

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06392

研究課題名(和文)野生動物生息地環境水のウィローム解析による野生動物ウイルス叢の解明

研究課題名(英文)Virome analysis of environmental water in wildlife habitat to understand viral flora of wild animals

研究代表者

山口 剛士 (Yamaguchi, Tsuyoshi)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：70210367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：野生動物生息環境の環境水および野生カモ類のスワブサンプルを対象に網羅的ウイルス遺伝子の探索を行なった。その結果、国内未報告ウイルスを含む多様なウイルスが検出され、野生動物由来ウイルスによる潜在的リスクの存在と渡り鳥による国内へのウイルス侵入実態が明らかになった。採水地点近隣に農場がある一部の環境水からは、主に家畜での感染が報告されているウイルスに一致した配列が検出され、環境水を介した家畜から野生動物への感染の可能性が示された。野外の水場は野生動物・家畜・人の接点となる可能性があることに加え、サンプル採取が容易でありワンヘルスの潜在的リスクとなるウイルス監視に極めて有用と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

野生動物が利用する水場環境水から国内未報告ウイルスを含む多様なウイルスを検出し、野生動物が保有するウイルス探索における環境水の有用性を示した。また、環境DNAによる動物相解析により検出ウイルスの宿主動物推定に道を拓いた。野生カモ類スワブの網羅的ウイルス検出では、渡り鳥による国内未報告ウイルス持ち込みを明らかにした。一部の環境水からは、家畜由来の可能性が高いウイルスが検出され、環境水を介した家畜から野生動物へのウイルス伝播の可能性を示した。以上より、環境水を検索対象とする野生動物ウイルス叢解析という新たな分野を開拓し、ワンヘルスの潜在的リスクとなるウイルス監視における環境水の重要性を示した。

研究成果の概要(英文)：To understand the prevalence of viruses in the wildlife environment, virome analyses were conducted on environmental water samples obtained from wildlife habitats and swab samples collected from wild ducks. Various viruses including never reported in Japan were detected in the water and duck swabs. These findings reveal the existence of a potential risk from wildlife-derived viruses and the actual situation of virus introduction into Japan by migratory birds. In some environmental water samples collected at water sites relatively close to livestock farms, viral sequences almost identical to the viruses usually detected from livestock were detected, indicating the possibility of spread of livestock-derived viruses to wild animals via environmental water. It was concluded that water sites are useful for monitoring various viruses that can be a potential risk for One Health because there are possibility for wildlife, livestock, and human contact and the ease of sample collection.

研究分野：動物衛生学

キーワード：野生動物 環境水 ウイローム ウイルス感染症 家畜 次世代シーケンス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 野生動物は、様々なウイルスの自然界での存続や地球規模の移動に重要な役割を果たし、時に人や家畜への感染源となる。このため、野生動物を宿主とするウイルスの実態解明は、将来の感染症制御や感染症の発生を未然に防ぐために極めて重要である。

(2) 近年、病原微生物を含む多様な生物のゲノム情報の蓄積と次世代シーケンス (NGS) 技術の急速な発展により、NGS による網羅的ウイルス遺伝子の探索が比較的容易に行えるようになった。

(3) 野生動物についても、糞便や血液など特定の個体を対象にした網羅的ウイルス遺伝子の探索が行われている。しかし、その知見は限定的で多様な野生動物を宿主とするウイルスの実態については未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

(1) 国内の野外環境にあって野生動物を宿主とし、動物衛生的および公衆衛生的潜在的リスクとなるウイルスの実態を明らかにする。

(2) 多様な野生動物を宿主とするウイルスの網羅的検出のため、野生動物生息環境にある環境水を対象に網羅的ウイルス遺伝子の探索を実施し、その有用性を評価する。

(3) 環境水から検出されたウイルスの宿主動物推定における環境水から調整した環境 DNA 解析による動物種同定の有用性を評価する。

3. 研究の方法

(1) 環境水

試験には、A、B、C、D および E の 5 県で採取した 9 検体の環境水を用いた。A 県では同一地点で異なる時期に 3 検体、B 県では異なる地点で採取した 3 検体、C 県、D 県および E 県ではそれぞれ 1 検体ずつ採取した。

