

2. 動物由来ウイルスの探索および性伏解析

佐々木 道 仁

北海道大学 人獣共通感染症国際共同研究所

新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）を含む人獣共通感染症原因ウイルスの多くは野生動物を起源とする。今後も発生することが予想される新たなウイルス性人獣共通感染症への備えとして、さまざまなウイルスの自然宿主、自然界における存続機構と伝播経路に関する知見を蓄積することが重要である。筆者らは、アフリカおよびインドネシアの研究者と共同で、現地のコウモリ、げっ歯類動物、霊長類動物および節足動物が保有するウイルスを対象とした研究を実施している。これまでに、上記の動物から、人に病気を起こすウイルスやこれまで知られていない新規ウイルスを多数見出した。本稿では、パルボウイルスとロタウイルスに関する成果を中心として紹介したい。

1. はじめに

人獣共通感染症（zoonosis）は脊椎動物と人の間で自然に伝播する疾病または感染症と定義される。人に疾病を惹き起こす病原微生物の内58%は動物由来であり、新興・再興感染症の60 - 73%は人獣共通感染症と試算される^{1,2)}。現在、我々の社会活動、経済活動に大きな影響を及ぼしている新型コロナウイルス感染症（COVID-19）も、コウモリのコロナウイルスを起源とする人獣共通感染症と考えられている^{3,4)}。昨今の気候変動、人や物の移動のグローバル化、人の生活域の拡大に伴う森林伐採、動物取引の需要拡大、外来種の侵入は人と動物の接触機会を増加させ、新たな人獣共通感染症の発生誘因となることが危惧されている^{5,6)}。最近のメタアナリシスの結果によると、ラッサウイルス、ハンタウイルス、コウモリコロナウイルスなどが、今後、動物から人へspilloverするリスクが高いウイルスとして抽出されている⁷⁾。上記の感染症に加えて、インフ

ルエンザ、エボラ出血熱、重症熱性血小板減少症候群（SFTS）、ジカウイルス感染症など、近年、公衆衛生上大きな問題となっているウイルス性人獣共通感染症は、いずれも野生動物を起源とする。したがって、野生動物が保有する多様なウイルスに関する知見は、将来、類似のウイルスによる新規のウイルス性人獣共通感染症が発生したときに、その自然宿主、伝播様式、進化系統、病原性などの研究を進め、対策を講じる上で重要な情報となる^{8,9)}。

筆者が所属する北海道大学 人獣共通感染症国際共同研究所は、ザンビア大学 獣医学部およびインドネシア ボゴール農業大学 獣医学部とMemorandum of Understanding (MOU)を締結しており、筆者は現地の研究者と共同で野生動物材料の収集と解析を実施している。これまで、血清を用いた抗ウイルス抗体の調査、PCRや次世代シーケンサーを使用したウイルスゲノムの調査、動物試料からの感染性ウイルスの分離などの各種実験手法を駆使することで、動物が保有する様々なウイルス（ヘルペスウイルス科、アスファウイルス科、ポリオーマウイルス科、ポックスウイルス科、パルボウイルス科、スマコウイルス科、レオウイルス科、パラミクソウイルス科、ラブドウイルス科、ナイロウイルス科、ピコルナウイルス科、コロナウイルス科、フラビウイルス科、トガウイルス科、ヘペウイルス科、レトロウイルス科に分類されるウイルス）を検出するとともに、その分布や病原性について研究を進めてきた¹⁰⁻²⁰⁾。本稿では、主にパルボウイルスとロタウイルスに関する研究成果を紹介する。なお、野生動物が保有するヘルペスウイルス、ポックスウイルス、ポリオーマウイルスを対象とした我々の研

連絡先

〒001-0020

北海道札幌市北区北20条西10丁目

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

TEL: 011-706-9513

FAX: 011-706-7370

E-mail: m-sasaki@czc.hokudai.ac.jp

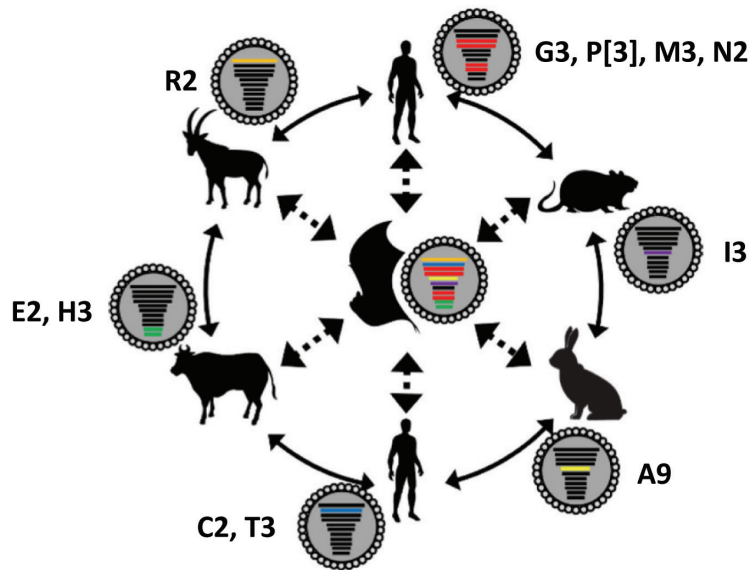


図1 検出した RVA LUS12-14 株 (G3-P[3]-I3-R2-C2-M3-A9-N2-T3-E2-H3 genotype) のフルゲノム解析結果から推測される RVA の種間伝播

