

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16003

研究課題名（和文）腸管寄生原虫の新規共生ウイルスの探索とその役割の解明

研究課題名（英文）Search for novel symbiotic viruses of intestinal parasitic protozoa

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：アイメリアは畜産環境において問題となる原虫である。近年、原虫の多くに2本鎖RNA（dsRNA）ウイルスが共生していることが明らかとなった。さらに、共生dsRNAウイルスが存在すると、原虫の宿主に対する病原性が高まるという報告が存在する。本研究では、日本の鶏に寄生するアイメリアにおいてNGSとPCRを用いた解析により鶏アイメリアの共生ウイルスを明らかにすることを目的とした。その結果、ニワトリアイメリアからEimeria共生ウイルス（EBV-1）を初めて検出した。複数農場の疫学解析の結果、EBV-1の陽性率は43%であり、日本の鶏アイメリアにおいてEBV-1が蔓延していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Eimeriaはニワトリに感染して激しい血便を引き起こすため、畜産環境において非常に問題となっている。本研究において、ニワトリのEimeriaにウイルスが存在していること、そしてそれが日本で蔓延していることが初めて示された。寄生虫に共生dsRNAウイルスが存在すると、寄生虫の宿主に対する病原性が高まるという報告が存在する。従って、今後、Eimeria共生ウイルスがニワトリEimeriaに与える影響を調べることで、「寄生虫共生ウイルス」をターゲットとした新たな原虫治療薬・ワクチンの開発に繋がると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Eimeria is protozoa that is problematic in livestock production environments. In recent years, it has become clear that many of the protozoa have double-stranded RNA (dsRNA) viruses. Furthermore, it has been reported that the presence of symbiotic dsRNA viruses increases the virulence of the protozoan parasites to their hosts. In this study, we aimed to determine the prevalence of chicken Eimeria symbiotic viruses in Japan by NGS and PCR-based analysis. As a result, Eimeria symbiotic virus (EBV-1) was detected for the first time in Japan. Epidemiological analysis of multiple farms revealed a 43% positive rate for EBV-1, suggesting that EBV-1 is widespread in chicken Eimeria.

研究分野：寄生虫

キーワード：寄生虫 共生ウイルス Eimeria ニワトリ

## 1. 研究開始当初の背景

アイメリアなどの寄生性原生生物(原虫)は、牛や鶏に感染してコクシジウム症を引き起こし、激しい下痢、血便により、時に致死的となるため畜産経営において多大な被害をもたらす。近年、これら原虫の多くに、2本鎖 RNA(dsRNA) ウイルスが共生していることが明らかとなった。このウイルスは、原虫の外に出ることなく、原虫の分裂に伴って増殖すると考えられているが、詳細な生活環は明らかになっていない。

原虫にウイルスが存在する意義や影響はほとんど未解明であるが、原虫に共生 dsRNA ウイルスが存在すると、原虫の宿主に対する病原性が高まることが一部のリーシュマニア原虫において報告されている(Ives et al., Science, 2011)。その機構の一端として、原虫内の dsRNA ウイルスが宿主の Toll 様受容体(TLR)に認識され、炎症応答が活性化することで病態増悪につながるということが指摘されているが、その詳細は明らかになっていない。

これらから、寄生虫からウイルスを検出し、その影響を調べることは急務の課題であると考えられる。しかし、原虫から共生ウイルスを検出する際、原虫自身の大量の核酸によってウイルスの配列がマスクされてしまうために、共生ウイルスの配列を検出することは非常に困難を極める。従って、アイメリア原虫において、共生ウイルスを検出した報告は単報のみであり、疫学的な調査は存在しない。また、本邦のニワトリアイメリアにおける共生ウイルスの有無は不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、日本の鶏に寄生するアイメリアにおいて FLDS 法(Fragmented and primer Ligated dsRNA Sequencing)と PCR を用いた解析により、日本において鶏アイメリアの共生ウイルスの存在およびその頻度を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### ・FLDS 法による、鶏 *Eimeria* からの共生ウイルスの探索

原虫をビーズ破碎し、全核酸を抽出した後、特殊なセルロースカラムを用いて dsRNA を特異的に抽出する。dsRNA のバンドが検出された場合は、FLDS 法を用いた次世代シーケンサー解析を行う。これにより、微量の新規 dsRNA ウイルスの探索および、全配列の決定が可能となる。

