

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15368

研究課題名(和文) ロタウイルスの感染がもたらすクリプトスポリジウム原虫への抵抗性の分子機構の解明

研究課題名(英文) Coinfection of rotavirus and Cryptosporidium in calves alleviates symptoms of Cryptosporidiosis

研究代表者

村越 ふみ (Murakoshi, Fumi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20759906

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：仔牛におけるロタウイルスの顕性/不顕性感染は、その後に感染するクリプトスポリジウムによる水様性下痢の日数を減少させることが明らかとなった。また、感染初期のクリプトスポリジウム排出量も共感染区の仔牛で有意に少なかった。細胞株を用いた実験においても、同様の結果となり、ロタウイルスの感染はその後のクリプトスポリジウムの感染を阻害した。以上の結果は、ロタウイルスへの感染がクリプトスポリジウムの動態に影響を与えていることを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、混合感染による複数の病原体のせめぎあいの機構が注目されている。本研究のような二種以上の病原体のせめぎあいを調べる視点は、実際の家畜体内で生じている病原体の感染メカニズムへの理解を深め、今後の家畜疾病コントロールの一端を担うと考えられる。本研究において、ウシロタウイルスがクリプトスポリジウムよりも先に顕性/不顕性感染すると、仔牛のクリプトスポリジウム症が緩和されるということが明らかになり、それは細胞株レベルにおいても明らかとなった。これらの分子メカニズムを複合的に明らかにすることは、未だ有効な薬剤やワクチンの存在しないクリプトスポリジウム症のコントロールの足がかりとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Overt/subclinical infection of rotavirus in calves was found to reduce the number of days of watery diarrhea caused by subsequently infected Cryptosporidium. Cryptosporidium excretion in the early stages of infection was also significantly lower in the co-infected calves. Similar results were obtained in cell line experiments, in which rotavirus infection inhibited subsequent Cryptosporidium infection. These results suggest that infection with rotavirus affects the dynamics of Cryptosporidium.

研究分野：寄生虫

キーワード：クリプトスポリジウム ロタウイルス 牛

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

畜産経営において仔牛の疾病管理は非常に重要であり、中でも肺炎と下痢症は 2 大疾病と呼ばれ大きな問題となっている。その中でも、人獣共通寄生原虫であるクリプトスポリジウム (*Cryptosporidium parvum*) およびロタウイルス (*Bovine rotavirus*) の腸管感染は、仔牛下痢症原因の約 70% を占める (小岩, DAIRYMAN, 2012)。ロタウイルスは、産前母牛に投与するワクチンが存在するが、クリプトスポリジウムに対するワクチン・治療薬は存在せず、激しい下痢症によって仔牛の生育不良や斃死を引き起こす。ロタウイルスは、生後 1-2 週齢の仔牛、クリプトスポリジウムは主に生後 2 週齢の仔牛に好発するため、両病原体の混合感染は頻繁に報告される。

このように、自然界において、病原体が単独種で存在することはなく、宿主は様々な病原体の感作を同時に受ける。そのため、野生動物や家畜への多種病原体への混合感染は珍しくない。しかしながら、これまで行われてきた病原体研究は「宿主-病原体」の二者間の相互作用を対象としており、一つの病原体への感染が他の病原体の病原性や症状に与える影響はほとんど調べられていない。

2. 研究の目的

本研究では、畜産経営において非常に問題となる二種の病原体、ロタウイルスとクリプトスポリジウム原虫が共感染した際の、病原体と宿主のせめぎあいについて調べることを目的とする。

3. 研究の方法

農場の仔牛の調査をおこない、ロタウイルスとクリプトスポリジウムに共感染した仔牛のクリプトスポリジウムの排出率を調べる。

また、細胞株にロタウイルスとクリプトスポリジウムを共感染させ、細胞に感染するクリプトスポリジウムの数の変化を調べる。

細胞に感染したクリプトスポリジウムを、イメージングサイトメーターを用いて簡便に測定する方法を確立する。

1) ロタウイルスとクリプトスポリジウムの共感染が仔牛に与える影響

クリプトスポリジウムおよびロタウイルスが問題となっている複数の農場において、毎日仔牛の糞便を採取した。その糞便において、糞便性状を記録し、イムノクロマトキットを用いてロタウイルス・クリプトスポリジウム・コロナウイルス・大腸菌が感染しているかを調べた。クリプトスポリジウムが陽性であったものに関しては、ショ糖遠心浮遊法を用い、糞便中のクリプトスポリジウムの個数を顕微鏡下でカウントした (OPG: オーシスト数/g)。

2) ウシロタウイルスのウシ腸管上皮細胞への馴化

ウシ腸管上皮細胞(BIE 細胞)でウシロタウイルスを複数回継代し、馴化を行った。

3) イメージングサイトメーターを用いたクリプトスポリジウムの細胞株への感染数の測定法の確立

クリプトスポリジウムを BIE 細胞に感染させ、クリプトスポリジウムを標的とする蛍光抗体を反応させた。そのサンプルを IN Cell Analyzer を用いて自動係数するためのプログラムについて条件検討を行った。

