

令和元年9月5日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08057

研究課題名(和文) 血漿中遺伝子の網羅的解析による犬の新規ウイルスの検索

研究課題名(英文) Detection of emerging virus from plasma using Next-Generation-Sequencing

研究代表者

桃井 康行 (MOMOI, YASUYUKI)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・教授

研究者番号：40303515

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)：本研究ではリンパ腫、肝炎、不明熱から採取した血漿を材料として次世代シーケンスを用いた網羅的解析による未知のウイルスの検出を試みた。一般に血漿中の遊離DNA/RNAは微量だが、これを増幅し解析することで、事前の情報なしでネコ免疫不全ウイルスや重症熱性血小板減少症ウイルスを検出することができた。リンパ腫、肝炎、不明熱のイヌとネコで解析を行った結果、内在性レトロウイルスや宿主ゲノム由来するウイルス相同遺伝子が検出された他、イヌでヒトの内在性レトロウイルス、ネコではモルビリウイルスが検出された。本方法は未知の感染症の検出において有用な手段にな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

獣医療ではまだ認識されていない多くの感染症がある。未知の感染症を臨床現場で診断することは難しい。本研究では、次世代シーケンスを使い、臨床検体から予想していなかった病因菌を体系的に検出できることを実症例で示すことができた。今後、本技術を感染症疑い症例に対して利用することで新しい感染症を同定することが可能であり、簡易な診断法や新規治療法の開発につながるができるだろう。また最近では重症熱性血小板減少症(SFTS)など重要な新興感染症が問題となっている。人と密接に接触する伴侶動物の感染症のいち早く検出することは、人の健康を守るためにも重要であり、本研究の成果はその目的にも資する技術となる。

研究成果の概要(英文)：In this project, we applied Next-Generation-Sequencing to detect unrecognized viruses in dogs and cats. Circulating DNA/RNA was extracted from small volume of plasma samples from clinical cases with lymphoma, hepatitis and fever of unknown origin suspected infectious disease. We successfully detected feline immunodeficiency virus and severe fever with thrombocytopenia syndrome in clinical samples. Endogenous retrovirus and virus-like nucleotide sequence of host genome origin was detected in some cases possibly unrelated to pathological condition. Human endogenous retrovirus and feline morbillivirus was also detected. The method applied used in this project was useful to detect unknown pathogen from clinical samples in veterinary medicine.

研究分野：臨床獣医学

キーワード：イヌ ネコ 新興感染症 ウイルス 次世代シーケンス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

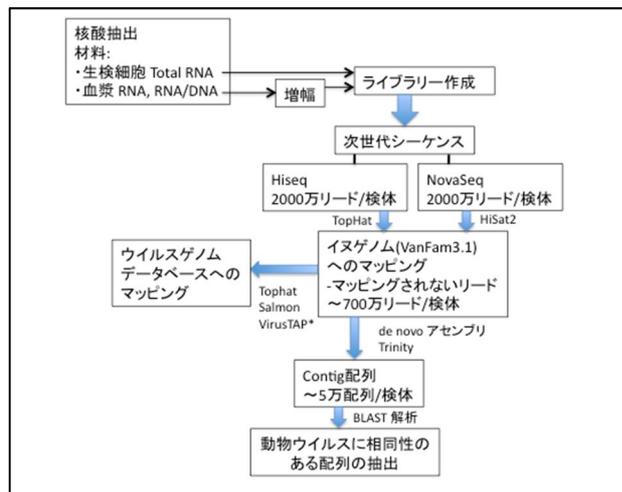
ヒトのリンパ腫では、HTLV-1、EBウイルスなどレトロウイルスやヘルペスウイルスが発癌に関与することが知られている。また肝炎では病因となるウイルスが知られている。犬や猫など伴侶動物の獣医療現場で実際に検査されているウイルス感染症の種類は少ない。犬、猫などにおいてもまだ臨床的に重要であるにもかかわらず、未だ同定されていない病原体が存在するはずである。近年、重症熱性血小板減少症 (SFTS) など伴侶動物から人間へと感染する重篤な感染症が国内で多発しており、公衆衛生上の問題となっており、獣医療において未知の感染症や新興感染症を検出する体系的なアプローチが必要とされている。PCR 法等、分子生物学技術を用いた病原体遺伝子の検出技術は著しい進歩を遂げているが、PCR 法に代表される核酸増幅検出法は、あらかじめ対象とする病原微生物の遺伝子情報が必要であり、病原体が未知の場合には利用できない。未知の病原微生物を同定するためには古典的にはその微生物が、病原部位から分離され、動物への接種で病気を再現できることが要求されるが(コッホの4原則) 実際には病原体の分離や疾患の再現は容易ではなく、病原体によっては不可能な場合もある。臨床検体から未知の病原体を検出する新しい手法が必要になっている。

