

平成30年 8月30日現在

機関番号：23303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07718

研究課題名(和文) 家畜の原因不明下痢症例におけるウイルスコミュニティの解明と新規ウイルスの検索

研究課題名(英文) Research of viral community for unexplained livestock diarrhea and discovery of novel gastrointestinal viruses

研究代表者

長井 誠 (NAGAI, Makoto)

石川県立大学・生物資源環境学部・教授

研究者番号：10540669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：家畜(牛および豚)の原因不明下痢症における消化管のウイルスコミュニティと未知のウイルスを解明するため、次世代シーケンサーによる糞便のメタゲノム解析を行ったところ、1つの新種のピコルナウイルスおよびポサウイルスの新しい遺伝子型を発見した。いずれものウイルスも下痢症との関連性をさらに検討する必要がある。また、トロウイルス、アストロウイルス、コブウイルス、エンテロウイルスおよびサポウイルスにおける遺伝子相同性組み換えを見出した。消化管内ウイルスは遺伝子組み換えにより血清学的多様性を保持し、農場の内で感染を継続させウイルス進化に寄与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To clarify viral community for unexplained livestock (cattle and pig) diarrhea and discover novel gastrointestinal viruses, bovine and porcine fecal samples were analyzed using a metagenomics approach. We identified a novel picornavirus and new genotypes of Posavirus. Further studies for pathogenicity of these viruses are needed. Multiple possible recombination events in toroviruses, astroviruses, kobuviruses, enteroviruses, and sapoviruses were identified, suggesting that recombination might have contributed to the serological diversity and played an important role in the continued infection and the evolution of viruses in the farms.

研究分野：獣医学、感染症学、ウイルス学

キーワード：家畜 下痢症 ウイルス メタゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

家畜の下痢症は生産性の低減につながる要因であり、特に幼弱な個体は下痢を起こしやすく、米国での子ウシ下痢症による被害額は年間 100-200 億円と試算されている。家畜の下痢症の原因は病原体によるものが多く、ウイルスでは A 群ロタウイルス、コロナウイルス、パルボウイルス、アデノウイルスが下痢症の原因となる病原体として確立されており、近年、培養法の確立や遺伝子情報の蓄積によって、トロウイルス、B 群および C 群ロタウイルスが新たな家畜下痢症の病原体として認識されるようになった。しかし、現在でも、原因が特定されず原因不明と診断される症例は少なくなく、我が国の乳牛においても、感染性と考えられる下痢症の原因調査では依然として 35%は原因が特定されていないとされている。このような中で近年、網羅的な遺伝子解析が可能である次世代シーケンサーが登場し、培養不能の病原体のメタゲノム解析が可能となり、これまで原因不明であった症例への応用が期待されている。

2. 研究の目的

本研究は、家畜の糞便中のウイルスコミュニティを明らかにして下痢症との関連を調査し、さらに新規のウイルスを探索することで、我が国のウイルス学に新しい知見をもたらし、畜産業の発展に貢献することを目的とした。本研究では、家畜(牛、豚)糞便中のウイルス遺伝子について次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析を行い、これまで実態が不明である、糞便中に存在する病原ウイルスとして確立されていないウイルスや新規のウイルスで構成されるウイルスコミュニティを明らかにし、家畜の下痢症との関連性

を調査する(図1)。

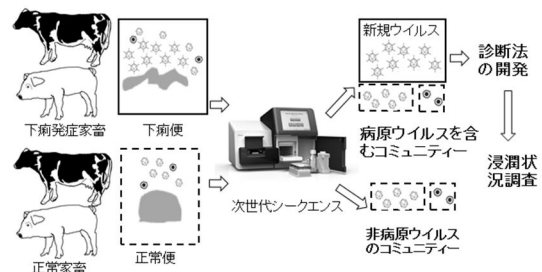


図1. 糞便の次世代シーケンサーによるメタゲノム解析をもとにした病原ウイルス検索のイメージ

3. 研究の方法

下痢便と正常便の両方を材料としてウイルス遺伝子解析を行い、検出されたウイルス遺伝子情報からウイルスの種類を同定する。検出されたウイルスがどのくらい浸潤しているかを確認するため、検出系を開発して調査する。本来、ウイルスの動物に対する病原性を調べるには、動物接種試験を行い、病原性を検討する必要があるが、本研究ではメタゲノム解析により下痢症に関わる可能性のあるウイルスを絞り込むことを目的とする。

