

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06424

研究課題名（和文）希少野生ツルに病原性を示すヘルペスウイルスの性状解析および流行状況把握

研究課題名（英文）Isolation and characterization of a herpes-like virus circulating in wild cranes

研究代表者

藤本 佳万（Fujimoto, Yoshikazu）

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准教授

研究者番号：20613631

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：鹿児島県出水水平野に飛来したナベヅルより分離されたヘルペス様ウイルスの性状解析を実施した。全ゲノム解析の結果、全長約159 kbpのゲノムを持ち、83個のオープンリーディングフレームを含むことが予想された。分子系統解析により、分離ウイルスはヘルペスウイルス亜科のマルディウイルス属に近縁であることが示唆された。発育卵接種試験において、ニワトリおよびカモ等の家禽胚に致死的な病原性を示すウイルスであることが明らかにされた。本研究を実施して得られたツル由来ヘルペスウイルスのゲノム配列情報や家禽に対する病原性試験結果は、希少野生鳥類であるツルにおける感染症対策における有用な情報になると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題においてツルに病原性を示すヘルペスウイルスの遺伝学的性状および生物学的性状を明らかにした。得られたゲノム配列は、ヘルペスウイルスの多様性と進化を正確に知るうえで貴重な情報になり、さらに、本ウイルス感染症における遺伝子診断技術開発の基礎情報としても有用と考えられる。ツル科鳥類の多くの種は、国際自然保護連合（IUCN）により絶滅の危機に瀕していると評価されていることから、本研究結果はツルの感染症対策を通じた保護活動に将来役立てられる事が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, herpes-like viruses were isolated from hooded cranes that migrated into the Izumi plain in Kagoshima prefecture, Japan. Whole genome analysis revealed that the genome length of the virus is approximately 159 kbp and 83 open reading frames are contained in the genome. Phylogenetic analysis demonstrated that the virus is genetically closely related to the genus Mardivirus of the subfamily alphaherpesviridae. In pathogenicity test using embryonated egg, the virus caused fatal infection in chicken embryos and duck embryos, suggested that those poultry species are susceptible to the virus infection. Characteristics of the virus from cranes will be useful information for infectious disease control of the herpesvirus derived from cranes.

研究分野：獣医学

キーワード：ヘルペスウイルス ツル科 野生鳥類 病原性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本最大規模のツルの越冬地である鹿児島県の出水平野には、ツル科全 15 種のうち、7 種の合計 15,000 羽程が毎年冬季に飛来する。なかでも、国際自然保護連合 (IUCN) が作成するレッドリストにおいて絶滅危惧類に指定されるナベヅルおよびマナヅルでは、世界の全生息羽数のそれぞれ約 80% および 40% が飛来するため、出水平野は国際的にも重要なツルの越冬地として知られている。このような野生鳥類の集団越冬地では、ウイルスや細菌などによる感染症の急速な拡大や大量死が懸念されており、平成 28 年度に出水平野の野生鳥類に発生した高病原性鳥インフルエンザによる集団死亡例以降、ツルの感染症対策の強化が求められている。

近年、出水平野にて越冬中に斃死したツルの死因調査において、肝臓・脾臓・小腸などに白色結節病変を認める死亡個体が複数観察されていた。これら臓器の病理組織学的検査の結果、多数の組織細胞に核内封入体の形成が観察されたことから、ウイルス性疾患により死亡した可能性が示唆された。核内封入体を形成する代表的なウイルスに対するプライマーを用いてウイルス遺伝子検出を試みた結果、白色病変を伴い死亡した個体からは例外なくヘルペスウイルス遺伝子が検出された。また、遺伝子の相同性解析の結果、最も相同性の高いアミノ酸配列をもつウイルスでも 73% しか一致しておらず、新規のヘルペスウイルス感染症により死亡した可能性が考えられた。以上の背景から、野生ツルに病原性を示す新規ヘルペスウイルス感染症の流行が示唆されたものの、研究開始当初には野生ツル由来ヘルペスウイルスの感染宿主域、病原性および流行状況に関する詳細な報告はなかった。

