

博士課程

新規ウシエンテロウイルスの塩基配列決定と分子疫学

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

病理病態学講座微生物学分野

岡田貴志

目次

1. 要約	p.3
2. 研究背景	p.6
3. 研究目的	p.9
4. 研究方法	p.9
5. 研究結果	p.13
6. 考察	p.15
7. 結論	p.18
8. 参考文献	p.20
9. 図	p.24
10. 表	p.29
11. 謝辞	p.33

1. 要約

1-1. 研究背景

ウシエンテロウイルス (Bovine Enterovirus: BEV) は、ウシにおける消化器疾患などの原因になっている可能性があるが、知見が少ないウイルスでありその病原性については不明な点が多い。畜産経営において家畜伝染病等が発生した場合には、患畜の殺処分、家畜の移動制限等の措置がとられることとなる。このような場合、畜産農家の経営の問題、さらに近隣農家への問題の波及、そのことによる生産量減少などがありその影響は広範囲にわたる。ウシエンテロウイルスは家畜の間で広く浸淫しており、一部の研究では、ウシにおいてウシエンテロウイルスが病原性を持つと示唆する研究もある。日本のウシエンテロウイルスに関する研究が乏しく、ウシエンテロウイルスの実態はいまだに不明である。したがって、ウシエンテロウイルスに関するウイルス学的・疫学的知見の蓄積が必要である。

1-2. 研究目的

本研究では、ウシエンテロウイルスの分子生物学的解析と疫学調査をとおして、日本におけるウシエンテロウイルスに関する新たな知見を得ることを目的とした。

1-3. 方法

1990年と2012年12月から2014年12月までに、鳥取

県家畜保健衛生所の 9 検体と東京農工大学フィールドサイエンスセンターの 20 検体、石川県北部家畜保健衛生所の 1 サンプル、鹿児島農業協同組合の 27 検体において採取されたウシの糞便検体を対象とし、次世代シーケンサーによりウイルスの解析と疫学調査を実施した。またそれぞれの検体の年代（1990 年に 1 か所、2012 年から 2014 年に 3 か所で採取）、地域性（鳥取県・東京都・石川県・鹿児島県）、宿主動物（ホルスタイン・黒毛和牛）による比較もおこなった。

1-4. 結果および考察

本研究の結果、鳥取県において採取された検体から新規ウシエンテロウイルスと考えられるウイルスが検出され、このウイルスを鳥取 U31 株として次世代シーケンサーにより全塩基配列を解析した。鳥取 U31 株の全塩基配列は 7,411 塩基から構成され、含まれるラージオープンリーディングフレームは 2,167 のアミノ酸から構成されていた。鳥取 U31 株の塩基配列と他のウシエンテロウイルスの相同性解析では、P1 領域が 60.5-74.9%、P2 領域が 66.4-79.9%、P3 領域が 68.5-84.7%となり、P1 領域における系統樹解析の結果も、鳥取 U31 株が新規エンテロウイルスである事を示していた。また鳥取 U31 株は既知のウシエンテロウイルスとの相同性解析・系統樹解析からエンテロウイルス F 型に分類されたが、系統樹解析の結果、エンテロウイルス F 型のなかでも血清型 F1 が最も近縁であるが、既知の血清型とは異なる新たなクラスターを形成したことにより、本ウイルスが新しい血清型（血清型 F5）の可能性があると考えられた。また疫学調査の結果、鳥取県家畜保健衛生所と東京農工大学フィールドサイエンスセンターの計 29 サンプルから鳥取 U31 株に類似のウイルスは検出されなかった。

鳥取県家畜保健衛生所で採取したウシ糞便から新規ウシエンテロウイルス鳥取 U31 株が発見されたことより、鳥取 U31 株類似のウイルスが日本において広く伝播しているかどうかを明らかにする目的で、疫学調査を石川県の検体と鹿児島県の検体によりおこなった。石川県の検体としては、糞便検体から MDBK 細胞で分離されたウシエンテロウイルスを使用した。その分離株を次世代シーケンサーにて解析したところ、1 頭のウシ便検体からエンテロウイルスの E 型と F 型の 2 種類が見つかった。系統樹解析では、エンテロウイルス E 型のウイルスは、血清型 E2 と近縁になった。また、検出されたエンテロウイルス F 型は鳥取 U31 株と比較した場合、エンテロウイルス F 型に属する鳥取 U31 株とは別のクレードに入った。

鹿児島県で採取したウシの下痢糞便検体からもエンテロウイルスが検出された。石川県の検体と同様に、糞便から次世代シーケンサーによりウイルスの解析をした。その結果エンテロウイルスが検出されたが、系統樹解析ではエンテロウイルス E 型・F 型いずれにも分類されず、その由来は不明であった。

1-5. 結語

メタゲノム解析に次世代シーケンサーを用いることは、糞便のサンプルからの新規ウイルスの解析に有効である事が示された。ウシエンテロウイルスなど子ウシのウイルス性下痢症が確認された場合、ただちに殺処分がおこなわれる。経済的な損失も大きいいため、本研究の手法を用いてウイルス学と疫学の知見を蓄積することが、ウシエンテロウイルスの病態解明とコントロールに役立つものと考えられる。

2. 研究背景

エンテロウイルスは、ポリオウイルス・コクサッキーウイルス A 群・B 群・エコーウイルスなど様々なエンテロウイルスで構成されるウイルスグループに属するウイルスの 1 つの属である。エンテロウイルス属には、エンテロウイルス I を除くエンテロウイルス A・B・C・D・E・F・G・H・J までの 9 つの型と、ライノウイルス A・B・C の 3 つの型がある。エンテロウイルスのうち、A・B・C・D 型がヒトエンテロウイルス、E・F 型がウシエンテロウイルス、G 型がブタエンテロウイルス、H 型がサルエンテロウイルス、J 型が未分類のサルエンテロウイルスである。

ウシエンテロウイルスは、これまでウシエンテロウイルスの A 型 と B 型に分類されていたが、最近の分類ではエンテロウイルス E 型 (かつてのウシエンテロウイルス A 型) と F 型 (かつてのウシエンテロウイルス B 型) として分類されている¹⁾。エンテロウイルス E 型と F 型のうち、エンテロウイルス E 型には 2 つの血清型、F 型には 4 つの血清型が知られている¹⁾²⁾³⁾⁴⁾。しかしウシエンテロウイルスはこれまで十分な研究が行われておらず、どのくらいの血清型が存在するのかについてもよくわかっていない。

エンテロウイルスの大きさは 27~30nm で、正 20 面体カプシド構造は 4 種類のタンパク質 VP1・VP2・VP3・VP4 から構成され、60 コピーの各カプシドタンパク質から粒子が形成される⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾。VP1・VP2・VP3 はウイルス表面に位置するが、VP4 はウイルス粒子の内部に存在する⁹⁾。ウイルスゲノムは 7.2~8.5kb あり、P1 領域は構造ポリペプチド、P2 領域と P3 領域は複製に関する非構造タンパク質がコードされている。

