

日生研おより

第70巻 第1号(通巻630号) 2024年(令和6年)1月

挨拶・巻頭言

年頭のご挨拶

..... 長井伸也(2)

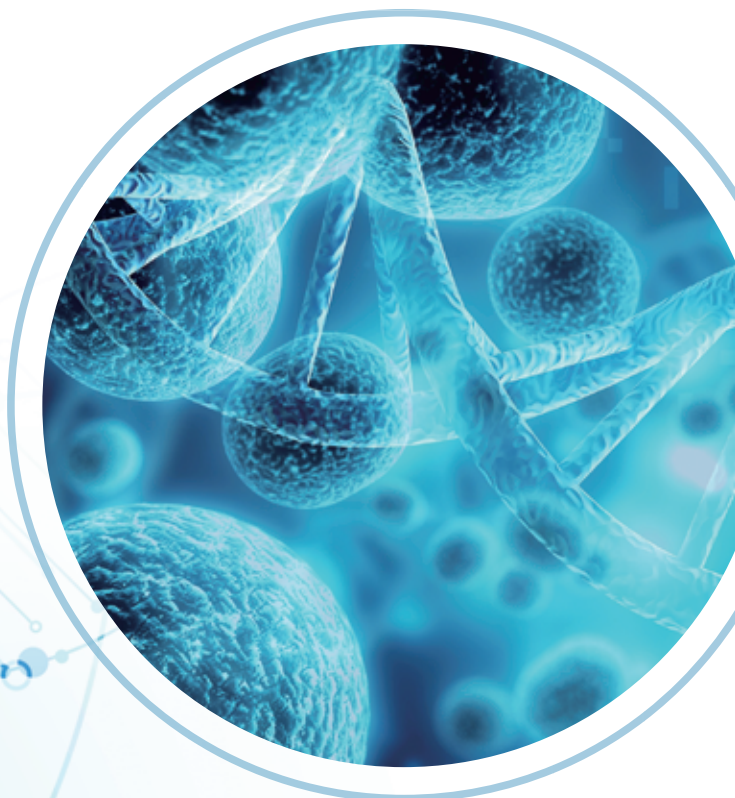
レビュー

次なる感染症対策へ向けた
大規模ウイルス探索とその性状解析

..... 堀江真行(3)

学会参加記

Asian Pig Veterinary Society
Congress (APVS) 2023 &
2023 Industry Forum: African
Swine Fever Vaccine and Its Safety
..... 高井亮輔(11)



年頭のご挨拶

長井伸也

謹んで新年のお慶びを申し上げます。皆様にはご健勝にて輝かしい新年をお迎えのことと存じます。2024年はぜひ幸多い年となりますことを心よりお祈り申し上げます。

2020年1月からパンデミックとなって世界を震撼させた新型コロナウイルス感染症ですが、2023年5月にWHOが「国際的に懸念される公衆衛生上の緊急事態」の終了を発表し、これを受けて我が国も同年5月8日に分類を「5類感染症」に引き下げ、これらが実質的な終息宣言となりました。パンデミックの3年4カ月の間に、世界全体での感染者数は累計で7億6,734万人、死者数は693万8,207人と発表されています（WHO、2023年5月28日報告）。第一次世界大戦での連合国の兵士の死亡者数は500~600万人であったとされますので、今回のコロナ禍は人類史に残る大変な惨事であったと言えるでしょう。

その後、現在まで散発的に発生があるものの大きなピークは見られず、社会、経済ともに徐々にコロナ禍以前の状態に戻りつつあることは喜ばしい限りです。

さて、このコロナ禍の終息に大きく貢献したのは、mRNAワクチンの開発とその普及であったことは誰しもが認めるところだと思います。この功績によってビオンテック社の顧問で米ペンシルバニア大学のカタリン・カリコ客員教授と同大学のドリュー・ワイズマン教授の二人に昨年のノーベル生理学・医学賞が授与されました。スウェーデンのカロリンスカ研究所は、mRNAワクチンは世界中で130億回接種され、何百万人も命を救ったとその受賞理由を説明しました。

カタリン・カリコ博士の経歴については「世界を救う mRNA ワクチンの開発者 カタリン・カリコ」（増田ユリヤ著、ポプラ新書）に詳しく書かれています。その中で、共産主義体制下にあったハンガリーから新天地を求めて米国へ移住、その折、全財産を熊のぬいぐるみの「テディベア」にこっそり忍ばせて出国した話、移住後のペンシルバニア大学でなかなか業績が認められず、降格の憂き目にあった話、失意のうちにコピー機の前でドリュー・ワイズマン氏と出会い、その共同研究から今回のノーベル賞に繋がる大きな発見が生まれた話など、これまで様々な記事として紹介されているところであります。

私が印象に残った箇所は、彼女がまだ小学生の頃、生物学が専門の高校教師で後に生涯の師となるトート先生に出会ってその才能が見出され、やがて先生の勤務していた高校に入学し、生物サークルに入ります。そこでオーストリア・ハンガリー帝国出身で「ストレス学説」の生みの親であるノーベル賞学者のハンス・セリエ教授や、同じくノーベル賞学者でビタミンCを発見・命名したセント・ジェルジ・アルベルト博士などと交流を持つことになります。ハンガリーはヨーロッパの中で大国とは言えませんが、科学について長い歴史と伝統があり、このように若いころから一流の科学に触れる機会があったことが、カタリン・カリコ氏という才能を生み出したのかもしれませんが。カリコ氏は「自分の研究がいつ、どこで役立つのかは分かりません。でも科学者として、常に誰かのためになりたいと思い続けてきました」と述べています。実に深みのある言葉です。科学技術に関しては、国家レベルで見ても、一夜漬けですぐに成果を得ようとするのは無理筋のようでもあります。

では、本年も当研究所に対する皆様方の温かいご指導、ご鞭撻をお願い申し上げ、これにて新年のご挨拶とさせていただきます。

(理事長)

レビュー

次なる感染症対策へ向けた大規模ウイルス探索とその性状解析

堀江真行 (大阪公立大学 大学院獣医学研究科、大阪公立大学 大阪国際感染症センター)

地球上には 10^{31} 個ものウイルスが存在すると考えられており [23]、様々な生物に感染する多種多様なウイルスが存在する。しかし、その多様性は未だ十分に解明されておらず、哺乳動物に感染するウイルスに限ったとしても、大量の未知のウイルスが存在すると考えられている [6]。このような未知のウイルスの中には、将来、人類や様々な動物に新たな感染症を引き起こすウイルスが存在するであろう。実際に近年、人類が経験してきた新興感染症の多くは、未発見の動物由来のウイルスによって引き起こされてきた [14]。また、ウイルスによる新興感染症はヒトに限らず、家畜動物など様々な動物でも起こり得る。そのため、感染症対策の一環として、どのようなウイルスがどのような生物に存在し、どのような性状であるかを調べることの重要性が増している。

ハイスループットシーケンスによるウイルス探索

近年、ウイルス探索においてハイスループットシーケンス (HTS) 技術 (次世代シーケンスとも呼ばれるが、ここでは HTS を用いる) が大活躍している。HTS は検体中の核酸の塩基配列を迅速、かつ網羅的に解読する技術であり、ゲノム解析、発現解析等、多岐の生命科学分野において今や必須の技術となっている。HTS では検体より核酸を抽出し、ライブラリを作成した後に大量のシーケンスを行う。現在ではイルミナ社や MGI 社のシーケンスプラットフォームを利用することが多いであろう。HTS では通常、「リード」(あるいはショートリード) とよばれる 50~300 bp 程度の配列断片が得られる。これらの短い配列を「アセンブル」することによってコンティグ配列が得られ、このコンティグからウイルス様の配列を探索する (図 1)。詳細な方法は後に説明する。