### ・日本の鶏 *Eimeria* における EBV-1 の疫学解析

全国の農場からニワトリ糞便を集め、糞便から精製された鶏 *Eimeria* オーストに共生ウイルスがどの程度の割合で存在するのか調査をおこなった。鶏 *Eimeria* オーストから RNA を抽出し、cDNA 合成を行った。FLDS 法によって明らかとなったウイルス配列からプライマーを作成し、PCR によって *Eimeria* 共生ウイルスの存在率を調べた。

### ・オーストレベルにおける EBV-1 の存在率の解析

糞便から精製したオーストを一個一個採取し、凍結融解によって RNA を抽出し、cDNA 合成をおこなった。PCR・シーケンス解析によって *Eimeria* の種同定および EBV-1 の存在を解析し、オーストレベルにおける EBV-1 の存在率を調査した。

## 4. 研究成果

ニワトリアイメリアから既知および新規のウイルス様配列を検出した。そのうちの 1 種は、海外で報告された *Eimeria brunetti virus-1*: EBV-1 であることが明らかとなった。従って、日本のアイメリアに EBV-1 が存在することを初めて示した。

日本の各地の農場において、FLDS において検出された *Eimeria* 共生ウイルス(*Eimeria brunetti virus-1*: EBV-1)の疫学解析を行った。その結果、13 農場の 30 検体のうち、7 農場の 13 検体が EBV-1 陽性であった。陽性率は 43% であり、日本の鶏 *Eimeria* において EBV-1 が蔓延していることが示唆された。

日本の鶏は複数の *Eimeria* 種が混合感染しているため、EBV-1 がどの *Eimeria* 種に存在しているかは糞便由来オーストを RNA 抽出する方法では明らかにすることはできない。そこで、2 農場の糞便から *Eimeria* オーストを精製し、そのオーストを一個一個採取し、*Eimeria* の種同定および EBV-1 の存在を調査した。その結果、EBV-1 は *E. brunetti*、*E. tenella* や *E. acervulina* の複数の *Eimeria* 種に存在していることを初めて明らかにした。さらに、同じ農場においても EBV-1 陽性のオーストと陰性のオーストが存在していることが明らかとなった。

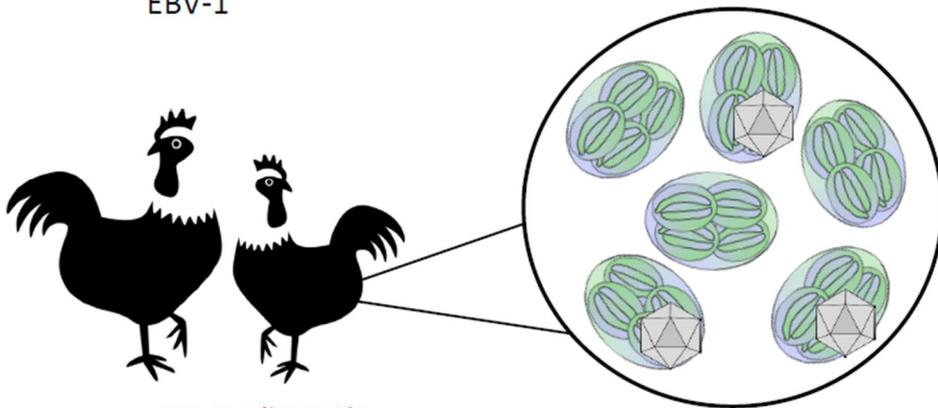
## <引用文献>

Ives A, Ronet C, Prevel F, Ruzzante G, Fuertes-Marraco S, Schutz F, Zangger H, Revaz-Breton M, Lye LF, Hickerson SM, et al. Leishmania RNA virus controls the severity of



EBV-1

*E. brunetti*, *E. tenella*, *E. acervulina*から検出



*Eimeria*混合感染鶏

EBV-1陽性・陰性オーシストの混在

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takaki Youki, Takami Yoshinori, Watanabe Takehiro, Nakaya Takaaki, Murakoshi Fumi	4. 巻 21
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 100430 ~ 100430
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村越ふみ
2. 発表標題 日本におけるクリプトスポリジウムおよびアイメリア共生ウイルスの検出と疫学解析
3. 学会等名 第37回生態学・疫学談話会（第92回日本寄生虫学会サテライトミーティング）（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村越 ふみ、田中 悠太郎、千葉 悠斗、浦山 俊一、萩原 大祐、松林 誠、中屋 隆明
2. 発表標題 日本における鶏アイメリアからの原虫共生ウイルスの網羅的検出と同定
3. 学会等名 第90回日本寄生虫学会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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