

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21519

研究課題名（和文）植物ウイルスが人や動物に感染する可能性を探る

研究課題名（英文）Possibility for infection of plant viruses to humans and animals

研究代表者

水谷 哲也（Mizutani, Tetsuya）

東京農工大学・農学部・教授

研究者番号：70281681

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：一般に植物に感染するウイルスはヒトや動物には感染しないと考えられている。しかし、1960年代にはタバコモザイクウイルスが喫煙者に肺癌を誘発する可能性についての論文が発表されており、学術的な決着はついていない。そこで、本研究ではトウガラシ微斑ウイルスを用いて哺乳類の培養細胞や鳥類に感染するかについて検討を行った。その結果、培養細胞にトウガラシ微斑ウイルスを添加しても、電気的な処理をして強制的に細胞に導入しても、ウイルスは培養細胞中で増殖することはなかった。トウガラシ微斑ウイルスは鶏雛の腸管内を分解されることなく通過して糞便中に排出され、わずかながらIgAの産生を誘導していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では植物ウイルス（トウガラシ微斑ウイルス）が哺乳類や鳥類に感染するという結果は得られなかった。ヒトや動物においては原因不明の疾患が数多く存在している。これらの原因が植物のウイルスである可能性は極めて低いものの否定もされていない。本研究は原因不明の疾患の原因を探るための基礎研究という一面をもっている。今後、さらに詳細な実験を行って解明を進める必要があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：It is generally believed that viruses that infect plants do not infect humans or animals. However, academic studies have not solved the issue. A paper was published in the 1960s on the possibility of tobacco mosaic virus inducing lung cancer in smokers. Therefore, in this study, we examined whether pepper mild mottle virus (PMMoV) can infect cultured mammalian cells and birds. As a result, the virus did not proliferate in cultured cells, either by just adding PMMoV to the cells or by introducing the virus into the cells using electroporation technique. It was found that PMMoV passed through the intestinal tract of chicken without being degraded and were excreted in the feces, inducing the production of IgA in a small amount.

研究分野：ウイルス感染症

キーワード：植物ウイルス トウガラシ微斑ウイルス 培養細胞 鶏

## 1. 研究開始当初の背景

これまでに植物のウイルスがヒトを含む哺乳類に感染したという事例はない。しかし、動物ウイルスも植物ウイルスも細胞へ感染する仕組みには共通した部分があるので、植物ウイルスが動物に感染する可能性は否定できない。もし植物ウイルスが動物に感染して病気を起こすことが明らかになれば、これまでに原因不明とされてきた疾患の原因の中には植物ウイルスも候補として挙げられるようになるかもしれない。1960年に出版された *Lancet* 誌に「*Tabacco Mosaic Virus and Lung Cancer*」(タバコモザイクウイルスと肺癌)という衝撃的なタイトルの論文が記載されている。これ以降、タバコモザイクウイルスが肺疾患の原因である可能性を示す論文が散見されたが、近年では植物ウイルスがヒトに感染して疾患を起こすという論文はない。しかし、2010年にフランスのグループが、ヒトはトウガラシ微斑ウイルス(PMMoV)というトウガラシに感染する植物ウイルスの抗体を作り、抗体量が多いと発熱や腹痛などを起こすことを *PLoS One* 誌に発表した。さらに、2016年には名古屋大学医学部から、急性脳炎・脳症を起こした小児患者の血清の中に PMMoV の遺伝子が多数検出されたという論文が *Scientific Reports* 誌に掲載された。私たちは萌芽研究に採択される以前に、PMMoV が動物に感染する可能性を検討し次のことを明らかにしてきた。1) 牛・豚・鶏や野生動物・野鳥の糞便に PMMoV が大量に存在していること 2) 牡蠣などの二枚貝の中腸腺に PMMoV が濃縮されていること 3) 鶏に PMMoV を接種するとわずかに抗体が産生されること(予備試験)である。さらに他の研究グループも野生動物や牡蠣、河川などから大量の PMMoV を検出したという報告がある。このように PMMoV は環境中を循環しながら、ヒトを含む様々な生物に疾病などの影響を及ぼしている可能性がある。

## 2. 研究の目的

「植物ウイルスはヒトを含む動物に感染して病気を起こすのだろうか」これを明らかにするのが本研究の究極の目的である。この目的を達するためには膨大な実験が必要である。本研究ではそのための基礎的実験を行う。

