

博士論文

ハイスループットシーケンシングを利用した  
新規ウイルスの検出

大場 真己



## 目次

略語一覧	1
緒言	3
第一章 ハイスループットシーケンシング用新規ウイルス検出法の開発	7
序論	8
材料および方法	10
結果	16
考察	20
図表	23
第二章 コウモリからの新規・希少ウイルスの検出	44
序論	45
材料および方法	48
結果	53
考察	55
図表	59
第三章 ブタからの新規・希少ウイルスの検出	65
序論	66
材料および方法	68
結果	71
考察	77

図表	81
総括	95
謝辞	98
参考文献	99

## 略語一覧

Cap; キャプシドタンパク質

ds; double-stranded

DSN; Duplex specific nuclease

EMCV; encephalomyocarditis virus

FSfaCV-J1; fur seal feces-associated circular DNA virus JPN1

IASV; immunodeficiency-associated stool virus

IRES; internal ribosome entry site

MDBK; Madin-Darby bovine kidney cells

ML; maximum-likelihood, 最尤

NGS; next generation sequencer

PfaIV; porcine feces-associated IASV-like virus

PLCP; パパイン様プロテアーゼ

PMWS; postweaning multisystemic wasting syndrome

PPV; porcine parvovirus

PTV; porcine teschovirus

PTV\_Im1-1; PTV\_JPN / Ishi-Im1-1 / 2015

PTV\_Ka2; PTV\_JPN / Ishi-Ka2 / 2006

PTV\_Ka1; PTV\_JPN / Ishi-Ka1 / 2006

RACE; rapid amplification of cDNA ends, cDNA 末端法

Rep; レプリケーションタンパク質

SARS; severe acute respiratory syndrome

SFTSV; severe fever with thrombocytopenia syndrome virus

ss; single-stranded

STV; soft tick bunyavirus

## 緒言

近年、NGS が感染症の研究分野で広く利用されるようになり、数多くの新しいウイルスが発見されてきた (Blinkova et al., 2010, Geoch et al., 2000, Ng et al., 2009)。NGS はハイスループットシーケンシングによりサンプル中の核酸配列を網羅的に決定できるので、従来のサンガー法でダイレクトシーケンシングする際に必要不可欠なプライマー配列としてのターゲットの遺伝子配列さえ不要であるという特徴を持つ。ハイスループットシーケンシングは、この点を考えると従来のサンガー法に比べて格段に効率良く核酸配列を決定できる手法であるといえる。その一方で、臨床サンプルの血液や糞便から抽出した核酸をそのまま NGS 用ライブラリーの調整に使用した場合には、ウイルスのリードが極端に少なくなってしまうという欠点がある。ハイスループットシーケンシングによって得られるターゲットウイルスのリード数は、サンプル中の全核酸のうちに占める各ターゲットウイルス核酸の相対的な量に依存することが報告されている (Zhang et al., 2014)。すなわち、サンプル中のターゲットウイルスの相対核酸濃度が高ければターゲットウイルス由来のリードも多くなるが、血液や糞便など、サンプルにターゲットウイルス以外のウイルスや宿主細胞や細菌が多く含まれている場合にはそれらに由来するリードがターゲットウイルス由来リード数を減少させてしまうというのがその理由である (Zhang et al., 2017)。

ハイスループットシーケンシングに供されるサンプルの背景は様々である。たとえば、集団下痢症が発生している豚舎で飼養されている幼齢豚由来の糞便サンプルの場合には原因ウイルスが大量に含まれているので、NGS 解析により原因ウイルスのリードが比較的容易に得られ、ウイルスゲノムの塩基配列をほぼ全長にわたり決定できる場合があ

る。逆に、ウイルスの量が非常に少ないことが予測される、臨床症状を何も呈していない動物の血液や糞便のサンプルを NGS 解析すると、宿主細胞や細菌由来のゲノムのリードばかりが得られてしまう。検体から抽出した核酸を一律にハイスループットシーケンシングしても必ずしもウイルスのリードが得られるとは限らないので、NGS を用いることで検体中の全ての核酸の塩基配列が明らかになるというイメージは誤りである。

このようにウイルスを NGS で解析する際には、① サンプル中の相対的濃度が低いウイルスゲノムは検出されにくい、② 1 回のランでは DNA もしくは RNA のどちらか一方しかシーケンシングができない（現在世界的に最も使用されているイルミナ社の MiSeq の場合）、③ ss 構造のウイルスゲノムのシーケンシングは難しい、という問題点がある。本研究では、これらの問題点を克服するために 2 種類のサンプル前処理方法を開発した。

2018 年 9 月、25 年ぶりに国内で豚コレラが発生した。豚コレラは classical swine fever virus により起こるブタおよびイノシシの熱性伝染病で、強い伝染力と高い致死率が特徴である (Blome et al., 2017)。発生から 1 年が経った現在でも、発生自治体による封じ込めは成功しておらず、沈静化の兆しが見えるどころか更なる感染拡大が報告されている。養豚場の外では豚コレラウイルスに感染して死亡したイノシシが発見されており、また捕獲された生存イノシシからも PCR で豚コレラ陽性となった例が多数報告されている。これらのことを考えると、感染拡大の原因の一つがイノシシであることが容易に想像でき、引き続き予断を許さない状況であることがわかる。一方、鳥インフルエンザは渡り鳥と屋外の放し飼い家禽の間で池の水を介して avian influenza virus の感染が成立する (Sakoda et al., 2012)。このように家畜や家禽であっても、防ぎきれない野生動物との関わりにより感染症の脅威に絶えずさらされている。

近年、野生動物の中でもウイルスの媒介動物としてコウモリが注目されている。コウモリはさまざまなウイルスのレゼルポアとして知られている。翼手目に属し、世界中で齧歯類に次いで数の多い哺乳類である。鳥類のように飛翔するが、哺乳類なので鳥類よりもヒトや家畜に感染する病原体を保有している可能性がある。また、蚊やダニなど病原体を媒介する節足動物に比較するとはるかに長い距離を飛ぶことができるので病原体を越境させる可能性がある。コウモリが関係する代表的なウイルスとしては重症急性呼吸器症候群（SARS）の原因である SARS coronavirus や ebolavirus、nipahvirus が挙げられる。SARS coronavirus はキクガシラコウモリに感染していた bat coronavirus が変異してヒトやハクビシンにも感染できるようになったと考えられている（Li et al., 2005）。ebolavirus はコウモリからのウイルス分離に成功していないが、抗体陽性のコウモリが存在することからレゼルポアになっている可能性が高い（De et al., 2018）。nipahvirus はコウモリからブタに感染し、さらにヒトへ感染していくことが知られている（Nahar et al., 2017）。このように、コウモリはウイルスの伝播に重要な役割を果たしている。

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では、国内のブタやウシなどの主要家畜から NGS や網羅的リアルタイム PCR 法を用いて新規・希少ウイルスを報告してきた（Nagai et.al., 2015, Naoi et al., 2016, Ito et al., 2017）。これは日本のように高度に管理されている畜産の現場においても家畜は新しいウイルスに感染 / 保有していることを示している。例えば私が関与したプロジェクトでは、ブタの正常糞便の中から porcine enterovirus のゲノムに porcine torovirus の PLCP の遺伝子が挿入されているウイルスを発見した。enterovirus はゲノムのほぼ全長からポリプロテインが翻訳され、ウイルスと宿主細胞のプロテアーゼによってプロセッシングを受け機能的な

蛋白質が生成される。porcine enterovirus に挿入された PLCP はウイルスのプロテアーゼが認識するアミノ酸配列を有していたことから、巧妙な遺伝子組換えが起こったと想像される (Tsuchiaka et al., 2018)。私はその他にもブタの新しい picornavirus を発見する研究にも携わった (Naoi et al., 2016)。ブタを感染源とする人獣共通感染症のウイルスには nipahvirus、Japanese encephalitis virus、influenza virus などがあり、養豚場のブタも野生動物と同様にウイルスの保有動物として重要である。このように、ブタには様々な種類のウイルスが感染していることが明らかになってきているが、さらに解析を進めることで未知のウイルスを発見できる確率は高い。

以上のことから本研究では、動物の検体から NGS を用いてウイルスを検出する際の問題点を新しい方法を開発することにより解決すること、従来の方法とこれらの新規方法を用いてコウモリとブタから新規・希少ウイルスを検出することを目的とした。

第一章では、新規 ss DNA ウイルスを検出するために、dsDNA を特異的に切断する DSN を利用した DSN-NGS 法を開発した。また、様々な生物由来ゲノムが含まれているサンプルからウイルス遺伝子のみを multiplex PCR により選択的に増幅する方法、multiplex PCR-NGS 法を開発した。

第二章では、コウモリが住み着いた国内宿泊施設屋根裏の、コウモリが出入りする開口部付近で採取されたコウモリマルヒメダニの内臓と体液から NGS の従来法を用いて新しいブニヤウイルス科<sup>註)</sup>のウイルス (STV) を発見した。また、multiplex PCR-NGS 法を用いて台湾にて採取したユビナガコウモリの糞便核酸から EMCV を検出した。

第三章では、国内の養豚場の子ブタから糞便を採集し、DSN-NGS 法により、日本で初めての報告となる希少ウイルス、FSfaCV-J1 及び PfaIV を発見した。また、NGS の従来法を用いて porcine teschovirus の新しい種を発見した。

注) 本博士論文中のウイルス分類の記載は、各研究をまとめた当時の分類となっているため、最新の ICTV による分類とは一部異なる。

## 第一章 ハイスループットシーケンシング用の新規ウイルス検出法の開発

## 序 論

NGS 解析においてウイルスゲノムを効率良く検出する方法を開発するために、ウイルスをゲノム構造から ssDNA ウイルス、dsDNA ウイルス、ssRNA ウイルス、dsRNA ウイルスの 4 種類に分けた (図 1-1)。私が所属する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では dsRNA ウイルスを効率良く検出する方法については S1 nuclease を使用した方法が (Shimada et al., 2015)、ssRNA ウイルスについては RiboMinus (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を使用した方法が (論文未発表) それぞれすでに開発されている。dsDNA ウイルスのゲノムを効率よく検出する方法は、SureSelect (Agilent Technologies, CA, USA) を設計し使用している (Oba, Tsuchiaka et al., 2017)。

ハイスループットシーケンシングによって得られるターゲットウイルスのリード数は、サンプル中の全核酸のうちに占める各ターゲットウイルス核酸の相対的な量に依存することが報告されている (Zhang et al., 2014)。すなわち、サンプル中のターゲットウイルス核酸の相対濃度が高ければターゲットウイルス由来のリードも多くなるが、サンプルにターゲットウイルス以外のウイルスや宿主細胞や細菌が多く含まれている場合にはそれらに由来するリードがターゲットウイルス由来リード数を減少させてしまう。そこで本研究では ssDNA を特異的に検出できる方法の開発を目的として、ハイスループットシーケンシングの際に ssDNA の濃度を相対的に上げるために宿主ゲノム由来の dsDNA ゲノム量を少なくすることを目指した。

DSN (Evrogen JSC, Moscow, Russia) はカムチャッカカニの睪臓から抽出された酵素で、dsDNA を特異的に切断するが ssDNA と ssRNA と dsRNA は切断しない (Shagin

et al., 2002)。このように DSN はサンプル内の dsDNA を分解することにより、ssDNA ウイルスゲノムの相対的な分子数を上昇させる。分解された dsDNA は DNA 精製キットを用いることにより除去される。さらに ssDNA をランダムに増幅する Phi29 酵素を用いて、dsDNA に変換しながら増幅する。この dsDNA を NGS で解析する。本法を DSN-NGS 法と呼び、既知の ssDNA ウイルスを用いて本法の有用性を検証した。

また、上記の 4 つのウイルス型の全てを網羅的に検出できる方法を確立するために、multiplex PCR を利用した NGS の前処理方法を開発した。multiplex PCR とは、1 つの PCR 反応液に複数のプライマーセットを入れ、複数の遺伝子を増幅する PCR 法である。近年、自然界においてウイルスが本来の宿主以外の動物で見つかることが多いため、ブタやコウモリから他動物種に感染するウイルスが検出される可能性がある。そこで、multiplex PCR 法では検出対象とするウイルスを家畜から鳥類・哺乳類全般に拡大し、縮重プライマーを用いて 137 属のウイルスを対象に約 700 本のプライマーをデザインした。従来法では multiplex PCR のプロダクトの塩基配列を決定する際には、電気泳動したアガロースゲルから目的のバンドを切り出し精製した後に PCR に用いたプライマーでシーケンシングするところであるが、本研究のように約 700 本のプライマーを使用する場合、アガロースゲルからのバンドの切り出しは実質的に不可能である。そこで、multiplex PCR 反応後にすべての反応液をまとめて DNA 精製しハイスルーブットシーケンシングのテンプレートとすることでこの問題を解決した。本法を multiplex PCR-NGS 法と呼び、その有用性を確認した。

## 材料と方法

### 1 DSN-NGS 法

#### 1-1 開発用サンプル

ssDNA ウイルスとしてブタパルボ生ワクチン中の porcine parvovirus (PPV)、宿主の dsDNA ゲノムのソースとして MDBK を使用した。それぞれ High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Basel, CA) および QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて核酸を抽出した。いずれも製品プロトコールに従って実施した。PPV と MDBK の核酸溶液を各 4 $\mu$ l ずつ混合した 8  $\mu$ l の核酸混合溶液 (PPV+MDBK) および PPV と nuclease free 水を各 4 $\mu$ l ずつ (PPV+nfw)、MDBK と nuclease free 水を各 4 $\mu$ l ずつ混合した核酸混合溶液 (MDBK+nfw) をそれぞれ DSN 処理群と非処理群に供するため 2 本ずつ調整した。

#### 1-2 DSN 処理

3 種の核酸混合溶液を DSN 処理群と非処理群に分け、DSN 処理群には 1 $\mu$ l の DSN solution と 1 $\mu$ l の 10 $\times$ DSN master buffer (どちらも Evrogen JSC, Moscow, Russia) を加えた。DSN 非処理群には DSN solution の代わりに nuclease free 水 1 $\mu$ l と 10 $\times$  DSN master buffer 1 $\mu$ l を加えた。両群ともに 35 $^{\circ}$ C で 10 分インキュベートし、さらに 5 $\mu$ l の stop solution を加えて 35 $^{\circ}$ C、5 分で不活化した。その後に Monofas DNA 精製キット I (Monofas I) (GL Sciences, Tokyo, Japan) で精製した。溶出には 40 $\mu$ l の nuclease free 水を使用した。この後は DSN 処理群と非処理群とで同じ工程を行った。つまり GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, U.K.)

