

医薬品 研究報告 調査報告書

識別番号・報告回数		報告日	第一報入手日	新医薬品等の区分	厚生労働省処理欄
一般的名称	別紙のとおり	研究報告の公表 状況	2004年8月23日	該当なし	公表国 オランダ
販売名(企業名)	別紙のとおり		「Identification of a new human coronavirus Identification of a new human coronavirus」 Nature Medicine online 21 March 2004; doi:10.1038.nm1024		
研究報告の概要	(問題点:新しい種類のヒトコロナウイルスが気管支炎と結膜炎を患った7ヶ月齢の小児から分離された。)				使用上の注意記載状況 その他参考事項等
	<p>背景 このウイルス: Hco-NL63 が分離される前までは、3種類のヒトコロナウイルスの存在が知られていた。ヒトコロナウイルスのなかで、3番目のウイルスである重症急性呼吸器症候群(SARS)は感染力の強さと生命を脅かす肺炎を引起す等で注目を集めている。この論文の著者等は、気管支炎と結膜炎を患った小児(7ヶ月)から、新しい種類のヒトコロナウイルスを分離しウイルスの細胞感受性とウイルス遺伝子解析を行ないその特長を明らかにした。</p> <p>方法 PCRによる未知ウイルスの遺伝子解析を行なうために、cDNA-AFLP技術をもとにしたVIDISCA法を新たに開発した。この方法を用いてHco-NL63の遺伝子解析を行なった。</p> <p>結果 このウイルスの全塩基配列である27,553ベースの配列を決定した。その結果、このウイルス塩基配列は特徴的な構造を持っていた、たとえばスパイク蛋白のN末端にユニークな断片の挿入があった。次に、GC含量に関しては34%であり、これはコロナウイルスでは最も低く、又IaとIbポリプロテインはゲノムRNAから翻訳されるが、残りのウイルス蛋白はマイナス鎖合成過程の不連続転写により発生したサブジェノミック mRNAから翻訳されていると考えられる等遺伝子構造の特長が明らかになった。このウイルスの細胞感受性については、他のヒトコロナウイルスと異なりサル腎臓系細胞でよく増殖することがわかった。</p> <p>結論 Hco-NL63は新しい種類のヒトコロナウイルスであることがわかった。このウイルスは第1グループのHcoV-229Eと近縁であると考えられたが、両者の塩基配列ホモロジーは低く(58%)、ORF3の存在の有無、スパイク蛋白のN末端に断片(537塩基)の挿入の有無、感受性細胞において、両者感には明確な違い等から、Hco-NL63は既存のコロナウイルスグループに属しないと考えられた。</p>				記載なし
	報告企業の意見				今後の対応
別紙のとおり				現時点においては、特段の対応は不要と考えるが、今後とも関連情報の収集に努め、本剤の安全性の確保を図っていきたい。	

200

27

<p>一般的名称</p>	<p>①人血清アルブミン②人血清アルブミン③人血清アルブミン④人免疫グロブリン⑤乾燥ペプシン処理人免疫グロブリン⑥乾燥スルホ化人免疫グロブリン⑦乾燥スルホ化人免疫グロブリン⑧乾燥濃縮人活性化プロテインC⑨乾燥濃縮人血液凝固第Ⅷ因子⑩乾燥濃縮人血液凝固第Ⅸ因子⑪乾燥抗破傷風人免疫グロブリン⑫抗HBs人免疫グロブリン⑬トロンビン⑭フィブリノゲン加第ⅩⅢ因子⑮乾燥濃縮人アンチトロンビンⅢ⑯ヒスタミン加人免疫グロブリン製剤⑰人血清アルブミン⑱人血清アルブミン⑲乾燥ペプシン処理人免疫グロブリン⑳乾燥人血液凝固第Ⅸ因子複合体㉑沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン㉒沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン㉓沈降精製百日せきワクチン㉔乾燥弱毒生風しんワクチン㉕乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン</p>
<p>販売名（企業名）</p>	<p>①献血アルブミン20「化血研」②献血アルブミン25「化血研」③人血清アルブミン「化血研」④「化血研」ガンマーグロブリン⑤献血静注グロブリン「化血研」⑥献血ベニコロン-I⑦ベニコロン⑧注射用アナグトC2,500単位⑨コンファクトF⑩ノバクトM⑪テタノセーラ⑫ヘパトセーラ⑬トロンビン「化血研」⑭ボルヒール⑮アンソロビンP⑯ヒスタグロビン⑰アルブミン20%化血研⑱アルブミン5%化血研⑲静注グロブリン⑳ノバクトF㉑DPT「化血研」シリンジ㉒沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン㉓沈降精製百日せきワクチン㉔乾燥弱毒生風しんワクチン㉕乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン「化血研」</p>
<p>報告企業の意見</p>	<p>今回の論文でHco-NL63は小児の鼻咽頭から分離されたが、その感染経路に関する詳細な記載はない。したがって、一般的なコロナウイルスの感染経路から考えて、Hco-NL63ウイルスは飛沫感染であると考えられる。たとえ、このHco-NL63が体液及び血液に含まれていたとしても、弊所においては以下のウイルスバリデーションを行なっているため影響はないと考える。弊所の血漿分画製剤の製造工程のウイルス除去・不活化は、「血漿分画製剤のウイルスに対する安全性確保に関するガイドラインについて（医薬発第1047号）」に従い、原料に混入する可能性のあるウイルスを考慮したモデルウイルスを選定し、ウイルスプロセスバリデーションを実施評価している。Hco-NL63ウイルスは、エンベロープを持つ大型RNAウイルスであり、このモデルウイルスとしては、BVDV（ウシウイルス性下痢ウイルス）が該当すると考える。弊所の血漿分画製剤は、その製造工程にウイルス安全対策として「低温アルコール分画」「ウイルス除去膜工程」「液状又は凍結乾燥加熱工程」が導入されている。これらのウイルス安全対策工程についてモデルウイルスを用いたウイルスバリデーションの結果から、Hco-NL63ウイルスの除去・不活化に対して有効であると推測されることなどから、弊所の血漿分画製剤を介したHco-NL63ウイルスに関する感染リスクについてはきわめて低いものと考えられる。</p> <p>しかしながら、Hco-NL63ウイルスについては、不顕性感染者におけるウイルス血症の程度などについて未だ不明な点もあることや、コロナウイルスそのものを用いたウイルスバリデーションの知見がほとんど無いことから、引き続き血漿分画製剤の安全性確保に関する情報の収集に努める必要がある。</p> <p>また、ヒト血漿由来のアポセルロプラスミンを沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンの製造工程においてに使用しているが、以下の理由により安全と考えられる。</p> <p>弊所で使用しているアポセルロプラスミンは1998年に製造されたものであり、Hco-NL63ウイルスが最初に分離されたのが2003年1月であることから、製造中にHco-NL63ウイルスが迷入した可能性は極めて低いと考えられる。</p> <p>また、アポセルロプラスミンの製造には、BMM膜（35nm）が用いられているが、コロナウイルスの一般的なサイズは80～180nmとされていることから、同工程において除去されると考えられる。</p> <p>更に、アポセルロプラスミンは、65℃で18時間加熱工程を行っているが、WHOによると、Hco-NL63ウイルスと同じコロナウイルスで属するSARSウイルスは56℃・15分間の熱処理により1万分の1～減少するという報告があること等から、仮に原料自体にSARSウイルスが混入していたとしても、製造過程で十分にHco-NL63ウイルスの不活化はできているものと考えられる。</p> <p>今後とも情報収集に努め、製剤の安全性の確保を図っていきたい。</p>

Identification of a new human coronavirus

Lia van der Hoek¹, Krzysztof Pyrc¹, Maarten F Jebbink¹, Wilma Vermeulen-Oost², Ron J M Berkhout², Katja C Wolthers¹, Pauline M E Wertheim-van Dillen³, Jos Kaandorp⁴, Joke Spaargaren² & Ben Berkhout¹

Three human coronaviruses are known to exist: human-coronavirus 229E (HCoV-229E), HCoV-OC43 and severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus (SARS-CoV). Here we report the identification of a fourth human coronavirus, HCoV-NL63, using a new method of virus discovery. The virus was isolated from a 7-month-old child suffering from bronchiolitis and conjunctivitis. The complete genome sequence indicates that this virus is not a recombinant, but rather a new group 1 coronavirus. The *in vitro* host cell range of HCoV-NL63 is notable because it replicates on tertiary monkey kidney cells and the monkey kidney LLC-MK2 cell line. The viral genome contains distinctive features, including a unique N-terminal fragment within the spike protein. Screening of clinical specimens from individuals suffering from respiratory illness identified seven additional HCoV-NL63-infected individuals, indicating that the virus was widely spread within the human population.

