

令和 2 年 11 月 26 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21609

研究課題名(和文) シュマレンベルクウイルスと同様の遺伝子再集合体ウイルスが国内に現れる可能性の検証

研究課題名(英文) A study on possible emergence of Schmallenberg virus-like reassortant virus in Japan

研究代表者

白藤 浩明 (Shirafuji, Hiroaki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・主任研究員

研究者番号：40414726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：欧州で2011年に出現したシュマレンベルクウイルス(SBV)は、サシュペリウイルス(SATV)とシャモンダウイルス(SHAV)の遺伝子再集合体ウイルスと考えられている。本研究では、SBVと同様の遺伝子再集合体ウイルスがわが国に出現する可能性を検討するため、SATVとSHAVの国内分離株を哺乳類由来細胞に重複感染させた。その結果、SBVと同様のゲノムをもつものを含め、5通りの遺伝子再集合体ウイルスが得られた。加えて、アルボウイルスによる牛異常産の小動物モデルを開発するため、シリアンハムスター妊娠個体に2種類のアカバネウイルスを接種した。その結果、体形異常を伴う死産や虚弱子の出産が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、わが国でサシュペリウイルスとシャモンダウイルスが宿主動物に重複感染して遺伝子再集合を起こした場合、SBVと同様のゲノムをもつウイルスを含め、多様な遺伝子再集合体ウイルスが生成する可能性が示された。また、シリアンハムスター妊娠個体へのアカバネウイルス感染実験により、ウシにおける異常産と類似の病態が認められたことから、シリアンハムスターがアルボウイルスの病原性評価に活用可能な小動物モデルとして有用である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In 2011, Schmallenberg virus (SBV) emerged in Europe and caused serious economic damage in livestock industry there. Since it is considered that SBV is a reassortant between Sathuperi virus (SATV) and Shamonda virus (SHAV), our study aimed to examine the possibility that SBV-like reassortant virus emerge by reassortment between SATV and SHAV in Japan. In this study, Hamster lung (HmLu-1) cells were infected with Japanese SATV and SHAV isolates. As a result, the infected cells yielded five reassortant viruses, and one of the five reassortant viruses had similar genome to that of SBV. Another experiment was also conducted to develop an experimental animal model of arboviral diseases of cattle in this study. Pregnant Syrian hamsters were inoculated with Akabane virus which causes Akabane disease in cattle. As a result, stillbirth and congenital abnormalities were observed. Our results suggest that animal models of arboviral disease of cattle can be provided by using Syrian hamsters.

研究分野：獣医学

キーワード：アルボウイルス 牛異常産 遺伝子再集合 小動物モデル

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

1. 研究開始当初の背景

近年、国内外でデング熱、重症熱性血小板減少症候群などさまざまな節足動物媒介性 (Arthropod-borne (Arbo) : アルボ) ウイルス感染症が公衆衛生上の脅威となっている。家畜衛生分野においても北米でのウマのウエストナイルウイルス感染症、日本を含むアジアでの日本脳炎、欧州での反芻動物のシュマレンベルクウイルス (Schmallenberg virus : SBV) 感染症やブルータングなどのアルボウイルス感染症が大規模な発生を起こしてきた。その中でも、欧州で 2006-2009 年に発生したブルータングは、2007 年に欧州全体で 4 万件を上回る発生があり、ベルギーでは国全体におけるヒツジの 6 分の 1 が本病により斃死するなど、深刻な被害を及ぼした。また、わが国ではオルソブニヤウイルス属のアカバネウイルス (Akabane virus : AKAV)、アイノウイルスやオルビウイルス属のチュウザンウイルスといった各種アルボウイルスによるウシの異常産 (流産、早産、死産、新生子の体形異常) が、家畜における重要な生産阻害要因の 1 つとなっている。1972-1975 年に約 42,000 頭に及ぶ大規模な被害が生じたウシのアカバネ病は、ワクチンの開発・普及によりその被害が大きく減少したものの、最近では従来の異常産に加えて生後感染による脳脊髄炎の被害が頻発している。さらに、ウシのアカバネ病と同様の症状がブタで認められるなど、これまでと異なる病態を示す発生も多く、被害規模の拡大が強く懸念される。一方、AKAV と同じくオルソブニヤウイルス属に分類される SBV は、欧州で猛威を振るっている。2011 年にドイツおよびその近隣諸国に突如出現した SBV は、翌 2012 年にかけて分布域を拡大し、2013 年には一旦収束したかに思われたが、2014 年に再び欧州内でまん延し、疾病が発生している。SBV はウシに発熱、下痢、食欲不振、泌乳量低下などの症状を引き起こすことに加え、ウシ、ヒツジ、ヤギにおける異常産を引き起こし、畜産業に甚大な損失が生じている。

