



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on zoonotic viruses isolated from wild animals with an optimal isolation method for protease-dependent viruses [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	岸本, 麻衣
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第15520号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89969
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Mai_Kishimoto_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨
Abstract of the dissertation

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学） 氏名： 岸本 麻衣
Name

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

Studies on zoonotic viruses isolated from wild animals with an optimal isolation method for protease-dependent viruses

(プロテアーゼ依存性ウイルスの高効率分離法により分離された
野生動物由来ウイルスに関する研究)

国際社会ではこれまでに、COVID-19をはじめとした様々な新興・再興感染症が出現し、公衆衛生上の脅威となっている。約 3/4 以上の新興・再興感染症は人獣共通感染症であり、中でもウイルス感染症の多くは野生動物からの伝播を経て出現したと考えられる。そのため、野生動物の保有するウイルスの調査はワンヘルスの観点から重要である。近年、メタゲノム解析技術の普及に伴い、多くの検体から様々な新規ウイルスゲノムが検出されている。しかし、ほとんどの報告はゲノム解析に留まっており、ウイルス分離およびウイルス学的な性状解析の試みは十分ではない。特に、プロテアーゼ依存性ウイルスは、培養細胞での増殖時に無血清培地でトリプシンを作用させる必要があるため、検体の接種による細胞傷害が生じやすく、ウイルス分離が困難である。これまで、宿主 II 型膜貫通型セリンプロテアーゼ (TTSP) 発現細胞において、トリプシン非存在下においてもプロテアーゼ依存性ウイルスの感染増殖が可能であることが明らかになっているが、TTSP 発現細胞を野生動物からの網羅的なウイルス分離に用いた例は少ない。そこで本研究では、TTSP 発現細胞を用いて野生動物由来検体からウイルス分離を実施し、分離したウイルスのウイルス学および疫学的性状解析を実施することを目的とした。

第一章では、代表的なプロテアーゼ依存性ウイルスである SARS-CoV-2 の感染を促進する TTSP を検索した。SARS-CoV-2 は、TMPRSS2 などの TTSP を利用して、ウイルスのスパイクタンパク質を切断・活性化し細胞侵入効率を上昇させるが、SARS-CoV-2 の感染における TMPRSS2 以外の TTSP の役割については解明されていない。そこで、ヒト ACE2 発現 HEK293T 細胞および Vero E6 細胞を用いて 12 種類の TTSP をスクリーニングし、TMPRSS11D および TMPRSS13 が SARS-CoV-2 の感染増殖を促進することを明らかにした。また、SARS-CoV-1 と SARS-CoV-2 は、ウイルス侵入過程において同様の TTSP を利用することが明らかになった。TTSP は各組織において異なる発現分布を示すため、本研究で明らかにした TTSP 利用性は

SARS-CoV-2 細胞や組織の指向性、病原性に影響する可能性がある。

脳心筋炎ウイルス (EMCV) は様々な哺乳類動物に感染し、脳炎、心筋炎、生殖障害、糖尿病などを引き起こす。特に、養豚場における繁殖障害や、動物園や野生動物保護区等での希少動物の突然死は経済・環境の観点から重要な問題である。また、動物との接触によってヒトへも稀に感染し、発熱性疾患を引き起こす人獣共通感染症である。本章では、ザンビアで採取した齧歯類動物 (マストミス、*Mastomys natalensis*) から EMCV ZM12/14 株を分離し、性状解析を実施した。系統解析の結果、ZM12/14 株は一部のゲノム領域で既知の EMCV 株と離れた系統に分類され、特徴的な進化系統を有することが示された。さらに、ザンビア各地で捕獲した各種齧歯類動物の組織および血清を用いて、EMCV の RT-PCR スクリーニングと中和抗体測定を実施した。その結果、*M. natalensis* のみから EMCV ゲノムおよび中和抗体が検出され、RT-PCR 陽性、陰性検体どちらにおいても、高い中和抗体価が確認された。他種の齧歯類動物ではゲノムおよび中和抗体は検出されなかった。本研究では、ザンビアで初めて EMCV を検出し、*M. natalensis* がレゼルボアの役割を担うことを示唆する結果を得た。

ロタウイルス A (RVA) は、ヒトや様々な動物に下痢性疾患を引き起こす。近年、ヒト RVA との遺伝子再集合を示唆するコウモリおよび齧歯類動物由来 RVA が複数報告されている。しかし、様々な非典型的な遺伝子型が含まれるコウモリおよび齧歯類動物由来 RVA のウイルス学的性状はほとんど解明されていない。そこで、ヒト TMPRSS2/TMPSS11D 共発現 MA104 細胞とザンビアで採取した野生動物検体を用いた RVA のウイルス分離先行型スクリーニングを実施し、コウモリ (*Rousettus aegyptiacus*) およびマストミス (*M. natalensis*) から RVA を分離した。全ゲノム配列解析の結果、コウモリ由来 RVA 16-06 株およびマストミス由来 RVA MpR12 株は、非典型的な遺伝子型構造を有していた。さらに、MpR12 株は、系統学的に他の齧歯類由来 RVA よりもコウモリ由来 RVA に近く、特徴的な進化系統を有することが示された。次に、分離株のウイルス学的性状を解析した。RVA が細胞侵入する際の接着因子である細胞表面糖鎖と RVA の結合性を調べた結果、16-06 株は細胞表面のシアル酸と結合して細胞内に侵入する一方、MpR12 株はシアル酸とは結合しないことが明らかになった。さらに、乳飲みマウスへの経口接種により分離株の病原性を評価した結果、16-06 株および MpR12 株はどちらも乳飲みマウスに感染し、下痢を引き起こすことが示された。また、3次元再構築したヒト初代腸管上皮に対する RVA の感染性を調べた結果、16-06 株および MpR12 株は、ヒト由来 RVA Wa 株と同等の効率で感染増殖することが明らかになった。本研究では、非典型的な遺伝子型構造を持つコウモリおよび齧歯類由来 RVA のウイルス学的性状が明らかになり、それらの RVA が人獣共通感染症となる可能性についてさらなる調査が必要であることが示唆された。

本研究では、プロテアーゼ依存性ウイルスに着目して野生動物検体からのウイルス分離を実施し、分離された EMCV および RVA の性状解析を実施した。野生動物の保有するウイルスの調査では通常、標的とする病原体のゲノムスクリーニング実施後、陽性検体からウイルス分離を実施する。しかし、このような手法では標的外のウイルスや既知ウイルスと配列類似性の低いゲノムを有するウイルスを検出することは困難である。多数の野生動物検体からゲノムスク

リーニングを介さずにウイルス分離を実施する本研究の手法により、今回分離した EMCV の様に採材地における分布が不明であったウイルスや、既知配列と低い配列類似性を持つコウモリおよび齧歯類動物由来 RVA が分離され、本手法の有効性が実証された。今後本手法を、野生動物を含む様々な検体からのウイルス探索に用いることにより、多数の新規ウイルスが分離されることが期待される。さらに本研究では、分離した EMCV および RVA のウイルス学的性状を解析した。EMCV の性状解析では、*M. natalensis* が EMCV のレゼルボアである可能性が示されたため、今後ザンビアの養豚場や野生動物保護区における EMCV の調査が必要である。RVA の性状解析では、コウモリおよび齧歯類動物由来 RVA のウイルス学的性状および宿主特異性に関する基礎的な知見を得た。今回検出した RVA が実際にヒトへの感染やヒト RVA との遺伝子再集合を起こすか調べるため、今後、多様な遺伝子型の RVA を標的としたザンビアのヒト検体の疫学調査が必要である。