HTS 登場以前のウイルス探索には、ウイルスの

分離・培養、PCR (コンセンサス PCR を含む) などが用いられていた。ウイルスの分離・培養はウイルス探索の王道であり、今もなおその重要性はゆるがない。しかし、ウイルスの分離・培養には労力がかかるうえに、ウイルスそのものを扱うため専用の施設が必要となる。さらに、ウイルスの中には未だ培養が困難なものが存在するため、培養可能なウイルスしか検出できないというバイアスが生じる。また非細胞傷害性のウイルスの場合はウイルスが培養できているかどうかの判断がつかない。PCR もウイルス探索に頻繁に用いられている。複数の近縁ウイルスの配列の保存された領域に設計されたプライマーを用いるコンセンサス PCR の場合は、比較的幅広い近縁ウイルスを検出することができる。ある程度標的を絞ったウイルス探索では今もなおその優位性はゆるがない。一方で、プライマーを用いるために検出できるウイルスは限定的であり、プライマーの配列と大きく異なるような配列のウイルスは検出できないというバイアスが生じる。一方、HTS ではウイルスの分離・培養や PCR のようなバイアスを生じる過程がないため、幅広いウイルスを効率よく検出することが可能である。上記の通り、HTS は検体中の核酸の配列を網羅的に解読することができるため、検体にウイルス (感染細胞) が含まれている場合は、ウイルス由来の核酸も検出することができる。実際に HTS の登場により、同定されたウイルスの数が爆発的に増えている。

上記の通り、HTS 技術はウイルス探索において技術的には極めて有用であるものの、費用面において難がある。例えば何らかの新興感染症が発生した際に、HTS を用いて病原体を同定するような場合の費用対効果は非常に高いであろう。しかし、将来の感染症対策としてのウイルス探索を考えた場合には、前述の通り自然宿主においては顕著な病気を起こさないようなウイルスも対象となるため、調査対象として見た目上健康な動物も含まれる。この場合、

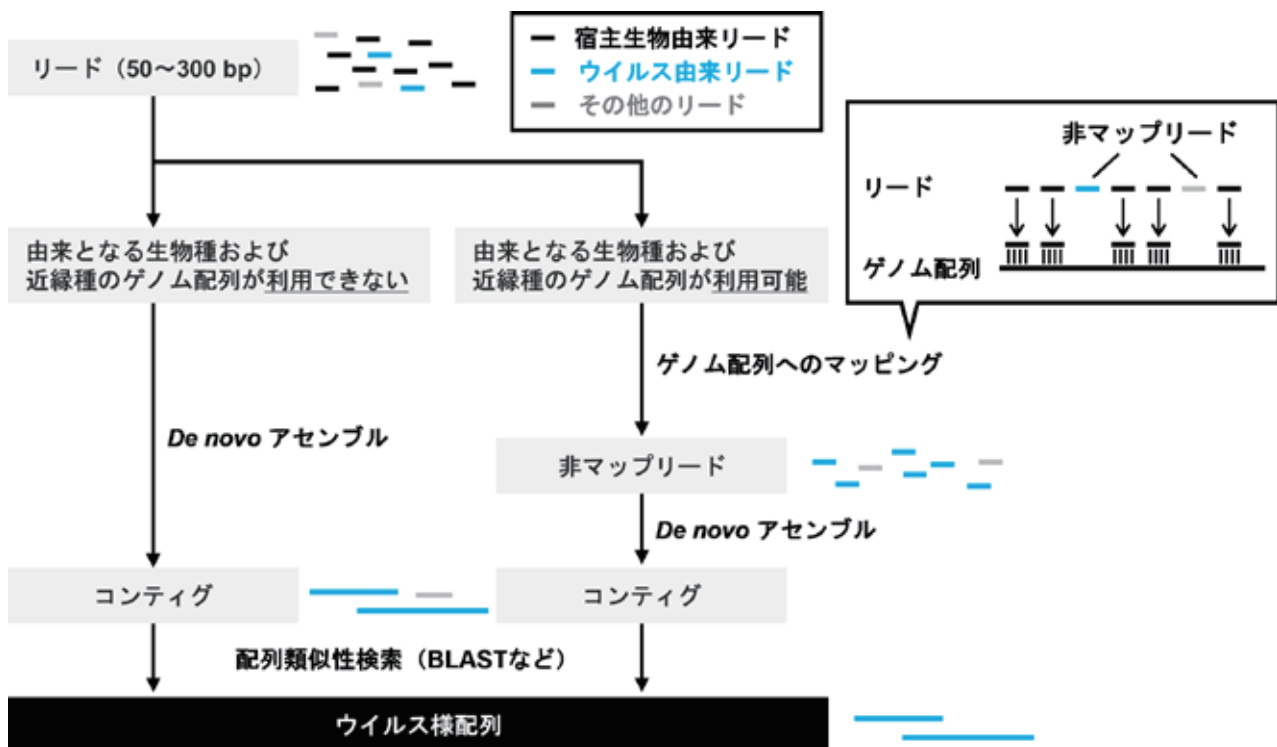


図1 筆者らが行った公共 HTS データを利用したウイルス探索の概要
筆者らが行った公共 HTS データを利用したウイルス探索の解析についての概要を示す。

対象個体がウイルスに感染しているとも限らないため、高額なシーケンスを行った結果、全くウイルスが検出されないことも十分に予想される。検体をプールすることによって効率よく探索するような手法も取られてきた [21] が、それでも対象となる動物は膨大であり、HTS によるウイルス探索を際限なく続けることはできない。

公共データベースを利用した大規模ウイルス探索

公共の塩基配列データベースには、様々な動物に由来する配列データが存在する。それらデータの多くはウイルス探索を対象として取得されたものではないが、その由来となる個体（検体）がウイルスに感染していた場合、ウイルス由来の配列が含まれる可能性がある。筆者は 2010 年頃、NCBI の EST (expressed sequence tags) データベース [20] より、新規のボルナウイルスと考えられる配列を偶然発見し、報告した [19]。この配列データは HTS ではなく、従来の手法で作成された cDNA ライブラリに由来する配列であった [12]。このときに筆者はウイルス探索における公共データベースの有用性に気がついたものの、当時は HTS の黎明期であり、利

用できるデータ量は限られていた。しかし現在、DDBJ DRA、NCBI SRA といった公共データベース [2] には、数十ペタ塩基以上の大量の HTS データが蓄積されている。このような大量のデータは、ウイルス由来の配列も含んでいると考えられるため、「ウイルスの宝庫」である可能性がある。さらに公共のデータにはメタデータが付随しており、検体の由来となる生物種、臓器、細胞などが記載されている（ただしこれらはデータの登録者に依存するため、十分な情報が得られない場合もある）。一定の制約はあるものの、このメタデータを使用することによって、ウイルスの宿主や標的器官、さらには疾患との関連についても解析することができる。

筆者らは NCBI SRA [20] に存在する哺乳動物および鳥類由来の 46,000 以上の RNA-seq データから、網羅的な RNA ウイルス探索を行った [11, 13]。レトロウイルスについては、宿主ゲノムに内在性レトロウイルスが存在し、効率的にウイルスを同定することが困難であるため、解析より除外した。同様に、多くの DNA ウイルスが宿主遺伝子と相同な遺伝子を保有しており、効率的にウイルスを同定することができないため DNA ウイルスも除外した。手法は極めてシンプルな方法（図 1）であり、50~

300塩基程度の配列断片（リード）をアセンブルし、BLASTx [5] を用いた配列類似性検索によってウイルス様配列を同定した。また計算コストを減らすため、RNA-seq データの由来となる生物種あるいはその同属近縁種のゲノム配列が利用可能な場合は、アセンブルの前にマッピングを行い、非マップリードを用いることによって生物由来の配列を可能な限り除去した。その結果、上記のデータのうち約 900 個のデータよりウイルスを同定した。

検出したウイルスの中には、既知のウイルスとは遺伝的に大きく異なる新規のウイルスも数多く存在した。私たちはこれらの新規のウイルスのうち、ほぼ全長に近い配列が得られたウイルスのみに絞り、系統解析などの詳細な解析を行った。これらの中には新種の定義を満たすようなウイルスも発見された（後述）。また、ヒトの病原体として知られているウイルスと比較的近縁なウイルスが家畜から検出された（例えば山羊のヘパトウイルス）（図 2）。

