

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 DOYSABAS Karla Cristine Callano

論 文 題 目

Development of novel method for rapid and accurate detection  
of viral infection

(ウイルス感染の迅速な検出に関する新規手法の開発)

論文審査担当者

主 査	名古屋大学教授	本 道 栄 一
委 員	名古屋大学教授	池 田 素 子
委 員	名古屋大学教授	山 本 直 之
委 員	名古屋大学准教授	阿 部 秀 樹
委 員	名古屋大学助教	飯 田 敦 夫
委 員	名古屋大学助教	山 田 早 人

## 論文審査の結果の要旨

## 別紙 1 - 2

ウイルス学は、タバコの葉の抽出液が、フィルターによって細菌を除去した後も感染性を持つというイワノフスキーらの研究から誕生した（1886年）。当時、彼らは、フィルターを通過しないとても小さな細菌か毒素がその原因であると考えたが、後にタバコモザイクウイルスが原因であることが明らかとなった。動物では、1898年に、やはり滅菌フィルター通過物が、口蹄疫を引き起こした。1913年になり、ワクチニアウイルスがモルモットの角膜組織で増殖することが示され、1931年になると発育鶏卵がウイルスの培養に利用されるようになった。1949年に、ポリオウイルスがヒトの胚細胞を利用して培養できることが報告され、哺乳類培養細胞における細胞変性効果という用語が初めて記載された。

以降、哺乳類に感染するウイルスの分離に際しては、感染が疑われる組織抽出液を哺乳類の培養細胞へ接種し、光学顕微鏡を用いて細胞変性効果を検出することでその存在を確認するという手法が世界標準となった。

一方、光学顕微鏡による細胞変性効果を示さないウイルスについては、その後の解析がなされないことがほとんどで、サンプルはそのまま放置されるか廃棄されていた。

Doysabas はこれまで、台湾、中国、韓国、フィリピン、タイで材料採集したコウモリの器官や糞からのウイルス分離を試みてきた（光学顕微鏡下での細胞変性効果の検出）。新種のベータコロナウイルスと思われる遺伝子断片や脳心筋炎ウイルスゲノムの検出には成功したもののウイルス分離には至らなかった（Doysabas *et al* *Virus Res* 259, 2019）。

そこで、Doysabas は、光学顕微鏡下での細胞変性効果の検出より、より感度の高い検出方法の開発に取り組んだ。C型肝炎ウイルスは、多くの場合、光学顕微鏡下での細胞変性効果は検出されないが、感染した細胞における細胞内 ATP レベルが変化することが知られていたため、ATP の細胞内レベルの変化を細胞変性効果の兆候ととらえて研究を進めた。FRET 原理に基づく ATP 結合タンパク質 ATeam probe の組み換えタンパク質を恒常的に発現する BHK 細胞を作製し、光学顕微鏡下での細胞変性効果を示さないウイルスを含む 9 種のウイルスを例に、ATP レベルの変化に基づいた細胞変性効果を指標としたウイルス分離技術の有効性を調査した。

まず、病原性の観点で重要なウイルスは、高い封じ込めレベルを必要とするため、サンプルを共焦点レーザー顕微鏡の設置場所のバイオセーフティレベルまで落とす必要があった。そのためにはホルマリン処理が有効であるため、作製した組み換え ATeam probe が ATP に結合するかどうかを確認した後に、ホルマリン処理に耐えるかどうかの検討を行った。細胞内 ATP レベルの指標となる Venus/CFP 率は、ホルマリン処理によって半減するものの、ATP レベルの測定には問題ないことが明らかとなった。実験系の前提が確保されたところで、前述の 9 種のウイルスを用いた感染実験を行い、ATP レベルの変化を指標とした細胞変性効果と光学顕微鏡下での細胞変性効果の感度の違いを検討した。

MOI1-3 の量でウシ下痢症ウイルスを ATeam 発現 BHK 細胞に感染させたところ、感染後 3 時間では、MOI5 の量で対照群との間に有意差が認められた。ウシ下痢症ウイルスは、BHK 細胞に感染しても光学顕微鏡下での細胞変性効果は認められないため、ATeam 発現 BHK 細胞は

## 論文審査の結果の要旨

### 別紙 1 - 2

非常に高い感度で細胞変性効果を検出できる可能性が示唆された。同様の実験を、BHK 細胞に対してそれぞれ約 16 時間、約 2 日間で細胞変性効果を示す脳脊髄炎ウイルスおよび日本脳炎ウイルスを用いて行った。結果、ウシ下痢症ウイルスと同様、ウイルス感染後 3 時間で ATP レベルに変化が現れた。

以上の結果は、共焦点レーザー顕微鏡で得られた細胞の画像から細胞質部分を手動でトレースして計算したものであり、解析全体の素早さと客観性に劣る。従って、画像処理を自動化するソフトウェアの開発を行った。

アカバネウイルス、ウシコロナウイルス、ウシエンテロウイルス、ウシパラインフルエンザ 3 型ウイルス、ウシ伝染性鼻気管炎ウイルス、ブタ Ka2 型テスコウイルスを ATeam 発現 BHK 細胞に感染させ (MOI0.25, 0.75, 1.25)、ATP レベルによる細胞変性効果の検出を行った。それぞれのウイルスで、最少 60 個の細胞をソフトウェアで自動採集し、Venus/CFP 率を自動で計算した。なお、光学顕微鏡下での細胞変性効果は、前者 4 つのウイルスで、約 3 日、約 6 日、約 5 日、約 6 日かかるものの、ウシ伝染性鼻気管炎ウイルス、ブタ Ka2 型テスコウイルスは細胞変性効果を示さない。

結果、すべてのウイルス感染細胞で、ウイルス接種後 3 時間で ATP レベルに統計学的に有意な変化が現れた。以上より、ウイルス感染による ATP レベルの変化は、非常に迅速に現れることが明らかとなり、Doysabas の作製した ATeam 発現 BHK 細胞は、迅速な新規ウイルス検出に非常に有効なものだと思われた。

以上の研究結果を踏まえた論文審査および筆記・口述試験の結果を総合的に判断し、Doysabas は博士の学位にふさわしい学識を備えていると判断した。