## 3. 研究の方法

### 3-1. 牡蠣から動物ウイルスの検出

市販の牡蠣 17 個を購入して中腸腺を取り出し、アミラーゼを加えて 37℃ で 1 時間消化した。これを遠心分離して上清をポリエチレングリコールと NaCl を加えて 4℃ で一晩インキュベートした。この混合物を遠心分離し、ペレットをジエチルピロカルボナート(DEPC)処理水に再懸濁した。ウイルス核酸抽出キット(Roche)を用いて懸濁液から RNA を抽出した。RT-qPCR アッセイは、One-step PrimeScript RT-PCR Kit(TaKaRa, Japan)を使用して実施した。また、プライマーおよびプローブを使用した(Zhang et al., 2006)。本研究では PMMoV 以外に家畜の消化管から排泄されるウイルスのうち、bovine viral diarrhea virus(BVDV), bovine enterovirus, Rotavirus A, Rotavirus B, Rotavirus C, bovine coronavirus, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine epidemic diarrhea virus, porcine group A rotavirus, swine transmissible gastroenteritis virus についてもカキから抽出した RNA を用いて RT-qPCR を実

施した (Matsuda et al., 2016, Tsuchiaka et al., 2015, Shirato K et al., 2020, Sunaga F et al., 2019) さらには SARS-CoV-2 についても検査を実施した。

### 3-2. PMMoV の哺乳類培養細胞への感染

PMMoV をタバコの葉に接種し、病変があらわれた葉の乳剤から超遠心分離によりシードウイルスを得た。ウイルス量はリアルタイム PCR で測定した。この PMMoV から RNA を抽出し、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) へのトランスフェクションを ELEPO21 (ネッパジーン株式会社) を用いて試みた。1 回のトランスフェクションには細胞数  $3.1 \times 10^5$  あたり  $2.2 \times 10^5$  copies の RNA を供した。3 種類の porning pulse 電圧と 2 種類の porning pulse 幅を組み合わせた計 5 通りの条件で実施した (300V/ 5msec., 125V/2.5msec., 150V/ 2.5msec., 125V/5msec., 150V/5msec.)。これらのうち 300V では細胞は死んでしまったが、125V と 150V の細胞はほとんどが張り付いて増殖した。トランスフェクション後は Day1, Day7, Day10 で細胞を観察し、HUVEC 細胞と上清の回収を行った。細胞と上清の回収時には細胞外の PMMoV の RNA を除くために PBS で細胞表面を 2 回 washout した。新しい PBS を 200 $\mu$ L 入れてからスクレーパーではがした細胞ごと回収し、全量を核酸抽出に使用した。ただし Day10 サンプルは Day7 の時点で washout を実施し、新たなメディウム 200 $\mu$ L での培養を開始した。Day10 にはそれを全量回収するのみとした。また、Vero E6, BHK, FBKT, DEMKT, YUBFKT, BKT 細胞についてトランスフェクションを行うことなく、PMMoV を培地に添加して自然に感染が起こるかを検討する実験を行った。

### 3-3. 野生のコウモリからの PMMoV の検出

人獣共通ウイルス感染症の自然宿主とされるオオコウモリに着目し、PMMoV 感染の有無について検討するとともに、他の植物ウイルスの網羅的な検出を行った。インドネシア科学院、森林省の許可の下、インドネシアで採集したジャワオオコウモリ 6 個体の肝臓由来の核酸を CITES 許可を得たのち、日本へ輸入した。そして、Hiseq による次世代シーケンシングを行ったメタゲノム解析を実施した。

### 3-4. PMMoV の鶏への感染実験

孵化後 2 日齢の鶏雛 5 羽 (投与群 3 羽、非投与群 2 羽) を準備し、投与群に対しては PMMoV ( $10^9$  copy/g) を含む飼料 100 g を給仕し、24 時間後残渣の重量より各個体の摂取量を求めると、それぞれ PC1 :  $9.03 \times 10^8$ 、PC2 :  $8.6 \times 10^8$ 、PC3 :  $8.7 \times 10^8$  となった (PC は投与群を示す)。ウイルスの投与後、投与当日を 0 日とし投与後 7 日まで計 8 日間、1 日 1 回綿棒を用い総排泄空内の残留糞便を採取しリン酸緩衝液 (PBS) 1 ml に懸濁し試料とした。非投与群についてはウイルスを投与せず、投与群同様 8 日間、1 日 1 回採材を行った。採材の後、雛をイソフルランで麻酔し、炭酸ガスを用いて安楽殺した。安楽殺の後、心臓より採血し血清を分離した。また、直腸粘膜面を綿棒でぬぐい取り PBS 5 ml に懸濁した。この実験は東京農工大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

#### 3-4-1. リアルタイム PCR による糞便中 PMMoV ゲノムの測定

投与群について、採材した糞便からウイルス遺伝子の抽出を行い、糞便中のウイルスの排出量を調べた。抽出は Roch の High pure viral nucleic acid kit を用い定法に従った。