4) 細胞株における、ロタウイルスとクリプトスポリジウムの共感染実験

BIE 細胞にウシロタウイルスを感染させ、その 9 時間後にクリプトスポリジウムを感染させた。クリプトスポリジウムを感染させた 3 時間後にクリプトスポリジウムおよびロタウイルスの感染数を係数した。

5) poly(I:C)の細胞株へのトランスフェクションがクリプトスポリジウムの感染に与える影響

ロタウイルスのような dsRNA ウイルスと同様の免疫活性を持つ poly (I:C)を宿主細胞にトランスフェクションすることによって、クリプトスポリジウムの細胞への感染数がどのように変化するか調べた。

BIE 細胞に、Poly(I:C)をトランスフェクションし、同時にクリプトスポリジウムを感染させた。感染 24 時間後にクリプトスポリジウムの感染数を係数した。また、トランスフェクション・クリプトスポリジウム感染後それぞれにおいて、BIE 細胞における IFN β の発現の有無を RTPCR によって調べた。

4. 研究成果

ロタウイルスの感染後、クリプトスポリジウムに感染した仔牛と、クリプトスポリジウムのみ感染した仔牛の糞便性状とクリプトスポリジウムの排出量を比較した。その結果、クリプトスポリジウムの排出量は、排出 1 日目において、共感染仔牛の方が優位に少なかった。下痢便の日数においても、クリプトスポリジウム単独感染区は平均 4.3 日下痢が続いたのと比較し、共感染区は平均 1.5 日と有意に短かった。しかし、オーシストの排出期間は、単独感染区が平均 7.25 日

であったのに対して、共感染区は 10.25 日であり、共感染区の方がオーシストの排出期間は有意に長かった。

本現象は、クリプトスポリジウムがロタウイルスより先に感染すると生じず、実際に、1 頭の仔牛がクリプトスポリジウムに感染してからロタウイルスに感染したが、下痢便の日数やオーシストの排出期間はクリプトスポリジウムの単独感染仔牛区とほとんど同一であった。

以上の結果から、ロタウイルスの顕性/不顕性感染は、その後に感染するクリプトスポリジウムによる水様性下痢の日数を減少させることが明らかとなった。このことは、ロタウイルスへの感染がクリプトスポリジウムの動態に影響を与えていることを示唆した。

次に、細胞株を用いた実験を行うために、ウシロタウイルスのウシ腸管上皮細胞への馴化およびイメージングサイトメーターを用いたクリプトスポリジウムの細胞株への感染数の測定法の確立をおこなった。クリプトスポリジウムの感染数の計測は、今まで顕微鏡下における直接観察が最も制度の高い方法とされてきたが、一つ一つ手でカウントすることは、検体数の多い実験を行うことを非常に困難にしてきた。96well プレートとイメージングサイトメーターを用いることによって、これらの労力的な作業が低減し、多数の検体を調べることが可能となった。

そこで、仔牛でみられた現象が細胞レベルでも起こるかどうかを検証するため、BIE 細胞株に両病原体を混合感染させた。すると、仔牛の結果と同様に、クリプトスポリジウム単独感染区と比較し、混合感染区において感染数原虫数が有意に減少した。

この理由として、ロタウイルス由来タンパク質である NSP4 によって本原虫の侵入障害が起こるといふ仮説が考えられる。クリプトスポリジウムは、細胞側の $\text{Na}^+/\text{glucose}$ チャネル(SGLT1)をハイジャックして膨張させ、寄生体胞の形成を行う (Chen *et al.*, PNAS, 2005)。対して、ロタウイルスの分節にコードされる NSP4 タンパク質は細胞の SGLT1 を阻害する。従ってロタウイルスの NSP4 による SGLT1 の阻害によって本原虫の侵入障害が起こっている可能性が考えられた。

また、Poly(I:C)のトランスフェクションにおいてもクリプトスポリジウムの感染数の減少が起こった。このことから、Poly(I:C)のトランスフェクションによって、細胞の表面抗原等の変化が生じて、クリプトスポリジウムの感染数の減少が起こったのではないかと考えられた。

さらに、トランスフェクションによって、 $\text{IFN}\beta$ が上昇した。ロタウイルスに感染した細胞は I 型インターフェロン ($\text{IFN-}\alpha\beta$) を放出する。それが細胞表面のレセプターに結合し、その下流の転写因子 (JAK/STAT 系) が活性化、抗ウイルスタンパク質の発現が誘導される。クリプトスポリジウムにおいても、細胞株およびマウスに $\text{IFN-}\alpha\beta$ を添加すると感染原虫数が減少するという報告が存在するため、混合感染時に自然免疫によるせめぎあいが生じていると予想される。本現象は、様々な免疫細胞が存在する仔牛の体内においてより顕著となると考えられる。

