

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05951

研究課題名（和文）インドネシアのコウモリの呼吸器検体を用いたViroome解析

研究課題名（英文）Viroome analysis of bats in Indonesia

研究代表者

澤 洋文（Sawa, Hirofumi）

北海道大学・ワクチン研究開発拠点・教授

研究者番号：30292006

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：コウモリは人に致死的な肺炎、出血熱等を起こすウイルスの自然宿主と考えられている。本研究計画では、インドネシアのコウモリから、新規・既知のウイルスの存在を明らかにすることを計画した。その結果、インドネシアのコウモリから肺炎を惹起するNelson Bay orthoreovirus を分離してその病原性、およびインドネシアのコウモリにおける感染状況を調査して、インドネシアにおけるNBVの流行に関する知見を得た。本研究は国際学術雑誌であるVirology (impact factor: 3.7)に2022年に報告した。さらに哺乳類オルソレオウイルスも分離して、現在論文を投稿して査読中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、インドネシアのコウモリから、肺炎を惹起するNelson Bay orthoreovirus を分離してその病原性、およびインドネシアのコウモリにおける感染状況を調査して、インドネシアにおけるNBVの流行に関する知見を得た。さらに、コウモリから哺乳類オルソレオウイルスも分離し、その病原性を明らかにした。

以上の研究により、コウモリの保有するウイルスの多様性に関する基礎的知見が得られ、東南アジアにおけるウイルス感染症を対象とした疫学研究のボトムアップに貢献し、コウモリが媒介するウイルス感染症に対する公衆衛生対策にも貢献した。

研究成果の概要（英文）： Bats are considered natural hosts of viruses that cause fatal pneumonia, hemorrhagic fever, and other diseases in humans. In this research plan, we planned to determine the presence of novel and known viruses from Indonesian bats. As a result, we isolated Nelson Bay orthoreovirus, which causes pneumonia, from Indonesian bats and investigated its pathogenicity and infection status in Indonesian bats to gain insight into the prevalence of NBV in Indonesia. This study was reported in the international journal, "Virology (impact factor: 3.7)" in 2022. We also isolated mammalian orthoreoviruses and are currently submitting a paper for peer review.

研究分野：ウイルス学

キーワード：コウモリ ウイルス 分離

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2020年10月25日現在、新型コロナウイルス感染症(COVID-19)の国際社会において、猛威をふるっており、世界全体の感染者数は4264万人以上、肺炎等による死者数は115万人以上と報告されている。今後、北半球では冬季を迎え、インフルエンザの流行と相まって、今以上の悪い状況になることが危惧されている。

COVID-19の原因ウイルスである、SARS-CoV-2の近縁のウイルスのゲノムがコウモリ、センザンコウから確認されており (Zhou P et al. 2020 *Nature*, Zhang T et al. 2020 *Curr Biol*)、COVID-19はウイルス性人獣共通感染症と考えられている。また、SARS-CoV-2を動物に感染させた実験結果によると、ブタとニワトリはSARS-CoV-2には感染しなかったが、食果コウモリ (Fruit bats) は上気道で感染が確認され、また他の非感染個体への感染も確認されたことから、食果コウモリが自然宿主としての役割を担っていることが示唆されている (Schlottau K et al. *Lancet Microbe*, Preprints, Rahman MT et al. 2020 *Microorganisms*)。

コウモリは上記の様にCOVID-19の他にも、2004年に流行したSARSコロナウイルス、2011年に流行したMERSコロナウイルス、出血熱の原因となるマールブルグウイルス、エボラウイルス、脳炎を起こすニパウイルス、ヘンドラウイルス、狂犬病ウイルス等、多くの公衆衛生学的に重要なウイルスの自然宿主であることが報告されている (Bonilla-Aldana DK et al. 2020 *Int J Infect Dis*)。

コウモリは哺乳類動物の中で唯一、長距離を飛行することが可能であり、またその種は1,100種類と多様である。コウモリは長距離を飛行するために進化の過程で骨を中空にしており、骨髄が不十分で有ることから、感染時の免疫応答で抗体産生を担うB-cellを産生できず、多くのウイルスを無症候で保有しており、自然宿主としての役割を果たしていることが示唆されている。

これまで申請者の研究チームはインドネシアのボゴール農業大学と連携してインドネシアで採集したコウモリを用いて多くのウイルスを検出・単離している。しかしながら、これまでに腸内内容物を用いたVirome解析実施した結果、食べた物に由来していると考えられた昆虫・植物由来のウイルスが主に確認された。本結果から、前述した公衆衛生学的に重要なウイルスを検出するためには、呼吸器由来の検体を検索することが必須である。

