



Title	全てのウイルスに対応できる汎用的な組換えウイルス作製技術の開発とその応用
Author(s)	山本, 紘嵩
Description	配架番号 : 3007
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16914号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16914
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99759
Type	doctoral thesis
File Information	YAMAMOTO_Hirotaka.pdf, 全文



学 位 論 文

全てのウイルスに対応できる汎用的な
組換えウイルス作製技術の開発とその応用

(Applied research on the rapid reverse
genetics for RNA viruses and DNA viruses)

2026 年 3 月

北 海 道 大 学

山 本 紘 嵩

学 位 論 文

全てのウイルスに対応できる汎用的な
組換えウイルス作製技術の開発とその応用

(Applied research on the rapid reverse
genetics for RNA viruses and DNA viruses)

2026 年 3 月

北 海 道 大 学

山 本 紘 嵩

目次

発表論文目録および学会発表目録	・ ・ ・	1	頁
要旨	・ ・ ・ ・ ・	2	頁
略語表	・ ・ ・ ・ ・	5	頁
緒言	・ ・ ・ ・ ・	6	頁
第一章	・ ・ ・ ・ ・	8	頁
緒言	・ ・ ・ ・ ・	9	頁
材料と方法	・ ・ ・ ・ ・	11	頁
結果	・ ・ ・ ・ ・	15	頁
考察	・ ・ ・ ・ ・	23	頁
第二章	・ ・ ・ ・ ・	26	頁
緒言	・ ・ ・ ・ ・	27	頁
材料と方法	・ ・ ・ ・ ・	28	頁
結果	・ ・ ・ ・ ・	33	頁
考察	・ ・ ・ ・ ・	36	頁
結論	・ ・ ・ ・ ・	38	頁
謝辞	・ ・ ・ ・ ・	39	頁
利益相反	・ ・ ・ ・ ・	40	頁
引用文献	・ ・ ・ ・ ・	41	頁

発表論文目録及び学会発表目録

本研究の一部は以下の論文にて発表した。

1. Hirotaka Yamamoto, Tomokazu Tamura, Takaya Ichikawa, Yudai Taguchi, Kento Mori, Satoshi Oguri, Rigel Suzuki, Saori Suzuki, Takanori Teshima, Takasuke Fukuhara
Generation of recombinant viruses directly from clinical specimens of COVID-19 patients
Journal of Clinical Microbiology, 2024;62(7): e0004224.
2. Hirotaka Yamamoto, Tomokazu Tamura, Takasuke Fukuhara
Rapid Plasmid-Free Generation of Recombinant Positive-Strand RNA Viruses That Use IRES-Mediated Translation Using an Expansion of the Circular Polymerase Extension Reaction (CPER)
Bio-protocol journal, 2025; 15(8): e5275.
3. Hirotaka Yamamoto, Tomokazu Tamura, Rigel Suzuki, Saori Suzuki, Takasuke Fukuhara
First Versatile Reverse Genetics System for DNA Viruses Using Circular Polymerase Extension Reaction
Microbiology and Immunology, 2025; Online ahead of print.

本研究の一部は以下の学会にて発表した。

1. 山本紘嵩、田村友和、市川貴也、田口裕大、森健人、小栗聡、鈴木理滋、鈴木紗織、豊嶋崇徳、福原崇介
新型コロナウイルス感染症の患者検体からの組換えウイルスの作出
第 70 回日本ウイルス学会学術集会、2023 年 9 月 26 日、仙台市
2. 山本紘嵩、田村友和、市川貴也、田口裕大、森健人、小栗聡、鈴木理滋、鈴木紗織、豊嶋崇徳、福原崇介
新型コロナウイルス感染症の患者検体からの組換えウイルスの作出
第 2 回新型コロナウイルス研究集会、2024 年 8 月 3 日、特別行政区

要旨

【背景と目的】

今もなお流行している新型コロナウイルス感染症（COVID-19）に代表される新興・再興ウイルス感染症は、時に多くの人命を奪い、世界経済に多大な被害をもたらす。このような事態を今後避けるためにも感染症が発生した際にウイルスの性状を解析し、更なる流行への先回り対策及び治療薬の開発に向けた基盤研究を行うことは極めて重要である。ウイルスのリバースジェネティクス法は、ウイルスゲノムを細胞に導入することで、感染性ウイルスを人工合成する技術である。この方法を用いることで、任意の変異をもつ組換えウイルスあるいは蛍光及び発光レポーターを搭載したウイルスを作製することが可能である。しかし、一般的に使用されているリバースジェネティクス法は、複雑な遺伝子操作技術と膨大な時間を要するため、新興・再興ウイルス感染症に迅速に対応できない。従って、汎用性が高く、かつ迅速に組換えウイルスを作製することができるリバースジェネティクス法を新たに開発することができれば、ウイルス感染症に迅速な対策を講じることができると考えられる。

私が所属する教室では、Circular Polymerase Extension Reaction（CPEP）法（Edmodns et al., J Virol., 2013; Setoh et al., J Gen Virol. 2015; Setoh et al., mSphere. 2017; Amarilla AA, et al., Nat Commun., 2021）を駆使し、プラス鎖一本鎖 RNA ウイルスの組換えウイルスを迅速に人工合成することに成功している（Tamura et al., J. Virol., 2018; Torii et al., Cell Rep., 2021; Tamura et al., J Virol., 2024）。また、Nakashima らによりマイナス鎖 RNA ウイルスへ CPEP 法を適用し、組換えウイルスの作出に成功したことが報告された（Nakashima et al., Biochem Biophys Res Commun., 2025）。CPEP 法とは、末端領域が重なるように設計した遺伝子断片を RNA ポリメラーゼ I または II を含むリンカー断片と共に PCR で連結して環状 DNA を構築する手法である。この手法を用いて SARS-CoV-2 の様々な変異株の性状を迅速に明らかにし、本邦での流行を前に成績を公表することができたことで、CPEP 法の極めて高い有用性が実証された（Motozono et al., Cell Host Microbe 2021, Saito et al., Nature 2021, Yamasoba et al., Cell 2022, Kimura et al., Cell 2022, Saito et al., Cell Host Microbe; Tsujino et al., Microbiol Immunol., 2024; Tamura et al., Nat Commun., 2024; Tsujino et al., J. Virol 2025）。従って、さまざまなウイルスにおいて組換えウイルスを自在に且つ迅速に作製することができれば、基礎ウイルス学研究の発展に資すると考えられる。

CPEP 法が適用されている SARS-CoV-2 をはじめとする RNA ウイルスは、自身のゲノムの校正機能が低く変異が入り易いため変異株が次々と出現する

（Duffy, PLoS Biok., 2018）。そのためウイルスの迅速な性状評価が必要となるが、臨床検体から分離されたウイルスは他の微生物による汚染、または採取・保存

の過程で感染性が低下することで細胞培養で増幅できない場合がある。そこで私は第1章として、COVID-19 診断の過程で採取された患者唾液検体を利用しウイルス分離を行うことなく、検体由来のゲノムをテンプレートにした CPER 法を用いて組換えウイルスの作製を試みた。さらに、唾液から作製した組換えウイルスを用いて承認済み抗 SARS-CoV-2 中和抗体医薬の中和試験を行うことで、その有用性を評価することを目的とした。

これまで、RNA ウイルスには迅速リバーシジェネティクスである CPER 法にて作出に成功しその性状を解析してきた一方で、DNA ウイルスで CPER 法によるウイルス作出の報告はない。そこで、第2章としてアデノウイルス (AdV) を対象として DNA ウイルスへの CPER 法の適用を試みた。2 種の AdV に迅速リバーシジェネティクス技術である CPER 法を適用し、組換えウイルスの作出を目的とした。

【対象と方法】

第1章では、市立札幌病院の COVID-19 患者由来の唾液 10 検体を本研究に供した。唾液からウイルス RNA を抽出し、cDNA を得た。スパイクタンパク質の全領域を増幅することができるプライマーを新たに設計し、遺伝子断片を PCR によって増幅した後、塩基配列を決定した。次に臨床検体から得たスパイクタンパク質をコードする遺伝子断片に加えて従来株の SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質以外の領域をコードする遺伝子断片とサイトメガロウイルスプロモーターと D 型肝炎リボザイム配列を含むリンカー断片を用いて CPER 反応を行った。得られた CPER 産物を HEK293-3P6C33 細胞にトランスフェクション法にて導入した。培養上清を回収し Vero E6/TMPRSS2 発現細胞に感染させ、組換えウイルスが作出されたか否かを、細胞変性効果 (CPE) 及びウイルス RNA を検出する定量 PCR 法にて評価した。さらに、GFP 搭載のキメラウイルスを作製し中和抗体カクテル AZD7442 を用いて唾液由来キメラウイルスの有用性を評価した。

第2章では、AdV のウイルスゲノム全長約 35,000 塩基を 10 個の領域に分け、それぞれをプラスミドにクローニングした。アデノウイルスは先端と末端の配列が同一であるため、F10 と CMV プロモーターを含む Linker を PCR にて連結し一つの断片にしてから CPER を行った。CPER 産物を 293 細胞と A549 細胞にトランスフェクションした。培養上清を A549 細胞に感染させ、免疫蛍光染色と増殖性を解析した。

【結果】

第1章で、本研究に供した 34 検体のうち Ct 値が 23 以下であった 28 検体でスパイクタンパク質遺伝子の増幅に成功し、28 検体全てでウイルスの作出が確認された。28 検体のうち BA.1, BA.2, XBB.1 がそれぞれ 5 検体、BA.5 が 13 検体であった。増幅したスパイクタンパク質を CPER に用いたところ全ての検体で組換えウイルスの作出を確認した。また、GFP 搭載キメラウイルスは臨床分離株と同様の中和抗体価を示した。

第2章においてAdVの組換えウイルスを作出するためのCPER反応物を接種した細胞においてカプシドタンパク質のヘキソンに対する抗体を用いて細胞を免疫染色したところ抗原陽性であり、AdVにおいてもCPER法によって組換えウイルスの作製に成功した。組換えAdVの増殖能は野生株と同等であった。

【考察】

第1章の研究から、ウイルスを単離することなく、臨床検体からCPER法にて組換えSARS-CoV-2を迅速に作出することに成功した。また、GFP搭載キメラウイルスは臨床分離株と同様の中和抗体価を示したことからこの技術の有用性が示された。本研究の技術を用いることで、次々と出現するSARS-CoV-2変異株等、流行株のウイルスの性状を迅速に解析可能である。

第2章において、DNAウイルスであるAdVを対象にCPER法を適用し、本研究にて新たな高速リバーシジェネティクス法の確立に成功した。今後は蛍光及び発光レポーターを導入した組換えウイルスを作出し、スクリーニング及び感染イメージング等の応用研究への展開が期待できる。また、他種のAdVにおいてCPER法を用いて従来よりも迅速にAdVを作出することで、今後、AdVの引き起こす多種多様な疾病についてその規定する因子を同定するなどの基礎研究を推進したい。

本研究にて臨床検体からの組換えウイルスの作出及びDNAウイルスへのCPER法の適用が可能となったため、これらを応用し新興・再興ウイルス感染症が流行した際には迅速にウイルスを作出し対応することができると考えられる。

【結論】

本研究ではCPER法を改良することで、臨床検体からのSARS-CoV-2の作出及びDNAウイルスであるAdVの組換えウイルスの作出に成功した。本研究の成果には、従来のリバーシジェネティクス技術に比べ、迅速に組換えウイルスを作出することができるという意義がある。さらに、SARS-CoV-2だけでなく新たなウイルス感染症が発生した際の対策に貢献できると考えられる。また、アデノウイルス以外のDNAウイルスにもCPER法が適用できる可能性が示唆される。すなわち、この技術を用いることによって、未だ見ぬ新興・再興ウイルス感染症が流行した際に迅速に対処策を講じることが可能である。

略語表

本文中及び図中で使用した略語は以下のとおりである。

ACE2 : Angiotensin-converting enzyme 2 (アンジオテンシン変換酵素 2)

AdV : Adenovirus (アデノウイルス)

BAC : bacterial artificial chromosome (大腸菌人工染色体)

BSA : Bovine Serum Albumin (ウシ血清アルブミン)

cDNA : complementary DNA (相補的 DNA)

CMV : cytomegalovirus (サイトメガロウイルス)

COVID-19 : Coronavirus disease 2019 (新型コロナウイルス感染症)

CPE : cytopathic effect (細胞変性効果)

CPER : Circular Polymerase Extension Reaction (環状ポリメラーゼ伸長反応)

D-MEM : Dulbecco's modified Eagle's Medium (ダルベッコ変法イーグル培地)

D-PBS : Dulbecco's phosphate buffered saline (ダルベッコリン酸緩衝化生理食塩水)

FBS : Fetal Bovine Serum (ウシ胎児血清)

HDVr : hepatitis delta virus ribozyme (D 型肝炎ウイルスリボザイム)

IRES : internal ribosome entry site (内部リボソーム侵入部位)

LB : Lysogeny Broth (溶原培地)

NTD : N-terminal domain (N 末端ドメイン)

PCR : polymerase chain reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)

PFA : Paraformaldehyde Phosphatase Buffer Solution (パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液)

RBD : receptor binding domain (受容体結合ドメイン)

SARS-CoV-2 : Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (重症急性呼吸器症候群コロナウイルス-2)

