

2. ザンビア, インドネシアにおける野生動物が保有する DNA ウイルスの探索

澤 洋文^{1,2)}, 佐々木 道仁¹⁾, 大場 靖子¹⁾

1) 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

2) 北海道大学 国際連携研究教育局

人獣共通感染症は自然界にその原因微生物が存在していることから、根絶することは不可能と考えられる。それ故、その発生を予測し、流行を防止する先回り戦略をとることが重要である。先回り戦略をとるために、病原微生物の起源と自然界における存続のメカニズム、伝播と侵入の経路および感染、発症と流行に関与する諸要因を明らかにする必要がある。

我々のチームは、検査体制、医療体制が不十分であり、感染症対策の支援を必要としているザンビア、およびインドネシアにおいて、野生動物が保有するウイルスを対象とした疫学研究を推進している。本稿では、両国との共同研究により得られた研究結果の内、DNA ウイルスであるオルソポックスウイルス、ポリオーマウイルス、ヘルペスウイルスを対象とした研究について得られた結果を紹介する。

1. はじめに

近年、インフルエンザ、中東呼吸器症候群 (MERS)、サル痘等のウイルス性疾患、結核、炭疽、薬剤耐性細菌感染症等の細菌性疾患、トリパノゾーマ等の原虫性感染症等の新興・再興感染症が世界各地で発生し、人類社会を脅かしている。これらはすべて自然界の野生動物に寄生し、被害をおよぼさずに存続してきた微生物が、時に家畜、家禽そしてヒトに侵入、伝播してひきおこす人獣共通感染症である。近年の著しい地球環境の変化は、自然宿主の生態と行動圏を攪乱し、野生生物と人間社会の境界消失をもたらした。また地球温暖化の影響は感染症の発生にも影響を与えており、2017年11月にLancet誌に掲載された、“The

Lancet Countdown on health and climate change”では世界保健機関 (WHO) が定義した媒介生物の“vectorial capacity” (媒介能) をデングウイルスの媒介蚊であるネッタシマカとヒトスジシマカで観察した場合1990年から2015年までの期間で2015年が最高の値を示すことが報告された。この事実はデング熱の症例が1990年から10年ごとに倍増している事実とも合致しており、実際2013年には明らかなデング熱の症例は5,840万人で、死亡例は10,000人以上、114万人が後遺症に悩んでいるという報告が出ている¹⁾。この様に、病原体が家畜、家禽と人に伝播する機会が増え、人獣共通感染症の多発を招いている。さらに貿易のグローバル化とボーダーレスの国際交流が進み、食肉、飼料、野生動物やペットの輸入と旅行者の増加に伴って、人獣共通感染症の病原微生物が日本に侵入する危険度はますます高まっている。

人獣共通感染症は、その病原微生物が自然界に由来するので、これらを根絶することは不可能である。その発生を予測し、流行を防止する先回り戦略によって初めて克服が可能となる。そのためには、病原微生物の起源と自然界における存続のメカニズム、伝播と侵入の経路および感染、発症と流行に関与する諸要因を明らかにしなければならない。さらに、人獣共通感染症の克服に向け、世界最先端基礎研究、新規予防・治療法の開発と実用化および実験室と

連絡先

〒001-0020

北海道札幌市北区北20西10

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

TEL: 011-706-5185

FAX: 011-706-7370

E-mail: h-sawa@czc.hokudai.ac.jp

臨床現場の協働を強力に推進するとともに、世界における人獣共通感染症の発生と流行を予測して、その防止を図る対策を確立することが、喫緊の国家・国際課題である。自然界の微生物の検出技術、宿主域、生態、病原性、および感染症の発生予測と予防・制圧方法を総括的に研究開発する組織を構築する必要がある。医学研究・教育の目的はヒトの健康保持・増進であり、獣医学のそれは、家畜、家禽、蜜蜂、魚とペット動物の病気の予防・治療である。行政では、人の医療と公衆衛生は厚生労働省、国際的にはWHOの、家畜、家禽の伝染病予防は農林水産省、OIEおよびFAOの管轄下にある。すなわち、人獣共通感染症は研究教育および行政の何れにおいても狭間にあり、人獣共通感染症の包括的な研究・教育および対策を実施するための基盤が無い。人獣共通感染症の予防と制圧に向けた研究と対策を推進できる人材も極めて少ない。斯かる状況で人獣共通感染症が発生した場合、適切な制圧対策を執ることができずに、取り返しのつかない事態を招く恐れがある。人獣共通感染症対策はヒト、家畜および野生動物を包括して対象とする。

人獣共通感染症の先回り予防対策は、自然界野生動物宿主を特定し、伝播経路を解明してはじめて可能となる。医学、獣医学、薬学、農学と情報科学を基盤とする微生物学、免疫学、動物生態学、数理生物学と危機管理学を融合させた新分野を創成し、先回り戦略を展開する必要がある。上記の目的を達成するためには、感染症の主要な発生母地であるアフリカ、東南アジア等の地域での疫学調査が重要な意味を持つ。

2. ザンビア大学、インドネシア ボゴール農業大学との共同研究

ザンビアはアフリカの南部中央に位置しており、面積は日本の約2倍(75.2万平方km)、人口は日本の約1/10(1,347万人)である。ザンビア共和国には73の部族が共存しているが、内政は独立以来安定している。主な産業はトウモロコシ等を主とする農業、銅鉱業、観光等である。ザンビアでは人獣共通感染症が発生・流行しているが、ザンビア国内の検査体制が不十分であること、及び人材の慢性的な不足から、得られる情報が不足しており、感染症対策の支援を必要としている。

首都のルサカにザンビア最大規模のザンビア大学があり、学生数は約1万人である。北海道大学獣医学部とザンビア大学獣医学部の交流は、日本の無償資金協力により、獣医学部が設立された1985年から継続している。ザンビア共和国を中心とした南部アフリカにおける人獣共通感染症病原体の疫学調査のための活動拠点として、新興・再興感染症研究拠点形成プログラムの支援を受けて、2007年にはザンビア大学獣医学部と人獣共通感染症リサーチセンター間にMemorandum of Understanding (MOU)が締