以上の背景より、本研究ではVirome (大規模ウイルス配列)解析を実施して、コウモリの呼吸器に公衆衛生学的に重要なウイルスが存在していることを解明すべき学問的問いとした。

2. 研究の目的

現在の国際社会のCOVID-19の感染状況において、飛行機等による交通は制限されており、出入国の際には検疫が必要である。斯かる状況において、私達が海外において疫学活動を実施し、コウモリの検体を入手すること、および、海外からコウモリの検体を日本に輸送することは極めて困難である。そこで本研究計画では、図1に示す様に、申請者の所属する研究施設に保管されている、3種類、183頭のコウモリから採集した呼吸器検体を使用することによって、海外に渡航する困難を克服できる。コウモリは3つの島 (スマトラ、ジャワ、スラウェシ) から採集しており、インドネシア地域でのウイルスの多様性を確認することが可能である。また、私達は、既にこれらのコウモリから採集した検体を用いて、ウイルスを単離・検出しており、検体中にウイルスが存在することは実証済みである。さらに、コウモリが自然宿主であり重篤な感染症を起こすニパウイルス感染症 (1998-1999年に267名が感染し、うち105名が死亡)が流行したマレ

ーシア、および 1994 年に馬 83 頭が感染し、14 頭が死亡し、馬の飼育に関与した人 7 人が感染し 4 名が死亡したヘンドラウイルス感染症が発生したオーストラリアの両国とインドネシア間で、コウモリの移動が確認されている。またインドネシアは熱帯性気候に属しており、節足動物媒介性のウイルス感染症も多く発生している。

以上の背景より、多くのウイルスの自然宿主であるコウモリの呼吸器におけるウイルスの Virome 解析を実施して公衆衛生学的に重要と考えられる新規・既知のウイルスの存在を明らかにすることを本研究の目的とする。

3 . 研究の方法

(A) コウモリの呼吸器由来検体を用いた Virome 解析

申請者らの研究グループは既に、げっ歯類動物の糞便を検体として、Virome 解析を実施している。本解析に必要なシーケンスライブラリの構築に必要な核酸量は僅か 1 ng であり、呼吸器由来検体 (transport media に入れて保存した呼吸器スワブ) から抽出した微量核酸でも増幅処理をすることなく (即ち、核酸増幅法によるバイアスを生じずに) 次世代シーケンサー (NGS) を用いた解析が可能となる。実際に NGS を用いて得られた 893, 430 reads の内、726, 286 reads (81.2 %) がウイルス由来の reads であることを確認した。

本解析により、インドネシアのコウモリの呼吸器に存在する公衆衛生学的に重要と考えられるウイルスを明らかにして、その感染状況、病原性への関与について明らかにすることを目指す。

(B) コウモリの呼吸器に存在する新規・既知のウイルスの感染状況の検討と病原性の確認

Virome 解析により得られたゲノム情報から、公衆衛生学的に重要なウイルスの全ゲノムシーケンスを、RACE 法、PCR 法を用いて決定する。その後以下の方法を用いて、感染状況、病原性への関与について明らかにする。現在申請者の研究グループは protease を発現する細胞を作成し、回転培養と組み合わせて、動物検体から効率良くウイルスを単離する方法を開発している。Virome 解析により、公衆衛生学的に重要なウイルスが確認された検体から開発した方法を用いて、申請者の研究グループが所属する施設の P3 実験施設を用いてウイルスの単離を試みる。

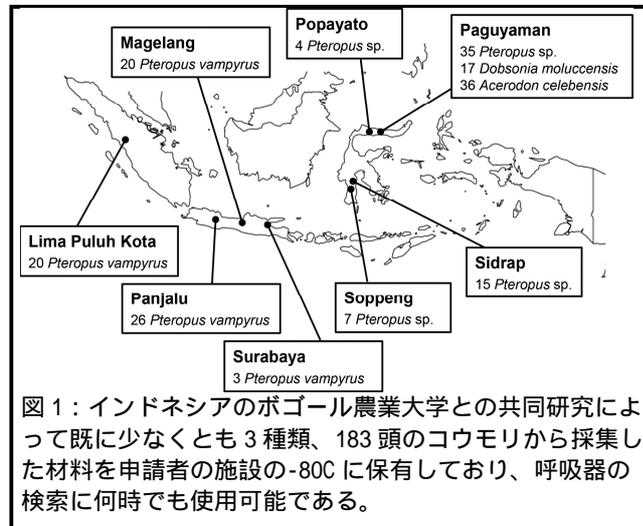
単離が成功した際には、単離されたウイルスのゲノムを確認して、重要なウイルスであった際には、動物実験を実施してその病原性を確認する。以上の実験により、インドネシアのコウモリの呼吸器に存在する重要なウイルスの感染状況、病原性を明らかにして、診断法、予防法、治療法の開発等必要な対策に向けた研究に繋げる。