緒言

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）に代表される新興・再興ウイルス感染症は、多くの人命を奪い、世界経済に多大な被害をもたらしている。このような事態を避けるためにも、感染症が流行した際に迅速にウイルスの性状を解析し、感染拡大への先回り対策、及び治療薬の開発に向けた基盤研究は必要不可欠である。そのためには、ウイルスの遺伝子やタンパク質の機能を分子レベルで解析できる実験系の整備が重要である。ウイルスのリバースジェネティクス法は、ウイルスゲノムを細胞に導入することで、感染性ウイルスを人工合成する技術である。この方法を用いることで、任意の変異をもつ組換えウイルスあるいは蛍光及び発光レポーターを搭載したウイルスを作製することが可能である。作出した組換えウイルスを用いることで、ウイルス感染の分子メカニズムの解明に繋げることができる。また、レポーター搭載ウイルスを用いることでウイルスの感染動態を可視化でき、創薬スクリーニングあるいは感染ライブイメージング等の実験研究を実施することが可能になる。このことから、リバースジェネティクスはウイルス学研究において重要な技術である。しかし、プラスミド、ライゲーションあるいは大腸菌人工染色体（bacterial artificial chromosome : BAC）システムを利用する従来のリバースジェネティクス法は、複雑な遺伝子操作技術と膨大な時間を要するため、新興・再興ウイルス感染症が発生し、流行した際に迅速に対応できない（Hotard et al., *Virology*, 2012; Lindenbach et al., *Adv Virus Res.*, 2022）。すなわち、汎用性が高く、かつ迅速に組換えウイルスを作製することができるリバースジェネティクス法を開発改良することは、あらゆる新興・再興ウイルス感染症の迅速な対応に資することが可能だと考えられる。

私が所属する教室では、Circular Polymerase Extension Reaction（CPER）法（Edmonds et al., *J Virol.*, 2013; Setoh et al., *J Gen Virol.* 2015; Setoh et al., *mSphere*. 2017; Amarilla AA, et al., *Nat Commun.*, 2021）を駆使し、キャップ依存的な翻訳を行うプラス鎖 RNA ウイルスであるフラビウイルス、SARS-CoV-2 の組換えウイルスを迅速に人工合成することに成功した（Tamura et al., *J. Virol.*, 2018; Torii et al., *Cell Rep.*, 2021）。さらに、我々は CPER 法を改良することで上記のウイルスとは異なる翻訳機構を持つキャップ非依存的翻訳を行うウイルスにも CPER 法を適用することができている（Tamura et al., *J Virol.*, 2024）。また、Nakashima らによりマイナス鎖 RNA ウイルスへ CPER 法を適用し、組換えウイルスの作出に成功したことが報告された（Nakashima et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, 2025）。CPER 法とは、末端領域が重なるように設計した遺伝子断片を PCR で増幅し、RNA ポリメラーゼ I または II を含むリンカー断片と共に PCR で連結する手法である。連結した環状 DNA を細胞に導入することで、ウイルス RNA

が細胞で転写され、感染性のウイルスを産生することができることが可能である。この手法を用いて SARS-CoV-2 の様々な変異株の性状を迅速に明らかにし、本邦での流行を前にその成果を発表することができたことで CPER 法の極めて高い有用性が実証された (Motozono et al., Cell Host Microbe 2021, Saito et al., Nature 2021, Suzuki et al., Nature 2022, Yamasoba et al., Cell 2022, Kimura et al., Cell 2022, Saito et al., Cell Host Microbe; Tsujino et al., Microbiol Immunol., 2024; Tamura et al., Nat Commun., 2024; Tsujino et al., J. Virol 2025)。従って、さまざまなウイルスにおいて組換えウイルスを自在に作製することができれば、基礎ウイルス学研究に貢献できると予想される。そこで、本研究では次々と出現する変異株に対抗するため、SARS-CoV-2 の CPER 法を応用し臨床検体から組換えウイルスを作製する手法の開発を試みた。さらに、さまざまなウイルスに CPER 法を汎用化するために、RNA ウイルスのみに適用されている CPER 法を DNA ウイルスへの適用を試みた。

第一章

COVID-19 の患者検体からの 組換えウイルスの作出

緒言

SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) は新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の原因ウイルスであり 2019 年末に初めて報告されて以降、世界規模で急速に拡大した。COVID-19 は呼吸器症状を主体とする感染症であるが、重症肺炎、急性呼吸窮迫症候群、血栓症、多臓器障害など多様な臨床像を呈し、高齢者や基礎疾患を有する患者では高い死亡率を示す。これまでに世界で 7 億人を超える感染者が報告され、死者は約 700 万人である

(WHO : 2024)。一方で、各国における検査体制や報告基準は流行初期から大きく変化しており、現在では多くの国で感染者数および死亡者数の包括的な集計が行われていない。特に、抗原検査の普及や軽症例の医療機関未受診、さらには報告義務の緩和により統計に反映されない感染例が増加していると考えられる。このため、実際の感染者数および死亡者数は、WHO が公表している数値を大きく上回る可能性が指摘されている。

さらに SARS-CoV-2 をはじめとする RNA ウイルスは、ゲノムに変異が入り易く変異株が次々と出現する (Duffy et al., PLoS Biol., 2018)。SARS-CoV-2 は流行の過程で複数の変異株を出現させ、感染力、免疫逃避能および病原性を変化させてきた。ワクチン接種や自然感染による免疫の獲得により重症化率は低下したものの、ウイルスの持続的な進化により COVID-19 は依然として世界的な公衆衛生上の課題であり続けている。

こうした背景から SARS-CoV-2 の分子生物学的特性や感染様式を継続的に理解することは、将来の流行対策や新興感染症への備えにおいて極めて重要である。しかし、臨床検体から分離されたウイルスは、採取時点ですでに他の細菌や真菌などの微生物による汚染を受けている場合がある。さらに、採取後の輸送や保存条件の影響により感染性を喪失していることも少なくない。その結果、感染許容細胞を用いた従来のウイルス分離・培養法では、ウイルスの増幅に失敗する例がしばしば認められる。

そこで本研究では、COVID-19 の診断の過程で採取された患者唾液検体を利用し感染許容細胞でのウイルス分離を行うことなく、CPEP 法を用いて組換えウイルスの作製を試みた。本手法はウイルスゲノムを複数の断片として増幅し、それらを *in vitro* で連結・再構築することにより細胞内で感染性ウイルスを再生する逆遺伝学的アプローチである。これにより感染性を失った検体や細胞培養に不適な検体からであっても、遺伝情報に基づいたウイルスの再構築が可能となる。さらに、唾液から作製した組換えウイルスを用いて承認済みの抗 SARS-CoV-2 中和抗体医薬 AZD7442 (エバシエルド) の中和試験を実施した。その結果、組換えウイルスが中和試験に適用可能であることを示し、本研究がウイルス性状評価および抗ウイルス薬の有効性評価において実用的かつ有用な

手法となり得ることを明らかにした。

材料と方法

本研究はヘルシンキ宣言に記載された倫理原則に従って実施され、市立札幌病院および北海道大学病院(認可番号 R-04-063-951 および 020-0116)の倫理委員会によって承認された。

本研究は人を対象とする生命科学・医学系研究に該当するが、COVID-19 診断目的で採取され検査後に廃棄予定であった唾液検体を匿名化して使用するものであり、研究者が個人を特定する情報を取得しない。侵襲および介入を伴わない既存試料を用いることから、説明同意は不要と判断される研究に該当する。

また、北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定に従って実施した。

1. 唾液採取

サンプル採取は、仕切りのあるブース内で喀痰処理器（東洋器材）に自己採取された。唾液サンプルはダルベッコリン酸緩衝化生理食塩水（D-PBS）（ナカライテスク）で4倍希釈し、実験に使用する前に2,000 gで5分間遠心分離して細胞及び残渣を除去した。

2. 唾液検体からウイルス RNA の抽出と定量

PureLink RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて唾液 100 µL から RNA を抽出した。THUNDERBIRD Probe One-step qRT-PCR Kit (Toyobo)、N2 プライマー(NIID_2019-nCOV_N_F2 and NIID_2019-nCOV_N_R2)、プローブ(NIID_2019-nCOV_N_P2) (Yokota et al., Clin Infect Dis., 2021)、7500 Real-time PCR Systems (Thermo Fisher Scientific)を用いて One-step qRT-PCR を行い、Ct 値を決定した。

3. スパイクタンパク質をコードする遺伝子断片の構築

16 µL の RNA と SuperScript™ IV VILO™ Master Mix (Thermo Fisher Scientific)を用いて逆転写を行い、cDNA を得た。スパイクタンパク質遺伝子全長を含む遺伝子断片を増幅するために設計したプライマー(F8 Fw 及び Full-length S protein F8 Rv、表 1) を用いて、合成した cDNA からポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によりスパイクタンパク質をコードするフラグメント 8 (F8)を増幅した。PCR は PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (タカラバイオ) を用い、98℃ 2分を1サイクル、98℃ 10秒、53℃ 15秒及び68℃ 1分を30サイクル、68℃ 4分30秒1サイクルの条件で行った。これらの PCR 産物を1.0%アガロースゲル電気泳動によって確認した。PCR 産物の精製には、FastGene Gel/PCR Extraction Kit（日本ジェネティクス）を用いた。

表1. SARS-CoV-2 スパイクタンパク質全長を増幅するために新たに設計したプライマー		
Name	Orientation	Nucleotide sequence (5'-3')
Full-length S protein F8 Fw	Forward	gttaacaactaaacgaacaatgttgttttcttgttttatgccactagtctctag
Full-length S protein F8 Rv	Reverse	gatttcaccttgcttcaaagttacagtccaattg
Full-length S protein F9+10 Fw	Forward	caattggaactgtaactttgaagcaagggtgaaatc
Full-length S protein F9+10 Rv	Reverse	ggagatgccatgccgacccctttttttttttttttttttttgtcattctcctaag

4. CPER 用遺伝子断片の構築

CPER を行うための F8 以外の遺伝子断片 F1～F7、F9-10、Linker を (Torii et al., Cell Rep., 2021) にて構築されたプラスミドとプライマーを用いて PCR によって増幅した。得られた PCR 産物に Dpn I を 1 μ l 加え 37°C で一晩静置した後、上記と同じように PCR 産物を精製した。

5. CPER 反応

唾液検体から得た F8 と 4. で構築した遺伝子断片をそれぞれ 0.1 pmol と PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase 使用し CPER 反応を 98°C 2 分 1 サイクル、98°C 10 秒、55°C 15 秒及び 68°C 15 分を 20 サイクル、68°C 25 分 1 サイクルの条件で行った。CPER 反応の概要を図 1 に示す。

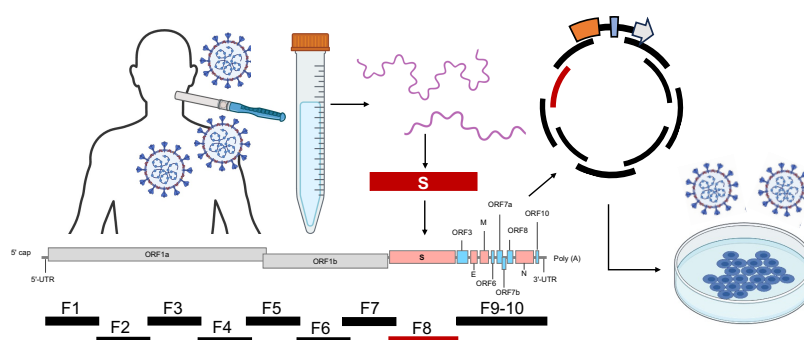


図1. 唾液検体を用いたCPERの概略

全長S遺伝子をコードする断片を新しいプライマーを用いて増幅した。この断片は、残りの SARS-CoV-2 ゲノムをカバーする8つの断片とともに、CPERによってUTRリンカー断片と連結し環状DNAを構築した。得られたCPER生成物を感受性細胞株HEK293-3P6C33に導入した。

6. CPER 産物のトランスフェクション

トランスフェクション当日に 80% コンフルエントとなるように 6 穴プレートに HEK293-3P6C33 細胞 (Torii et al., Cell Rep., 2021) を播種した。37°C に温めた Opti-MEM (Thermo Fisher SCIENTIFIC) 200 μ l に CPER 産物 25 μ l を加えピペッティングにより混合した。TransIT®-LT1 Transfection Reagent (Mirus) を 12 μ l 加えゆっくりとピペッティングにより混合しスピンドウンして 10 分間静置した。細胞のプレートから培地を取り除き、維持培地 [ダルベッコ変法イーグル培地 (D-MEM) (High glucose) (ナカライテスク) にウシ胎児血清 (FBS) (biosera)]

を 2%添加し、ペニシリンストレプトマイシン混合溶液（安定化）（ナカライテスク）を 1%添加した。] 2ml をプレートに加え、CPER 産物が入った溶液を 200 μ l 加え 37°C で培養した。

7. ウイルスの配列解析と系統解析

本研究で用いた全ての配列は、SeqStudio Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) あるいは外部委託サービス (Fasmac) を用いてシーケンス解析した。系統解析は、臨床検体及び Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID) データベースから得られた配列を含む 52 の配列セットに対して実施された。GISAID 由来の配列は、EPI_SET_240401 (Khare et al., China CDC Wkly., 2021) を通じてアクセスした、2022 年 3 月 18 日までの GISAID データベースで利用可能な合計 38 の配列から選択した。配列アライメントは、AliView v1.28 (Larsson et al., Bioinformatics., 2014) 及び MAFFT v7.511 (Kato et al., Mol Biol Evol., 2013) を用いた。アライメント後、RAxML-NG v. 1.2.0 (Kozlov et al., Bioinformatics., 2019) を用いて、ガンマ分布と不変部位 (GTR + G + I) を用いた一般時間可逆モデルを用いて系統樹を構築し、WIV04 (Okada et al., Euro Surveill., 2020) 配列をルートとして用いた。構築された系統樹の可視化には、Figtree v1.4.4 と ggtree v3.10.0 (Yu et al., Methods Ecol Evol., 2016) を用いた。