結されて、同年にザンビア大学獣医学部内に人獣共通感染症リサーチセンター ザンビア拠点(Hokudai Center for Zoonosis Control in Zambia: HUCZCZ)が開設された。本拠点はBSL-3およびBSL-2の実験室を備えており、病原体を安全に取り扱うことが可能であり、ザンビア国内のフィールドにおいてサンプリングを実施し、PCR法やLAMP法等の分子生物学的手法を用いて、野生動物および家畜が保有する既知・未知の病原体を検索し、人獣共通感染症の先回り対策に貢献している。筆者が所属する北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター分子病態・診断部門は精力的に疫学活動を推進し、また、筆者はこれまでに50回以上ザンビア共和国を訪問して、多くの既知・未知のウイルスを検出・単離している。

インドネシアは1万3400以上の島からなり、面積が人口の約5倍(191.9万平方km)、人口は日本の約2倍(2億5,700万人)である。インドネシアでも人獣共通感染症が流行しているが、医療従事者数が不足しており、ザンビアと同様に感染症対策が重要な課題である。インドネシアの野生動物からは人獣共通感染症の原因となるニパウイルスが検出されており^{2,3)}、またテレメトリー解析により、インドネシアには、ニパウイルス発生国のマレーシアや⁴⁾、ヘンドラウイルス発生国のオーストラリアからコウモリの移入があることが明らかとなっており⁵⁾、コウモりを介した病原体侵入リスクの研究に適した地域である。

インドネシアのボゴール農業大学はボゴール市に位置する1963年9月に設置された国立大学であり、学生数は約28,800人である⁶⁾。人獣共通感染症リサーチセンター分子病態・診断部門では、2010年にボゴール農業大学獣医学部と人獣共通感染症リサーチセンター間で締結したMOUに基づいて、コウモリ等を対象としたウイルスの疫学調査を実施している。これまでに、パラミクソウイルス⁷⁾、コロナウイルス⁸⁾、ポリオーマウイルス⁹⁾、ブファウイルス¹⁰⁾等のウイルスを検出して報告してきた。また、北海道大学は2012年4月にザンビア大学獣医学部内にルサカオフィスを設置し、さらにインドネシア共和国ボゴール農業大学ダルマガキャンパスに、2017年6月にインドネシアリエゾンオフィスを設置している。これらの海外オフィスでは、情報の収集及び提供、入学試験の広報、本学から派遣する留学生の支援、大学院等の入学に係る面接試験等の実施、大学との学術交流及び連携の支援、学生の就職活動の支援、産学官連携活動の支援をその業務内容として、国際連携の強化を目指している¹¹⁾。

3. DNAウイルスを対象とした疫学調査

DNAウイルスであるサル痘は、現在でもアフリカで流行が続いており、2016年8月には中央アフリカ共和国で患者26人と死亡者2人によるサル痘の集団感染が発生した¹²⁾。現在の段階ではサル痘については、リス、サル、げっ

ウイルス	宿主
天然痘ウイルス	ヒト
牛痘（ワクシニア）	ヒト、水牛、ウシ、ゾウ、ブタ、ウサギ等
バッファロー痘ウイルス	水牛、ウシ、ヒト
サル痘ウイルス	ヒト、サル、類人猿、げっ歯類動物、プレーリードッグ等
牛痘ウイルス	ヒト、ネコ、ウシ、ゾウ、げっ歯類動物、サイ等
ラクダ痘ウイルス	ラクダ
エクトロメリアウイルス	マウス
アライグマ痘ウイルス	アライグマ
ハタネズミ痘ウイルス	ハタネズミ、マウス

図1 オルソポックス属のウイルスの種類とその宿主（参照文献19の図を改変）

歯類動物等がその自然宿主と考えられているが、感染経路については未だ不明な点が多い¹³⁾。また、同様にDNAウイルスであるアルファヘルペスウイルスに属するBウイルスは、ヒトに感染する単純ヘルペスウイルス（HSV-1,2）と類似している。本ウイルスは、マカク属のサルに感染しているが、ヒトに感染すると致死性の脳炎を惹起する人獣共通感染症である¹⁴⁾。最近の報告では、フランス領ギアナのアマゾン川流域で採集した吸血コウモリ（*Desmodus rotundus*）と食虫コウモリ（*Molossus molossus*）の唾液腺と糞便を用いて実施したメタゲノム解析により、14種類の哺乳類動物に感染するウイルスが確認されている。両種のコウモリの検体から確認されたウイルスゲノムの断片の中では、DNAウイルスが多く確認されており、食虫コウモリからは、ヘルペスウイルス、パピローマウイルス、サーコウイルス科のウイルスが多く検出され、特に唾液腺からは主にヘルペスウイルスが検出された¹⁵⁾。

本稿では我々のチームが実施したDNAウイルスを対象とした疫学調査の結果の一部について紹介する。

オルソポックスウイルス

オルソポックスウイルスはFamily: *Poxviridae*, Subfamily: *Chordopoxvirinae*, Genus: *Orthopoxvirus* に属する¹⁶⁾。ヒトの天然痘はオルソポックスウイルス（OPXV）に属する天然痘ウイルスによるウイルス感染症である。1970年代のWHOの防疫対策とワクチンの普及により、1980年にWHOが天然痘根絶宣言を発した¹⁷⁾。現在までに、天然痘は人間に感染する感染症で人類が根絶できた唯一の例である。OPXVは250 x 200 nm程度の大きさを有するレンガ型のエンベロープウイルスであり、170-250 kbの二本鎖DNAをゲノムとして有する¹⁸⁾。OPXVは他のDNAウイルスとは異なって、感染細胞の細胞質で複製する。また、