To date, there is still a variety of human diseases with unknown etiology. A viral origin has been suggested for many of these diseases, emphasizing the importance of a continuous search for new viruses^{1–3}. Major difficulties are encountered, however, when searching for new viruses. First, some viruses do not replicate *in vitro*, at least not in the cells that are commonly used in viral diagnostics. Second, for those viruses that do replicate *in vitro* and cause a cytopathic effect (CPE), the subsequent virus identification methods may fail. Antibodies raised against known viruses may not recognize the cultured virus, and virus-specific PCR methods may not amplify the new viral genome. To solve both problems, we developed a new method for virus discovery based on the cDNA-amplified restriction fragment-length polymorphism technique (cDNA-AFLP⁴). Here we report the identification of a new coronavirus using this method of Virus-Discovery-cDNA-AFLP (VIDISCA).

Coronaviruses, a genus of the *Coronaviridae* family, are enveloped viruses with a large plus-strand RNA genome. The genomic RNA is 27–32 kb in size, capped and polyadenylated. Three serologically distinct groups of coronaviruses have been described. Within each group, viruses are characterized by their host range and genome sequence. Coronaviruses have been identified in mice, rats, chickens, turkeys, swine, dogs, cats, rabbits, horses, cattle and humans, and can cause a variety of severe diseases including gastroenteritis and respiratory tract diseases^{5,6}. Three human coronaviruses have been studied in detail. HCoV-229E and HCoV-OC43 were identified in the mid-1960s, and are known to cause the common cold^{7–15}. The recently identified SARS-CoV causes a life-threatening pneumonia, and is the most pathogenic human coronavirus identified thus far^{16–18}. SARS-CoV is likely to reside in an animal reservoir, and has recently initiated the epidemic in humans through zoonotic

transmission^{19,20}. It has been suggested that SARS-CoV is the first member of a fourth group of coronaviruses, or that it is an outlier of group 2 (refs. 21, 22).

The new coronavirus that we present here was isolated from a child suffering from bronchiolitis and conjunctivitis. This was not an isolated case, as we identified the virus in clinical specimens from seven additional individuals, both infants and adults, during the last winter season. We also resolved the complete sequence of the viral genome, which revealed several unique features.

RESULTS

Virus isolation from a child with acute respiratory disease

In January 2003, a 7-month-old child was admitted to the hospital with coryza, conjunctivitis and fever. Chest radiography revealed typical features of bronchiolitis. A nasopharyngeal aspirate specimen was collected 5 d after the onset of disease (sample NL63). Diagnostic tests for respiratory syncytial virus, adenovirus, influenza viruses A and B, parainfluenza virus types 1, 2 and 3, rhinovirus, enterovirus, HCoV-229E and HCoV-OC43 yielded negative results. The clinical sample was subsequently inoculated onto human fetal lung fibroblasts, tertiary monkey kidney cells (*Cynomolgus* monkey) and HeLa cells. CPE was detected exclusively on tertiary monkey kidney cells, and was first noted 8 d after inoculation. The CPE was diffuse, with a refractive appearance in the affected cells followed by cell detachment. More pronounced CPE was observed upon passage onto the monkey kidney cell line LLC-MK2, with overall cell rounding and moderate cell enlargement (Supplementary Fig. 1 online). Additional subcultures on human fetal lung fibroblasts, rhabdomyosarcoma cells and Vero cells remained negative for CPE. Immunofluorescence assays to detect respiratory syncytial virus, adenovirus, influenza viruses A and B, and parainfluenza virus types 1, 2 and 3 remained negative. Acid

¹Department of Human Retrovirology, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Meibergdreef 15, 1105 AZ, Amsterdam, The Netherlands. ²Public Health Laboratory, Municipal Health Service, Nieuwe Achtergracht 100, 1018 WT, Amsterdam, The Netherlands. ³Department of Medical Microbiology/Clinical Virology, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Meibergdreef 15, 1105 AZ, Amsterdam, The Netherlands. ⁴Pediatric Department, Slotervaart Hospital, Louwesweg 6, 1066 EC Amsterdam, The Netherlands. Correspondence should be addressed to B.B. (b.berkhout@amc.uva.nl).

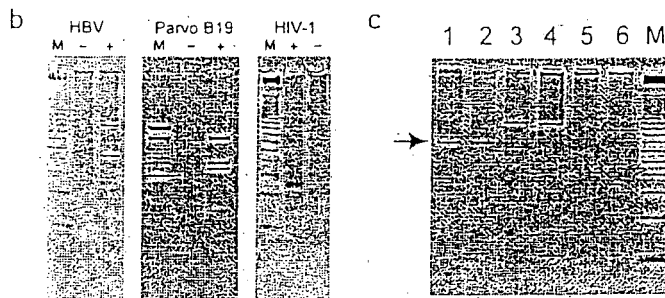
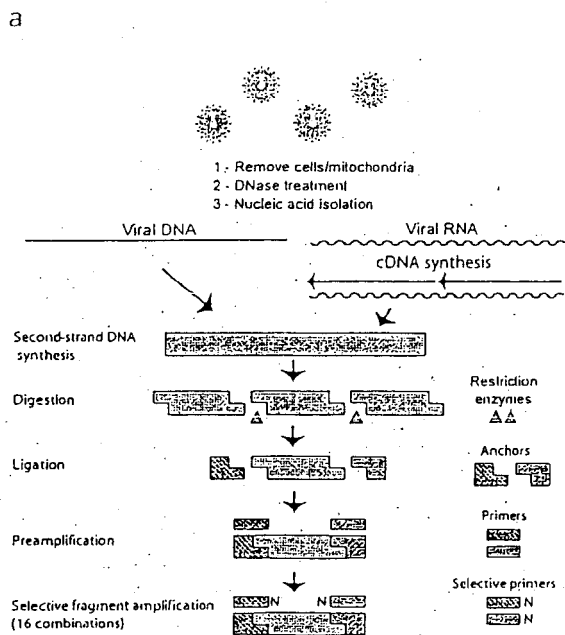


Figure 1 The VIDISCA method. (a) Schematic overview of steps in VIDISCA method. (b) Examples of VIDISCA-mediated virus identification. Specimens were analyzed using ethidium bromide-stained agarose (parvovirus B19) or Metaphor agarose (HBV and HIV-1) gel electrophoresis. Lane M, DNA molecular weight markers; -, negative controls; +, VIDISCA PCR products for HBV (amplified with primers *HinP11-T/MseI-T*), parvovirus B19 (*HinP11* standard primer only) or HIV-1 (*EcoRI-A/MseI-C* primers). (c) VIDISCA PCR products for HCoV-NL63. *HinP11-G* and *MseI-A* primers were used for selective amplification; products were visualized by Metaphor agarose gel electrophoresis. Lanes 1 and 2, duplicate PCR product of cultured HCoV-NL63 harvested from LLC-MK2 cells; 3 and 4, duplicate control supernatant from uninfected LLC-MK2 cells; 5 and 6, duplicate negative controls containing water; M, 25-bp molecular weight marker. Arrow indicates HCoV-NL63 fragment that was excised from gel and sequenced.

ability and chloroform sensitivity tests indicated that the virus was most likely enveloped, and did not belong to the picornavirus group²³.

Virus discovery by the VIDISCA method

Identification of unknown pathogens using molecular biology tools is difficult because the target sequence is not known, so genome-specific PCR primers cannot be designed. To overcome this problem, we developed the VIDISCA method based on the cDNA-AFLP technique⁴. The advantage of VIDISCA is that prior knowledge of the sequence is not required, as the presence of restriction enzyme sites is sufficient to guarantee PCR amplification. The input sample can be either blood plasma or serum, or culture supernatant. Whereas cDNA-AFLP starts with isolated mRNA, VIDISCA begins with a treatment to selectively enrich for viral nucleic acid, including a centrifugation step to remove residual cells and mitochondria (Fig. 1a). A DNase treatment is also used to remove interfering chromosomal and mitochondrial DNA from degraded cells (viral nucleic acid is protected within the viral particle). Finally, by choosing frequently cutting restriction enzymes, the method can be fine-tuned such that most viruses will be amplified. We were able to amplify viral nucleic acids in EDTA-treated plasma from a person with hepatitis B viral infection, and from a person with an acute parvovirus B19 infection (Fig. 1b). The technique can also detect HIV-1 in cell culture, demonstrating its capacity to identify both RNA and DNA viruses (Fig. 1b).