このように筆者らは、ウイルス探索において HTS データの「再利用」が極めて有用であることを実証した。上述の通り、筆者らはゲノム全長に近い配列を決定できたウイルスのみしか報告していないが、実際は部分配列であるものの新規ウイルスと考えられるようなものも大量に検出されている。現在は、このような部分配列についても地道に解析を行っている。

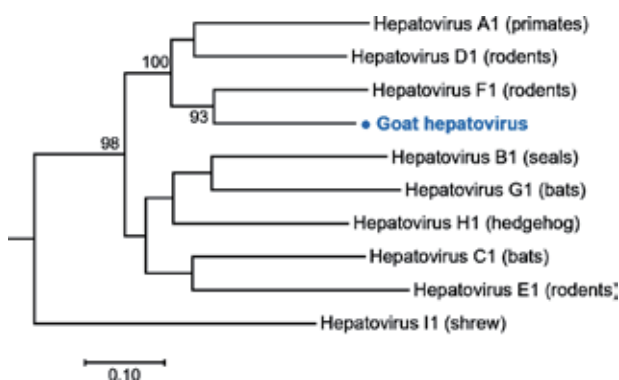


図 2 山羊ヘパトウイルスの分子系統樹
ヘパトウイルスの分子系統樹を示す。筆者らが発見した山羊のヘパトウイルスは青色と円で示されている。ウイルスの名前の後ろの括弧内は宿主動物を表す。系統樹の内部枝の数字はブートストラップ値を示す。70 未満のブートストラップ値は削除した。スケールバーは遺伝距離（置換/部位）を示す。

メタデータを利用したウイルスの性状解析

前述の通り、HTS データには通常、検体の情報やシーケンス方法などが記載されたメタデータが付随する。このメタデータを有効活用することによって、発見したウイルスの宿主、標的器官や細胞、場合によっては疾患との関連性などを調べることができる。筆者らは公共データベースから発見した新規ウイルスの一部について、そのウイルス由来のリードの数とメタデータを組み合わせることにより、様々な性状解析を試みた。その一例を紹介する。

パレコウイルスはピコルナウイルス科パレコウイルス属のウイルスである [26]。パレコウイルスは様々な動物から検出されており、人のパレコウイルスにおいては小児の種々の疾患に関連があると考えられている [9]。筆者らは上記のデータベース解析により、牛パレコウイルスを発見した（図 3a）[13]。これまでにパレコウイルスが家畜動物から検出された例はなく、家畜動物における初のパレコウイルスの報告であった。また、牛パレコウイルスは遺伝的に新規なパレコウイルスであり、国際ウイルス分類委員会（International Committee on Taxonomy of Viruses: ICTV）によって定められたパレコウイルス属の新種の基準を満たしていた。

筆者らは、牛パレコウイルスの性状解析のため、公共 HTS データを牛パレコウイルスのゲノム配列にマッピングし、個々の HTS データにおけるウイルス由来のリード数をカウントする（図 3b）とともに、検体の由来となる組織や健康状態などのメタデータを組み合わせた解析を行った。その結果、牛パレコウイルスは広範な組織に分布することが強く示唆された（図 3c）。一方、消化器疾患、呼吸器疾患などとの関連性についても疫学的な解析を行ったが、疾患との関連は不明であった（図 3d）。

本稿では解析の一部を紹介したが、筆者らはその他にもウイルスが分布する地域や、宿主動物種、さらには宿主動物の免疫とウイルスに関する情報など、様々なデータが得られた。詳細は筆者らの論文 [11, 13] をご覧いただきたい。

ウイルスの異種間伝播に関する解析

新興感染症対策を考えると、ウイルスが異種間伝

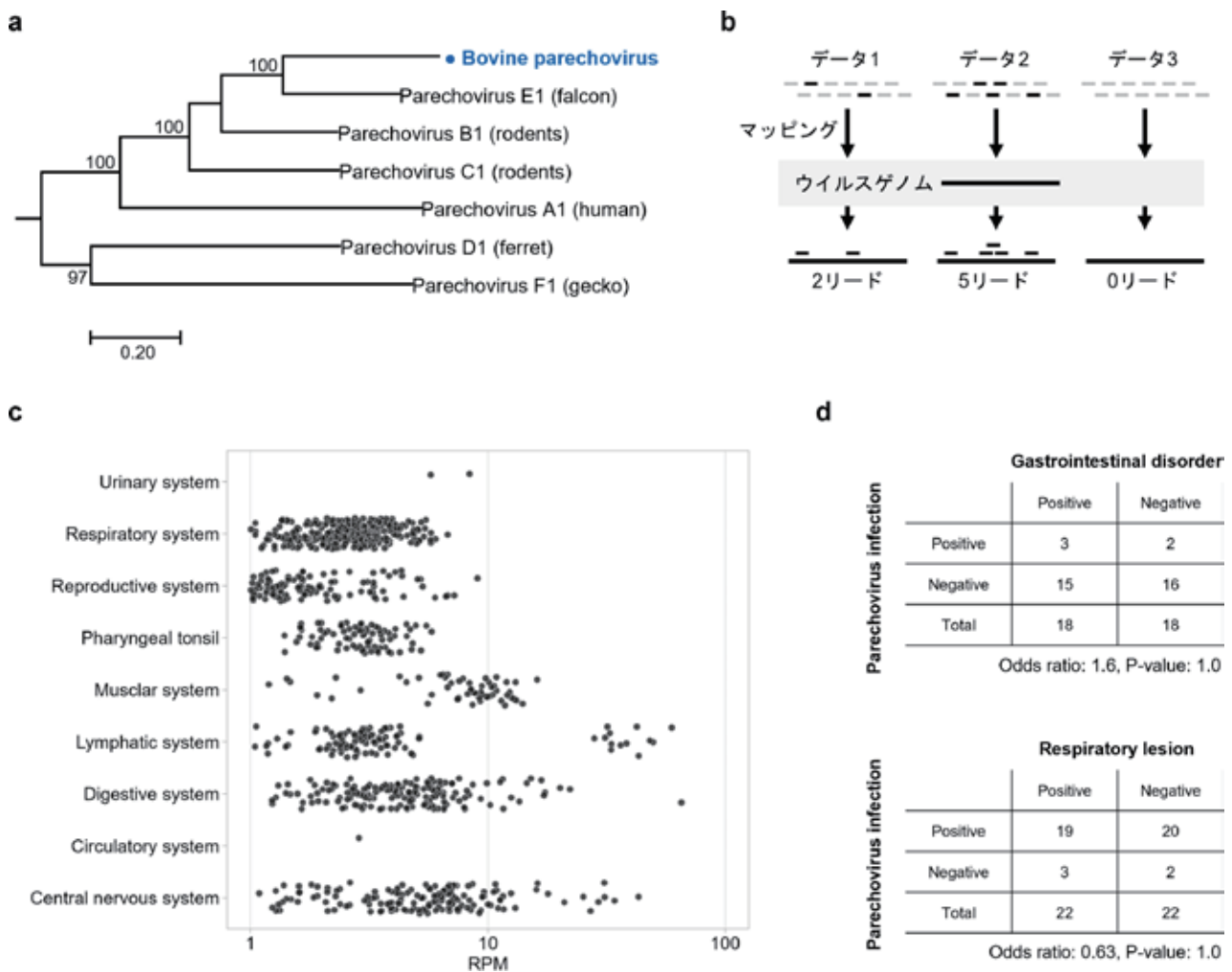


図3 公共データを利用した牛パレコウイルスの性状解析

公共データを利用したウイルスの性状解析の一例を示す。(a) パレコウイルスの分子系統樹を示す。筆者らが発見した牛パレコウイルスは青色と円で示されている。ウイルスの名前の後ろの括弧内は宿主動物を表す。系統樹の内部枝の数字はブートストラップ値を示す。70未満のブートストラップ値は削除した。スケールバーは遺伝距離(置換/部位)を示す。(b) ウイルスゲノムへのマッピングとそのカウントについての概要を示す。(c) 各器官における個々のHTSデータに含まれる牛パレコウイルス由来のリード数を示す。RPMはread per million(100万リードあたりのリード数)を表す。(d) パレコウイルス感染と臨床症状についての解析を示す。