#### 3-4-2. ELISA 法による糞便中、血清、腸粘膜上の IgA 量の測定

採材した各検体について Abcam 社の Chicken IgA ELISA Kit を用いて検体中の IgA 濃度を求めた。それぞれの検体について前処理および試験手技についてはキットの添付プロトコールに

従い試験を行った。

### 3-4-3. 血清を用いたインフルエンザウイルス中和試験

PMMoV を投与した雛及び非投与の雛から採材した各 1 羽分の血清について、インフルエンザウイルスの中和試験を行った。96well プレート上でインフルエンザウイルス液 ( $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^3$ ) 50 $\mu$ l と原液及び希釈した血清 (原液  $\sim \times 100000$ ) 50 $\mu$ l を混合し 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。反応後 96 well プレート上にシートさせた MDCK 細胞に対し混合液 100 $\mu$ l を滴下し静かに混和した後、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で 72 時間反応させ、反応後の細胞の状態から中和能を調べた。また、試験に際しプレート上で同一希釈については 4 well ずつ反応をさせた。

## 4. 研究成果

### 4-1. 牡蠣から動物ウイルスの検出

牡蠣からは qPCR によって PMMoV が検出されたが 10 種類の家畜の病原性ウイルスは検出されなかった。本研究においても PMMoV は牡蠣の中腸線に蓄積されていることが明らかになった。SARS-CoV-2 を下水で検出するという試みが行われている。SARS-CoV-2 が PMMoV のように下水から河川、海へと流れていき牡蠣に蓄積するかについても検討したが、PMMoV が高率に検出されたのに対して、SARS-CoV-2 は検出されなかった。家畜の重要感染症の原因ウイルスも検出されなかったことから、PMMoV は様々な環境の要因に対して耐性である特殊なウイルスであることが明らかになった。

### 4-2. PMMoV の哺乳類培養細胞への感染

PMMoV を様々な条件で HUVEC 細胞にトランスフェクションしたが、細胞傷害や細胞増殖の遅れ等の変化は認められなかった。また、すべての条件において細胞内の PMMoV の RNA 量に変化は認められなかった。Vero E6 細胞で PMMoV を培地に添加後 3 日目から徐々に死ぬ細胞がみられた。この変化は 3 世代目まで観察されたが、以降は観察されなくなった。PMMoV が入っていた原液に含まれていた物質に細胞毒性があったことが示唆されるが、今後の詳細な検討が必要である。これらの結果から、PMMoV は哺乳類の培養細胞に感染できない可能性、今回の実験条件が最適ではなかった可能性などが考えられた。

### 4-3. 野生のコウモリからの PMMoV の検出

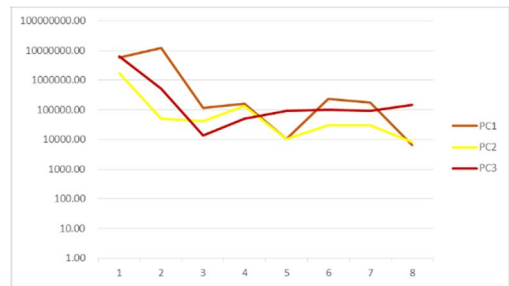
PMMoV の動物への感染を検討するために、野生のコウモリから抽出した核酸を用いてメタゲノム解析を実施した。その結果、6 個体中、2 個体から多数の植物ウイルスゲノム断片が見つかった。1 個体からは、すべてのウイルス種 156 種のうち 102 種、他個体では 74 種中 15 種が植物ウイルス種だった。PMMoV は見つからなかったが、Tomato yellow leaf virus のような人間社会に存在する植物ウイルス種が見つかった。6 個体中 4 個体からは植物ウイルスが見つからなかった。

### 4-4. PMMoV の鶏への感染実験

PMMoV の鳥類への感染や免疫系への影響を検討するために、萌芽研究採択以前に実施していた予備試験を参考にして、検討項目を加えながら感染実験を実施した。卵に色を付ける目的でトウガラシの成分を含んだ鶏の飼料が市販されていることから、本研究では鶏雛を用いて実験を行った。