8. 細胞培養でのウイルスの増殖性の解析及びウイルス感染価の測定

培養上清に含まれるウイルスの感染価を、50%組織培養感染量 (TCID₅₀) (Reed et al., Am J Hyg., 1938) により測定した。細胞の培養上清を、1 mg/mL G418

(Nacalai Tesque) 及び 2% FBS を含む DMEM で 10 倍段階希釈した後、96 ウェルプレートの VeroE6/TMPRSS2 細胞に接種した。感染価は感染後 72 時間 (hpi) に測定した。ウイルス感染の有無は、ECLIPSE Ts2 (Nikon) で観察し、細胞変性効果 (CPE) により判断した。増殖性の解析は以下の方法で実施した。6 ウェルプレートで VeroE6/TMPRSS2 細胞に感染多重度 (MOI) 0.01 で SARS-CoV-2 を接種した。培養上清を 1 hpi で新しい培地に交換し、培養した。その後、感染後 12、24、36、48 hpi に採取した培養上清の感染価を測定した。

9. 唾液検体からのウイルス分離

検体から SARS-CoV-2 を分離するため、PCR 陽性唾液検体 100 μ L を VeroE6/TMPRSS2 細胞で培養し CPE が観察されるまで接種した。培養上清から遠心分離 (2,000 g、5 分間) により細胞及び細胞片を除去した後、ウイルス分注液は使用時まで -80°C で保存した。

10. GFP 搭載ウイルスの作製

Torii ら (Torii et al., Cell Rep., 2021) にて報告された sfGFP をコードするオー

プンリーディングフレーム 7 を sfGFP 遺伝子に置き換えたフラグメント F9-10 を上記と同様に精製した。上記と同様に唾液由来の F8 を用いて CPER を行い、ウイルス感染価の測定を行った。

11. 中和アッセイ

モノクローナル抗体カクテル AZD7442 (チキサゲビマブ/シルガビマブ) (Dong et al., Nat Microbiol., 2021) を 3 倍に段階的に希釈した。各希釈液を組換えウイルスと混合し、37℃で 1 時間インキュベートした後、VeroE6/TMPRSS2 細胞に接種した。細胞は 37℃で 36~48 時間インキュベートした。50%中和抗体価 (NT₅₀) は、AZD7442 の希釈率とマイクロプレートリーダー (Infinite200 PRO、Tecan) で測定した蛍光強度の変化から算出した。

結果

1. COVID-19 患者から得られた SARS-CoV-2 遺伝子の性状

本研究では、2022 年 1 月から 2023 年 4 月の間に札幌市立病院及び北海道大学病院で採取された COVID-19 患者由来の唾液検体 34 例（年齢範囲：12～95 歳）を使用した（表 2）。男女比は 17 対 17 であった。RT-qPCR 検査におけるサイクル閾値（Ct 値）は 15～39 の範囲であった。

表1. 本研究におけるCOVID-19患者の情報				
Sample No.	sex	Age	Days after onset (at the time of examination)	Ct value
1 [†]	F	72	0	20.85
2	M	59	0	20.02
3	F	52	0	20.59
4	F	73	1	17.15
5	M	57	0	19.62
6	F	95	0	16.93
7	M	29	0	19.80
8	M	75	10	20.00
9 [†]	F	73	7	15.32
10	F	47	2	18.10
11	M	37	3	18.67
12	M	70	1	16.78
13	F	25	1	19.50
14 [†]	M	45	2	18.85
15	F	12	1	15.70
16	M	83	0	16.78
17	M	74	3	15.64
18	M	34	1	21.32
19	M	65	32	20.90
20	F	64	2	22.10
21	F	60	19	21.60
22	M	29	1	17.80
23	M	43	N/A	22.40
24	F	25	0	22.70
25 [†]	F	50	0	18.20
26	M	58	1	20.00
27	F	78	4	20.40
28	M	50	1	18.60
29	F	57	32	39.36
30	M	59	53	38.37
31	F	44	N/A	30.72
32	F	46	0	30.88
33	M	60	0	24.18
34	F	46	0	23.66
35	M	71	1	17.17
36	M	43	N/A	17.18
N/A: not applicable				
†: in vitroでの増殖速度測定及び中和アッセイに使用されるサンプル				

唾液検体からウイルス RNA を精製し、SARS-CoV-2 の病原性を決定する主要因子であるスパイクタンパク質遺伝子 (S 遺伝子) を PCR により増幅した (Barut et al., Nat Commu., 2022)。まず異なる Ct 値を有する 4 セットの唾液検体（サン

プル ID: 1-2, 29-30, 31-32, 33-34) を選抜し、全長 S 遺伝子の増幅を試みた (図 2)。その結果、4 セットのうち 1 セットのみで全長 S 遺伝子の増幅が確認され、必要最小 Ct 値が 23.66~20.85 の範囲にあることが示唆された。

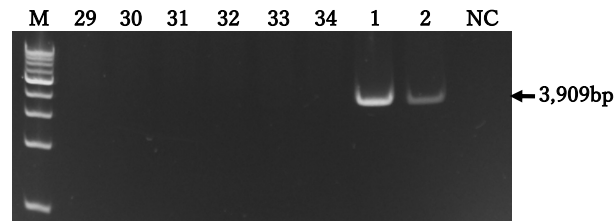


図2. Ct値の異なる4群の唾液からPCRにより生成したS遺伝子アンプリコンのゲル電気泳動解析
M:1 kbのDNAラダー。1、2、および29-34:検体番号。矢印は増幅されたスパイクタンパク質遺伝子の塩基対 (bp) である。

図 2 の結果に基づき、Ct 値が 23 未満の唾液検体 28 例を用いて、PCR にて全長 S 遺伝子の DNA 断片を得ることに成功した。得られた DNA 断片を用いて遺伝子を決定したところ、これら 28 例はすべてオミクロン系統に分類され、各々 BA.1 (5 例)、BA.2 (5 例)、BA.5 (13 例)、及び XBB.1 (5 例) であった (図 3a)。それぞれの参照株 [GenBank アクセッション番号 : OY724674.1 (BA.1)、OR496569.1 (BA.2)、OR496284.1 (BA.5)、及び OR239444.1 (XBB.1)] と比較したところ、BA.1、BA.5、及び XBB.1 のスパイクタンパク質に同義及び非同義変異が認められた。変異の数は、BA.1 で 2 箇所 (サンプル ID: 10 及び 12)、BA.5 で 6 箇所 (サンプル ID: 1-5 及び 21)、XBB.1 で 3 箇所 (サンプル ID: 23-25 及び 27) であった (図 3b)。臨床検体において検出された BA.1 及び BA.5 の変異の多くは受容体結合ドメイン (RBD) に位置していた。一方、XBB.1 に分類された臨床検体では、変異は主に N 末端ドメイン (NTD) に認められた。

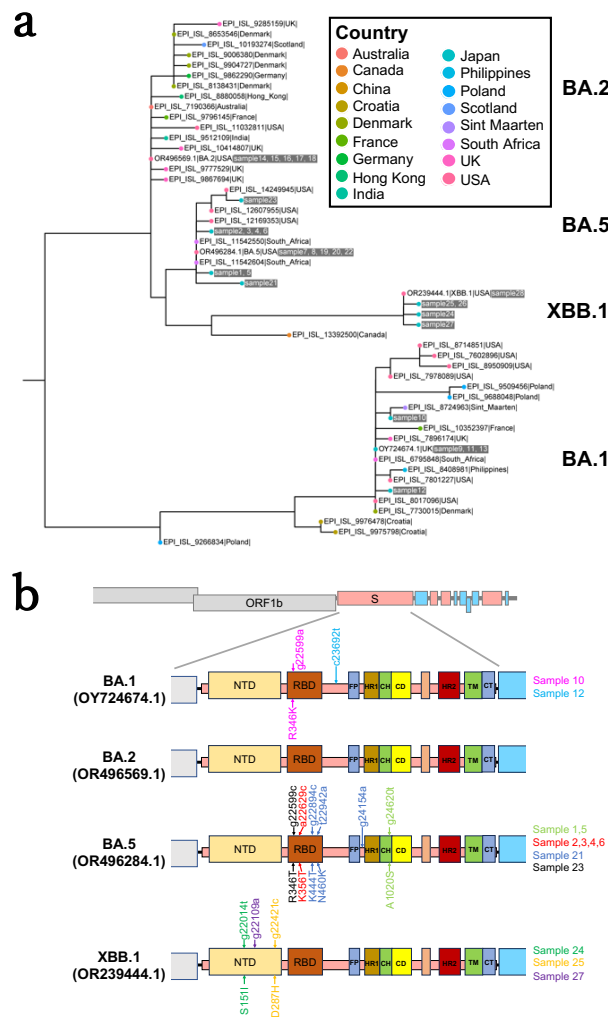


図3. 臨床検体から得られたSARS-CoV-2スパイク (S) の特性

(a) 本研究で使用したSARS-CoV-2臨床検体の系統樹を示す。系統樹はBEASTソフトウェアを用いて解析した。28の臨床検体を黒く強調した。枝の色は、ウイルスが分離された国を示す。(b) SARS-CoV-2ウイルスゲノムの概略図を示す。臨床サンプルのSに認めた突然変異を矢印で示し、各々サンプルによって色分けた。参照株のGenBankアクセス番号は、BA.1ではOY724674.1, BA.2ではOR496569.1, BA.5ではOR496284.1, XBB.1ではOR239444.1である。

2. 臨床検体の S 遺伝子全長を搭載したキメラウイルスの作出

環状ポリメラーゼ伸長反応 (circular polymerase extension reaction, CPER) は、ウイルスを新たに生成するための手法であり、これまでに SARS-CoV-2 研究でも利用されている (Torii et al., Cell Rep., 2021)。現在の CPER 法は SARS-CoV-2 変異株の作製に有用であることが示されている。一方で S 遺伝子が 2 つの断片に分割されているため、S 遺伝子に認められる変異が病原性に及ぼす影響を解析するためには、二つの遺伝子断片を編集する必要があるという課題がある。そこで本研究では、全長 S 遺伝子を単一の遺伝子断片として組み込むため、新たにプライマーを設計した。これらの新規プライマーを用い、CPER に必要な他の断片を B.1.1 株 (GenBank アクセセッション番号: MN908947) (Torii et al., Cell Rep.,

2021) から作製した。これらすべての断片と UTR リンカー断片を組み合わせ、上記の 28 検体を用いて CPER を実施した。

CPER 産物を HEK293-3P6C33 細胞にトランスフェクションし、5 日後にその培養上清を VeroE6/TMPRSS2 に接種した。その結果、図 4 に示すように、検討したすべての CPER 産物で CPE が観察され、臨床検体由来のキメラウイルスを作製することに成功したことが示された。生成されたキメラウイルスの S 遺伝子配列を解析したところ、それぞれの臨床検体と完全に一致していた。

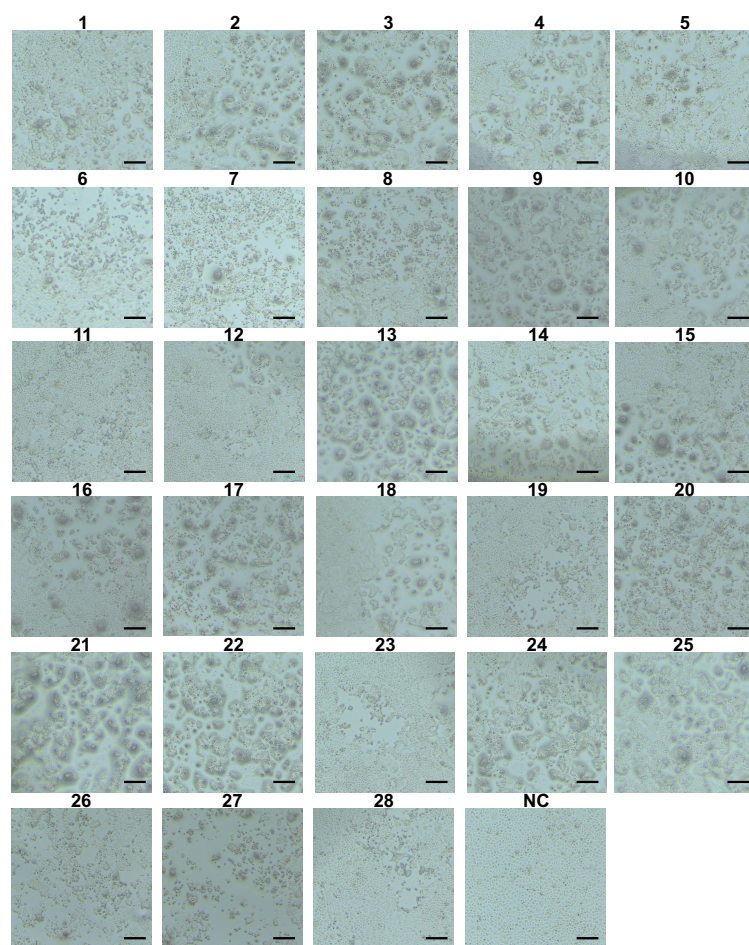


図4. CPER法を用いた臨床検体からの組換えウイルスの作製

改良CPER法によって作製された28検体のキメラウイルスを接種したVeroE6/TMPRSS2細胞においてCPEが観察された。写真上の数字(1~28)は検体番号である。バーは200 μ mを示す。