以上の減少が仔牛の体内で複合的に起こり、ロタウイルスとクリプトスポリジウムに共感染した仔牛は、クリプトスポリジウムのみに単独感染した仔牛と比較し、クリプトスポリジウムの感染数が低く抑えられ、症状が軽くなるのではないかと考えられた。

近年、混合感染による複数の病原体のせめぎあいの機構が注目されている。本研究のような二種以上の病原体のせめぎあいを調べる視点は、実際の家畜体内で生じている病原体の感染メカニズムへの理解を深め、今後の家畜疾病コントロールの一端を担う重要な研究であると考えられる。本研究において、ウシロタウイルスがクリプトスポリジウムよりも先に顕性/不顕性感染することで引き起こされる分子生物学的な作用によって、仔牛のクリプトスポリジウム症が緩和されるということが明らかになり、それは細胞株レベルにおいても明らかとなった。

これらの分子メカニズムを複合的に明らかにすることは、未だ有効な薬剤やワクチンの存在しないクリプトスポリジウム症のコントロールの足がかりとなることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fumi Murakoshi, Kenji Koyama, Takumi Akasaka, Noriyuki Horiuchi, Kentaro Kato	4. 巻 80
2. 論文標題 Molecular and histopathological characterization of Cryptosporidium and Eimeria species in bats in Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1395-1399
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.18-0130	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Youki Takaki, Yoshinori Takami, Takehiro Watanabe, Takaaki Nakaya, Fumi Murakoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Molecular identification of Cryptosporidium isolates from ill exotic pet animals in Japan including a new subtype in Cryptosporidium fayeri	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.vprsr.2020.100430	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fumi MURAKOSHI, Takaaki NAKAYA, Kentaro KATO	4. 巻 -
2. 論文標題 Detection and Epidemiological Analysis of Symbiotic Viruses from Protozoa	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Integrated field science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） -	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 F. Murakoshi, A. Saito-Ito, K. Kato, Y. Matsumoto, T. Nakaya
2. 発表標題 Detection and phylogenetic analyses of symbiotic dsRNA viruses of protozoan parasites
3. 学会等名 The 15th Asian-Pacific Congress for Parasitic Zoonoses (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村越ふみ、七戸新太郎、林美和、田中悠太郎、三條場千寿、松本芳嗣、中屋隆明
2. 発表標題 共生dsRNAウイルスの探索と薬剤による除去
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 F. Murakoshi, S. Shichinohe, M. Hayashi, Y. Tanaka, C. Sanjyoba, Y. Matsumoto, T. Nakaya
2. 発表標題 Adenosine analog inhibits replication of protozoan endogenous dsRNA virus: Leishmanivirus (LRV2) and Crispovirus (CSpV1).
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村越ふみ、佐藤開、三條場千寿、松本芳嗣、中屋隆明
2. 発表標題 原虫共生ウイルスの有無における原虫の遺伝子発現比較解析
3. 学会等名 第88回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村越ふみ、伊藤めぐみ、芝野健一、加藤健太郎
2. 発表標題 ウシロタウイルス共感染時におけるクリプトスポリジウムの病原性の変化
3. 学会等名 第86回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村越ふみ、杉達紀、Oluyomi Adeyemi、野中基弘、加藤健太郎
2. 発表標題 アピコンプレクサへの特異的増殖阻害効果を持つヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の解析
3. 学会等名 第160回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村越ふみ、杉達紀、Oluyomi Adeyemi、野中基弘、中屋隆明、加藤健太郎
2. 発表標題 アピコンプレクサ特異的なヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の解析
3. 学会等名 第73回日本寄生虫学会 西日本支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村越ふみ、中屋隆明、加藤健太郎
2. 発表標題 原虫特異的なヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の探索と解析
3. 学会等名 第7回4大学連携研究フォーラム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村越ふみ、杉達紀、Oluyomi Adeyemi、野中基弘、中屋隆明、加藤健太郎
2. 発表標題 Nullscriptのアピコンプレクサ原虫特異的な脱アセチル化酵素阻害作用の解析
3. 学会等名 第87回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村越ふみ、佐藤開、三條場千寿、松本芳嗣、中屋隆明
2. 発表標題 リーシュマニア原虫共生ウイルスの除去による遺伝子発現への影響
3. 学会等名 第75回日本寄生虫学会 西日本支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中悠太郎、千葉悠斗、浦山俊一、萩原大祐、松林誠、中屋隆明、村越ふみ
2. 発表標題 アイメリア原虫共生ウイルスの網羅的検出
3. 学会等名 第75回日本寄生虫学会 西日本支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fumi Murakoshi, Kai Satoh, Shintaro Shichinohe, Chizu Sanjyoba, Yoshitsugu Matsumoto, Takaaki Nakaya
2. 発表標題 Transcriptome comparison of Leishmania major with and without their endogenous dsRNA virus.
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fumi Murakoshi
2. 発表標題 Detection and epidemiological analysis of symbiotic viruses from protozoa using the FLDS (A Comprehensive dsRNA Sequencing Method).
3. 学会等名 東北大学複合生態フィールド教育研究センター 第17回国際シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----