2. 研究の目的

本研究では、未知のウイルスを検出するために臨床例から得られる組織および血漿を材料にした次世代シーケンスによる網羅的解析方法の確立を試みた。その方法の妥当性を評価するためにまず既知の感染症の臨床例について実際に解析を行った。そして実際に未知のウイルスの関与が疑われる疾患のうち、リンパ腫、肝炎、不明熱の症例についてその方法を応用しウイルスの検出を試みることにした。次世代シーケンスで病原体の配列が取得された症例については、PCR 法による遺伝子増幅とサンガーシーケンスなど従来広く用いられている方法を用い、感染の有無を確認することにした。

3. 研究の方法

鹿児島大学附属動物病院および鹿児島県内の動物病院に来院した犬および猫を対象にした(表1)。材料としては生検により得られた細胞診材料、または症例から採取した血漿を用いた。細胞診を材料として検索したのはリンパ腫と診断された犬の2症例および全身性のリンパ節炎の1症例であり、これに追加して犬のT細胞リンパ腫株化細胞であるCLC細胞からtotal RNAを抽出し、次世代シーケンスによるRNA解析を外部に依頼した。血漿を材料として検索したのは上記とは別の犬のリンパ腫2例、画像診断などで原因が特定できない肝炎(ALTの著増)の犬の2例、不明熱の犬5例、不明熱の猫4例である。本方法の有用性と評価する目的で既知の感染症感染例として *Innotus* 属真菌の全身感染の犬1例、SFTSの感染猫1例について血漿150-200 μ l を材料に血漿中の循環RNAまたはDNA/RNAを抽出した。本方法の概略を図1に示した。RNAの抽出にはNucleoSpinRNA Virus(MACHERRY-NAGEL)を用い、DNA/RNAの抽出にはMagDIA Dx SV(プレジジョンシステムサイエンス)を用いた。抽出したRNAは微量であるためovation RNA-SeqSystemV2(Nugen)を用いてcDNAを合成、増幅した。合成したライブラリーについてイルミナ社のHiSeqまたはNovaSeqによる解析を外部機関に依頼し、塩基配列情報を取得した。取得した配列について情報どおりトリミングとクオリティーコントロールを実行し、イヌまたはネコのリファレンス配列に対してTopHatまたはHisat2ツールによりマッピングを行い、マップされないリードをウイルス検索の解析対象とした。これらのリードはウイルスゲノムのデータベースに対して直接マッピングを行うと同時に、Trinityツールにて *de novo* assembleを行い、得られたContig配列についてBLAST解析を行いウイルス関連の塩基配列の検出を試みた。これらの結果から感染が疑われたウイルスについて、リードの塩基情報を基にPCR法による増幅とサンガーシーケンスを行い、検体からのウイルス検出を試みた。



本研究で行った解析のフローチャート。臨床材料(生検細胞、血漿)から出発し、遺伝子増幅後、次世代シーケンスにより塩基配列情報を取得した。その後、一般のツールを使いウイルスに関連した配列を検索した。
Akifumi Yamashita, Tsuyoshi Sekizuka and Makoto Kuroda. *VirusTAP: Viral Genome-Targeted Assembly Pipeline*. *Front. Microbiol.* 2016. doi: 10.3389/fmicb.2016.00032