先行研究により、SARS-CoV-2 感染時に生じる形態学的変化が変異株間で異なることが報告されており (Suzuki et al., Nature, 2022)、ウイルス S タンパク質が病原性の主要な決定因子であることが知られている。そこで、異なる臨床検体由来 S 遺伝子を有するキメラウイルスの性状を評価するため、BA.1、BA.2、BA.5、及び XBB.1、サンプル ID: 1, 9, 14, 25) の S を持つ 4 種のキメラウイルスを VeroE6/TMPRSS2 細胞に感染させ、経時的に細胞の形態変化を観察した。その結

果、図5に示すように、各キメラウイルスは異なるCPEを示した。BA.1由来Sを持つウイルスが形成する合胞体は小さく、続く変異株由来ウイルスほどより大きな合胞体を形成した。これにより、本研究で改良されたCPER法で新たに生成されたキメラウイルスが、それぞれのS遺伝子由来変異株の特性を反映していることが示唆された。

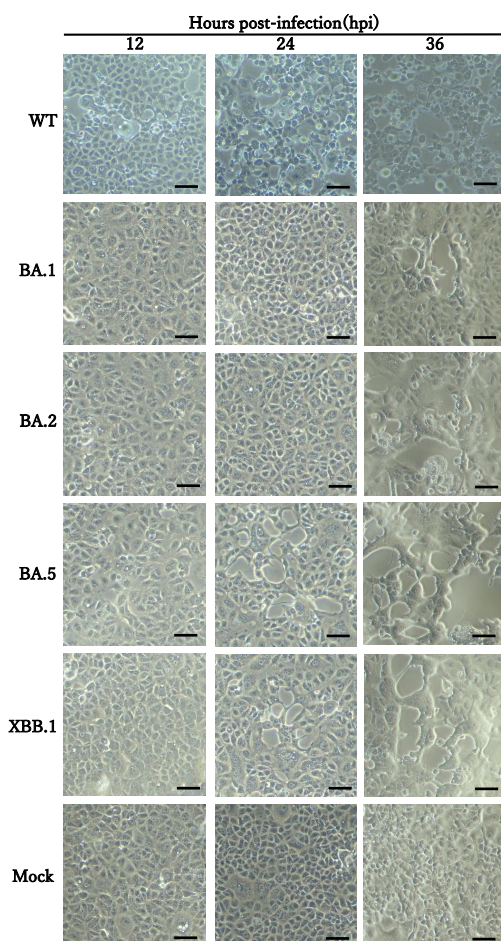


図5. 臨床検体のSを保有するキメラウイルスの細胞変性効果

BA.1 (ID:9)、BA.2 (ID:14)、BA.5 (ID:1)、XBB.1 (ID:25)及びB.1.1 (WT) のS遺伝子を搭載したキメラウイルスをVeroE6/TMPRSS2細胞に接種し、感染時の形態変化を経時的に観察した。バーは200 μ mを示す。

さらに、これらのキメラウイルスの複製特性を評価するため、VeroE6/TMPRSS2細胞にB.1.1（野生株：WT）または4種のキメラウイルスをMOI=0.001で感染させ、各々のウイルスの増殖性を評価した。その結果、予想通りWTは急速に増殖し、感染後24時間（hpi）において、オミクロン系統のキメラウイルスよりも高い感染価を示した。一方、4種のキメラウイルス間では類似した増殖傾向を示し、BA.1はやや低い傾向を示したものの、統計的に有意な

差は認められなかった（図 6）。

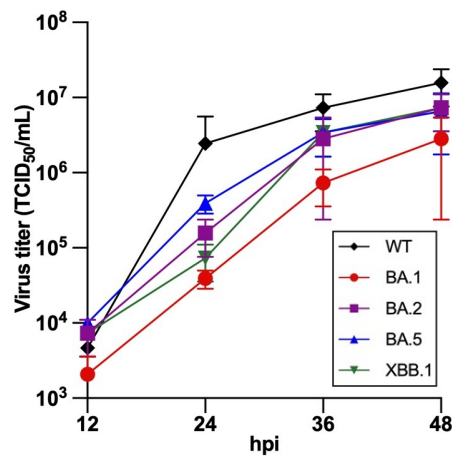


図6. 臨床検体のSを有するキメラウイルスの増殖能

WT及び組換えキメラウイルスの培養細胞における増殖性を評価した。VeroE/TMPRSS細胞をWTまたは組換えキメラウイルス (MOI=0.001) に感染させた。培養上清のウイルス感染価を経時的に測定した。グラフは、独立して2回実施した成績を示す。

3. 唾液由来組換えウイルスに対する中和抗体医薬の有効性

私が所属する教室にてこれまでに、GFP を搭載した組換え SARS-CoV-2 を用いて蛍光強度の変化を測定することでウイルス増殖を評価する手法を開発している (Tomiya et al., Front Cell Infect Microbiol., 2023; Suzuki et al., J Virol Methods., 2024)。そこで本研究では、この手法を応用し、CPER 法によって作製した臨床検体由来S 遺伝子及びGFP を保有する組換えキメラウイルスを用いて、市販されている SARS-CoV-2 抗ウイルス薬 AZD7442 の効果を迅速に評価できるかを否か検討した (図 7)。

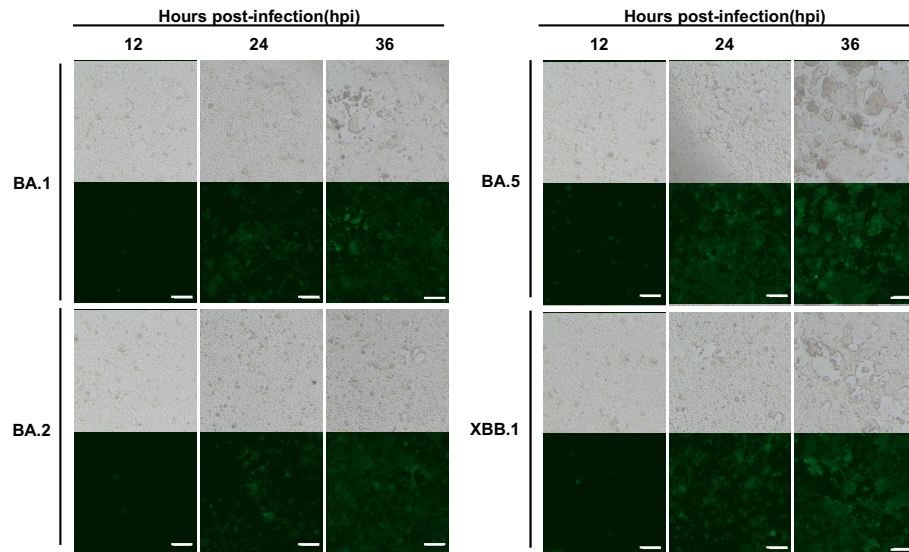


図7. CPER法による唾液由来GFP搭載SARS-CoV-2の作製

キメラGFPウイルス感染12~36時間後のVeroE6/TMPRSS2細胞の明視野画像（上）およびGFP蛍光（下）。バーは200 μ mを示す。

陽性対照として、B.1.1のSを有する組換えGFPウイルス(Torii et al., Cell Rep., 2021)を作製した。その結果、B.1.1のSを持つ組換えウイルスは高い中和活性($NT_{50}=5,128,781$)を示した。一方、BA.1のSを持つウイルスでは部分的な中和活性($NT_{50}=2,597$)が確認され、BA.2 Sを持つウイルスではさらに低い中和活性($NT_{50}=180$)を示した。これに対し、BA.5及びXBB.1のSを持つウイルスでは中和活性がほとんど認められなかった($NT_{50}<5$) (図 8a)。

さらに、対応する臨床検体から分離したウイルスを用いて同様にAZD7442に対する抗ウイルス効果を評価したところ、臨床分離株においても同様の傾向が確認された (図 8b)。これらの結果から、各変異株由来のS遺伝子を有するキメラウイルスが抗SARS-CoV-2モノクローナル抗体に対する中和活性を反映していることが示された。

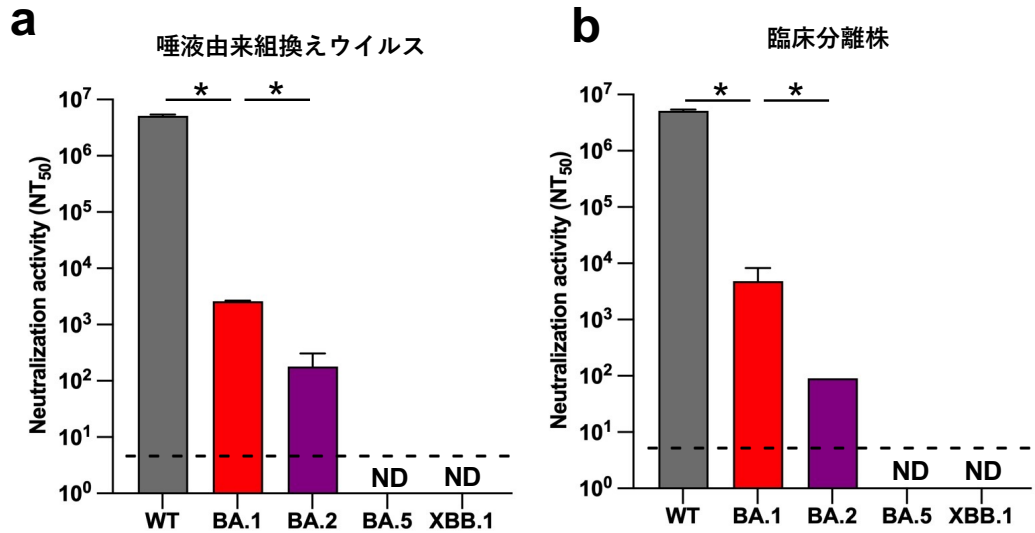


図8.唾液検体由来ウイルスに対するAZD4772の中和活性

(a) GFPを搭載したキメラウイルスに対するモノクローナル抗体AZD4772の中和抗体価を示す。各時点における各ウイルス間の統計的有意差は、両側Student's *t*-検定によって決定された。破線は検出限界を示す。NDは検出されなかったことを示す。(b) 各臨床分離株に対するモノクローナル抗体AZD4772の中和抗体価を示す。各時点における各ウイルス間の統計的有意差は、両側Student's *t*-検定によって決定された。破線は検出限界を示す。NDは検出されなかったことを示す。

考察

2020 年に世界的な公衆衛生上の懸念として初めて認識されて以来、SARS-CoV-2 はヒトの間で循環し免疫から逃避する変異を獲得してきた

(Carabelli et al., Nat Rev Microbiol., 2023)。本研究では細胞培養からウイルスを分離することなく臨床検体から直接、組換え SARS-CoV-2 を作製できる方法を開発し、新規変異株の迅速な性状評価を可能にした。

SARS-CoV-2 は呼吸器疾患であり季節性インフルエンザに対し、一人の感染者が免疫を持たない集団に加わった際に直接感染させる人数の指標である基本再生産数が 2 倍ほど高い。従って、SARS-CoV-2 の感染力は高いため、早期の適切な診断はさらなる感染拡大を防ぐうえで重要である (Pormohammad et al., Rev Med Virol., 2020)。そのため、SARS-CoV-2 を検出する PCR 検査及び抗原検査が開発され、利用されている (Safiabadi et al., Clin Microbiol Rev., 2021)。現在 SARS-CoV-2 を含む呼吸器ウイルスにおいては、鼻咽頭から綿棒で上気道検体を採取することが標準とされている (Uršič et al., Front Public Health., 2023; CDC, 2024)。しかしこの採取方法では、くしゃみ及び咳を誘発し医療従事者がウイルスに曝露するリスクがある。そのため、COVID-19 の診断においては唾液及びうがい液を用いた検査方法が世界的に普及しており日本でも同様である (Yokota et al., Clin Infect Dis., 2021)。既報により、これらの検体と鼻咽頭スワブ検体との間で検出感度が同程度であることが示されている (Fernandes et al., J Clin Virol., 2021; Ahmadiéh et al., Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol., 2022)。

本研究では、唾液検体を用いて各々検体に由来する SARS-CoV-2 の病原性の主要な決定因子である S タンパク質を有するキメラウイルスを CPER 法で新規に作製した。34 検体すべてが SARS-CoV-2 陽性と診断されたが、Ct 値が高い検体 (>23) からは PCR で S 遺伝子を増幅できなかった (図 2)。一方、Ct 値が 23 未満の 28 検体からは、遺伝子解析 (図 3)、CPER、及び組換えウイルス作製に用いるための DNA 断片を得ることができた。

通常 SARS-CoV-2 RNA はヌクレオカプシド内に存在するが、ウイルス粒子が破壊されると唾液中の RNase によりゲノムが分解される可能性がある (Nishibata et al., Pathol Res Pract., 2021)。さらに、未精製の臨床検体から cDNA を増幅するのは一般的に困難であり特に S 遺伝子 (約 3,800 bp) のような長い遺伝子では難しい。そのため、本手法では Ct 値が低い検体が必要となる。しかし Yazawa らは、Ct 値が低い場合でも唾液中の他の微生物による汚染や唾液酵素による分解のためにウイルス分離が失敗する場合があることを報告している (Yazawa et al., Sci Rep 2023)。したがって、本手法は十分な利点を有しており従来のウイルス分離法と併用することで有用であると考えられる。

遺伝子解析の結果、BA.1 及び BA.5 で見られた変異の大部分は RBD 領域に位置していた (図 3b)。RBD はコロナウイルス S タンパク質が宿主受容体のアン

