



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_review.pdf, 審査の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 山 本 紘 嵩

主査 教 授 氏 家 英 之
審査担当者 副査 教 授 畠 山 鎮 次
副査 准教授 北 條 慎太郎

学 位 論 文 題 名

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)

ウイルス学におけるリバーシジェネティクス法は、ウイルスを人工的に作出する技術である。この技術はウイルスの性状解析において重要であることから、未知の新興・再興ウイルス感染症の迅速な対策を講じる上で役立つと考えられる。その中で **Circular Polymerase Extension Reaction (CPER)** 法は従来法に比べ迅速にウイルスを作出することが可能である。そこで本研究では、**SARS-CoV-2** の **CPER** 法を改良し臨床検体から直接組換えウイルスの作出を試みた。また、現在 **CPER** 法を用いて組換えウイルスの作出に成功したウイルスは **RNA** ウイルスのみであるため、**DNA** ウイルスであるアデノウイルス 41 型 (**AdV41**) に **CPER** 法を改良し、組換えウイルスの作出を試みた。

審査にあたり、まず副査の畠山教授から、アデノウイルスの **CPER** 産物をトランスフェクションする際に細胞を二つ使った理由はなぜかとの質問があり、申請者はトランスフェクション効率の高い **293** 細胞とアデノウイルス感染感受性細胞の **A549** 細胞を使用することでウイルスの増殖効率を向上させたと回答した。次に、**GFP** は比較的大きなタンパクであるが **SARS-CoV-2** の **GFP** ウイルスは野生株と比較し増殖性に差異ないのかとの質問があり、申請者は過去の文献から **GFP** ウイルスは野生株に比べ増殖性は下がることがわかっているが薬剤の評価をする上で問題はないと回答した。次に、他の巨大ゲノムの **DNA** ウイルスでは同じ手技が応用可能かとの質問があり、申請者は巨大ゲノムのウイルスでは各遺伝子断片の塩基数を **PCR** で増幅できる限界値まで増やすことで対応できるのではないかと回答した。さらにインフルエンザのような分節ウイルスの場合はどう対処するかとの質問があり、申請者はインフルエンザのような分節ウイルスでは各分節をプラスミドに導入するリバーシジェネティクスがすでに確立されており、各文節の塩基数も小さいため **CPER** を適応する必要はない、と回答した。

次に副査の北條准教授から、臨床検体の **Ct** 値は他のウイルスではどうなのか、スパイク

タンパク質以外のウイルスタンパク質の影響はどうかという質問があり、申請者は同じウイルスで同じ Ct 値でも該当の遺伝子によって PCR での伸びやすさが変わるためウイルスが異なれば必要となる Ct 値も変わってくる、低 Ct 値の検体でスパイクタンパク質以外の増幅にも成功したが低 Ct 値の検体を集めるコストと迅速性・利便性を比較したときに今回のようにスパイクタンパク質が病原性を決定する場合は迅速性を優先しウイルスの解析をした方が良いと回答した。また、PCR のエラーはどうやって確認しているのか、シーケンスは確認しているのかという質問があり、申請者はシーケンスは確認済みであると回答した。

最後に主査の氏家教授から、さらに巨大な DNA ウイルスに CPER 法を用いる場合に遺伝子断片を増やすことはできないのかとの質問があり、遺伝子断片の塩基数を増やしつつ断片の数も増やす必要があるが、断片を増やし過ぎると想定通りに結合しなくなる可能性があるので増やすにも限度があると回答した。次に、アデノウイルスで細胞毒性は見えないのかとの質問があり、申請者はアデノウイルスの細胞毒性は確認済みでブドウの房様の細胞変性効果が見られると回答した。次に、アデノウイルスでは SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質のように病原性を起因する遺伝子はあるのかとの質問があり、申請者はアデノウイルスのファイバータンパク質が受容体に結合することが知られているが病原性や宿主特異性を決定する因子はまだ明らかになっていないと回答した。最後に、レポーター遺伝子挿入の進捗はどうかとの質問があり、実験を進めており挿入箇所の見直しとトランスフェクション効率の向上を検討していると回答した。

この論文は、臨床検体からの迅速なウイルスの作出とその有用性を示した点と DNA ウイルスへの CPER 法の適応を確認した点で高く評価され、今後のほぼ全てのウイルスへの CPER 法の適応可能性が期待される。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。