播を引き起こすかどうか、あるいは過去に異種間伝播を引き起こしたかどうかという情報は極めて重要である。筆者らは、新規に発見したウイルスのうち、デルタウイルス(厳密にはごく近年に設立された*Kolmioviridae*という新しい分類群に属するウイルスと考えられるが、ここではデルタウイルスで統一する)について詳細な解析を行ったので紹介したい。

デルタウイルスは環状1本鎖マイナス鎖RNAウイルスである。デルタウイルスは自身のみでウイルス粒子を形成できない「サテライトウイルス」であり、ウイルス粒子の形成には何らかの他のヘルパーウイルスのエンベロプタンパク質を必要とする。代表的なウイルスは1977年に報告された[18]ヒトのD型肝炎ウイルス(hepatitis delta virus: HDV)

である。HDVは自身でウイルス粒子を形成できないが、ヘルパーウイルスであるB型肝炎ウイルス(hepatitis B virus: HBV)のエンベロプタンパク質を利用することによってウイルス粒子を形成することができる[4, 17]。

1977年から2018年まで、HDVの近縁ウイルスの存在は知られていなかったが、2018年のヘビヤカモなどのデルタウイルスの発見[10, 25]を皮切りに、新規のデルタウイルスが次々と報告された[3, 7, 16]。筆者らも上述の公共データベースを用いた解析によって、キンカチョウ、ウッドチャック、オジロシカなどから新規のデルタウイルスを発見し、報告した[11]。このように新規のデルタウイルスが次々と発見される一方で、デルタウイルスが異種

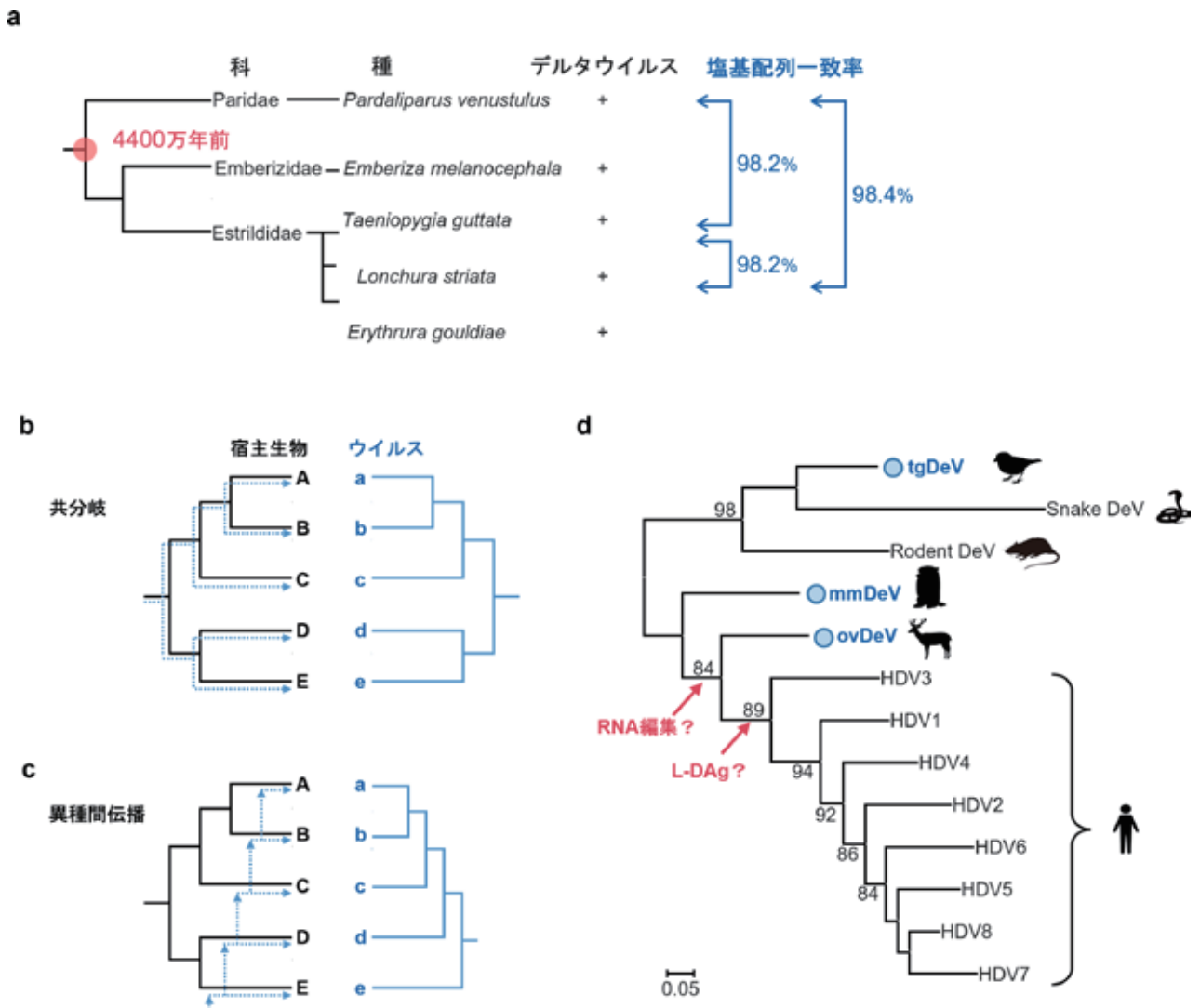


図4 デルタウイルスの異種間伝播

(a) スズメ目から検出されたデルタウイルスが過去に異種間伝播が起こったことを示唆するデータを示す。左側の系統樹は各鳥種の進化の系統樹を示す。右に各鳥種から検出されたデルタウイルス間の塩基配列一致率が示されている。(b) 宿主とウイルスが共分岐した際の模式的な系統樹を示す。左の系統樹における黒の実線は宿主動物の、水色の破線の矢印はウイルスの進化を示す。右の系統樹はウイルスの系統樹を表す。共分岐が起こった場合には、宿主とウイルスの系統樹のトポロジーが一致する。(c) ウイルスの異種間伝播が起こった際の模式的な系統樹を示す。系統樹の説明は (b) と同じ。異種間伝播が起こると、宿主とウイルスの系統樹のトポロジーが一致しない。(d) デルタウイルスの分子系統樹を示す。シルエットはそれぞれの宿主動物を表す。赤色の矢印と文字はデルタウイルスの進化の際に獲得されたと考えられる形質を表している。系統樹の内部枝の数字はブートストラップ値を示す。70未満のブートストラップ値は削除した。スケールバーは遺伝距離(置換/部位)を示す。

間伝播を起こし得るかどうかどうかという事は全くわかっていなかった。

筆者らはデルタウイルスの異種間伝播の可能性を検討するために、はじめにキンカチョウデルタウイルス (tgDeV) について詳細な解析を行った。上述の公共 HTS データのマッピングによると鳥の検体を用いた RT-PCR による解析の結果、tgDeV はスズメ目の広範な鳥に感染していることが判明した。また、これらの解析により、新たにジュウシマツとキバラガラという2種の鳥種から、新たに2株の

tgDeV (正確には tgDeV 様ウイルス) の全ゲノム配列を決定することができた。これらのゲノム配列とウイルスの進化速度および宿主の分岐年代を組み合わせた解析により、tgDeV の祖先ウイルスが異種間伝播を引き起こしていたことが明らかとなった(図4a)。キンカチョウ、ジュウシマツ、キバラガラより検出されたウイルスはそれぞれ塩基配列が約98%一致していた。一方、これらの鳥種は4400万年ほど前に分岐したと考えられている。ウイルスの進化パターンは大きく「共分岐」と「異種間伝播」

に分けられる (図 4b および c)。共分岐とは宿主とウイルスが同時に進化的に分岐することを指し、宿主とウイルスが密接な関係がある場合に生じる。tgDeV が約 4400 万年の 3 種の鳥の共通祖先に感染し、その後共分岐してきたと仮定すると、当然 3 種の鳥から検出されたウイルスは 4400 万年分の変異を蓄積していると考えられる。デルタウイルスの進化速度は極めて速く、HDV では 1 年あたりおよそ 10^{-3} 置換/部位であると推定されている [1, 8, 15]。しかし、上記の通り、3 株のウイルスのゲノム配列は約 98% 一致している。長期の進化を考えるとウイルスの進化速度はもう少し遅くなる [22] と考えられるが、4400 万年で 2% 程度しか変異しないということは考えづらい。これはすなわち、過去に tgDeV の祖先ウイルスの異種間伝播が起こったことを強く示唆している。