2. 研究の目的

感染症対策を講じるにあたり、まずは感染症を発症している個体からの病原体の分離と、その生物学的性状を明らかにすることが重要である。そこで本研究課題では、野生ツル由来ヘルペスウイルス感染症に関する疫学調査研究を実施し、有効な感染症対策に資する情報の構築を目的とする。

3. 研究の方法

(1) ウイルス分離

出水平野において死亡し、病理学的検索において白色結節病変が認められた臓器からのウイルス分離を試みた。ウイルス分離には、10% 臓器乳剤上清を試験に供した。6 ウェルプレートにアヒル胎仔線維芽細胞 (DEF) を播種し、臓器乳剤上清を接種後、37 °C および 5% CO₂ 存在下で 5 日間細胞の観察を行った。細胞変性効果 (CPE) を認めた培養上清を回収した。なお、DEF に CPE を認めなかった検体については、接種した細胞の培養上清を回収し、盲継代を 2 回繰り返した。合計 3 回の連続継代後も CPE が出現しなかった検体は、ウイルス分離陰性と判断した。

(2) ウイルス精製

DEF にウイルス接種後、細胞全体に CPE が観察されるまで 37 °C および 5% CO₂ 存在下にて培養した。細胞沈渣を取り除くために培養液を 4 °C、10,000 rpm にて 30 分間遠心し、上清を回収した。超遠心法には Optima XE-90 Ultracentrifuge (ベックマン・コールター) および SW 32Ti 6×38.5 mL スウィングローターを用い、遠心用ポリスチレンチューブの底にクッションとして 20% スクロース含む PBS 溶液を 10 mL 入れ、その上に上記の回収上清 25 mL を静かに流し入れた後、4 °C、32,000 rpm、2 時間の遠心を行った。遠心終了後に沈渣ペレットをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 1 mL に懸濁し、精製ウイルスとして回収した。

(3) 塩基配列決定法

次世代シーケンス解析によりウイルスゲノム配列を明らかにするため、以下の実験を実施した。精製ウイルスから innuPREP Virus DNA/RNA kit を用いて核酸を抽出後、RNase A (ニッポンジーン) にて RNA を消化し、AMPure XP (日本ジェネティクス) にて核酸を再度精製した。得られた核酸と NEBNext Ultra II FS DNA Library prep Kit for Illumina (NEB) を用いてシーケンスライブラリを作成した。NextSeq 500 (イルミナ) を用いて、2×150 bp のシーケンス解析を実施した。fastp 0.20.0 (Chen et al., 2018) を用いて得られたシーケンスリードのプレプロセッシングを行った後、metaSPAdes3.12.0 (Nurk et al., 2017) により *de novo* アセンブルを実施した。SeqKit 0.9.0 (Shen et al., 2016) を用いて、得られた scaffold から 1,000 塩基対以上のものを抽出し、BLASTx (Camacho et al., 2009) によりヘルペスウイルスに当たる scaffold を同定した。遺伝子配列解析ソフト EMBLseq: getorf (Rice et al., 2000) を用いて、次世代シーケンス解析により決定されたゲノム配列の中から蛋白質のコード領域を検索した。

(4) 分子系統解析

決定したウイルス遺伝子配列を基に、塩基配列解析ソフト Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 10.1.6 を用いて近隣接合法 (Neighbor-joining 法) による分子系統樹を構築した。系統関係の信頼性を評価するため、1,000 回の施行によるブートストラップ確率を求めた。分子系統解析に用いた参照ウイルスの塩基配列は、National Center for Biotechnology Information (NCBI) の GenBank から取得した。

