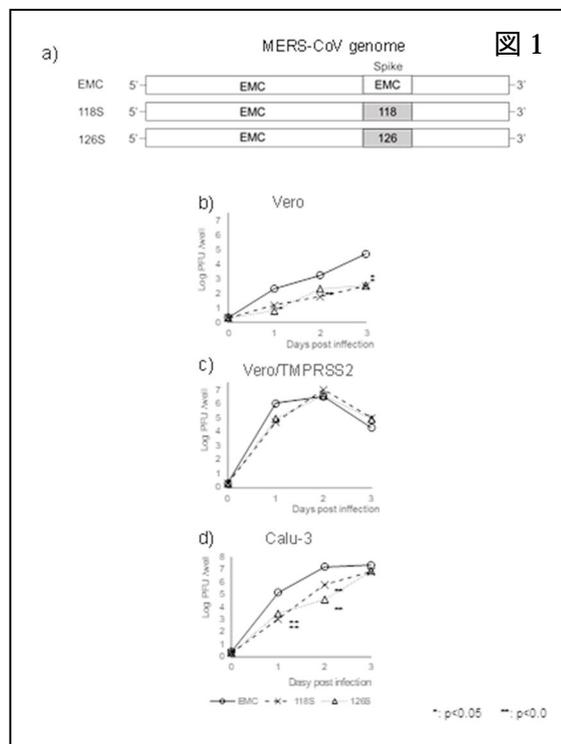
#### 4 . 研究成果

Afar 州の Awash、Geweane、Amibara、Cemera の 4 か所で検体の採取ができた。最終的に 258 検体中 39 で陽性であった。すべての陽性は Amibara で検出された。RT-LAMP 法で陽性となったもののうち、検出時間が短く、ウイルス量が高いと思われる検体 12 を使い、Miseq を用い RNA sequencing を行った。うち 2 検体で大まかなウイルスゲノム配列の存在が確認されたため、Hiseq を用いて詳細な解読を行い、最終的に 2 つの全長遺伝子配列が得られた。これらは GenBank に登録された (MK564474, camel/Ethiopia/Amibara/118/2017; MK564475, camel/Ethiopia/Amibara/126/2017)。系統解析により、他のアフリカ株と同様に Clade C に属すること、西アフリカでの株とは異なり C1 sub clade に分類されることが分かった。

中東株である MERS-CoV EMC 株をベースに作製された BAC ベクターによるリバースジェネティクス系(Virology 2017 511:95-105)を用い、S 蛋白質を Amibara 株と入れ方組み換えウイルスを作製した(図 1a)。培養細胞におけるウイルス力価を比較すると、Amibara 株の S 蛋白質を持つウイルスは Vero、Vero/TMPRSS2、Calu-3 細胞においてウイルス複製が低いことが分かった(図 1b-d)。ウイルスの細胞侵入量を継時的に測定すると、Amibara 株の S 蛋白質を持つウイルスはわずかではあるが、細胞侵入量が少ないことが分かった(図 2)。

