

動物が保有するウイルスの多様性とその起源に関する研究

佐々木 道仁（北海道大学 人獣共通感染症リサーチセンター）

m-sasaki@czc.hokudai.ac.jp

人獣共通感染症を克服するためには、病原微生物の自然宿主、自然界における存続機構と伝播経路を解明する必要がある。我々は、上記の目的に基づき、動物が保有するウイルスの検索を実施してきた。これまでに、様々な動物から、人に病気を起こすウイルスやこれまで知られていない新規ウイルスを多数見出した。得られた成果は、ウイルスの生活環、起源、多様性の解明に資するものである。

はじめに

人獣共通感染症（zoonosis）は脊椎動物とヒトの間で自然に伝播するあらゆる疾病または感染症と定義される。地球環境の変化やヒトの生活域の拡大により、ヒトと野生動物の接触機会が増加し、自然宿主である野生動物内で症状を示すことなく維持されていた病原微生物にヒトが偶発的に感染する機会が増えることが人獣共通感染症の発生増加の要因と考えられる。近年、西アフリカで発生したエボラ出血熱、メキシコと米国から世界中に感染が拡大した H1N1 パンデミックインフルエンザ、中東と韓国で流行した中東呼吸器症候群（MERS）等、人類はウイルス性人獣共通感染症の流行を相次いで経験した。将来発生する新たな人獣共通感染症への備えとして、動物が保有する病原体に関する知見を蓄積すること、自然界における病原体の存在様式やヒトへの伝播経路を解明することが重要である。そこで、我々は培養細胞によるウイルス分離、PCR 検索の手法、そして次世代シーケンサーを用いる網羅的解析手法を駆使して、野生動物が保有するウイルスを対象とした研究を推進している。

オオコウモリ由来新規ヘルペスウイルスの分離

インドネシアに生息するオオコウモリの脾臓組織を Vero 細胞に接種し、ヘルペスウイルスを分離した。次世代シーケンサーを用いてその全ゲノム塩基配列を決定し、進化系統を解析したところ、分離したウイルスはヒト単純ヘルペスウイルス 1 型（HSV-1）に類縁の新規ヘルペスウイルスであることが判明した。また、感染実験により、分離した新規ヘルペスウイルスはマウスに致死病的病態を惹起することが判明した。インドネシア各地にて採集したオオコウモリ組織より抽出した DNA を用いて実施した PCR の結果、133 例中 12 例（9%）より本ウイルスのゲノムが検出された。また、血清採取が可能であった 96 例のうち、46 例（48%）から中和抗体が検出された。以上の結果から、本ウイルスに感染したコウモリがインドネシアの広範な地域に分布していることが示唆された¹⁾。

野生動物が保有するパラミクソウイルスの検索

麻疹ウイルスやムンプスウイルス、ニパウイルスに代表されるパラミクソウイルス科のウイルスは、ヒトや動物に呼吸器疾患や脳脊髄炎を引き起こす公衆衛生上重要な病原体である。我々は採集した野生動物の組織試料を用いて、パラミクソウイルスの検索を実施した。ザンビアに生息する野生のヒヒ4例から、乳幼児や高齢者に重篤な呼吸器症状を惹起するヒトパラインフルエンザウイルス3型（HPIV3）のゲノムを検出した。進化系統解析の結果、検出したHPIV3が近年のヒト流行株と極めて近縁であることが明らかとなり、自然界においてヒトと野生霊長類動物間におけるHPIV3の種間伝播が生じたことが判明した²⁾。

インドネシアにて採集したオオコウモリを対象としたパラミクソウイルスの検索では、ヒトに致死的な脳脊髄炎を引き起こすニパウイルスに近縁な新規パラミクソウイルスのゲノムを複数検出した。進化系統解析により、コウモリがこれまで知られていない新種のパラミクソウイルスを複数保有していることが判明した³⁾。我々の研究を含む複数の研究により、コウモリが多様なパラミクソウイルスを保有していることが明らかとなり、コウモリが保有するパラミクソウイルスの多様性の解明が進んでいる。

ザンビアにて採集した小型齧歯類動物、食虫目動物を対象としたパラミクソウイルスの検索では、齧歯類動物を宿主とするパラミクソウイルスが齧歯類動物組織から高率に検出された一方、食虫目動物トガリネズミの組織からは、コウモリを自然宿主とする上記のニパウイルスに近縁な新規パラミクソウイルスのゲノムを複数検出された。本研究により、食虫目動物トガリネズミが齧歯類動物とは異なるウイルス感受性を有することが示唆された⁴⁾。