4. 研究成果

(1) 技術的な成果と得られた課題

成果: 血漿を材料にした網羅的検出によるウイルス感染の検出方法が確立できた

未知のウイルス感染症を同定する場合、通常は培養細胞への接種によるウイルスの単離と増幅が行われる。しかしこの方法では増殖しないウイルスは同定できない。今回、血漿から直接核酸を増幅することにより感染ウイルスを検出することを試みている。まず塩基配列情報の取得について、今回の研究では症例への負担がないように少量の臨床検査の残余サンプルを出発点とした。スタートした血漿量は 200µl と少なかったが、増幅により検体あたり 1800-2000 万ペアリードの塩基配列を取得することができ、rRNA や増幅に起因する取得配列の重複はみられなかった。TopHat または Hisat2 によるリードのマッピングでは、10-30%程度のリードが犬ゲノムに対してマップされなかった。宿主ゲノムにマップされなかったリードの *de novo* assemble により、数千～数万配列/検体の config 配列が得られた。今回、解析した症例のうち、解析前にウイルス感染が判明していた 2 例（ネコ免疫不全ウイルス：FIV、および SFTS）について実際にウイルス由来配列が検出された。SFTS の症例（急性期：採材日に死亡）については多量の SFTS 由来配列が、FIV 陽性で不明熱が持続していた症例については比較的多くの FIV 由来配列が検出された。今回の解析では、一般に利用可能なデータベース、解析ツール、公開されているパイプラインを使用した、特殊な解析ツールを使用することなく解析を行うことができた。

課題：DNA 病原体の検出ができなかった。次世代シーケンスの際の他検体情報の混入

一方で、*Inonotus* 属真菌の全身感染が判明していたイヌに対して、DNA/RNA 抽出を行い、同様な方法により原因真菌由来の遺伝子が検出されるか検討してみた。一般に病原体がわからない状況では、DNA を解析すべきか RNA を解析すべきか不明である。今回採用した方法で血中の病原体のゲノムや漏れ出てくるゲノムを検出できると想定していたが、血漿から真菌由来の遺伝子を検出することはできなかった。DNA を遺伝情報とする微生物、すなわち DNA ウイルス、細菌、真菌、原虫等を想定する場合には別の検出方法を検討する必要があると考えられた。また次世代シーケンサーに関する技術的な問題点が明らかになった。今回、数回にわたり次世代シーケンス解析を外注したが、取得された配列情報に他のサンプル由来の配列が混入することが明らかになった。

表 1 本研究で解析した症例

症例	種	疾患	材料	遺伝子抽出-解析機種
T1	Dog	リンパ腫	生検細胞	RNA(Total)-Hiseq
T2	Dog	リンパ腫	生検細胞	RNA(Total)-Hiseq
T3	Dog	リンパ節炎	生検細胞	RNA(Total)-Hiseq
T4	Dog	リンパ腫細胞株	細胞	RNA(Total)-Hiseq
P1	Dog	不明熱	血漿	RNA-増幅-Hiseq
P2	Dog	不明熱	血漿	RNA-増幅-Hiseq
P3	Dog	リンパ腫	血漿	RNA-増幅-Hiseq
P4	Dog	リンパ腫	血漿	RNA-増幅-Hiseq
P5	Dog	肝炎	血漿	RNA-増幅-Hiseq
P6	Dog	肝炎	血漿	RNA-増幅-Hiseq
P7	Dog	不明熱、皮下多発性肉芽腫	血漿	RNA-増幅-Novaseq
P8	Dog	白血球減少、不明熱	血漿	RNA-増幅-Novaseq
P9	Dog	深在性真菌症（ <i>Inonotus</i> 属）	血漿	RNA-増幅-Novaseq
P10	Dog	白血球減少、不明熱	血漿	RNA-増幅-Novaseq
P11	Cat	SFTS	血漿	RNA-増幅-Novaseq
P12	Cat	白血球、血小板減少、不明熱	血漿	RNA-増幅-Novaseq
P13	Cat	不明熱	血漿	RNA-増幅-Novaseq
P14	Cat	不明熱	血漿	RNA-増幅-Novaseq

が明らかになった。一般に次世代シーケンスではコスト等の問題から、一つの泳動レーンに複数の検体を混ぜて塩基配列を決定する。得られた配列情報について、どの検体由来であるかわかるように、事前に DNA 検体に「バーコード配列」を付加し、それを読むことにより検体を仕分けする。今回、おそらく他の依頼検体由来と推測される海洋微生物のゲノムウイルス量が多かった SFTS 由来配列が他検体へ少なからず混入していた。感染症の解析では、これらの混入は「誤診」につながる重大な問題となる。次世代シーケンサーの性能のスペックなど性能の問題にも関連するが、バーコード配列のあり方や検体の依頼方法などについて検討する必要があることが明らかになった。