また、デルタウイルス全体の系統樹からも異種間伝播が起こったことが示唆された。筆者らが発見したデルタウイルスを含めて分子系統樹を推定した場合、そのトポロジー (形) は宿主生物の系統樹のトポロジーとは一致しなかった。通常、共分岐の場合はウイルスと宿主生物の系統樹のトポロジーが一致する (図 4b および c)。しかし、今回のデルタウイルスの系統樹では、シカのウイルスがウッドチャック (げっ歯類) のウイルスよりも HDV (ヒトのウイルス) に近縁であるなど、トポロジーが一致しなかった (図 4d)。すなわち、デルタウイルスの進化の過程において異種間伝播が起こったことが示唆される。

このように、筆者らの解析により、過去にデルタウイルスの異種間伝播が起こったということが強く示唆された。筆者らが発見したウイルスなしにはこれらの解析は不可能であり、公共データベースを用いた解析をもとに、ウイルスの性質を明らかにした一つの例であると言えよう。

人工合成による性状解析の例

データベースを用いたウイルス探索の最大の難点は、ウイルスそのものが得られないということである。もちろんデータの登録者に連絡することによって検体が手に入ることもあるが、その場合でもウイルス分離を想定して -80°C などで保管されていることは稀である。しかし、多くのウイルスでは人工合成系 (リバーシジェネティクス法) が確立されており、全長の塩基配列さえわかればウイルスを「作る」ことができることもある。筆者らは実際に、発見したウイルスのうち、tgDeV とウッドチャックデルタウイルス (mmDeV) のリバーシジェネティクス系を作出し、実験的解析を行った。ここではその成果の一部を紹介する。

はじめに、実際に動物のデルタウイルスが異種細胞 (ヒト細胞) において複製するかどうかを確かめた。その結果、tgDeV と mmDeV の両ウイルスともにヒト細胞において複製可能であることを確認した。また mmDeV については、少なくとも 2 ヶ月以上の持続感染を成立させることもわかった。このように、ウイルスを人工合成することにより、両ウ

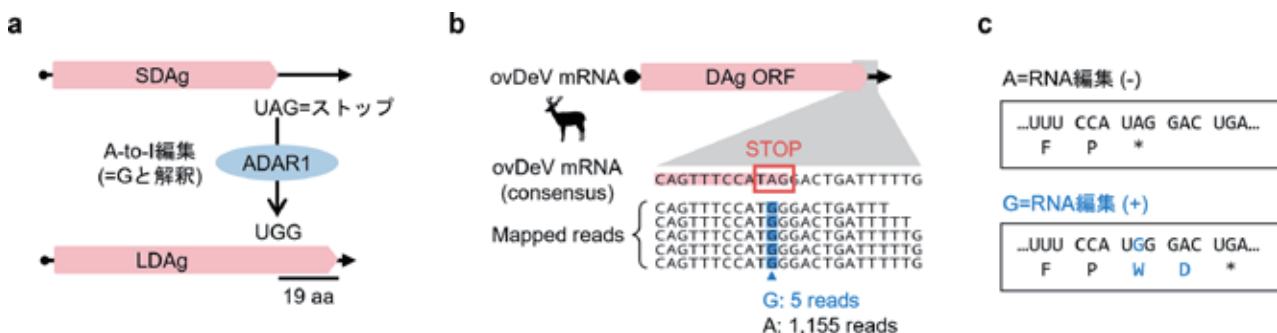


図 5 デルタウイルスの DAg アイソフォームの発見

(a) D 型肝炎ウイルス (HDV) における RNA 編集と DAg アイソフォームの発見を模式的に示す。(b) オジロシカデルタウイルス (ovDeV) の RNA-seq データを利用した RNA 編集の解析を示す。RNA-seq データを ovDeV ゲノムへとマッピングし、ストップコドンにマッピングされた各リードにおいて A-to-I RNA 編集 (I は G とみなされる) の有無を調べた。合計 1160 リード中、5 リードにおいて本来は A である塩基が G となっていたことから、RNA 編集が起こっていたと考えられる。(c) ovDeV の DAg 遺伝子のストップコドンに RNA 編集が起こってない場合 (上段) と起こった場合 (下段) の mRNA の塩基配列と翻訳されるアミノ酸配列を示す。*はストップコドンを表す。

ウイルスがヒト細胞でも複製できるという性質を確認することができた。なお、実際にはデルタウイルスの感染伝播はヘルパーウイルスに依存するため、ヒト細胞内で複製できるからといって必ずしも実際にヒトへと伝播するかどうかはわからない。しかし逆に、ヘルパーウイルス次第ではヒトにも感染し得るということでもある。

次にヘルパーウイルスに関する解析を行った。デルタウイルスのヘルパー/サテライトウイルスの関係については、HDV/HBV と、ヘビのデルタウイルス/アレナウイルス [24] を除いて全くわかっていない。上記の通り、デルタウイルスの感染伝播はヘルパーウイルスの性質に依存する。そのため、先回りの感染症対策を考えたとき、デルタウイルスの宿主域の同定・予測にはこれらの情報が必須である。はじめに、筆者らは公共 HTS データを用い、デルタウイルスと共感染しているウイルスを網羅的に検出した。しかし、エンベロープウイルスの共感染は見つからず、データ解析からのアプローチではヘルパーウイルスに関する知見は得られなかった。

次に、デルタウイルスの RNA 編集によるアイソフォームの発現に着目した解析を行った。HDV は宿主の RNA 編集機構を利用することによって、1 つの遺伝子から 2 つのアイソフォームのタンパク質 (Delta antigen : DAg) を発現する (図 5a)。HDV の場合、ストップコドンの RNA 編集により 19 アミノ酸長い DAg (LDAg) が発現し、この長いタンパク質の C 末端には HBV のエンベロープタンパク質と相互作用するための重要な領域が含まれている。筆者らは公共の HTS データを発見したそれぞれのデルタウイルスのゲノムにマッピングし、ストップコドンにおける RNA 編集の有無を検討した。その結果、オジロシカのデルタウイルスでのみ RNA 編集が起こっていることを示唆するデータが得られた (図 5b)。また、人工合成した tgDeV と mmDeV の感染細胞を用いてウエスタンブロッティングを行った結果、これらの両ウイルスは 1 つの DAg しか発現していないことを確認した。これらのことから、オジロシカのデルタウイルスと HDV の分岐以前に、宿主の RNA 編集機構を利用するという形質が獲得されたことが示唆された (図 4d)。しかし、オジロシカのデルタウイルスの場合、RNA 編集が起こったとしても 2 アミノ酸しかタンパク質は伸長されず、

HBV のエンベロープタンパク質と相互作用するためのモチーフ配列は存在しないため、HDV と同じメカニズムによってヘルパーウイルスと相互作用することはできないと考えられた (図 5c)。

さらに筆者らは、人工合成した tgDeV と mmDeV を用いて、さらなる実験的解析を行った。上記の通り HBV は HDV のヘルパーウイルスであることが知られている。そこで、今回発見したデルタウイルスが、HBV のエンベロープタンパク質を利用してウイルス粒子を形成できるかどうかを実験的に検討した。その結果、tgDeV、mmDeV とともに HBV のエンベロープタンパク質の存在下においても感染性の粒子を形成できないということが示された。これらのことから、HDV/HBV で見られるヘルパー/サテライトの関係は、動物のデルタウイルスと HDV の分岐以降に成立したと考えられた (図 4d)。

以上より筆者らは、ウイルスの人工合成によってデルタウイルスの様々な性状を明らかにした。本稿では詳細については記せないものの、tgDeV のヘルパーとして有力候補も発見しており、現在鋭意解析中である。