を製品プロトコールどおりに使用して DNA の増幅と 2nd strand の合成を行った。その後、再度 Monofas I で精製し、Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) で濃度を測定した。

### 1-3 Real-time PCR

各核酸混合溶液の DSN 処理、非処理における PPV、MDBK 抽出核酸量の変化を SYBR Green Real-time PCR、TaqMan Real-time PCR を用いて確認した。なお、MDBK については  $\beta$ -actin 遺伝子領域の塩基配列の DNA 量を指標として dsDNA 量を推定した。DSN 処理後の Monofas I の溶出量は、溶出後のサンプル 1 $\mu$ l あたりの PPV および MDBK 抽出核酸量が処理群と非処理群とで等量(1 $\mu$ l)となるよう 40 $\mu$ l とした (Monofas I の回収量による影響を除く)。PPV は既報のプライマーセット (Song et al., 2010) のうち Forward (NS1-FP; 5'-GAAGACTGGATGATGACAGATCCA-3') と Reverse (NS1-RP; 5'-TGCTGTTTTTGTCTTGCTAGAGTAA-3') のみを使用して SYBR Green Real-time PCR を実施し、Ct 値を比較した。 $\beta$ -actin は KerstinWernike et al. (2011) のプライマーセット (ACT2-1030-F; 5'-AGCGCAAGTACTCCGTGTG-3', ACT-1081-probe; 3'-FAM-TCGCTGTCCACCTTCCAGCAGATGT-TAMURA-5', ACT-1135-R; 5'-CGGACTCATCGTACTCCTGCTT-3') を使用し定量した。定量に使用するスタンダード DNA は Integrated DNA Technologies 社から購入した。PCR の条件は、いずれも 95°C 10 分間の熱変性の後、95°C 15 秒、58°C 20 秒、72°C 35 秒を 40 サイクルとした。

## 2 multiplex PCR-NGS 法

### 2-1-1 開発用サンプル

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にて保有してある分離ウイルス株および生ワクチンを使用した（表 1-1）。High Pure Viral Nucleic Acid Kit（Roche）を使用して DNA あるいは RNA（DNA / RNA）を抽出した。RNA ウイルスについては Super Script III Reverse Transcriptase（Thermo Fisher Scientific）によりランダムプライマーを使用して cDNA を合成した。multiplex PCR のテンプレートとして cDNA と抽出 DNA / RNA を等量ずつ混合した。

### 2-1-2 検証用サンプル

国内 4 農場の 3 週齢未満の 7 頭の子ブタの下痢便を使用した。便は滅菌 PBS で 10% の乳剤に調整し、1,500 rpm で 15 分間遠心した。上清 200  $\mu$ l から High Pure Viral Nucleic Acid Kit（Roche）を使用して DNA / RNA を抽出した。

### 2-2 プライマーの設計

multiplex PCR-NGS 法に使用するプライマーの設計に際しては、ICTV Master Species List (<https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/>) を参照して哺乳類及び鳥類に感染し得るウイルス属から 137 属を選定した。GenBank で RefSeq に指定されているウイルス株を選定したウイルス属ごとにセットにして塩基配列のデータセットを作成しプライマー設計に使用した。設計には複数のウイルス株を検出するための縮重プライマーを設計するために開発された CoCoMo プライマー設計アルゴリズム（Jimba M et al., 2010）と CLC genomic Workbench 6.5.1（CLC bio）を使用した。1 属あたり RefSeq ウイルスが 1 つしかない場合には、同じ属の別のウイルス株もデータセットに加えた。プロダクトサイズは最大でも 1,000bp を超えないようにした。

multiplex PCR に供した全プライマーを表 1-3-1~1-3-9 に示す。後の検証の結果を踏まえ、herpesvirus、adenovirus、orthoreovirus、bornavirus は設計したプライマーの他に既報のユニバーサルプライマーも使用した (Devanter et al., 1996, Mizutani et al., 1999, Spinner et al., 2001, Weissenböck et al., 2009, Wellehan et al., 2004)。

約 700 本のプライマーを使った multiplex PCR を 1 枚の 96 well プレートで行えるよう、well ごとにあらかじめプライマーミックスを作成した。1 well に入れるプライマーが最大 10 本までとなるよう、ウイルス属ごとに混合した (表 1-3-1~1-3-11)。さらに PCR に使用するプライマーを 10  $\mu$ M に調整し、0.2 ml の 8 連チューブに分注した。

### **2-3 multiplex PCR**

multiplex PCR は Multiplex PCR Assay Kit (TaKaRa) を使用して行った。1 well あたり Multiplex PCR Mix 1 を 0.125  $\mu$ l、 Multiplex PCR Mix 2 を 12.5  $\mu$ l、cDNA と抽出 DNA/RNA の混合物を 1  $\mu$ l、10  $\mu$ M のプライマーミックス を 10  $\mu$ l および nuclease free 水を 1.375  $\mu$ l 混合した。反応時間は 94 $^{\circ}$ C 90 秒の初期変性の後、94 $^{\circ}$ C 30 秒、45 $^{\circ}$ C 90 秒、72 $^{\circ}$ C 90 秒 を 40 サイクル実施し、最終伸長を 72 $^{\circ}$ C 10 分間行った。

multiplex PCR 終了後の反応液を全 well (94well) から回収し混合した。100 bp 未満のプライマーダイマーを除くため、80% エタノールを使用して Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) を用いて精製した。

### **2-4 NGS 用ライブラリーの調整**

multiplex PCR-NGS 法、従来法ともにライブラリー調整には NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina (NEW ENGLAND Bio Labs) を使用した。従来法（前処理なし）のサンプルは製品プロトコールどおりに、multiplex PCR-NGS 法のサンプルは製品プロトコールを一部改変して使用した。具体的には end repair 以降のみを実施した。

## 2-5 ハイスループットシーケンシング及びデータ解析

開発用サンプルのハイスループットシーケンシングは MiSeq Reagent Kit v2 (150 サイクル) (Illumina) を使用しペアエンドシーケンシングとした。検証用ブタサンプルのハイスループットシーケンシングでは multiplex PCR 法と従来法（前処理無し）のそれぞれに別々のインデックスをつけて、同時にシーケンシングを実施した。こちらは MiSeq Reagent Kit v2 (300 サイクル) (Illumina) を使用しペアエンドシーケンシングとした。得られた各リードについて MiSeq レポーターを用いて FASTAQ 形式ファイルとして出力し、CLC genomic Workbench 6.5.1 (CLC bio) を用いて解析した。各リードに対してクオリティーの低い配列をトリミングするためのコマンドを実行した。

multiplex PCR-NGS 法ではプライマー設計に使用したすべてのウイルスゲノム配列を参照配列としてリードをマッピングした。このデータセットをマッピングデータセットと呼ぶこととした (表 1-4-1~1-4-4)。

マッピングされた結果のうちコンセンサス長 200 以上、マッピングリード数 100 以上の条件を満たす参照配列をそのウイルスゲノムが検出された可能性があるものとし、参照配列ごとにマッピング画像の確認を行った。マッピング画像においては multiplex PCR プロダクトのサイズに合う距離を置いて forward 端と reverse 端の両方にリード

のマッピングがみられるものを陽性と判断した (図 1-2)。従来法ではトリミングしたリードから *De novo assembly* コマンドによってコンティグを作成し、インターネット上の NCBI BLASTn にて検索を行った。minimum contig length は 500 とした。

## 結 果

### 1 DSN-NGS 法

#### 1-1 DSN-NGS 法の開発

NGS 解析において宿主細胞や細菌のゲノム DNA を可能な限りシーケンシングすることなく、ウイルスゲノムを増幅してシーケンシングできる方法を開発することを目的として、DSN を採用した。DSN は核酸溶液中の dsDNA 構造核酸を消化するが、ssDNA ウイルス核酸は消化しない特性を持つ酵素である。これを利用して ssDNA ウイルスを含むサンプルにおける ssDNA ウイルス核酸の相対濃度を高めることを目指した。

開発に際して、ssDNA ウイルスとして PPV と dsDNA ゲノムとして MDBK から抽出した DNA を混合し、DSN の処理の条件検討を行った。DSN 処理後の PPV と MDBK の DNA 量を TaqMan Real-timePCR と SYBR Green Real-timePCR を用いて定量および半定量した。なお、MDBK の DNA 量は  $\beta$ -actin で定量した。DSN 処理後の Monofas I の溶出量は、この時点でのサンプル中の核酸量が  $1\mu\text{l}$  となるようにした (Monofas I の回収量による影響を除く)。DSN 添加後のインキュベート温度については 35、40、45、45、50、55、60、65°C の 8 つの条件で試験したところ、35°C 10 分でインキュベートした場合に最も効率よく DSN の効果が得られることが明らかになった。つまりこの条件で得たテンプレートを Real-time PCR すると、最も PPV 量を減らすことなく  $\beta$ -actin 量を減らせる結果となった。具体的には  $\beta$ -actin 量が  $10^{2.5}\text{copies}/\mu\text{l}$  から  $10^0\text{copies}/\mu\text{l}$  に減少した (図 1-3)。この結果から、DSN-NGS 法は ssDNA を効率良く検出できることを示せた。

## 1-2 DSN-NGS 法の検証

本研究で使用する Miseq は、従来法におけるライブラリー調整キットへの鋳型として ssDNA が対応していない。このため DSN 処理サンプルと非処理サンプルをハイスルー プットシーケンシングして比較することは現実的に不可能である。よって NGS を使用 した検証は実施せず、DSN-NGS 法の目的における DSN の有用性を Real-timePCR で 検証するまでにとどめた。

## 2. multiplex PCR-NGS 法

### 2-1 multiplex PCR-NGS 法の開発

NGS 解析において、可能な限り宿主細胞のゲノム DNA をシーケンシングすることな く、ウイルスゲノムを増幅してシーケンシングできる方法を開発することを目的として、 NGS の前処理に multiplex PCR を採用した。

開発の際には、作成した約 700 本のプライマーが互いに干渉せずに働くかを Akabane virus、bovine viral diarrhoea virus、bovine rotavirus A、pneumonia virus of mice、 bovine adenovirus、bovine coronavirus、bovine torovirus、bovine enterovirus、bovine rhinitis A、bovine parainfluenza 3、bovine respiratory syncytial virus、mammalian orthoreovirus、bovine herpesvirus 1、canine distemper virus、canine adenovirus type 2、canine parainfluenzavirus、canine parvovirus、feline herpesvirus 1、feline calicivirus、feline parvovirus (表 1-1) の混合物をテンプレートとして使用し条件検討 を実施した。まず multiplex PCR のプロダクトを電気泳動し、想定サイズのコピーが現 れるかを検証した (data not shown)。アニーリング温度は 45°C と 50°C を試し、より確 実にバンドが得られた 45°C を採用することとした (data not shown)。バンドとして目

視できなかったウイルスを含む属については新たなプライマーを設計、もしくは既報のユニバーサルプライマーを **multiplex PCR** のプライマーミックスに加えた。続いて同じテンプレートを使用して新たなプライマーをプライマーミックスに追加した **multiplex PCR** を実施し、そのプロダクトをハイスループットシーケンシングした。得られたリード数は **50,602,224** であった。全リードを加えたテンプレートの参照配列にマッピングしたところ、殆どのウイルスでマッピングコンセンサス長が **200** をこえ、マッピングリード数も **100** をこえていた。しかし **mammalian orthoreovirus** のみがコンセンサス長も **200** に満たず、マッピングリード数も著しく少なかった (表 1-5)。そこで **mammalian orthoreovirus** については既報のユニバーサルプライマー (Spinner M. L et al., 2001) をプライマーミックスに加えることとした。

## 2-2 multiplex PCR-NGS 法の検証

開発した **multiplex PCR-NGS** 法の有用性についてブタの糞便サンプルで検討を行った。先の検証後 **orthoreovirus** のプライマーを加えたプライマーセットを使用した。**multiplex PCR-NGS** 法によって得られたリード数は **5,866,908** であった。全リードをマッピングデータセット内の参照配列にマッピングした。マッピングに使用されたリード数は **200,747** であった。マッピングリードのコンセンサス長 **200** 以上、マッピングリード数 **100** 以上の条件を満たす参照配列数は **21** であった。これらについて参照配列ごとにマッピング画像の確認を行った。**Rotavirus**、**Kobuvirus**、**Enterovirus**、**Mamastrovirus**、**Circovirus** の各属のウイルスが陽性と判断された (図 1-2)。マッピングによって得られたコンセンサス配列と参照配列を **BLASTn** で比較したところ、最も一致率の低いものは **90%** であった。

一方、従来法によって得られたリード数とコンティグ数はそれぞれ 4,586,838 および 19,080 であった。得られたコンティグは NCBI からダウンロードしたウイルスデータベース内で BLASTn 検索を実施し、このうち E-value が 1.0E-10 以下のコンティグに対しインターネット上の NCBI にて再度 BLASTn 検索を実施した。ウイルスに相性を示す E-value が 1.0E-10 以下のものを陽性と判断した。multiplex PCR-NGS 法における陽性ウイルスとの比較を表 1-6 に示す。表中 Genus No. の記載のあるウイルスはプライマー設計をされているウイルスであるため、multiplex PCR-NGS 法ではこれらがすべて陽性となっている。一方従来法では、プライマー設計対象のウイルスのうち Circovirus 属と Mastastrovirus 属の検出はできなかった。

multiplex PCR-NGS 法で陽性と判断された各ウイルス属について、multiplex PCR のプロダクトを電気泳動し想定サイズの PCR プロダクトが得られているかについて確認したところ、陽性と判断されたいずれのウイルス属についても想定サイズのバンドが確認された (図 1-4)。

## 考 察

本研究では、NGS を用いてウイルスを検出するときに生じる宿主細胞あるいは細菌由来のゲノムがウイルスの検出を妨げるという問題を解決するために2つの方法を開発した。

DSN-NGS 法は ssDNA を検出することを目的として開発した。一般に NGS は哺乳類細胞や細菌、真菌などの dsDNA ゲノムの解析や mRNA など ssRNA のトランスクリプトーム解析に使用されることが多い。それゆえ、ssDNA は NGS のライブラリー作製時の鋳型にはなりにくい。ssDNA ウイルスはパルボウイルス科とサーコウイルス科などで構成されている。porcine parvovirus は雌ブタに異常産を起こし (Mészáros et al., 2017) porcine circovirus 2 は離乳後多臓器消耗症候群の原因となる (Fenaux et al., 2000, Fenaux et al., 2003, Reuter et al., 2014)。また、Chicken anaemia virus は養鶏に貧血や免疫抑制を起こす (Noteborn et al., 1995, Lien et al., 2012)。このように ssDNA ウイルスには家畜にとって注意すべきウイルスが含まれている。

本研究で使用した DSN は核酸溶液中の dsDNA 構造核酸を分解するが、ssDNA ウイルス核酸は分解しない特性を持つ酵素である。DSN の酵素活性至適温度は 55°C~65°C と説明されている。私が実際に検証を行った際には、55°C~65°C では dsDNA の指標として用いた  $\beta$ -actin はあまり減少せず、ssDNA ウイルスの代表として用いた PPV の濃度が非処理に比べて減少してしまった。そこで温度条件の検討の結果 35°C での反応とした。また、Real-time PCR のテンプレートとしては問題とならなかった ssDNA 構造のゲノムはそのまま NGS 用ライブラリー調整には使用できず、2本鎖目の合成が必須であったため GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit を使用した。GenomiPhi V2 DNA

Amplification Kit の使用によって ssDNA の 2 本鎖目が合成されるだけでなくテンプレートが増幅されるため、サンプル中のウイルス数が著しく少ない場合でも NGS で検出できることを目指した。このように DSN を用いて ssDNA を検出するための最適条件を決定した。MiSeq の場合、1 回の解析で 2000 万リードの塩基配列の情報を得ることができる。それゆえ、本法のようにサンプル中の dsDNA 量を減らすことにより ssDNA を解析することは可能である。

さらに本研究ではウイルス検出の網羅性を高めるために multiplex PCR-NGS 法を開発した。すでにのべ約 60 サンプルのウイルス検索を multiplex PCR-NGS 法によって実施している (表 1-2)。multiplex PCR は複数のプライマーをひとつのチューブに入れて PCR を行うので、プライマーの相性が重要とされていた。それゆえ、multiplex PCR の検出系を開発する際には詳細な条件検討が必要であった。しかし、近年 multiplex PCR の効率は PCR 用バッファーを最適化することで解決することが明らかになり、現在、数社の試薬メーカーから最適化されたバッファーが販売されている。本研究では TaKaRa 社の製品を採用した。プライマーの設計には CoCoMo および CLC genomic Workbench 6.5.1 を利用した。CoCoMo は酪農学園大学の遠藤大二教授らによって作成された最適なプライマーの設計ソフトである。CoCoMo によるプライマー設計を利用した牛白血病ウイルスの qPCR はキット販売されている (Yuan et al., 2015, Sakai et al., 2015)。プライマーの設計にあたり、CoCoMo は保存領域が明確なデータセットを用いた場合に威力を発揮するソフトであるが、プライマー設計にあたって使用したウイルス属ごとのデータセットの中には多様性があるものも多く、CoCoMo だけでは対応できなかった。CLC genomic Workbench 6.5.1 はどのようなデータセットでもプライマーの作成が可能だが、好スコアのプライマーセット以外を働かせるにはバッファーや温度の条

件の設定が難しい。multiplex PCR-NGS 法ではすべてのプライマーを同条件で働かせなくてはならないため、本来であれば CoCoMo で設計不可能なデータセットのプライマーは、本研究に合う条件で設計するのはかなり困難であるといえるだろう。検証は 17 属 20 種のウイルスで実施したが、残り 120 属の未検証のプライマーの中にうまく働かないものが含まれている可能性は否定できない。特に CoCoMo で設計されていないプライマーについては適宜見直していくべきと考えている。

また、今回検出対象としていなかったウイルス属や今後新たに発見されるウイルスについても、哺乳類や鳥類への感染に対する報告がされたなどの場合には、適宜プライマーを追加しながら運用していく予定である。

multiplex PCR-NGS 法は哺乳類と鳥類に感染するほとんどのウイルスを理論的に検出できるという利点がある一方で、PCR プロダクトの塩基配列を決定することからウイルスゲノムの全長を決定できないという欠点がある。しかし、multiplex PCR-NGS 法で陽性と判断されたウイルス属については新たにプライマーを設定してコンベンショナル PCR を実施し、ダイレクトシーケンシングすることでウイルス種を特定できる。multiplex PCR-NGS 法で NGS 解析の際に実施するマッピングでは参照配列との一致率が 90%のウイルス株も検出できた。これは、multiplex PCR-NGS 法が半特異的であり、プライマー設計に使用したウイルス株以外のウイルスも検出できることを示唆している。このように multiplex PCR-NGS 法は効率的かつ網羅的にターゲットウイルスゲノム断片を獲得できる方法であるといえる。