OPXVは多くの種類が有り、また種々の宿主に感染し、ヒトに感染するOPXVも多い（図1）¹⁹⁾。

サル痘は動物からヒトへの感染を起こす人獣共通感染症であり、デンマークのコペンハーゲンの動物施設で最初に発見された。本施設はポリオワクチンの研究を実施するためにサルが常時供給されており、小水泡膿泡性の皮膚症状を呈しているが、全身状態はそれ程悪くない症状を有する感染症の発症が認められた。サル痘は感染したサルの膿泡から鶏卵を用いて単離され、天然痘に類似したウイルスであることが1958年に発見され翌年報告された²⁰⁾。米国でもカニクイザルでサル痘の感染が1959年および1962年に発生した^{20, 21)}。1964年にはオランダのロッテルダム動物園で、オオアライクイ、オランウータン、ゴリラ、チンパンジー、テナガザル、リスザル、コモンマーモセットでのサル痘の感染が確認された²⁰⁾。また、2003年にはガーナから輸入されたげっ歯類動物と接触したプレーリードッグを介して30名のヒトへのサル痘の感染が米国のイリノイ、インディアナ、ウィスコンシンで報告された^{20, 22)}。これはアフリカ以外での初めてのヒトでのサル痘の感染に関する報告であった。

最近でもサル痘のアウトブレイクはアフリカで散発しており、スーダンでは2005 - 2006年にかけて、49例（内、確定例：10例、非常に疑わしい例：9例、疑い例：30例）のサル痘が報告された²³⁾。コンゴ民主共和国では2013年に104例のサル痘罹患者が報告され、内10名が死亡した²⁴⁾。また中央アフリカ共和国では2016年9月から10月にかけて、26名のサル痘の症例が確認されている²⁵⁾。2017年に入ってから、ナイジェリアで4名、コンゴ共和国で84名（内5名が死亡）のサル痘疑いの症例が報告されている²⁶⁾。

これまでにサル痘の報告はザンビアでは認められていなかったが、我々の研究チームはザンビアがコンゴ民主共和

動物	年	地域	数	OPXV ELISA		OPXV PCR positive (n)
				positive (n)	positive (%)	
Vervet Monkey	2009	Mfuwe	50	0	0	0
	2010 -2011	Livingstone	38	0	0	0
Yellow Baboon	2009	Mfuwe	50	0	0	0
Chacma Baboon	2010 -2011	Livingstone	50	4	8.0	0
Monkeys total			188	4	2.1	
Rodent	2012	Lusaka	5	0	0	0
	2012	Mpulungu	48	7	14.6	0
	2012	Namwala	63	13	20.6	0
	2013	Solwezi	70	7	10.0	0
	2013	Mazabuka	73	11	15.1	0
	Rodent total			259	38	14.7
Shrew	2012	Mpulungu	20	6	30.0	0
	2012	Namwala	2	1	50.0	0
	2013	Solwezi	16	7	43.7	0
	2013	Mazabuka	4	0	0	0
	Shrew total			42	14	33.3

図2 ワクシニアウイルスを抗原とした ELISA を用いて OPXV に対する IgG 抗体価を測定した結果と OPXV に保存されている OPXV *rpo18* 遺伝子をターゲットとした Real-time PCR 法による結果のまとめ (参照文献 27 の Table 1 を改変)

国に接していることも有り、先回り対策を講ずるために、ザンビア国内での野生動物の OPXV の感染状況の調査を実施した²⁷⁾。

図2に示す様に、ワクシニアウイルスのタンパク質を抗原として用いた ELISA により、ザンビアの野生動物血清における抗 OPXV 抗体 (IgG) を検出した結果、vervet monkey, baboon からの 188 検体中、Chacma baboon (*Papio ursinus*) からの 4 検体に陽性所見を認めた²⁷⁾。また、げっ歯類動物から採集した 259 検体中、Gambian pouched rat (*Cricetomys gambianus*) 1 検体 (5 検体中)、tiny fat mice (*Steatomys parvus*) 4 検体 (5 検体中)、natal multimammate mouse (*Mastomys natalensis*) 33 検体 (173 検体中)、総計 38 検体 (188 検体中) に陽性所見を認めた。げっ歯類動物の陽性例においては、採集地域による陽性率の差異は認められなかった。一方、食虫目の Shrews (*Crocidura* spp.) では 14 検体 (42 検体中) で陽性であった。さらに種々の OPXV の遺伝子を 10 コピーまで検出可能な Real-time PCR 法を用いて、全ての検体から OPXV のゲノムの検出を試みたが、全 489 検体中において、Real-time PCR 陽性例は認められなかった²⁷⁾ (図2)。

我々の研究成果により、ザンビアの野生動物も OPXV に既感染していることが示唆され、ザンビアにおいても他のアフリカの地域と同様に OPXV のヒトへの感染が生じる可能性が考えられたため、野生動物への接触に留意する必要性をザンビア大学を介して、ザンビア政府に報告した。

ポリオーマウイルス

ポリオーマウイルスは Family: *Polyomaviridae* に属し、Genus: *Alphapolyomavirus*, *Betapolyomavirus*, *Deltapolyomavirus*, *Gammapolyomavirus* に分類される¹⁶⁾。ポリオーマウイルスの名称は、本ウイルスが腫瘍発生に関わっていると考えられたことから many tumor を意味するギリシア語の poly-, -oma から命名された^{28, 29)}。当初、ポリオーマウイルス属はパピローマウイルス属とともにパポバウイルス科に分類されていた。2000 年にパポバウイルス科がポリオーマウイルス科とパピローマウイルス科に分割された際に、ポリオーマウイルス属はポリオーマウイルス科に分類された。ポリオーマウイルス科に分類されるウイルスは、一般的に自然宿主内でのみ効率良く増殖し、非自然宿主においては感染のサイクルが完全に進行せず腫瘍を形成すると考えられている³⁰⁾。ポリオーマウイルスはエンベロープを持たない、直径 45 - 50 nm の正二十面体構造のウイルス粒子を形成する。そのゲノムは約 5,000 bp 程度の環状二本鎖 DNA である。ゲノム内には複製開始起点 (ori) である転写調節領域 transcriptional control region: TCR もしくは non-coding control region: NCCR と記載されている二方向性のプロモーターが 1 つ存在し、その両側に計 5 - 9 個の転写産物がコードされている³¹⁾。ヒトに感染するポリオーマウイルスには、1971 年に腎移植後の症例の尿から分離された、出血性膀胱炎、ポリオーマウイルス腎症の原因ウイルスである BK ウイルス (BKPyV)³²⁾、中枢神経脱髄疾