The supernatant of the CPE-positive LLC-MK2 culture NL63 was analyzed by VIDISCA. The supernatant of uninfected cells was used as a negative control. After the second PCR amplification step, unique and prominent DNA fragments were present in the test sample but not in the control (1 of 16 selective PCR reactions is shown in Fig. 1c). These fragments were cloned and sequenced. Thirteen of 16 fragments showed sequence similarity to members of the coronavirus family, but significant sequence divergence with known coronaviruses was apparent in all fragments, indicating that we had identified a new coronavirus. The sequences of the 13 VIDISCA fragments are provided in Supplementary Figure 2 online.

Detection of HCoV-NL63 in patient specimens

To show that HCoV-NL63 originated from the nasopharyngeal aspirate of the child, we designed a diagnostic RT-PCR that specifically detects HCoV-NL63. This test confirmed the presence of HCoV-NL63 in the clinical sample. The sequence of the RT-PCR product of the 1b gene was identical to that of the virus identified upon *in vitro* passage in LLC-MK2 cells (data not shown).

Having confirmed that the cultured coronavirus originated from the child, the question remained as to whether this was an isolated clinical case, or whether HCoV-NL63 is circulating in humans. To address this question, we used two diagnostic RT-PCR assays to examine respiratory specimens of hospitalized individuals and those visiting the outpatient clinic between December 2002 and August 2003 (Fig. 2). We identified seven additional individuals carrying

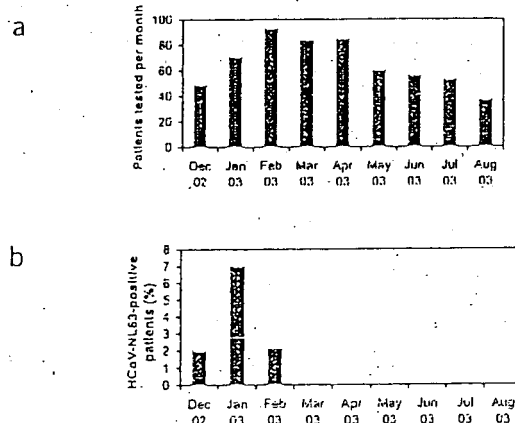


Figure 2 Detection of HCoV-NL63 in winter months of 2002 and 2003. (a) Number of patients tested per month. (b) Percentage of patients positive for HCoV-NL63.



HCoV-NL63 (Table 1). Sequence analysis of the PCR products indicated the presence of a few characteristic point mutations in several samples, suggesting that several viruses with different molecular markers may be cocirculating (Fig. 3 and Supplementary Fig. 3 online). At least five of the HCoV-NL63-positive individuals suffered from respiratory tract illness; the clinical data of two individuals was not available. Including the index case, five of the patients were children less than 1 year old, and three patients were adults. Two adults were likely to be immunosuppressed, as one of them was a bone marrow transplant recipient and the other an HIV-positive patient suffering from AIDS, with very low CD4⁺ cell counts (Table 1). No clinical data was available for the third adult. One patient was coinfecting with respiratory syncytial virus (no. 72), and the HIV-infected patient (no. 466) carried *Pneumocystis carinii*. No other respiratory agent was found in the other patients, suggesting that the respiratory symptoms were caused by HCoV-NL63. All positive samples were collected during the last winter season, with a detection frequency of 7% in January 2003. None of the 306 samples collected in the spring and summer of 2003 contained HCoV-NL63 ($P < 0.01$ by two-tailed t test).

Complete genome analysis of HCoV-NL63

The genomes of coronaviruses have a characteristic organization. The 5' two-thirds contain the 1a and 1b genes that encode the nonstructural polyproteins, followed by the genes encoding four structural proteins: spike (S), envelope (E), membrane (M) and nucleocapsid (N). The genomes of known coronaviruses contain a variable number of unique characteristic open reading frames (ORFs) encoding nonstructural proteins either between the 1b and S genes, between the S and E genes, between the M and N genes, or downstream of the N gene.

To determine whether the HCoV-NL63 genome organization shares these characteristics, we constructed a cDNA library with purified virus stock as input material. A total of 475 genome fragments were analyzed, with an average coverage of seven sequences per nucleotide. Specific PCR reactions were designed to fill in gaps and to sequence regions with low-quality sequence data. We combined this with 5' and 3' rapid amplification of cDNA ends to resolve the complete HCoV-NL63 genome sequence.

The RNA genome of HCoV-NL63 consists of 27,553 nucleotides and a poly-A tail. With a GC content of 34%, HCoV-NL63 has the lowest GC content among the *Coronaviridae*, which range from 37–42% (ref. 24). ZCurve software was used to identify the ORFs²⁵, and the genome configuration was portrayed using the similarity with known coronaviruses as a guide (Fig. 4a and Supplementary Table 1 online). Short untranslated regions (UTRs) of 286 and 287 nucleotides are present at the 5' and 3' termini, respectively. The 1a

Table 1 Patients positive for HCoV-NL63

Patient no.	Age	Symptoms	Specimen	Sample date
72	4 months	URTI	NPA	31 Dec 2002
251	67 years	Unknown	OPA	7 Jan 2003
223	52 years	Unknown ^b	OPA	8 Jan 2003
NL63 ^a	7 months	LRTI	NPA	10 Jan 2003
246	9 months	LRTI	OPA	13 Jan 2003
248	11 months	URTI	OPA	16 Jan 2003
466	40 years	LRTI ^c	BAL	4 Feb 2003
496	7 months	URTI	OPA	25 Feb 2003

^aSeven-month-old patient from whom HCoV-NL63 was cultured. ^bPatient received bone marrow transplant in 2001. ^cPatient infected with HIV-1; 20 CD4⁺ cells per mm³. URTI, upper respiratory tract illness; LRTI, lower respiratory tract illness; NPA, nasopharyngeal aspirate; OPA, oropharyngeal aspirate; BAL, bronchoalveolar lavage.

and 1b genes encode the RNA polymerase and proteases that are essential for virus replication. A potential pseudoknot structure is present at position 12,439 (data not shown), which may provide the -1 frameshift signal to translate the 1b polyprotein. Genes predicted to encode the S, E, M and N proteins are found in the 3' part of the genome. The hemagglutinin-esterase gene, which is present in some group 2 coronaviruses, is not present in HCoV-NL63. ORF3, located between the S and E genes, probably encodes a single accessory nonstructural protein; this gene showed only limited similarity to ORF4A and ORF4B of HCoV-229E and ORF3 of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV).

The 1a and 1ab polyproteins are translated from the genomic RNA, but the remaining viral proteins are translated from subgenomic mRNAs, made by discontinuous transcription during negative strand synthesis²⁶. Each subgenomic mRNA has a common 5' end, derived from the 5' portion of the genome (the 5' leader sequence), and common 3' coterminal parts. Discontinuous transcription requires base-pairing between *cis*-acting transcription regulatory sequences (TRSs), one located near the 5' part of the viral genome (the leader TRS) and others located upstream of each of the respective ORFs (the body TRSs)²⁷. The cDNA bank that we sequenced contained copies of the subgenomic mRNA for the N protein, thus providing the opportunity to exactly map the leader sequence that is fused to all subgenomic mRNAs. A leader of 72 nucleotides was identified at the 5' UTR. Eleven of twelve nucleotides of the leader TRS (5'-UCU-CAACUAAAC-3') showed similarity with the body TRS upstream of the N gene. Putative TRSs were also identified upstream of the S, ORF3, E and M genes (Supplementary Table 2 online).

We next aligned the sequence of HCoV-NL63 with the complete genomes of other coronaviruses. The percentage nucleotide identity was determined for each gene and is listed in Table 2. All genes except the M gene shared the highest identity with HCoV-229E. To confirm that HCoV-NL63 is a new member of the group 1 coronaviruses, we conducted phylogenetic analysis using the nucleotide sequence of the 1a, 1b, S, M and N genes (Fig. 4b). For each gene analyzed, HCoV-NL63 clustered with the group 1 coronaviruses. The 1a, 1b and S genes of HCoV-NL63 are most closely related to those of HCoV-229E. However, further inspection revealed a subcluster of HCoV-NL63, HCoV-229E and PEDV. Phylogenetic analysis could not be performed for the ORF3 and E genes because the regions were too variable or too small for analysis, respectively. Bootscan analysis by the Simplot software version 2.5 (ref. 28) found no signs of recombination (data not shown).

The presence of a single nonstructural gene between the S and E genes is noteworthy because almost all coronaviruses have two or more ORFs in this region, with the exception of PEDV and

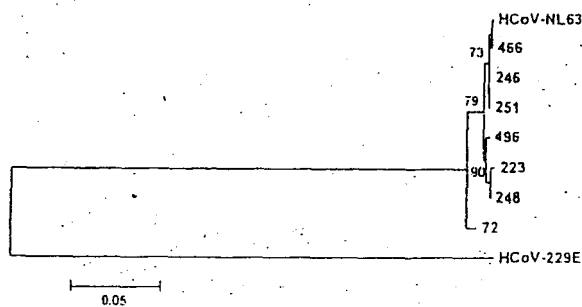


Figure 3 Phylogenetic analysis of RT-PCR sequences of the 1a gene from HCoV-NL63-positive patients. HCoV-229E was used to root the tree.