今後の展望

本稿では、データベースを用いてウイルスを発見し、発見したウイルスについてデータ解析とウイルスの人工合成による実験的解析を組み合わせることで性状解明を行うという、いわゆるドライとウェットの研究を融合したウイルス学研究を紹介した。公共データベースを用いた解析はウイルス探索のみに限らず、他の様々な病原体にも応用が可能である。また、ウイルス感染と宿主の遺伝子発現の変動を調べることによって、ウイルスの様々な性状を知るとともに、宿主との様々な相互作用を知ることができるかもしれない。このように、公共データベースを用いた解析は様々な可能性を秘めており、今後の感染症研究にも大きな力となることが期待される。

謝辞

本研究では、岩本将士氏 (ロックフェラー大学)、川崎純菜氏 (早稲田大学) をはじめとした、本稿で紹介した 2 つの論文の共著者の皆様に多大なるご協

力をいただきました。皆様に心より感謝いたします。

参考文献

- Alvarado-Mora, M. V., Romano, C. M., Gomes-Gouveia, M. S., Gutierrez, M. F., Carrilho, F. J. and Pinho, J. R. R. 2011. Dynamics of hepatitis D (delta) virus genotype 3 in the Amazon region of South America. *Infect. Genet. Evol.* **11** : 1462–1468.
- Arita, M., Karsch-Mizrachi, I. and Cochrane, G. 2021. The international nucleotide sequence database collaboration. *Nucleic Acids Res.* **49** : D121–D124.
- Bergner, L. M., Orton, R. J., Broos, A., Tello, C., Becker, D. J., Carrera, J. E., Patel, A. H., Biek, R. and Streicker, D. G. 2021. Diversification of mammalian deltaviruses by host shifting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **118** : e2019907118.
- Bonino, F., Heermann, K. H., Rizzetto, M. and Gerlich, W. H. 1986. Hepatitis delta virus : protein composition of delta antigen and its hepatitis B virus-derived envelope. *J. Virol.* **58** : 945–950.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K. and Madden, T. L. 2009. BLAST+ : architecture and applications. *BMC Bioinformatics.* **10** : 421.
- Carlson, C. J., Zipfel, C. M., Garnier, R. and Bansal, S. 2019. Global estimates of mammalian viral diversity accounting for host sharing. *Nat. Ecol. Evol.* **3** : 1070–1075.
- Chang, W.-S., Pettersson, J. H.-O., Le Lay, C., Shi, M., Lo, N., Wille, M., Eden, J.-S. and Holmes, E. C. 2019. Novel hepatitis D-like agents in vertebrates and invertebrates. *Virus Evol.* **5** : vez021.
- Chao, Y. C., Tang, H. S. and Hsu, C. T. 1994. Evolution rate of hepatitis delta virus RNA isolated in Taiwan. *J. Med. Virol.* **43** : 397–403.
- Dunn, J. J. 2016. Enteroviruses and Parechoviruses. *Microbiol. Spectr.* **4**.
- Hetzl, U., Szirovicza, L., Smura, T., Prähauser, B., Vapalahti, O., Kipar, A. and Hepojoki, J. 2019. Identification of a Novel Deltavirus in Boa Constrictors. *MBio.* **10**.
- Iwamoto, M., Shibata, Y., Kawasaki, J., Kojima, S., Li, Y.-T., Iwami, S., Muramatsu, M., Wu, H.-L., Wada, K., Tomonaga, K., Watashi, K. and Horie, M. 2021. Identification of novel avian and mammalian deltaviruses provides new insights into deltavirus evolution. *Virus Evol.* **7** : veab003.
- Kato, M. and Okanoya, K. 2010. Molecular characterization of the song control nucleus HVC in Bengalese finch brain. *Brain Res.* **1360** : 56–76.
- Kawasaki, J., Kojima, S., Tomonaga, K. and Horie, M. 2021. Hidden Viral Sequences in Public Sequencing Data and Warning for Future Emerging Diseases. *MBio.* **12** : e0163821.
- Kawasaki, J., Tomonaga, K. and Horie, M. 2023. Large-scale investigation of zoonotic viruses in the era of high-throughput sequencing. *Microbiol. Immunol.* **67** : 1–13.
- Krushkal, J. and Li, W. H. 1995. Substitution rates in hepatitis delta virus. *J. Mol. Evol.* **41** : 721–726.
- Paraskevopoulou, S., Pirzer, F., Goldmann, N., Schmid, J., Corman, V. M., Gottula, L. T., Schroeder, S., Rasche, A., Muth, D., Drexler, J. F., Heni, A. C., Eibner, G. J., Page, R. A., Jones, T. C., Müller, M. A., Sommer, S., Glebe, D. and Drosten, C. 2020. Mammalian deltavirus without hepadnavirus coinfection in the neotropical rodent *Proechimys semispinosus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **117** : 17977–17983.
- Ponzetto, A., Cote, P. J., Popper, H., Hoyer, B. H., London, W. T., Ford, E. C., Bonino, F., Purcell, R. H. and Gerin, J. L. 1984. Transmission of the hepatitis B virus-associated delta agent to the eastern woodchuck. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81** : 2208–2212.
- Rizzetto, M., Canese, M. G., Aricò, S., Crivelli, O., Trepo, C., Bonino, F. and Verme, G. 1977. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut* **18** : 997–1003.
- Rubbenstroth, D., Rinder, M., Stein, M., Höper, D., Kaspers, B., Brosinski, K., Horie, M., Schmidt, V., Legler, M., Korb, R. and Staeheli, P. 2013. Avian bornaviruses are widely distributed in canary birds (*Serinus canaria f. domestica*). *Vet. Microbiol.* **165** : 287–295.

20. Sayers, E. W., Bolton, E. E., Brister, J. R., Canese, K., Chan, J., Comeau, D. C., Connor, R., Funk, K., Kelly, C., Kim, S., Madej, T., Marchler-Bauer, A., Lanczycki, C., Lathrop, S., Lu, Z., Thibaud-Nissen, F., Murphy, T., Phan, L., Skripchenko, Y., Tse, T., Wang, J., Williams, R., Trawick, B. W., Pruitt, K. D. and Sherry, S. T. 2022. Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res.* **50** : D20–D26.
21. Shi, M., Lin, X.-D., Chen, X., Tian, J.-H., Chen, L.-J., Li, K., Wang, W., Eden, J.-S., Shen, J.-J., Liu, L., Holmes, E. C. and Zhang, Y.-Z. 2018. The evolutionary history of vertebrate RNA viruses. *Nature* **556** : 197–202.
22. Simmonds, P., Aiewsakun, P. and Katzourakis, A. 2019. Prisoners of war—host adaptation and its constraints on virus evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* **17** : 321–328.
23. Suttle, C. A. 2005. Viruses in the sea. *Nature* **437** : 356–361.
24. Szirovicza, L., Hetzel, U., Kipar, A., Martinez-Sobrido, L., Vapalahti, O. and Hepojoki, J. 2020. Snake Del-tavirus Utilizes Envelope Proteins of Different Viruses To Generate Infectious Particles. *MBio.* **11** .
25. Wille, M., Netter, H. J., Littlejohn, M., Yuen, L., Shi, M., Eden, J.-S., Klaassen, M., Holmes, E. C. and Hurt, A. C. 2018. A Divergent Hepatitis D-Like Agent in Birds. *Viruses* **10** : 720.
26. Zell, R., Delwart, E., Gorbalenya, A. E., Hovi, T., King, A. M. Q., Knowles, N. J., Lindberg, A. M., Pallansch, M. A., Palmenberg, A. C., Reuter, G., Simmonds, P., Skern, T., Stanway, G., Yamashita, T. and Ictv Report Consortium 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile : Picornaviridae. *J. Gen. Virol.* **98** : 2421–2422.