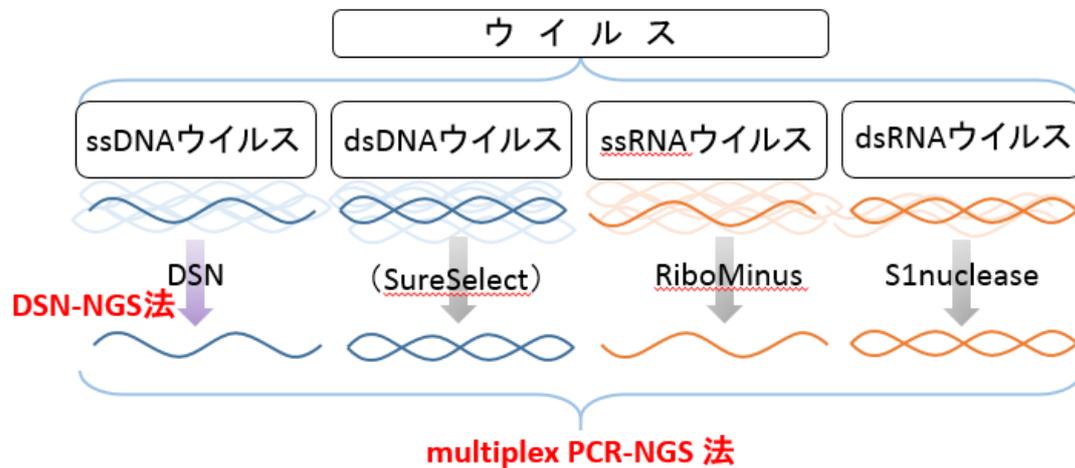
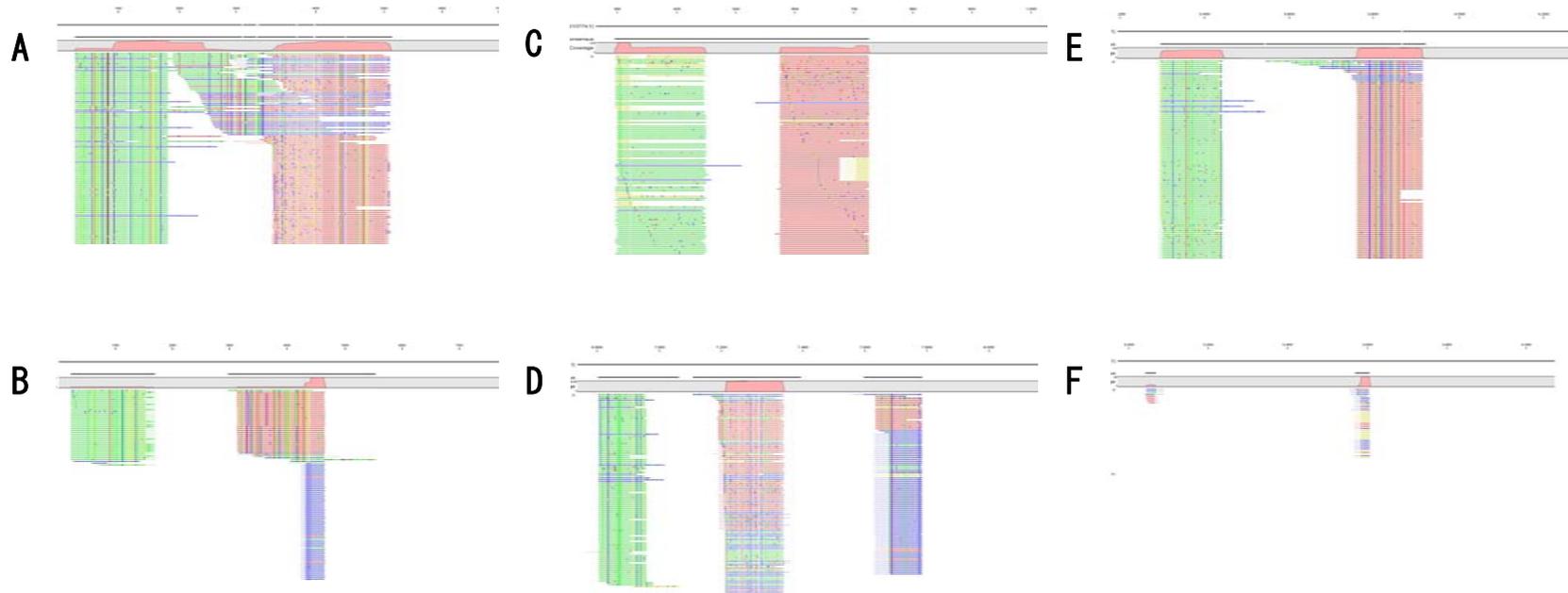


図 1-1 ゲノム構造によるウイルス分類とサンプルの前処理

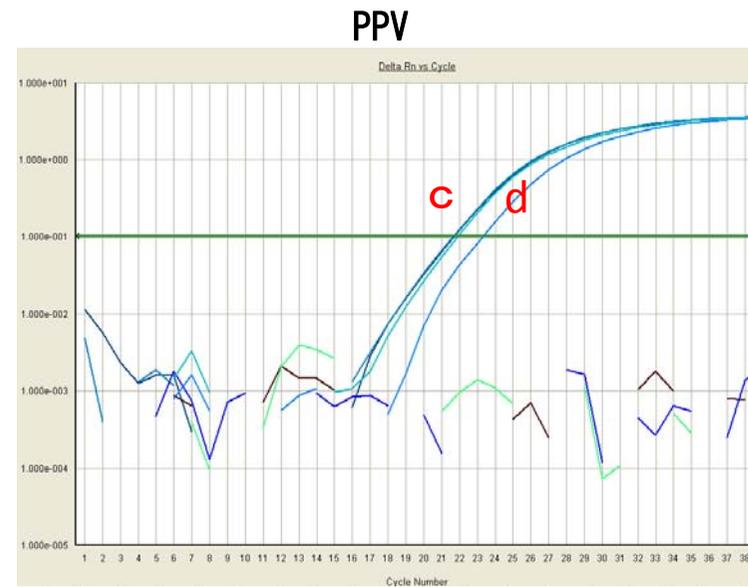
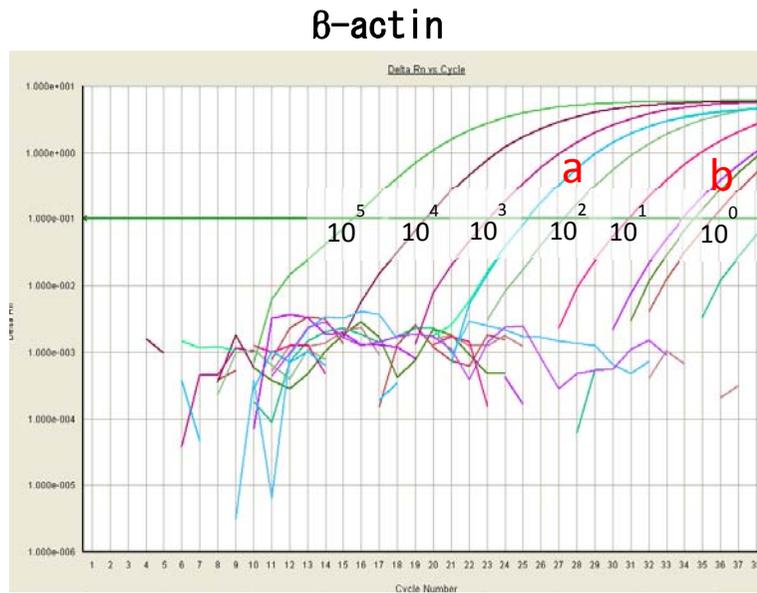
ウイルスをそのゲノム構造から4種に分けた。レトロウイルスは対象外とした。



**図 1-2 ブタ検証用サンプルにおける multiplex PCR-NGS 法マッピング画像**

A は Enterovirus、B は Rotavirus、C は Circovirus、D は Kobuvirus、E は Mamastrovirus、F は Herpesvirus を参照配列としてリードをマッピングした。A~E は陽性例、F は陰性例を示す。

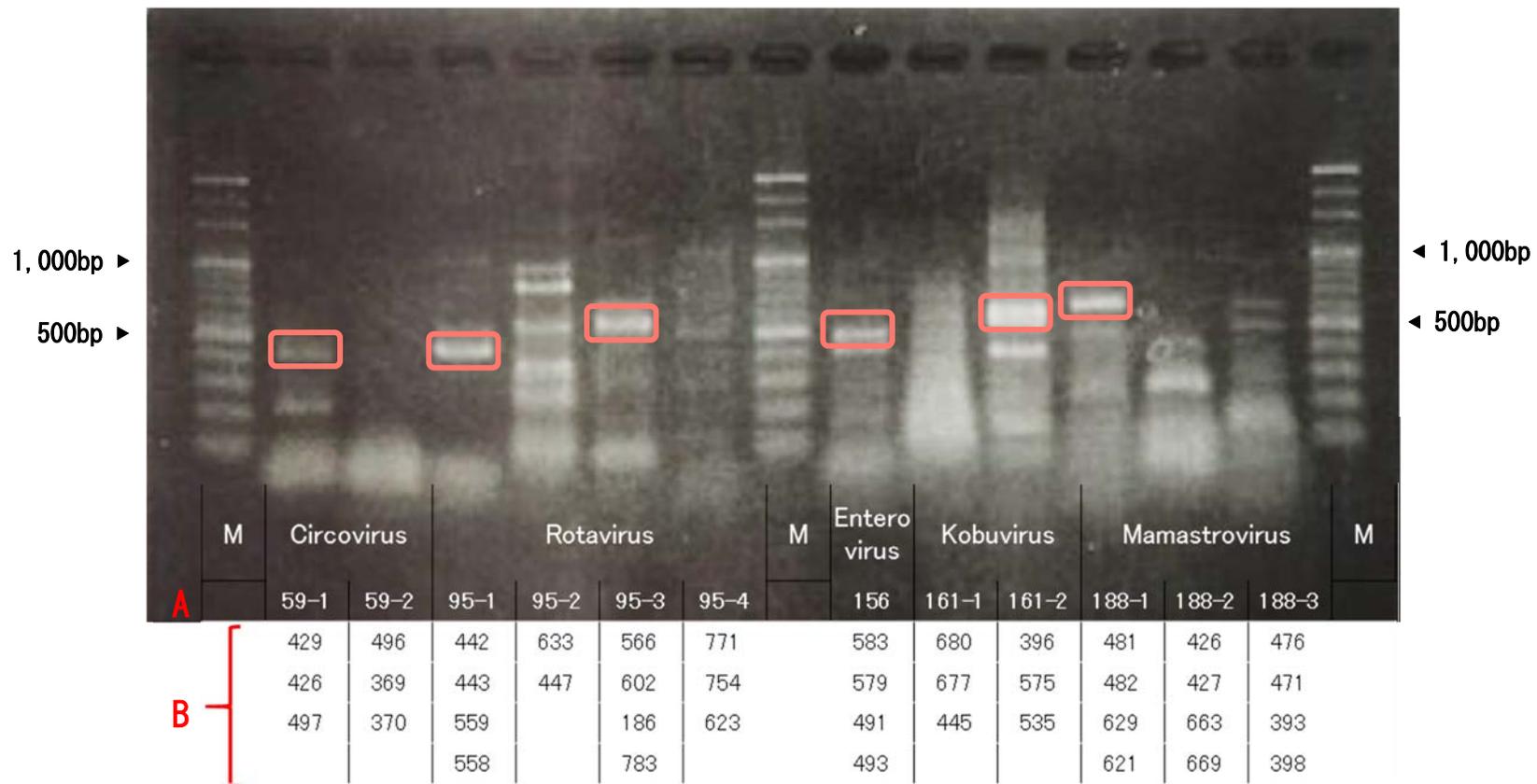
想定される PCR プロダクトの長さの両端にリード（200 リード以上）がマッピングされており、マッピングコンセンサス長が 150 を超えたものを陽性と判断する。リードの色は、赤が forward 側からのシーケンス、緑が reverse 側からのシーケンス、青がペアシーケンス、黄色は非特異的なシーケンスをそれぞれ示す。



**図 1-3 Real-time PCR による DSN 処理効果の検討**

左は  $\beta$ -actin (Taqman Real-time PCR)、右は PPV (SYBR Green Real-time PCR) における検証の結果を示す。 $\beta$ -actin は既知の濃度の合成 DNA をスタンダードとして使用した。

a: DSN 非処理 Genome 含サンプル×2、b: DSN 処理 Genome 含サンプル×2、c: DSN 処理 PPV 含サンプル×2 および DSN 非処理 PPV 含サンプル×1、d: DSN 非処理 PPV 含サンプル×1



**図 1-4 multiplex PCR 法における PCR product の泳動**

A はプライマーミックス No. (表 1-3-1~1-3-9 参照), B は PCR の想定プロダクトサイズを示す。  
陽性例では想定されるサイズの PCR プロダクトが確認できた。

表 1-1 multiplex PCR-NGS 法開発に使用したウイルス

No.	target	origin	group	family	genus	genus No.
1	akabane virus	culture supernatant	(-)ssRNA	<i>Bunyaviridae</i>	<i>Orthobunyavirus</i>	144
2	bovine viral diarrhoea virus	culture supernatant	(+)ssRNA	<i>Flaviviridae</i>	<i>Pestivirus</i>	203
3	bovine rotavirus A	culture supernatant	dsRNA	<i>Reoviridae</i>	<i>Rotavirus</i>	95
4	pneumonia virus of mice (PVM)	culture supernatant	(-)ssRNA	<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Pneumovirus</i>	135
5	bovine adenovirus	culture supernatant	dsDNA	<i>Adenoviridae</i>	<i>Atadenovirus</i>	35
6	bovine coronavirus	culture supernatant	(+)ssRNA	<i>Coronaviridae</i>	<i>Coronavirus</i>	192
7	bovine torovirus	culture supernatant	(+)ssRNA	<i>Coronaviridae</i>	<i>Totovirus</i>	196
8	bovine enterovirus	culture supernatant	(+)ssRNA	<i>Picovirnaviridae</i>	<i>Enterovirus</i>	156
9	bovine rhinitis A (BRAV)	culture supernatant	(+)ssRNA	<i>Picornaviridae</i>	<i>Aphthovirus</i>	149
10	bovine parainfluenza 3 (BPIV3)	culture supernatant	(-)ssRNA	<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Respirovirus</i>	131
11	bovine respiratory syncytial virus (BRSV)	culture supernatant	(-)ssRNA	<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Pneumovirus</i>	135
12	mammalian orthoreovirus (MRV)	culture supernatant	dsRNA	<i>Reoviridae</i>	<i>Orthoreovirus</i>	101
13	bovine herpesvirus 1 (IBR)	culture supernatant	dsDNA	<i>Herpesviridae</i>	<i>Varicellovirus</i>	20
14	canine distemper virus	vaccine	(-)ssRNA	<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Morbillivirus</i>	130
15	canine adenovirus type 2	vaccine	dsDNA	<i>Adenoviridae</i>	<i>Mastadenovirus</i>	35
16	canine parainfluenzavirus	vaccine	(-)ssRNA	<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Respiro/Rubulavirus</i>	131/132
17	canine parvovirus	vaccine	ssDNA	<i>Parvoviridae</i>	<i>Protoparvovirus</i>	80
18	feline herpesvirus 1	vaccine	dsDNA	<i>Herpesviridae</i>	<i>Varicellovirus</i>	20
19	feline calicivirus	vaccine	(+)ssRNA	<i>Caliciviridae</i>	<i>Vesivirus</i>	185
20	feline parvovirus	vaccine	ssDNA	<i>Parvoviridae</i>	<i>Protoparvovirus</i>	80

genus No. は表 1-3-1~1-3-9 の genus No. に対応している

表 1-2 multiplex PCR-NGS 法解析サンプル一覧

No.	animal	origin	cartridge	number of reads	detected viruses
1	cow	feces	150 v3	4,288,224	calicivirus, kobuvirus, hungarovirus
2	cow	serum	150 v3	8,871,644	-
3	cow	liver	150 v3	7,882,282	-
4	goat	blood	150 v3	5,862,934	-
5	elephant	blood, nasal discharge, oral swab, oral abscess swab, nasal swab	150 v3	7,022,422	-
6	tuna	culture supernatant	150 v3	8,327,456	-
7	pig	feces	150 v3	7,347,476	kobuvirus, rotavirus A, enterovirus
8	pig	feces	150 v3	7,063,832	kobuvirus, enterovirus, circovirus, astrovirus
9	cat	various organs	150 v3	8,294,906	-
10	bat	feces	300micro	1,389,170	black beetle virus, picornavirus, polyomavirus, mastadenovirus
11	bat	feces	300micro	1,088,682	picornavirus, polyomavirus
12	bat	feces	300micro	1,072,458	picornavirus, polyomavirus
13	cow	nasal swab	300micro	1,633,120	rhinovirus
14	hedgehog	nasal swab	300micro	1,648,226	adenovirus
15	hedgehog, sugar glider, guinea pig, degu	pharyngeal swabs, stools, pharyngeal mucus, nasal discharge	300micro	1,655,762	-
16	bat	feces	300micro	3,016,110	-
17	hedgehog, pygmy opossum	feces	300micro	5,787,330	-