(5) 培養細胞におけるウイルス増殖

CEF、DEF、Vero、LMH および DF-1 を 6 ウェルプレートに播種し、感染多重度 (Multiplicity of infection: MOI) 0.005 となるように希釈ウイルス液 1 ml を細胞に接種した。1 時間吸着後、感染細胞を 2 回洗浄し、5%FBS 含む DMEM 1.5 ml を各ウェルに加えて培養した。接種後 24 時間毎に 3 ウェルから培養上清および感染細胞を回収し、ウイルス力価測定に用いた。感染細胞は PBS で 2 回洗浄したのち、セルリフターで細胞をプレートから剥離し、DMEM 1 ml に回収した。さらに、回収した細胞浮遊液を 3 回凍結融解し、遠心後の上清をウイルス力価測定に用いた。ウイルス力価は、48 ウェルプレートに播種した DEF を用いて測定し、3 試験の平均値で表した。

(6) ニワトリ胚およびアヒル胚における感染実験

1,000 units/ml ペニシリン G および 1,000 µg/ml ストレプトマイシン硫酸塩溶液添加 PBS で希釈し、 10^4 TCID₅₀ (50% tissue culture infectious dose) となる感染価のウイルス液を各発育卵に 200 µl 接種した。尿膜腔内接種では 11 日胚齢ニワトリ卵および 13 日胚齢アヒル卵を用い、卵黄嚢内接種では 7 日胚齢ニワトリ卵および 10 日胚齢アヒル卵を用いた。接種後は 37 °C にて転卵を行い、検卵により胚の生死を毎日観察した。

4. 研究成果

(1) ウイルス分離

2018-2019 年度の冬季に出水平野に飛来後に死亡したツルから臓器を採材し、その乳剤を作製して DEF に接種した。その結果、5 個体のナベツルの肝臓、脾臓、排泄器官および食道から CPE を誘導するウイルスが回収された。ウイルス分離陽性の臓器乳剤を接種した DEF では、接種後 2-3 日目から収縮円形化および合胞体の形成を伴う CPE が観察され、接種後 5 日目には細胞シート全体に CPE が認められた。個体番号 C5591 の脾臓から分離された 5591S 株については、限界希釈法によるクローニングを実施し、得られた 5591ScI 株を以後の実験に用いた。

(2) 5591ScI 株の全ゲノム解析

5591ScI 株の分類学的位置を明らかにすることを目的として、次世代シーケンスによる全ゲノム解析を実施した。ウイルスゲノムの全長は共に約 159 kbp であり、合計 83 個のオープンリーディングフレーム (ORF) を含むことが予測された。UL2、UL5、UL15、UL19、UL27、UL28、UL29 および UL30 の 8 種類の ORF は、哺乳動物および鳥類由来ヘルペスウイルスに偏在することが報告されている (McGeoch et al., 1995, 2000)。ヘルペスウイルス亜科に属する代表的ウイルスおよび 5591ScI 株のアミノ酸配列を基にした分子系統解析を実施した結果、5591ScI はマルディウイルス属に分類されるウイルスと遺伝的に近縁であることが明らかとなった (図 1)。