研究代表者らのグループは、SBV がオルソブニヤウイルス属のサシュペリウイルス (Sathuperi virus : SATV) とシャモンダウイルス (Shamonda virus : SHAV) の遺伝子再集合体 (リアソータント) ウイルスであることを明らかにした (Yanase *et al.*, Arch. Virol. 2012)。すなわち、L、M、S の 3 分節からなるゲノムを持つこれらのウイルスにおいて、SBV の L および S 分節は SATV に最も近縁である一方で、SBV の M 分節は SHAV に最も近縁である。しかし、SBV の病原性をわが国で分離された SATV や SHAV の病原性と比較すると、疾病発生の規模が全く異なる。SBV は欧州の広い範囲でウシ、ヒツジ、ヤギといった反芻動物に大規模な被害を引き起こし、20 カ国で SBV が検出されたのに対し、わが国では SATV が 1999、2006-2008 年に、SHAV が 2002、2007 年にそれぞれ分離されているが、疾病 (死産や新生子の体形異常) との関連がみられたのは合計 5 例のみである。感受性動物における増殖性や病原性、媒介節足動物と考えられるヌカカでの増殖性といった性状において SBV は SATV や SHAV と大きく異なるものと考えられるが、実際の疾病発生規模が何故これだけ異なるのか、その原因は全く不明である。

また、前述のようなアルボウイルスに関して、ウシをはじめとする反芻動物に対する病原性の解析は疾病の診断や予防のために必須であるが、解析の方法にはいくつかの技術的な問題がある。そのため、小動物モデルの作出が強く望まれるが、未だに開発されていない。妊娠ハムスターの AKAV 感染実験により流産が起こったとの報告があるが (斎藤, 脳と発達 1980; Andersen and Campbell, Am J Vet Res 1978)、流産を発症させるための実験条件は確立されておらず、ハムスターおよびウイルスに関する実験条件を検討する必要がある。

2. 研究の目的

わが国で SBV と同様のリアソータントウイルスが出現する可能性を検討するため、本研究では、哺乳類由来の培養細胞に SATV と SHAV を重複感染させ、遺伝子再集合によるリアソータントウイルスの生成を観察し、生成されたウイルスのゲノム構成を明らかにする。その後、リアソータントウイルスの培養細胞における増殖性を明らかにし、また、哺乳類における神経病原性を明らかにするために幼若マウスへの脳内接種を行う。さらに、妊娠ハムスターにアルボウイルスを接種することにより、異常産を引き起こす実験条件を検討する。

3. 研究の方法

(1) サシュペリウイルスとシャモンダウイルスの日本国内分離株による遺伝子再集合体ウイルスの試験管内生成およびその性状解析

SATV (2008 年鹿児島分離株) と SHAV (2002 年鹿児島分離株) を HmLu-1 細胞 (ハムスター肺由来) に同時接種した。接種の際の感染多重度は、SATV=1.0 / SHAV=0.1、SATV=1.0 / SHAV=1.0、SATV=0.1 / SHAV=1.0 の 3 通りとした。その後、増殖したウイルスを回収し、SATV と SHAV の各ゲノム分節を検出する RT-PCR 法を行った。次に、回収したウイルスと SATV および SHAV の増殖性を比較するため、HmLu-1 細胞に接種して 12 時間毎に培養上清を採取し、感染価を測定した。さらに、マウスにおける神経病原性を比較するため、3 日齢の ICR マウス 10~12 頭に 100 TCID₅₀ の各ウイルスを脳内接種し、経過を観察した。