メタゲノム解析による野生動物保有ウイルスの網羅的検索

次世代シーケンサーの普及により、試料中に含まれるウイルスの網羅的検索が可能となった。しかしながら、動物試料から抽出した核酸を直接次世代シーケンサーで解析すると、得

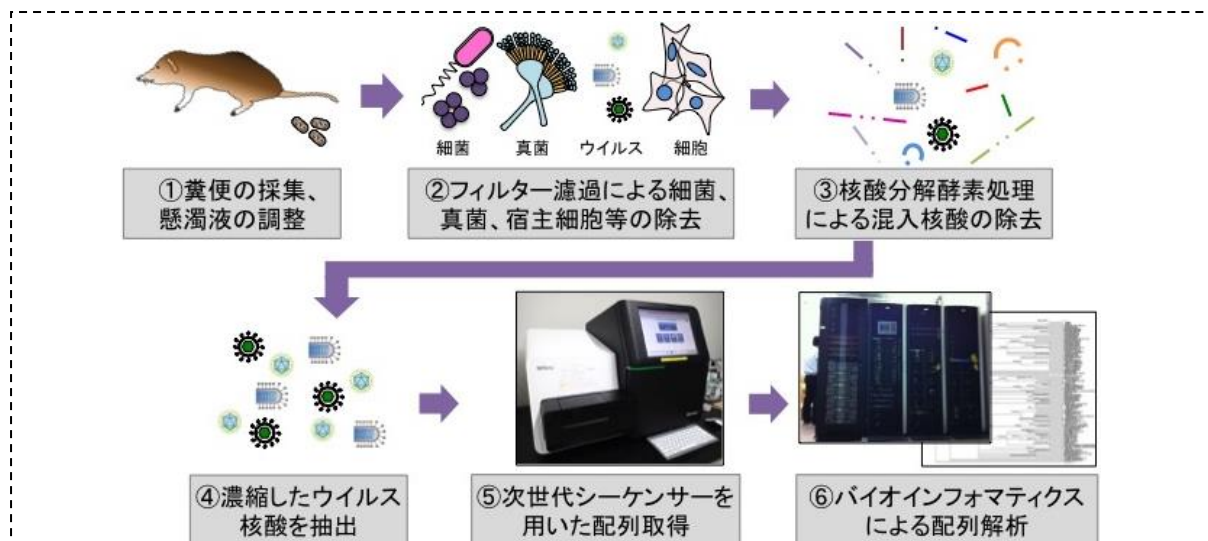


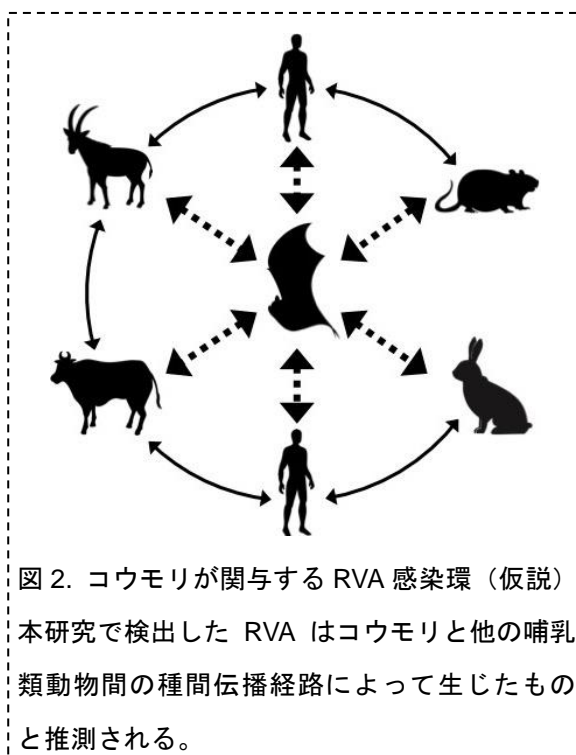
図1. 糞便試料を用いたウイルスメタゲノム解析の概要

ウイルス粒子内のゲノムは構造タンパク質に覆われているため、核酸分解酵素処理に耐性を示す。

られる塩基配列の大部分は動物由来のゲノム DNA やリボソーム RNA で占められる。我々は、動物の糞便懸濁液をフィルター濾過、核酸分解酵素処理することで、試料中のウイルス核酸を選択的に濃縮し、そこから抽出した核酸試料を用いて次世代シーケンサーによる糞便メタゲノム解析を実施した（図 1）。