4. 研究成果

3 都県 92 農場の牛から下痢便 120 検体および正常便 44 検体、9 県 77 農場の豚から下痢便 96 検体および正常便 126 検体を採取し、糞便から直接ウイルスゲノムを抽出し、次世代シーケンサーであるイルミナ社の MiSeq でメタゲノム解析を行った。集めた遺伝子データは各種バイオインフォマティクス解析ソフトで解析を行った。

(1)牛および豚の消化管内ウイルスコミュニティから新規ウイルスの発見：豚からこれまで報告のない新種のピコルナウイルス(豚ピコルナウイルスジャパン: PPVJ)、ポサウイルスの新規の遺伝子型ウイルスを発見した

(図2および3)。これらのウイルスは下痢、

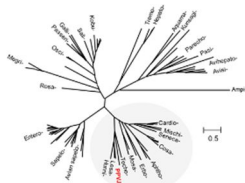
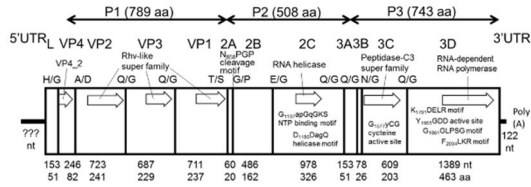


図2. 豚から検出された新規ピココロナウイルスの遺伝子構造とピココロナウイルス分子系統樹におけるポジション。新規ウイルス(豚ピココロナウイルスジャパン: PPVJ)はピココロナウイルススーパーグループ1に分類された

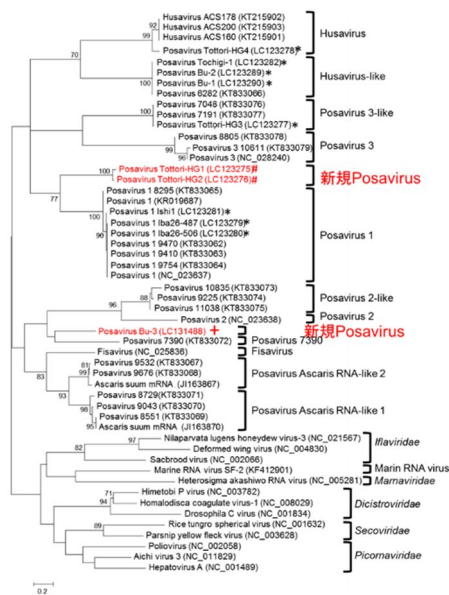


図3. ポサウイルスの新規遺伝子型の発見

正常いずれの便からも検出されたが、新規のウイルスであるため起病性に関する情報はまったく見当たらず、今後監視を行っていく必要があると考えられた(文献、)。また、これまでに下痢の原因として認識されているが、遺伝子情報が報告されていなかった牛ウイルス性下痢ウイルス1nおよび1o型、牛B群口炎ウイルスおよびサポウイルスX型およびXI型について、メタゲノム解析により遺伝子全長を初めて解読することに成功した(文献、)。

(2)消化管ウイルスコミュニティを形成す

るウイルスの遺伝子組み換え：牛トロウイルスは、近年牛の下痢症との関連が明らかになった病原体であり、その遺伝子情報はほとんど知られていなかった。今回の解析で、牛トロウイルス遺伝子の大部分は豚トロウイルスの遺伝子で構成されており、ウイルス粒子の表面蛋白をコードする領域のみが異なるキメラウイルスであることが明らかになった(図4)。トロウイルスは豚ではほとんど病原性を示さないが、遺伝子変異を起こした株が豚から牛へ種間伝播した結果、牛への病原性獲得につながった可能性が示された(文献)。