ジオテンシン変換酵素 2 (ACE2) に結合する領域である (Letko et al., Nat Microbiol., 2020)。したがって、RBD 内の変異は ACE2 との親和性を高めウイルスの感染性や中和抗体への耐性を向上させる可能性がある (Harvey et al., Nat Rev Microbiol., 2021)。一方、XBB.1 に分類される臨床分離株では、変異の多くが NTD 領域に存在していた。NTD に認めた変異は、感染増強抗体と結合して感染を悪化させ ACE2 との結合を強化することが知られており、感染の重症化に関与する可能性が指摘されている (Liu et al., Cell, 2021)。よって、本手法で作製したキメラウイルスはこれらの変異がウイルスの性質に及ぼす影響を効率良く調べるために有用であると考えられる。

大きなゲノムを持つウイルスの組換えウイルス作製は、cDNA クローンを用いる場合困難である。CPER 法を用いることで全長ウイルスゲノムのクローニングを省略でき、組換えウイルスを得るまでの時間を短縮できる (Torii et al., Cell Rep., 2021; Edmonds et al., J Virol., 2013; Tamura et al., J Virol., 2018; Tamura et al., J Virol., 2024; Nakashima et al., Biochem Biophys Res Commun., 2025)。先行の SARS-CoV-2 の CPER 法では、S 遺伝子全長を 1 つのフラグメントに含めることができず C 末端領域 (B.1.1 株の 25,325-25,384 nt) が続くフラグメントに含まれていた。S タンパク質の C 末端領域はタンパク質をウイルス膜内に固定する役割を担っている (Li et al., Front Mol Biosci., 2022)。特筆することにより、この領域に変異を持つ BA.1 株も分離されている [<https://gisaid.org>; EPI_SET ID: EPI_SET_231115zo (https://epicov.org/epi3/epi_set/231115zo?main=true), strain PZH-UMB-11187; GISAID ID: EPI_ISL_9509456, strain PZH-UMB-11662; GISAID ID: EPI_ISL_9688048]。したがって、以前の CPER 法で作製された組換えウイルスは変異を有する S タンパク質の完全な表現型を必ずしも反映しない可能性がある。

本研究では、新たなプライマー (表 1) を設計し臨床検体由来の S タンパク質を保持するキメラウイルスを作製した。表 1 に示すように、新プライマーセットを用いることでキメラ SARS-CoV-2 の作製に成功した。S タンパク質は融合活性を有し、ウイルス増殖に必須であるため (V'kovski., Nat Rev Microbiol., 2021)、組換えウイルスの細胞変性効果及び細胞培養でのウイルスの増殖性は S 配列に依存していた (図 5,6)。さらに、GFP を組み込んだ臨床検体由来キメラウイルスを作製し (図 7)、蛍光プレートリーダーを用いてウイルス複製動態を定量的に測定した。

GFP を搭載したキメラウイルスを用いて、市販のモノクローナル抗体製剤 AZD7442 の効果を臨床検体に対応する 4 種類のオミクロン亜系統に対して評価した。その結果、BA.1 S 及び BA.2 S を有するキメラウイルスは部分的に中和されたが、BA.5 または XBB.1 S を有するウイルスは完全には中和されなかった。これは既報 (Wang et al., Cell, 2023) と一致する結果であり、本手法で作製したキメラウイルスが抗ウイルス薬評価に迅速かつ十分に利用できることを示している。さらに、臨床検体で得られた結果とも一致した。

現在承認されている抗ウイルス薬の多くは S タンパク質を標的として開発されており、本手法で作製したキメラウイルスがそれらの評価に有用であることを支持している (Sun et al., *Antib Ther.*, 2022)。Vangeel ら及び Uraki らは、レムデシビルやモルヌピラビルなど他のウイルスタンパク質を標的とする抗ウイルス薬が、現在流行中のオミクロン株を含むすべての SARS-CoV-2 変異株に対して有効であることを報告しており (Vangeel et al., *Antiviral Res.*, 2022; Uraki et al., *iScience*, 2023)、本研究で作製したキメラウイルスが既存のすべての抗ウイルス薬の評価に適していることを示している。さらに、本研究で開発した手法はすべての抗ウイルス候補薬に応用可能である。これは、標的とするウイルス遺伝子を置換して対応するキメラウイルスを作製できるためである。今後、他のウイルス遺伝子を組み込んだキメラウイルスの挙動を評価するさらなる研究が必要である。

本研究では粗臨床検体から組換え SARS-CoV-2 を作製する新しい手法を開発し、これらのウイルスが比較的短期間で抗ウイルス薬評価に利用できることを実証した。本研究で開発された手法は SARS-CoV-2 のみならず、他のウイルスによる新興・再興感染症の制御にも貢献すると期待される。

第二章

DNA ウイルスへの CPER 法の適用

緒言

アデノウイルス (AdV) はエンベロープを持たないゲノムサイズが約 35Kb の二本鎖 DNA ウィルスであり、ヒトを含む多くの脊椎動物に感染する。ヒトアデノウイルスは主に呼吸器、消化管、結膜、尿路などの上皮細胞に感染し、多くの場合は軽度かつ自然軽快する感染症を引き起こすが、乳幼児、高齢者、免疫不全患者では重症化することもある。現在までに 50 種類以上の血清型が同定されており、それぞれが異なる組織指向性および臨床症状を示すことが知られている (MacNeil et al., 2023; Lynch et al., 2016)。AdV の組織指向性は、ウィルス侵入過程、細胞内複製能、宿主免疫応答との相互作用など、複数の要因によって規定されると考えられている。特に、ウィルス表面タンパク質である fiber、penton base、hexon と、宿主細胞表面の受容体との相互作用は、感染細胞の選択性に大きく関与する。しかしながら、AdV の組織指向性の詳細な分子メカニズムは現在も明らかになっていない (Marquez-Martinez et al., Curr Opin Immunol., 2023)。この複雑な組織指向性を解析するためには、迅速で簡便な遺伝子操作系が必要である。

また、野生型アデノウイルスはヒトに対して病原性を示す一方で幅広い宿主細胞指向性ならびに非分裂細胞への感染能といった特性から、ワクチンおよび治療用途への応用を目的としたアデノウイルス利用への関心が急速に高まっている。特に、複製能を欠損させた組換え AdV は安全性と遺伝子発現効率のバランスに優れたウィルスベクターとして確立されている。その結果、遺伝子治療、癌治療、ワクチン、CRISPR-Cas9 等のベクターとして広く使用されている (Biegert et al., Mol Ther Oncolytics., 2021; Colloca et al., Sci Transl Med., 2012; Ehrke-Schulz et al., Sci Rep., 2017)。これらのベクターは通常、BAC やプラスミドを使用した完全長ゲノムを使用して生成される (Luo et al., Nat Protoc., 2007; Mück-Häusl et al., Nucleic Acids Res., 2015)。これらの手法は高い再現性と柔軟な遺伝子改変を可能にする一方で、構築工程が煩雑で時間を要し、特別なベクターや大腸菌株を必要とするといった技術的制約を有している。また、大規模改変や複数変異の同時導入には、さらなる作業負担が生じることも課題である。そのため、AdV ベクターを用いた技術の需要が高まるにつれ、より効率的な生産方法が必要とされている。よって、CPER のような迅速なリバーシジェネティクスシステムを AdV にも適用することで、基礎ウィルス学の研究だけでなく、より効果的な抗ウィルス対策の開発や遺伝子治療の進歩も加速すると予想される。

一方で、上記でも述べたように現在 CPER 法は RNA ウィルスにしか適用されていない。そこで、本研究では DNA ウィルスであるアデノウイルスを対象に CPER 法を用いた迅速な組換えウィルスの作出を試みた。

材料と方法

北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定に従って実施した。

1. ウイルス DNA の準備

AdV37 型 GW 株及び AdV41 型 Tak 株を American Type Culture Collection より入手し、DNA を抽出した。DNA 抽出には培養上清 100 μ l を使用し、*Quick-DNA* Viral Kit (ZYMO RESEARCH) にて抽出し、精製した。

2. ウイルス DNA のフラグメント設計

AdV DNA を鋳型にして、ウイルスゲノム全長約 35,000 塩基を末端領域が重なるように 10 個の領域に分けた遺伝子断片を PCR にて作製した。PCR は PrimeSTAR[®] GXL DNA Polymerase (タカラバイオ) を用い、98 $^{\circ}$ C 2 分を 1 サイクル、98 $^{\circ}$ C 10 秒、53 $^{\circ}$ C 15 秒及び 68 $^{\circ}$ C 1 分を 30 サイクル、68 $^{\circ}$ C 4 分 30 秒 1 サイクルの条件で行った。プライマー配列は表 3 に示す。これらの PCR 産物を 1.0% アガロースゲル電気泳動によって確認した。PCR 産物の精製には、FastGene Gel/PCR Extraction Kit を用いた。

表3. AdVの各フラグメントの遺伝子増幅に用いたプライマー					
Name	Orientation	Nucleotide sequence (5'-3')	Name	Orientation	Nucleotide sequence (5'-3')
37 F1 Fw	Forward	TAGGCCGGAAGCAAGTCGC	41 F1 Fw	Forward	CATCATCAATAATATACCTTAAAG
37 F1 Rv	Reverse	GCATATAGCTCGAGGCCAGTCTC	41 F1 Rv	Reverse	GTAAAGTCCAAAATCAGCTGC
37 F2 Fw	Forward	GAGACTGGCCTCGAGCTATATGC	41 F2 Fw	Forward	GCAGCTGATTTTGGACTTTAC
37 F2 Rv	Reverse	GATTCGAGCTCTGGGAGCAC	41 F2 Rv	Reverse	CAAAATCACCCGCAACTTTATGC
37 F3 Fw	Forward	GTGCTCCCAGAGCTCGAAATC	41 F3 Fw	Forward	GCATAAAGTTGCGGGTGATTTTG
37 F3 Rv	Reverse	CGCCCTCTTCCAAGTCCATC	41 F3 Rv	Reverse	CTTGTCGGGCTCAAAGTCTTC
37 F4 Fw	Forward	GATGGACTTGGAAGAGGGCG	41 F4 Fw	Forward	GAAGACTTTGAGCCCGACAAG
37 F4 Rv	Reverse	CTGGCATCACCAGCTTGGTC	41 F4 Rv	Reverse	GAAAACCTTCTTGAAACGGCAG
37 F5 Fw	Forward	GACCAAGCTGGTGATGCCAG	41 F5 Fw	Forward	CTGCCGTTTCAAGAAGGTTTTC
37 F5 Rv	Reverse	CAGCGTGCTCTGCCAGTTC	41 F5 Rv	Reverse	CAGGAGGCGCATACAATAAG
37 F6 Fw	Forward	GAAGTGGCAGAGCAGCTG	41 F6 Fw	Forward	CTTATTGTATGCGCTCCTG
37 F6 Rv	Reverse	CATTTTATCAAAAGCGGTGGC	41 F6 Rv	Reverse	CATTTGATCAAAAGCTGTAGC
37 F7 Fw	Forward	GCCACCGCTTTTGATAAAATG	41 F7 Fw	Forward	GCTACAGCTTTTGATCAAAATG
37 F7 Rv	Reverse	GTCCATTCTTCTTCCATCTC	41 F7 Rv	Reverse	CTTGCTGTTCCTTTGGGC
37 F8 Fw	Forward	GAGATGGAAGAAGAATGGGAC	41 F8 Fw	Forward	GCCCAAAGGGAACAAGCAAG
37 F8 Rv	Reverse	GTTTCTGCCAGTTATGATGTTTCATC	41 F8 Rv	Reverse	GTAATCCCAAAAAGGTGGCAAAG
37 F9 Fw	Forward	GATGAACATCATAACTGGCAGAAAC	41 F9 Fw	Forward	CTTTGCCACCTTTTGGGATTAC
37 F9 Rv	Reverse	CGACCACAATCAAAGACACATTAGC	41 F9 Rv	Reverse	GAGTAGCCTTCTAATGCATG
37 F10 Fw	Forward	GCTAATGTGTCTTTGATTGTGGTCG	41 F10 Fw	Forward	CATGCATTAGAAGGCTACTC
37 F10 Rv	Reverse	GGTCATGAAAGCCATTTTGGACG	41 F10 Rv	Reverse	CATCATCAATAATATACCTTAAAGCTGGAAAC
37 Linker Fw	Forward	CGTCCAAAATGGCTTTTCATGACCGG	41 Linker Fw	Forward	CTTTAAGGTATATTATTGATGATGGGTGCGGC
37 Linker Rv	Reverse	GCGACTTGCTTCCGGCCTAACGGTT	41 Linker Rv	Reverse	ACGGTTCATAAACGAGCTCTGC

3. リンカー断片の構築

AdV の 3'末端の 40 塩基、D 型肝炎ウイルスリボザイム (HDVr)、Bovine growth

hormone polyadenylation (BGH poly A)、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、及び AdV の 5'末端の 40 塩基をコードするリンカー断片を PCR により得た。PCR は KOD One[®] PCR Master Mix -Blue-を用い、98℃ 10 秒、50℃ 5 秒及び 68℃ 1 分を 35 サイクル、68℃ 4 分を 1 サイクルの条件で行った。得られた PCR 産物に Dpn I (タカラバイオ) 1 µl 加え 37℃で一晩静置した後、上記と同様に PCR 産物を精製した。

AdV は先端と末端の配列が同一であるため、構築した 10 番目のフラグメント [フラグメント 10 (F10)]とリンカー断片を PCR により連結し一つの断片とした。PCR には PrimeSTAR[®] GXL DNA Polymerase を使用した。F10 と Linker 断片をそれぞれ 100ng ずつ使用し、98℃ 2 分を 1 サイクル、98℃ 10 秒、55℃ 15 秒及び 68℃ を 35 サイクルの条件で行った。なお、プライマーは 2 ステップ目の 25 サイクル目で入れた。上記と同様に PCR 産物を精製し DNA 断片 10+リンカー (F10+Linker) を得た。