(2)臨床例での新規ウイルス検出の結果（表 2）

リンパ腫症例由来の生検材料の解析

リンパ腫の腫瘍細胞が大部分を含むリンパ節生検材料から抽出した RNA について調べたところ、ウシウイルス性流行熱ウイルス、ブタロタウイルス、牛痘ウイルス、ラッサウイルス、C 型肝炎ウイルスと同源性のある配列が検出された。これらのウイルス関連配列は、リンパ節炎から得られた材料からも検出された。詳細に検討したところ、これらの配列はイヌゲノム配列に由来することが判明した。犬ゲノムへのマッピングの過程で取り除くことができなかったも

同
菌
れ

のと推測される。リンパ腫の症例だけでなく、リンパ節炎の症例からも検出されていることからこれらの RNA がリンパ腫の発症に関与することは考えにくい。動物に病原性のあるウイルスの遺伝子に相同的な配列がイヌゲノム中に存在することは興味深い。さらに今回検出されているウシウイルス性下痢ウイルスの配列は、血漿からも RNA として検出されており、ウイルスの進化や発生を考える上で非常に興味深い知見であった。

血漿由来 RNA を材料にした解析

リンパ腫 2 例や肝炎の犬の 2 例、不明熱の 2 例については血漿由来 RNA を抽出し HiSeq により解析した。その結果、前述のようにイヌゲノム由来のウイルス相同配列が検出された他、マウス白血球ウイルス (MuLV) に相同性を持つ内因性レトロウイルスが検出されている。この配列はすべての検体から検出されているため、リンパ腫などの疾患の発症に直接関与しているとは考えにくい。しかしながら、通常のレトロウイルスと同様、この配列がレトロポゾンとして新たに宿主ゲノムへの遺伝子組み込まれれば、発がんに関与する可能性がある。そのため犬の内因性レトロウイルスの遺伝子組み込みに必要な *pol* 領域の塩基配列について調べたところ、この配列の *pol* 相同領域からコードされる蛋白は酵素活性をもたないことが予想され、検出された内因性レトロウイルスは犬の癌化には関与しないと推測された。これ以外にレトロウイルス関連配列として人の内因性レトロウイルスに 90% 程度の相同性を持つ配列が複数の検体から検出された (1, 2)。この配列は犬のゲノム上にマップされず感染性因子である可能性が示唆された。そこで、この配列がもっとも多く検出されたリンパ腫症例のサンプルについて解析をすすめたところ、検出された複数のリードはヒト内因性ウイルス HERV/env59 の広い領域にマッピングされた。実際にサンプル中にこの配列が存在するか RT-PCR とサンガーシーケンスにより検証した結果、この配列が PCR で増幅され血漿中に存在していることが明らかになった。この配列が複数の検体で検出されていることから、病態に関与していることは考えにくい。しかしながら、この配列がどこから由来しているのか不明であり、今後、解析を進める予定である。

DNA を遺伝情報とする病原微生物についても検出できる可能性を考慮し、NovaSeq による解析も実施した。その結果、解析されたネコからネコ内因性レトロウイルスである RD114 が検出されている。この内因性レトロウイルスは、過去にワクチン等への混入が示唆されている (3, 4)。今回、FIV 感染による AIDS 様症状を呈している猫からこの遺伝子が検出されているほか、不明熱の症例からも検出されている。一方で急性発症した SFTS の症例からは検出されなかった。解析した症例が少なく詳細は不明であるが、FIV 感染など長期にわたる免疫抑制とこの内因性レトロウイルスの関連や病態への関与について今後検討していく必要があると考えられた。

NovaSeq により解析を行った犬の 1 例において、ウマ伝染性貧血ウイルス (EIAV) に相同性のある配列が検出された。この症例は、一過性の発熱、白血球減少など急性ウイルス感染に典型的な症状を呈して来院した症例であり、その後回復している。この EIAV に相同性のある配列はイヌゲノム上には存在していない。この検体について RT-PCR、および PCR を実施し検体からの EIAV 遺伝子の検出を試みたが検出されなかった。一般に EIAV は近年、国内での発生がなく扱っている研究者も少ないため解析中に遺伝子が混入してくる可能性は低いと考えられる。当該症例が生存しているため今後、抗体価の測定等を行う予定である。