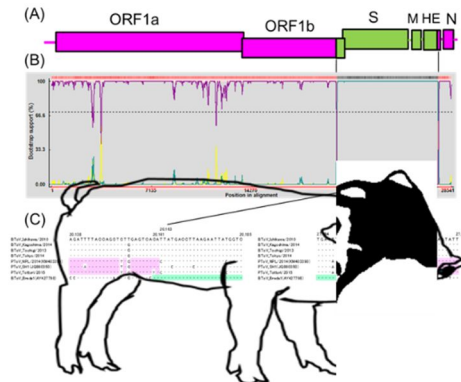


図4. 牛トロウイルスの遺伝子全長解析の結果、牛トロウイルスは豚トロウイルスとのキメラウイルスであることを発見した

今回、豚におけるメタゲノム解析で豚アストロウイルス、豚コブウイルス、豚エンテロウイルスおよび豚サポウイルスが正常便および下痢便の両方から検出されたことから、豚の消化管ウイルスコミュニティを構成するウイルスと考えられた。これらのウイルスの遺伝子全長を解析した結果、いずれのウイルスも遺伝子多様性を示し、さらにウイルス遺伝子相同性組み換えを起こしていることを発見した(図5)。遺伝子相同性組み換えによりウイルスは血清学的な多様性を得ることになり、農場の内で継続的に新規宿主に感染し、進化を続けていることが示唆された(文献、)。

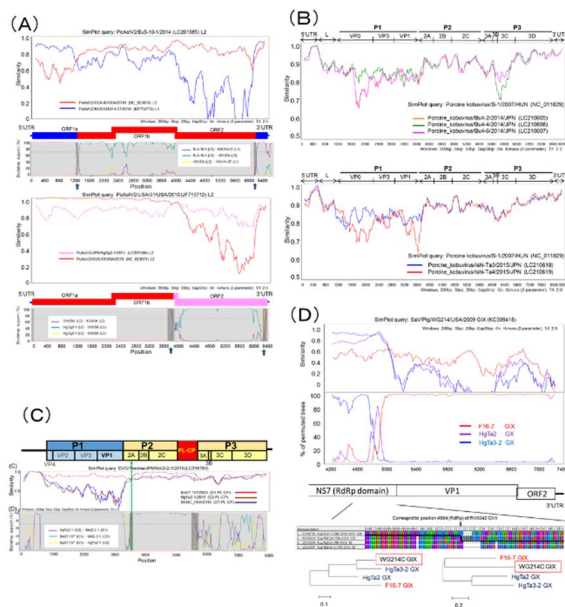


図5. 豚アストロウイルス(A)、豚コブウイルス(B)、豚エンテロウイルス(C)および豚サポウイルス(D)の遺伝子同源性組み換え

進化の過程で病原性を獲得する場合も考えられることから、糞便ウイルスは継続的に観察する必要があると思われた。

(3)糞便ウイルスの消化管外感染：

糞便ウイルスである牛アストロウイルスのサーベイランスを行っている中で、脳炎症状で死亡した黒毛和種育成牛の中枢神経から、我が国で初めて牛アストロウイルスを検出した(文献)。近年、人のアストロウイルス脳炎が報告され、消化管ウイルスであるアストロウイルスの中に中枢神経に親和性を示すグループがあることが報告されている。今後、糞便ウイルスは下痢症のみならず、他の疾患との関連を含め、調査を継続するべきと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

Hirashima Y, Okada D, Shibata S,

Yoshida S, Fujisono S, Omatsu T, Mizutani T, Nagai M. (2018) Whole genome analysis of a novel neurotropic bovine astrovirus detected in a Japanese black steer with non-suppurative encephalomyelitis in Japan. Arch Virol. (In press)
DOI: 10.1007/s00705-018-3898-3.

Tsuchiaka S, Naoi Y, Imai R, Masuda T, Ito M, Akagami M, Ouchi Y, Ishii K, Sakaguchi S, Omatsu T, Katayama Y, Oba M, Shirai J, Satani Y, Takashima Y, Taniguchi Y, Takasu M, Madarame H, Sunaga F, Aoki H, Makino S, Mizutani T, Nagai M. (2018) Genetic diversity and recombination of enterovirus G strains in Japanese pigs: High prevalence of strains carrying a papain-like cysteine protease sequence in the enterovirus G population. Plos One. 13(1):e0190819.
DOI: 10.1371/journal.pone.0190819

Kuroda M, Masuda T, Ito M, Naoi Y, Doan YH, Haga K, Tsuchiaka S, Kishimoto M, Sano K, Omatsu T, Katayama Y, Oba M, Aoki H, Ichimaru T, Sunaga F, Mukono I, Yamasato H, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Oka T, Nagai M. (2017) Genetic diversity and intergenogroup recombination events of sapoviruses detected from feces of pigs in Japan. Infect Genet Evol. 55: 209-217.
DOI: 10.1016/j.meegid.2017.09.013.