ウシエンテロウイルスは、1950 年代に初めて分離された¹⁰⁾¹¹⁾。それ以降、世界各

地でウシエンテロウイルスが検出されてきており、さまざまなウシエンテロウイルスに関する知見が得られてきているが、いまだに動物への実験的な感染による臨床症状の再現は難しく、その臨床的な重要性も十分にはわかっていない¹²⁾。

エンテロウイルスは一般に腸管で増殖し、ヒトエンテロウイルスの場合では夏季に多く流行し冬に減少する。ヒトエンテロウイルス感染症は、乳幼児や子供が発症しやすく、手足口病・急性出血性結膜炎・無菌性髄膜炎などの症状を呈する。これに対しウシエンテロウイルスは、ウシの腸管で増殖するが、ウシへの病原性は不明である。通常は軽度の症状や不顕性感染しか起こさないとされているが、重篤な臨床症状が生じることもある¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾。

エンテロウイルスの E 型と F 型は分類学上同じエンテロウイルス属に分類されるが、ウイルス感染による臨床症状も似ており、呼吸器疾患や腸炎・生殖器の疾患・不妊の原因となるという報告もある¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾²²⁾²³⁾²⁴⁾。これまで下痢・乳房炎発症牛・繁殖障害のウシ・流産胎子からウイルスが分離され、病原性への関連も疑われている。しかし、ウシエンテロウイルスは、無症状のウシと臨床症状を呈したウシからも検出され、子ウシに実験的に感染させた場合は通常は臨床症状の進行がない。このため、ウシエンテロウイルスがウシでの病気に明確に関与するかはまだ分かっていない。ウシのウイルス性下痢症は、ウシ群内での伝搬が早く、乳量減少や増体遅延などを表すことで大きな損耗をもらしている。しかし、詳細な原因検索の報告例は日本では少ない。アメリカとカナダの病因に関する報告では、子ウシのウイルス性下痢症について下痢に関与する重要度の高いウイルスとしてロタウイルス・コロナウイルスがあり、重要性の低いものとしてエンテロウイルス・レオウイルス・パルボウイルス等があるとされている²⁵⁾。この 5 種類のウイルスは育成牛など月齢の進んだウシでは重

要度は高いとされて、複合感染が多いと報告がある²⁵⁾。日本においてもレオウイルスやエンテロウイルスおよびパルボウイルスはウシの糞便から分離され下痢との関係が示唆されているが、エンテロウイルスの宿主動物とウイルスとの病原性の関係は不明な点が多い²⁵⁾。

ウシエンテロウイルスは、これまでその疫学像については詳細が分かっておらず、地域による血清型の分布などのデータはほとんどない。本研究では、新規ウシエンテロウイルスが検出されたがそのウイルスがいつ頃からどの地域に存在したのか調べるため、鳥取県・東京都・石川県・鹿児島県のサンプルでの検索を行った。

2007年にトルコで行われたウシエンテロウイルスの研究では、ヒトを含む幅広い哺乳類で抗体の保有が報告されている²⁶⁾。この研究では、ウマ(12.8%)・ヒツジ(29.8%)・ヤギ(27.6%)・ウシ(64.8%)・イヌ(3.2%)・ヒト(30.3%)で抗体が検出され、ヒトはウシに次ぐ2番目に高い抗体保有率になった。これまでウシエンテロウイルスがヒトに病気を起こしたという報告はないが、ヒトに対しての病原性が完全に否定されているわけではない。また、エンテロウイルスは高頻度でリコンビネーションを起こすことも知られており²⁷⁾²⁸⁾、ヒトで広く見られるヒトエンテロウイルスと家畜であるウシに広く見られるウシエンテロウイルスの間でリコンビネーションが起こることでヒトに病原性を持つ新たなウイルスが出現する可能性もある。人獣共通感染症の観点からもウシエンテロウイルスの実態を明らかにすることは重要である。

ウシエンテロウイルスの感染について、疫学調査やウシエンテロウイルスの分子生物学的研究の報告数が不足しており、その実態を理解する上で大きな障害となっている。ウシへの病原性や将来のヒトへの感染リスクを評価するためにも、ウシエンテロウイルスの基礎的なデータの蓄積が欠かせない。

3. 研究目的

次世代シーケンサーによりウシ糞便検体から網羅的にウシエンテロウイルスを検出し、ウイルスの遺伝子解析と疫学調査を目的とする。

4. 研究方法

4-1. 採集検体

2012年12月26日から2014年8月21日まで、鳥取県鳥取家畜保健衛生所でウシの糞便検体9サンプルを採取した。

疫学調査のため、上記9サンプルのほかに2014年12月に東京農工大学のフィールドサイエンスセンターのウシ舎にてウシの糞便20サンプル、1990年に石川県北部家畜保健衛生所にてホルスタイン育成牛からウシ糞便検体を採取し、その検体から分離されたウシエンテロウイルスの培養上清1サンプル、2014年10月17日から12月26日の間に鹿児島農業協同組合で採取された糞便27検体でのウシエンテロウイルスの検索を行った。

上記4か所の糞便は、それぞれ健康なウシと下痢症状のあるウシから採取した。鳥取県の糞便は正常便が4検体、下痢便が5検体であり、鹿児島県の糞便は正常便が5検体、下痢便が22検体になった。

4-2. 細胞培養とウイルス分離

糞便検体は、以下の手順で MDBK (Madin Darby bovine kidney) 細胞を用いてウイルス分離した。採取した糞便検体は交雑物とウイルスを分けるため、室温で 1,000rpm 15 分間遠心した。遠心後の糞便検体は、Millex-HV filter 0.45 μ m (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) で濾過し、MDBK 細胞に接種した。MDBK 細胞は、MEM (GIBCO/BRL, Burlington, Ontario, Canada) に 5% の馬血清 (GIBCO), 100U/ml Penicillin- 100 μ g/mL Streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を加えた細胞培養液を作製し、37°C の 5% CO₂ インキュベーターで維持した。

4-3. ウイルス RNA 抽出

ウイルス RNA は ISOGEN-LS (NIPPON GENE , Tokyo, Japan), and High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche applied science, Mannheim, Germany) を使って糞便検体と分離株から抽出した。

4-4. cDNA 合成

20 μ l cDNA (complementary DNA: 相補的 DNA) 合成反応溶液は、抽出 RNA 溶液 10 μ l、30 μ g/ μ l Random Primer (Invitrogen, Burlington, Canada) 2 μ l、10mM dNTP 1 μ l、5 \times first-strand buffer 4 μ l、0.1M DTT 2 μ l、RNase inhibitor 0.5 μ l、SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Canada Inc Burlington, ON,

Canada) 0.5 μ l より合成した。

cDNA 合成条件は、65°C5 分、25°C10 分、50°C50 分、85°C5 分とした。

4-5. PCR

合成した cDNA は、Premix Ex Taq Hot Start Version (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan)を用いて Polymerase Chain Reaction (PCR)をおこなった。PCR 反応溶液 25 μ l は、Premix Ex Taq Hot Start Version 12.5 μ l、template 1 μ l、50 μ M Forward primer 1 μ l、50 μ M Reverse primer 1 μ l、Nuclease free water 9.5 μ l を含む。