学会参加記

Asian Pig Veterinary Society Congress (APVS) 2023 & 2023 Industry Forum : African Swine Fever Vaccine and Its Safety

たか い りょう すけ
高井 亮 輔

はじめに

2023年7月31日から8月2日にかけて台湾の台北市にて開催されたAsian Pig Veterinary Society Congress (APVS) 2023と、8月3日に台湾の国立屏東科技大学にて開催された2023 Industry Forum : African Swine Fever Vaccine and Its Safetyに参加する機会を得たので、その概要を報告する。

APVS 2023 について

APVSはアジア地域の国際的な養豚学会であり、2年に一度開催されている。しかしながら、

Covid-19の世界的な流行により2021年の開催は延期され、ようやく2023年に10回目となるAPVS 2023が開催された。現在のAPVS参加国は日本、中国、韓国、台湾、タイ、フィリピン及びベトナムの7カ国であり、APVS 2023では初めて台湾が主催国となった。

台北松山空港から台北市内への移動にはタクシーや地下鉄を利用することができる。本学会会場であるTaipei International Convention Center (TICC)は台北市の中心部に位置し、タクシーを利用すれば台北松山空港から約30分で到着する(写真1左)。会場では主に2フロアを利用し、展示エリアの他、2~3部屋で同時に講演が行われていた(写真1右)。

APVS 2023 の演題は、①越境性疾病 (21)、②ウイルス感染症 (124)、③細菌感染症・その他の感染症 (108)、④栄養・動物福祉 (47) の4つのトピックに分けられていた。括弧内には事前登録された演題数を記した。実際に発表されたものは口頭発表が36演題、ポスター発表が247演題だった。本学会には37カ国から1,300名余りが参加し、そのうち台湾からの参加者は544名であった。学会期間中、興味深かった演題について紹介する。

APVS 2023 演題紹介

① The Evolution of PRRSV in Pigs—A Beautiful Example of the Darwinian Law of the Survival of the Fittest (口頭発表)

演者：Hans Nauwynck (Ghent University、ベルギー)

豚繁殖呼吸障害症候群 (PRRS) は PRRS ウイルス (PRRSV) によって引き起こされる豚の感染症である。PRRSV はマクロファージに感染することが知られており、PRRSV に感染したマクロファージはアポトーシスを起こす。PRRSV の GP5 と M タンパク質で構成されるヘテロダイマーがマクロファージ表面上のレセプターに結合することで感染が成立するとされており、これまでにいくつかのレセプターが同定されている。演者は、PRRSV が同定された1980年代から現代に至るまでの、PRRSV 感受性マクロファージの変遷を報告した。

1980年代に分離された PRRSV 株は Siglec-10 及び CD163 の2つのレセプターを有するマクロファージにのみ感染することが確認されたが、本特

性を持つマクロファージの存在はリンパ組織のリンパ球に限られていた。その後、1990年代に分離された PRRSV 株は、Siglec-1⁺CD163⁺の肺胞壁、鼻粘膜深層及び胎盤に存在するマクロファージにも感染が確認された。PRRSV が肺胞マクロファージに感染しアポトーシスを起こすと、単球が集簇して肺胞マクロファージに分化・成熟するが、これには約3週間を要すると言われている。その間、肺は他の病原性微生物の易感染性状態となり、呼吸器症状が悪化しやすくなったと考えられている。また、胎盤に存在するマクロファージにも PRRSV の感染が可能になったことから、繁殖障害の被害が増えたと演者は説明した。2000年代に分離された PRRSV 株は、鼻粘膜表層に存在する Siglec-1⁻CD163⁺のマクロファージに感染することが確認され、Siglec-1 以外のレセプターの関与が推測されたが、現時点では同定に至っていない。PRRSV の鼻粘膜表層に存在するマクロファージへの感染が可能となったことにより、鼻先を突き合わせる豚にとって、より個体間での感染拡大が容易になったと考えられた。また、PRRSV の感染により鼻粘膜表層に存在するマクロファージがアポトーシスを起こして脱落し、先述した肺と同様にバリア機能の喪失により、鼻においても他の病原性微生物に対して易感染状態となり、重症化の要因になったと考えられている。2006年にヨーロッパで確認された高病原性 PRRS 罹患豚は神経症状を呈したが、中枢神経系に存在するマクロファージに PRRSV が感染していることが確認された。さらに、血管周囲に存在するマクロファージに感染する PRRSV も確認されており、この PRRSV に感染すると血中ウイルス力価が顕著に上昇し高熱



写真1 会場入り口 (左) およびメイン会場内 (右) (学会 HP より引用)

が引き起こされた。このように、1980年代から現代に至るまで PRRSV 感受性マクロファージの種類は増加しており、豚に対してより病原性の高い株も確認されているが、感染に関与するレセプターの同定には未だ至っていない。

演者はこの変遷を進化と説明し、PRRSV は効果的により多くの細胞に感染できるよう進化を遂げて感染拡大していると括った。PRRS 制御のためにも PRRSV の感染レセプターの解明は重要であると考えられた。

② Comparing Competitive Fitness of Different Genotypes of Classical Swine Fever Viruses (口頭発表)

演者: Hsin-Meng Liu (National Taiwan University, 台湾)

台湾は 2024 年中の豚熱 (CSF) 清浄化宣言を目指しており、同国では近年の CSF 発生例は無い。演者らは、過去の台湾における CSF 発生時のウイルス株の変遷とその要因について実験的に検証した。台湾では、1993 年までは遺伝子型 3.4 (G3.4) の CSF ウイルス (CSFV) が主に検出されていたが、1994 年に遺伝子型 2.1 (G2.1) の CSFV が検出され、1996 年以降は検出される多くの CSFV の遺伝子型は G2.1 であった。以前に行った培養試験により、G2.1 は G3.4 よりも早期に培養液中からウイルスが検出されることが分かっている。本演題は、*in vivo* 試験の内容についての報告であった。10 頭の SPF 豚を準備し、G2.1 あるいは G3.4 をそれぞれ 3 頭に感染させ、残りの 4 頭は非感染状態のままにし、すべての豚を同居させ 26 日間飼育した。血清中及び口腔液中のウイルスゲノム量を経時的に測定した結果、ピーク時には、血清中及び口腔液中ともに G2.1 の単独感染群では G3.4 の単独感染群よりも多くのウイルスゲノムが検出された。また、口腔液に関しては G2.1 の単独感染群では G3.4 単独感染群よりも早期にウイルスゲノムが検出された。非感染同居豚に関しては、4 頭中 3 頭で血清及び口腔液中に両遺伝子型のウイルスゲノムが検出され、G2.1 のウイルスゲノム量は G3.4 のウイルスゲノム量よりも多かった。残りの 1 頭からは G2.1 のウイルスゲノムのみ検出された。その他、環境スワブ中のウイルスゲノム量を測定したところ、G2.1 のウイルスゲノムの方が多く残存していた。以上、*in vitro* 試

験及び *in vivo* 試験の結果から、G3.4 と比較して G2.1 の方が生体内での増殖性が高いこと及び環境中にも長く残存することが、主要な CSFV 株が G3.4 から G2.1 へ変化した原因であると示唆された。

③ Phylogenetic Analysis of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Pig Heads in China from 2014 to 2022 Based on the Classification of Open Reading Frame 5 Gene (ポスター)

発表者: Ke-Wen Wang (Zoetis China, 中国) *et al.*

2014 年 1 月から 2022 年 7 月にかけて、中国本土の 434 農場から北米型 PRRSV 陽性の 909 の組織及び血清を集め、PRRSV の ORF5 配列の分子系統樹解析を行った。その結果、Lineage 1、3、5、8 (L1、3、5、8) に分類された。本演題は各 Lineage に分類された PRRSV 株の検出割合に関する内容であった。2014 年～2016 年の間、L8 株の割合は 58.22% であったが、2019 年～2020 年には 26.54% まで減少し、その後 2022 年まで大きな割合の変動は見られなかった。L5 株の割合は 2014 年～2016 年は 4.00% であったが、徐々に増加し 2021 年～2022 年では 13.03% であった。L3 株の割合は 2014 年～2016 年は 12.89% であり、それ以降大きな変動はなく、2021 年～2022 年で 9.58% であった。L1 株の割合は 2014 年～2016 年は 24.89% であったが、2020 年～2022 年では 48.66% と急激に増加していた。