※検出されたウイルスには PCR で確認していないものも含む。

表 1-3-1 multiplex PCR-NGS 法に使用したプライマー (1)

Genome	order	family	subfamily	Genus No.	genus	プライマー配列F	プライマー配列R	primer Mix No.				
dsDNA	Unassigned	Poxviridae	Chordopoxvirinae	001	Avipoxvirus							
				002	Capripoxvirus							
				003	Cervidpoxvirus							
				004	Crocodylipoxvirus							
				005	Leporipoxvirus							
				006	Molluscipoxvirus							
				007	Orthopoxvirus							
				008	Parapoxvirus							
				009	Suipoxvirus							
				010	Yatapoxvirus							
	Unassigned	Asfarviridae	Iridoviridae	011	Asfivirus							
	012			Megalocytiavirus								
	Unassigned				013	Ranavirus						
					014	Iridovirus						
					015	Chloriridovirus						
					016	Lymphocystivirus						
Herpesvirales	Herpesviridae	Alphaherpesvirinae	017	Iltovirus	017_iltovirus_2618_F	GGGSGTRGATWTRGTMMSAAR	017_iltovirus_2939_R	YTCGYKCSGMGRRYYTTYTY				
			018	Mardivirus	018_mardi1_1_68159F 018_mardi1_2_67828F	CGTATCCTGCATYACRCTACGG CCATATCTTGAACRACGGCAAT	018_mardi1_1_68726R 018_mardi1_2_68308R	CATGACMGAAGTRGGKGAAGCT AAATTCGGRTAYCARATCGCTG	017018019			
			019	Simplexvirus	019_simplex_200_F 019_simplex_2210_F	AGAGGSSVCRSGSVNNSMSSGM AAAVGARGGSRSCGSSGGS	019_simplex_1051_R 019_simplex_2902_R	CGSRBTGSRNNGCSYSYVB ATSGSGGSRBRAASAGSGCB				
			020	Varicellovirus	DFA ILK	GAYTTYGCNAGYYTNTAYCC TCCTGGACAAGCAGCARNYSGCNMTNAA	KG1	GTCTTGCTCACCAGNTCNACNCCYT		020-U		
			Betaherpesvirinae	021	Cytomegalovirus	021_cytom1_1_102245F 021_cytom1_2_102246F	TRCCKCCDGTGATYTCGTCCAT GTRCCKCCDGTGATYTCGTCCAT	021_cytom1_1_101937R 021_cytom1_2_101937R	AGGSTTYAACACCATYCTGGG AGGSTTYAACACCATYCTGGG		021022	
				022	Muromegalovirus	022_murom1_1_67942F 022_murom1_2_67942F	AGTTGATYTTGCACAGGAGACG AGTTGATYTTGCACAGGAGACG	022_murom1_1_68314R 022_murom1_2_68315R	TGCTGAAGTAYTGGCATCCGA ATGTCTGAAGTAYTGGCATCCG			
				023	Proboscivirus							
				024	Roseolovirus	024_roseo1_1_137665F 024_roseo1_2_137664F	ACCGCGGTACMCACTGACCTTT AACCGGGTACMCACTGACCTTT	024_roseo1_1_140943R 024_roseo1_2_140943R	GCGGAACCGCAGTTYCTGTTT GCGGAACCGCAGTTYCTGTTT		024025	
				Gammaherpesvirinae	025	Lymphocryptovirus	025_lymph4_1_124268F 025_lymph4_2_123025F	CCATRATCTGGTTGTCRGCCTC AGHGCGCARACTACTGACCCA	025_lymph4_1_124618R 025_lymph4_2_123493R	AYGCYCKCCCATGTTTATCCT CYGTGGACCGRCTRATGGTGGG		
					026	Macavirus	026_macav1_1_52150F 026_macav1_2_52150F	ATAGAGACSGGCYTGAGCTACA ATAGAGACSGGCYTGAGCTACA	026_macav1_1_52970R 026_macav1_2_52969R	ACYGGRGCCACTTCTCAATAAA CYGGRGCCACTTCTCAATAAA		026027
			027		Percavirus	027_perca1_1_3040F 027_perca1_2_3043F	AAACTCACCMGTACGCTCTACC CTCACCMGTACGCTCTACCCGG	027_perca1_1_3602R 027_perca1_2_3604R	TGGMACGTCATCTGGCCAA CMTGGMACGTCATCTGGCCA			
			028		Rhadinovirus	028_rhadi3_1_39973F 028_rhadi3_2_56186F	CYGTGTATTTGATATAAATCA ACTACTCCATCASTCTCAGAA	028_rhadi3_1_40611R 028_rhadi3_2_56962R	TWACATATTTGTTACAAGAGT GATCCWAAACGWGAACACTCA		028	
		028	Rhadinovirus		028_rhadi1_1_14970F 028_rhadi1_2_14971F	GGACRGMMYTGGAGTTTGACTG GACRGMMYTGGAGTTTGACTGC	028_rhadi1_1_15734R 028_rhadi1_2_15734R	TGGCCAGCTTGGCTATYCCGA TGGCCAGCTTGGCTATYCCGA				
		Alloherpesviridae	029	Batrachovirus	029_batracho_797_F 029_batracho_2399_F	KYGYTSTWTSRGRYKGGGYG RSMRGTGGTGRGTGRRGAWR	029_batracho_1498_R 029_batracho_3105_R	SWSGTGSRKGTGYGSKSGT MCCGCWMMYTSAGRCRMRTR		029036		
			030	Cyprinivirus								
			031	Ictalurivirus								
			032	Salmonivirus								
		Malacoherpesviridae	033	Aurivirus								
			034	Ostreavirus								
		Unassigned	Adenoviridae	035	Atadenovirus	035_atade4_1_15480F 035_atade4_2_17364F 035_atade1_1_16831F 035_atade1_2_16831F	ATGGCRGCTAGYTACAACCAAG ACTTTGAACCCATGAGCAGGCA ATGGCWGCAATTATAATCAAG ATGGCWGCAATTATAATCAAG	035_atade4_1_16011R 035_atade4_2_17813R 035_atade1_1_17345R 035_atade1_2_17346R	TAATTCACCTGCGGGTAGTTG TAATTCACCTGCGGGTAGTTG CTHGTGGTTGATTRATAACAA TCTHGTGGTTGATTRATAACA		035	
						polRouter	TNMGNGNGNMGNMTGYTAYCC	polRouter	GTDGCRAANSHNCRTABARNGMRT		035-U	
				036	Aviadenovirus	036_aviad1_1_21742F 036_aviad1_2_22199F	ARYTTYATGCCMATGGATCACA TYCAGATGGCBACVAACAGAA	036_aviad1_1_22222R 036_aviad1_2_22669R	ARTTGTAGTTSGTSGCCATCTG CGAARTWDATSACCATGCTGTG		029036	
				037	Ichtadenovirus							

表 1-3-2 multiplex PCR-NGS 法に使用したプライマー (2)

Genome	order	family	subfamily	Genus No.	genus	プライマー配列F	プライマー配列R	primer Mix No.		
dsDNA	Unassigned	Polyomaviridae		038	Mastadenovirus	038_masta24_1_5617F	GCRACARATRTCTGTTTCTA	038_masta24_1_6235R	ATGACATHGTGGCATGTATGC	038
						038_masta24_2_5617F	GCRACARATRTCTGTTTCTA	038_masta24_2_6236R	TATGACATHGTGGCATGTATG	
						038_masta2_1_19957F	CYAACATGCTNTACCCATHCC	038_masta2_1_20308R	ARRAACAGTCYTTGGTCATGT	
				039	Siadenovirus	038_masta2_2_19956F	GCYAACATGCTNTACCCATHCC	038_masta2_2_20308R	ARRAACAGTCYTTGGTCATGT	
						039_siade1_1_8529F	CWGTGWATTGTGTTAAATGCAT	039_siade1_1_8942R	TTTCWGTATAATOHGCATCTCT	039
						039_siade1_2_8528F	TOWGTGWATTGTGTTAAATGCA	039_siade1_2_8942R	TTTCWGTATAATOHGCATCTCT	
				040	Polyomavirus	040_polyo12_1_787F	TTTACCTGGGATGYTGCAGAA	040_polyo12_1_1365R	GRATAGGTYTCTATTACCTCTG	
						040_polyo12_2_787F	TTTACCTGGGATGYTGCAGAA	040_polyo12_2_1352R	TTACCTCWGCAGATTGATCTGT	
						040_polyo5_1_3613F	CRCTGACTGGATGCTTCCTTT	040_polyo5_1_2914R	TTTCATYYTDGADGGGTCTGG	040-1
						040_polyo5_2_3612F	RCCTGACTGGATGCTTCCTTTA	040_polyo5_2_2914R	TTTCATYYTDGADGGGTCTGG	
						040_polyo23_1_3017F	TGATCTCKGAAATTATCTAAAT	040_polyo23_1_3780R	CCTTATRRACTTATAGAAGAAA	040-2
						040_polyo23_2_3016F	ATGATCTCKGAAATTATCTAAA	040_polyo23_2_3780R	CCTTATRRACTTATAGAAGAAA	
						040_polyo22_1_1942F	YTRATGTGGGAAGCAATTAGTG	040_polyo22_1_2299R	CWGTGARCTGCCAAARTATCT	040-2
						040_polyo22_2_1945F	ATGTGGGAAGCAATTAGTGTA	040_polyo22_2_2299R	CWGTGARCTGCCAAARTATCT	
						040_polyo10_1_559F	TCAGGAATAGAAACWTTAGCTC	040_polyo10_1_1073R	TKGGAGGCGCCATTTAAACCTTA	040-3
						040_polyo10_2_559F	TCAGGAATAGAAACWTTAGCTC	040_polyo10_2_1047R	TAAAGGAGCATCCARTCAGGT	
						040_polyo3_1_841F	AAACTGTWCAGGTGYCAGTGC	040_polyo3_1_1431R	TTARAGGAAGCATCCARTCTTG	040-3
						040_polyo3_2_841F	AAACTGTWCAGGTGYCAGTGC	040_polyo3_2_1429R	ARAGGAAGCATCCARTCTTGAG	
						040_polyo11_1_1344F	ATTTTAAAAATGCGYAGRTGGCG	040_polyo11_1_1668R	GGGSCATCTTCTCTTCTTCTA	040-4
						040_polyo11_2_1266F	TWGCCMKRTATTTTAAAAATGC	040_polyo11_2_1602R	GGGSCATCTTCTCTTCTTCTA	
040_polyo4_1_3474F	CWGCMACYTTRTTCCAATTACA	040_polyo4_1_3888R	GATAGTCCTWCTGAYHTKCCCT			040-4				
040_polyo4_2_3473F	TCWGCMACYTTRTTCCAATTAC	040_polyo4_2_3888R	GATAGTCCTWCTGAYHTKCCCT							
040_polyo15_1_1178F	GACTGGTTRCTYCCITTTGCTTT	040_polyo15_1_1601R	TTTGCAGCTAACTGCTCCACA			040-5				
040_polyo15_2_1178F	GACTGGTTRCTYCCITTTGCTTT	040_polyo15_2_1600R	TTGCAGCTAACTGCTCCACA							
040_polyo1_1_4344F	CTATTRCTAAAYACAGCWGTGAC	040_polyo1_1_4758R	TTGYTACTGCWTTGAYTGCTTC	040-5						
040_polyo1_2_4396F	CYTTGGGCTTCTACCTTTCT	040_polyo1_2_4758R	TTGYTACTGCWTTGAYTGCTTC							
dsDNA	Unassigned	Papillomaviridae		041	Alphapapillomavirus					
				042	Betapapillomavirus					
				043	Gammapapillomavirus					
				044	Deltapapillomavirus					
				045	Epsilonpapillomavirus					
				046	Etapapillomavirus					
				047	Iotapapillomavirus					
				048	Kappapapillomavirus					
				049	Lambdapapillomavirus					
				050	Mupapillomavirus					
				051	Nupapillomavirus					
				052	Omikronpapillomavirus					
				053	Pipapillomavirus					
				054	Thetapapillomavirus					
055	Xipapillomavirus									
056	Zetapapillomavirus									
	Unassigned	Ascoviridae		057	Ascovirus					
ssDNA	Unassigned	Circoviridae		058	Gyrovirus	058_gyrov1_1_76F	CGCTCGGATYYGTGGAAGGCG	058_gyrov1_1_355R	CCTACYGCCGWCCGGTATGYGC	058
						058_gyrov1_2_61F	CRRATCGCTCGACTKCGCTCGC	058_gyrov1_2_355R	CCTACYGCCGWCCGGTATGYGC	
				059	Circovirus	059_circo3_1_296F	AAGGAACYGAYCAGCAGAATAA	059_circo3_1_724R	ACARTCTCAGTAGATCATCCCA	059-1
						059_circo3_2_299F	GAACYGAYCAGCAGAATAAAGA	059_circo3_2_724R	ACARTCTCAGTAGATCATCCCA	
						059_circo2_1_92F	MTAATAACCCCTACCTTTGAAG	059_circo2_1_588R	AATCAAAYRCRTAACGGCTCT	
				059_circo2_2_92F	MTAATAACCCCTACCTTTGAAG	059_circo2_2_587R	ATTCAAAYRCRTAACGGCTCTT	059-2		
				059_circo1_1_373F	GTTGCCGSGTGAARGCCGGAA	059_circo1_1_741R	CTTMGAGGTRAACTCCACATAV			
				059_circo1_2_374F	TTGCCGSGTGAARGCCGGAA	059_circo1_2_741R	CTTMGAGGTRAACTCCACATAV			

表 1-3-3 multiplex PCR-NGS 法に使用したプライマー (3)

Genome	order	family	subfamily	Genus No.	genus	プライマー配列F	プライマー配列R	primer Mix No.		
	Unassigned	Anelloviridae		060	Alphatorquevirus					
				061	Betatorquevirus					
				062	Gammatorquevirus					
				063	Deltatorquevirus					
				064	Epsilontorquevirus					
				065	Etatorquevirus					
				066	Iotatorquevirus					
	Unassigned	Parvoviridae	Densovirinae	067	Thetatorquevirus					
				068	Zetatorquevirus					
				069	Ambidensovirus					
				070	Brevidensovirus					
				071	Hepadensovirus					
				072	Iteradensovirus					
ssDNA			Parvovirinae	073	Penstydensovirus					
				074	Amdoparvovirus	074_ amdop1_ 1_ 1698F	TTAAAGCCATTACTGGAGGTGG	074_ amdop1_ 1_ 2376R	ATAAACACGTGCTTGGAGCAC	074
						074_ amdop1_ 2_ 1699F	TAAAGCCATTACTGGAGGTGGT	074_ amdop1_ 2_ 2376R	ATAAACACGTGCTTGGAGCAC	
				075	Aveparvovirus					
				076	Bocaparvovirus	076_bocap2_ 1_ 3224F	GCGGTAACCTTGGCGRTGCCGT	076_bocap2_ 1_ 3925R	GCGTCCARGGAAAGCGGTGTTCC	076
						076_bocap2_ 2_ 2435F	CGRGASGGAGCATGGAACGTCT	076_bocap2_ 2_ 3245R	ACGGGAYGCGCAAAGTTACCGC	
						076_bocap1_ 1_ 2546F	AYACTGTRTTCAGTCAACACAG	076_bocap1_ 1_ 2905R	TTTCARCAGCAGAAAGCATTTCC	
						076_bocap1_ 2_ 2546F	AYACTGTRTTCAGTCAACACAG	076_bocap1_ 2_ 2911R	CCATRSTTTCARCAGCAGAAAG	
				077	Copiparvovirus					
				078	Dependoparvovirus	078_depen6_ 1_ 2728F	CCTCRGGWATTGGCATTGCGA	078_depen6_ 1_ 3082R	ACGGTGSWGGTGAGRTTGTTGG	078079
						078_depen6_ 2_ 2729F	CTCRGGWATTGGCATTGCGAT	078_depen6_ 2_ 3082R	ACGGTGSWGGTGAGRTTGTTGG	
						079_eryth1_ 1_ 2168F	AGAACTGAGTGAAGCAGCTTT	079_eryth1_ 1_ 2604R	ATCCAGACAGGTAAAGCAGATTT	
						079_eryth1_ 2_ 2067F	GATTTCCTGGAAATWAATGCAG	079_eryth1_ 2_ 2604R	ATCCAGACAGGTAAAGCAGATTT	
			080	Protoparvovirus	080_proto3_ 1_ 1185F	CAGAYAGTTATATWGAATGAT	080_proto3_ 1_ 1788R	TCTCTTATTGGTTGTGTATGTT	080-1	
					080_proto3_ 2_ 1183F	WCCAGAYAGTTATATWGAATG	080_proto3_ 2_ 1788R	TCTCTTATTGGTTGTGTATGTT		
					080_proto2_ 1_ 3255F	AACTATACAACAACGACTAAC	080_proto2_ 1_ 3640R	AGGATTWCCAATRTGTCTAGAA		
					080_proto2_ 2_ 1018F	AGAAACMGWAAAGAAATAACT	080_proto2_ 2_ 1544R	ATTGGTTACTTGAGTTCCAAA		
					080_proto1_ 1_ 759F	TAWCACCAGCTGAAAGAATTAA	080_proto1_ 1_ 1203R	ATTTCATRTRAACTGTCTGGCT	080-2	
					080_proto1_ 2_ 1878F	TGGTRAAGAAAYGGTACCAATG	080_proto1_ 2_ 2553R	AGCAGSAGAGAAGTACAGGTAA		
dsDNA, (+)ssRNA with RT	Unassigned	Hepadnaviridae	Orthoretrovirinae	081	Tetraparvovirus					
				082	Orthohepadnavirus					
				083	Avihepadnavirus					
				084	Alpharetrovirus					
		Retroviridae		Betaretrovirus	085	Betaretrovirus				
					086	Deltaretrovirus				
					087	Epsilontoretrovirus				
					088	Gammaretrovirus				
		Spumaretrovirinae		Lentivirus	089	Lentivirus				
					090	Spumavirus				
dsRNA	Unassigned	Reoviridae	Sedoreovirinae	091	Cardoreovirus					
				092	Mimoreovirus					
				093	Orbivirus	093_orbiv2_ 1_ 1063F	ATACGGATTATTTTCGATCCACG	093_orbiv2_ 1_ 1884R	CGTAMCGATAAGTATCATAACA	093
						093_orbiv2_ 2_ 1062F	TATACGGATTATTTTCGATCCAC	093_orbiv2_ 2_ 1699R	ARATCWGWATTATCACTTTCC	
						093_orbiv1_ 1_ 2F	TTAAGATGACTCAGCAATGGAT	093_orbiv1_ 1_ 441R	GATCRCGTACAAATTGAATTTCT	
				093_orbiv1_ 2_ 3F	TAAGATGACTCAGCAATGGATG	093_orbiv1_ 2_ 441R	GATCRCGTACAAATTGAATTTCT			
094	Phytoreovirus									