プライマーセットは、エンテロウイルスの VP1 領域をターゲットとして設計した (forward 5' -TAAGGACGCTGTGCACAAGA-3' , reverse 5' -TTGAGGGCACCATCCCATAAT-3')。PCR サイクルプログラムは、94°C 5 分の熱反応の後、94°C30 秒の熱変性および 60°C30 秒のアニーリング、72°C60 秒の伸長反応を 50 サイクル繰り返し、最後に 72°C7 分の反応をおこなった。

4-6. シーケンス

PCR 産物は、MonoFas DNA purification kit (GL Science, Shinjyuku, Japan)を用いて説明書に従い精製した。サイクルシーケンス反応は、Big Dye 3.1 Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を使い、精製した DNA をシーケンスした。シーケンスは、ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA)でおこなった。

4-7. 系統樹作製

系統樹は MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) software version 6.0 にてアライメントをおこない、maximum likelihood method を用いて系統樹を作製し遺伝子学的解析をおこなった。MEGA の解析パラメーターとして、ブートストラップ値は 1,000 回おこなった。系統樹作成の際の参照株として GeneBank に登録されているエンテロウイルス E 型と F 型の代表株の各遺伝子型の P1 (2,499bp) 領域を用いた (表 1)

4-8. 相同性解析

相同性解析は CLC Genomics Workbench 6.0 (CLC bio, Aarhus, Denmark) と NCBI nucleotide blast を用いておこなった。

4-9. 次世代シーケンス

ウイルス RNA は TRIzol LS Reagent (Life technologies, Carlsbad, CA, USA) を使って糞便検体から直接抽出した。次世代シーケンスのための cDNA ライブラリーは、イルミナの NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) を使っておこない、製品のプロトコールに従った。次世代シーケンスは、MiSeq bench-top sequencer (Illumina, San Diego, CA, USA) を使い、DNA 断片の片側であるシングルリード 51 塩基を得た。シーケンスデータの解析は、MiSeq Reporter

v1 (Illumina)から FASTQ フォーマットシーケンスデータを用いておこなった。検体のデータは、解析ソフト CLC Genomics Workbench 6.0 (CLC bio, Aarhus, Denmark)を用いてトリミング、de novo アセンブリ、BLAST、リファレンスとのマッピングの順におこなった。de novo アセンブリでは、各値を初期値に従いミスマッチコストでは 2、インサクションコストを 3、デリーションコストを 3、レングスフラクションを 0.5、シミラリティーフラクションを 0.8 とした。またグラフパラメーターのワードサイズを 20 とした。リードマッピングも同じくミスマッチコストを 2、インサクションコストを 3、デリーションコストを 3、レングスフラクションを 0.5、シミラリティーフラクションを 0.8 とした。シーケンス後のクオリティーの低い配列は、CLC Genomics Workbench 6.0 (CLC bio)の de novo アセンブリを使いトリミングし、その後コンティグを作製した。ペアワイズシーケンスアイデンティティーは CLC Genomics Workbench 6.0 (CLC bio)を使って決定した。

5. 研究結果

5-1. 新規ウシエンテロウイルスの塩基配列決定

次世代シーケンスにより、鳥取県で採取された検体からのエンテロウイルス検出を試みたところ、1 件の糞便検体中からエンテロウイルスを検出することができ、この株を鳥取 U31 株と名付けた。鳥取 U31 株の 3'末端のポリ A 配列を含む全長ゲノムである 7,411 塩基のシーケンスデータを得ることができた。オープンリーディングフレームは 6,501 塩基を含んでおり、2,167 塩基のアミノ配列と、両端の 5'非翻訳領域 836 塩基と 3'非翻訳領域 71 塩基から構成されることが分かった。ウシエンテロウイルス

鳥取 U31 株アミノ酸配列のペアワイズアライメントにより、鳥取 U31 株との共通の相同性を調べた結果、エンテロウイルス E 型(P1: 65.3-65.8%; P2: 76.1-77.3%; P3: 78.7-79.7%)、エンテロウイルス F 型(P1: 79.1-90.6%; P2: 92.5-96.8%; P3: 94.8-98.4%)となった(表 3)。系統樹解析では、鳥取 U31 株の P1 領域の塩基配列を比較した結果、鳥取 U31 株はエンテロウイルス F 型のクラスターに含まれたが、独立した系統の株として分岐した(図 3)。NCBI nucleotide blast を使った既知のウシエンテロウイルスとの比較の結果、最も近縁なウシエンテロウイルス F 型との塩基配列の相同性は 81%、エンテロウイルス E 型とは 72%を示した(表 4)。

5-2. 分子疫学研究

新規ウシエンテロウイルス鳥取 U31 株に類似の F5 型ウイルスを検出するため、VP1 領域をターゲットとした特異的なプライマーセットを設計し、PCR とシーケンスの結果をあわせて判定した。その結果、鳥取県と東京都の 2 つの異なる地域での疫学調査では、F5 型に属するウイルスは検出されなかった。

石川県で採取したウシの糞便検体からの分離株は、同様に次世代シーケンサーにて解析した。その結果、1 頭のウシの糞便検体からエンテロウイルスの E 型と F 型の 2 種類が見つかった。詳細なウイルスの解析をおこなうために再分離を試みたが、E 型のみが分離された。系統樹解析では、エンテロウイルス E 型のウイルスは血清型 E2 と近縁であり、エンテロウイルス F 型のウイルスは血清型 F3 と近縁になった(図 4)。また、鳥取 U31 株と比較した場合、エンテロウイルス F 型に属する鳥取 U31 株とは別のクレードに入った。

鹿児島県で採取した糞便検体 (34 日齢の雄ウシで、肉用牛黒毛和種) では、次世

代シーケンスの結果、エンテロウイルスが検出されたがウシエンテロウイルスであるエンテロウイルス E 型・エンテロウイルス F 型のいずれにも分類されなかった(図 5)。

6. 考察

本研究の結果、鳥取県の農場の健康なウシの便から新規ウシエンテロウイルスと考えられる鳥取 U31 株を検出した。

系統樹解析を用い、地域や年代などの異なる様々な既知のウシエンテロウイルス株と比較して鳥取 U31 株の新規性を調べたが、その結果、鳥取 U31 株は既存の血清型とは異なるクラスターを形成することがわかった。P1 領域の塩基配列とアミノ酸配列によるペアワイズアライメントでも、鳥取 U31 株と既知のウシエンテロウイルスと比べた結果、塩基配列は E 型が平均 60%、F 型が平均 72%、アミノ酸は E 型が平均 65%、F 型が平均 86%といずれの既存のウシエンテロウイルスと比較しても低い値になった。今回系統樹解析の比較に用いた VP1 ゲノム配列はエンテロウイルスの分類に多用されており^{29) 30) 31)}、特に血清型の分類には重要であるとされている³²⁾。ペアワイズアライメントのためにウシエンテロウイルスの VP1 を含む P1 領域をもちいて解析し、それにより鳥取 U31 株はエンテロウイルス F 型に属するものの、既存の血清型とは異なると考えられた。鳥取 U31 株の含まれる血清型を仮に F5 と名付けた。検索した範囲では、鳥取 U31 株の属する F5 に分類されるウイルスの報告は日本ではこれまでなかった。