(2) シリアンハムスターを用いた牛のアルボウイルス性異常産の小動物モデルの開発

シリアンハムスター妊娠個体 8 頭を供試し、妊娠 9 日目に AKAV OBE-1 株 (Genogroup II, 1974 年岡山分離株) および AKAV KM-1/Br/06 株 (Genogroup I, 2006 年熊本分離株) を各 3 頭に接

種した (GII 接種群および GI 接種群)。接種経路および力価は、予備実験のデータを基に 10^3 TCID₅₀ の皮下接種とした。残り 2 頭は陰性対照として培養液を接種した (対照群)。接種後、娩出される胎子の様子を観察し、胎子の脳、心臓、大腿部筋肉を回収してリアルタイム RT-PCR 法 (Shirafuji *et al.*, J. Virol. Methods 2015) によりウイルス遺伝子を検出した。

4. 研究成果

(1) SATV と SHAV の HmLu-1 細胞への同時接種により、合計 5 通りのリアソータントウイルス (R1~R5) が回収され、SBV と同様のゲノムを持つもの (R3) が含まれていた。経時的に採取したウイルスの感染価は、多くのウイルス間で有意な差がみられなかったが、36~60 時間後に R3 は SATV や SHAV より有意に低い値を示した (図 1)。一方、マウスへの接種試験では、SATV や SHAV では 4~6 日後に半数以上の個体が斃死したのに対し、R1 と R3 では 3 日後に半数以上が斃死した。以上の結果から、SATV と SHAV が哺乳類の細胞に重複感染することにより、SBV と同様のゲノムをもつウイルスを含め、多様なリアソータントウイルスが生成し、増殖性や神経病原性に変化が生じる例が示された。このことは、わが国で SATV と SHAV が宿主動物に重複感染した場合、SBV と同様のゲノムを持つリアソータントウイルスが出現する可能性を示唆する。今後、ウシでそのような現象が起こる可能性を検証する必要がある。