究成果に関しては本誌第 67 巻の記事も参照して頂きたい²¹⁾。

2. パルボウイルス

Bufavirus (BuV) は、2012 年にブルキナファソにて原因不明の下痢症患者の便中から初検出されたパルボウイルスである²²⁾。その後、アフリカ、欧州、アジア、南米の地域の下痢症患者から類似の BuV の検出報告が相次いだ²³⁻²⁷⁾。BuV の病原性については結論が出ていないものの、BuV ゲノムは健常者に比べて下痢症患者に高率に検出され^{26,27)}、人から BuV に対する特異抗体が検出されていることから^{28,29)}、本ウイルス感染と下痢症の関連が疑われている。

当時、BuV の検出報告は人と実験用霊長類動物に限られていたが、筆者らはザンビアの民家周辺で採集した食虫目動物ジネズミの糞便メタゲノム解析から、予期せず BuV ゲノムに類似する塩基配列を検出した¹⁵⁾。他の野生動物種を検索した結果、ザンビアでは、ジネズミに加えて霊長類動物であるヒヒから、インドネシアではフルーツコウモリからヒト BuV に近縁のパルボウイルスが検出され、野生動物を宿主とする animal BuV の存在が明らかとなった^{15,16)}。また、検出したフルーツコウモリ由来 BuV のフルゲノム解析から、ブタパルボウイルス、及びサルパルボウイルスと相同な領域を見出しており、過去にこれらの動物間でパルボウイルスの種間伝播が発生したことが示唆された¹⁶⁾。

筆者らの論文発表後、他の研究者によってラット、ブタ、イヌ、ネコなどの動物から多様な BuV の検出報告が相次ぎ、これらの進化系統解析の結果から、BuV は種特異性を有し、宿主動物と共進化してきたことが示唆された³⁰⁻³⁶⁾。この後

に、ウイルスの分類を行う国際組織 International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) によって、筆者らがジネズミから検出した BuV は *Eulipotyphla protoparvovirus 1*、フルーツコウモリから検出した BuV は *Chiropteran protoparvovirus 1* として新種登録された³⁷⁾。

3. ロタウイルス

A 群ロタウイルス (RVA) は世界中に分布し、小児に重篤な下痢症を惹き起こす。発展途上国において、下痢症は小児の主要な死亡要因であり、RVA は年間 20 万人以上を死に至らしめる³⁸⁾。RVA のゲノムは 2 本鎖 RNA の 11 分節からなり、外殻タンパク質を構成する VP4 と VP7 によって血清型が規定される。従来、この VP4 と VP7 遺伝子分節の塩基配列によって、RVA の遺伝子型が分類されてきたが、新たに全 11 遺伝子分節の塩基配列に基づいた分類法 (VP7, VP4, VP6, VP1, VP2, VP3, NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5/6 の順に各分節の遺伝子型を記載する Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx) が採用された^{39,40)}。本分類法が普及したことで、RVA 株のより詳細な遺伝子型分類が可能となり、種間伝播や遺伝子再集合 (リアソータント) の検出など、RVA の進化に関する知見集積が加速している。

筆者らは、ザンビアの洞窟に生息する食虫コウモリの糞便メタゲノム解析を実施し、RVA (LUS12-14 株) を検出した。従来、コウモリから検出される RVA はいずれも他動物由来株とは遠縁であり、コウモリ種特異的な RVA 株とされていた^{41,42)}。しかしながら、筆者らが検出した LUS12-14 株は、全 11 分節のうち VP4 遺伝子と VP7 遺伝

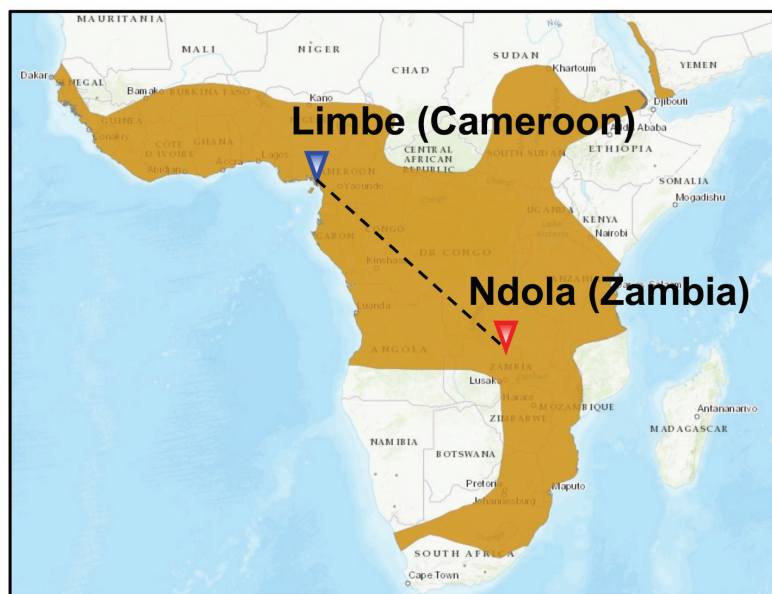


図2 RVA ZFB14-135株を検出したNdolaとRVA BatLi08株が検出されたLimbeの位置とストローオオコウモリ (*Eidolon helvum*) の生息域