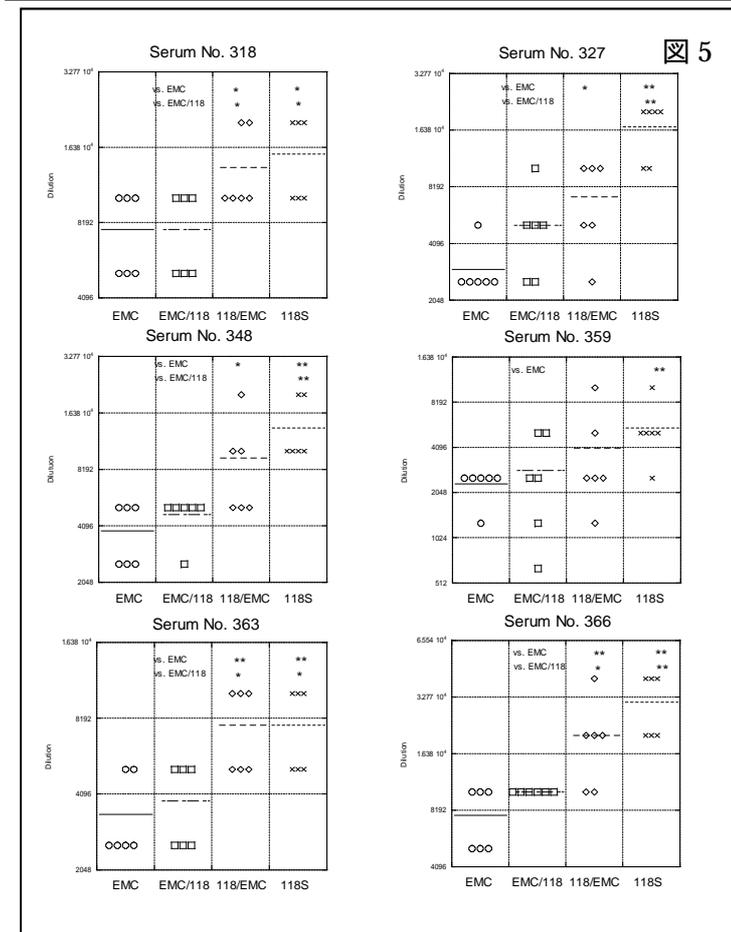
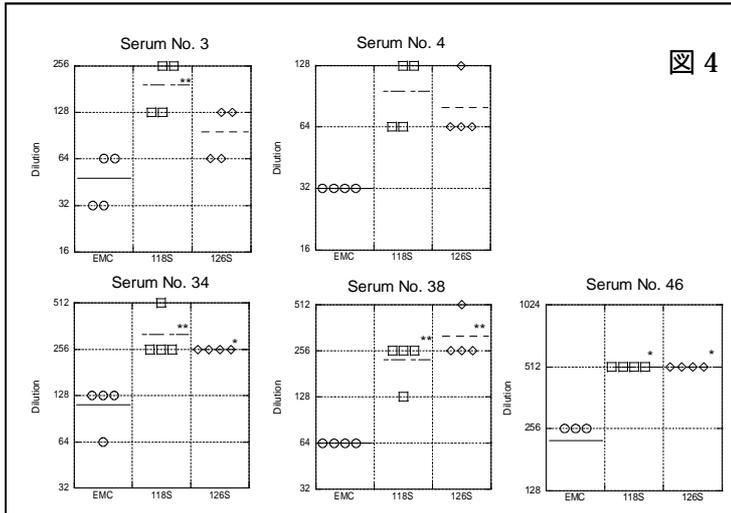
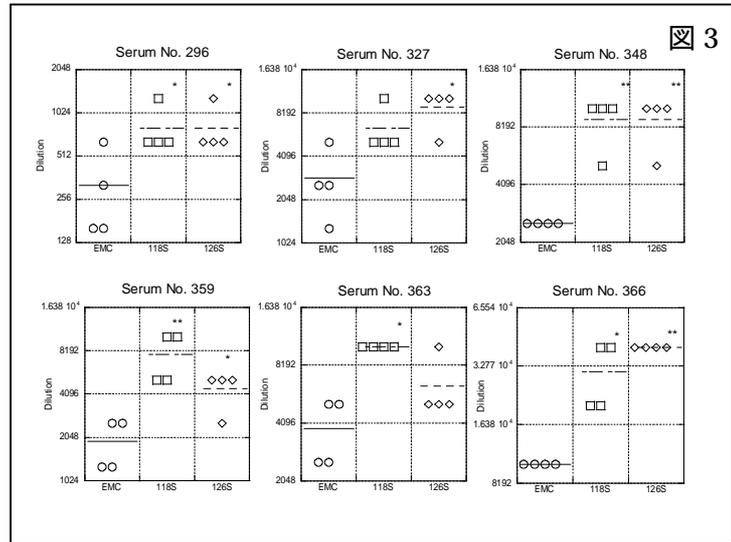
次に Afar 州で採取されたヒトコブラクダ血清を用いてウイルス中和動態を調べると、Amibara 株の S 蛋白質を持つウイルスは EMC 株と比較して高い中和抗体価を示すことが分かった(図 3)。ヒトコブラクダ血清は Amibara 株とほぼ同様のエチオピア株が感染していると考えられる。従って EMC 株と Amibara 株の S 蛋白質の間で抗原性が異なる可能性を示唆したため、今度は逆に EMC 株で免疫したマウス血清を用いて同様に中和試験を行った。す