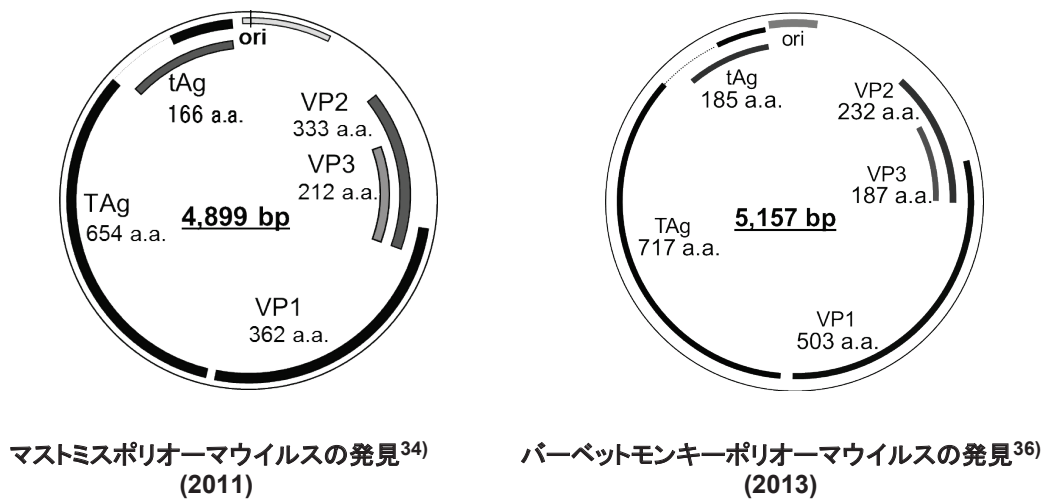


図3 ザンビアで検出した新規ポリオーマウイルスのゲノム全長の図

患である進行性多巣性白質脳症 (Progressive multifocal leukoencephalopathy: PML) を発症し、死亡した 38 歳の男性から 1971 年に分離された JC ウイルス (JCPyV)³³⁾ 等がある。

現在までにヒトを含む種々の動物を自然宿主とするポリオーマウイルスが多数報告されている。我々の研究チームは、ザンビア国内での野生動物のポリオーマウイルスの感染状況の調査を実施した。ザンビアの各地で採集した 100 頭の野生のげっ歯類動物の脾臓から抽出した DNA を用いて、PCR 法を実施し、約 250 bp のポリオーマウイルスのゲノム断片を 1 匹のマストミスの脾臓から検出した。その後、環状 DNA がゲノムであることを利用して inverse PCR 法を実施し、4,899 bp の全ゲノムを検出し、新規ウイルスであることを確認し mastomys polyomavirus (MasPyV) と命名した³⁴⁾ (図 3)。得られたゲノム全長を BHK, Vero 細胞に導入した結果、タンパク質が発現することを確認した。MasPyV の Large T 抗原は pRb には結合したが、SV40 ウイルス、JCPyV とは異なり、p53 に結合しなかった。本結果から MasPyV が感染した際に、p53 によって感染細胞に惹起されるアポトーシスが抑制されないことが予想された^{34, 35)}。ザンビアに生息する野生霊長類動物である vervet monkey (*Chlorocebus pygerythrus*) から、新規のポリオーマウイルスである Vervet monkey PyV-1 (VmPyV-1) のゲノムを単離し、本ウイルスの VP1 のみからなる Virus-like particle (VLP) 合成系を確立した^{36, 37)} (図 3)。

また、洞窟から採集した食虫および食果コウモリから、4 種類の新規のポリオーマウイルスを検出し、全ゲノム配列を確認した。得られたゲノム配列を用いて実施した系統発生解析の結果、4 種類の新規ポリオーマウイルスである、*Miniopterus schreibersii* polyomavirus 1, *Miniopterus*

schreibersii polyomavirus 2 は *Alphapolyomavirus* に属し、*Rhinolophus hildebrandtii* polyomavirus 1, *Rousettus aegyptiacus* polyomavirus 1 は *Betapolyomavirus* に属することが明らかになった³⁸⁾。さらに、得られたゲノム情報と、これまでに報告されているゲノム情報を基にして、Recombination Detection Program (RDP) 等を用いることにより³⁹⁾、ゲノムの組み換えが他の動物 (霊長類動物、コウモリ、ヒト) 由来のポリオーマウイルスとの間で起きていること、このリコンビネーションのブレイクポイントは VP1 と Large T 抗原の間の領域と、VP2/VP3 の 3' であることが示された³⁸⁾。この結果はポリオーマウイルスの進化において、Large T 抗原遺伝子が安定しており、ポリオーマウイルスの分類を Large T 抗原に基づいて実施していることが理にかなっていると考えられた。さらに、Horseshoe Bat に属する *Rhinolophus blasii* と *Rhinolophus simulator* に関して詳細な検索を実施し、脾臓から抽出した DNA から *Rhinolophus blasii* polyomavirus 1, 2 と *Rhinolophus simulator* polyomavirus 1, 2, 3, 4 の 6 種類の新規のポリオーマウイルスを検出した。この内 *Rhinolophus blasii* polyomavirus 2, *Rhinolophus simulator* polyomavirus 1, *Rhinolophus simulator* polyomavirus 3 は *Alphapolyomavirus* に属し、*Rhinolophus blasii* polyomavirus 1, *Rhinolophus simulator* polyomavirus 2, 4 は *Betapolyomavirus* に属することが明らかになった⁴⁰⁾。得られたゲノム情報を基にして、ほぼ同一のポリオーマウイルスが異なった Horseshoe Bat の種類に存在することを見出した。この結果は、RNA ウイルスに比較して安定であると考えられている DNA ウイルスにも、宿主のスイッチングが生じていることを表している。さらにコウモリ以外の他の種においても、宿主のスイッチングが生じている可能性があるということが示唆された⁴⁰⁾。