4. DNA 断片と Linker 断片のクローニング

AdV41 の F1~4、6、7、9 及び F10+Linker を TOPO ベクター[pCR-BluntII-TOPO (Thermo Fisher SCIENTIFIC)]へ遺伝子をクローニングした。F5 及び 8 は TOPO ベクターでの導入効率が低かったため、pMW118 DNA (ニッポンジーン) を用いた。クローニングには In-Fusion[®] HD Cloning Kit (タカラバイオ) を用いた。

AdV37 の各断片とリンカー断片を AdV41 と同様に TOPO ベクターへ遺伝子をクローニングした。

5. プラスミドから CPER 用 DNA 断片の PCR

得られた AdV の DNA 断片を導入したプラスミドから表 1 のプライマーを用いて PCR を行った。PCR は KOD One[®] PCR Master Mix -Blue-を用い、98℃ 10 秒、50℃ 5 秒及び 68℃ 1 分を 30 サイクル、68℃ 4 分を 1 サイクルの条件で行った。得られた PCR 産物に Dpn I を 1 µl 加え 37℃で一晩静置した後、上記と同じように PCR 産物を精製した。

また、各遺伝子断片を SeqStudio Genetic Analyzer 及び外部委託サービスを用いて遺伝子を決定した。

6. CPER 反応

得られた AdV の DNA 断片をそれぞれ 0.1pmol と PrimeSTAR[®] GXL DNA Polymerase 使用し CPER 反応を 98℃ 2 分 1 サイクル、98℃ 10 秒、55℃ 15 秒及び 68℃ 15 分を 20 サイクル、68℃ 25 分 1 サイクルの条件で行った。

CPER 反応の概要を図 9 に示す。

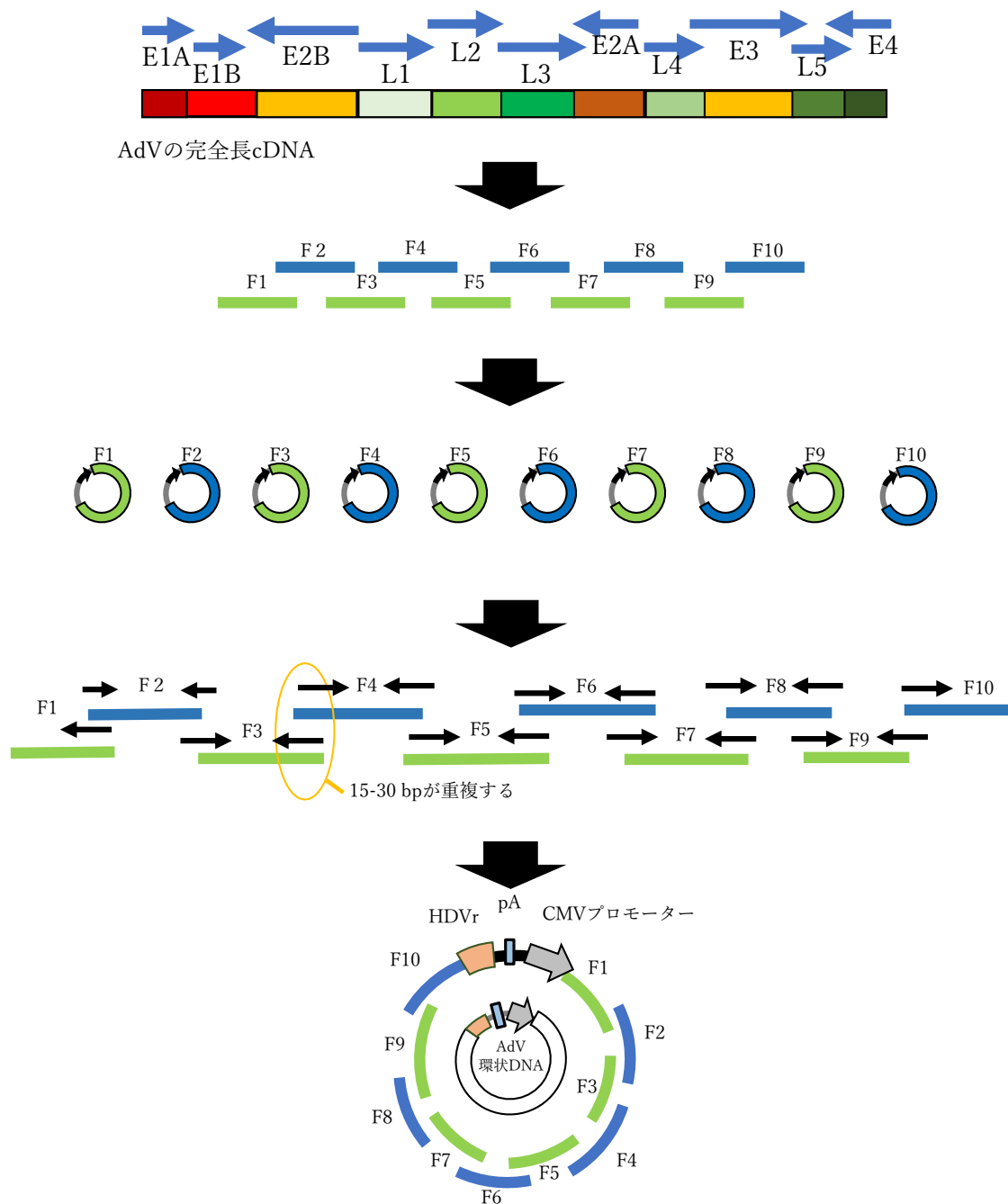


図9. AdVのCPER反応の概略

AdVの完全長 cDNAから約3.5 kbずつ10個の遺伝子断片を作製し、pCR-BluntII-TOPOベクターに挿入した。TOPOベクターにクローニングした遺伝子断片をテンプレートとして末端の15-30bpが重複するようにPCRで遺伝子断片を作製した。CPEC法により、PCR産物を結合・環状化し、ウイルスの完全長遺伝子、HDVリボザイム遺伝子、BGHポリアダニル化シグナル遺伝子及びCMVプロモーター遺伝子配列をコードする環状のDNAを構築した。

7. CPER 産物のトランスフェクション

トランスフェクション当日に 80% コンフルエントとなるように 6 穴プレートに A549 細胞と 293 細胞を 1:1 の割合で共培養した。37℃に温めた Opti-MEM 200 μ l に AdV CPER 産物 25 μ l を加えピペッティングにより混合した。TransIT®-LT1 Transfection Reagent を 12 μ l 加えゆっくりとピペッティングにより混合しスピンドウンして 10 分間静置した。細胞のプレートから培地を捨て、維持培地 2ml をプレートに加え、CPER 産物が入った溶液を 200 μ l 加え 37℃で培養した。

8. ウイルスの回収

AdV CPER 産物をトランスフェクションした 7 日後、ピペッティングで細胞を剥がして培養液ごと回収し、-80℃で凍結させた。その後、37℃で素早く融解させて激しく攪拌するという凍結融解の操作を 4 回行って、細胞を破碎した。3,000 rpm、室温で 15 分遠心し、細胞の破片を除き、上清を 1 次シードウイルス液として回収し、-80℃で保存した。

感染当日に 6 穴プレートに 80%コンフルエントとなるように A549 細胞を播種し、1 次シードウイルス液を 500 μ l 細胞に接種した。37℃で 1 時間 CO₂ インキュベーター内にて振盪培養した。維持培地を 2ml 加え 37℃で CO₂ インキュベーターにて培養した。1 次シードウイルス液を感染させた 7 日後に、上記と同様の操作で 2 次シードウイルス液を得た。

9. 免疫染色によるウイルスタンパク質の検出

回収した組換え AdV 2 次シードウイルス液を 1 %ペニシリンストレプトマイシン加 DMEM で 10 倍～10⁶ 倍希釈した。感染当日に 48 穴プレートに 80%コンフルエントとなるよう A549 細胞細胞を播種した。希釈した上清を 100 μ l ずつ各ウェルに加え 37℃で 1 時間 CO₂ インキュベーター内にて振盪培養し感染させた。培地を除いて 1%メチルセルロース（シグマ）加 DMEM を 500 μ l 加え 37℃で CO₂ インキュベーターにて培養し感染させた。

感染から 4 日後メチルセルロースを除き、1 %ペニシリンストレプトマイシン加 DMEM で細胞を洗浄した。さらに D-PBS で洗浄し、4%-パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液（PFA）（ナカライテスク）を加え室温で 15 分振盪した。振盪後 PFA を捨て DPBS で洗浄した。その後 0.2% Triton X-100（富士フイルム和光純薬）加 D-PBS を加え 15 分振盪した。DPBS で洗浄し 1%ウシ血清アルブミン（BSA）（シグマ）加 D-PBS を加え 30 分振盪した。DPBS で洗浄し、1 次抗体 MOUSE ANTI ADENOVIRUS HEXON（BIO RAD）を 0.1% BSA 加 DPBS で 500 倍希釈した抗体液を 150 μ l 加え室温で 1 時間振盪した。DPBS で洗浄し、2 次抗体 Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ Plus 488（Thermo Fisher SCIENTIFIC）を 0.1% BSA 加 DPBS で 1,000 倍希釈した抗体液を 150 μ l 加え室温で 1 時間振盪した。DPBS で洗浄し第 1 章と同

様に蛍光顕微鏡で分析した。

10. ウイルス力価測定と細胞培養でのウイルスの増殖性の解析

培養上清中の感染価を第一章と同様に、50%組織培養感染量 (TCID₅₀) (Reed et al., Am J Hyg., 1938) により測定した。細胞の培養上清を、2% FBS を含む DMEM で 10 倍段階希釈した後、96 ウェルプレートに A549 細胞に接種した。ウイルス感染の有無は、感染後 72 時間 (hpi) に検鏡にて CPE により判定した。各種ウイルスの増殖性は、6 ウェルプレートで A549 細胞に MOI 1 で AdV を接種した。培養上清を 1 hpi で新しい培地に交換し、培養した。その後、感染後 24、48、72、96hpi に採取した培養上清の感染感染価を測定した。

結果

1. AdV 遺伝子の増幅と遺伝子断片のクローニング

各遺伝子断片をプラスミドベクターにクローニングした結果、複数のコロニーが得られ、ウイルス遺伝子と同一の配列のプラスミド DNA を精製することができた。

得られたプラスミドから各々に対応したプライマーを用いて各遺伝子断片を PCR にて増幅した。PCR により作製した各ウイルスの遺伝子断片を 1.0%アガロースゲル電気泳動によって確認した。目的の分子量の DNA が確認されたため、各ウイルス遺伝子断片 PCR 産物が作製されていることが示唆された (図 10)。

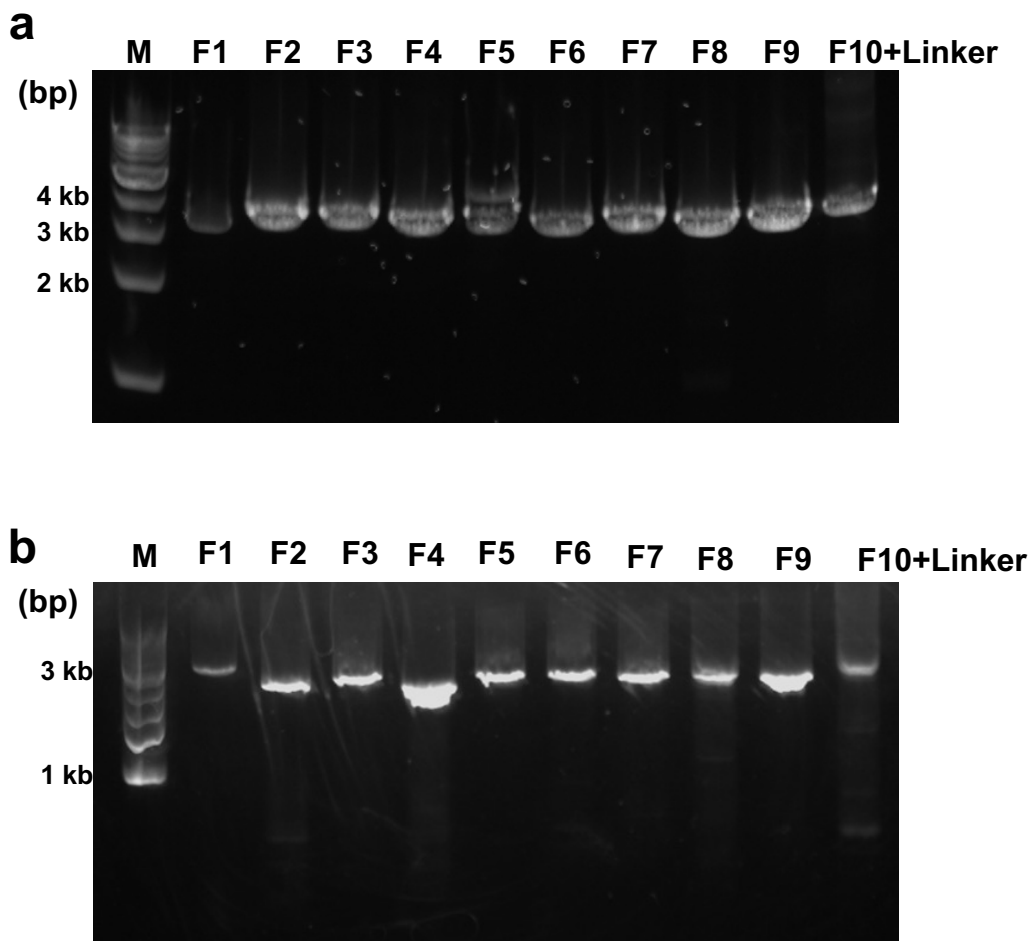


図10. PCRで得られた各遺伝子断片の分子量

組換えAdVを作製するための遺伝子断片をPCRにより増幅した。Mは、1 kbのDNAラダーの泳動結果を示す。

(a) AdV37の各フラグメント。(b) AdV41の各フラグメント。

2. 免疫染色によるウイルスタンパク質の検出

CPER 反応により組換えウイルスが作出されているかを調べるために免疫染色を行った。

AdV CPER 産物から得られた 2 次シードウイルス液を接種した細胞を 4%PFA により固定し免疫染色して蛍光顕微鏡にて観察した。組換え AdV の CPER 反応物を接種した細胞はカプシドタンパク質ヘキソンに対する抗体を用いた免疫染色にて 37 型、41 型ともに抗原陽性であったことから、CPER 法によって組換え AdV が作製されていることが確認された。(図 11)