© 2004 Nature Publishing Group http://www.nature.com/naturemedicine



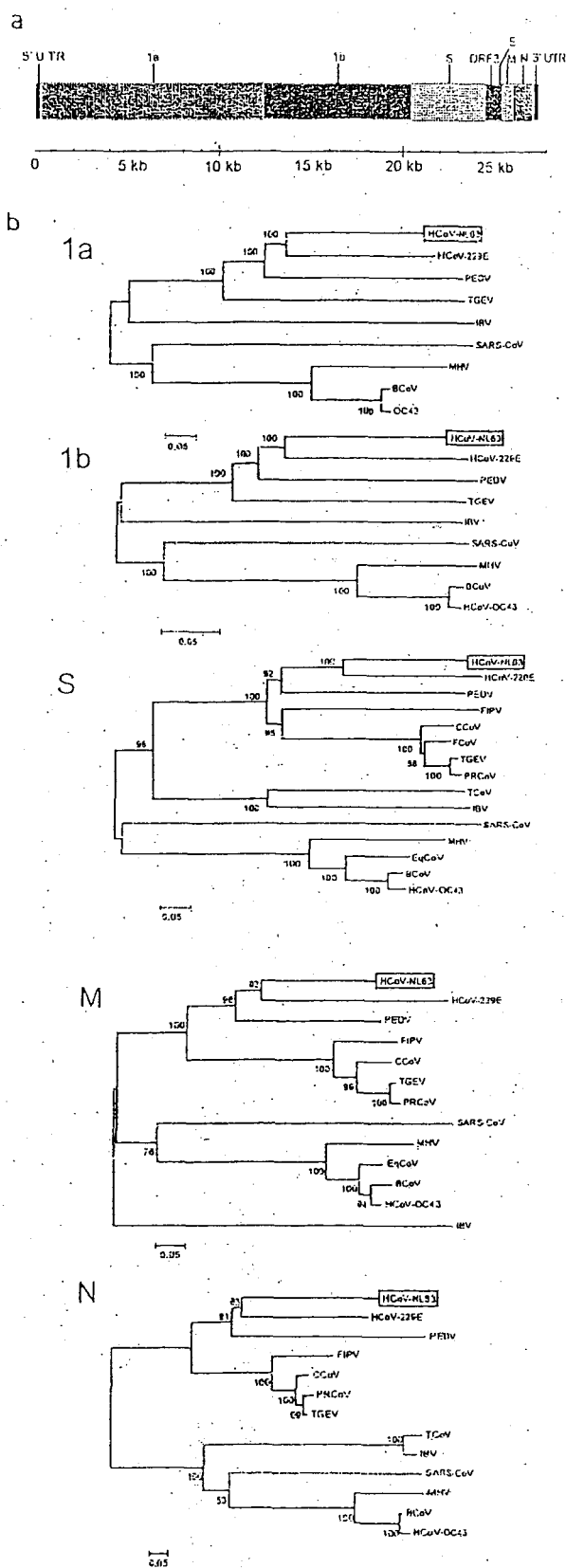


Figure 4 HCoV-NL63 genome organization and phylogenetic analysis. (a) ORFs encoding 1a, 1b, S, ORF3, E, M and N proteins are flanked by 286-nucleotide 5' UTR and 287-nucleotide 3' UTR. Coordinates of each ORF are provided in Supplementary Table 1 online. (b) Phylogenetic analysis of HCoV-NL63, using nucleotide sequences predicted to encode 1a, 1b, S, M and N proteins (see Supplementary Methods online for GenBank accession numbers). Red, group 1 viruses; blue, group 2; green, group 3; purple, SARS-CoV. MHV, mouse hepatitis virus; IBV, avian infectious bronchitis virus; BCoV, bovine coronavirus; FCoV, feline enteric coronavirus; CCoV, canine coronavirus; FIPV, feline infectious peritonitis virus; ECoV, equine coronavirus; TCoV, turkey coronavirus.

HCoV-OC43 (ref. 29,30). Perhaps most notable is a large insert of 537 nucleotides in the 5' portion of the S gene of HCoV-NL63, as compared with that of HCoV-229E. A BLAST search found no similarity between this additional 179-amino acid domain of the S protein and any coronavirus or other sequence deposited in GenBank. An alignment of the HCoV-NL63 S protein sequence with those of other group 1 coronaviruses is shown in Supplementary Figure 4 online.

DISCUSSION

In this study we present a detailed description of a new human coronavirus. Thus far, only three human coronaviruses have been characterized if we include SARS-CoV; further characterization of HCoV-NL63 as the fourth member will provide important insight into the variation among human coronaviruses. HCoV-NL63 is a member of the group 1 coronaviruses and is most closely related to HCoV-229E, but the differences between them are prominent. First, they share on average only 65% sequence identity. Second, a single gene, ORF3, in HCoV-NL63 takes the place of the 4A and 4B genes of HCoV-229E. Third, the 5' region of the S gene of HCoV-NL63 contains a large in-frame insertion of 537 nucleotides. The N-terminal region of the S protein has been implicated in binding to aminopeptidase N (group 1 coronaviruses) and sialic acid³¹⁻³³, so the 179-amino acid insert in HCoV-NL63 might be involved in receptor binding and may explain the tropism of this virus in cell culture. However, the aminopeptidase N receptor-binding domain of the HCoV-229E S protein has been mapped to amino acids 407-547 (ref. 33), so it seems unlikely that the insertion will be directly involved in binding to aminopeptidase N. Fourth, whereas HCoV-229E is fastidious in cell culture with a narrow host range, HCoV-NL63 replicates efficiently in monkey kidney cells. SARS-CoV is also able to replicate in monkey kidney cells (Vero-E6 cells³⁴), yet the predicted S proteins of SARS-CoV and HCoV-NL63 do not share a domain that could explain the *in vitro* host cell range of these viruses. Other viral proteins may influence the cell tropism of a virus, but none of the HCoV-NL63 proteins were more closely related to SARS-CoV than to HCoV-229E.

Variability at the 5' end of the S gene, correlating with alterations in tropism, has also been described for the group 1 coronaviruses porcine respiratory coronavirus (PRCoV) and transmissible gastroenteritis virus (TGEV). These porcine viruses are antigenically and genetically related, but their pathogenicity is markedly different. TGEV replicates in and destroys the enterocytes of the small intestine, causing severe diarrhea with high mortality in neonatal swine. In contrast, PRCoV (which emerged more recently than TGEV) has a selective tropism for respiratory tissue, and very little capacity to replicate in intestinal tissue. The difference between the TGEV and PRCoV S gene sequences is comparable to the difference between those of HCoV-NL63 and HCoV-229E³⁵. Compared with TGEV, PRCoV contains a deletion in the 5' hypervariable region of the S gene. The extra region that is present at the 5' end of the TGEV S gene is responsible for the hemagglutination activity of TGEV, and its capacity to bind to

© 2004 Nature Publishing Group <http://www.nature.com/naturemedicine>



Table 2 Percent nucleotide sequence identity between HCoV-NL63 and other coronaviruses

Gene	Group 1			Group 2		Group 3	Group 2/4
	HCoV-229E	PEOV	TGEV	BCoV	MHV	IBV	SARS-CoV
1a	53	57	50	40	38	37	38
1b	75	72	69	58	57	59	58
S	56	53	48	35	34	32	32
ORF3	53	49	29	29	25	19	23
E	59	54	49	37	39	25	40
M	64	65	46	47	43	43	42
N	52	38	45	30	29	31	30

GenBank accession numbers for viruses are provided in Supplementary Methods online.

sialic acid³². However, this region shows no similarity to the HCoV-NL63 insert.

The common cold-causing virus HCoV-229E can cause more serious respiratory disease in infants and immunocompromised patients^{16,37}. Our data indicate that HCoV-NL63 causes acute respiratory disease in children below the age of 1 year, and in immunocompromised adults. To date, no known viral pathogen can be identified in a substantial portion of respiratory disease cases in humans (20–30%; ref. 38). Several assays have been used to diagnose coronavirus infections. Traditionally, an antibody test is implemented to measure a rise in titers of antibodies to the human coronaviruses HCoV-229E or HCoV-OC43 (ref. 12). Antibodies to HCoV-NL63 might cross-react with HCoV-229E, given that these viruses are members of the same serotype. If this were the case, HCoV-NL63 infections might have been misdiagnosed as HCoV-229E. Molecular biology tools such as RT-PCR assays^{39,40} were designed to selectively detect the human coronaviruses HCoV-229E and HCoV-OC43, but these assays will not detect HCoV-NL63. Even the RT-PCR assay that was designed to amplify all known coronaviruses⁴⁰ is not able to amplify HCoV-NL63 because of several mismatches with the primer sequences. The availability of the complete HCoV-NL63 genome sequence means that these diagnostic assays can be substantially improved.