疫学調査では、新規血清型と考えられる F5 がいつ頃どのような地域に存在したのか調べるため、2 つの年代と北陸から九州まで広く 4 地域を考慮しておこなった。この結果、新規ウシエンテロウイルス鳥取 U31 株に類似のウイルスはどの検体からも

検出されなかったが、各地域の検体数が十分ではないため、この疫学調査の結果のみでこの新規ウイルスの存在の有無についての結論を得ることはできない。新規血清型と考えられる F5 の疫学を明らかにするためには、検体数を増やして検索をすることが必要である。

石川県の検体による系統樹解析では、同一検体から E 型と F 型の 2 つが検出されたが、ウシエンテロウイルスが家畜の間で広く感染しているため、他のウシの糞便検体が採材の際に混入した可能性も考えられる。今回のような E 型と F 型の混合感染は稀な例であり、今回の混合感染の検体を疫学的側面からも精査する必要がある。鹿児島県の下痢糞便検体からもエンテロウイルスが検出されたが、既知のウシエンテロウイルスであるエンテロウイルス E 型・エンテロウイルス F 型のいずれにも分類されなかった。このウイルスの由来についてはヒトや他の動物から感染した可能性を含めてさらなる解析が必要である。

疫学調査では、石川県の検体をホルスタイン育成牛、鹿児島県の検体を黒毛和種(肉用牛)から採取した。過去の報告で、黒毛和牛とホルスタインに口蹄疫ウイルスを接種した感染実験が行った報告がある³³⁾。症状・ウイルス血症・ウイルス排泄・抗体応答・ウイルス伝播を比較した結果、黒毛和牛はすべての項目で陽性となり同種へは伝播も成立した。一方、ホルスタインでは、ウイルス血症と抗体応答で陽性になった以外は、すべて陰性であり伝播も不成立だった。このことから、ホルスタインは他のウシに比べて感受性が低く、病原性が低いと考えられる。このように同じウシでも種による違いがみられ、種の違いもウイルスの病原性を規定する要素である可能性がある。

特に日本において知見の少ないウシエンテロウイルスに関して行った研究であり、本研究の結果は、今後ウシエンテロウイルスの実態を明らかにしていくために有用な情

報であると考えられる。このような研究データの蓄積が対策につながり、将来的に子ウシの死亡を減少させたり、ワクチンなどの形で畜産農家へ還元できる可能性がある。しかし、新規ウシエンテロウイルス鳥取 U31 株は健康なウシから分離され、現時点でウイルスの起源や病原性など不明な点が多い。ウシのウイルス性下痢症の場合では、疫学調査などが実施されるものの、原因ウイルスの農場への侵入経路が判明しない場合も多く見られる。健康なウシからは、下痢症原因ウイルスが検出されているが、感染源になっている可能性が指摘されている。ウシエンテロウイルスとウシでの病原性の関連は不明だが、本研究により新規ウシエンテロウイルスが健康なウシから検出され、ウイルスの感染源となり維持され続けている可能性が考えられる。この新規ウシエンテロウイルスがウシや他の家畜に悪影響を及ぼしている可能性も排除できず、さらなる研究が必要である。

次世代シーケンサーは、これまでのサンガー法によるシーケンサーと比べてゲノム DNA 塩基配列解読の高速化と大量解読化によりサンプル中の微生物のゲノム情報を網羅的に解析することができるが問題点もある。得られる大量の情報には様々な生物由来のものが含まれ、そこから必要とする情報を見極めて抽出するのは難しい。また、次世代シーケンサーから得られた短い塩基配列データ同士をマッピングすることにより、配列データが少しずつ重なり長い配列の解読が可能になる。それぞれのリードは、リファレンス配列に対してサンガー法によるシーケンサーより多いミスマッチの上限を決めて許容し、その中から最もミスマッチが少なくなる位置にマップされる。リファレンスとのミスマッチが集中して発生する領域が存在するとの報告もあり、そのためには短いデータから信頼性の高い正しいデータのみを選び出し処理することが必要である。次世代シーケンサーは未だに発展途上であり解析ソフトも日々バージョン

ョンアップされ、データ解析に適したものを複数の解析ソフトの中から選ぶ必要がある。また、次世代シーケンサーにより特定された未知の一塩基変異については、他の実験手法を用いて確認することが必要である。このため、配列解析の結果として新しい変異を見いだしたとしても、他の実験手法による検証が必要とされ手間と時間がかかることになる。

本研究により新規ウシエンテロウイルスが検出されたが、特に鳥取 U31 株は新しい血清型であり、鹿児島県で検出された株はウシエンテロウイルスの E 型や F 型に該当しないエンテロウイルスであることを示唆する結果となった。ヒトがウシエンテロウイルスの抗体を保有していることは報告されており、これらの新規ウシエンテロウイルスがヒトに感染する可能性を含めてさらなる解析をする必要がある。

今後は、新規ウシエンテロウイルス鳥取 U31 株の疫学調査、病原性の研究、他の家畜やヒトへの伝播の可能性についてさらなる知見の蓄積が必要である。またエンテロウイルスはリコンビネーションを起こすことから、家畜の個体ごとの型の調査と、ウイルスの遺伝子学的研究が必要である。

7. 結論

ウシは牛乳・乳製品および牛肉など畜産物を提供する家畜として極めて重要である。しかし、乳・肉用牛飼育の現状は、経営の合理化による疾病の多発や飼育管理の能力低下などの問題が起こっている。ウシの感染症は飼育上の最大の問題点である。その多発の原因として、飼育効率を追求する多頭飼育経営の性急な普及に伴って素牛や種牛などが不足し、それらを多数輸入したため同時に多様な病原体の侵入することにつながったと考えられる。その結果、感染症が繁殖障害や呼吸器病・下痢など深刻な飼

育効率の低下をもたらしている。

子ウシや妊娠中のウシでは、ウシエンテロウイルスにより死亡や流産する可能性があるが、成牛では臨床症状があった場合でも食欲不振や下痢などの症状にとどまると考えられている。ウシエンテロウイルスの危険性については科学的に議論されてきたが、ウシエンテロウイルスと臨床症状の間の因果関係はいまだに不明である。エンテロウイルスは農場で飼育されているウシの間で広く浸淫している。その理由として、汚染された牛舎や管理者を介した間接伝播の可能性もあるものの、ウイルスを排泄している動物からの直接伝播が重要であると考えられる。複数の動物による共生環境は、ウシエンテロウイルスと他の宿主のエンテロウイルスとのリコンビネーションのように、エンテロウイルスに遺伝子レベルで変化をもたらす危険性がある³⁴⁾。