出典：The IUCN Red List of Threatened Species⁴⁶⁾

子を含む6分節はヒト臨床株の分節と96–99%の塩基配列同一性を示し、残りの5分節は家畜や野生動物由来株と近縁であった¹⁷⁾。この結果は、コウモリがヒトと同じ遺伝子型のRVAに感受性を有しており、種間伝播とリアソータントによるRVAの遺伝的多様性獲得に関与していることを示唆するものであった(図1)。

コウモリのRVAについて、更なる知見を得るべくRT-PCRスクリーニングを実施し、ザンビアのフルーツコウモリから上述のLUS12-14株とは異なるRVA(ZFB14-52株, ZFB14-126株, ZFB14-135株)を検出した。ルーセットオオコウモリ(*Rousettus aegyptiacus*)から検出したZFB14-126株は、NSP2, NSP5遺伝子分節が既存の遺伝子型と大きく異なる塩基配列を有していたことから、RVAの遺伝子型を管理する国際組織Rotavirus Classification Working Groupへ塩基配列を送付、遺伝子型を照会したところ、ZFB14-126株を分類するために新たに遺伝子型N21, E27が設けられた¹⁸⁾。一方、ストローオオコウモリ(*Eidolon helvum*)から検出したZFB14-52, ZFB14-135株は、別の研究者がケニアのストローオオコウモリから検出したRVA BatLi08株の遺伝子分節と97-99%同一の塩基配列を有していた^{18,43)}。これらのRVA陽性サンプルが採集されたザンビアのNdolaとケニアのLimbeは2800 kmの距離があるが、ストローオオコウモリは3000 kmを超える長距離を移動する習性を持つことから⁴⁴⁻⁴⁶⁾、この”渡り”によってRVAが遠隔地に伝播することが示唆された(図2)。

4. 様々なウイルス分離に関する取り組み

次世代シーケンサーの普及により、サンプル中に含まれるウイルスの網羅的解析(メタゲノム解析)が可能となり、新規ウイルスを含む様々なウイルスのゲノム塩基配列が検出されてきた。本稿執筆時点で、GenBankデータベースにはウイルス由来と分類される塩基配列が853万件登録されている。ICTVによって認定されたウイルス種数は、2011年は2480種であったが、2021年には10434種となり、この10年で4倍に増加した(図3)⁴⁷⁾。これらの知見から、自然界には既存のウイルス株と大きく異なる塩基配列を有する同種のウイルス(新規遺伝子型ウイルス)、あるいは、より多様性に富んだ塩基配列を有し既存の種分類に当てはまらないウイルス(新種ウイルス)を含む多様なウイルスが存在することがわかってきた(Virosphereの概念)⁴⁸⁻⁵⁰⁾。しかしながら、これら新規ウイルスを対象とした研究はウイルスゲノム塩基配列解析が主流であり、感染性ウイルスの分離を経て、その宿主域や臓器指向性、病原性といった解析まで至るものは極めて少ない。環境サンプルから検出されたウイルスに至っては、その由来(宿主)すら不明なことが多い⁵⁰⁾。筆者らは、野生動物材料から懸濁液や組織乳剤を調製し、培養細胞へ接種することでヘルペスウイルス、フラビウイルス、ナイロウイルス、ピコルナウイルス、オルソレオウイルス、レトロウイルスを分離し、その性状を解析している^{13,20,51-56)}。このうち、インドネシアにて採取したコウモリの脾臓から分離した新規ヘルペスウ