Our results indicate that HCoV-NL63 is present in a significant number of respiratory tract illnesses of unknown etiology. HCoV-NL63 was detected in patients suffering from respiratory disease, with a frequency of up to 7% in January 2003. The virus was not detected in more recent samples collected in the spring and summer of 2003, which correlates with the fact that human coronaviruses tend to be transmitted predominantly in the winter season¹². Future experiments with more sensitive diagnostic tools should yield a more accurate picture of the prevalence of this virus and its association with respiratory disease.

METHODS

VIDISCA method. The virus was cultured on LLC-MK2 cells. Details of virus culture and patient descriptions are available in Supplementary Methods online. To remove residual cells and mitochondria, 110 µl of virus culture supernatant was spun for 10 min at maximum speed (13,500 r.p.m.) in an Eppendorf microcentrifuge. To remove chromosomal DNA and mitochondrial DNA from the lysed cells, 100 µl of supernatant was transferred to a fresh tube and treated with DNase I for 45 min at 37 °C (Ambion). Nucleic acids were extracted as described⁴¹. A reverse transcription reaction was performed with random hexamer primers (Amersham Bioscience) and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (MMLV-RT; Invitrogen). Second-strand DNA synthesis was carried out with Sequenase II (Amersham Bioscience), without further addition of a primer. A phenol-chloroform extraction was followed by ethanol precipitation.

cDNA-AFLP was performed essentially as described⁴, with some modifications. The double-stranded DNA was digested with the *HinP1I* and *MseI* restriction enzymes (New England Biolabs). *MseI* and *HinP1I* anchors (see below) were subsequently added, along with 5U ligase enzyme (Invitrogen) in the supplied ligase buffer, for 2 h at 37 °C. The *MseI* and *HinP1I* anchors were prepared by mixing a top-strand oligonucleotide (5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' for the *MseI* anchor and 5'-GACGATGAGTCCTGAC-3' for the *HinP1I* anchor) with a bottom-strand oligonucleotide (5'-TAGGTACGCAGTC-3' for the *MseI* anchor and 5'-CGGTCAGGACTCAT-3' for the *HinP1I* anchor) in a 1:40 dilution of ligase buffer. Twenty

cycles of PCR were carried out with 10 µl of the ligation mixture, 100 ng of *HinP1I* standard primer (5'-GACGATGAGTCCTGACCGC-3') and 100 ng of *MseI* standard primer (5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'). Five microliters of this PCR product was used as input in the second 'selective' amplification step, along with 100 ng *HinP1I* N-primer and 100 ng *MseI* N-primer (the 'N' indicates that the standard primers were extended with one nucleotide; G, A, T or C). The selective rounds of amplification were done using 'touchdown PCR': 10 cycles of 94 °C for 60 s, 65 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min (annealing temperature reduced by 1 °C per cycle); 25 cycles of 94 °C for 30 s, 56 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min; and finally 1 cycle of 72 °C for 10 min. Sixteen PCR reactions, each with 1 of the 16 primer combinations, were conducted for each sample in this selective PCR. The PCR products were analyzed on 4% Metaphor agarose gels (Cambrex), and the fragments of interest were cloned and sequenced using BigDye terminator reagents. Electrophoresis and data collection were performed using an ABI 377 instrument. DNA molecular weight markers were from Invitrogen and Eurogentec.

To detect HIV-1, we used VIDISCA with *EcoRI* digestion instead of *HinP1I* digestion. VIDISCA was modified for parvovirus B19 detection as follows: the reverse transcription step was excluded; only *HinP1I* digestion and adaptor ligation were performed; the first PCR reaction was performed with 35 cycles instead of 20; and the first PCR fragments were visualized by agarose gel electrophoresis. Details of cDNA library construction and full genome sequencing are available in Supplementary Methods online.

Diagnostic RT-PCR. A total of 614 respiratory samples were collected from 493 individuals between December 2002 and August 2003 at the Academic Medical Center in Amsterdam. The specimens included oral and nasopharyngeal aspirates, throat swabs, bronchoalveolar lavage and sputum. The samples had been collected for routine viral diagnostic screening of people suffering from upper and/or lower respiratory tract diseases, and the patients consented that their samples be used for testing of respiratory viruses that included coronaviruses. We used 100 µl of each sample in a Boom extraction⁴². The diagnostic assay was designed based on the sequence of the 1b gene. The reverse transcription was performed with MMLV-RT (Invitrogen), using 10 ng of reverse transcription primer (repSZ-RT, 5'-CCACTATAAC-3'; coordinate 16232 in HCoV-NL63). The entire reverse transcription mixture was added to the first PCR mixture containing 100 ng of primer repSZ-1 (5'-GTGATGCATATGCTAATTG-3'; coordinate 15973) and 100 ng of primer repSZ-3 (5'-CTCTTGGAGGTATAATCCTA-3'; coordinate 16210). The PCR reaction consisted of the following steps: 95 °C for 5 min; then 35 cycles of 95 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, and 72 °C for 2 min; then 72 °C for 10 min.

A nested PCR was started using 5 µl of the first PCR product with 100 ng of primer repSZ-2 (5'-TTGGTAAACAAAGATAACT-3'; coordinate 16012) and 100 ng of primer repSZ-4 (5'-TCAATGCTATAACAGTCAT-3'; coordinate 16181). Twenty-five PCR cycles were performed using the same profile as the first PCR. Ten microliters of each PCR product was analyzed by agarose gel electrophoresis. All positive samples were repeated and sequenced to confirm the presence of HCoV-NL63. To verify negative and positive PCR results, an additional diagnostic RT-PCR assay was conducted using the 1a gene primers 5'-AATATGTCATAACAAATAAAACGATT-3' (reverse transcriptase primer P4H10-3; coordinate 6667), 5'-CTTTGATAACGGTCACTATG-3' (SS 5852-5P; coordinate 5777) and 5'-CTCATTACATAAACATCAAACGG-3'



ARTICLES

(P4G1M-5-3P; coordinate 6616) in the first PCR; and 5'-GGTCACTATG-TAGTTTATGATG-3' (P3E2-5P; coordinate 5788) and 5'-GGATTTTTCATAACCACTTAC-3' (SS 6375-3P; coordinate 6313) in the nested PCR. Details of sequence analysis are available in Supplementary Methods online.

GenBank accession numbers. The HCoV-NL63 sequences were deposited in GenBank under accession numbers AY567487-AY567494.

Note: Supplementary information is available on the Nature Medicine website.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank G. Koen and H. van Eijk for the images of the CPE, W. van Est for artwork, W. Pauw for providing patient specimens, and A. de Ronde for critical reading of the manuscript.

COMPETING INTERESTS STATEMENT

The authors declare competing financial interests (see the Nature Medicine website for details).

Received 10 December 2003; accepted 8 March 2004
Published online at <http://www.nature.com/naturemedicine/>

1. Stohlman, S.A. & Hinton, D.R. Viral induced demyelination. *Brain Pathol.* 11, 92-106 (2001).
2. Jubelt, B. & Berger, J.R. Does viral disease underlie ALS? Lessons from the AIDS pandemic. *Neurology* 57, 945-946 (2001).
3. Shingadia, D., Bose, A. & Bony, R. Could a herpesvirus be the cause of Kawasaki disease? *Lancet Infect. Dis.* 2, 310-313 (2002).
4. Bachem, C.W. et al. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J.* 9, 745-753 (1996).
5. Holmes, K.V. & Lal, M.M.C. Coronaviridae. in *Fields Virology* (eds. Fields, B.N. et al.) 1075-1093 (Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996).
6. Guy, J.S., Breslin, J.J., Breuhaas, B., Vivrette, S. & Smith, L.G. Characterization of a coronavirus isolated from a diarrhetic foal. *J. Clin. Microbiol.* 38, 4523-4526 (2000).
7. Tyrrell, D.A.J. & Bynoe, M.L. Cultivation of novel type of common-cold virus in organ cultures. *Br. Med. J.* 1, 1467-1470 (1965).
8. Hamre, D. & Procknow, J.J. A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 121, 190-193 (1966).
9. Almeida, J.D. & Tyrrell, D.A. The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture. *J. Gen. Virol.* 1, 175-178 (1967).
10. Thiel, V., Herold, J., Schelle, B. & Siddell, S.G. Infectious RNA transcribed in vitro from a cDNA copy of the human coronavirus genome cloned in vaccinia virus. *J. Gen. Virol.* 82, 1273-1281 (2001).
11. McIntosh, K., Dees, J.H., Becker, W.B., Kapikian, A.Z. & Chanock, R.M. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57, 933-940 (1967).
12. Hendley, J.O., Fishburne, H.B. & Gwaltney, J.M., Jr. Coronavirus infections in working adults. Eight-year study with 229 E and OC 43. *Am Rev. Respir. Dis.* 105, 805-811 (1972).
13. Mourir, S., Labonte, P. & Talbot, P.J. Characterization of the nonstructural and spike proteins of the human respiratory coronavirus OC43: comparison with bovine enteric coronavirus. *Adv. Exp. Med. Biol.* 342, 61-67 (1993).
14. Kunkel, F. & Herrler, G. Structural and functional analysis of the surface protein of human coronavirus OC43. *Viol.* 195, 195-202 (1993).
15. Bradburne, A.F., Bynoe, M.L. & Tyrrell, D.A. Effects of a "new" human respiratory virus in volunteers. *Br. Med. J.* 3, 767-769 (1967).
16. Peiris, J.S. et al. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet* 361, 1767-1772 (2003).