4. 研究成果

2021年度は、オーストラリアのコウモリから単離されたオルソレオウイルスである、Nelson Bay オルソレオウイルスを用いて、2010年から2014年にかけて、スマトラ、ジャワ、スラウェシで採集したコウモリから採集して、-80C に保管していたインドネシアのコウモリの血清の中和活性を測定した(図1)。

その結果、133 検体中、118 検体(89.5%)に中和抗体価を確認した。以上より、予想より高い陽性率で有り、インドネシアのコウモリで、オルソレオウイルスが蔓延していることが推察された(図2)。さらに、中和抗体価の陽性率が9割近くであったことから、インドネシアのコウモリにはオルソレオウイルスの感染が蔓延していることが示唆された。

2022年度は、スマトラ、ジャワ、スラウェシで採集したコウモリを対象とし血清(133 検体)



Screening of neutralizing antibody against NBV Miyazaki-Bali/2007 strain and ORV genome in Indonesian fruit bats.									
Year	Location	Bat species	Number of positive samples				Nested RT-PCR		
			Neutralizing antibody titer by PRNT ₅₀				Feces	Lung	
			1:20	1:80	1:320	1:1280	Total (%)		
2010	Panjalu	<i>Pteropus vampyrus</i>	1	5	7	2	15/15 (100)	NA ^a	0/15
2011	Lima Puluh Kota	<i>Pteropus vampyrus</i>	0	4	4	2	10/10 (100)	NA	0/20
	Paguyaman	<i>Pteropus sp.</i> ^b	4	4	5	5	18/18 (100)	NA	0/23
	Popayato	<i>Pteropus sp.</i>	0	0	1	2	3/3 (100)	NA	0/4
2012	Paguyaman	<i>Dobsonia moluccensis</i>	0	7	6	3	16/16 (100)	0/17	0/17
		<i>Acerodon celebensis</i>	2	4	2	1	9/18 (50)	0/18	0/18
		<i>Pteropus sp.</i>	0	0	2	0	2/2 (100)	0/2	0/2
	Surabaya	<i>Pteropus vampyrus</i>	0	1	0	2	3/3 (100)	0/3	0/3
	Magelang	<i>Pteropus vampyrus</i>	3	3	5	8	19/19 (100)	0/19	0/20
2013	Paguyaman	<i>Pteropus sp.</i>	0	1	6	3	10/10 (100)	3/8	0/10
		<i>Acerodon celebensis</i>	2	2	1	0	5/10 (50)	3/7	0/18
2014	Soppeng	<i>Pteropus sp.</i>	0	0	3	3	6/6 (100)	0/7	0/7
	Sidrap	<i>Pteropus sp.</i>	0	0	1	2	3/3 (100)	0/15	0/15
Total			12	31	43	33	119/133 (89.5)	6/96	0/172

^a NA; sample not available.
^b *Pteropus sp.*; Bat genetically closely related to *Pteropus hypomelanus*.

図2: インドネシアのコウモリの血清の中和活性を測定した結果、133 検体中、118 検体(89.5%)に中和抗体価を確認 (Intaruck K et al. 2022 *Virology*)。

糞便(96 検体)および肺(172 検体)を用いて、Nelson Bay オルソレオウイルスの血清疫学調査、ゲノムの検出、ウイルスの単離を試み、血清(133 検体)の内 119 検体で中和抗体が陽性であること、nested RT-PCR 法を用いて、糞便 96 検体中 6 検体からウイルスゲノムを検出した。

さらに、ゲノムが陽性であった糞便検体を TMPRSS2 を強制発現させた Vero 細胞に接種してウイルスを 5 株単離した。5 株のウイルスゲノムを解析した結果、単離したウイルスがオルソレオウイルスである事、また 5 株のウイルスの塩基配列の相同性が 99%以上である事から単離したウイルスが単一のオルソレオウイルスであると結論付けた。

