

論文の内容の要旨

獣医学 専攻

平成 18 年度博士課程 進学

氏 名 渡辺 俊平

指導教員名 明石 博臣

論文題目 Epidemiological studies targeting viruses derived from bats
using methods for virus species-independent detection
(網羅的検出手法によるコウモリ保有ウイルスの疫学的研究)

1994 年のヘンドラウイルスの出現を発端とし、ニパウイルス、エボラウイルスなど、コウモリは多くの人獣共通感染症ウイルスの宿主となることが近年報告されている。コウモリは約 1000 種とも言われており、哺乳類の中では、げっ歯類に続き第 2 位の多様性を有する一群である。また地球上のほぼ全域に分布することも知られ、自然環境中でウイルス保有宿主として果たす役割は大きいと推測される。それにも関わらず、コウモリとウイルスに関する科学的知見は少なく、その大部分が上記の新興感染症ウイルスや、コウモリの保有が従来から報告されている狂犬病ウイルスを標的とした疫学的知見に限られる。さらに先行研究の多くは、ウイルス流行後にウイルス感染症により被害を受けたヒトや家畜動物を対象としたものである。しかし新興感染症ウイルスは不意に出現するのではなく、本来は野生動物をレゼルボアとして以前より自然界に存在しているものである。従ってコウモリ由来ウイルスのリスクを正しく評価し、その評価に見合った現実的な予防策を講じるためにも、コウモリの保有病原体叢を積極的に調査し、流行の有無に関わらず知見を蓄積することが重要である。そのためには、標的ウイルスを限定しない系統だったコウモリの疫学調査が必要である。そこで著者は、コウモリにおいてウイルス種網羅的な疫学調査を試みた。

コウモリ保有ウイルスに対する疫学的研究が重要である一方で、これまでにコウモリが保有すると知られている既知のウイルス種は、僅か 80 程度に過ぎない。約 1000 種というコウモリの多様性を考えると、極端に少ないことがわかる。この事実は、今後も多くの未知ウイルスがコウモリから出現し、その一部にはヒトや動物に大きな危害を加えるウイルスが存在する可能性を示唆する。よってコウモリにおいて未知ウイルスを探索し、コウモリにおける疫学調査の対象そのものを拡大することが重要である。しかし、

現在のウイルス診断法はウイルス特異的な遺伝子や抗体の検出など、既知ウイルスに対するものが標準的であり、未知ウイルスの探索を野外材料から効率的に行うことのできる手法はこれまでに報告がない。近年、ウイルス培養上清からダイレクトシーケンスにより網羅的にウイルス遺伝子の一部を決定する方法、Rapid determination system for viral RNA sequences (RDV) 法が開発された。著者は、RDV 法を改良することにより、野外材料からの効率的なウイルス探索法の開発を本研究で目指した。各章の要約は以下の通りである。

(第1章)

多検体処理や少量検体への応用性という観点からコウモリ血清調査に使用できる ELISA 系の確立を試みた。ウイルス抗原を補足したプレートに、一次血清としてコウモリ血清を、二次血清にビオチン化抗コウモリ IgG 免疫血清を加えるコンベンショナルな ELISA 系を採用した。同系は、抗原のみを換えることで多様なウイルスについてコウモリからの抗体検出が可能な利便性の高い手法である。ELISA 系のモデルとして、日本でコウモリから分離された数少ないウイルスであるヨコセウイルス（フラビウイルス属）を選び、コウモリ血中のヨコセウイルス抗体を検出する ELISA を確立した。フィリピンおよびマレーシアで採取された検体を利用して ELISA による抗体調査を行った結果、フィリピン 1 個体 (2.8%)、マレーシア 5 個体 (19.2%) が ELISA で陽性であった。ヨコセウイルスの病原性についてはこれまでに検討がなされていなかったため、食果コウモリを用いた感染実験を行った。しかし、臨床症状は確認されず、ウイルスの増殖も確認できなかった。ヨコセウイルスは食果コウモリに感染したとしても素早くクリアされ、病原性を持たないことを示した。

(第2章)

2003 年の SARS コロナウイルスの流行以後、同ウイルスの自然界における保有宿主が探索され、その過程でコウモリから多くのコロナウイルス (CoV) 遺伝子が新たに検出された。ウイルスの出現に関与する宿主としてコウモリが注目されている。そこでフィリピンで捕獲の 52 頭のコウモリについて、CoV 遺伝子検出を試みた。CoV 汎用プライマーを用いて RT-PCR を行った所、26 の腸管検体においてウイルス RNA を検出した。得られた遺伝子配列から、グループ 1 および 2 の 2 種の CoV 様配列の存在が示された。動物園より分与された食果コウモリ（デマレルーセットオオコウモリ）にグループ 2 CoV RNA を含む腸組織の実験的経口投与を行った所、臨床症状を示さなかったが、腸管におけるコロナウイルスの増殖が示唆された。しかし、腸組織を用いたコウモリ継代実験では、ウイルス増殖を示す結果は得られず、デマレルーセットコウモリにおけるウイルス増殖は一過性である可能性が示された。