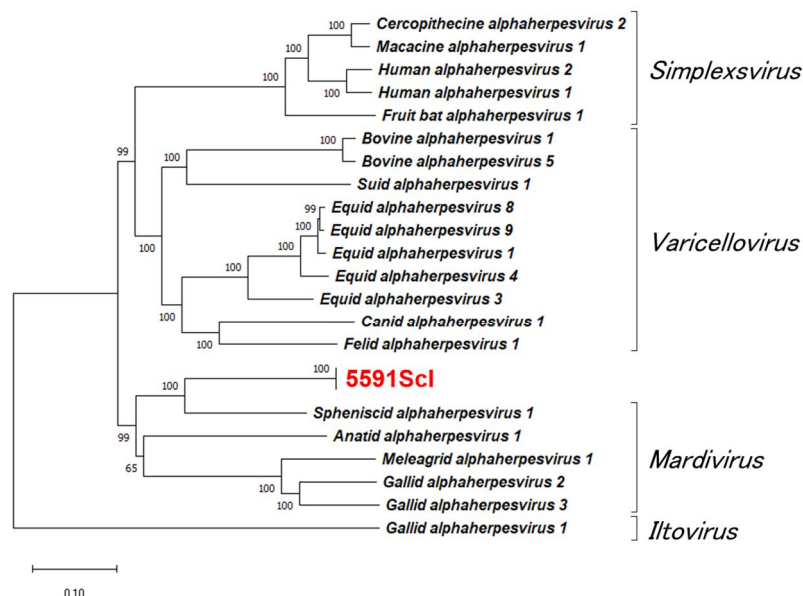


図1 αヘルペスウイルスのアミノ酸配列に基づいた系統樹

(3) 培養細胞におけるウイルス増殖能

鳥類を宿主とするヘルペスウイルスの分離および研究に汎用される培養細胞として、ニワトリ由来の初代培養細胞(CEF)および不死化細胞(LMH、DF-1)や、アフリカミドリザル由来のVero細胞が知られている。培養細胞における5591Scl株の増殖能を比較するため、MOI 0.005でウイルス接種後、24時間毎の培養上清中および培養細胞内のウイルス力価測定を実施した。接種した培養細胞のうち、DEF、CEFおよびVeroにおいてウイルス増殖が認められた。いずれの細胞においても、培養上清中および培養細胞内におけるウイルス力価は接種後5日目で最高値に達した。Veroと比較して、DEFおよびCEFでは接種後48時間以内の感染初期から効率の良いウイルス増殖を示した(図2)。一方、LMHおよびDF-1では、ウイルス増殖が認められなかった。

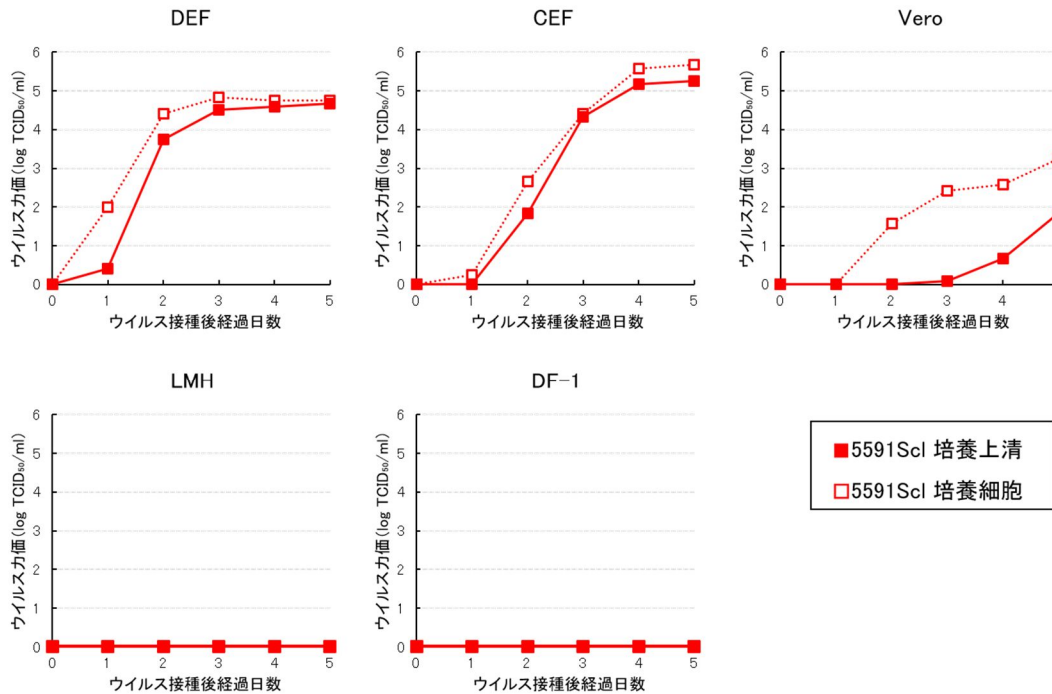


図2 培養細胞におけるウイルスの増殖曲線

(4) ニワトリ胚およびアヒル胚に対する5591Scl株の感受性

野鳥から分離された病原体の家禽に対する感受性を把握することは、家禽産業の伝染性疾病対策を図る上で重要である。そこで、アヒル胚およびニワトリ胚へのウイルス感染試験を実施した。5591Scl株を接種したアヒル胚では、接種経路を問わず接種した12例中9例の胚が死亡した(表1)。死亡アヒル胚には、特に脳を含む全身性出血、胚の矮小化、心嚢水の貯留、肝臓の表面粗造および壊死巣の密発といった肉眼病変を認めた。

