

令和 3 年 4 月 27 日現在

機関番号：13701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23706

研究課題名(和文) 様々な動物を対象としたベータコロナウイルス-1種に対する疫学調査

研究課題名(英文) Epidemiological survey for betacoronaviruse-1 species in various types of animals

研究代表者

中川 敬介 (NAKAGAWA, KEISUKE)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：90853250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：牛コロナウイルスを含むベータコロナウイルス-1種に属するウイルス群(1CoVs)の自然感染動態を明らかにする目的で、様々な動物の糞便サンプル(牛、犬、猫、鶏)から1CoVs遺伝子の検出を試みた。その結果、犬由来サンプル約100、猫由来サンプル約100、鶏由来サンプル約50、牛由来サンプル約200からは、1CoVsのN遺伝子は検出されなかった。一方で、牛の下痢便由来のサンプルからは、冬季にウイルス遺伝子の検出がみられた。また、検出されたウイルス遺伝子は牛コロナウイルスのものであった。以上より、犬、猫、鶏、および牛の正常便を介した1CoVsの感染拡大は引き起こされにくいことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

牛コロナウイルスを含むベータコロナウイルス-1種に属するウイルス群(1CoVs)は比較的幅広い宿主域をもつ可能性が考えられる。したがって、我々が今までに注目してこなかった動物が、1CoVsの伝播動物となっている可能性が考えられるものの、様々な動物を対象とした1CoVsの感染実態調査は行われてこなかった。今回の調査により、犬、猫、鶏、牛の正常便からは1CoVsの遺伝子は検出されなかった。この結果は、健康な犬、猫、鶏、牛の糞便には1CoVsは存在せず、自然界での1CoVsの存続には、これらの動物は重要な役割を果たしていないことを示唆している。

研究成果の概要(英文)：To understand infection status of beta-coronavirus-1 species (CoVs) including bovine coronavirus in nature, we attempted to detect the viral gene (N gene) by RT-PCR from fecal samples of asymptomatic animals, such as dogs (about 100 samples), cats (about 100 samples), poultry (about 50 samples) and cattle (about 200 samples). Accordingly, there were no samples being positive with RT-PCR, whereas we could detect some samples being positive with RT-PCR from symptomatic cattle. These data indicate that asymptomatic animals will not have roles for transmitters of CoVs.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ベータコロナウイルス-1種 牛コロナウイルス 分子疫学 伴侶動物 家畜

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

コロナウイルスは様々な動物に下痢症や呼吸器病等を引き起こし、畜産業に大きな経済損失をもたらす。これまでコロナウイルスの宿主域は、ウイルスが利用する受容体により決定されと考えられてきた。シアル酸を受容体とするベータコロナウイルス-1 種に属するウイルス群 ( $\beta$ 1CoVs) は、疾病を引き起こす動物(感受性宿主)以外にも感染する可能性が示唆されている。家畜への  $\beta$ 1CoVs 感染を防ぐためには、本ウイルス群の生態・流行動態の解明が重要である一方、その調査は限定的である。本研究では「既知の感受性宿主以外の動物にも  $\beta$ 1CoVs が感染しており、家畜への  $\beta$ 1CoVs 感染の病原巣となっている」という仮説より、様々な動物の糞便より  $\beta$ 1CoVs の検出を試み、本ウイルス種の生態・流行動態の解明を目指した。

### 2. 研究の目的

$\beta$ 1CoVs には、牛コロナウイルスを含め、現在も小動物医療や家畜衛生において問題となっている病原体が多く含まれる。本研究の目的は、これまで十分な疫学調査が行われてこなかった  $\beta$ 1CoVs の生態・流行動態を解明し、感受性宿主への感染経路の一端を明らかにすることである。これまでのコロナウイルスの疫学調査は、ウイルスが病原性を示す動物(感受性宿主)に対して行われることが多かった(例: 牛コロナウイルスの疫学調査を牛に対して行う)。本研究では、これまで  $\beta$ 1CoVs の感受性宿主と考えられてこなかった動物を対象にし、本ウイルス群を網羅的に検出する点に学術的独自性がある。 $\beta$ 1CoVs が幅広い動物種に感染・蔓延していることが明らかになれば、コロナウイルスの生態に新たな知見を加えることができる。また、家畜への  $\beta$ 1CoVs の侵入を防ぐ上で重要な知見となる新たな  $\beta$ 1CoVs 感染経路の発見に繋がると考えた。

### 3. 研究の方法

#### 家畜および伴侶動物からの糞便サンプルの採集

民間の動物病院および岐阜県家畜保健衛生所と協力し、伴侶動物(犬、猫)および家畜(牛、鶏)の糞便を採集した。

#### $\beta$ 1CoVsのN遺伝子およびS遺伝子の検出

採集した糞便サンプルより、RNA を抽出後、ランダムプライマーを用いて cDNA に変換した。まず、 $\beta$ 1CoVs 間で保存性の高い N 遺伝子を標的とし、幅広い種類の  $\beta$ 1CoVs 遺伝子を検出可能なプライマーを用いた PCR により、サンプル中における  $\beta$ 1CoVs の存在を確認した。さらに、 $\beta$ 1CoVs 間で比較的保存性の低い S 遺伝子を標的とした PCR を行い、増幅された S 遺伝子領域の塩基配列を決定することで、サンプル中に存在する  $\beta$ 1CoVs の種類を推測を試みた。