17. Lai, M.M. SARS virus: the beginning of the unraveling of a new coronavirus. *J. Biomed. Sci.* 10, 664-675 (2003).
18. Drosten, C. et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 348, 1967-1976 (2003).
19. Martina, B.E. et al. Virology: SARS virus infection of cats and ferrets. *Nature* 425, 915 (2003).
20. Guan, Y. et al. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science* 302, 276-278 (2003).
21. Marra, M.A. et al. The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* 300, 1399-1404 (2003).
22. Snijder, E.J. et al. Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J. Mol. Biol.* 331, 991-1004 (2003).
23. Hamparian, V.V. Rhinoviruses. in *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infection*. (eds. Lennette, E.H. & Schmidt, N.J.) 562 (American Public Health Association, Washington DC, 1979).
24. Rota, P.A. et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* 300, 1394-1399 (2003).
25. Chen, L.L., Ou, H.Y., Zhang, R. & Zhang, C.T. ZCURVE_CoV: a new system to recognize protein coding genes in coronavirus genomes, and its applications in analyzing SARS-CoV genomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307, 382-388 (2003).
26. Sawicki, S.G. & Sawicki, D.L. Coronaviruses use discontinuous extension for synthesis of subgenome-length negative strands. *Adv. Exp. Med. Biol.* 380, 499-506 (1995).
27. van Marle, G. et al. Arterivirus discontinuous mRNA transcription is guided by base pairing between sense and antisense transcription-regulating sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 12056-12061 (1999).
28. Lole, K.S. et al. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J. Virol.* 73, 152-160 (1999).
29. Mourir, S. & Talbot, P.J. Human coronavirus OC43 RNA 4 lacks two open reading frames located downstream of the S gene of bovine coronavirus. *Viol.* 192, 355-360 (1993).
30. Duarte, M. et al. Sequence analysis of the porcine epidemic diarrhea virus genome between the nucleocapsid and spike protein genes reveals a polymorphic ORF. *Viol.* 198, 466-476 (1994).
31. Godel, M., Grosclaude, J., Delmas, B. & Laude, H. Major receptor-binding and neutralization determinants are located within the same domain of the transmissible gastroenteritis virus (coronavirus) spike protein. *J. Virol.* 68, 8008-8016 (1994).
32. Krempf, C. et al. Characterization of the sialic acid binding activity of transmissible gastroenteritis coronavirus by analysis of haemagglutination-deficient mutants. *J. Gen. Virol.* 81, 489-496 (2000).
33. Bonavia, A., Zelus, B.D., Wentworth, D.E., Talbot, P.J. & Holmes, K.V. Identification of a receptor-binding domain of the spike glycoprotein of human coronavirus HCoV-229E. *J. Virol.* 77, 2530-2538 (2003).
34. Ksiazek, T.G. et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 348, 1953-1966 (2003).
35. Vaughn, E.M., Halbur, P.G. & Paul, P.S. Sequence comparison of porcine respiratory coronavirus isolates reveals heterogeneity in the S, 3, and 3-1 genes. *J. Virol.* 69, 3176-3184 (1995).
36. McIntosh, K. et al. Coronavirus infection in acute lower respiratory tract disease of infants. *J. Infect. Dis.* 130, 502-507 (1974).
37. Pene, F. et al. Coronavirus 229E-related pneumonia in immunocompromised patients. *Clin. Infect. Dis.* 37, 929-932 (2003).
38. Boivin, G. et al. Human metapneumovirus infections in hospitalized children. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 634-640 (2003).
39. Myint, S., Johnston, S., Sanderson, G. & Simpson, H. Evaluation of nested polymerase chain methods for the detection of human coronavirus 229E and OC43. *Mol. Cell. Probes* 8, 357-364 (1994).
40. Stephensen, C.B., Casebolt, D.B. & Gangopadhyay, N.N. Phylogenetic analysis of a highly conserved region of the polymerase gene from 11 coronaviruses and development of a consensus polymerase chain reaction assay. *Virus Res.* 60, 181-189 (1999).
41. Boorn, R. et al. A rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28, 495-503 (1990).

© 2004 Nature Publishing Group <http://www.nature.com/naturemedicine>



Identification of a new human coronavirus

新しいヒトコロナウイルスの確認

文献: Nature Medicine

掲載: online 21 March 2004; doi:10.1038.nm1024

概要

3 種類のヒトコロナウイルス: 229E(HCoV-229E)、HCoV-OC43、そして重症急性呼吸器症候群 (SARS)に関連しているコロナウイルス (SARS-CoV) が存在することが知られている。ウイルス発見の新技术を用いて、4 番目のヒトコロナウイルス HCoV-NL63 を同定したことを、私達はここに報告する。ウイルスは気管支炎と結膜炎を患った7ヶ月齢の小児から分離した。全ゲノム配列は、このウイルスが組換え型ではなく、むしろ新しいグループ1のコロナウイルスであることを示している。HCoV-NL63 は Tertiary サル腎細胞とサル腎 LLC-MK2 細胞系において複製するので、HCoV-NL63 のインビトロ宿主細胞範囲は注目すべきである。このウイルスゲノムは、スパイク蛋白 (spike protein) N 末端のユニークな断片等を含めた特徴的な構造を持っている。呼吸器疾患にかかったヒトから採取した臨床検体のスクリーニングにより、さらに7名の HCoV-NL63 感染者を確認した。それは、ヒトの集団内においてウイルスが広範囲に広がっていたことを示している。

今日までに、ヒトにおいて原因不明の様々な疾病が依然として存在している。これらの疾病の多くについてはウイルス性の原因が示唆されており、それは新しいウイルスにおける継続的調査の重要性を強調している。しかしながら、新しいウイルスを調査するにあたり、大きな困難に直面している。1 番目の困難は、いくつかのウイルスがインビトロ、即ち少なくともウイルスの診断によく用いる細胞では複製しないことである。2 番目は、インビトロで複製し、そして細部変性効果 (CPE) を引き起こしたウイルスに対して、その後に行うウイルス同定法が失敗する可能性があることである。既知ウイルスの抗体は培養したウイルスを認識しない可能性があり、そしてあるウイルスに特異的な PCR の方法は新しいウイルスゲノムを増幅しない可能性がある。私達はこの2つの問題を解決するために、cDNA 増殖制限酵素断片長多型法 (cDNA-AFLP) を基にした新しいウイルス検出法を開発した。この cDNA 増殖制限酵素断片長多型ウイルス検出法 (VIDISCA) を用いた新しいコロナウイルスの同定について、私達はここに報告している。

コロナウイルス科のコロナウイルスは、大きなプラス鎖 RNA ゲノムを持ったエンベロープウイルスである。ゲノム RNA は、サイズが27-32kbであり、そしてキャップ構造を持ち、ポリアデニル化している。コロナウイルスの3つの血清学的に異なったグループがあることが立証されている。各グループについて、ウイルスはその宿主域とゲノム配列によって性状が明らかにされている。マウス、ネズミ、ニワトリ、シチメンチョウ、ブタ、イヌ、ネコ、ウサギ、ウマ、ウシ、ヒトにおいてコロナウイルスは同定されており、このウイルスは、胃腸炎や気道疾患などの深刻な疾病を引き起こす。3種類のヒトコロナウイルスが詳細に研究されている。HCoV-229E と HCoV-43 は、1960 年中期に同定されており、