(2) 環境水からのウイルス濃縮法の検討

市販のニューカッスル病ウイルス (NDV) 弱毒生ワクチンを加えた滅菌蒸留水から、ウイルスをスキムミルクに吸着して回収するスキムミルク法 () および Polyethylene glycol MW 8000 および NaCl を添加によりウイルスを沈渣として回収する PEG 法 () で NDV を回収、回収されたウイルス量からウイルスの濃縮率を比較・検討した。

(3) ウイルス核酸の調製とウイルスゲノムの増幅

ウイルス濃縮液から DNA および RNA を調製し、DNA は全ゲノム増幅用の市販キットで、RNA は配列に依存しない単一プライマー増幅 (Sequence-Independent Single Primer Amplification : SISPA) 法により増幅し、得られた増幅断片を NGS に供した。NGS により得られたシーケンスデータは、Adapter 配列のトリミングおよび Pair end merge 後、ウイルス相同配列検出のため既報のウイルスゲノムおよびウイルス様配列から成る Clustered Reference viral database (2) を対象に BLAST 検索に供した。データベース中の配列と相同性を示した配列は、さらに National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Nucleotide collection (nr/nt) を対象とした BLAST 検索に供し、ウイルス由来配列との相同性が確認された配列を当該ウイルス由来と判定した。

(4) 環境 DNA の調製とメタバーコーディング解析による動物相解析

環境水約 1 L を濾過後、濾過フィルターから DNA を調製、哺乳類 () および鳥類検出用プライマーペア () を用いた PCR 後、増幅産物を NGS 解析に供し、BLAST 検索で 97% 以上の相同率を示した動物種を検出動物種とした。

(5) カモ類スワブからの網羅的ウイルス遺伝子探索

C 県の環境水採取地で捕獲されたオナガガモと他の地域で狩猟により捕殺されたカモ類の気管およびクアカからスワブを採取し、ブイヨンに懸濁、使用まで -80 に保存した。狩猟個体からは、肺組織を採取し使用まで -30 に保存した。

各スワブ懸濁液はスワブ採取部位ごとにまとめて混合後、環境水と同様に NGS 解析に供した。肺組織は、NGS で検出された一部ウイルス遺伝子の PCR 法による検出に用いた。

4. 研究成果

(1) 環境水の網羅的ウイルス遺伝子探索

環境水からのウイルス濃縮法の検討

スキムミルク法および PEG 法のウイルス濃縮率比較で、NDV 生ワクチン株は PEG 法よりスキムミルク法で 10 倍程度多くのウイルス RNA が回収され、環境水からのウイルス濃縮にはスキムミルク法を用いることとした。

環境水の網羅的ウイルス遺伝子探索と動物相解析

A 県では、同一の水場で 4 月、7 月および 10 月に採水した環境水を解析に供した。4 月および 7 月の環境水からは、脊椎動物に由来する可能性のあるウイルスとしてジェノモウイルス科ウイルスが検出された。10 月の環境水からは、ジェノモウイルス科の他、パルボウイルス科未分類ウイルス、デンソウイルス亜科未分類ウイルス、未分類アンピデンソウイルス、メジロのコロナウイルスなど多様なウイルスが検出された。これらは糞便やスワブなど過去に鳥類に関連するサンプルからの検出報告があったが、いずれも病原性は不明であった。動物相解析では、4 月の環境水からは主にニワトリが、7 月の環境水からはニワトリおよびカルガモまたはマガモが検出された。10 月の環境水からは、ニワトリ、セキレイ属の一種、ヒヨドリ、ニホンアナグマ、コウモリ、アカネズミなど、多様な動物種が検出された。採水地近隣にある養鶏場の影響と考えられるニワトリ以外の検出状況から、季節による動物相の変化が示された。また、季節による動物種の変化が検出ウイルスの多様性に影響する可能性が考えられた。