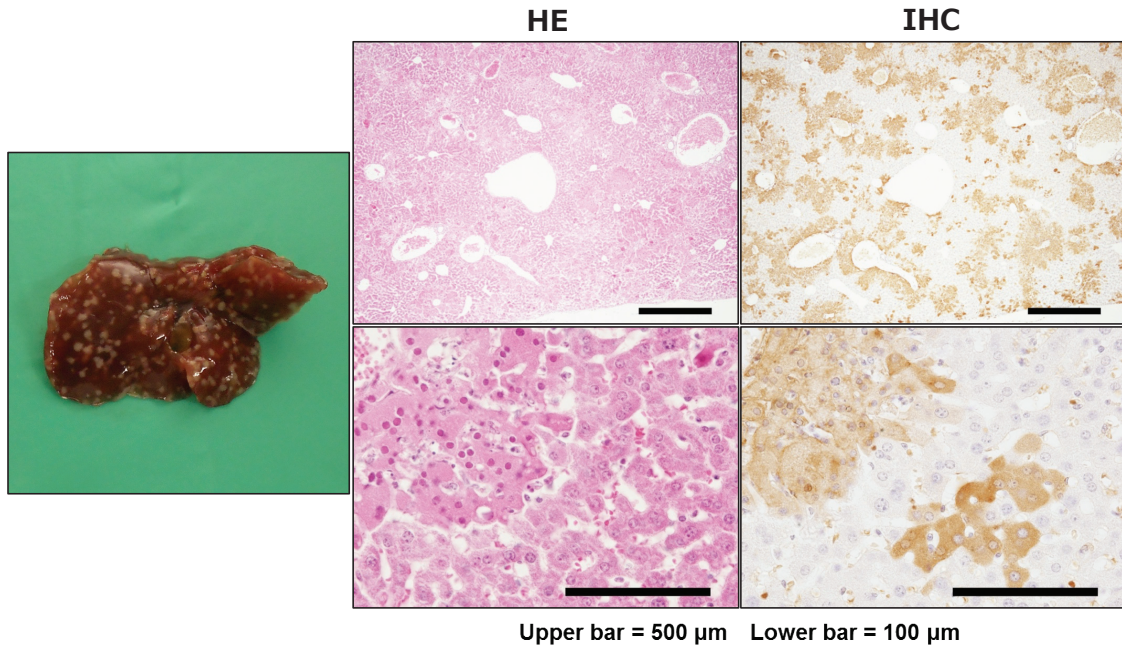


図4 FBAHV1接種による肝臓の傷害の肉眼像，HE染色の弱拡および強拡像，および抗アルファヘルペスウイルス抗体を用いた免疫染色の弱拡および強拡像．肉眼像で肝臓は白色の結節を認め，組織切片上では，肝細胞の多発性巣状壊死が確認．壊死した肝細胞には好酸性の核内封入体が認められ，免疫染色では壊死した部分に抗アルファヘルペスウイルス抗体陽性像を認める．

ヘルペスウイルス

ヘルペスウイルスは Family: *Herpesviridae* に属し， Subfamily: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae*, *Gammaherpesvirinae* に分類される¹⁶⁾．ヘルペスウイルスはヒトを含む哺乳類，鳥類，爬虫類，両生類，魚類，貝類に含まれる多くの動物に感染する．現在100種類以上のヘルペスウイルスが報告されている．典型的なヘルペスウイルスは直径120 - 260 nm位の球状のエンベロープを有する粒子を形成する．粒子内にはテグメントというカプシドの外側に有るタンパク質を有している．そのゲノムは二本鎖DNAであり，120-250 kbpの長さを有している．

これまでに我々の研究チームの報告を含めて，コウモリから7つのヘルペスウイルスが，また，コウモリ由来の細胞から1つのヘルペスウイルスが単離されている．コウモリから単離されたヘルペスウイルスの内訳は，5つはアルファヘルペスウイルスで食果コウモリ，食虫コウモリ，および他のコウモリから単離されている^{41, 42)}．他の2つはベータヘルペスウイルスで食虫コウモリから単離されている^{43, 44)}．食虫コウモリ由来の細胞から単離されたウイルスはガンマヘルペスウイルスであった⁴⁵⁾．

我々の研究チームは，インドネシアの各地域で採集した食果コウモリを細胞に接種して，ウイルスの単離を試みた．その結果，スラウェシ島にて採集したオオコウモリ (*Pteropus sp.*) の脾臓から作成した乳剤を接種した Vero 細胞において細胞変性効果が生じていることを見出した．

次に培養上清中の病原体を同定するために，細胞変性効果を呈した細胞の培養上清を超速心処理により濃縮し RNA を抽出して次世代シーケンサーを用いて塩基配列を解析した結果，HSV-1, 2 のゲノムと homology を有する塩基断片が検出された⁴²⁾．

次に，ウイルス粒子の形状を確認するために，濃縮した検体を用いて，ネガティブ染色を実施し，透過型電子顕微鏡を用いて観察した．その結果，ヘルペスウイルスの特徴を有する，直径100-120 nm のエンベロープを有するウイルス様粒子が観察された⁴²⁾．

さらに，単離したウイルスの全ゲノム配列を決定することを試みた．濃縮した粒子を調整して，DNA を抽出し再度パイロシーケンス法を実施した．その結果，平均長431 bp のリードが122,696 個得られた．コンティグ間のギャップはプライマーウォーキングで埋め，最終的に149,459 bp の全ゲノム配列を確認した⁴²⁾．単離したウイルスは，新規のアルファヘルペスウイルスで有ることが判明したため，fruit bat alphaherpesvirus 1 (FBAHV1) と命名した⁴²⁾．FBAHV1 のコードするゲノムには少なくとも67 個の ORF が存在していた．コードするタンパク質の中で UL15, UL19, UL29 は HSV-1 の其々のタンパク質と80%以上の相同性を有していた．

次に，細胞への感受性を確認するために MOI 0.1 で FBAHV1 の接種実験を実施し，ヒト神経系由来細胞 (IMR-32, SK-N-SH)，ヒト各種癌由来細胞 (A549, HeLa,