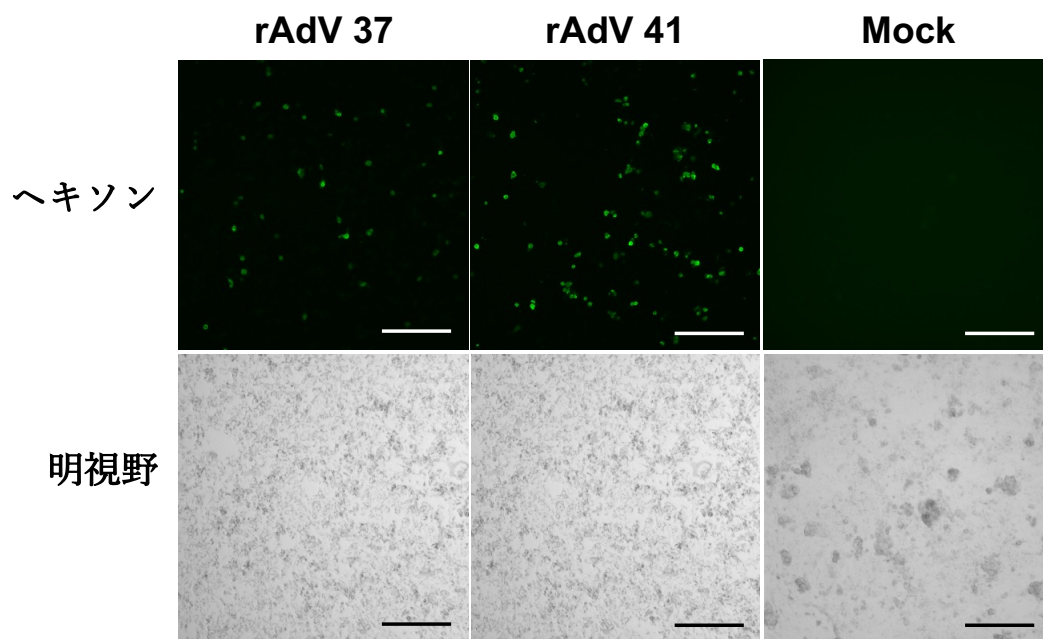


図11. AdV 抗ヘキソン抗体で免疫染色した細胞

CPER産物を導入した共培養細胞から採取した培養上清100 μ LをA549細胞に接種した。感染後72時間で、細胞をAdVカプシドタンパク質ヘキソンに対する抗体を用いて免疫蛍光染色した。バーは200 μ m を示す。

3. 作出した組換えウイルスの増殖能

2 種類の組換え AdV の増殖性を評価するために、親株及び組換えウイルスを A549 細胞に MOI=1 で感染させ、培養上清のウイルス感染価を経時的に測定した (図 12)。その結果、両組換え AdV はいずれも親株と同等の増殖性を示した。

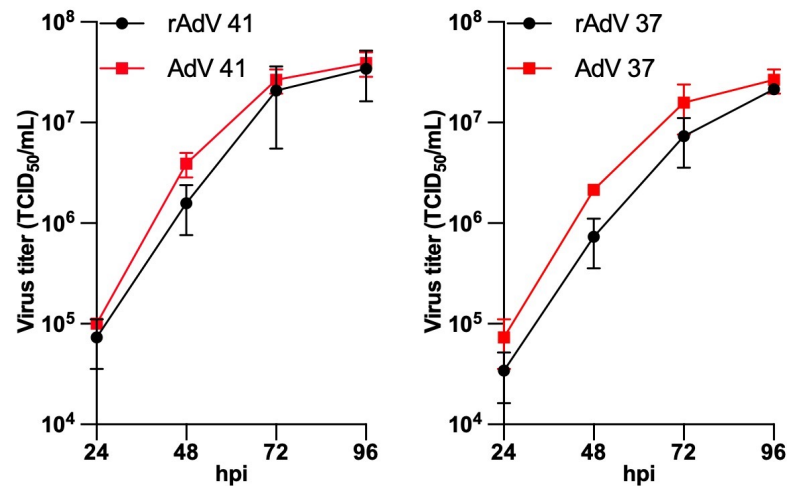


図12. 親株と組換えAdVの増殖性の比較

WT及び組換えキメラウイルスの培養細胞における増殖性を評価した。A549細胞を、親株または組換えAdVを用いてMOI = 1で接種した。接種後24時間ずつで上清を回収しウイルス力価を測定した。培養上清のウイルス感染価は、TCID₅₀によって測定した。独立して2回実施した成績を示す。

考察

これまでに CPER 法を適用することができたウイルスは、RNA ウイルスであった (Edmonds et al., J Virol., 2013; Setoh et al., J Gen Virol. 2015; Setoh et al., mSphere. 2017; Tamura et al., J. Virol., 2018; Amarilla AA, et al., Nat Commun., 2021; Torii et al., Cell Rep., 2021; Tamura et al., J Virol., 2024; Nakashima et al., Biochem Biophys Res Commun., 2025)。一方でこれまでに DNA ウイルスへの CPER 法の適用は報告されていなかった。DNA ウイルスはゲノムサイズが大きく一般的に使われているコスミド及び BACs を用いたリバーシジェネティクスには多くの時間と熟練した技術が必要である (Luo et al., Nat Protoc., 2007; Mück-Häusl et al., Nucleic Acids Res., 2015)。本研究では DNA ウイルスである AdV37 型及び AdV41 型を対象に CPER 法を改良することで組換えウイルスが作出できるかを試みた。

AdV37 型及び AdV41 型について CPER 法の改良を試みた。得られた CPER 産物を細胞に接種しカプシドタンパク質に対する抗体にて免疫染色を行ったところ、抗原陽性となった。また、細胞の培養上清を接種した細胞で、ウイルス感染価が経時毎に増加した。従って、CPER 法にて組換え AdV が作出されうることが示された。DNA ウイルスである AdV において CPER 法を適用することができたことから、他の DNA ウイルスにおいても CPER 法が可能であることが示唆される。一方で DNA ウイルスには 10 万塩基を超えるゲノムを持つものもあり、CPER 法は多数の DNA 断片の連結と高精度の増幅を必要としゲノムが大きくなるほど反応効率や正確性の低下が懸念される。そのため、どの DNA ウイルスに CPER を適用できるかを検証する必要がある。また AdV は A～G の 7 種に大別され 51 種類の血清型及び 52 型以降の遺伝型に分類される。上気道炎、胃腸炎、結膜炎、膀胱炎、発疹など種ごとに引き起こす疾患が大まかに決まっている (花岡ら、2022)。現在、AdV のリバーシジェネティクス法はコスミドを用いた古典的手法が主に用いられている。コスミド法は完全長のウイルスゲノムをコスミドに導入し制限酵素処理後、細胞に導入する方法である (近藤ら、2007)。しかし、AdV は約 3,6000 塩基とゲノムサイズが大きく全長のウイルスゲノムをコスミドに挿入するには熟練の技術が必要である。また、Miciak らはプラスミドを用いて AdV のゲノムを分割・管理し、それらを連結させることにより組換え AdV を作製する方法を報告している (Miciak et al., PLoS One., 2018)。この方法ではコスミドに比べクローニングは簡単であるが、エレクトロポレーションの技術と機器を必要とする。これに対し、本研究の CPER 法はゲノム断片増幅と環状 DNA 構築の両方を PCR で達成でき、トランスフェクションは市販の試薬で行うことができるため、特殊な機器が不要でありより簡易で汎用的な方法と言える。そこで、本研究の成果を基に CPER 法の迅速さを活かし指向性の異なる AdV のタンパク質を入れ替えた新たな組換えウイルスを網羅的に作出し、

指向性が変化を解析することにより AdV の指向性の解明に繋がる可能性がある。

以上、本研究の結果より、DNA ウイルスに CPER 法が適用可能であることが明らかになった。従って本研究の知見と既報の研究成果を合わせると、新興・再興ウイルス感染症が流行した際、迅速に組換えウイルスを作出し、対応することが可能だと考えられる。

結論

本研究から得られた結果は以下のとおりである。

- ・ 唾液検体からウイルスを単離することなく組換え SARS-CoV-2 を得ることができた。
- ・ 臨床検体からレポーターウイルスを作製することで臨床検体の性状を迅速に解析することができた。
- ・ DNA ウイルスである AdV37 型及び 41 型に CPER 法を適用し、迅速に組換えウイルスを作出することができた。

本研究の成果には、従来のリバーシジェネティクス技術に比べ、迅速に組換えウイルスを作出することができるという意義がある。さらに、SARS-CoV-2 だけでなく新たなウイルス感染症が発生した際の対策に貢献できると考えられる。また、アデノウイルス以外の DNA ウイルスにも CPER 法が適用できる可能性が示唆される。すなわち、この技術を用いることによって、未だ見ぬ新興・再興ウイルス感染症が流行した際に迅速に対応策を講じることができると考えられる。

今後の課題として、本研究での知見を応用しアデノウイルスの蛍光及び発光レポーター遺伝子を搭載したウイルスを作出することで、創薬スクリーニング、感染ライブイメージング等の応用研究が展開できると考えられる。

謝辞

本研究の遂行にあたり、指導教官として終始多大なご指導を賜った、九州大学大学院医学研究院ウイルス学分野、福原崇介教授、田村友和准教授、鈴木紗織助教ならびに鈴木理滋助教、北海道大学大学院医学研究院微生物学免疫学分野病原微生物学教室、小林弘一教授に深謝致します。

本研究は、その一部を科学研究費助成事業（課題番号：21H0273602）、国立研究開発法人 日本医療研究開発機構（課題番号：PJ4222KD01、PJ4222KD24、PJ4222KD21）、JSPS 科研費（JP25KJ0482）から助成を受けて推進しました。

病原微生物学教室の皆様には大変お世話になりました。同教室、手塚瑞穂さんには本研究の遂行にあたり事務的な補助を頂きました。九州大学大学院医学研究院ウイルス学分野の皆様にも大変お世話になりました。ここに感謝の意を表します。

利益相反

本研究において開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Ahmadiéh A, Dincer S and Navazesh M (2022) Is saliva collected passively without forceful coughing sensitive to detect SARS-CoV-2 in ambulatory cases? A systematic review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 133: 530-538

Amarilla, A. A., J. D. J. Sng, R. Parry, J. M. Deerrain, J. R. Potter, Y. X. Setoh, D. J. Rawle, T. T. Le, N. Modhiran, X. Wang et al. (2021) A versatile reverse genetics platform for SARS-CoV-2 and other positive-strand RNA viruses. *Nat Commun*, 12, 3431.

Barut GT, Halwe NJ, Taddeo A, Kelly JN, Schön J, Ebert N, Ulrich L, Devisme C, Steiner S, Trüeb BS et al (2022) The spike gene is a major determinant for the SARS-CoV-2 Omicron-BA.1 phenotype. *Nat Commun* 13: 5929

Biegert GWG, Rosewell Shaw A and Suzuki M (2021) Current development in adenoviral vectors for cancer immunotherapy. *Mol Ther Oncolytics* 23: 571-581

Carabelli AM, Peacock TP, Thorne LG, Harvey WT, Hughes J, Peacock SJ, Barclay WS, de Silva TI, Towers GJ, Robertson DL et al (2023) SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness. *Nat Rev Microbiol* 21: 162-177

Colloca S, Barnes E, Folgori A, Ammendola V, Capone S, Cirillo A, Siani L, Naddeo M, Grazioli F, Esposito ML et al (2012) Vaccine vectors derived from a large collection of simian adenoviruses induce potent cellular immunity across multiple species. *Sci Transl Med* 4: 115ra112

Dong J, Zost SJ, Greaney AJ, Starr TN, Dingens AS, Chen EC, Chen RE, Case JB, Sutton RE, Gilchuk P et al (2021) Genetic and structural basis for SARS-CoV-2 variant neutralization by a two-antibody cocktail. *Nat Microbiol* 6: 1233-1244

Duffy S (2018) Why are RNA virus mutation rates so damn high? *PLoS Biol* 16: e3000003

Edmonds, J., E. van Grinsven, N. Prow, A. Bosco-Lauth, A. C. Brault, R. A. Bowen, R. A. Hall & A. A. Khromykh (2013) A novel bacterium-free method for generation of flavivirus infectious DNA by circular polymerase extension reaction allows accurate

recapitulation of viral heterogeneity. *J Virol*, 87, 2367-72.