本研究により、新規ウシエンテロウイルス鳥取 U31 株が検出され、また疫学調査によりウシエンテロウイルスの 2 つの型の混合感染と、系統樹解析でエンテロウイルス E 型・F 型のいずれにも分類されないエンテロウイルスが検出された。

ウシエンテロウイルスの病原性は不明な点が多いが、エンテロウイルスはすべての脊椎動物に感染しリコンビネーションを起こすことから、新規ウシエンテロウイルスの探索とウイルスの性状解析をおこなうことは、人獣共通感染症の観点からも重要である。

8. 参考文献

1. Zell, R., et al., Molecular-based reclassification of the bovine enteroviruses. *J Gen Virol*, 2006. 87(Pt 2): p. 375-85.
2. Huck, R.A. and S.F. Cartwright, Isolation and classification of viruses from cattle during outbreaks of mucosal or respiratory disease and from herds with reproductive disorders. *J Comp Pathol*, 1964. 74: p. 346-65.
3. Barya, M.A., T. Moll, and D.E. Mattson, Antigenic analysis of bovine enteroviruses through studies of the kinetics of neutralization. *Am J Vet Res*, 1967. 28(126): p. 1283-94.
4. Knowles, N.J. and I.T. Barnett, A serological classification of bovine enteroviruses. *Arch Virol*, 1985. 83(3-4): p. 141-55.
5. Smyth, M., et al., Implications for viral uncoating from the structure of bovine enterovirus. *Nat Struct Biol*, 1995. 2(3): p. 224-31.
6. Hoey, E.M. and S.J. Martin, A possible precursor containing RNA of a bovine enterovirus: the provirion 11. *J Gen Virol*, 1974. 24(3): p. 515-24.
7. Todd, D. and S.J. Martin, Studies of the replication of a bovine enterovirus RNA. *J Gen Virol*, 1979. 43(1): p. 75-89.
8. Earle, J.A., et al., The complete nucleotide sequence of a bovine enterovirus. *J Gen Virol*, 1988. 69 (Pt 2): p. 253-63.
9. Chow, M., et al., Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature*, 1987. 327(6122): p. 482-6.
10. Kunin, C.M. and E. Minuse, The isolation in tissue culture, chick embryo

- and suckling mice of filtrable agents from healthy dairy cattle. *J Immunol*, 1958. 80(1): p. 1-11.
11. Moll, T. and A.V. Finlayson, Isolation of cytopathogenic viral agent from feces of cattle. *Science*, 1957. 126(3270): p. 401-2.
 12. Zhang, H., et al., Characterization of an Enterovirus species E isolated from naturally infected bovine in China. *Virus Res*, 2014. 191: p. 101-7.
 13. Blas-Machado, U., et al., Fatal ulcerative and hemorrhagic typhlocolitis in a pregnant heifer associated with natural bovine enterovirus type-1 infection. *Vet Pathol*, 2007. 44(1): p. 110-5.
 14. McClurkin, A.W., Probable role of viruses in calfhood diseases. *J Dairy Sci*, 1977. 60(2): p. 278-82.
 15. Moll, T. and A.D. Davis, Isolation and characterization of cytopathogenic enteroviruses from cattle with respiratory disease. *Am J Vet Res*, 1959. 20: p. 27-32.
 16. Straub, O.C. and H.O. Böhm, Enterovirus as cause of bovine vaginitis. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, 1964. 14(2): p. 272-275.
 17. Straub, O.C. and G. Kielwein, [Bovine enteroviruses as causative agents of mastitis]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 1965. 78(20): p. 386-9.
 18. Rovozzo, G.C., R.E. Luginbuhl, and C.F. Helmboldt, Bovine enteric cytopathogenic viruses. i. characteristics of three prototype strains. *Cornell Vet*, 1965. 55: p. 121-30.
 19. Van der Maaten, M.J. and R.A. Packer, Isolation and characterization of bovine enteric viruses. *Am J Vet Res*, 1967. 28(124): p. 677-84.
 20. Buczek, J., Further characterization of bovine enteroviruses isolated in

- Poland. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, 1970. 30(4): p. 408-410.
21. Ide, P.R., Developments in veterinary science. The etiology of enzootic pneumonia of calves. *The Canadian Veterinary Journal*, 1970. 11(10): p. 194-202.
 22. Dunne, H.W., et al., Parainfluenza-3 and bovine enteroviruses as possible important causative factors in bovine abortion. *Am J Vet Res*, 1973. 34(9): p. 1121-6.
 23. Weldon, S.L., et al., Isolation of picornavirus from feces and semen from an infertile bull. *J Am Vet Med Assoc*, 1979. 174(2): p. 168-9.
 24. Li, Y., et al., Isolation of two Chinese bovine enteroviruses and sequence analysis of their complete genomes. *Arch Virol*, 2012. 157(12): p. 2369-75.
 25. 吉川 若枝, 田上 宏明ほか: 肉牛肥育農場で発生した牛コロナウイルス・エンテロウイルス混合感染症の一症例. 平成 19 年度三重県家畜保健衛生業績発表会 2007
 26. Gur, S., O. Yapkic, and A. Yilmaz, Serological survey of bovine enterovirus type 1 in different mammalian species in Turkey. *Zoonoses Public Health*, 2008. 55(2): p. 106-11.
 27. Huang, S.C., et al., Appearance of intratypic recombination of enterovirus 71 in Taiwan from 2002 to 2005. *Virus Res*, 2008. 131(2): p. 250-9.
 28. Yoke-Fun, C. and S. AbuBakar, Phylogenetic evidence for inter-typic recombination in the emergence of human enterovirus 71 subgenotypes. *BMC Microbiology*, 2006. 6: p. 74-74.
 29. Caro, V., et al., Molecular strategy for 'serotyping' of human enteroviruses. *J Gen Virol*, 2001. 82(Pt 1): p. 79-91.

30. Casas, I., et al., Molecular characterization of human enteroviruses in clinical samples: comparison between VP2, VP1, and RNA polymerase regions using RT nested PCR assays and direct sequencing of products. *J Med Virol*, 2001. 65(1): p. 138-48.
31. Oberste, M.S., et al., Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol*, 1999. 37(5): p. 1288-93.
32. Minor, P.D., Antigenic Structure of Picornaviruses, in *Picornaviruses*, V. Racaniello, Editor. 1990, Springer Berlin Heidelberg. p. 121-154.
33. 山川 睦, 坂本研一ほか: 日本で分離された口蹄疫ウイルス O/JPN/2000 株の動物に対する病原性. *動物衛生研究所成果情報* 2002
34. Boros, A., et al., Natural interspecies recombinant bovine/porcine enterovirus in sheep. *J Gen Virol*, 2012. 93(Pt 9): p. 1941-51.