得られたウイルスのゲノム情報は DNA Data Bank of Japan (DDBJ)に登録した(LC632072-LC632081)。単離したウイルスはコウモリを採集した地域に因んで、Paguyaman orthoreovirus (PgORV)と命名した。さらに単離した PgORV の分子系統学的解析を実施して、マレーシアの人症例および、タイのサルから検出されたオルソレオウイルスと祖先を同一にする事が判明した。

単離した PgORV について、異なった細胞でのウイルスの増殖を比較してヒト由来の細胞株である A549、293T、Caco-2 に感受性がある事を明らかにした。

また PgORV をマウスに鼻腔内接種することにより、マウスでの病原性を死亡率で確認し(図3)さらに肺炎を惹起する事を確認した(図4)。

以上の結果を国際学術雑誌である *Virology* (2022 Oct;575:10-19. doi: 10.1016) に報告した。

2023年度は我々の研究グループが2010年から2014年にかけて、スマトラ、ジャワ、スラウェシで採集したコウモリを対象として、肺(167検体)口腔スワブ(45検体)、糞便(91検体)を哺乳類由来細胞(Vero T2-hACE2)細胞に接種して細胞傷害効果(Cytopathic effect: CPE)が確認された細胞からウイルスを分離する事に成功した。

CPEを呈した細胞に接種した3検体は、いずれもジャワ島で採集した3頭のジャワオオコウモリ(*Pteropus vampyrus*)から採集した糞便であった。分離したウイルスについて全ゲノム解析を実施した結果、3つのウイルス由来のゲノムは99%のゲノムの相同性を有す

る哺乳類オルソレオウイルスである事が判明した。次に電子顕微鏡で形態学的観察を実施して、分離した哺乳類オルソレオウイルスは典型的なレオウイルスの形状である、約80nmの直径を有し、球形の車軸状の形状を有し、さらに二重の層を有するタンパク質のカプシドを有していた。さらに、ウイルスゲノムの構造を解析した結果、単離したウイルスは10本のゲノムを有しており、既存の報告と73.3-95.3%の相同性を有しており、血清型2に属する事が明らかになった。さらに、種々の哺乳類由来の細胞での増殖性を比較した結果、BHK-21細胞(ハムスター腎臓由来)、HEK293T細胞(ヒト腎臓由来不死化細胞)、A549細胞(ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞)で増殖性が良い事が明らかになり、ヒトへの感染が生じる可能性を明らかにした。

現在哺乳類オルソレオウイルスを単離した結果をまとめて *J Gen Virol* に投稿中である。

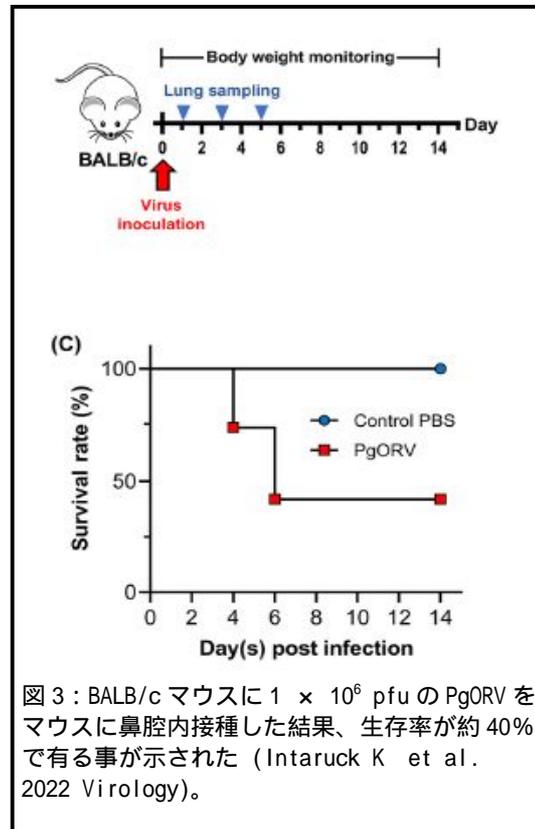


図3: BALB/c マウスに 1×10^6 pfu の PgORV をマウスに鼻腔内接種した結果、生存率が約40%で有る事が示された (Intaruck K et al. 2022 *Virology*)。