臨床的には予想していなかった感染症として、不明熱のネコの症例からネコのモルビリウイルスが検出された。ネコのモルビリウイルスは近年、ネコで多発する慢性腎臓病への関与が指摘されている (5, 6)。これまでのところ、このウイルスが全身性の急性疾患を起こすかについては報告がない。今回の症例の臨床症状にモルビリウイルスが関与しているか不明であるが、今後、獣医療での重要性について検討していく必要があると考えられた。

表 2. 本研究で検出された病原体関連遺伝子

検出された配列	検出された検体	由来
牛ウイルス性下痢ウイルス	イヌリンパ腫および	イヌゲノム
C 型肝炎ウイルス	リンパ節炎由来細胞	
E 型肝炎ウイルス	犬血漿	
マウス白血球ウイルス 他		
ヒト内因性レトロウイルス	イヌ血漿	由来不明 (遺伝子陽性)
ウマ伝染性貧血ウイルス	イヌ血漿	由来不明 (遺伝子陰性)
重症熱性血小板減少症ウイルス	ネコ血漿	感染 (遺伝子陽性)
ネコ免疫不全ウイルス	ネコ血漿	感染 (抗体陽性)
ネコモルビリウイルス	ネコ血漿	感染? (遺伝子検査未実施)
ネコ内因性レトロウイルス RD114	ネコ血漿	ネコゲノム

研究成果の総括

今回実施した次世代シーケンスによる解析手技のうち血漿を用いた解析は、宿主細胞を解析しないため比較的少ないデータ取得でウイルス血漿を呈する病原体を効率的に検出できることを示すことができた。一方で、現状で行われている次世代シーケンスでは検体間でのデータ混入が生じる可能性があり、感染症の解析に利用する場合には、実施方法や解釈に注意が必要で

あることが判明した。実際の解析の結果からイヌやネコの血漿中には内在性レトロウイルスが普遍的に存在することが明らかとなり臨床的な重要性について今後検討する必要があると考えられた。疾患とは関係しないと考えられるが、イヌのゲノム上には他の動物種を宿主とするウイルスの相同配列が存在し、それが通常でも転写されていることが明らかになり、ウイルスの発生や進化を考える上で興味深い事象を見出すことができた。

<引用文献>

1. Endogenous retroviruses in the human genome sequence. Griffiths DJ. *Genome Biol.* 2(6):REVIEWS1017, 2001.
2. Demystified. Human endogenous retroviruses. Nelson PN, Carnegie PR, Martin J, Davari Ejtahadi H, Hooley P, Roden D, Rowland-Jones S, Warren P, Astley J, Murray PG. *Mol Pathol.* 56: 11-18, 2003.
3. Virus similar to RD114 virus in cat cells. Sarma PS, Tseng J, Lee YK, Gilden RV. *Nat New Biol.* 244(132):56-59, 1973.
4. Contamination of infectious RD-114 virus in vaccines produced using non-feline cell lines. Yoshikawa R, Sato E, Miyazawa T. *Biologicals.* 39: 33-37 2011.
5. Feline morbillivirus, a previously undescribed paramyxovirus associated with tubulointerstitial nephritis in domestic cats. Woo PC, Lau SK, Wong BH, Fan RY, Wong AY, Zhang AJ, Wu Y, Choi GK, Li KS, Hui J, Wang M, Zheng BJ, Chan KH, Yuen KY. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109: 5435-5440, 2012.
6. Association of feline morbillivirus infection with defined pathological changes in cat kidney tissues. Sutummaporn K, Suzuki K, Machida N, Mizutani T, Park ES, Morikawa S, Furuya T. *Vet Microbiol.* 228: 12-19, 2019.

5. 主な発表論文等

1. Natural severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection in domestic cats in Japan. Matsuu A, Momoi Y, Nishiguchi A, Noguchi K, Yabuki M, Hamakubo E, Take M, Maeda K. *Vet Microbiol.* *Accepted in press.*

6. 研究組織

研究分担者

研究分担者氏名：松鷄 彩

ローマ字氏名：(MATSUU, aya)

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：農水産獣医学域獣医学系

職名：准教授

研究者番号(8桁)：40348595

研究分担者氏名：前田 健

ローマ字氏名：(MAEDA, ken)

所属研究機関名：山口大学

部局名：共同獣医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：90284273

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。