B 県で採取した環境水 3 検体のうち、シカが多く生息する山中で採取した環境水からは、有意なウイルスとして、米国で呼吸器症状を呈したオジロジカからの検出例があるアストロウイルスに高い相同性を示す配列が多数検出された。この採水地点では、環境 DNA からニホンジカが高率に検出され、ニホンジカがアストロウイルスの宿主動物と推定された。このウイルスは国内での報告例がなく、宿主動物の確認および国内での浸淫状況や病原性解明のため、ニホンジカを対象にした疫学調査が必要と考えられた。

B 県の住宅地近隣の山中で採水した環境水からは、マダニを宿主とし、人を含む多様な哺乳動物からの検出例から人への潜在リスクの可能性が指摘されているフラビウイルス科ウイルスと高い相同性を示す配列が多数検出された。環境 DNA からは、ヒヨドリ、ホオジロ、マミチャジナイなどの小鳥のほか、ニホンアナグマ、イノシシ、ニホンジカなどが検出された。このウイルスは、国内でマダニからの検出例があるが、環境水からの検出例は世界的にも例がなく、環境水から検出されたウイルスが動物相解析で検出された動物由来なのか、それらに寄生していたマダニ類由来なのか、今後の検討が必要と考えられた。

B 県の養鶏場近くにある溜池で採取した環境水からは、鳥類に病原性を示す可能性のあるウイルスとして、鳥アデノウイルス、鶏貧血ウイルス、ロタウイルス A および Chicken parvovirus が検出された。いずれも主にニワトリからの検出例があるウイルスであったことに加え、動物相解析で主にニワトリが検出されたことから、これらのウイルスは養鶏場に由来する可能性が高いと考えられた。一方、これらのウイルスは野鳥に感染する可能性もあることが知られている。動物相解析ではニワトリのほかにカモ類が検出されており、ニワトリ由来のウイルスが環境水を介し、野鳥により環境中に拡大する可能性のあることが示された。この環境水からは、そのほかにも *Avian dependoparvovirus 1*、*Turkey astrovirus 1*、*Chicken picornavirus* など、鳥類を宿主とするウイルスと高い相同性を示す配列が多数検出された。

C 県の環境水からは、マガンの肛門スワブ、コブハクチョウ糞便、アヒル糞便からの検出例があるピコルナウイルス科ウイルス相同配列が多数検出された。動物相解析では、主にマガンおよびオナガガモが検出され、これらが検出ウイルスの宿主動物であることが推察された。

D 県の環境水からは、アデノウイルスが高率に検出された他、鳥類および豚の糞便関連サンプルからの検出例がある複数種のパルボウイルス科ウイルス、豚糞便からの検出例があるサーコウイルス科およびスマコウイルス科ウイルスが多数検出された。RNA ウイルスでは、鳥類糞便関連サンプルからの検出例があるピコルナウイルス科、セドレナウイルス科、およびカリシウイルス科ウイルス、豚の糞便や唾液などから検出例のあるピコルナウイルス科およびアストロウイルス科ウイルスが検出された。動物相解析では、ナベヅルが最も高率に検出され、次いで複数種のカモ類が検出された。今回検出されたアデノウイルスは、過去にナベヅル糞便からの検出例があり、環境 DNA から検出された動物種の成績と良く相関した。動物相解析で検出されなかった豚やイノシシからの検出例が報告されている多くのウイルスが検出された理由は不明だが、採水地に流入する水路等の周囲には養豚場が点在しており、養豚場を起源とするウイルスが水場に流入している可能性が考えられた。検出されたウイルスの感染性は不明であり、その起源を含めさらなる検討が必要と考えられた。

E 県の山中で採取した環境水からは、シカからの検出例のあるアストロウイルスおよびピコルナウイルス科ウイルスが検出された。動物相解析では主にニホンジカが検出され、検出されたウイルスの宿主である可能性が推察された。アストロウイルスは、B 県で検出されたウイルスと一致し、当該ウイルスが国内のシカに広く感染している可能性が考えられた。検出されたピコルナは国内未報告ウイルスで、野生のシカなどの感染実態や病原性は不明だが、ヤギで下痢症との関