るとヒトコブラクダ血清と同様に、こちらも Amibara 株の S 蛋白質を持つ組み換えウイルスのほうが高い中和抗体を示した、すなわち、EMC 株と Amibara 株の抗原性は同じであるが、



中和されやすさが異なるという事が考えられる。Amibara 株の S 蛋白質のほうが中和抗体が高いという事は、Amibara 株の S のほうが易中和性であることを示す。この中和反応性の違いは S1 および S2 を入れ方組み換えウイルスを用いた中和で、想定通りに S1 によることが示された (図 5)。

以上のことからエチオピアの MERS-CoV の S 蛋白質は中東株である EMC 株と比較して低いウイルス複製、易中和性を持っており、この増えにくく中和されやすい性質がエチオピアでヒトでの MERS ケース報告が 1 例もない原因の 1 つである可能性が示唆された。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kazuya Shirato, Simenew Keskes Melaku, Kengo Kawachi, Naganori Nao, Naoko Iwata-Yoshikawa, Miyuki Kawase, Wataru Kamitani, Shutoku Matsuyama, Tesfaye Sisay Tessema, Hiroshi Sentsui	4. 巻 10
2. 論文標題 Middle East Respiratory Syndrome coronavirus in dromedaries in Ethiopia is antigenically different from the Middle East isolate EMC	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1326
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2019.01326	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kazuya Shirato, Naganori Nao, Shutoku Matsuyama, and Tsutomu Kageyama	4. 巻 In press
2. 論文標題 An ultra-rapid real-time RT-PCR method for detecting Middle East respiratory syndrome coronavirus using a mobile PCR device, PCR1100	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7883/yoken.JJID.2019.400	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kazuya Shirato, Naganori Nao, Harutaka Katano, Ikuyo Takayama, Shinji Saito, Fumihiro Kato, Hiroshi Kato, Masafumi Sakata, Yuichiro Nakatsu, Yoshio Mori, Tsutomu Kageyama, Shutoku Matsuyama, Makoto Takeda	4. 巻 In press
2. 論文標題 Development of Genetic Diagnostic Methods for Novel Coronavirus 2019 (nCoV-2019) in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7883/yoken.JJID.2020.061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kazuya Shirato*, Shohei Semba, Sherif A. El-Kafrawy, Ahmed M. Hassan, Ahmed M. Tolah, Ikuyo Takayama, Tsutomu Kageyama, Tsugunori Notomi, Wataru Kamitani, Shutoku Matsuyama and Esam Ibraheem Azhar	4. 巻 258
2. 論文標題 Development of Fluorescent Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) using Quenching probes for the detection of the Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Virological Methods	6. 最初と最後の頁 41-48
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jviromet.2018.05.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名	白戸憲也、Simenew Keskes Melaku, 河内健吾、直亨則、岩田奈織子、川瀬みゆき、神谷亘、松山州徳、Tefaye Sisay Tessema、泉對博
2. 発表標題	エチオピアのヒトコブラクダから分離された中東呼吸器症候群コロナウイルスの病原性は中東分離株であるEMC株と異なる
3. 学会等名	第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Kazuya Shirato, Simenew Keskes Melaku, Kengo Kawachi, Naganori Nao, Shutoku Matsuyama, Wataru Kamitani, Tesfaye Sisay Tessema and Hiroshi Sentsui
2. 発表標題	Characterization of Middle East Respiratory Syndrome coronavirus in dromedary camels in Ethiopia
3. 学会等名	第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Kazuya Shirato, Shohei Semba, Sherif A. El-Kafrawy, Ahmed M. Hassan, Ahmed M. Tolah, Ikuyo Takayama, Tsutomu Kageyama, Tsugunori Notomi, Wataru Kamitani, Shutoku Matsuyama and Esam Ibraheem Azhar
2. 発表標題	Development of Fluorescent Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) using Quenching probes for the detection of the Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus
3. 学会等名	American Society for Virology 37th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年	2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	泉對博  (Sentsui Hiroshi)  (10355167)	日本大学・生物資源科学部・教授    (32665)	