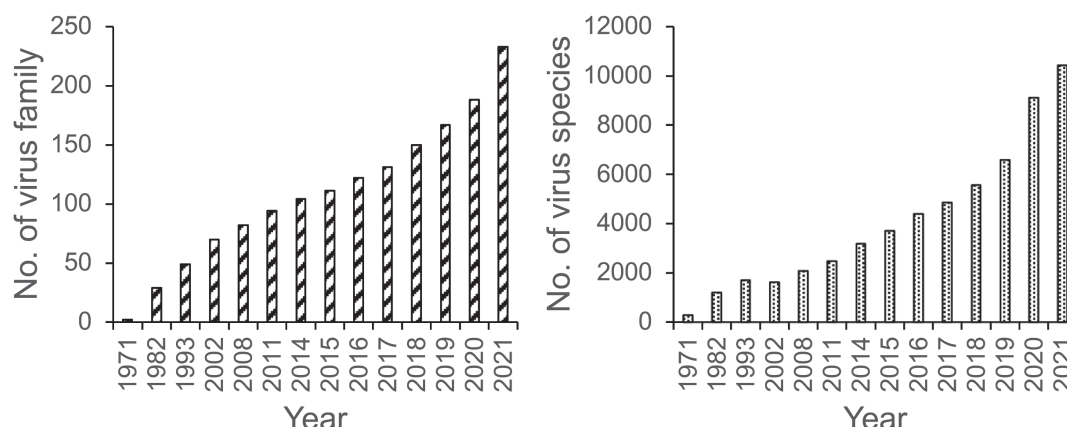


図3 ICTVによって規定されるウイルス科（左）とウイルス種（右）総数の推移⁴⁷⁾

イルス（FBAHV1と命名）は、全ゲノム塩基配列が判明した最初のコウモリ由来アルファヘルペスウイルスであり、本ウイルスの発見報告を受けて、ICTVによりアルファヘルペスウイルス種 *Pteropodid alphaherpesvirus 1* が新設された。FBAHV1は *Simplexvirus* 属に分類されヒト単純ヘルペスウイルス1型に類縁であるが、本ウイルスはマウスに肝細胞の多発性巣状壊死を伴う致死感染を引き起こす¹³⁾。複数の地域から、FBAHV1に対するPCR陽性および中和抗体陽性のコウモリが検出され、本ウイルスがインドネシア広域に分布していることが示唆されており、FBAHV1の種間伝播について監視が必要と考えている¹³⁾。

より多くの野生動物由来ウイルスの生物学的性状を解析することを目的として、筆者らは高感度ウイルス分離手法の導入に取り組んでいる。本稿で取り上げたRVAは、宿主のプロテアーゼによって外殻タンパク質が開裂し、感染性を獲得する⁵⁷⁾。既報により、インフルエンザウイルス、パラミクソウイルス、コロナウイルスは宿主の膜貫通型セリンプロテアーゼ（Type II Transmembrane Serine Proteases: TTSPs）によって、外殻タンパク質が開裂し、感染が促進されることが判明している^{58,59)}。そこで、筆者らはRVAの感染を促進するTTSPをスクリーニングし、細胞表面のTMPRSS2、TMPRSS11DがRVA細胞内侵入過程においてVP4を開裂し、ウイルス感染を促進することを見出した（図4）⁶⁰⁾。また、RVAの分離、増殖に汎用されるサル腎由来MA104細胞にTMPRSS2とTMPRSS11Dを共発現させたMA104-T2T11D細胞は複数のヒト由来RVA株、ウシ由来RVA株に高い感受性を示した⁶⁰⁾。加えて、培養細胞を用いたRVA臨床株の増殖はトリプシンを添加した無血清培地で実施する必要があるが、MA104-T2T11D細胞ではトリプシンが失活するFBS含有培地においてもRVAが増殖することから、本細胞がウイルス

分離に有用と考えられる。実際に、筆者らはこのMA104-T2T11D細胞を用いて野生動物サンプルから合計4株の新規遺伝子型RVAの分離に成功しており、現在その生物学的性状を解析中である。

5. おわりに

将来、人獣共通感染症を惹き起こす可能性がある（潜在的な人獣共通感染症）ウイルスのリスクを考察するには、地道な材料収集とサーベイランスが不可欠である。本稿で述べたように、筆者らは野生動物が保有する既知および新規ウイルスを研究対象とし、自然界におけるウイルスの分布、多様性、生活環に関する知見を蓄積してきた。筆者らは、ザンビアでのヒト臨床サンプルを用いたウイルス調査を計画しており、ヒト、野生動物の両面からウイルス探索研究を展開することで、ヒトと野生動物間のウイルス伝播に関する新たな知見が得られることを期待している。

比較的安価で携帯可能なナノポアシーケンサーの登場によって、高額機器を導入せずともウイルスゲノムの検出や塩基配列解析が可能となり、特に新規ウイルスに関する研究の進展が予想される。一方、こうした核酸解析技術の著しい進歩に伴い、新規ウイルスの研究は、そのゲノム核酸検出、塩基配列解析に偏重している印象がある。データベースに登録されていないウイルス塩基配列を追い求めるだけでなく、できるだけ多くのウイルスを分離し、その感染・増殖様式、臓器指向性や病原性といった基本的な生物学的性状解析を進めて行く必要がある。

今後も研究を継続し、人獣共通感染症国際共同研究所が掲げる人獣共通感染症制圧のための感染症の発生予測、対策準備といった先回り戦略の実現に貢献したい。

6. 謝辞

本研究は、北海道大学 人獣共通感染症国際共同研究所

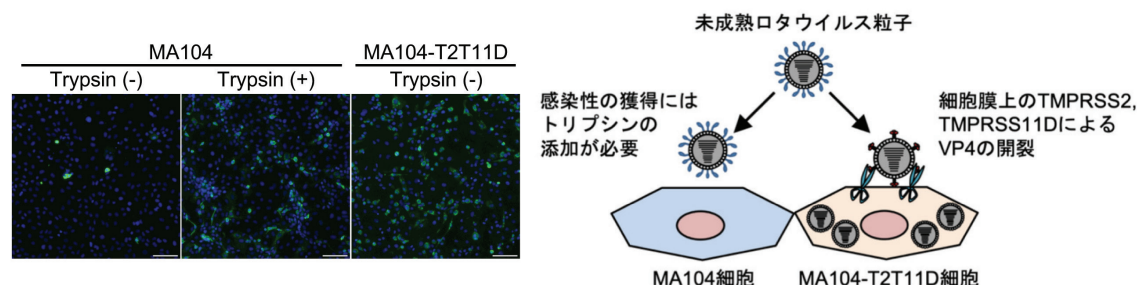


図4 TMPRSS2, TMPRSS11D による A 群ロタウイルス (RVA) 感染の促進

蛍光抗体を使用した RVA 感染細胞 (緑色) の染色像。RVA の増殖はトリプシン添加培地が使用されるが、筆者が樹立した MA104-T2T11D 細胞を使用することでトリプシン非存在化でも RVA を増殖させることができる⁶⁰⁾