表 1-3-4 multiplex PCR-NGS 法に使用したプライマー (4)

Genome	order	family	subfamily	Genus No.	genus	プライマー配列F	プライマー配列R	primer Mix No.				
dsRNA				095	Rotavirus	095_rotA1_1_21F GGGAAGTAYAATCTAATCTTGT	095_rotA1_1_462R ACCARAACATRACTGCATTTAA					
						095_rotA1_2_21F GGGAAGTAYAATCTAATCTTGT	095_rotA1_2_463R AACCARAACATRACTGCATTTA					
						095_rotA1_1_2403F ATTGCRAAATCACCRCAATTTA	095_rotA1_1_2961R ATCTGTCATGYTTATACATCTG		rota-1			
						095_rotA1_2_2404F TTGCRAAATCACCRCAATTTA	095_rotA1_2_2961R ATCTGTCATGYTTATACATCTG					
						095_rotA1_1_1775F CRATTGATGAAGCGAGAGAAGA	095_rotA1_1_2407R TTGARGCTGAAGTGGTATTAG		rota-2			
						095_rotA1_2_1632F CCGCTAAAGCYGCATCTTTAAC	095_rotA1_2_2078R CATCTCCATCAACYCGCATATG					
						095_rotap1_1_57F TTTGTTTATAATTCRCAATCTG	095_rotap1_1_622R TAATAYGGTTTATCTTTGATTA					
						095_rotap1_2_1641F TTAGATATGYTGGCTAATATGA	095_rotap1_2_2242R ACAGATGTCATYGTATAATTT		rota-3			
						095_rotap1_1_1785F GCAATYAAAGAAGCTAGAACA	095_rotap1_1_1970R ACCTGATGCAACTCCATGATAT					
						095_rotap1_2_1560F GCGGARTTCAACACACAATAG	095_rotap1_2_2342R TGCAGCCGARTAGATAAGTGAG					
						095_rota-B-Con_200-222_F RMKWGMWMDKYWHHRWSTMTWV	095_rota-B-Con_953-970_R KRWRTRKWHGTWGGWGM					
						095_rota-B-Con_196-219_F RDWWRMKWGMWMDKYWHHRWSTM	095_rota-B-Con_955-972_R TTKRWRTRKWHGTWGGWG		rota-4			
						095_rota-D,F-Con_1511-1530_F CRYMRKCWMMKCACTACTR	095_rota-D,F-Con_2113-2133_R MGYMGTTKKWTKWTKYCTYTT					
						095_rota-D,F-Con_2065-2082_F GGWGGWGMWTKTWTTTT	095_rota-D,F-Con_2065-2084_R CTAAAAMAKWCKWCCWCC					
						096	Seadornavirus		096_seadorna_530_F TRVKRYWGYWGCWGAYGGWKYD	096_seadorna_1124R CAWDGCMRKSHPYGBKSAGCR	096	
						097	Aquareovirus					
						Spinareovirinae	098		Coltivirus	098_colt5_1_551F TMTGGCCMARTGGTAGTGGACA	098_colt5_1_1082R ATGAGGTASAGCTCACCAGGCC	
										098_colt5_2_25F CCTRCGTTTCAGCATCATGTTTG	098_colt5_2_683R ACATAACTYTTCCATCCCACT	
										098_colt3_1_1574F GAATCCWAGCAGRTCTGTGAC	098_colt3_1_2289R AGACCCAGTGAACCCACTCAGC	
										098_colt3_2_2268F GCTGAGTGGTTTCACTGGGCT	098_colt3_2_2625R CCATYCCCTCKGAGTCAGTCAT	
				098_colt2_1_993F TGGCYTAGGAACKATGGATAC	098_colt2_1_1631R CCTCGAACAGCTCAGGCATAGA							
				098_colt2_2_1085F ATTKCYAGYTTAAGGATGGGA	098_colt2_2_1629R TCGAACAGCTCAGGCATAGA							
				098_colt4_1_25F CCTTCGAAAGAGTGGAGAGAGA	098_colt4_1_636R CAACATAGTMACRGCACCATGA							
				098_colt4_2_33F AGAGTGGAGAGAGATCAAT	098_colt4_2_635R AACATAGTMACRGCACCATGAT							
				098_colt1_1_33F TCCACTATGCCGGCTCTTGCTA	098_colt1_1_718R CCAAYCTTCARTGACTGACCGA							
				098_colt1_2_39F ATGCCGGCTCTTGCTATAATCG	098_colt1_2_717R GAAYCTTCARTGACTGACCGAA							
			099	Cypovirus								
			100	Fijivirus								
			Orthoreovirus	101	101_orthoreo_mam_762F RYTRGYRARRYTDGGRGTV	101_orthoreo_mam_1460R RRTTCARCACCAYYTRR						
					101_orthoreo_mam_1132F TCCKTCRARYRTGCCCTCCY	101_orthoreo_mam_1923R TCYTCRCAHCCRCACCAY						
					101_orthoreo_mam_539F GCRTCHACTYTRTCRTTY	101_orthoreo_mam_1518R GAYGTRTRNGARAAHGGY						
					101_orthoreo_mam_2583F RAYDGGYGARASYGTRGGB	101_orthoreo_mam_3045R WARTGAYGGRRGRTTGTG						
					101_orthoreo_avi_1925F TGTTYGTRTYTRYTGG	101_orthoreo_avi_2307R RTTYARGGKGGATTRGTR						
					101_orthoreo_avi_291F YAGYGGYRAARGAYGGV	101_orthoreo_avi_911R GGRAARGGAGTHGTDATG						
					101_orthoreo_avi_236F CATYRTNYTRTYCCYYC	101_orthoreo_avi_602R AAARCARCCRACRTAYACAC						
					101_orthoreo_avi_1671F RTTGGTGGYTRTYRTTY	101_orthoreo_avi_2121R GRTARTGYTGRAAGGGRG						
					REOL3F CAGTCGACACATTTGTGGTC	REOL3R GCGTACTGACGTGGATCATA						
								101-U				
dsRNA	Unassigned	Birnaviridae	102	Idnoreovirus								
			103	Dinovemavirus								
			104	Oryzavirus								
			105	Mycoreovirus								
			106	Avibirnavirus								
			107	Aquabimavirus								
			108	Blosnavirus								
			109	Entomobimavirus								
					Picobirnaviridae	110	110_picobirna_seg1_2222_F CCTCACCATCCATACCTTCTTC	110_picobirna_seg1_2513_R TAACGCACACACCCCA	110205			
						110_picobirna_seg2_1130_F ACCATACCCTCTTAACCC	110_picobirna_seg2_1420_R CCATCTTCTCACCCCATAC					
(-)ssRNA	Mononegavirales	Bornaviridae	111	Bornavirus	BDV A1 GTCACGGCGATATGTTTC	BDV D1 CTTCTTACTCCAGTAAACGC	111					
					ABV-NF CATGAGGCTATWGATTGGATTA	ABV-NR TAGCCNGCCMKTGTWGGRTTYT						
		Rhabdoviridae	112	Vesiculovirus	112_vesic2_1_6403F CATTGATTATGAGAAATGGAAC	112_vesic2_1_6939R AARATGGGAYTTTCCATAAT						
					112_vesic2_2_5767F TAGTGATTGGCWAGRATTGTA	112_vesic2_2_6432R TGATGRTTGTTCATTTCTCAT						
					112_vesic4_1_6597F TCACCAGCGGAAAGAAATCCAA	112_vesic4_1_7160R CATGTSACTCKAGACATCTTT						
					112_vesic4_2_6596F ATCACCGAGCGAAAGAAATCCAA	112_vesic4_2_7160R CATGTSACTCKAGACATCTTT						
					112_vesic1_1_138F GAATATCCAGCTGAYTACTTCA	112_vesic1_1_681R TYTTGAACATGTGGAAGAACAT						
					112_vesic1_2_138F GAATATCCAGCTGAYTACTTCA	112_vesic1_2_686R ATGYTTYTTGAACATGTGGAAG						

表 1-3-5 multiplex PCR-NGS 法に使用したプライマー (5)

Genome	order	family	subfamily	Genus No.	genus	プライマー配列F	プライマー配列R	primer Mix No.
				113	Ephemerovirus	113_ephem2_1_9589F AAGTCATTOMTATGATAGATCA 113_ephem2_2_9589F AAGTCATTOMTATGATAGATCA 113_ephem1_1_9543F TTGATATWCKKGATATGATTGA 113_ephem1_2_9543F TTGATATWCKKGATATGATTGA	113_ephem2_1_10017R TTATTCACCTTCTCATAATCCA 113_ephem2_2_10016R TATTCACCTTCTCATAATCCAA 113_ephem1_1_10019R ARTTATTCACCTTCTCATAATC 113_ephem1_2_10021R ATARTTATTCACCTTCTCATAA	113
				114	Sigmavirus	.	.	.
				115	Tibrovirus	.	.	.
				116	Tupavirus	.	.	.
				117	Perhabdovirus	.	.	.
				118	Sprivirus	.	.	.
				119	Cytorhabdovirus	.	.	.
				120	Lyssavirus	120_lyssa2_1_10242F AGGACRARATGGTTRGATCAAG 120_lyssa2_2_10242F AGGACRARATGGTTRGATCAAG 120_lyssa9_1_7264F TGGAYTAYGAGAAGTGAACAA 120_lyssa9_2_7287F ACTCYAGAGTGACYTATGCTTT 120_lyssa6_1_655F AATTGGAGYACAATCCAAACT 120_lyssa6_2_656F ATTGGAGYACAATCCAAACT 120_lyssa1_1_8361F ATHAGGAAGGCYYTKATGATG 120_lyssa1_2_8362F THAGGAAGGCYYTKATGATGA	120_lyssa2_1_10650R ARGCCATSARRTCATTACCTC 120_lyssa2_2_10651R GARGCCATSARRTCATTACCTC 120_lyssa9_1_7849R ACTCTYGCCCATCTYTTAGACT 120_lyssa9_2_7899R ACTCTYGCCCATCTYTTAGACT 120_lyssa6_1_1229R ACWGTTCATCATCWGCCAATG 120_lyssa6_2_1229R ACWGTTCATCATCWGCCAATG 120_lyssa1_1_8975R ATGRACATTKGTSACYTTCTCC 120_lyssa1_2_8975R ATGRACATTKGTSACYTTCTCC	120-1 120-2
				121	Novirhabdovirus	.	.	.
				122	Nucleorhabdovirus	.	.	.
(-)ssRNA		Filoviridae		123	Cuevavirus	123_cueva_4330_F CAGGAAGAAGCACAAGGGC 123_cueva_9194_F CCCAAGGCAAGGTTCAAACG	123_cueva_5076_R GCAGCACCTTGTGTTGGAG 123_cueva_10115_R TGTTCTGTTGTCGGATCGGT	123129
				124	Ebolavirus	124_ebola3_1_13434F GGTGAGAATGCYACTGTTAGAG 124_ebola3_2_12772F ATMATCTTTGARACATTTGTG 124_ebola1_1_3629F CAACCACCACCTGGACCATCAC 124_ebola1_2_3632F CCACCACCTGGACCATCACTTT 125_marbu1_1_1480F AATGATCCATTGGACTGCTGA 125_marbu1_2_1474F GACTTGAATGATCCATTTGGAC	124_ebola3_1_13809R GATTRTCAACCATTACCGAGA 124_ebola3_2_13512R AATAAAGGAGCTGAAACTCA 124_ebola1_1_4034R TGTCACCWCGAGAGCGGATGTG 124_ebola1_2_4035R ATGTCACCWCGAGAGCGGATGT 125_marbu1_1_1876R CACCATYTACATCACCAATACT 125_marbu1_2_1876R CACCATYTACATCACCAATACT	124 125127
			Paramyxoviridae	126	Aquaparamyxovirus	.	.	.
				127	Avulavirus	127_avula1_1_10787F CCATYAGTGCAGACACTTCTT 127_avula1_2_11142F YAACCTTCAACTCAAGGCTC	127_avula1_1_11552R AGCCCTGAATTTGCTTTCTCC 127_avula1_2_11552R AGCCCTGAATTTGCTTTCTCC	125127
				128	Ferlavirus	.	.	.
				129	Henipavirus	129_henip1_1_14777F TTGACAGGTGCYAGAGAGGAAA 129_henip1_2_14782F AGGTGCYACAGAGGAAATGCT	129_henip1_1_15360R ARGTACCAAGCYTCATAACCAAC 129_henip1_2_15360R ARGTACCAAGCYTCATAACCAAC	129
				130	Morbillivirus	130_morbi2_1_836F CCMGGGAACAAACCYAGGATTG 130_morbi2_2_836F CCMGGGAACAAACCYAGGATTG 130_morbi4_1_2135F TCATGTTTATGATCACAGCGGT 130_morbi4_2_2184F GACTCTATCMTGGTTCAATCAG 130_morbi1_1_11031F AGTAYTGCCTGAATGGAGATA 130_morbi1_2_11031F AGTAYTGCCTGAATGGAGATA	130_morbi2_1_1223R CTGAYCTCCTACCATCTCTTG 130_morbi2_2_1227R CCTGCGWATCTYCTGACCATCT 130_morbi4_1_2758R ATGTCTTGGAYATCSGAGAAACA 130_morbi4_2_2758R ATGTCTTGGAYATCSGAGAAACA 130_morbi1_1_11621R CATCYACTATTGTTCTGACCA 130_morbi1_2_11622R TCATCYACTATTGTTCTGACC	130-1 130-2
				131	Respirovirus	131_respi4_1_880F YCGATYGTGGGAAYTACATC 131_respi4_2_881F CAGATTGWGGRRAAYTACATCA 131_respi1_1_10207F ATATGAAAGYAAAGCATTTATC 131_respi1_2_10204F TYTATATGAAAGYAAAGCATTTATC	131_respi4_1_1203R AACATTTOMATATCCAGATAWG 131_respi4_2_1203R AACATTTOMATATCCAGATAWG 131_respi1_1_10636R GAATTTATGTAYAYTTCATTAT 131_respi1_2_10636R GAATTTATGTAYAYTTCATTAT	131
				132	Rubulavirus	132_rubul3_1_152F ACTGTGCAAGGATGCTTCCGGT 132_rubul3_2_154F TGTGCAAGGATGCTTCCGGT 132_rubul1_1_10404F AAGCTTYGATKCGWACCCGAGT 132_rubul1_2_10404F AAGCTTYGATKCGWACCCGAGT	132_rubul3_1_971R AARAATGCACTCATCCGGGAT 132_rubul3_2_971R AARAATGCACTCATCCGGGAT 132_rubul1_1_10794R CTCYTTGAACARCTTSCCTGACA 132_rubul1_2_10792R CYTTGAACARCTTSCCTGACG	132
				133	TPMV-like viruses	.	.	.
			Pneumovirinae	134	Metapneumovirus	134_metaneomo_1890_F RGAYGCAATGRTWGSWTRAGR	134_metaneumo_2317_R GGWGGTGRITGGYYTGR	
				135	Pneumovirus	135_pneum4_1_11860F ACCATAGTGATTACCACTACTAA 135_pneum4_2_11860F ACCATAGTGATTACCACTACTAA 135_pneum1_1_10177F CTYAGTGTAGTATGATGTTTG 135_pneum1_2_13275F TTGGTGWGTYAATAGATTAT	135_pneum4_1_12669R CTGTTTACTACTCAGAAACATC 135_pneum4_2_12201R CAATAATGAGTCTATGTTTGACA 135_pneum1_1_10640R TODATACCACCCATATGATATC 135_pneum1_2_14075R CTTARAAYTCAATWGGTAAAC	134135