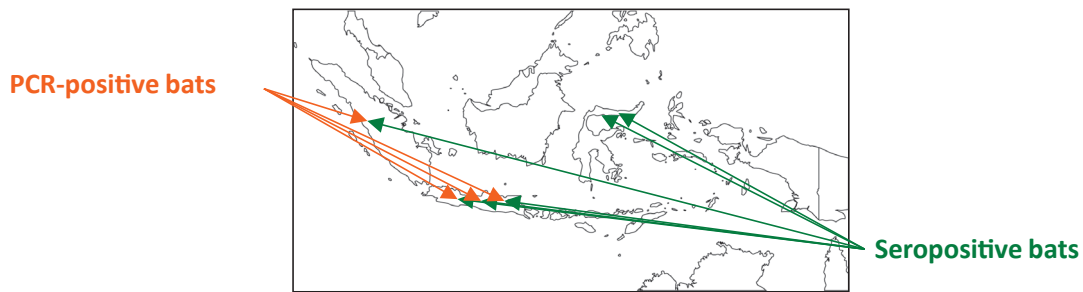


図5 FBAHV1を標的としたPCR法で陽性、および中和抗体陽性例が検出された地域。

Huh-7, HepG2)に感染すること、さらに、HSV-1非感受性であるチャイニーズハムスター腎臓由来細胞(CHO-K1)に感染性を示すことを確認した⁴²⁾。

マウスへの感染性を確認するために、 10^5 PFUのFBAHV1をBALB/cマウスに経鼻接種したところ、接種後6日目の死亡率は100%であった。同様のウイルス量を腹腔内接種で実施した結果、接種後9日目でFBAHV1の死亡率は100%であった。FBAHV1接種後の臓器の肉眼所見で、肝臓は白色の結節を認め、病理組織学的解析の結果、肝細胞の多発性巣状壊死が生じており、壊死している細胞は抗アルファヘルペスウイルス抗体陽性である事を確認した⁴²⁾(図4)。

さらに、スラウェシ島、ジャワ島、およびスマトラ島で採取した計133例のオオコウモリの脾臓DNAと血清サンプルを用いて、UL19遺伝子ホモログを特異的に増幅するプライマーセットを用いたPCR法と中和試験によるスクリーニングを実施した結果、133例中12例よりFBAHV1の遺伝子断片が検出された。また、血清採取が可能であった104例のうち、44例が中和抗体陽性を示した⁴²⁾(図5)。

以上、我々のチームは、インドネシアのオオコウモリの脾臓からHSV-1に近縁な新規アルファヘルペスウイルス(FBAHV1)を単離し、感染実験の結果として、FBAHV1がマウスに対し病原性を有することを証明した。また、血清学的検索によりスラウェシ、ジャワ、スマトラの3島に生息する、4種類のオオコウモリにFBAHV1に対する中和抗体陽性例を認めたことから、FBAHV1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⁴²⁾。

4. まとめと今後の展望

本稿では、我々のチームが推進している感染症発生の予測、流行を防止する先回り戦略をとることを目的とした、ザンビア、およびインドネシアでのウイルスを対象とした疫学研究で得られた結果の一部を紹介した。我々のチームは今後もザンビア、およびインドネシアを中心とした国際研究・教育ネットワークを活用して、国際社会の公衆衛生に貢献すべく活動を続けていく予定である。

現在は、2010年10月に愛知県名古屋市で開催された生

物多様性条約第10回締約国会合(COP10)において、Access and Benefit-Sharing(ABS)の着実な実施を確保するための手続きを定める国際文書として、「生物の多様性に関する条約の遺伝資源の取得の機会及びその利用から生ずる利益の公正かつ衡平な配分に関する名古屋議定書(名古屋議定書)」が採択されており⁴⁶⁾、ABS指針は、2017年8月20日に、名古屋議定書の国内発効と同時に施行された。本指針においては、1)各国は、自国の天然資源に対して主権的権利を持ち、遺伝資源への取得の機会(アクセス)について定める権限は、当該遺伝資源が存する国の政府に属する。遺伝資源にアクセスする際は、提供国の国内法令に従うこと、2)遺伝資源にアクセスするには、提供国政府による「情報に基づく事前の同意(Prior and informed consent: PIC)」と、提供者との間の「相互に合意する条件(mutually agreed terms: MAT)」の設定が必要となる。3)締約国は、遺伝資源の利用から生ずる利益を提供国との間で公正かつ衡平に配分するための措置をとる。その配分は、MATに従うことが要求されている。国際共同研究における疫学的研究においてもABS指針を良く理解して、適切なプロセスをとった後に、実施することが必要とされる。各国の情報交換センターであるABS Clearing-House(ABSCH)の情報はwebsiteで確認できる⁴⁷⁾。

我々の研究チームは、本稿で紹介した野生動物が保有するDNAウイルスの探索を目的とした疫学研究の他にも、塩野義製薬との共同研究による人獣共通感染症に対する抗ウイルス薬の創薬研究、他の共同研究者との連携によるウイルス性感染症の診断法の開発研究、さらにはウイルス性疾患の病原性の発現機構の解明、内在性ウイルスの機能解明等の基礎研究を推進している。現在実施している地道な研究によって得られる結果が、人獣共通感染症の克服に繋がる様、これからも努力を続けて行きたい。