9. 図

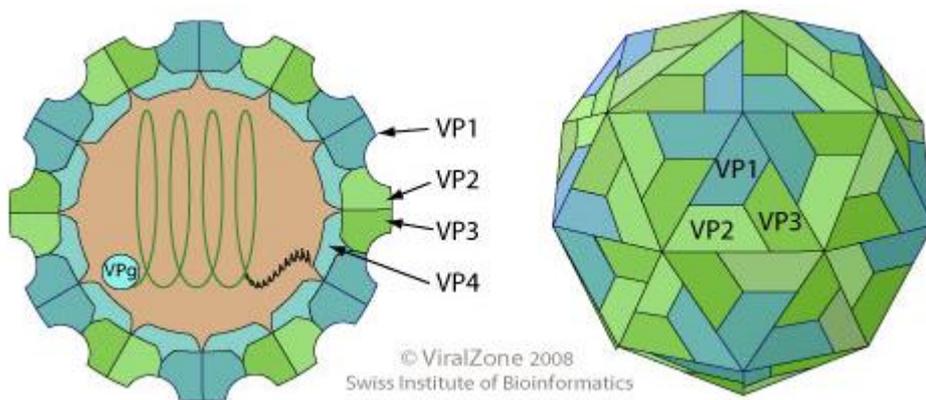


図 1 エンテロウイルスのウイルス粒子構造

ViralZone (http://viralzone.expasy.org/all_by_species/97.html)より引用

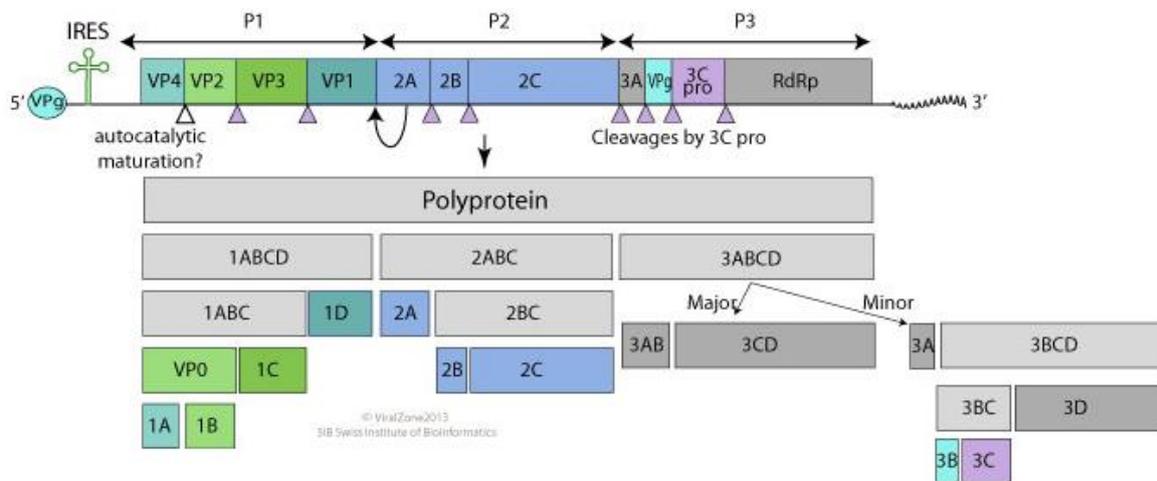


図2 エンテロウイルスのウイルスゲノム構造

ViralZone (http://viralzone.expasy.org/all_by_species/97.html)より引用

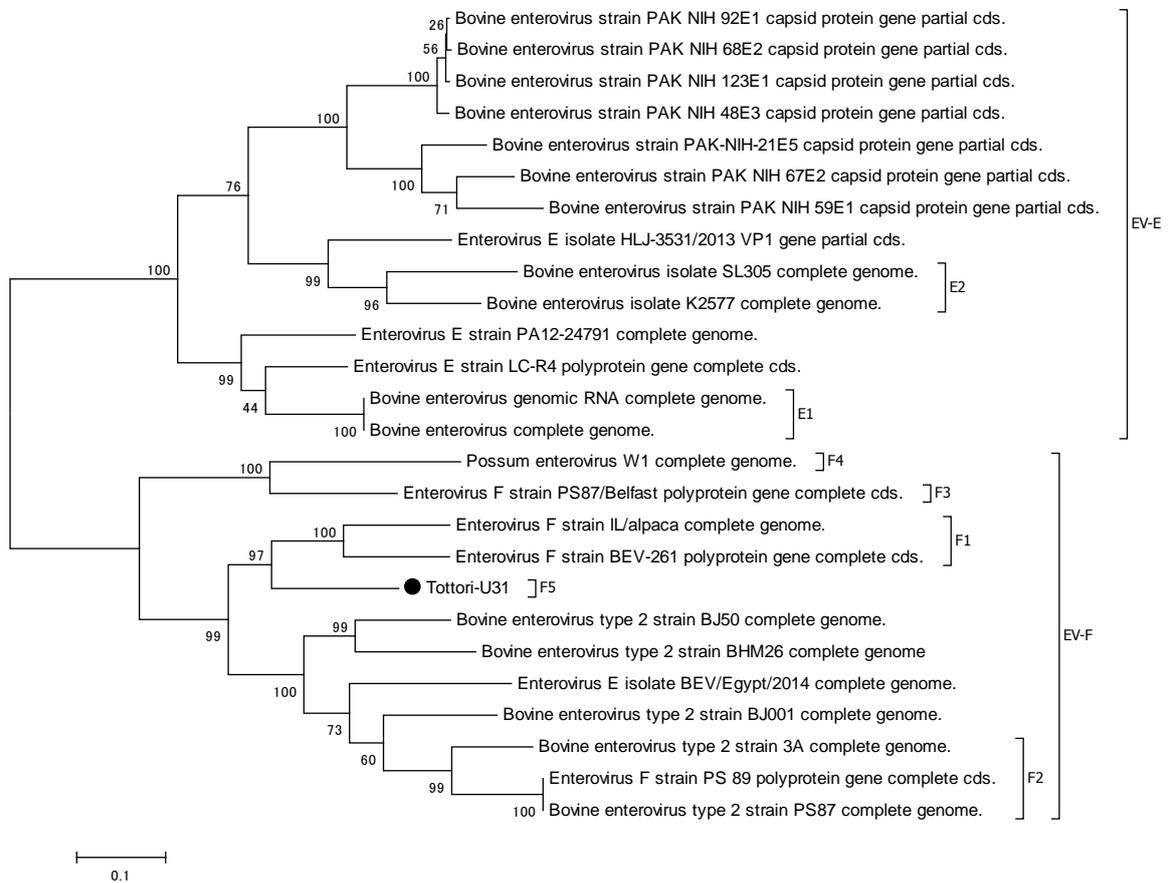


図3 鳥取県の検体の系統樹解析結果。系統樹はMEGA software version 6.0にてアライメントをおこない、maximum likelihood methodを用いて系統樹を作製し遺伝子学的解析をおこなった。系統樹作成の際の参照株としてGeneBankに登録されているエンテロウイルスE型とF型の各遺伝子型のP1(2,499bp)領域を代表株として用いた。