表 1-3-6 multiplex PCR-NGS 法に使用したプライマー (6)

Genome	order	family	subfamily	Genus No.	genus	プライマー配列F		プライマー配列R		primer Mix No.
	Unassigned	Orthomyxoviridae		136	Influenza virus A	136_inflA1-3_1016_F	AYGAYRGMWCHRCARTWGYVR	136_inflA1-3_1395_R	ACYWKWDYRCCACAAAACACA	136137
						136_inflA4-6_756_F	CCRCTRTAHCCWSWCCAVTCAK	136_inflA4-6_1249_R	ACYGATGGVYCDRSYRMTGGR	
				137	Influenza virus B	137_inflB_seg3_491_F	AGGAAGGAAAAAGGAGAG	137_inflB_seg3_859_R	CAGACATGAGGAGAAAGG	
						137_inflB_seg6_706_F	CACACACATCCTAAGAACACA	137_inflB_seg6_1290_R	AGCCAAAAGAATACCAACCA	138160
				138	Influenza virus C	138_influC_1274_F	ACGCCCTGCAACAATAA	138_influC_seg1_2206_R	GCCCAATCCCACATCAA	
						138_influC_seg2_293_F	AGAAAAAATGGGGGAAGG	138_influC_seg2_860_R	GGCATTGAGAGAAGTAAACAG	
				139	Isavirus					
				140	Quarantivirus					
(-)ssRNA				141	Thogotovirus	141_thogoto_seg3_1027F	GGGTAGAGGAAGAGATGG	141_thogoto_seg3_1535_R	GTAATTGATGCTGGCTGT	141142143
						141_thogoto_seg4_708_F	AGGAGAAAGGAAGACCAAGA	141_thogoto_seg4_1346_R	ACCACAAAAGACCAACCA	
	Unassigned	Bunyaviridae		142	Hantavirus	142_hanta_583_F	GYMVRMGDWMHSMDDGGBTHGT	142_hanta_1054_R	KRKRHHGGWGHHTCWGDDDBW	144-1
				143	Nairovirus	143_nairo_L_4964_F	CAGGCYTKAMYBTWGYTYWYGR	143_nairo_L_5480_R	ARDARYCGCAGCWTSCKKBTMK	
				144	Orthobunyavirus	144_ortho3_1_2628F	GCAAACCCAGAATTTGTTGATG	144_ortho3_1_3424R	GTRTAATFRAGATTCCTTGCA	144-2
						144_ortho3_2_2626F	GCAAACCCAGAATTTGTTGATG	144_ortho3_2_3115R	TATAYGTGATCATATGGCTTGC	
						144_ortho2_1_3147F	AAATAAATGCAGACATGTCAA	144_ortho2_1_3671R	TATATGTTTTTTTCATRTTTCG	145-1
						144_ortho2_2_3146F	GAATAAATGCAGACATGTCAA	144_ortho2_2_3671R	TATATGTTTTTTTCATRTTTCG	
						144_ortho4_1_3164F	MWTGGGWTGYGAAGAATGGGG	144_ortho4_1_3551R	GCATGACAAATATAATCAAAAT	145-2
						144_ortho4_2_3164F	MWTGGGWTGYGAAGAATGGGG	144_ortho4_2_3552R	TGCATGACAAATATAATCAAAAT	
						144_ortho1_1_159F	YYGYTAGAGTCTTCTCCTCAA	144_ortho1_1_629R	GAGTCATCCAYTSTTCWGCAGT	145-1
						144_ortho1_2_137F	TGTTGYTAGAGTCTTCTCCTC	144_ortho1_2_609R	GAGTCATCCAYTSTTCWGCAGT	
				145	Phlebovirus	145_phleb3_1_2502F	ATGAYGTGCTTGCAGAAGCAA	145_phleb3_1_3289R	ATTGGAACCTCTAGCCCGAAG	145-1
						145_phleb3_2_2502F	ATGAYGTGCTTGCAGAAGCAA	145_phleb3_2_3285R	GAACTCTAGCCCGAAGACTA	
						145_phleb2_1_50F	TTAAGGAGTTCGGTGAGACAT	145_phleb2_1_566R	TGGGTGAAGTGAATGCCAGA	145-2
						145_phleb2_2_44F	ATATCCTTAAGGAGTTCGGTGA	145_phleb2_2_566R	TGGGTGAAGTGAATGCCAGA	
						145_phleb4_1_2622F	GGARGAGTTGAAGAATCTCGC	145_phleb4_1_3039R	AGTGGTGAATGSCCTTGGTTC	147157
						145_phleb4_2_3151F	AACAGCATTGCAAGCATAAAG	145_phleb4_2_3592R	TGAAYTCTGARTTGATTTCACA	
						145_phleb1_1_2305F	ATAAAGAAGAARACWGAGCC	145_phleb1_1_3024R	TTGTWACAAARTGGCCTTGGTT	
						145_phleb1_2_2305F	ATAAAGAAGAARACWGAGCC	145_phleb1_2_3025R	TTGTWACAAARTGGCCTTGGTT	
				146	Tospovirus					
	Unassigned	Arenaviridae		147	Arenavirus	147_arena_3865_F	TTHCCYCCAACYTYCTTTR	147_arena_4746_R	YRMYTCWGTWGCCARMTRWCW	
		Unassigned		148	Hepatitis D					
(+)ssRNA										
	Picornavirales	Picornaviridae		149	Aphthovirus	149_aphtho_3220_F	MMYSYKQWRTGGGATRYHGGVY	149_aphtho_3765_R	GGGGTGGTGGTAAAYTYD	149151
				150	Aquamavirus					
				151	Avihepatovirus	151_avihe1_1_608F	CTGGTCGAGTCCCACTACTAT	151_avihe1_1_1217R	GTGTRGTGCGSAGATCCAA	149151
						151_avihe1_2_608F	CTGGTCGAGTCCCACTACTAT	151_avihe1_2_1219R	CWGTGTRGTGCGSAGATCCAA	
				152	Avisivirus					
				153	Cardiovirus	153_cardi1_1_7665F	AGATTACWCCTGCYAACAAGAC	153_cardi1_1_8008R	TAAMRCGTTGGATCCGATCGA	153154155
						153_cardi1_2_7664F	AAGATTACWCCTGCYAACAAGAC	153_cardi1_2_8008R	TAAMRCGTTGGATCCGATCGA	
				154	Cosavirus	154_cosa_1930_F	ACHTCBCCYTYCAYDMNGN	154_cosa_2767_R	DGTCATKSYWGHTRYWGWGMN	156
				155	Dicipivirus	155_dicep1_1_867F	CAGTCGTAATGCGYAAGTCCAT	155_dicep1_1_1340R	TCAACAGCTGTATCRGTACTCC	
						155_dicep1_2_1319F	GGAGTACYGATACAGCTGTTGA	155_dicep1_2_1729R	CAGTGGTCTTCTYAACTTGGC	
				156	Enterovirus	156_enter2_1_31F	RGGGCCCACTGGCGYTAGTAC	156_enter2_1_613R	CCGCCTCCAACTTRCGGTTAC	156
						156_enter2_2_60F	CGYTAGWACCTTGTACGCGCTG	156_enter2_2_638R	CACGGRTACCGAAAGTAGTCT	
						156_enter1_1_63F	HRGTAMCYTTGTRCGCWRTT	156_enter1_1_553R	TTRGGATTAKCCRCATTGAGGG	
						156_enter1_2_62F	VHRGTACCYTTGTRCGCCTRTT	156_enter1_2_554R	GTTTRRRGTTAKCCRCATTGAGG	
				157	Erbovirus	157_erbov1_1_7886F	CATTGGTTGACCGCTTGGTTGC	157_erbov1_1_8568R	ACTCCAGCGGTCGAAGATGAAC	147157
						157_erbov1_2_7503F	TCATTGTTGACAGATTGGTA	157_erbov1_2_7895R	TGAACCAATGCCTAATCCATTG	
				158	Gallivirus					

表 1-3-7 multiplex PCR-NGS 法に使用したプライマー (7)

Genome	order	family	subfamily	Genus No.	genus	プライマー配列F	プライマー配列R	primer Mix No.				
(+)ssRNA				159	Hepatovirus	159 hepat3 1.338F 159 hepat3 2.337F 159 hepat2 1.5081F 159 hepat2 2.5081F 159 hepat1 1.1395F 159 hepat1 2.932F	CTCATATTGAGAGATACCTCCA ACTCATATTGAGAGATACCTCC AARAATGTTTMAAATGGATG AARAATGTTTMAAATGGATG AGGAATGAATTTMGAATTTCAA WACWGATGCTTTATTTTCATGAA	159 hepat3 1.1111R 159 hepat3 2.1111R 159 hepat2 1.5799R 159 hepat2 2.5805R 159 hepat1 1.2022R 159 hepat1 2.1416R	CACCTTRATYCTCACAACATTA CACCTTRATYCTCACAACATTA TCCACTTAGTAATTCCTTGAG GTGAATTCACCTTTAGTAATTC GACTTAATCTRTTGTATACAAA TTGAAATCKAAATTCATTCTC	159-1 159-2		
				160	Hunnivirus	160 hunni1 1.6889F 160 hunni1 2.6887F	TTGGATTTGATGATGTGGCCTT GCTTGGATTTGATGATGTGGCC	160 hunni1 1.7211R 160 hunni1 2.7213R	CCATTCAAAGGTCCACTCTTT GTCCATTCAAAGGTCCACTCT	138160		
				161	Kobuvirus	161 kobuv3 1.2037F 161 kobuv3 2.2037F 161 kobuv4 1.7597F 161 kobuv4 2.4951F 161 kobuv1 1.7120F 161 kobuv1 2.6715F	CAACACTGGAAGAYCCGGCCG CAACACTGGAAGAYCCGGCCG TCTGGACTACAAGTYTTTATGAT CCCGTGGTGTCTACCTCTACG GGTGGWCTCATYAGTACATGC TTCCTYAAACACAAYAAGGGAG	161 kobuv3 1.2716R 161 kobuv3 2.2713R 161 kobuv4 1.8041R 161 kobuv4 2.5346R 161 kobuv1 1.7694R 161 kobuv1 2.7249R	GCCTGTGGCTGGATGCCAAGG TGTGGCTGGATGCCAAGGAG TTTGAGGAAGGTGACTTCATAG GGTGACGTTGATCCGAGGTTGG GGCACRAACCARGTTTCAGAA ARTCCARATCAAAGACTTGAGG	161-1 161-2		
				162	Kunshagivirus							
				163	Megrivirus							
				164	Mischivirus	164 mischi.3949 F 164 mischi.1178 F	GCAAACAACCTCCGGGCAAT GTACCCCACTGCCCTTTCTC	164 mischi.4754 R 164 mischi.1956 R	GGTCCAAGCTTCGGAGTCAA CTGGGTGTTTATGGCCGAGT	164165		
				165	Mosavirus	165 mosav1 1.7723F 165 mosav1 2.7723F	GTCTGACTCRGACCAGCTCTAC GTCTGACTCRGACCAGCTCTAC	165 mosav1 1.8182R 165 mosav1 2.8180R	CGCGACACTCCCTACCTGTGCA CGACACTCCTCACCTTGTGAGG			
				166	Oscivirus							
				167	Parechovirus	167 parecho.593 F	DRWGGYYRGRATGWRCGSCY	167 parecho.1442 R	CCTGRGWGTYKYKGYRMRT			
				168	Pasivirus	168 pasiv1 1.4374F 168 pasiv1 2.5490F	TATACTACCAATGGTATGACT CTTTATGGYTTTGTGGAACAGG	168 pasiv1 1.4867R 168 pasiv1 2.6083R	GARTAACTGCTGGAATTCATTAT CARCAAATCTTCCAGTCAGCA	167168170		
				169	Passerivirus							
				170	Rosavirus	170 rosav1 1.6307F 170 rosav1 2.6628F	GCAATGCYCATGGCTTCAAAGA TGACCATGCCAGGTTATGGGG	170 rosav1 1.6645R 170 rosav1 2.7104R	AATAACCTGGCATGGTCACTGC GGTTCATGTCARGCCATCCAT	167168170		
				171	Sakobuvirus							
				172	Salivirus	172 saliv1 1.2282F 172 saliv1 2.2284F	CGGTGCRCAATTGGCTCGAGTA GTGCRCAATTGGCTCGAGTACG	172 saliv1 1.2610R 172 saliv1 2.2610R	GGTRGARTCGCATTACATCC GGTRGARTCGCATTACATCC	172173174		
				173	Sapelovirus	173 sapelo.7485 F	TGGTGATGGWDMWVWGGDTW	173 sapelo.8190 R	ATTGCAVCCMACHSMWVWCCW			
174	Senecavirus	174 senec1 1.3591F 174 senec1 2.3125F	GTTCARCAGACCTGGAGAAAGT CCAGGCTTCYAGGTTTGTCTAC	174 senec1 1.3914R 174 senec1 2.3914R	CCAGTCTTTGACTKTGTCCATG CCAGTCTTTGACTKTGTCCATG							
175	Sicivirus											
176	Teschovirus	176 tesch1 1.5121F 176 tesch1 2.5124F	AGAAYATAGTGGARATGACATA AYATAGTGGARATGACATATGA	176 tesch1 1.5719R 176 tesch1 2.5719R	AAARTCTGYTTTCTGCACATCA AAARTCTGYTTTCTGCACATCA	176177						
177	Tremovirus	177 tremo1 1.2448F 177 tremo1 2.4902F	CATCRGTRGGTGCCATTAGGTT CMTAYATYCTGATGCCATATCA	177 tremo1 1.3194R 177 tremo1 2.5399R	CCATCATYGTGTRGTCACTGGC TTGTGAYCACTCTRGAATTTGC							
(+)ssRNA	Unassigned	Dicistroviridae		178	Aparavirus							
				179	Cripavirus							
				180	Iflavivirus							
				Caliciviridae	181	Lagovirus	181 lagov1 1.1203F 181 lagov1 2.5275F	ATGAAGGGYGTGSSAAGCTCA RWTTTGTGAATGTTATGGAGGG	181 lagov1 1.1783R 181 lagov1 2.5959R	TTGTCACAGTTGAGDGGGCAGC ACRAACTCAAAGTCYTCACITG	181182	
					182	Nebovirus	182 nebov1 1.77F 182 nebov1 2.5638F	GGCTCCAGTGTGTTCCAGAGAT ACACCTGTGCGGTACAGTGCA	182 nebov1 1.535R 182 nebov1 2.6039R	TTGCCYTTGTAGGAGGTGTCAT CRTCCGGTTCRGTGCTGATTG		
					183	Norovirus	183 noro.1997 F 183 noro.5100 F	AATSMWCMWRSCCMGYSCOM GAYSMGYWGGTKSYAMGGYM	183 noro.2392 R 183 noro.5462 R	TWTGWRMCMYRMMYGYGGCK ATYSRCKYTTGRYGYWGGY	183184	
					184	Sapovirus	184 sapov1 1.13F 184 sapov1 2.269F	TGGCTTCAAAGCCATTCTACCC CACAACGTTCCTGTAGCTGTTT	184 sapov1 1.597R 184 sapov1 2.852R	TAACCACCTGACGCCACATGGC CTTCAAACARAGCAGTGACTGT		
					185	Vesivirus	185 vesiv5 1.1343F 185 vesiv5 2.1343F 185 vesiv3 1.3670F 185 vesiv3 2.4974F 185 vesiv1 1.4891F 185 vesiv1 2.4923F	WCYCTGOWACTCAGAAATGCT WCYCTGOWACTCAGAAATGCT YGCTGAAGCCGAGGAAAGGTT ACTTCTCWGMAATCATCCTAT AAATCYCAAATGTTGATTCGG ACTWAAATCAAACCAATTGGC	185 vesiv5 1.2014R 185 vesiv5 2.2010R 185 vesiv3 1.4052R 185 vesiv3 2.5544R 185 vesiv1 1.5372R 185 vesiv1 2.5362R	CTCATCAATGATGAAACCTGG TCAATGATGCAAACCTCGTTGC CRTACGGTAAWCCGACGACTCC AAGAGACASACATTCCAGAGTT TTYTCYGTGTTGATRTAGTAGA TGATRTAGTAGAATGCCGAAT	185-1 185-2	