本稿に関連し、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

参考文献

- 1) Watts N, Adger WN, Ayeb-Karlsson S, Bai Y, Byass P, Campbell-Lendrum D, Colbourn T, Cox P, Davies M, Depledge M1, Depoux A, Dominguez-Salas P, Drummond P, Ekins P, Flahault A, Grace D, Graham H, Haines A, Hamilton I1, Johnson A, Kelman I, Kovats S, Liang L, Lott M, Lowe R, Luo Y, Mace G, Maslin M, Morrissey K, Murray K, Neville T, Nilsson M, Oreszczyn T, Parthemore C, Pencheon D, Robinson E, Schütte S, Shumake-Guillemot J, Vineis P, Wilkinson P, Wheeler N, Xu B, Yang J, Yin Y, Yu C, Gong P, Montgomery H, Costello A.: The Lancet Countdown: tracking progress on health and climate change: from 25 years of inaction to a global transformation for public health. *Lancet*. 389(10074):1151-1164, 2017.
- 2) Sendow I, Field HE, Adjid A, Ratnawati A, Breed AC, Darminto, Morrissy C, Daniels P.: Screening for Nipah virus infection in West Kalimantan province, Indonesia. *Zoonoses Public Health*. 57(7-8):499-503, 2010
- 3) Sendow I, Ratnawati A, Taylor T, Adjid RM, Saepulloh M, Barr J, Wong F, Daniels P, Field H.: Nipah virus in the fruit bat *Pteropus vampyrus* in Sumatera, Indonesia. *PLoS One*. 22;8(7):e69544, 2013.
- 4) Epstein JH, Olival KJ, Pulliam JR, Smith C, Westrum J, Hughes T, Dobson AP, Zubaid A, Rahman SA, Basir MM, Field HE, Daszak P.: *Pteropus vampyrus*, a hunted migratory species with a multinational home-range and a need for regional management. *J Appl Ecol*.;46: 991-1002, 2009.
- 5) Breed AC, Field HE, Smith CS, Edmonston J, Meers J.: Bats without borders: long-distance movements and implications for disease risk management. *Ecohealth*. 7(2):204-212, 2010.
- 6) <http://humas.ipb.ac.id/filebox/17/16082214074813%20d.%20data%20statistika%20ipb%20secara%20umum.pdf>
- 7) Sasaki M, Setiyono A, Handharyani E, Rahmadani I, Taha S, Adiani S, Subangkit M, Sawa H, Nakamura I, Kimura T.: Molecular detection of a novel paramyxovirus in fruit bats from Indonesia. *Viol J*. 19;9:240, 2012.
- 8) Anindita PD, Sasaki M, Setiyono A, Handharyani E, Orba Y, Kobayashi S, Rahmadani I, Taha S, Adiani S, Subangkit M, Nakamura I, Sawa H, Kimura T.: Detection of coronavirus genomes in Moluccan naked-backed fruit bats in Indonesia. *Arch Virol*. 160(4):1113-1118, 2015.
- 9) Kobayashi S, Sasaki M, Nakao R, Setiyono A, Handharyani E, Orba Y, Rahmadani I, Taha S, Adiani S, Subangkit M, Nakamura I, Kimura T, Sawa H.: Detection of novel polyomaviruses in fruit bats in Indonesia. *Arch Virol*. 160(4):1075-1082, 2015.
- 10) Sasaki M, Gonzalez G, Wada Y, Setiyono A, Handharyani E, Rahmadani I, Taha S, Adiani S, Latief M, Kholilullah ZA, Subangkit M, Kobayashi S, Nakamura I, Kimura T, Orba Y, Ito K, Sawa H.: Divergent bufavirus harboured in megabats represents a new lineage of parvoviruses. *Sci Rep*. 26;6:24257, 2016.
- 11) <https://www.hokudai.ac.jp/international3/internationalization/overseasoffices/indonesia/>
- 12) <http://www.forth.go.jp/moreinfo/topics/2016/12121125.html>
- 13) Parker S, Nuara A, Buller RM, Schultz DA.: Human monkeypox: an emerging zoonotic disease. *Future Microbiol*. 2(1):17-34, 2007.
- 14) Elmore D, Eberle R.: Monkey B virus (Cercopithecine herpesvirus 1). *Comp Med*. 58(1):11-21, 2008.
- 15) Salmier A, Tirera S, de Thoisy B, Franc A, Darcissac E, Donato D, Bouchier C, Lacoste V, Lavergne A.: Virome analysis of two sympatric bat species (*Desmodus rotundus* and *Molossus molossus*) in French Guiana. *PLoS One*. ;12(11):e0186943, 2017.
- 16) Virus Taxonomy: 2016 Release: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
- 17) WHO Global Commission for the Certification of Smallpox Eradication, editor. The Global Eradication of Smallpox. Final Report of the Global Commission for the Certification of Smallpox Eradication, Geneva, 1979. Geneva: WHO; 1980.
- 18) ViralZone: http://viralzone.expasy.org/149?outline=all_by_species
- 19) Pauli G, Blümel J, Burger R, Drosten C, Gröner A, Gürtler L, Heiden M, Hildebrandt M, Jansen B, Montag-Lessing T, Offergeld R, Seitz R, Schlenkrich U, Schottstedt V, Strobel J, Willkommen H, von König CH.: Orthopox viruses: Infections in humans. *Transfus Med Hemother*. 37(6):351-364, 2010.
- 20) Parker S, Buller RM.: A review of experimental and natural infections of animals with monkeypox virus between 1958 and 2012. *Future Virol*. 8(2):129-157, 2013.
- 21) Mcconnell SJ, Herman YF, Mattson DE, Erickson L.: Monkey pox disease in irradiated cynomolgous monkeys. *Nature*. 195:1128-1129, 1962.
- 22) CDC Update: multistate outbreak of monkeypox - Illinois, Indiana, and Wisconsin, 2003. *Mort. Morb. Wkly Rep*. 52(23):537-540, 2003.
- 23) Formenty P, Muntasir MO, Damon I, Chowdhary V, Opoka ML, Monimart C, Mutasim EM, Manuguerra JC, Davidson WB, Karem KL, Cabeza J, Wang S, Malik MR, Durand T, Khalid A, Rioton T, Kuong-Ruay A, Babiker AA, Karsani ME, Abdalla MS.: Human monkeypox outbreak caused by novel virus belonging to Congo Basin clade, Sudan, 2005. *Emerg Infect Dis*. 16(10):1539-1545, 2010.
- 24) Nolen LD, Osadebe L, Katomba J, Likofata J, Mukadi D, Monroe B, Doty J, Hughes CM, Kabamba J, Malekani J, Bomponda PL, Lokota JI, Balilo MP, Likafi T, Lushima RS, Ilunga BK, Nkawa F, Pukuta E, Karhemere S, Tamfum JJ, Nguete B, Wemakoy EO, McColum AM, Reynolds MG.: Extended Human-to-Human Transmission during a Monkeypox Outbreak in the Democratic Republic of the Congo. *Emerg Infect Dis*. (6):1014-1021, 2016.
- 25) Emergencies preparedness, response, Monkeypox in Central African Republic, Disease outbreak news: WHO, <http://www.who.int/csr/don/13-october-2016-monkeypox-caf/en/>, 2016