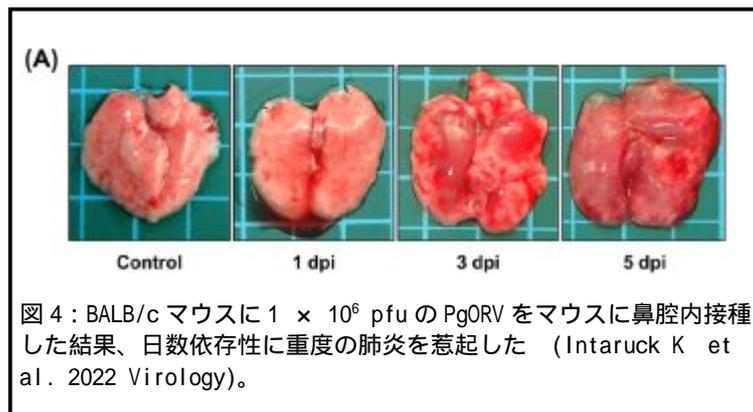


図4: BALB/c マウスに 1×10^6 pfu の PgORV をマウスに鼻腔内接種した結果、日数依存性に重度の肺炎を惹起した (Intaruck K et al. 2022 *Virology*)。

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 1件）

1. 著者名 Intaruck Kittiya, Itakura Yukari, Kishimoto Mai, Chambaro Herman M., Setiyono Agus, Handharyani Ekowati, Uemura Kentaro, Harima Hayato, Taniguchi Satoshi, Saijo Masayuki, Kimura Takashi, Orba Yasuko, Sawa Hirofumi, Sasaki Michihito	4. 巻 575
2. 論文標題 Isolation and characterization of an orthoreovirus from Indonesian fruit bats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 10~19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virol.2022.08.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kittiya Intaruck, Yukari Itakura, Mai Kishimoto, Herman Moses Chambaro, Takashi Kimura, Yasuko Orba, Hirofumi Sawa, Michihito Sasaki.
2. 発表標題 Characterization and seroprevalence of a new Nelson Bay orthoreovirus isolated from Indonesian fruit bats.
3. 学会等名 The 10th Sapporo Summer Seminar for One Health (SaSSOH) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kittiya Intaruck, Yukari Itakura, Mai Kishimoto, Herman Moses Chambaro, Agus Setiyono, Ekowati Handharyani, Kentaro Uemura, Hayato Harima, Yasuko Orba, Hirofumi Sawa, Michihito Sasaki.
2. 発表標題 Characterization and serological study of Nelson Bay orthoreovirus isolated from Indonesian fruit bats.
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kittiya Intaruck, Yukari Itakura, Mai Kishimoto, Herman Moses Chambaro, Agus Setiyono, Ekowati Handharyani, Takashi Kimura, Yasuko Orba, Hirofumi Sawa, Michihito Sasaki.
2. 発表標題 Virological and serological characterization of a new Nelson Bay Orthoreovirus isolated from wild fruit bats in Indonesia
3. 学会等名 One Health Lecture Series: Interdisciplinary Approach Reinforces Sustainable Development Goals (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kittiya Intaruck, Agus Setiyono, Ekowati Handharyani, Yasuko Orba, Hirofumi Sawa, Michihito Sasaki
2. 発表標題 Isolation and Characterization of an Orthoreovirus from Indonesian Fruit Bats
3. 学会等名 第44回分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kittiya Intaruck, Mai Kishimoto, Yukari Itakurai, Koshiro Tabata, Agus Setiyono, Ekowati Handharyani, Yasuko Orba, Hirofumi Sawa, Michihito Sasaki
2. 発表標題 Isolation and characterization of Mammalian Orthoreovirus from Pteropus vampyrus bats in Indonesia.
3. 学会等名 第70回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kittiya Intaruck, Koshiro Tabata, Yukari Itakura, Nijiho Kawaguchi, Mai Kishimoto, Agus Setiyono, Ekowati Handharyani, Yasuko Orba, Hirofumi Sawa, Michihito Sasaki
2. 発表標題 Isolation and characterization of Mammalian Orthoreovirus from Pteropus vampyrus bats in Indonesia.
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所 分子病態・診断部門 https://www.czc.hokudai.ac.jp/pathobiol/ 北海道大学ワクチン研究開発拠点 https://www.ivred.hokudai.ac.jp/
--

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 靖子 (Yasuko Orba) (60507169)	北海道大学・人獣共通感染症国際共同研究所・教授 (10101)	
研究 分 担 者	佐々木 道仁 (Michihito Sasaki) (70609403)	北海道大学・人獣共通感染症国際共同研究所・准教授 (10101)	

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			
アイルランド	アイルランド国立大学ダブリン校			