#### ウイルス分離および次世代シーケンサーによる分離ウイルスの全塩基配列の決定

N および S 遺伝子が検出された糞便サンプルを用いて、ウイルスの分離を試みた。 $\beta$ 1CoVs が哺乳動物および鳥類で共通発現するシアル酸を受容体として利用すること、ならびに抗ウイルス因子である I 型インターフェロン系が欠損された細胞であることから、Vero 細胞を第一選択細胞としてウイルス分離を試みた。また、必要があれば糞便サンプルを採取した動物種由来の培養細胞を用いた。分離に成功した場合は分離ウイルスを用いて、ウイルスの全塩基配列を次世代シーケンサーにより決定し、これまでに報告された  $\beta$ 1CoVs の遺伝子配列と比較した系統解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### 牛、犬、猫、鶏の正常便からの $\beta$ 1CoV<sub>s</sub> 遺伝子探索

様々な動物の糞便サンプル（牛、犬、猫、鶏）から  $\beta$ 1CoV<sub>s</sub> の N 遺伝子の検出を試みた。その結果、犬由来サンプル約 100、猫由来サンプル約 100、鶏由来サンプル約 50 から  $\beta$ 1CoV<sub>s</sub> の N 遺伝子は検出されなかった。牛由来サンプル約 200 については 2019 年-2020 年の通年にかけて、正常便を中心に  $\beta$ 1CoV<sub>s</sub> の N 遺伝子の検出を試みたものの、正常便からはウイルス遺伝子は検出されなかった。これらの結果より、犬、猫、鶏、および牛の正常便を介した  $\beta$ 1CoV<sub>s</sub> の感染拡大は引き起こされにくいことが示唆された。

##### 同一牛コロナウイルス罹患牛の気管スワブおよび下痢便から検出された牛コロナウイルス遺伝子の解析

$\beta$ 1CoV<sub>s</sub> の 1 つである牛コロナウイルスは牛に呼吸器症状と下痢症を引き起こす。このように異なる組織にて異なる病態を引き起こすことが分かっているものの、感染牛の各組織に同じ遺伝子のウイルスが感染するのか、異なる組織には異なる遺伝子を保有するウイルスが感染するのかが不明である。本研究の実施期間中の 2020 年 2 月に、岐阜県の農家にて牛コロナウイルスによる下痢症の集団発生があり、本農家の死亡成牛 1 頭が、剖検のため岐阜県中央家畜保健衛生所に運ばれてきた。その際に剖検に立ち会い、同死亡成牛 1 頭の下痢便および呼吸器スワブを回収し、ウイルス遺伝子の検出とウイルス分離を試みた。その結果、両サンプルから牛コロナウイルス遺伝子（N 遺伝子と S 遺伝子）が検出された。これら下痢便および呼吸器スワブ由来のウイルスの配列を次世代シーケンシングにより決定したところ、両サンプル由来のウイルス遺伝子は 100% の一致率を示した。この結果は、牛コロナウイルスは腸管と呼吸器という異なる組織に、同じ遺伝子のウイルスが感染することを示している。本研究成果の一部を第 163 回日本獣医学会学術集会にて発表した。

##### コロナウイルス罹患牛の気管スワブからの牛コロナウイルスの分離

また、上記の下痢便および呼吸器スワブから、ヒト腸管由来細胞である HRT-18 細胞を用いてウイルス分離を試みた。その結果、下痢便からはウイルスは分離されなかった一方、呼吸器スワブから牛コロナウイルスの分離に成功した。現在、本分離ウイルスの配列を次世代シーケンシングにより決定している。

本研究に供した犬、猫、牛、鶏の正常便からは  $\beta$ 1CoV<sub>s</sub> 遺伝子は検出されなかった。これらの結果は、これら動物の正常便を介した  $\beta$ 1CoV<sub>s</sub> 感染拡大は引き起こされにくいことを示唆している。一方で、本研究実施期間中の冬季に牛コロナウイルス感染症の集団発生事例に遭遇した。依然として、牛コロナウイルスを含めた  $\beta$ 1CoV<sub>s</sub> の侵入経路は不明であることから、継続的な疫学調査が必要と考えられる。また、当初の目的とは逸脱したが、貴重な牛コロナウイルス自然感染牛のデータより、同一のウイルスゲノムを有す牛コロナウイルスが呼吸器と腸管という異なる組織に感染することを示すことができた。また、同牛の気道スワブから牛コロナウイルスを分離することに成功した。以上より、本研究の結果は、 $\beta$ 1CoV<sub>s</sub> の生態解明の一助となり、また今後の牛コロナウイルス感染症の防疫に寄与する情報であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 中川 敬介
2. 発表標題 冬季に死亡した牛の気道および腸管内容物から検出された牛コロナウイルスのS遺伝子解析
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
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
---------	---------