- 26) Weekly bulletin on outbreaks and other emergencies, Week 39: 23-29 September 2017, WHO <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/259084/1/OWE39-232992017.pdf>
- 27) Orba Y, Sasaki M, Yamaguchi H, Ishii A, Thomas Y, Ogawa H, Hang'ombe BM, Mweene AS, Morikawa S, Saijo M, Sawa H.: Orthopoxvirus infection among wildlife in Zambia. *J Gen Virol.* 96 (Pt 2):390-394, 2015.
- 28) Maginnis MS, Atwood WJ.: JC virus: an oncogenic virus in animals and humans?. *Semin Cancer Biol* 19: 261-269, 2009.
- 29) Eddy BE, Stewart SE, Berkeley W.: Cytopathogenicity in tissue culture by a tumor virus from mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 9: 848-851, 1958.
- 30) 鈴木 忠樹, 大場 靖子, 澤 洋文: ポリオーマウウイルス科, pp 639 - 646, 病原細菌・ウイルス図鑑 (新居 志郎, 倉田 毅, 林 英生, 本田 武司, 小田 紘, 松本 明), 北海道大学出版会, 札幌, 日本
- 31) Knipe DM, Howley PM.: 2013, *Fields Virology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA
- 32) Gardner SD.: New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* 1: 1253-1257, 1971.
- 33) Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH.: Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Lancet* 1: 1257-1260, 1971.
- 34) Orba Y, Kobayashi S, Nakamura I, Ishii A, Hang'ombe BM, Mweene AS, Thomas Y, Kimura T, Sawa H.: Detection and characterization of a novel polyomavirus in wild rodents. *J Gen Virol.* 92(Pt 4):789-795, 2011.
- 35) 澤 洋文, 小林 進太郎, 鈴木 忠樹, 大場 靖子: ポリオーマウウイルスの疫学研究と基礎研究, *ウイルス*. 64(1): pp 25-34, 2014
- 36) Yamaguchi H, Kobayashi S, Ishii A, Ogawa H, Nakamura I, Moonga L, Hang'ombe BM, Mweene AS, Thomas Y, Kimura T, Sawa H, Orba Y.: Identification of a novel polyomavirus from vervet monkeys in Zambia. *J Gen Virol.* 94(Pt 6):1357-1364, 2013.
- 37) Yamaguchi H, Kobayashi S, Maruyama J, Sasaki M, Takada A, Kimura T, Sawa H, Orba Y.: Role of the C-terminal region of vervet monkey polyomavirus 1 VP1 in virion formation. *J Vet Med Sci.* 76(5):637-644, 2014.
- 38) Carr M, Gonzalez G, Sasaki M, Ito K, Ishii A, Hang'ombe BM, Mweene AS, Orba Y, Sawa H. Discovery of African bat polyomaviruses and infrequent recombination in the large T antigen in the Polyomaviridae. *J Gen Virol.* 98(4):726-738, 2017.
- 39) Martin DP.: Recombination detection and analysis using RDP3. *Methods Mol Biol* 537:185-205, 2009.
- 40) Carr M, Gonzalez G, Sasaki M, Dool SE, Ito K, Ishii A, Hang'ombe BM, Mweene AS, Teeling EC, Hall WW, Orba Y, Sawa H.: Identification of the same polyomavirus species in different African horseshoe bat species is indicative of short-range host-switching events. *J Gen Virol.* doi: 10.1099/jgv.0.000935, 2017.
- 41) Razafindratsimandresy R, Jeanmaire EM, Counor D, Vasconcelos PF, Sall AA, Reynes JM.: Partial molecular characterization of alphaherpesviruses isolated from tropical bats. *J Gen Virol.* 90:44-47, 2009.
- 42) Sasaki M, Setiyono A, Handharyani E, Kobayashi S, Rahmadani I, Taha S, Adiani S, Subangkit M, Nakamura I, Sawa H, Kimura T.: Isolation and characterization of a novel alphaherpesvirus in fruit bats. *J Virol.* 1;88(17):9819-9829, 2014.
- 43) Watanabe S, Maeda K, Suzuki K, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Shimoda H, Kato K, Yoshikawa Y, Morikawa S, Kurane I, Akashi H, Mizutani T.: Novel betaherpesvirus in bats. *Emerg Infect Dis.* 16:986-988, 2010
- 44) Zhang H, Todd S, Tachedjian M, Barr JA, Luo M, Yu M, Marsh GA, Crameri G, Wang LF.: A novel bat herpesvirus encodes homologues of major histocompatibility complex classes I and II, C-type lectin, and a unique family of immune-related genes. *J Virol.* 86:8014-8030, 2012.
- 45) Shabman RS, Shrivastava S, Tsibane T, Attie O, Jayaprakash A, Mire CE, Dilley KE, Puri V, Stockwell TB, Geisbert TW, Sachidanandam R, Basler CF.: Isolation and characterization of a novel gammaherpesvirus from a microbat cell line. *mSphere.* 17;1(1), 2016.
- 46) <http://www.env.go.jp/nature/biodic-abs/nagoya-protocol.html>
- 47) <https://absch.cbd.int/countries>

Discovery of DNA viruses in wildlife in Zambia and Indonesia

Hirofumi SAWA^{1,2,*}, Michihito SASAKI¹, Yasuko ORBA¹

1) Division of Molecular Pathobiology, Research Center for Zoonosis Control, Hokkaido University

2) Global Institution for Collaborative Research and Education, Hokkaido University

Address: N20, W10, Kita-Ku, Sapporo, 001-0020, JAPAN

Division of Molecular Pathobiology, Research Center for Zoonosis Control, Hokkaido University

TEL: 011-706-5185 FAX: 011-706-7370

*e-mail address: h-sawa@czc.hokudai.ac.jp

Zoonoses originate from pathogens harbored in domestic and wild animals and therefore it is likely impossible to completely eradicate zoonotic diseases. For pre-emptive measures to attempt to predict the emergence of zoonosis outbreaks and the prevention of future epidemics and pandemics, it is imperative to identify natural host animals carrying potential pathogens and elucidate the routes of pathogen transmission into the human population.

Our research team is conducting epidemiological research studies in Zambia and Indonesia for the control of viral zoonotic diseases. In this review, we present the research findings, including the discovery of orthopoxviruses and polyomaviruses in wildlife in Zambia and the identification of herpesviruses in bats in Indonesia among our activities.