一般的な風邪を引き起こすことが知られている。最近同定された SARS-CoV は、生命を脅かす肺炎を引き起こし、これまでに同定された最も病原性が強いヒトコロナウイルスである。SARS-CoV は動物リザーバーに存在している可能性が高く、近年、人畜共通の感染を介してヒトにおいて流行が起きた。SARS-CoV は、コロナウイルスのグループ 4 に属する最初のメンバー、あるいはグループ 2 からかけ離れていることが示唆されている。

私達がここに提起した新しいコロナウイルスは、気管支炎と結膜炎の小児から分離した。私達が昨年の冬、乳児と成人を含む 7 名の患者の臨床試料からウイルスを同定したことから、これは孤立した症例ではなかった。また、私達はウイルスゲノムの全塩基配列を解明し、いくつかのユニークな構造を明らかにした。

結果 急性呼吸器病の小児からのウイルス分離

2003 年 1 月、7 ヶ月齢の小児が、コリーザ、結膜炎、発熱を呈して入院した。胸部 X 線検査により、典型的気管支炎の特徴が明らかになった。発病 5 日目に鼻咽頭の吸引試料を採取した (検体 NL63)。RS ウイルス、アデノウイルス、インフルエンザウイルス A 型・B 型、パラインフルエンザウイルス 1 型・2 型、ライノウイルス、エンテロウイルス、HCoV-229、HCoV-OC43 に対して実施した診断学的検査の結果は、陰性だった。引き続き、臨床検体をヒト胎児肺の繊維芽細胞、tertiary サル (カニクイザル) 腎細胞、そして HeLa 細胞に接種した。Tertiary サルの腎細胞においてのみ CPE を検出し、接種後 8 日目に初めて CPE が見られた。感染細胞において、屈折の出現をともなって CPE が拡散した。その後、細胞の剥離が起きた。サルの腎臓細胞系 LLC-M2 で継代すると、細部は全体的に丸くなり、そして適度に大きくなり顕著な CPE が観察された。ヒト胎児肺繊維芽細胞、胎児型横紋筋肉腫細胞、Vero 細胞に対し追加実施した 2 次培養は、依然として CPE 陰性を示した。また、RS ウイルス、アデノウイルス、インフルエンザウイルス A 型・B 型、パラインフルエンザウイルス 1 型・2 型を検出するための免疫蛍光測定法の結果も、引き続き陰性を示した。酸不安定試験とクロロホルムの感受性検査結果は、そのウイルスが外膜に被われている可能性が最も高く、そしてピコナウイルスグループには属していないことを示していた。

VIDISCA 法によるウイルスの検出

ターゲットとする塩基配列が分からないので、特異的 PCR プライマーをデザインすることは不可能である。従って分子生物学ツールを用いて未知の病原体を同定することは困難である。私達はこの問題を解決するために、cDNA-AFLP 技術を基にした VIDISCA 法を開発した。VIDISCA 法の長所として、制限酵素部位が PCR 増幅を十分に保証するので、塩基配列の予備知識を必要としないことがある。供試検体には、血液血漿か血清のどちらか、あるいは培養上清を用いることができる。cDNA-AFLP は単離した mRNA を出発材料とするのに対し、VIDISCA では残留細胞とミトコンドリアを除去する遠心分離ステップを含めたウイルス性核酸を選択的に濃縮する処理から始める。さらに、分解した細胞 (ウイルスの核酸はウイルス粒子内で保護されている) から、妨害染色体とミトコンドリア DNA を取り除くために DNase 処理法も採用した。最終的には、高頻度に切断する制限酵素を選択することにより、殆どのウイルス遺伝子が増幅するようにこの方法を微調整することができ

る。私達は、B型肝炎ウイルス感染患者と急性パルボウイルス B19 感染患者の EDTA 処理をした血清中のウイルス核酸を増幅することができた。また、この技術における RNA と DNA 両者を同定する能力が立証されていることから、この技術をもちいて培養細胞から HIV-1 ウイルスを検出することも可能である。

NL63 の CPE 陽性 LLC-MK2 培養上清を VIDISA によって解析した。感染していない細胞の上清をネガティブコントロールとして用いた。2 回目の PCR 増幅を行った後、ユニークかつ顕著な DNA 断片が検査用検体に現われたが、ネガティブコントロールには現われなかった(選択した 16 の PCR 反応のうち 1 つを Fig.1 に表す)。これらの断片をクローン化し、塩基配列を決定した。16 のうち 13 断片がコロナウイルス科のメンバーに似た塩基配列を示したが、全ての断片において既知のコロナウイルスの塩基配列との著しい相違がはっきりと見られた。即ちこれは、私達が新しいコロナウイルスを同定したことを示していた。13 個の VIDISCA 断片の塩基配列を Fig.2 に示す。

患者試料からの HCoV-NL63 検出

HCoV-NL63 が小児の鼻咽頭の吸引物に由来することを示すため、私達は HCoV-NL63 を特異的に検出する診断用 RT-PCR をデザインした。この検査によって HCoV-NL63 の臨床検体を確認した。1b 遺伝子の PT-PCR 産物における塩基配列は、LLC-MK2 細胞においてインビトロ継代時に同定したウイルスの塩基配列と一致した(データ表さず)。培養コロナウイルスが小児に由来していたことは確認されているが、それが臨床の孤立例であるのか、あるいは HCoV-NL63 がヒトの間で感染を続けているのかという疑問は依然として残っている。この疑問を解決するために、入院患者および 2002 年 12 月～2003 年 8 月の期間に病院を訪れた患者の呼吸器試料を 2 種類の診断用 RT-PCR 検査を用いて調べた(Fig.2)。その結果、さらに 7 名の HCoV-NL63 感染者を確認した(Table1)。PCR 産物における塩基配列の解析は、数個の特長的な突然変異がいくつかの検体に存在していることを示していた。そのことは、異なった分子マーカを持ついくつかのウイルスが同時に拡がっている可能性を示していた。(Fig.3 及び補足 Fig.3 オンライン)。これらの HCoV-NL63 陽性患者のうち、少なくとも 5 名が気道疾患に苦しんでいた。2 名の臨床データは入手できなかった。発端患者を含め、5 名の患者は 1 歳以下の小児であり、3 名は成人であった。そのうち 2 名の成人患者は免疫不全の可能性があり、この 2 名の成人患者の 1 人は骨髄移植の患者、もう 1 人は極めて低い CD4⁺細胞を持つ AIDS を患した HIV 陽性患者であった。3 人目の患者についてのデータは得られていない。1 名の患者(no.72)は、RS ウイルスに同時感染しており、HIV の患者(no.466)においては、ニューモシステイス・カリニを保有していた。他の患者から呼吸性病原体が発見されなかったことは、呼吸器性の症状が HCoV-NL63 によって引き起こされたということを示唆していた。全ての陽性検体は昨冬期に採取した。その検出率は、2003 年 1 月で 7%であった。2003 年の春と夏に採取した 360 検体においては、HCoV-NL63 を持つものは無かった(両側 t 検定 $P < 0.01$)。

HCoV-NL63 の全ゲノム解析

コロナウイルスゲノムは特徴的な構造を持っている。5' 末端の 2/3 には、非構造ポリタンパクをコー

ドしている Ia と Ib を持ち、それに続いて4つの構造遺伝子: スパイク(S)、エンベロープ(E)、膜(M)、ヌクレオカプシド(N)を持っている。既知のコロナウイルスゲノムには非構造タンパクをコードしている; 長さがさまざまな特長的なオープンリーディングフレーム(ORFs)を、Ib と S 遺伝子間、S と E 遺伝子間、M と N 遺伝子間 または N 遺伝子の下流に持っている。

HcoV-NL63 がこれら性状を保有しているのか明らかにするために、試験投入材料としての精製ウイルスから、cDNA ライブラリーを構築した。平均で1塩基当り7塩基のカバーを行い、全部で 475 ゲノム断片を解析した。ギャップを埋めるためと精度が低い配列データの領域塩基配列を決めるために、特異的 PCR 反応をデザインした。HcoV-NL63 の全ゲノム配列を解析するために、cDNA 末端の5'末端迅速増幅(rapid amplification)と3'末端それを組み合わせた。