Ehrke-Schulz E, Schiwon M, Leitner T, Dávid S, Bergmann T, Liu J and Ehrhardt A (2017) CRISPR/Cas9 delivery with one single adenoviral vector devoid of all viral genes. *Sci Rep* 7: 17113

Fernandes PADC, Ferreira FADC, Morais OM, Ramos CMT, Fernandes É, Rocha SAAD, Rocha RJA, Monteiro VJP, Vilar PSG, Romão AM et al (2021) Performance of saliva as a specimen to detect SARS-CoV-2. *J Clin Virol* 142: 104913

Harvey WT, Carabelli AM, Jackson B, Gupta RK, Thomson EC, Harrison EM, Ludden C, Reeve R, Rambaut A, Peacock SJ et al (2021) SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat Rev Microbiol* 19: 409-424

Hotard A. L., Shaikh F. Y and Lee S. (2012) A Stabilized Respiratory Syncytial Virus Reverse Genetics System Amenable to Recombination-Mediated Mutagenesis. *Virology* 434: 129–136.

Jothikumar, N., T. L. Cromeans, V. R. Hill, X. Lu, M. D. Sobsey & D. D. Erdman (2005) Quantitative real-time PCR assays for detection of human adenoviruses and identification of serotypes 40 and 41. *Appl Environ Microbiol*, 71, 3131-6.

Katoh K and Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 30: 772-780

Khare S, Gurry C, Freitas L, Schultz MB, Bach G, Diallo A, Akite N, Ho J, Lee RT, Yeo W et al (2021) GISAID's Role in Pandemic Response. *China CDC Wkly* 3: 1049-1051

Kimura, I., D. Yamasoba, T. Tamura, N. Nao, T. Suzuki, Y. Oda, S. Mitoma, J. Ito, H. Nasser, J. Zahradnik, K. Uriu et al. (2022) Virological characteristics of the SARS-CoV-2 Omicron BA.2 subvariants, including BA.4 and BA.5. *Cell*, 185, 3992-4007.e16.

Kozlov AM, Darriba D, Flouri T, Morel B and Stamatakis A (2019) RAxML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics* 35: 4453-4455

Lanford, R. E., Z. Feng, D. Chavez, B. Guerra, K. M. Brasky, Y. Zhou, D. Yamane, A. S.

Perelson, C. M. Walker, and S. M. Lemon, 2011, Acute hepatitis A virus infection is associated with a limited type I interferon response and persistence of intrahepatic viral RNA: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 108, p. 11223-8.

Larsson A (2014) AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics* 30: 3276-3278

Letko M, Marzi A and Munster V (2020) Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat Microbiol* 5: 562-569

Li Q, Liu Y and Zhang L (2022) Cytoplasmic tail determines the membrane trafficking and localization of SARS-CoV-2 spike protein. *Front Mol Biosci* 9: 1004036

Lindenbach B. D. (2022) Reinventing Positive-Strand RNA Virus Reverse Genetics. *Advances in Virus Research* 112: 1–29.

Liu Y, Soh WT, Kishikawa JI, Hirose M, Nakayama EE, Li S, Sasai M, Suzuki T, Tada A, Arakawa A et al (2021) An infectivity-enhancing site on the SARS-CoV-2 spike protein targeted by antibodies. *Cell* 184: 3452-3466.e3418

Luo J, Deng ZL, Luo X, Tang N, Song WX, Chen J, Sharff KA, Luu HH, Haydon RC, Kinzler KW et al (2007) A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system. *Nat Protoc* 2: 1236-1247

Lynch JP and Kajon AE (2016) Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention. *Semin Respir Crit Care Med* 37: 586-602

MacNeil KM, Dodge MJ, Evans AM, Tessier TM, Weinberg JB and Mymryk JS (2023) Adenoviruses in medicine: innocuous pathogen, predator, or partner. *Trends Mol Med* 29: 4-19

Marquez-Martinez S, Vijayan A, Khan S and Zahn R (2023) Cell entry and innate sensing shape adaptive immune responses to adenovirus-based vaccines. *Curr Opin Immunol* 80: 102282

Miciak JJ, Hirshberg J and Bunz F (2018) Seamless assembly of recombinant

adenoviral genomes from high-copy plasmids. *PLoS One* 13: e0199563

Moriishi, K. & Y. Matsuura (2003) Mechanisms of hepatitis C virus infection. *Antivir Chem Chemother*, 14, 285-97.

Motozono, C., M. Toyoda, J. Zahradnik, A. Saito, H. Nasser, T. S. Tan, I. Ngare, I. Kimura, K. Uriu, Y. Kosugi et al. (2021) SARS-CoV-2 spike L452R variant evades cellular immunity and increases infectivity. *Cell Host Microbe*, 29, 1124-1136.e11.

Mück-Häusl M, Solanki M, Zhang W, Ruzsics Z and Ehrhardt A (2015) Ad 2.0: a novel recombineering platform for high-throughput generation of tailored adenoviruses. *Nucleic Acids Res* 43: e50

Nakashima M, Funabiki K, Izume S, Maruyama Y, Yamamoto A, Watanabe M, Okaga S, Hashimoto T, Hayasaki-Kajiwara Y and Nakano Y (2025) Development of a reverse genetic system for mononegaviruses using a circular polymerase extension reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 754: 151493

Nishibata Y, Koshimoto S, Ogaki K, Ishikawa E, Wada K, Yoshinari M, Tamura Y, Uozumi R, Masuda S, Tomaru U et al (2021) RNase in the saliva can affect the detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 by real-time one-step polymerase chain reaction using saliva samples. *Pathol Res Pract* 220: 153381

Oka GU, Souza DP, Sgro GG, Guzzo CR, Dunger G and Farah CS (2024) Xanthomonas immunity proteins protect against the cis-toxic effects of their cognate T4SS effectors. *EMBO Rep* 25: 1436-1452

Okada P, Buathong R, Phuygun S, Thanadachakul T, Parnmen S, Wongboot W, Waicharoen S, Wacharapluesadee S, Uttayamakul S, Vachiraphan A et al (2020) Early transmission patterns of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in travellers from Wuhan to Thailand, January 2020. *Euro Surveill* 25

Pormohammad A, Ghorbani S, Khatami A, Razizadeh MH, Alborzi E, Zarei M, Idrovo JP and Turner RJ (2021) Comparison of influenza type A and B with COVID-19: A global systematic review and meta-analysis on clinical, laboratory and radiographic findings. *Rev Med Virol* 31: e2179

Reed LJ and Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints.

Am J Hyg 27:493–497.

Safiabadi Tali SH, LeBlanc JJ, Sadiq Z, Oyewunmi OD, Camargo C, Nikpour B, Armanfard N, Sagan SM and Jahanshahi-Anbui S (2021) Tools and Techniques for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 Detection. Clin Microbiol Rev 34

Saito, A., T. Irie, R. Suzuki, T. Maemura, H. Nasser, K. Uriu, Y. Kosugi, K. Shirakawa, K. Sadamasu, I. Kimura et al. (2022a) Enhanced fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Delta P681R mutation. *Nature*, 602, 300-306.

Saito, A., T. Tamura, J. Zahradnik, S. Deguchi, K. Tabata, Y. Anraku, I. Kimura, J. Ito, D. Yamasoba, H. Nasser et al. (2022b) Virological characteristics of the SARS-CoV-2 Omicron BA.2.75 variant. *Cell Host Microbe*, 30, 1540-1555.e15.

Setoh, Y. X., N. A. Prow, N. Peng, L. E. Hugo, G. Devine, J. E. Hazlewood, A. Suhrbier & A. A. Khromykh (2017) De Novo Generation and Characterization of New Zika Virus Isolate Using Sequence Data from a Microcephaly Case. *mSphere*, 2.

Setoh, Y. X., N. A. Prow, D. J. Rawle, C. S. E. Tan, J. H. Edmonds, R. A. Hall & A. A. Khromykh (2015) Systematic analysis of viral genes responsible for differential virulence between American and Australian West Nile virus strains. *J Gen Virol*, 96, 1297-1308.

Sun Y, Ho M (2020) Emerging antibody-based therapeutics against SARS-CoV-2 during the global pandemic. *Antib Ther* 3: 246-256

Suzuki R, Yamasoba D, Kimura I, Wang L, Kishimoto M, Ito J, Morioka Y, Nao N, Nasser H, Uriu K et al (2022) Attenuated fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Omicron variant. *Nature* 603: 700-705

Suzuki R, Kamiyama A, Ito H, Kawashiro K, Tomiyama T, Tamura T, Suzuki S, Yoshizumi T, Hotta K and Fukuhara T (2024) The development of a rapid, high-throughput neutralization assay using a SARS-CoV-2 reporter. *J Virol Methods* 326: 114894

Tamura T, Fukuhara T, Uchida T, Ono C, Mori H, Sato A, Fauzyah Y, Okamoto T, Kurosu T, Setoh YX et al (2018) Characterization of Recombinant Flaviviridae Viruses

Possessing a Small Reporter Tag. *J Virol* 92

Tamura T, Yamamoto H, Ogino S, Morioka Y, Tsujino S, Suzuki R, Hiono T, Suzuki S, Isoda N, Sakoda Y et al (2024) A rapid and versatile reverse genetics approach for generating recombinant positive-strand RNA viruses that use IRES-mediated translation. *J Virol* 98: e0163823

Tomiya T, Suzuki R, Harada N, Tamura T, Toshida K, Kosai-Fujimoto Y, Tomino T, Yoshiya S, Nagao Y, Takeishi K et al (2023) A third dose of the BNT162b2 mRNA vaccine sufficiently improves the neutralizing activity against SARS-CoV-2 variants in liver transplant recipients. *Front Cell Infect Microbiol* 13: 1197349

Torii, S., C. Ono, R. Suzuki, Y. Morioka, I. Anzai, Y. Fauzyah, Y. Maeda, W. Kamitani, T. Fukuhara & Y. Matsuura (2021) Establishment of a reverse genetics system for SARS-CoV-2 using circular polymerase extension reaction. *Cell Rep*, 35, 109014.

Tsujino S, Deguchi S, Nomai T, Padilla-Blanco M, Plianchaisuk A, Wang L, Begum MM, Uriu K, Mizuma K, Nao N et al (2024) Virological characteristics of the SARS-CoV-2 Omicron EG.5.1 variant. *Microbiol Immunol* 68: 305-330

Tsujino S, Tsuda M, Nao N, Okumura K, Wang L, Oda Y, Mimura Y, Li J, Hashimoto R, Matsumura Y et al (2025) Evolution of BA.2.86 to JN.1 reveals that functional changes in non-structural viral proteins are required for fitness of SARS-CoV-2. *J Virol* 99: e0090825

Uraki R, Ito M, Kiso M, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Sakai-Tagawa Y, Imai M, Koga M, Yamamoto S, Adachi E et al (2023) Antiviral efficacy against and replicative fitness of an XBB.1.9.1 clinical isolate. *iScience* 26: 108147

Uršič T, Kogoj R, Šikonja J, Jevšnik Virant M and Petrovec M (2023) A simplified nasopharyngeal swab collection procedure for minimizing patient discomfort while retaining sample quality. *Front Public Health* 11: 1066934

V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H and Thiel V (2021) Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* 19: 155-170

Vangeel L, Chiu W, De Jonghe S, Maes P, Slechten B, Raymenants J, André E, Leyssen P, Neyts J and Jochmans D (2022) Remdesivir, Molnupiravir and Nirmatrelvir remain

active against SARS-CoV-2 Omicron and other variants of concern. *Antiviral Res* 198: 105252

Wang Q, Iketani S, Li Z, Liu L, Guo Y, Huang Y, Bowen AD, Liu M, Wang M, Yu J et al (2023) Alarming antibody evasion properties of rising SARS-CoV-2 BQ and XBB subvariants. *Cell* 186: 279-286.e278

Yamasoba, D., I. Kimura, H. Nasser, Y. Morioka, N. Nao, J. Ito, K. Uriu, M. Tsuda, J. Zahradnik, K. Shirakawa et al. (2022) Virological characteristics of the SARS-CoV-2 Omicron BA.2 spike. *Cell*, 185, 2103-2115.e19.

Yazawa S, Yamazaki E, Saga Y, Itamochi M, Inasaki N, Shimada T, Oishi K and Tani H (2023) Evaluation of SARS-CoV-2 isolation in cell culture from nasal/nasopharyngeal swabs or saliva specimens of patients with COVID-19. *Sci Rep* 13: 8893

Yokota I, Shane PY, Okada K, Unoki Y, Yang Y, Inao T, Sakamaki K, Iwasaki S, Hayasaka K, Sugita J et al (2021) Mass Screening of Asymptomatic Persons for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Using Saliva. *Clin Infect Dis* 73: e559-e565

Yu G, Smith DK, Zhu H, Guan Y and Lam T-Y. 2016. ggtree: an r package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. *Methods Ecol Evol* 8:28–36.

近藤小貴, 寺島美保, 福田尋充, 斎藤泉, 鐘ヶ江裕美. (2007) .3. アデノウイルスベクターの遺伝子工学. *ウイルス* 第 57 巻 第 1 号, pp.37-46.

花岡希, 高橋健一郎, 藤本嗣人. (2022) . 病原体検出・検査マニュアル 腸管アデノウイルス (感染性胃腸炎) 令和 4 (2022) 年 5 月 Ver. 2 国立感染症研究所 <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/AdenoVirusDiarrhea20220518.pdf> (最終アクセス 2022 年 12 月 27 日)

CDC

https://www.cdc.gov/covid/hcp/clinical-care/clinical-specimen-guidelines.html?utm_source=chatgpt.com (最終アクセス 2025 年 11 月 4 日)

FigTree: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>. (最終アクセス 2025 年 11 月 4 日)

WHO <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases?n=c> (最終アクセス 2025 年 11 月 4 日)