トガリネズミの糞便メタゲノム解析により、我々はトガリネズミの腸内ウイルス叢を明らかにすると共に、ヒトの急性腸炎や原因不明神経疾患の患者の便または脳脊髄液から検出されたウイルスに類縁の新規ピコルナウイルス、サーコウイルス、パルボウイルスを検出した⁵⁾。このうち、ヒトブファウイルスと近縁な新規パルボウイルスに着目し、さらに研究を進めた。ヒトブファウイルスは、2012 年に発見され、以降アフリカ、ヨーロッパ、アジアにおいて、下痢症を呈した小児や成人患者の糞便中から相次いで検出されたパルボウイルスである。ヒトブファウイルスの病原性は現在のところ不明であるが、下痢症を呈した患者からのみ本ウイルスの遺伝子が検出されることから、本ウイルスとヒト下痢症の関連が強く疑われている。トガリネズミに加えて、他の野生動物種を検索した結果、ヒヒ、コウモリからもヒトブファウイルスに近縁のパルボウイルスが検出され、野生動物がヒトブファウイルスの近縁ウイルスを保有していることが判明した^{6,7)}。さらに、検出したコウモリ由来パルボウイルスのゲノムに、ブタパルボウイルス、及びサルパルボウイルスと相同な領域を見出し、過去にこれらの動物間でパルボウイルスの種間伝播が発生したことが示唆された⁷⁾。

ザンビアの洞窟に生息する食虫コウモリの糞便メタゲノム解析を実施し、A 群ロタウイルス (RVA) を検出した。過去にコウモリから検出された RVA 株は他動物由来株とは遠縁であり、コウモリ種特異的な RVA 株であると考えられている。しかしながら、我々が検出した RVA は、全 11 分節のうち 6 分節はヒト臨床株の分節と 96-99% の塩基配列同一性を示し、残りの 5 分節は家畜や野生動物由来株と近縁であった。本結果は、コウモリがヒトと同じ遺伝子型の RVA に感受性を有しており、種間伝播と遺伝子再集合 (リアソータント) による RVA の遺伝的多様性獲得に関与していることを示唆している (図 2)⁸⁾。



おわりに

人獣共通感染症の発生において、野生動物、産業動物が自然宿主や媒介動物として重要な役割を担う。次世代シーケンサーの普及により、これまで認識されていなかった膨大な数

のウイルスが哺乳類動物の体内で維持されていることが明らかになってきた。今後も、様々な解析手法を駆使して動物が保有するウイルスの研究を継続し、ウイルスの生活環、起源、多様性の解明、及びウイルス性人獣共通感染症の予防と制圧に資する研究を継続していきたい。

謝辞

本賞の受賞にあたり、北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター、鈴木定彦教授に御推薦を頂きました。また、本研究を遂行するにあたり、北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター分子病態・診断部門、澤洋文教授、木村享史准教授（現北海道大学大学院獣医学研究科教授）に御指導、御支援を頂きました。動物試料の採集と解析では、北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター、ザンビア大学、インドネシアボゴール農業大学の共同研究者の皆様大変お世話になりました。この場をお借りして御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Sasaki M. *et al.*: Isolation and characterization of a novel alphaherpesvirus in fruit bats. *J Virol* 88(17): 9819-9829 (2014)
- 2) Sasaki M. *et al.*: Human parainfluenza virus type 3 in wild nonhuman primates, Zambia. *Emerg Infect Dis* 19(9): 1500-1503 (2013)
- 3) Sasaki M. *et al.*: Molecular detection of a novel paramyxovirus in fruit bats from Indonesia. *Virology* 459: 240 (2012)
- 4) Sasaki M. *et al.*: Molecular epidemiology of paramyxoviruses in Zambian wild rodents and shrews. *J Gen Virol* 95(Pt 2): 325-330 (2014)
- 5) Sasaki M. *et al.*: Metagenomic analysis of the shrew enteric virome reveals novel viruses related to human stool-associated viruses. *J Gen Virol* 96(Pt 2): 440-452 (2015)
- 6) Sasaki M. *et al.*: Distinct lineages of bufavirus in wild shrews and nonhuman primates. *Emerg Infect Dis* 21(7): 1230-1233 (2015)
- 7) Sasaki M. *et al.*: Divergent bufavirus harboured in megabats represents a new lineage of parvoviruses. *Sci Rep* 6: 24257 (2016)
- 8) Sasaki M. *et al.*: Multi-reassortant G3P[3] group A rotavirus in a horseshoe bat in Zambia. *J Gen Virol* 97(10): 2488-2493 (2016)