中国での検出が急増した L1 株は韓国や台湾でも増加していることが報告されている。日本では、PRRSV は ORF5 配列の分子系統樹解析により Cluster 1～5 に分類され、近年 Cluster 4 に分類される株の分離割合が増加してきている。L1 株の中には、Cluster 4 に分類される株が多く含まれていることから、日本だけではなく、アジア諸国でも L1 株のコントロールが重要となってきていると感じた。

2023 Industry Forum : African Swine Fever Vaccine and Its Safety について

台北駅から新幹線で 100 分ほど南へ移動すると左^さ營^{えい}駅に到着する。左營駅は、台北市に次ぐ第二の都市である高雄市の南西に位置する。高雄市は台湾最

大の貿易港を持ち、古くから港町として栄えてきた。台南で最も高く、高雄市のシンボルである左帝士 85 ビルが遠目に見えた。フォーラムの会場となったのは、左営駅から車で約 40 分の距離にある国立屏東科技大学（写真 2）である。国立屏東科技大学は台湾有数の大学の一つであり、台湾で最も広い敷地面積を持っている。今回、国立屏東科技大学獣医学部にて、アフリカ豚熱（ASF）に関するフォーラムが開催され、台湾、韓国、ベトナム及び日本の大学や研究所から 17 名が参加した。フォーラムでの演題内容について紹介する。

2023 Industry Forum : African Swine Fever Vaccine and Its Safety 演題紹介

① African Swine Fever Vaccine and Its Safety

演者：Hyoung Joon Moon（Semyung University、韓国）

韓国では、2019 年に初めて ASF が発生し、2023 年までに 37 件の ASF の発生が確認されている。また、近年では報告数が増加していることから、韓国では ASF ワクチンの開発が急がれている。現在、ASF ワクチンとしては、Modified Live Virus (MLV) が有望とされており、演者は MLV ワクチン開発を取り巻く状況について報告した。

ASF ワクチンの開発は世界的に急務となっているが、ワクチンの評価系が統一されていないため、比較が難しいという課題を抱えている。例えば、ウイルスの力価では、HAD₅₀、TCID₅₀ または PFU 等、研究者によって使用する指標が異なっている。様々な MLV ワクチン候補株の安全性と有効性の評価方法をまとめた文献によると、安全性を評価した試験



写真 2 国立屏東科技大学（大学 HP より引用）

では、Dose は $10^3 \sim 10^7$ TCID₅₀、使用する豚の週齢は 5~12 週齢、観察期間は 14~42 日と研究者により大きなばらつきがあった。有効性を評価した試験でも同様に、Dose は $10^2 \sim 10^8$ HAD₅₀、免疫後の攻撃タイミングは 7~70 日、観察期間は 21~28 日と多様であった。また安全性、有効性ともに、評価パラメーター（臨床症状、発熱、ウイルス血症、組織中のウイルス量、死亡率など）が研究者によって大きく異なっていた。

そこで、演者は ASF の MLV ワクチン開発に特化したガイドラインの制定が必要だと提言した。ガイドラインは ASF の MLV ワクチン開発を行う企業にとって指針となり、行政にとってはレビューの指針となる。安全性に関しては、「動物医薬品の承認審査資料の調和に関する国際協力（VICH）」、「欧州医薬品庁（EMA）」、「米国農務省（USDA）」のガイドラインも利用しつつ、発熱及びウイルス血症が無いこと、環境中への排泄が無いことなどの最低基準を設けるべきである。また有効性に関しては、動物の評価モデルの確立、防御効果の最低評価基準の設定、またワクチン接種後長期間（3 ヶ月以上）経過後の防御効果の評価なども必要であると説明した。

② Sharpen the Knife : Recent Progress in ASF Vaccine Research

演者：國保健浩（農研機構 動物衛生研究部門、日本）

ASF に感染すると、急性の場合は臨床症状を呈することなく死亡する。急死せず、臨床症状を呈する場合、他の疾病との鑑別が必要となるが、臨床症状のみで鑑別することは難しい。特に CSF の臨床症状と似ているため、遺伝子検査により鑑別しなければならないが検査には 6 時間以上要するとされている。

現時点で、日本国内で ASF ワクチンは開発されていないため、ASF の侵入・拡大防止のためには農場、地域、国レベルでのバイオセキュリティと迅速な診断が必要となってくる。農研機構はこの課題を解決するために、血液を材料として短時間で ASF と CSF を鑑別できるマルチプレックス PCR キットをタカラバイオ株式会社と共同で開発した。当該キットはタカラバイオ株式会社から販売されている。

その他、農研機構で行っている ASF ワクチンの

開発について報告があった。ASF ウイルス (ASFV) 感染後は中和抗体が誘導されないため、MLV が ASF ワクチンの候補である。世界中の研究者が様々な遺伝子を欠損させることで MLV 候補株を生み出しており、演者らも **Multigene Family** 内のいくつかの遺伝子を欠損させるなどして、ワクチン候補株の作出を目指している。同時にワクチンの安全性や有効性を評価する動物モデルを確立する必要があるが、これらは未だ確立できていない。また、同じ生体内で 2 株の ASFV が同時感染すると 2 株間での遺伝子組換えが起こり得ることが示されている。そのため、野外において生ワクチン株が野外株と遺伝子組換えを起こさないように、ウイルス血症期間が短い株を選択する必要があるなど、ASF ワクチン開発の難しさを報告した。

おわりに

国内で開催される学会にはこれまでも参加してきたが、今回初めて国際学会に参加する機会を得た。

アジア各国の疫学情報や取り組みなどを知ることで、グローバルな視点から養豚業界を俯瞰することができ、非常に有意義な体験であった。現在、アジアの多くの国々で ASF が発生するなど、グローバル化による人の移動や物の流通による感染症の世界規模の拡大が問題となっている。この問題を解決するために各種疾病に対するワクチンの開発及びバイオセキュリティの重要性を強く実感する学会であった。APVS 2023 では、“Comparing the Pathogenicity of Two Field Strains of Type-2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus of the Same Genetic Cluster Isolated in Japan” という演題でポスター発表する機会をいただいた。自分の研究成果が養豚業界にとって有意義なものとなるよう、今後も継続して研究に取り組んでいきたい。次回の APVS 2025 は福岡で開催される。14 年ぶりの日本での開催であり、アジア地域の養豚業界関係者の情報交換の場として大いに盛り上がることを期待する。
(研究員)

ウェブサイト移転のお知らせ

平素は格別のご高配を賜り、厚く御礼申し上げます。

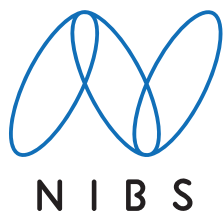
さて、この度弊所では皆様に安心してご利用いただくために、SSL（インターネット上でやりとりされる情報を暗号化する仕組み）に対応することいたしました。SSL化と共に、ウェブサイトを2023年10月より移転いたしましたのでご案内申し上げます。

ホームページアドレス（URL）は、下記のとおりとなります。

旧：<http://nibs.lin.gr.jp>

新：<https://nibs.or.jp>

お手数ですが、「お気に入り」や「ブックマーク」などに登録されている方は変更をお願いいたします。今後も皆さまのお役に立てるよう取り組んでまいりますので、引き続きご指導ご鞭撻を賜りますようお願い申し上げます。



—— テーマは「生命の連鎖」——

生命の「共生・調和」を理念とし、生命体の豊かな明日と、研究の永続性を願う気持ちを快いリズムに整え、視覚化したものです。カラーは生命の源、水を表す「青」としています。

表紙題字は故中村稔治博士による揮毫です。

日生研たより 昭和30年9月1日創刊(年4回発行)
(通巻630号) 令和5年12月25日印刷 令和6年1月1日発行(第70巻第1号)
発行所 一般財団法人日本生物科学研究所
〒198-0024 東京都青梅市新町9丁目2221 番地の1
TEL: 0428(33)1520(経営企画部) FAX: 0428(31)6166
URL: <https://nibs.or.jp>
発行人 土屋耕太郎

編集室 委員/河島奈悠(委員長)、高橋真理、高井亮輔
事務/経営企画部

印刷所 株式会社 精興社
(無断転載を禁ず)