表 1-3-8 multiplex PCR-NGS 法に使用したプライマー (8)

Genome	order	family	subfamily	Genus No.	genus	プライマー配列F	プライマー配列R	primer Mix No.										
Unassigned	Hepeviridae			186	Orthohepevirus	186_orthohepe_5604_F 186_orthohepe_4596_F	186_orthohepe_5932_R 186_orthohepe_5061_R	186187										
				187	Avastrovirus	187_avast1_1_5384F 187_avast1_2_5385F	187_avast1_1_5948R 187_avast1_2_5948R											
	Astroviridae				188	Mamastrovirus	188_mamas5_1_3611F 188_mamas5_2_3611F 188_mamas3_1_3432F 188_mamas3_2_3432F 188_mamas7_1_4388F 188_mamas7_2_4388F 188_mamas4_1_3363F 188_mamas4_2_3362F	188_mamas5_1_4091R 188_mamas5_2_4092R 188_mamas3_1_4060R 188_mamas3_2_4052R 188_mamas7_1_4813R 188_mamas7_2_4814R 188_mamas4_1_4025R 188_mamas4_2_4030R	188-1 188-2 188-3									
					188	Mamastrovirus	188_mamas1_1_3470F 188_mamas1_2_3470F 188_mamas8_1_3257F 188_mamas8_2_3257F	188_mamas1_1_3946R 188_mamas1_2_3947R 188_mamas8_1_3649R 188_mamas8_2_3654R										
					189	Betanodavirus												
					190	Alphanodavirus	190_alpha2_1_668F 190_alpha2_2_668F 190_alpha1_1_246F 190_alpha1_2_246F	190_alpha2_1_1014R 190_alpha2_2_1013R 190_alpha1_1_834R 190_alpha1_2_718R		190								
					Nidovirales	Coronaviridae	Coronavirinae			191	Alphacoronavirus	191_alpha5_1_9997F 191_alpha5_2_11208F 191_alpha16_1_14781F 191_alpha16_2_14781F	191_alpha5_1_10622R 191_alpha5_2_11830R 191_alpha16_1_15205R 191_alpha16_2_15301R	191-1 191-2				
										192	Betacoronavirus	191_alpha1_1_17260F 191_alpha1_2_17260F 192_betac1_1_14919F 192_betac1_2_14919F 192_betac1_3_14919F 192_betac2-1_26701F 192_betac2_2_26701F 192_betac2_3_26378F	191_alpha1_1_17923R 191_alpha1_2_17922R 192_betac1_1_15227R 192_betac1_2_15229R 192_betac1_3_15228R 192_betac2-1_26829R 192_betac2_2_26830R 192_betac2_3_26846R	192-1 192-2				
										193	Deltacoronavirus	193_delta1_1_12332F 193_delta1_2_12332F 193_delta1_3_12332F 193_delta2_1_17280F 193_delta2_2_17280F 193_delta2_3_17280F	193_delta1_1_12708R 193_delta1_2_12707R 193_delta1_3_12696R 193_delta2_1_17399R 193_delta2_2_17400R 193_delta2_3_17397R	193-1 193-2				
										194	Gammacoronavirus	194_gamma1_1_15012F 194_gamma1_2_15690F	194_gamma1_1_15711R 194_gamma1_2_16087R	194				
										Arteriviridae Mesoniviridae Roniviridae				195	Bafinivirus			
														196	Torovirus	196_torov1_1_9844F 196_torov1_2_16354F	196_torov1_1_10389R 196_torov1_2_16784R	196197
	197	Arterivirus	197_arteri_8645_F	197_arteri_8969_R														
	198	Alphamesonivirus																
	199	Okavirus																

表 1-3-9 multiplex PCR-NGS 法に使用したプライマー (9)

Genome	order	family	subfamily	Genus No.	genus	プライマー配列F	プライマー配列R	primer Mix No.			
Unassigned	Flaviviridae			200	Hepacivirus	200 hepac1_1_145F 200 hepac1_2_283F	GTGTKGGGAACCGGTGAGTACA YGGTACTGCCTGATAGGGTCT	200 hepac1_1_725R 200 hepac1_2_725R	CGCABGTHAGGGTATSGATGAC CGCABGTHAGGGTATSGATGAC	200202	
					201	Flavivirus	201 flavii0_1_8985F	GCCATMTGGTAYATGTGGCTTG	201 flavii0_1_9568R		ACCACRCAGTCATCWCCACTGA
				201 flavii0_2_8926F			ACATGATGGGAAAGMGAGAGAA	201 flavii0_2_9568R	ACCACRCAGTCATCWCCACTGA		
				201 flavii2_1_9031F			ABTGYGTGACAWCATGATGGG	201 flavii2_1_9751R	TTNGCCATGTGCTTSAAGRAAGT		
				201 flavii2_2_9079F			GYMGGGOMATYTGTTACATGTG	201 flavii2_2_9753R	GCTCCCAITCBCCVATGTCCTT		
				201 flavii7_1_9150F			TYTGGTACATGTGGTTGGGAGC	201 flavii7_1_9569R	TRGTSAMGGTGTTCAGGGCATA		
				201 flavii7_2_9150F			TYTGGTACATGTGGTTGGGAGC	201 flavii7_2_9562R	GGTGTTCAGGGCATAWGTGACC		
				201 flavii14_1_9441F			CATYTCACGRGAAGACCAGAGA	201 flavii14_1_10075R	CYCCCTTWCATGGATGGACCA		
				201 flavii14_2_9441F			CATYTCACGRGAAGACCAGAGA	201 flavii14_2_10125R	AATCCACACSCGRTCCACACT		
				201 flavii6_1_8756F			ATGACWGAAYACRACCTCCATTTG	201 flavii6_1_9107R	TYTCTCTYTTKCCCATCATGTT		
				201 flavii6_2_8474F			TAYCATGGMAGCTATGAAGTGA	201 flavii6_2_8940R	TTYTCTCTYTTKCCCATCATGTT		
				201 flavii5_1_341F			AGAAAGACATCATCCAAGCCAT	201 flavii5_1_967R	TGTACARTGGTCCACAAATTC		
				201 flavii5_2_341F			AGAAAGACATCATCCAAGCCAT	201 flavii5_2_963R	CARTGGTCCACAAATTCCTCT		
				201 flavii8_1_8622F			CARAGRGTGTTAAAGAGAAAG	201 flavii8_1_9064R	GASACCCAGTGRCTTCATTTA		
				201 flavii8_2_8623F			ARAGRGTGTTAAAGAGAAAGT	201 flavii8_2_9064R	GASACCCAGTGRCTTCATTTA		
				202			Pegivirus	202 pegiv1_1_7791F	TGTAAGRCCACATGCTGCCATG	202 pegiv1_1_8186R	GTKATRCTACTRCCGAAGCAGG
								202 pegiv1_2_7790F	CTGTAAAGRCCACATGCTGCCAT	202 pegiv1_2_8186R	GTKATRCTACTRCCGAAGCAGG
				203			Pestivirus	203 pesti5_1_10691F	ACAGCAATACCAAGAATGAGA	203 pesti5_1_11129R	TMCCCTCTYTGCCCTTKTCTTAT
								203 pesti5_2_10688F	GAAACAGCAATACCAAGAATG	203 pesti5_2_11129R	TMCCCTCTYTGCCCTTKTCTTAT
					203 pestii1_1_365F	CTCTGCTGTACATGGMACATGG		203 pestii1_1_1438R	GTTRCACCWCCRTGYTTGTTC		
203 pestii1_2_365F	CTCTGCTGTACATGGMACATGG	203 pestii1_2_1380R	GTCTTYTCACTHGORTCCATCA								
Unassigned	Togaviridae		204	Alphavirus	204 alpha2_1_2266F	AGYGGAAARAAGAAAAGCTGYC	204 alpha2_1_2783R	GCRGWGCTGTGATGACYTCGT			
					204 alpha2_2_2306F	AGYGGAAARAAGAAAAGCTGYC	204 alpha2_2_2832R	GCWGTGTGATGACYTCGKTC			
					204 alpha9_1_7904F	ATGAAACCCWGCACCGTGAAG	204 alpha9_1_8249R	CCATRTCTTTGTTCCAGGTGAC			
					204 alpha9_2_7803F	GTCACCTGGTACGCCCTGCCTGG	204 alpha9_2_8184R	CCATRTCTTTGTTCCAGGTGAC			
					204 alpha11_1_2839F	ACAACGAGCTCATGACTGCGGC	204 alpha11_1_3266R	AGCCGAATGCGGCTTGCCTCT			
					204 alpha11_2_2074F	TCTACTACAAGCTTGTGGAGCC	204 alpha11_2_2587R	TGTTGACACATCCGACTTGTG			
					204 alpha4_1_134F	AGCAGGTCAACWCKAATGACCA	204 alpha4_1_925R	TSCCSGGCTBATKGTGATCTT			
					204 alpha4_2_136F	TCACWCKAATGACCATGCTAA	204 alpha4_2_577R	TCGAATCCTATCCARTAYACTG			
					204 alpha1_1_149F	ATGACCAYGCYAATGCBAGAGC	204 alpha1_1_644R	TCRTKGCCTARTKGTGTTGT			
					204 alpha1_2_149F	ATGACCAYGCYAATGCBAGAGC	204 alpha1_2_643R	CRCTKGCCTARTKGTGTTGT			
					205	Rubivirus	205 rubiv1_1_1055F	CCTAYTGCAAGACCCTGAGCC	205 rubiv1_1_1384R	CGTCTGYTCCACTCCTCCAT	
							205 rubiv1_2_5747F	CYTGGCCGAAGACTACCGCGC	205 rubiv1_2_6548R	TGGAGTCTCCATRTGATGG	

※表中網掛け部分はプライマー設計対象外ウイルス属を示す。

表 1-4-1 multiplex PCR-NGS 法におけるマッピング参照配列 (1)

No.	Accession No.										
1	NC_006573.1	66	NC_004905.2	131	NC_006311.1	196	NC_022037.1	261	NC_009489.1	326	NC_012802.1
2	NC_006572.1	67	NC_007380.1	132	NC_006310.1	197	NC_009895.1	262	NC_007620.1	327	NC_012801.1
3	NC_013058.1	68	NC_007381.1	133	NC_006309.1	198	NC_009894.1	263	NC_006430.1	328	NC_012798.1
4	NC_013057.1	69	NC_007382.1	134	NC_006308.1	199	NC_009896.1	264	NC_006428.1	329	NC_025961.1
5	NC_018711.1	70	NC_007361.1	135	NC_006307.1	200	NC_005777.1	265	NC_004074.1	330	NC_012800.1
6	NC_018710.1	71	NC_007370.1	136	NC_006306.2	201	NC_005776.1	266	NC_002200.1	331	NC_011550.1
7	NC_028245.1	72	NC_007366.1	137	NC_009528.2	202	NC_004110.1	267	NC_006508.1	332	NC_011549.1
8	NC_025407.1	73	NC_007367.1	138	NC_006429.1	203	NC_004109.1	268	NC_006507.1	333	NC_016992.1
9	NC_025390.1	74	NC_007372.1	139	NC_025408.1	204	NC_004108.1	269	NC_006506.1	334	NC_016991.1
10	NC_025374.1	75	NC_007369.1	140	NC_025385.1	205	NC_014395.1	270	NC_006504.1	335	NC_016990.1
11	NC_025373.1	76	NC_007374.1	141	NC_025377.1	206	NC_014396.1	271	NC_006496.1	336	NC_016996.1
12	NC_025363.1	77	NC_007368.1	142	NC_025365.1	207	NC_014397.1	272	NC_006495.1	337	NC_009995.1
13	NC_025361.1	78	NC_007373.1	143	NC_025251.1	208	NC_006319.1	273	NC_028255.1	338	NC_016994.1
14	NC_025349.1	79	NC_007378.1	144	NC_020810.1	209	NC_006320.1	274	NC_025394.1	339	NC_016993.1
15	NC_025347.1	80	NC_007377.1	145	NC_020809.1	210	NC_006318.1	275	NC_025392.1	340	NC_021178.1
16	NC_019531.1	81	NC_007376.1	146	NC_020808.1	211	NC_005214.1	276	NC_025378.1	341	NC_008714.1
17	NC_005036.1	82	NC_007375.1	147	NC_020807.1	212	NC_027203.1	277	NC_025364.1	342	NC_003988.1
18	NC_003043.1	83	NC_007363.1	148	NC_018629.1	213	NC_027202.1	278	NC_025353.1	343	NC_001430.1
19	NC_002617.1	84	NC_007362.1	149	NC_009527.1	214	NC_027201.1	279	NC_025255.1	344	NC_001859.1
20	NC_016144.1	85	NC_007360.1	150	NC_003243.1	215	NC_027142.1	280	NC_024473.1	345	NC_024073.1
21	NC_002549.1	86	NC_007359.1	151	NC_001542.1	216	NC_027141.1	281	NC_022755.1	346	NC_021220.1
22	NC_014373.1	87	NC_007358.1	152	NC_024781.1	217	NC_027140.1	282	NC_020806.1	347	NC_013695.1
23	NC_014372.1	88	NC_007364.1	153	NC_001608.3	218	NC_022632.1	283	NC_020805.1	348	NC_010415.1
24	NC_006432.1	89	NC_004907.1	154	NC_007652.1	219	NC_024496.1	284	NC_001560.1	349	NC_009996.1
25	NC_004161.1	90	NC_004906.1	155	NC_004148.2	220	NC_024495.1	285	NC_004142.1	350	NC_004441.1
26	NC_028246.1	91	NC_002023.1	156	NC_028249.1	221	NC_024494.1	286	NC_002691.1	351	NC_001617.1
27	NC_028241.1	92	NC_002022.1	157	NC_006383.2	222	NC_023635.1	287	NC_002037.1	352	NC_001612.1
28	NC_028239.1	93	NC_002021.1	158	NC_025264.1	223	NC_023634.1	288	NC_001411.2	353	NC_001490.1
29	NC_025400.1	94	NC_002020.1	159	NC_001498.1	224	NC_023633.1	289	NC_004144.1	354	NC_001472.1
30	NC_025396.1	95	NC_002019.1	160	NC_006296.2	225	NC_022631.1	290	NC_004145.1	355	NC_002058.3
31	NC_025358.1	96	NC_002018.1	161	NC_005283.1	226	NC_022630.1	291	NC_004146.1	356	NC_003983.1
32	NC_017685.1	97	NC_002017.1	162	NC_001921.1	227	NC_015452.1	292	NC_003692.1	357	NC_001451.1
33	NC_017714.1	98	NC_002016.1	163	NC_004159.1	228	NC_015451.1	293	NC_003691.1	358	NC_010800.1
34	NC_002526.1	99	NC_004911.1	164	NC_004158.1	229	NC_015450.1	294	NC_002690.1	359	NC_010646.1
35	NC_005236.1	100	NC_004908.1	165	NC_004157.1	230	NC_015413.1	295	NC_004004.1	360	NC_028981.1
36	NC_005228.1	101	NC_004912.1	166	NC_025833.1	231	NC_015412.1	296	NC_010354.1	361	NC_028366.1
37	NC_005226.1	102	NC_004910.1	167	NC_025832.1	232	NC_015411.1	297	NC_003982.1	362	NC_028365.1
38	NC_005217.1	103	NC_004909.1	168	NC_025831.1	233	NC_015374.1	298	NC_012437.1	363	NC_028364.1
39	NC_005216.1	104	NC_026438.1	169	NC_005301.3	234	NC_015373.1	299	NC_005790.1	364	NC_028363.1
40	NC_005215.1	105	NC_026437.1	170	NC_005300.2	235	NC_015375.1	300	NC_003790.1	365	NC_027818.1
41	NC_005224.1	106	NC_026436.1	171	NC_005302.1	236	NC_005221.1	301	NC_002470.1	366	NC_001489.1
42	NC_005223.1	107	NC_026435.1	172	NC_005775.1	237	NC_005220.1	302	NC_008250.2	367	NC_025675.1
43	NC_003466.1	108	NC_026434.1	173	NC_001927.1	238	NC_018138.1	303	AC_000192.1	368	NC_018668.1
44	NC_005234.1	109	NC_026433.1	174	NC_001926.1	239	NC_018137.1	304	NC_026011.1	369	NC_027919.1
45	NC_005233.1	110	NC_026432.1	175	NC_001925.1	240	NC_018136.1	305	NC_006577.2	370	NC_027918.1
46	NC_005235.1	111	NC_026431.1	176	NC_024076.1	241	NC_025344.1	306	NC_003045.1	371	NC_027054.1
47	NC_005227.2	112	NC_026429.1	177	NC_024075.1	242	NC_006579.1	307	NC_025217.1	372	NC_023422.1
48	NC_010708.1	113	NC_026428.1	178	NC_024074.1	243	NC_001989.1	308	NC_019843.3	373	NC_011829.1
49	NC_010707.1	114	NC_026427.1	179	NC_022597.1	244	NC_001803.1	309	NC_022643.1	374	NC_016769.1
50	NC_010704.1	115	NC_026426.1	180	NC_022596.1	245	NC_001781.1	310	NC_005147.1	375	NC_015936.1
51	NC_006437.1	116	NC_026425.1	181	NC_022595.1	246	NC_028362.1	311	NC_012936.1	376	NC_004421.1
52	NC_006435.1	117	NC_026424.1	182	NC_018478.1	247	NC_001796.2	312	NC_010327.1	377	NC_001918.1
53	NC_006433.1	118	NC_026423.1	183	NC_018477.1	248	NC_025402.1	313	NC_009021.1	378	NC_011704.1
54	NC_005238.1	119	NC_026422.1	184	NC_018476.1	249	NC_003461.1	314	NC_009020.1	379	NC_001543.1
55	NC_005237.1	120	NC_007371.1	185	NC_018467.1	250	NC_002161.1	315	NC_009019.1	380	NC_002615.1
56	NC_005225.1	121	NC_007357.1	186	NC_018466.1	251	NC_001552.1	316	NC_008315.1	381	NC_027711.1
57	NC_005222.1	122	NC_002207.1	187	NC_018465.1	252	NC_003443.1	317	NC_007732.1	382	NC_013443.1
58	NC_005219.1	123	NC_002204.1	188	NC_018464.1	253	NC_025410.1	318	NC_004718.3	383	NC_026814.1
59	NC_005218.1	124	NC_002211.1	189	NC_018463.1	254	NC_025404.1	319	NC_001846.1	384	NC_004579.1
60	NC_003468.2	125	NC_002210.1	190	NC_018462.1	255	NC_025403.1	320	NC_017083.1	385	NC_001943.1
61	NC_003467.2	126	NC_002209.1	191	NC_018461.1	256	NC_025350.1	321	NC_001366.1	386	NC_024701.1
62	NC_025352.1	127	NC_002208.1	192	NC_018460.1	257	NC_025348.1	322	NC_009448.2	387	NC_025379.1
63	NC_025351.1	128	NC_002206.1	193	NC_018459.1	258	NC_025343.1	323	NC_010810.1	388	NC_025346.1
64	NC_001906.3	129	NC_002205.1	194	NC_022039.1	259	NC_021928.1	324	NC_001479.1	389	NC_024472.1
65	NC_002728.1	130	NC_006312.1	195	NC_022038.1	260	NC_009640.1	325	NC_023984.1	390	NC_024297.1