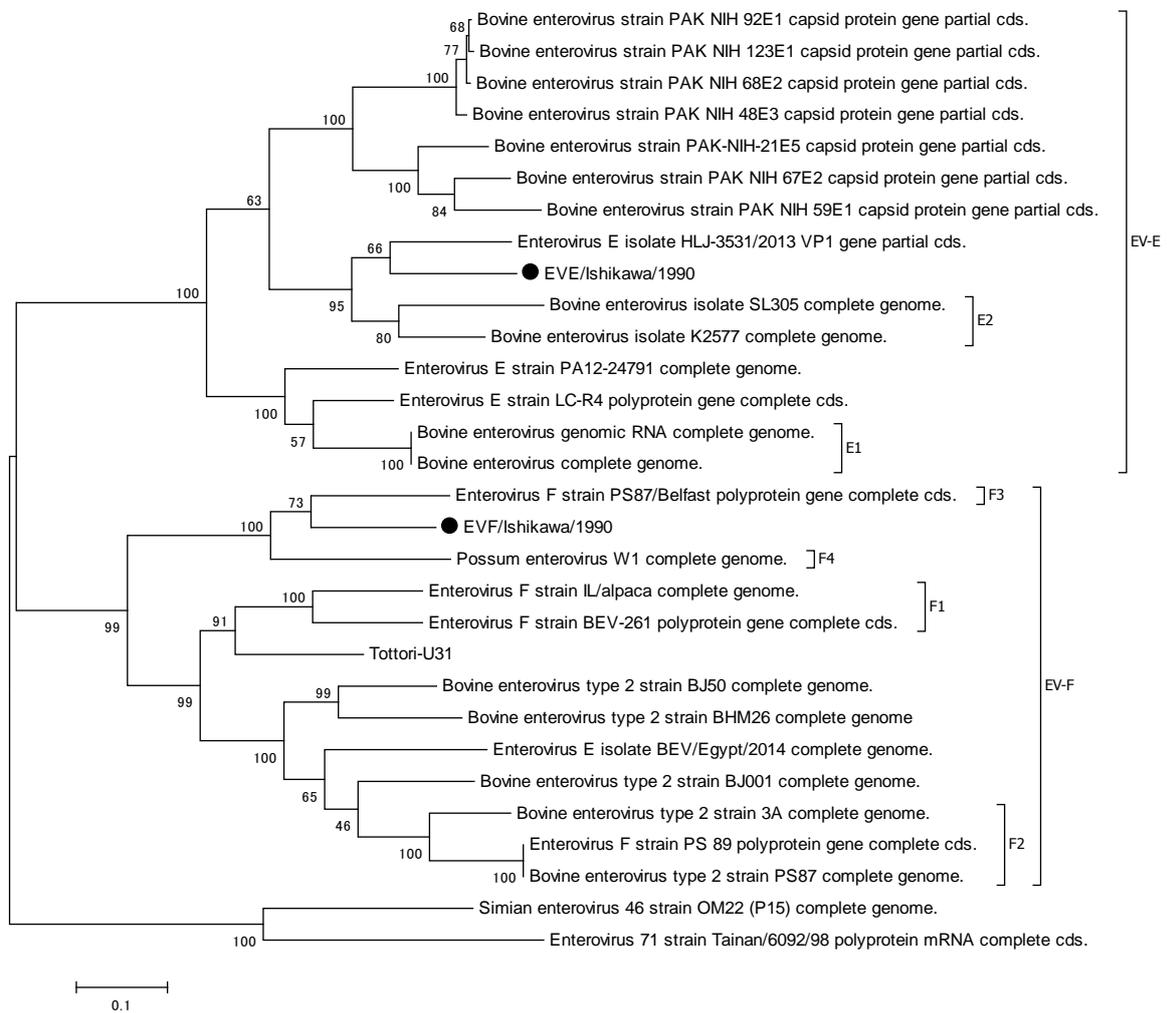


図4 石川県の検体の系統樹解析結果。系統樹はMEGA software version 6.0にてアライメントをおこない、maximum likelihood methodを用いて系統樹を作製し遺伝子学的解析をおこなった。系統樹作成の際の参照株としてGeneBankに登録されているエンテロウイルスE型とF型の各遺伝子型のP1 (2,499bp)領域を代表株として用いた。