HcoV-NL63 の RNA ゲノムは 27,553 塩基であり、ポリ A 末端を持つ。コロナウイルス GC 含量の範囲は 37~42%であるなかで、HcoV-NL63 は 34%であり最も低い GC 含量を持つ。オープンリーディングフレーム(ORFs)を同定するために、ZCurve ソフトウェア(Zcurve Software)を用いた。1つの指針として既知のコロナウイルスとの類似性を用いて、ゲノムの立体配置を描いた。286 塩基と 287 塩基の短い非翻訳領域が 5'末端と 3'末端のそれぞれに存在した。Ia と Ib 遺伝子はウイルス複製に必須な RNA ポリメラーゼとプロテアーゼ(タンパク分解酵素)をコードしていた。シュードノット構造となる可能性、すなわちマイナス1塩基のフレームシフトにより Ib ポリプロテインを翻訳させる可能性がある部分が 12,439 のところにある。S、E、M、そして N タンパクをコードしていると予測できる遺伝子がゲノムの 3'側に見いだせる。いくつかのグループ2コロナウイルスに存在する、ヘモグルチニン-エステラーゼ遺伝子は HcoV-NL63 には存在していない。S と E 遺伝子間に存在する ORF3 はたぶん、シングルアクセサリー非構造タンパクをコードしている。この遺伝子は HcoV-229E の ORF4A と ORF4B に対して、そしてブタ流行性下痢症ウイルスの ORF3 に対して限定的な類似性を示した。

Ia と Iab ポリプロテインはゲノム RNA から翻訳されるが、残りのウイルスタンパクについては、マイナス鎖合成過程の不連続転写により発生したサブジェノミック mRNA から翻訳されている。各サブジェノミック mRNA は、ゲノムの5'側(5'リーダー配列)と共通3'共末端から由来した5'末端を有している。不連続転写が起こるには、シスに働く転写制御配列、すなわちウイルス遺伝子の5'部分に位置する配列(リーダーTRS)とそれぞれの ORF 上流に位置する配列との間に塩基対が必要である。私たちが塩基配列を決定した cDNA バンクは N タンパクに対するサブジェノミック mRNA コピーを含んでいる、そのことはサブジェノミック mRNA に融合しているリーダー配列の位置を正確に教示することになる。リーダーの 72 塩基を 5'UTR の位置に見出した。リーダー TRS(5'-UCUCAACUAAAC-3')の 12 塩基のうち 11 塩基は、N タンパクの TRS 上流との間に類似性を呈した。想定転写因子も S、ORF3、E そして M 遺伝子の上流に見つかった。

次に、他のコロナウイルスゲノムと共に HcoV-NL63 の全塩基配列を一行に並べ比較した。各遺伝子について、塩基の同一性のパーセンテージを決め、それを表 2 にリストした。M 遺伝子を除いた残り全ての遺伝子は HcoV-229E 非常に高い同一性を有していた(図 4b)。HcoV-NL63 がグループ1コロナウイルスの新たなメンバーであることを確認するために、Ia、Ib、S、M と N 遺伝子の塩基配列を用いて、系統発生解析を行なった。解析した各遺伝子に対して、HcoV-NL63 は

HCoV-229Eとの間でクラスターが見られた。HCoV-NL63の1a、1b、SはHCoV-229Eのそれらと最も深い近縁関係がある。しかしながら、より深く調べるとHCoV-NL63、HCoV-229EとPEDVはサブクラスターの関係にあることがわかった。ORF3とE遺伝子を分析するには、各々が伝子領域があまりにも変化にとんでいて、又はE遺伝子は小さすぎるために、系統発生解析は行えなかった。シムプロットソフトウェア Ver.2.5によるブースト分析によると遺伝子組合せの形跡は見られなかった。S遺伝子とE遺伝子の間に、1個の非構造遺伝子が存在することは注目に値する、というのはPEDVとHCoV-OC43を除き、ほとんど全てのコロナウイルスはこの領域に2個、もしくはそれ以上のORFをもっているからだ。たぶんもっとも注目すべきことは、HCoV-229Eの場合と比較し、HCoV-NL63のS遺伝子の5'部分に537塩基という長い挿入があることだ。このようにS遺伝子に付加されている179アミノ酸ドメインと他のコロナウイルスまたはGenBankに蓄積されている他のウイルス配列の間には、全く類似がないことがBLASTサーチによりわかった。HCoV-NL63のSタンパク配列を他のグループ1コロナウイルスのそれらを一列に並べた比較を Supplement Figure4 online に示した。

ディスカッション

私達は、本研究において新しいヒトコロナウイルスについて、詳細な説明を提示している。現在のところ、SARS-CoVを含めると、3種類のヒトコロナウイルスの性状が明らかにされている。4番目のメンバーとして、HCoV-NL63の性状をさらに明らかにすることは、ヒトコロナウイルスの変化における洞察を提供するであろう。HCoV-NL63は、コロナウイルスグループの一員であり、HCoV-229Eとは最も近縁の関係にある。しかしながら、この2つのウイルスの違いは顕著である。1番目に、両者は平均してわずか56%の塩基配列の同一性を持っているだけである。2番目は、HCoV-229Eの4A遺伝子とB遺伝子がある位置に、HCoV-NL63では1つの遺伝子ORF3が存在している。3番目は、HCoV-NL63のS遺伝子5'末端領域に、大きなインフレームで挿入された537塩基があることである。SタンパクのN末端領域が、アミノペプチターゼN(コロナウイルスグループ1)とシアリン酸の結合に関わっていることから、HCoV-NL63にアミノ酸179個の挿入はレセプターの結合に関係している可能性があり、よって細胞培養においてこのウイルスの親和性を説明するかも知れない。しかしながら、HCoV-229EのSタンパクアミノペプチターゼNレセプター結合ドメインがアミノ酸407-547に位置付けられている(ref.33)。そこで、その挿入がアミノペプチターゼNの吸着に直接関与している可能性は低いと思われる。4番目は、HCoV-229Eは狭い宿主幅を持っており、細胞培養が困難であるのに対して、HCoV-NL63はサルの腎細胞で効率良く複製する。SARS-CoVもまた、サルの腎細胞で複製することができる(Vero-E6細胞)。しかし、SARS-CoVとHCoV-NL63の想定Sタンパクは、これらのウイルスのインビトロでの宿主細胞範囲を説明できる共通のドメインを持っていない。他のウイルスタンパク質がウイルスの細胞親和性に影響を及ぼす可能性があるが、HCoV-NL63の全てのタンパクについて、HCoV-229Eに対してよりもSARS-CoVに対しての方がより近縁な関係がなかった。

コロナウイルスグループ1のブタ呼吸器コロナウイルス(PRCoV)とブタ伝染性胃腸炎ウイルス(TGEV)において、親和性の変動に関係するS遺伝子5'末端の変動性も説明がされている。これら

のブタウイルスは、抗原的そして遺伝子学的には近縁関係にあるが、その病原性において高い死亡率を伴った深刻な下痢を引き起こす。一方、PRCoV(TGEV よりも最近になり出現した)は呼吸器組織に選択的親和性を有し、腸組織においてはわずかな複製しか行わない。TGEVとPRCoVのS遺伝子配列の相違は、S遺伝子の超可変領域5末端に欠失がある。TGEVのS遺伝子5末端にある特別領域は、TGEVの血球凝集活性及び、シアリン酸への結合に関与している。しかしながら、この領域はHCoV-NL63の挿入部分との類似性を示していない。

一般的な風邪を引き起こすHCoV-229Eウイルスは、小児と免疫不全患者に、より重症な呼吸器疾患を引き起こす可能性がある。私達のデータは、HCoV-NL63が1歳以下の小児と免疫不全患者において急性呼吸器疾患を引き起こすことを示している。ほとんどのヒト呼吸器疾患において、今日までそのウイルス病原体は同定できていない(20-30%;参照38)。そして、コロナウイルス感染を診断するために様々な方法が用いられている。伝統的に、ヒトコロナウイルスHCoV-229EまたはHCoV-OC43に対する抗体価の上昇を測定するために、抗体検査が行われている(参照12)。もしこれらのウイルスが同じ血清型のメンバーだとすると、HCoV-NL63に対する抗体はHCoV-229Eに対して交差反応を起こす可能性がある。もしそうであったとしたならば、HCoV-NL63感染は、HCoV-229Eと誤診された可能性があったかもしれない。RT-PCR法などの分子生物学ツールは、ヒトコロナウイルスHCoV-OC43を選択的に検出するようにデザインされたが、HCoV-NL63を検出することはない。既知の全コロナウイルスを増幅するためにデザインしたRT-PCR法でさえも、プライマー塩基配列のいくつかが一致していないので、HCoV-NL63を増幅することは出来ないであろう。HCoV-NL63の全ゲノム配列情報を入手することは、治療方法の大幅な改善を意味している。

私達が得た結果は原因不明の多数の疾患に、HCoV-NL63が存在していることを示している。呼吸器病を患った患者からHCoV-NL63を検出した。その検出頻度数は、2003年1月に最高7%であった。2003年の春と夏に採取した最も新しい検体からウイルスは検出されなかった。これは、ヒトコロナウイルスは冬場に圧倒的に伝播する傾向にあるということと一致する。このウイルスによる感染の拡がりや、呼吸器病との関連性における正確なイメージが、より感度の高い診断ツールを用いた将来の研究によって得られるであろう。

以上