

審査の結果の要旨

氏名 大場 真己

近年、次世代シーケンサー (next generation sequencer, NGS) が感染症研究で広く利用されるようになり、数多くの新しいウイルスが発見されている。NGS はハイスループットシーケンシングによりサンプル中の核酸配列を網羅的にシーケンシングするので、従来のサンガー法に比べて格段に効率良く核酸の塩基配列を決定することができる。しかし、実際は、①サンプル中の相対的濃度が低いウイルスゲノムは検出されにくい、②1回のランでは DNA もしくは RNA のどちらか一方しかシーケンシングができない (イルミナ社の MiSeq の場合)、③single-stranded (ss) 構造のウイルスゲノムのシーケンシングは難しい、という問題点がある。申請者は、ウイルスを NGS 解析する際のこれらの問題点を克服するために2つのサンプル前処理方法を開発した。さらにこれらの新しいサンプル前処理方法あるいは従来法を用いて、野生のコウモリおよび家畜のブタの糞便サンプル等から新規あるいは希少ウイルスを NGS 解析で検出した。

第一章では、NGS 解析において ssDNA ウイルスを特異的に検出できる方法の開発を目指した。本法では Duplex specific nuclease (DSN) という dsDNA を特異的に切断する酵素を用いている。DSN によってサンプル内の ssDNA ウイルスゲノムの相対的な分子数を上昇させた後、ssDNA をランダムに増幅する Phi29 酵素を用いて dsDNA に変換しながら増幅し、この dsDNA を NGS で解析する方法である。本法を DSN-NGS 法と呼び、MDBK 細胞より抽出した dsDNA と豚パルボウイルス生ワクチンより抽出した ssDNA を用い、本法の有用性を検証したと述べられている。

また、multiplex PCR を利用した NGS の前処理方法も開発したと述べられている。本法では検出対象とするウイルスを鳥類・哺乳類全般とし、縮重プライマーを用い 137 属のウイルスを対象に約 700 本のプライマーをデザインし、multiplex PCR 反応後にすべての反応液をまとめて DNA 精製し、ハイスループットシーケンシングにより解析するものである。本法を multiplex PCR-NGS 法と呼び、その有用性をブタ糞便抽出核酸のプールを用いて検証したと述べられている。

第二章では、コウモリに関連するウイルスの検出を試みている。台湾・新北市内の洞窟で採取されたユビナガコウモリ (*Miniopterus fuliginosus*) の糞便サンプルより、multiplex PCR-NGS 法により encephalomyocarditis virus (EMCV) が検出されたと記述されている。EMCV はピコルナウイルス科 *Cardiovirus* 属のプラスセンスの ssRNA ウイルスであり、人獣共通感染症の原因ウイルスである。コンベンショナル PCR 法により、台湾、韓国およ

び日本のユビナガコウモリが EMCV を保有していることが示され、ユビナガコウモリが東アジアにおける EMCV の自然宿主の 1 つであることが示唆されたと報告されている。

申請者は国内のコウモリマルヒメダニの内臓と体液から Vero 細胞を用いてウイルス分離を行い、その培養上清から NGS 従来法によりブニヤウイルス科の新規ウイルス Soft tick bunyavirus (STV) を検出したと述べている。BLASTn 検索の結果、3 つのコンティグはヒトに頭痛や発熱を引き起こす Issyk-kul virus のセグメント L、M および S とそれぞれ 77%、76% および 79% の相同性を示したと記述している。系統解析から、STV は Nairovirus 属のクラスターに含まれることが示唆されたが、その病原性は不明であると述べられている。

第三章では、ブタ糞便から NGS 従来法と DSN-NGS 法を用いて、新しい porcine teschovirus (PTV) と fur seal feces-associated circular DNA virus JPN1 (FSfaCV-J1) および porcine feces-associated IASV-like virus (PfaIV) を発見したと記述されている。新規 PTV の病原性は不明でさらなる研究が必要であり、一方 FSfaCV-J1 および PfaIV は日本の養豚場に広く蔓延していることが明らかとなったと述べられている。FSfaCV-J1 および PfaIV に病原性がある可能性は低いと推定されている。

申請者は、NGS を用いて動物検体からウイルスを検出する際の問題点を DSN-NGS 法と multiplex PCR-NGS 法の 2 つの新しいサンプル前処理方法を開発することによって解決したと述べ、審査員はその新規性を認めた。また申請者は、NGS 従来法とこれらの新規方法を用いてコウモリとブタから新規あるいは希少ウイルスを検出し、コウモリやブタには未知のウイルスが未だ存在することを示し、これらのウイルスが変異し、ブタに病原性を示したり、人獣共通ウイルス感染症の原因になったりする可能性は否定できず、新興ウイルス感染症発生の脅威は現在もあるとの考えを示し、審査員はその考察は実際のデータに基づいた妥当なものであると納得した。さらに、新たなウイルス感染症に備えるため、今後本研究で開発した方法等を用いてコウモリやブタ等が持っているウイルスを網羅的な検出していく必要があると申請者は主張し、審査員も賛成した。

なお、国際ウイルス分類委員会 (ICTV) によるウイルス分類に最近大幅な変更があり、本論文中のウイルス分類の記載は各研究が発表された当時の分類であり、最新の分類とは一部異なっているとの指摘があった。しかし、現在の分類に直すと返って混乱を招く恐れがあるので、この事実を論文中に加筆するようコメントされた。最終的に、それに従って加筆されている。

これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士 (獣医学) の学位論文として価値あるものと認めた。