澤洋文先生、木村享史先生のご指導のもとで実施したものです。私がプロジェクトに参画した時には、すでに先生達の尽力によって海外の研究者と強固な共同研究体制が構築されていましたが、私自身は海外でのフィールドワークに大変不慣れであったため、苦勞して採集したサンプルを使って自分でも何らかの成果を出したいという思い入れと共に研究を進めました。メタゲノム解析の手法を取り入れて以降は、対象とするウイルス種を特定せず、様々なウイルスに興味を拡大していきましたが、そうした私の希望を尊重、支援して下さいました。本研究では、自ら採集したものではなく、共同研究者の支援のもとで使用させて頂いた貴重なサンプルが多く含まれます。高田礼人先生、伊藤直人先生、大場靖子先生、Mweene Aaron 先生、Hang'ombe Bernard 先生、Setiyono Agus 先生、Handharyani Ekowati 先生を始めとして、国内外の大変多くの共同研究者に御支援を頂きましたことを、この場をお借りして御礼申し上げます。最後に、日本ウイルス学会杉浦奨励賞に御推薦下さいました、松浦善治先生、喜田宏先生、澤洋文先生に深く感謝申し上げます。

7. 利益相反事項の開示

本稿に関連し、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

参考文献

- 1) Woolhouse ME, Gowtage-Sequeria S. Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerg Infect Dis.* 2005 Dec;11(12):1842-7.
- 2) Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, Daszak P. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature.* 2008 Feb 21;451(7181):990-3.
- 3) Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, Si HR, Zhu Y, Li B, Huang CL, Chen HD, Chen J, Luo Y, Guo H, Jiang RD, Liu MQ, Chen Y, Shen XR, Wang X, Zheng XS, Zhao K, Chen QJ, Deng F, Liu LL, Yan B, Zhan FX, Wang YY, Xiao GF, Shi ZL. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020 Mar;579(7798):270-273.
- 4) Boni MF, Lemey P, Jiang X, Lam TT, Perry BW, Castoe TA, Rambaut A, Robertson DL. Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic. *Nat Microbiol.* 2020 Nov;5(11):1408-1417.
- 5) Dobson AP, Pimm SL, Hannah L, Kaufman L, Ahumada JA, Ando AW, Bernstein A, Busch J, Daszak P, Engelmann MF, Kinnaird MF, Li BV, Loch-Temzelides T, Lovejoy T, Nowak K, Roehrdanz PR, Vale MM. Ecology and economics for pandemic prevention. *Science.* 2020 Jul 24;369(6502):379-381.
- 6) Zhang L, Rohr J, Cui R, Xin Y, Han L, Yang X, Gu S, Du Y, Liang J, Wang X, Wu Z, Hao Q, Liu X. Biological invasions facilitate zoonotic disease emergences. *Nat Commun.* 2022 Apr 1;13(1):1762.
- 7) Grange ZL, Goldstein T, Johnson CK, Anthony S, Gilardi K, Daszak P, Olival KJ, O'Rourke T, Murray S, Olson SH, Togami E, Vidal G; Expert Panel; PRE-DICT Consortium, Mazet JAK; University of Edinburgh Epigroup members those who wish to remain anonymous. Ranking the risk of animal-to-human spillover for newly discovered viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021 Apr 13;118(15):e2002324118.
- 8) Karesh WB, Dobson A, Lloyd-Smith JO, Lubroth J, Dixon MA, Bennett M, Aldrich S, Harrington T, Formenty P, Loh EH, Machalaba CC, Thomas MJ, Heymann DL. Ecology of zoonoses: natural and unnatural histories. *Lancet.* 2012 Dec 1;380(9857):1936-45.
- 9) 宮沢孝幸, 中川草. 新型コロナウイルス SARS-CoV-2 の比較ウイルス学と比較ゲノム解析. *実験医学.* 2020; 8(5):1338-1347.
- 10) Sasaki M, Setiyono A, Handharyani E, Rahmadani I, Taha S, Adiani S, Subangkit M, Sawa H, Nakamura I, Kimura T. Molecular detection of a novel paramyxovirus in fruit bats from Indonesia. *Virol J.* 2012 Oct 19;9:240.