尿膜腔内接種したニワトリ胚では、接種した全6例は実験終了まで死亡せず、内臓病変も認められなかった。一方、卵黄嚢内接種では、12例中10例のニワトリ胚が死亡し(表1)、死亡胚には全身性出血や肝臓壊死等の肉眼病変を認めた。死亡胚の脳および肝臓におけるウイルス力価を測定した結果、接種後3日目から7日目までの臓器では約 $10^{2.5}$ から $10^{7.5}$ TCID₅₀/gの力価を示した。

表1 アヒル胚およびニワトリ胚への5591Scl株接種試験成績

種	接種経路	接種胚数	死亡胚数	死亡までの接種後日数										
				2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
アヒル (ペキン種)	尿膜腔内接種	12	9	0	0	0	3	2	2	1	0	1	0	
	卵黄嚢内接種	12	9	5	1	1	1	1	0	0	0	-	-	
ニワトリ (白色レグホン種)	尿膜腔内接種	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	卵黄嚢内接種	12	10	0	3	1	0	4	2	0	0	-	-	

現在のところツル由来ヘルペスウイルスの遺伝子配列に関する報告はなく、本研究が初の報告である。得られたゲノム配列は、ヘルペスウイルスの多様性と進化をより正確に知るうえで、貴重な情報になり、さらに、本ウイルス感染症における遺伝子診断技術開発の基礎情報としても有用と考えられる。ツル科鳥類の多くの種は、IUCNにより絶滅の危機に瀕していると評価されていることから、本研究成果はツルの感染症対策を通じた保護活動に将来役立てられる事が期待される。また、本研究ではニワトリ胚の多くがツル由来ヘルペスウイルス 5591ScI 株に致死的感染し、脳や肝臓における効率良いウイルス増殖がみられるなど、ニワトリは本ウイルスに対する感受性を有する可能性が示唆された。ニワトリに対する本ウイルスの病原性を正確に評価するため、本研究で分離されたウイルスおよび家禽を用いた感染実験を実施する必要があると考えられる。

<引用文献>

- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL. 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10: 421.
- Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. 2018. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* 34: i884-i890.
- McGeoch DJ, Cook S, Dolan A, Jamieson FE, Telford EA. 1995. Molecular Phylogeny and Evolutionary Timescale for the Family of Mammalian Herpesviruses. *J Mol Biol.* 247: 443-458.
- McGeoch DJ, Dolan A, Ralph AC. 2000. Toward a comprehensive phylogeny for mammalian and avian herpesviruses. *J Virol.* 74: 10401-10406.
- Nurk S, Meleshko D, Korobeynikov A, Pevzner PA. 2017. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome Res.* 27: 824-834.
- Rice P, Longden I, Bleasby A. 2000. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet.* 16: 276-277.
- Shen W, Le S, Li Y, Hu F. 2016. SeqKit: A Cross-Platform and Ultrafast Toolkit for FASTA/Q File Manipulation. *PLoS One.* 11: e0163962.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 SUENAGA Yasuhiro, OBI Takeshi, IJIRI Moe, CHUMA Takehisa, FUJIMOTO Yoshikazu	4. 巻 81
2. 論文標題 Surveillance of antibiotic resistance in Escherichia coli isolated from wild cranes on the Izumi plain in Kagoshima prefecture, Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1291 ~ 1293
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.19-0305	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤本 佳万、石川 希実、畑井 仁、堀江 真行、小澤 真、富岡 幸子、丸山 覚詞、所崎 香織、原口 優子、松井 勉
2. 発表標題 ツル封入体病症例から分離されたヘルペスウイルスの遺伝学的解析
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------