(第3章)

RDV 法は、大臣確認の組換え申請を要する未知配列のクローニングなしにウイルス配

列の一部を網羅的に検出可能な手法であり、未知ウイルスの同定に有用である。よってコウモリから新規ウイルスを探索するため、RDV 法の応用を考えた。しかしウイルス検出の有無を最終判定するのに 1 検体につき 65,536 通りもの煩雑な PCR 反応を必要とするため、同手法をそのまま野外検体に応用することは困難であった。そこでアダプターを付与して行う 2 次遺伝子ライブラリーの作成法を改良し、使用するアダプターを 1 種類から 2 種類に変更した。その結果、1 検体につき計 256 通りの PCR 反応によって検出が可能となった。

(第 4 章)

RDV 法において 2 次遺伝子ライブラリーの作成法をさらに最適化した結果、1 検体につき計 64 通りの PCR 反応によりウイルス遺伝子の検出が可能となった。この簡便法を用いて、日本でユビナガコウモリより分離されたウイルスの同定を行った。その結果、 β ヘルペスウイルス亜科に属する tupaiaid herpesvirus 1 に相同性を示すウイルス様遺伝子断片を得た。ウイルスの gB 遺伝子配列を決定した結果、新規の β ヘルペスウイルス遺伝子であることが示された。

(第 5 章)

フィリピンで採取された 46 のコウモリ脾臓検体から核酸を抽出し、汎用プライマーを用いてヘルペスウイルス遺伝子の検出を行った。その結果、1 頭のカグラコウモリから PCR 増幅を検出した。しかし、同プライマーは高度に degenerate な混合塩基配列を有し、ダイレクトシーケンスによる塩基配列の決定は困難であった。そのため PCR 増幅産物を制限酵素処理しアダプターを付加後、RDV 法を適用し塩基配列を決定した。決定配列を基に設計した配列特異的プライマーと汎用プライマーを併用することでダイレクトシーケンスによる塩基配列の決定を行った。gB および DNA polymerase の部分配列より、検出された遺伝子が新規の γ ヘルペスウイルス遺伝子であることが示された。

(第 6 章)

RDV 法には、検査対象が培養上清に限られるという制約がある。これは、動物組織中には多量の宿主リボソーム RNA および宿主ゲノムが混入しているため、網羅的な遺伝子増幅の際にウイルス核酸の増幅が阻害されるためである。そこで第 2 の改良として、動物由来組織からの直接的な RNA ウイルスの網羅的検出法の開発を試みた。核酸分解酵素を用いてウイルス粒子外の核酸のみを選択的に分解する技術とタグ配列を有するランダムプライマーを用いた核酸増幅技術を組み合わせることにより、細胞由来核酸を排除しながら選択的にウイルス由来配列を検出することが可能となった。改良法を用いて、コロナウイルス RNA を含む野外コウモリの腸管からウイルス遺伝子の検出に成功した。以上の RDV 法の改良に加えて、本章では IFN 系シグナルを指標とした、培養細胞におけるウイルス感染細胞の新しいスクリーニング法の検討を行った。検討の結果、VeroE6 細胞において Viperin 等の mRNA 発現量を指標とすることでウイルス感染細胞を細胞変性効果に頼らずにスクリーニングできることを示した。

以上のように ELISA による抗体検出やウイルス特異的な遺伝子検出を利用して、ヨコセウイルスやコロナウイルスといった既知のコウモリ由来ウイルスの野外コウモリにおける保有状況を調査した。これらのウイルスについては、飼育食果コウモリを用いて実験感染による病原性の検討も同時に行った。調査地や検討するコウモリ種を変えて今後もこうした研究を持続的に実施することにより、自然界におけるコウモリ由来ウイルスの生態解明に結びつくと考えられる。さらに網羅的ウイルス遺伝子検出法である RDV 法を野外検体に応用することで、2 種の新規ヘルペスウイルス遺伝子の検出に成功した。発見された新規ウイルスについても今後調査の対象としていきたい。RDV 法は、方法に煩雑な手順を含み、検査対象が培養上清に限られるため野外調査への使用には限界があったが、本研究において開発された動物組織をも検査対象とし得る簡便な改良法を用いることにより野外調査への応用が現実的となった。ウイルス培養の可否に関わらず、改良 RDV 法は動物由来感染症の原因ウイルスの同定に広く応用可能である。さらに本研究で検討した、細胞培養系でのウイルス感染細胞スクリーニング法を組み合わせることにより、ウイルス分離において細胞変性効果に頼らずにウイルスの増幅を検出することが可能となり、続けて改良 RDV 法を用いることで、野外材料から新規ウイルスの探索を効率的に行い得ると考えられる。この結果、コウモリの保有病原体叢の全貌が明らかになることが期待される。