- 11) Sasaki M, Ishii A, Orba Y, Thomas Y, Hang'ombe BM, Moonga L, Mweene AS, Ogawa H, Nakamura I, Kimura T, Sawa H. Human parainfluenza virus type 3 in wild nonhuman primates, Zambia. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(9):1500-3.
- 12) Sasaki M, Muleya W, Ishii A, Orba Y, Hang'ombe BM, Mweene AS, Moonga L, Thomas Y, Kimura T, Sawa H. Molecular epidemiology of paramyxoviruses in Zambian wild rodents and shrews. *J Gen Virol.* 2014 Feb;95(Pt 2):325-330.
- 13) Sasaki M, Setiyono A, Handharyani E, Kobayashi S, Rahmadani I, Taha S, Adiani S, Subangkit M, Nakamura I, Sawa H, Kimura T. Isolation and characterization of a novel alphaherpesvirus in fruit bats. *J Virol.* 2014 Sep 1;88(17):9819-29.
- 14) Sasaki M, Orba Y, Ueno K, Ishii A, Moonga L, Hang'ombe BM, Mweene AS, Ito K, Sawa H. Metagenomic analysis of the shrew enteric virome reveals novel viruses related to human stool-associated viruses. *J Gen Virol.* 2015 Feb;96(Pt 2):440-452.
- 15) Sasaki M, Orba Y, Anindita PD, Ishii A, Ueno K, Hang'ombe BM, Mweene AS, Ito K, Sawa H. Distinct Lineages of Bufavirus in Wild Shrews and Nonhuman Primates. *Emerg Infect Dis.* 2015 Jul;21(7):1230-3.
- 16) Sasaki M, Gonzalez G, Wada Y, Setiyono A, Handharyani E, Rahmadani I, Taha S, Adiani S, Latief M, Kholilullah ZA, Subangkit M, Kobayashi S, Nakamura I, Kimura T, Orba Y, Ito K, Sawa H. Divergent bufavirus harboured in megabats represents a new lineage of parvoviruses. *Sci Rep.* 2016 Apr 26;6:24257.
- 17) Sasaki M, Orba Y, Sasaki S, Gonzalez G, Ishii A, Hang'ombe BM, Mweene AS, Ito K, Sawa H. Multi-reassortant G3P[3] group A rotavirus in a horseshoe bat in Zambia. *J Gen Virol.* 2016 Oct;97(10):2488-2493.
- 18) Sasaki M, Kajihara M, Changula K, Mori-Kajihara A, Ogawa H, Hang'ombe BM, Mweene AS, Simuunza M, Yoshida R, Carr M, Orba Y, Takada A, Sawa H. Identification of group A rotaviruses from Zambian fruit bats provides evidence for long-distance dispersal events in Africa. *Infect Genet Evol.* 2018 Sep; 63:104-109.
- 19) Anindita PD, Sasaki M, Gonzalez G, Phongphaew W, Carr M, Hang'ombe BM, Mweene AS, Ito K, Orba Y, Sawa H. Discovery and genetic characterization of diverse smacoviruses in Zambian non-human primates. *Sci Rep.* 2019 Apr 8;9(1):5045. doi: 10.1038/s41598-019-41358-z. Erratum in: *Sci Rep.* 2019 Jun 6;9(1):8502.
- 20) Kishimoto M, Hang'ombe BM, Hall WW, Orba Y, Sawa H, Sasaki M. *Mastomys natalensis* is a possible natural rodent reservoir for encephalomyocarditis virus. *J Gen Virol.* 2021 Mar;102(3).
- 21) 澤洋文, 佐々木道仁, 大場靖子. ザンビア, インドネシアにおける野生動物が保有する DNA ウイルスの探索. *ウイルス.* 2017;67(2):151-160.
- 22) Phan TG, Vo NP, Bonkougou IJ, Kapoor A, Barro N, O'Ryan M, Kapusinszky B, Wang C, Delwart E. Acute diarrhea in West African children: diverse enteric viruses and a novel parvovirus genus. *J Virol.* 2012 Oct;86(20):11024-30.
- 23) Yahiro T, Wangchuk S, Tshering K, Bandhari P, Zangmo S, Dorji T, Tshering K, Matsumoto T, Nishizono A, Söderlund-Venermo M, Ahmed K. Novel human bufavirus genotype 3 in children with severe diarrhea, Bhutan. *Emerg Infect Dis.* 2014 Jun;20(6): 1037-9.
- 24) Väisänen E, Kuisma I, Phan TG, Delwart E, Lappalainen M, Tarkka E, Hedman K, Söderlund-Venermo M. Bufavirus in feces of patients with gastroenteritis, Finland. *Emerg Infect Dis.* 2014 Jun;20(6):1077-79.
- 25) Smits SL, Schapendonk CM, van Beek J, Vennema H, Schürch AC, Schipper D, Bodewes R, Haagmans BL, Osterhaus AD, Koopmans MP. New viruses in idiopathic human diarrhea cases, the Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2014 Jul;20(7):1218-22.
- 26) Chieochansin T, Vutithanachot V, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Bufavirus in fecal specimens of patients with and without diarrhea in Thailand. *Arch Virol.* 2015 Jul;160(7):1781-4.
- 27) Altay A, Yahiro T, Bozdayi G, Matsumoto T, Sahin F, Ozkan S, Nishizono A, Söderlund-Venermo M, Ahmed K. Bufavirus genotype 3 in Turkish children with severe diarrhoea. *Clin Microbiol Infect.* 2015 Oct;21(10):965.e1-4.
- 28) Väisänen E, Paloniemi M, Kuisma I, Lithovius V, Kumar A, Franssila R, Ahmed K, Delwart E, Vesikari T, Hedman K, Söderlund-Venermo M. Epidemiology of two human protoparvoviruses, bufavirus and tusavirus. *Sci Rep.* 2016 Dec 14;6:39267.
- 29) Väisänen E, Mohanraj U, Kinnunen PM, Jokelainen P, Al-Hello H, Barakat AM, Sadeghi M, Jalilian FA, Majlesi A, Masika M, Mwaengo D, Anzala O, Delwart E, Vapalahti O, Hedman K, Söderlund-Venermo M. Global Distribution of Human Protoparvoviruses. *Emerg Infect Dis.* 2018 Jul;24(7):1292-1299.
- 30) Yang S, Liu D, Wang Y, Qu F, He Y, Sun Z, Shen Q, Li W, Fu X, Deng X, Zhang W, Delwart E. Bufavirus Protoparvovirus in feces of wild rats in China. *Virus Genes.* 2016 Feb;52(1):130-3.
- 31) Hargitai R, Pankovics P, Kertész AM, Bíró H, Boros Á, Phan TG, Delwart E, Reuter G. Detection and genetic characterization of a novel parvovirus distantly related to human bufavirus in domestic pigs. *Arch Virol.* 2016 Apr;161(4):1033-7.
- 32) Liu L, Schwarz L, Ullman K, Ahola H, Qiu Y, Ma Z, Hennig-Pauka I. Identification of a novel bufavirus in domestic pigs by a viral metagenomic approach. *J Gen Virol.* 2016 Jul;97(7):1592-1596.
- 33) Martella V, Lanave G, Mihalov-Kovács E, Marton S, Varga-Kugler R, Kaszab E, Di Martino B, Camero M, Decaro N, Buonavoglia C, Bányai K. Novel Parvovirus Related to Primate Bufaviruses in Dogs. *Emerg Infect Dis.* 2018 Jun;24(6):1061-1068.
- 34) Diakoudi G, Lanave G, Capozza P, Di Profio F, Melegari I, Di Martino B, Pennisi MG, Elia G, Cavalli A, Tempesta M, Camero M, Buonavoglia C, Bányai K, Martella V. Identification of a novel parvovirus in