#### 4-4-1. リアルタイム PCR による糞便中 PMMoV ゲノムの測定

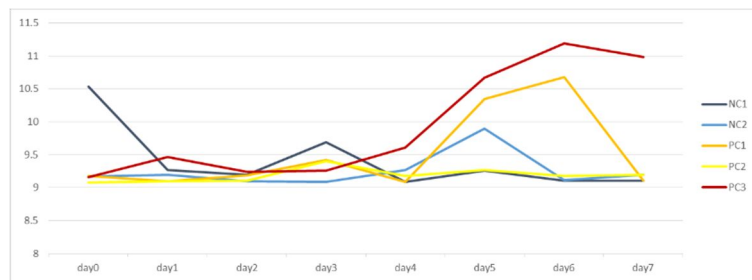
鶏に投与した PMMoV が何日間糞便に排出されるかを検討するために、採材した糞便についてリアルタイム PCR を実施した。その結果、投与群について投与当日から投与 7 日まで継続してウイルス遺伝子が検出された(右図: PC は投与した鶏のサンプル)。また、陰性対象として実施した非投与群の糞便の検索においては検出されなかった。この結果から、PMMoV は鶏の腸管で分解されることなく糞便中に排出されることが明らかになった。それゆえ、次の項目で PMMoV が腸管の免疫を刺激している可能性を探った。



#### 4-4-2. ELISA 法による糞便中、血清、腸粘膜上の IgA 量の測定

鶏の腸管を PMMoV が通過するとき、免疫が反応するかを検討するために IgA を測定した。

糞便中の IgA 量の投与日 (day0) から投与 7 日 (day7) までの推移を右図に示す。NC は PMMoV の非投与、PC は投与されたサンプルを示す。試験の結果、投与群 3 羽の内 2 羽では採材 6 日 (day6) から 7 日



(day7)にかけて IgA 量の上昇が認められた。1 羽では IgA 量の増加は見られず、非投与群の中でも採材日によって高い値を示す場合が認められた。また、血清について投与群の値は非投与群に比べてやや高い値を示していた。腸粘膜についてはすべての検体について低値を示していた。これらの結果から、PMMoV は鶏の腸管に対して弱い IgA の産生を誘導する可能性が示唆された。また、PMMoV の投与により IgA 量が増加していなくても少ない IgA 量の産生が誘導されていることは否定できないので、さらなる詳細な解析が必要であると考えられた。本研究では PMMoV の投与により少量でも IgA が産生していると仮定して研究を進めた。

#### 4-4-3. 血清を用いたインフルエンザウイルス中和試験

IgA は抗原に対して特異的に結合するものと、非特異的に結合するものがあると考えられている。後者の非特異的 IgA が鶏でも産生されるならば、PMMoV により弱く誘導された IgA が他のウイルスへも結合すると考えられる。そこで、本研究では PMMoV に誘導された IgA がインフルエンザウイルスを中和できるかについて検討した。その結果を右表に示す。

投与群、非投与群共にインフルエンザウイルス量が  $1.0 \times 10^5$  の系列では、原液及び 10 倍希釈の血清で中和を行っても細胞変性効果 (CPE) が見られなかった。インフルエンザウイルス量が  $1.0 \times 10^4$  の系列では、原液及び 10 倍希釈血清を用いた well では CPE は完全に阻止され、100 倍から 10000 倍の血清を用いて中和を行った well では半数及び 4 分の 1 の well で CPE が阻止された。インフルエンザウイルス量が  $1.0 \times 10^3$  の系列では CPE が見られなかった。この結果は PMMoV により IgA が弱く誘導されていたとしても、非特異的な中和活性は認められないことを示している。

		非投与群 (NC1) ←			IV $1.0 \times 10^5$			IV $1.0 \times 10^4$			IV $1.0 \times 10^3$		
血清	原液	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10倍	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100倍	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1000倍	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10000倍	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	血清無し	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NC1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

		投与群 (PC1) ←			IV $1.0 \times 10^5$			IV $1.0 \times 10^4$			IV $1.0 \times 10^3$		
血清	原液	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10倍	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100倍	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1000倍	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10000倍	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	血清無し	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NC1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

※IV: Influenza virus, -: CPE無し, +: CPE有り

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Atsuo Iida, Hitoshi Takemae, Ronald Tarigan, Ryosuke Kobayashi, Hirokazu Kato, Hiroshi Shimoda, Tsutomu Omatsu, Supratikno, Chaerul Basri, Ni Luh Putu Ika Mayasari, Srihadi Agungpriyono, Ken Maeda, Tetsuya Mizutani, Eiichi Hondo	4. 巻 83
2. 論文標題 Viral-derived DNA invasion and individual variation in an Indonesian population of large flying fox Pteropus vampyrus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1068-1074
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大場 真己 (Oba Mami)  (30816559)	東京農工大学・農学部・特任准教授  (12605)	
研究分担者	本道 栄一 (Hondo Eiichi)  (30271745)	名古屋大学・生命農学研究科・教授  (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
インドネシア	ボゴール農科大学		