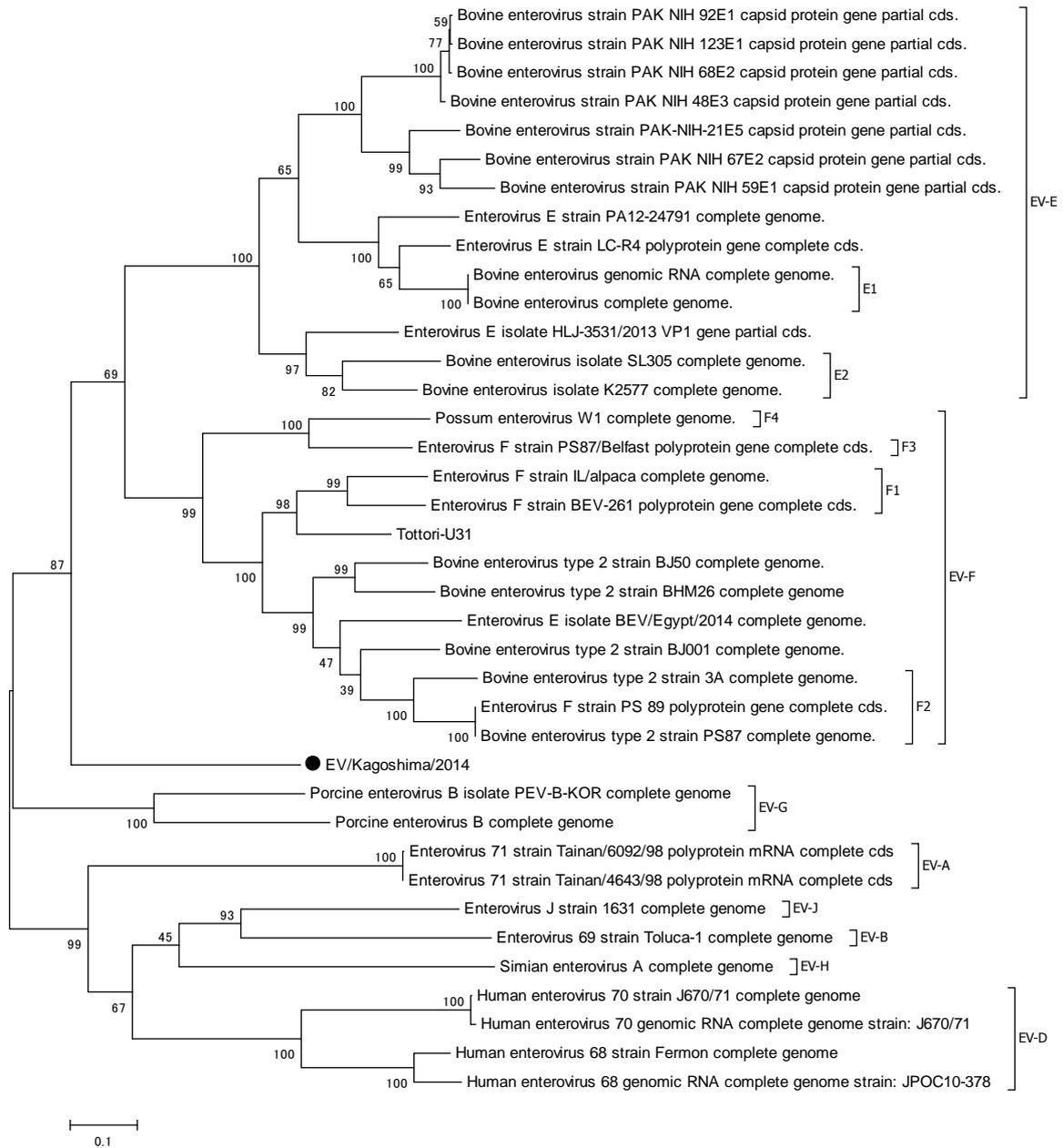


図5 鹿児島県の検体の系統樹解析結果。系統樹はMEGA software version 6.0にてアライメントをおこない、maximum likelihood methodを用いて系統樹を作製し遺伝子学的解析をおこなった。系統樹作成の際の参照株としてGeneBankに登録されているエンテロウイルスE型とF型の各遺伝子型のP1(2,499bp)領域を代表株として用いた。

10. 表

表 1 系統樹解析に用いた参考株の一覧

Species	Serotype	Accession no.		Date	Host	Country
E	1	NC001859	Bovine enterovirus, complete genome	1987		
E	1	D00214	Bovine enterovirus genomic RNA, complete genome	1988		
E	2	AF123433	Bovine enterovirus isolate SL305, complete genome	1999		Australia
E	2	AF123432	Bovine enterovirus isolate K2577, complete genome	1999		Australia
E		JQ690746	Bovine enterovirus strain PAK_NIH_92E1 capsid protein gene partial cds.	2010	sewage sample	Pakistan
E		JQ690745	Bovine enterovirus strain PAK_NIH_68E2 capsid protein gene partial cds.	2010	sewage sample	Pakistan
E		JQ690744	Bovine enterovirus strain PAK_NIH_67E2 capsid protein gene partial cds.	2010	sewage sample	Pakistan
E		JQ690743	Bovine enterovirus strain PAK_NIH_59E1 capsid protein gene partial cds.	2010	sewage sample	Pakistan
E		JQ690742	Bovine enterovirus strain PAK_NIH_48E3 capsid protein gene partial cds.	2011	sewage sample	Pakistan
E		JQ690747	Bovine enterovirus strain PAK_NIH_123E1 capsid protein gene partial cds.	2010	sewage sample	Pakistan
E		JQ690741	Bovine enterovirus strain PAK-NIH-21E5 capsid protein gene partial cds.	2009	sewage sample	Pakistan
E	1	KC667561	Enterovirus E strain PA12-24791 complete genome.	2013	bovine lung	USA
E	1	DQ092769	Enterovirus E strain LC-R4 polyprotein gene complete cds.	2006		USA
E		KJ956699	Enterovirus E isolate HLJ-3531/2013 VP1 gene partial cds.	2014	bovine	China
F	1	DQ092770	Enterovirus F strain BEV-261 polyprotein gene, complete cds	2006		
F	1	KC748420	Enterovirus F strain IL/alpaca complete genome.	2007	alpaca	USA
F	2	AY508696	Bovine enterovirus type 2 strain PS87, complete genome	2004	bovine	United Kingdom
F	2	AY508696	Enterovirus F strain PS 89 polyprotein gene, complete cds	2006	bovine	United Kingdom
F	2	AY508697	Bovine enterovirus type 2 strain 3A, complete genome	2004	bovine	USA
F	3	DQ092794	Enterovirus F strain PS87/Belfast polyprotein gene, complete cds	2006		USA
F	4	AY462106	Possum enterovirus W1, complete genome	2007		
F	2	KM667941	Enterovirus E isolate BEV/Egypt/2014 complete genome.	2014	bovine	Egypt
F		HQ917061	Bovine enterovirus type 2 strain BJ50 complete genome.	2008	bovine	China
F		HQ663846	Bovine enterovirus type 2 strain BJ001 complete genome.	2009	bovine	China
F		HQ917060	Bovine enterovirus type 2 strain BHM26 complete genome	2008	bovine	China

表 2 新規ウシエンテロウイルス鳥取 U31 株の塩基配列による相同性解析結果

Table 2. Pairwise nucleotide sequence identity (%) comparisons of Tottori-U31 to other bovine enteroviruses

Species	Serotype	Strain name	Accession no.	Pairwise nucleotide identity (%)		
				P1	P2	P3
E	1	VG527	D00241	61.1	66.4	68.5
E	2	K2577	AF123432	61.0	67.1	69.1
E	2	SL305	AF123433	60.5	66.7	68.7
F	1	IL/alpaca	KC748420	74.9	79.9	83.4
F	1	BEV-261	DQ092770	74.7	78.9	84.7
F		BJ50	HQ917061	72.2	77.2	83.9
F		BJ001	HQ663846	71.9	78.4	81.6
F		BHM26	HQ917060	71.5	77.6	80.3
F	2	PS89	DQ092795	71.5	76.6	84.6
F	2	3A	AY508697	71.4	77.6	83.5
F	3	PS87/Belfast	DQ092794	70.1	79.6	84.2

表 3 新規ウシエンテロウイルス鳥取 U31 株のアミノ酸配列による相同性解析結果

Species	Serotype	Strain name	Accession no.	Pairwise amino acid identity (%)		
				P1	P2	P3
E	1	VG527	D00214	65.6	76.1	78.7
E	2	K2577	AF123432	65.8	77.3	79.7
E	2	SL305	AF123433	65.3	77.2	79.2
F	1	IL/alpaca	KC748420	90.6	96.8	97.8
F	1	BEV-261	DQ092770	90.4	93.6	98.2
F		BJ50	HQ917061			
F		BJ001	HQ663846	85.4	92.7	94.8
F		BHM26	HQ917060	86.3	92.9	94.8
F	2	PS89	DQ092795	85.4	93.0	98.1
F	2	3A	AY508697	85.7	92.5	98.2
F	3	PS87/Belfast	DQ092794	79.1	96.0	98.4

表 4 新規ウシエンテロウイルス鳥取 U31 株とエンテロウイルス E 型と F 型の同
 性比較

Species	Serotype	genome sequence homology(%)	Accession no.	Strain name
E	2	72.0	AF123433	Bovine enterovirus isolate SL305, complete genome
F	1	81.0	DQ092770	Enterovirus F strain BEV-261 polyprotein gene, complete cds

11. 謝辞

本研究の遂行に当たり、多大なるご指導及びご助言を賜った東北大学大学院医学系研究科微生物学分野の押谷仁教授をはじめ諸先生方、東京農工大学農学部附属国際家畜感染症防疫研究教育センターの水谷哲也教授・長井誠准教授・大松勉講師・大学院生の土赤忍氏に謹んで感謝致します。