連が指摘されていることや、オーストラリアの野生シカからの検出例があることから、さらなる調査研究が必要と考えられた。

(2) カモ類スワブの網羅的ウイルス遺伝子探索

C県の採水地で、捕獲したオナガガモの気管およびクロアカスワブのNGS解析では、気管およびクロアカ両スワブから国内では未報告のパピローマウイルスが高率に検出された。

カモ類狩猟個体のクロアカスワブからは、国外で肝炎を呈したアヒルからの検出例があるピコルナウイルス科ウイルスが検出された。また、気管およびクロアカ両スワブからヒトデからの検出例があるデンソウイルス亜科のウイルスが検出された。このウイルスは、6個体の肺乳剤からも検出された。当該ウイルス無脊椎動物が宿主動物と考えられているが、カモ類の肺乳剤からウイルス遺伝子が検出されたことから、このウイルスがカモ類にも感染する可能性が示された。狩猟カモ類から検出された上記ウイルスは、いずれも国内未報告ウイルスで、渡り鳥であるカモ類により国内に持ち込まれていることが示された。

(3) 総括

環境水から、脊椎動物からの検出例のある多様なウイルスが検出された。その多くは病原性が未確定あるいは不明であったが、一部には、家畜や人の健康リスクとなる可能性のあるウイルスが検出され、環境水がこれらウイルスの野生動物間の伝播に重要な役割を果たすこと、さらには家畜や人への感染源となる可能性が示された。環境水から検出されたウイルスの多くは、過去に糞便や肛門またはクロアカスワブから検出例のあるウイルスであり、環境水からのウイルス検出は特に糞便中に排出されるウイルスの検出に有効と考えられた。環境水から検出されたウイルスの宿主動物は不明だが、検出ウイルスに近縁なウイルスの宿主動物が環境DNAから検出された動物種と一致することが多く、環境DNAを用いた動物相解析が検出ウイルスの宿主動物推定に有用であることが示された。

以上、環境水を対象にしたウイルス配列の網羅的探索は、未知ウイルスを含め水場周辺に生息する複数の動物種に関連するウイルスを比較的容易に検出することが可能であり、希少な野生動物の生息地や家畜と野生動物が接する可能性のある放牧場、人との接点がある野生動物生息地など、感染症発生の潜在的リスクが想定される場所や地域での監視対象として極めて有用であることが示され、今後多方面での活用が期待される。

<引用文献>

Calgua B, Rodriguez-Manzano J, Hundesa A, *et al.* New methods for the concentration of viruses from urban sewage using quantitative PCR. *J Virol Methods* 2013;187(2):215-21.

Goodacre N, Aljanahi A, Nandakumar S, *et al.* A Reference Viral Database (RVDB) To Enhance Bioinformatics Analysis of High-Throughput Sequencing for Novel Virus Detection. *mSphere* 2018;3(2): e00069-18.

Hjelmsø MH, Hellmér M, Fernandez-Cassi X, *et al.* Evaluation of Methods for the Concentration and Extraction of Viruses from Sewage in the Context of Metagenomic Sequencing. *PLoS One* 2017;12(1): e0170199.

Ushio M, Fukuda H, Inoue T, *et al.* Environmental DNA enables detection of terrestrial mammals from forest pond water. *Mol Ecol Resour* 2017;17(6): e63-e75.

Ushio M, Murata K, Sado T, *et al.* Demonstration of the potential of environmental DNA as a tool for the detection of avian species. *Sci Rep* 2018;8(1):4493.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柴田千晴、笛吹達史、北村夕子、森口紗千子、松井 勉、山口剛士
2. 発表標題 野外環境水からの網羅的ウイルス遺伝子解析による動物由来ウイルスの探索
3. 学会等名 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柴田千晴、笛吹達史、小林由美、山口剛士
2. 発表標題 日本国内に冬季渡来するカモ類保有ウイルスの網羅的探索 - 渡り鳥を介した未知ウイルスの侵入実態
3. 学会等名 第28回日本野生動物医学会集会
4. 発表年 2022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
---------	---------