- domestic cats. *Vet Microbiol.* 2019 Jan;228:246-251.
- 35) Li J, Cui L, Deng X, Yu X, Zhang Z, Yang Z, Delwart E, Zhang W, Hua X. Canine bufavirus in faeces and plasma of dogs with diarrhoea, China. *Emerg Microbes Infect.* 2019;8(1):245-247.
 - 36) Sun W, Zhang S, Huang H, Wang W, Cao L, Zheng M, Yin Y, Zhang H, Lu H, Jin N. First identification of a novel parvovirus distantly related to human bufavirus from diarrheal dogs in China. *Virus Res.* 2019 May;265:127-131.
 - 37) Cotmore SF, Agbandje-McKenna M, Canuti M, Chiorini JA, Eis-Hubinger AM, Hughes J, Mietzsch M, Modha S, Ogliastro M, Pénzes JJ, Pintel DJ, Qiu J, Soderlund-Venermo M, Tattersall P, Tijssen P, Ictv Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Parvoviridae. *J Gen Virol.* 2019 Mar;100(3):367-368.
 - 38) Crawford SE, Ramani S, Tate JE, Parashar UD, Svensson L, Hagbom M, Franco MA, Greenberg HB, O'Ryan M, Kang G, Desselberger U, Estes MK. Rotavirus infection. *Nat Rev Dis Primers.* 2017 Nov 9;3:17083. doi: 10.1038/nrdp.2017.83. PMID: 29119972; PMCID: PMC5858916.
 - 39) Matthijnssens J, Ciarlet M, Rahman M, Attoui H, Bányai K, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gómara M, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Patton JT, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Desselberger U, Van Ranst M. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol.* 2008;153(8):1621-9.
 - 40) Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Bányai K, Brister JR, Buesa J, Esona MD, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gómara M, Johne R, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Parreño V, Rahman M, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Patton JT, Desselberger U, Van Ranst M. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol.* 2011 Aug;156(8):1397-413.
 - 41) Esona MD, Mijatovic-Rustempasic S, Conrardy C, Tong S, Kuzmin IV, Agwanda B, Breiman RF, Bányai K, Niezgodá M, Rupprecht CE, Gentsch JR, Bowen MD. Reassortant group A rotavirus from straw-colored fruit bat (*Eidolon helvum*). *Emerg Infect Dis.* 2010 Dec;16(12):1844-52.
 - 42) He B, Yang F, Yang W, Zhang Y, Feng Y, Zhou J, Xie J, Feng Y, Bao X, Guo H, Li Y, Xia L, Li N, Matthijnssens J, Zhang H, Tu C. Characterization of a novel G3P[3] rotavirus isolated from a lesser horseshoe bat: a distant relative of feline/canine rotaviruses. *J Virol.* 2013 Nov;87(22):12357-66.
 - 43) Yinda CK, Zeller M, Conceição-Neto N, Maes P, Deboutte W, Beller L, Heylen E, Ghogomu SM, Van Ranst M, Matthijnssens J. Novel highly divergent reassortant bat rotaviruses in Cameroon, without evidence of zoonosis. *Sci Rep.* 2016 Sep 26;6:34209.
 - 44) Richter HV, Cumming GS. First application of satellite telemetry to track African straw - coloured fruit bat migration. *J Zool.* 2008;275(2):172-176.
 - 45) Ossa G, Kramer-Schadt S, Peel AJ, Scharf AK, Voigt CC. The movement ecology of the straw-colored fruit bat, *Eidolon helvum*, in sub-Saharan Africa assessed by stable isotope ratios. *PLoS One.* 2012;7(9):e45729.
 - 46) Cooper-Bohannon, R., Mickleburgh, S., Hutson, A.M., Bergmans, W., Fahr, J. & Racey, P.A. 2020. *Eidolon helvum*. The IUCN Red List of Threatened Species 2020: e.T7084A22028026. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-2.RLTS.T7084A22028026.en>.
 - 47) International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Master Species Lists. 2021. <https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl>
 - 48) Carroll D, Daszak P, Wolfe ND, Gao GF, Morel CM, Morzaria S, Pablos-Méndez A, Tomori O, Mazet JAK. The Global Virome Project. *Science.* 2018 Feb 23;359(6378):872-874.
 - 49) Zhang YZ, Shi M, Holmes EC. Using Metagenomics to Characterize an Expanding Virophere. *Cell.* 2018 Mar 8;172(6):1168-1172.
 - 50) Call L, Nayfach S, Kyrpides NC. Illuminating the Virophere Through Global Metagenomics. *Annu Rev Biomed Data Sci.* 2021 Jul 20;4:369-391.
 - 51) Ishii A, Ueno K, Orba Y, Sasaki M, Moonga L, Hang'ombe BM, Mweene AS, Umemura T, Ito K, Hall WW, Sawa H. A nairovirus isolated from African bats causes haemorrhagic gastroenteritis and severe hepatic disease in mice. *Nat Commun.* 2014 Dec 2;5:5651.
 - 52) Carr M, Kawaguchi A, Sasaki M, Gonzalez G, Ito K, Thomas Y, Hang'ombe BM, Mweene AS, Zhao G, Wang D, Orba Y, Ishii A, Sawa H. Isolation of a simian immunodeficiency virus from a malbrouck (*Chlorocebus cynosuros*). *Arch Virol.* 2017 Feb;162(2):543-548.
 - 53) Orba Y, Hang'ombe BM, Mweene AS, Wada Y, Anindita PD, Phongphaew W, Qiu Y, Kajihara M, Mori-Kajihara A, Eto Y, Sasaki M, Hall WW, Eshita Y, Sawa H. First isolation of West Nile virus in Zambia from mosquitoes. *Transbound Emerg Dis.* 2018 Aug;65(4):933-938.
 - 54) Wastika CE, Harima H, Sasaki M, Hang'ombe BM, Eshita Y, Qiu Y, Hall WW, Wolfinger MT, Sawa H, Orba Y. Discoveries of Exoribonuclease-Resistant Structures of Insect-Specific Flaviviruses Isolated in Zambia. *Viruses.* 2020 Sep 11;12(9):1017.
 - 55) Harima H, Sasaki M, Kajihara M, Gonzalez G, Simulundu E, Bwalya EC, Qiu Y, Okuya K, Isono M, Orba Y, Takada A, Hang'ombe BM, Mweene AS, Sawa H. Characterization of mammalian orthoreoviruses isolated from faeces of pigs in Zambia. *J Gen Virol.* 2020 Oct;101(10):1027-1036.
 - 56) Harima H, Sasaki M, Orba Y, Okuya K, Qiu Y, Wastika CE, Changula K, Kajihara M, Simulundu E, Yamaguchi T, Eto Y, Mori-Kajihara A, Sato A, Taniguchi S, Takada A, Saijo M, Hang'ombe BM, Sawa H. Attenuated infection by a Pteropine orthoreovirus isolated from an Egyptian fruit bat in Zambia. *PLoS*