Akagami M, Ito M, Niira K, Kuroda M, Masuda T, Haga K, Tsuchiaka S, Naoi Y, Kishimoto M, Sano K, Omatsu T, Aoki H, Katayama Y, Oba M, Oka T, Ichimaru T, Yamasato H, Ouchi Y, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Nagai M. (2017) Complete genome analysis of porcine kobuviruses from the feces of pigs in Japan. *Virus Genes*. 53: 593-602.

DOI: 10.1007/s11262-017-1464-9.

Ito M, Kuroda M, Masuda T, Akagami M, Haga K, Tsuchiaka S, Kishimoto M, Naoi Y, Sano K, Omatsu T, Katayama Y, Oba M, Aoki H, Ichimaru T, Mukono I, Ouchi Y, Yamasato H, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Nagai M. (2017) Whole genome analysis of porcine astroviruses detected in Japanese pigs reveals genetic diversity and possible intra-genotypic recombination. *Infect Genet Evol*. 50: 38-48.

DOI: 10.1016/j.meegid.2017.02.008.

Hayashi-Miyamoto M, Murakami T, Minami-Fukuda F, Tsuchiaka S, Kishimoto M, Sano K, Naoi Y, Asano K, Ichimaru T, Haga K, Omatsu T, Katayama Y, Oba M, Aoki H, Shirai J, Ishida M, Katayama K, Mizutani T, Nagai M. (2017) Diversity in VP3, NSP3, and NSP4 of rotavirus B detected from Japanese cattle. *Infect Genet Evol*. 49: 97-103.

DOI: 10.1016/j.meegid.2017.01.003.

Sano K, Naoi Y, Kishimoto M, Masuda T, Tanabe H, Ito M, Niira K, Haga K, Asano K, Tsuchiaka S, Omatsu T, Furuya T, Katayama Y, Oba M, Ouchi Y, Yamasato H, Ishida M, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Nagai M. (2016) Identification of further diversity among posaviruses. *Arch Virol*. 161: 3541-3548.

DOI: 10.1007/s00705-016-3048-8

Naoi Y, Kishimoto M, Masuda T, Ito M, Tsuchiaka S, Sano K, Yamasato H, Omatsu T, Aoki H, Furuya T, Katayama Y, Oba M, Okada T, Shirai J, Mizutani T, Nagai M. (2016) Characterization and phylogenetic analysis of a novel picornavirus from swine feces in Japan. *Arch Virol*. 161:1685-1690.

DOI: 10.1007/s00705-016-2834-7

Sato A, Tateishi K, Shinohara M, Naoi Y, Shiokawa M, Aoki H, Ohmori K, Mizutani T, Shirai J, Nagai M. (2016) Complete sequencing of bovine viral diarrhea virus 1 subgenotype 1n and 1o. *Genome Announc*. 2016 Feb 18;4(1). pii: e01744-15.

DOI: 10.1128/genomeA.01744-15.

Ito M, Tsuchiaka S, Naoi Y, Otomaru K, Sato M, Masuda T, Haga K, Oka T, Yamasato H, Omatsu T, Sugimura S, Aoki H, Furuya T, Katayama Y, Oba M, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Nagai M.

(2016) Whole genome analysis of Japanese bovine toroviruses reveals natural recombination between porcine and bovine toroviruses. Infect Genet Evol. 38:90-95.
DOI: 10.1016/j.meegid.2015.12.013

Masuda), 赤上正貴 (Masataka, Akagami), 新楽和孝 (Kazutaka, Niira)

[学会発表](計 1 件)

長井 誠 他、牛糞便サンプルの次世代シーケンシングによるウイルス遺伝子解析、平成 27 年度 関東・東京合同地区三学会

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長井 誠 (NAGAI, Makoto)
石川県立大学・生物資源環境学部生産科学科・教授
研究者番号：10540669

(2) 研究分担者

青木 博史 (AOKI, Hiroshi)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授
研究者番号：10440067

(3) 連携研究者

水谷 哲也 (MIZITANI, Tetsuya)
東京農工大学・農学部・教授
研究者番号：70281681

(3) 連携研究者

白井 淳資 (SHIRAI, Junsuke)
東京農工大学・連合農学院研究科・教授
研究者番号：00355182

(4) 研究協力者

伊藤美加 (Mika, Ito), 増田恒幸 (Tsuneyuki,