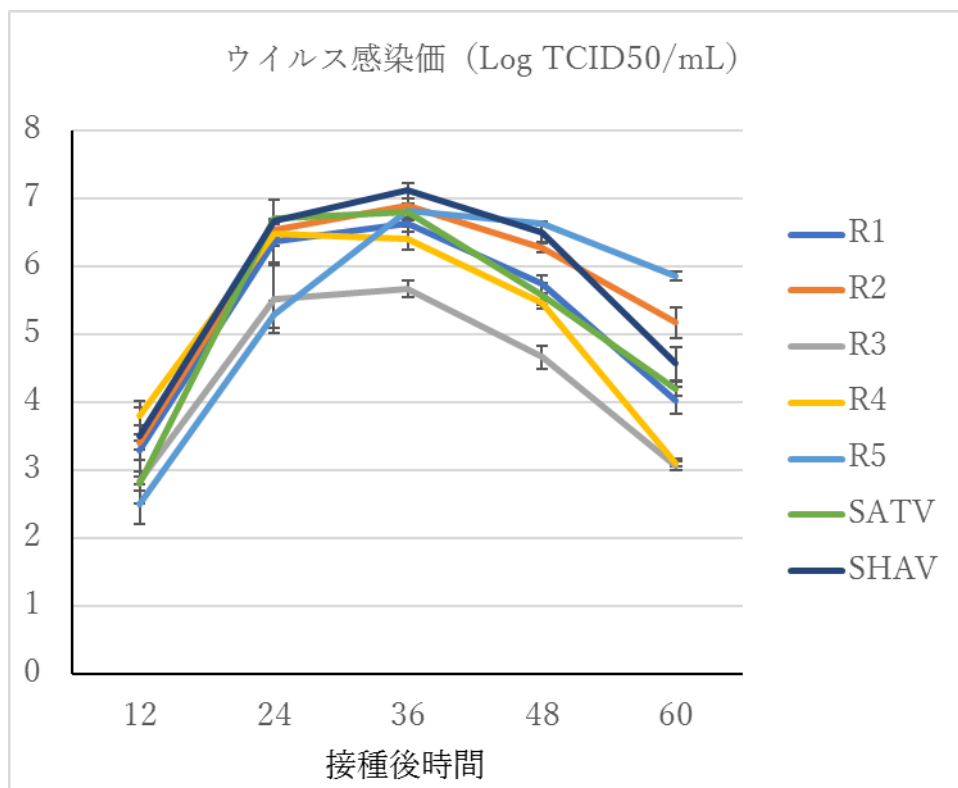


図 1 本研究において回収されたリアソータントウイルス (R1~R5)、SATV および SHAV の HmLu-1 細胞における増殖性の比較

(2) シリアンハムスター妊娠個体の AKAV 感染実験において、GII 接種群では、2 頭の接種個体から死産胎子と生存した胎子が混在して娩出され、残りの 1 頭からは死産胎子のみ娩出された。群全体の胎子生存率は 57.1% (16/28) であった。GI 接種群では、すべての接種個体から死産胎子と生存した胎子が混在して娩出されたが、死産胎子が全体的に多く、胎子生存率は 21.4% (6/28) であった。これらの群では、死産胎子に奇形を伴うものやミイラ状のものが含まれており、一部の生存胎子には虚弱子も含まれていた。対照群では全ての胎子が生存していた (図 2)。また、GII 接種群では検査を実施した 22 頭中 22 頭、GI 接種群では 22 頭中 15 頭から AKAV 遺伝子が検出された。以上の結果から、供試した 2 株の AKAV が接種個体の胎子に感染し、異常産が発生したと考えられる。よって、今回のような実験条件において、シリアンハムスターはアルポウイルスの病原性を評価するための小動物モデルとして有用である可能性が示された。

| No. | 群 | 胎子数 | 胎子の状態 | 胎子生存率 |
|-----|------------|-----|----------------|-------------------|
| 1 | GII | 9 | 7頭正常、2頭死産 | 57.1 % (16/28) |
| 2 | GII | 10 | 8頭正常、1頭虚弱、1頭死産 | |
| 3 | GII | 9 | 9頭死産 | |
| 4 | GI | 6 | 1頭虚弱、5頭死産 | 21.4 % (6/28) |
| 5 | GI | 9 | 2頭正常、2頭虚弱、5頭死産 | |
| 6 | GI | 13 | 1頭正常、12頭死産 | |
| 7 | 対照 | 11 | 11頭正常 | 100 % (19/19) |
| 8 | 対照 | 8 | 8頭正常 | |

図2 シリアンハムスター妊娠個体のAKAV感染実験における胎子の状態および生存率

<引用文献>

Yanase T, Kato T, Aizawa M, Shuto Y, Shirafuji H, Yamakawa M, Tsuda T, Genetic reassortment between Sathuperi and Shamonda viruses of the genus *Orthobunyavirus* in nature: implications for their genetic relationship to Schmallenberg virus. Arch Virol 157, 2012, 1611-1616

斎藤加代子、ハムスターへの実験的アカバネウイルス胎内感染 - 生直後の骨格筋、中枢神経の病理学的検索 - 、脳と発達、12巻、1980、519-534

Andersen AA and Campbell CH, Experimental placental transfer of Akabane virus in the Hamster. Am J Vet Res 39, 1978, 301-304

Shirafuji H, Yazaki R, Shuto Y, Yanase T, Kato T, Ishikura Y, Sakaguchi Z, Suzuki M, Yamakawa M, Broad-range detection of arboviruses belonging to Simbu serogroup lineage 1 and specific detection of Akabane, Aino and Peaton viruses by newly developed multiple TaqMan assays. J Virol Methods 225, 2015, 9-15

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 2 件)

白藤 浩明、小林 なつみ、田中 省吾、室田 勝功、梁瀬 徹、シリアンハムスターを用いた牛のアルポウイルス性異常産の小動物モデルの開発、第 161 回日本獣医学会学術集会、2018

白藤 浩明、岸田 なつみ、田中 省吾、室田 勝功、梁瀬 徹、サシュペリウイルスとシャモンダウイルスの日本国内分離株による試験管内における遺伝子再集合、第 162 回日本獣医学会学術集会、2019

6. 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：梁瀬 徹、田中 省吾、山川 睦

ローマ字氏名：(YANASE, tohru) (TANAKA, shogo) (YAMAKAWA, makoto)

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。