- Negl Trop Dis. 2021 Sep 7;15(9):e0009768.
- 57) 河本聡志, 谷口孝喜. ロタウイルス. ウイルス. 2014;64(2):179-190.
- 58) 松山州徳. プロテアーゼ依存的なコロナウイルス細胞侵入. ウイルス. 2011;61(1):109-116.
- 59) 竹田誠. プロテアーゼ依存性ウイルス病原性発現機構と TMPRSS2. ウイルス. 2019;69(1):61-72.
- 60) Sasaki M, Itakura Y, Kishimoto M, Tabata K, Uemura K, Ito N, Sugiyama M, Wastika CE, Orba Y, Sawa H. Host serine proteases TMPRSS2 and TMPRSS11D mediate proteolytic activation and trypsin-independent infection in group A rotaviruses. J Virol. 2021 Mar 24;95(11):e00398-21.

Investigation of viruses harbored by wild animals: toward pre-emptive measures against future zoonotic diseases

Michihito SASAKI

Division of Molecular Pathobiology, International Institute for Zoonosis Control, Hokkaido University

Zoonoses are caused by pathogens transmitted from animals. To prepare mitigating measures against emerging zoonoses, it is imperative to identify animal reservoirs that carry potential pathogens and also elucidate the transmission routes of these pathogens. Under the continuous collaboration with counterparts from Zambia and Indonesia, we have so far identified various viruses in wild animals. Some of the identified viruses were phylogenetically distinct from known virus species and this finding led to approved new virus species by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Our studies provided new insights into the divergence, natural hosts and lifecycle of viruses. Through the exploration and characterization of viruses in animals, we will endeavor to contribute to the existing knowledge on viral pathogens in wild animals. This is cardinal for evidence-based preemptive measures against future zoonoses.