表 1-4-2 multiplex PCR-NGS 法におけるマッピング参照配列 (2)

No.	Accession No.										
391	NC_023675.1	456	NC_022103.1	521	NC_001437.1	586	NC_002685.2	651	AC_000001.1	716	NC_026012.1
392	NC_023674.1	457	NC_003436.1	522	NC_012932.1	587	NC_001813.1	652	NC_022266.1	717	NC_001515.2
393	NC_023632.1	458	NC_023760.1	523	NC_021069.1	588	NC_000899.1	653	NC_021168.1	718	NC_010277.2
394	NC_023631.1	459	NC_018871.1	524	NC_023439.1	589	NC_001720.1	654	NC_020485.1	719	NC_001663.2
395	NC_023630.1	460	NC_002306.3	525	NC_023424.1	590	NC_024486.1	655	NC_016895.1	720	NC_025892.1
396	NC_023629.1	461	NC_009657.1	526	NC_018705.3	591	NC_014564.2	656	NC_015932.1	721	NC_025899.1
397	NC_022249.1	462	NC_010438.1	527	NC_009029.2	592	NC_024474.1	657	NC_015225.1	722	NC_025898.1
398	NC_019494.1	463	NC_010437.1	528	NC_015843.2	593	AC_000014.1	658	NC_014899.1	723	NC_025897.1
399	NC_016896.1	464	NC_010436.1	529	NC_009028.2	594	AC_000013.1	659	NC_017825.1	724	NC_025896.1
400	NC_002469.1	465	NC_009988.1	530	NC_009026.2	595	NC_022613.1	660	NC_010956.1	725	NC_025895.1
401	NC_023987.1	466	NC_005831.2	531	NC_008604.2	596	NC_022612.1	661	NC_006879.1	726	NC_025894.1
402	NC_007916.1	467	NC_002645.1	532	NC_007580.2	597	NC_012221.1	662	AC_000020.1	727	NC_025868.1
403	NC_004064.1	468	NC_013528.1	533	NC_008718.1	598	NC_017979.1	663	AC_000019.1	728	NC_025811.1
404	NC_008311.1	469	NC_012561.1	534	NC_008719.1	599	NC_015323.1	664	AC_000018.1	729	NC_019854.2
405	NC_001959.2	470	NC_018615.1	535	NC_016997.1	600	NC_014969.1	665	AC_000017.1	730	NC_019858.1
406	NC_003976.2	471	NC_016960.1	536	NC_006947.1	601	NC_008210.1	666	AC_000011.1	731	NC_019857.1
407	NC_001897.1	472	NC_016962.1	537	NC_006551.1	602	NC_008211.1	667	AC_000010.1	732	NC_019856.1
408	NC_021482.1	473	NC_016961.1	538	NC_005064.1	603	NC_027016.1	668	AC_000008.1	733	NC_019855.1
409	NC_018226.1	474	NC_003908.1	539	NC_005062.1	604	NC_012783.2	669	AC_000007.1	734	NC_019853.1
410	NC_024070.1	475	NC_003900.1	540	NC_005039.1	605	NC_016448.1	670	AC_000006.1	735	NC_019851.1
411	NC_025114.1	476	NC_003899.1	541	NC_004355.1	606	NC_006273.2	671	AC_000003.1	736	NC_019850.1
412	NC_012957.1	477	NC_003215.1	542	NC_004119.1	607	NC_003521.1	672	NC_003266.2	737	NC_025380.1
413	NC_012986.1	478	NC_001786.1	543	NC_003690.1	608	NC_016447.1	673	NC_006144.1	738	NC_018102.1
414	NC_006553.1	479	NC_001449.1	544	NC_003687.1	609	NC_006150.1	674	NC_001876.1	739	NC_023845.1
415	NC_004451.1	480	NC_024887.1	545	NC_003635.1	610	NC_006623.1	675	NC_001734.1	740	NC_023008.1
416	NC_003987.1	481	NC_023812.1	546	NC_017086.1	611	NC_005264.1	676	NC_001460.1	741	NC_022519.1
417	NC_027026.1	482	NC_016959.1	547	NC_026797.1	612	NC_007605.1	677	NC_001454.1	742	NC_020890.1
418	NC_017936.1	483	NC_006558.1	548	NC_021153.1	613	NC_004367.1	678	NC_001405.1	743	NC_004763.2
419	NC_006554.1	484	NC_004162.2	549	NC_004102.1	614	NC_009334.1	679	NC_019559.1	744	NC_019844.1
420	NC_006269.1	485	NC_003930.1	550	NC_024889.1	615	NC_006146.1	680	NC_027200.1	745	NC_020106.1
421	NC_010624.1	486	NC_003433.1	551	NC_025673.1	616	NC_007646.1	681	NC_004065.1	746	NC_013796.1
422	NC_000940.1	487	NC_003417.1	552	NC_025672.1	617	NC_002531.1	682	NC_002512.2	747	NC_020711.1
423	NC_011349.1	488	NC_001547.1	553	NC_009824.1	618	NC_024303.1	683	NC_026421.1	748	NC_020070.1
424	NC_003985.1	489	NC_001544.1	554	NC_009827.1	619	NC_024382.1	684	NC_001650.2	749	NC_020069.1
425	NC_003990.1	490	NC_001512.1	555	NC_009823.1	620	NC_024450.1	685	NC_025259.1	750	NC_020068.1
426	NC_027122.1	491	NC_003092.2	556	NC_009826.1	621	NC_013036.1	686	NC_026473.1	751	NC_020067.1
427	NC_011050.1	492	NC_001639.1	557	NC_009825.1	622	NC_002229.3	687	NC_028635.1	752	NC_020066.1
428	NC_001481.2	493	NC_001961.1	558	JQ814851.1	623	NC_002641.1	688	NC_028127.1	753	NC_020065.1
429	NC_004541.1	494	NC_002532.2	559	KT818608.1	624	NC_002577.1	689	NC_028123.1	754	NC_007611.1
430	NC_004542.1	495	NC_027999.1	560	NC_027998.1	625	NC_028113.1	690	NC_028122.1	755	NC_015150.1
431	NC_002551.1	496	NC_001474.2	561	NC_021154.1	626	NC_028107.1	691	NC_028121.1	756	NC_014743.1
432	NC_025676.1	497	NC_002640.1	562	NC_001837.1	627	NC_028105.1	692	NC_028120.1	757	NC_011310.1
433	NC_019712.1	498	NC_001563.2	563	NC_025679.1	628	NC_028103.1	693	NC_028119.1	758	NC_014361.1
434	NC_008580.1	499	NC_001477.1	564	NC_024371.1	629	NC_028102.1	694	NC_028117.1	759	NC_019982.1
435	NC_028918.1	500	NC_027819.1	565	NC_020902.1	630	NC_027708.1	695	NC_026762.1	760	NC_009951.1
436	NC_028909.1	501	NC_027817.1	566	NC_001710.1	631	NC_027705.1	696	NC_026770.1	761	NC_009539.1
437	NC_028893.1	502	NC_001475.2	567	NC_012812.1	632	AC_000191.1	697	NC_026769.1	762	NC_009238.1
438	NC_028884.1	503	NC_009942.1	568	NC_003679.1	633	AC_000190.1	698	NC_026768.1	763	NC_001505.2
439	NC_028873.1	504	NC_027709.1	569	NC_003678.1	634	AC_000189.1	699	NC_026767.1	764	NC_001699.1
440	NC_028866.1	505	NC_012735.1	570	NC_002657.1	635	NC_024150.1	700	NC_026766.1	765	NC_001669.1
441	NC_028858.1	506	NC_012671.1	571	NC_002032.1	636	NC_011202.1	701	NC_027532.1	766	NC_002665.1
442	NC_028845.1	507	NC_012534.1	572	NC_001461.1	637	NC_011203.1	702	NC_027531.1	767	NC_001987.1
443	NC_028839.1	508	NC_012533.1	573	NC_025677.1	638	NC_025828.1	703	NC_024118.1	768	NC_001350.1
444	NC_028833.1	509	NC_012532.1	574	NC_024018.2	639	NC_025827.1	704	NC_026944.1	769	NC_015049.1
445	NC_028824.1	510	NC_026624.1	575	NC_023176.1	640	NC_025826.1	705	NC_026942.1	770	NC_001826.2
446	NC_028814.1	511	NC_026623.1	576	NC_018713.1	641	NC_002702.1	706	NC_025800.1	771	NC_009333.1
447	NC_028811.1	512	NC_026620.1	577	NC_001545.2	642	NC_002513.1	707	NC_025790.1	772	NC_003401.1
448	NC_028806.1	513	NC_003996.1	578	NC_022787.1	643	NC_000942.1	708	NC_013439.1	773	NC_001664.2
449	NC_028797.1	514	NC_003675.1	579	NC_007447.1	644	NC_025678.1	709	NC_001538.1	774	NC_001716.2
450	NC_028790.1	515	NC_003676.1	580	NC_025962.1	645	NC_012959.1	710	NC_001442.1	775	NC_000898.1
451	NC_028781.1	516	NC_000943.1	581	NC_024684.1	646	AC_000005.1	711	NC_026244.1	776	NC_016437.1
452	NC_028771.1	517	NC_001809.1	582	NC_020074.1	647	AC_000002.1	712	NC_025370.1	777	NC_015455.1
453	NC_028761.1	518	NC_001672.1	583	AC_000004.1	648	NC_012584.1	713	NC_014406.1	778	AC_000016.1
454	NC_028756.1	519	NC_002031.1	584	NC_009989.1	649	AC_000012.1	714	NC_014407.1	779	NC_002501.1
455	NC_028752.1	520	NC_001564.1	585	NC_004037.2	650	AC_000009.1	715	NC_026015.1	780	NC_001958.1

表 1-4-3 multiplex PCR-NGS 法におけるマッピング参照配列 (3)

No.	Accession No.	No.	Accession No.	No.	Accession No.	No.	Accession No.	No.	Accession No.	No.	Accession No.
781	NC_001806.2	846	NC_027805.1	911	NC_022627.1	976	NC_006022.1	1041	NC_015129.1	1106	NC_021548.1
782	NC_001798.2	847	NC_027804.1	912	NC_022626.1	977	NC_006015.1	1042	NC_015128.1	1107	NC_021547.1
783	NC_024306.1	848	NC_027803.1	913	NC_022625.1	978	NC_006014.1	1043	NC_015127.1	1108	NC_021546.1
784	NC_014567.1	849	NC_027562.1	914	NC_022624.1	979	NC_006013.1	1044	NC_015126.1	1109	NC_021545.1
785	C_007653.1	850	NC_027561.1	915	NC_022623.1	980	NC_006010.1	1045	NC_014236.1	1110	NC_021544.1
786	NC_006560.1	851	NC_027560.1	916	NC_022622.1	981	NC_006008.1	1046	NC_014237.1	1111	NC_021543.1
787	NC_004812.1	852	NC_027559.1	917	NC_022621.1	982	NC_006007.1	1047	NC_014238.1	1112	NC_021542.1
788	NC_001847.1	853	NC_027558.1	918	NC_022620.1	983	NC_006021.1	1048	NC_014239.1	1113	NC_021541.1
789	NC_001348.1	854	NC_027557.1	919	NC_022562.1	984	NC_006020.1	1049	NC_014240.1	1114	NC_011505.2
790	NC_024771.1	855	NC_027556.1	920	NC_022561.1	985	NC_013234.1	1050	NC_014241.1	1115	NC_011504.2
791	NC_011644.1	856	NC_027555.1	921	NC_022560.1	986	NC_013233.1	1051	NC_014242.1	1116	NC_011509.2
792	NC_013590.2	857	NC_027554.1	922	NC_022559.1	987	NC_013232.1	1052	NC_014243.1	1117	NC_011508.2
793	NC_017826.1	858	NC_027553.1	923	NC_022558.1	988	NC_013231.1	1053	NC_014244.1	1118	NC_011507.2
794	NC_002686.2	859	NC_027552.1	924	NC_022557.1	989	NC_013230.1	1054	NC_014244.1	1119	NC_011506.2
795	NC_005261.2	860	NC_027551.1	925	NC_022556.1	990	NC_013229.1	1055	NC_007027.1	1120	NC_011503.2
796	NC_006151.1	861	NC_027550.1	926	NC_022555.1	991	NC_013228.1	1056	NC_007026.1	1121	NC_011502.2
797	NC_001491.2	862	NC_027549.1	927	NC_022554.1	992	NC_013227.1	1057	NC_026830.1	1122	NC_011501.2
798	NC_001844.1	863	NC_027548.1	928	NC_022553.1	993	NC_013226.1	1058	NC_026829.1	1123	NC_011500.2
799	NC_004191.1	864	NC_027547.1	929	NC_014524.1	994	NC_013225.1	1059	NC_026828.1	1124	NC_011510.2
800	NC_004190.1	865	NC_027546.1	930	NC_014529.1	995	NC_025810.1	1060	NC_026827.1	1125	NC_014511.1
801	NC_004189.1	866	NC_027545.1	931	NC_014530.1	996	NC_025809.1	1061	NC_026826.1	1126	NC_007572.1
802	NC_004188.1	867	NC_027544.1	932	NC_014531.1	997	NC_025808.1	1062	NC_026825.1	1127	NC_007571.1
803	NC_004187.1	868	NC_027543.1	933	NC_014528.1	998	NC_025807.1	1063	NC_026824.1	1128	NC_007570.1
804	NC_004186.1	869	NC_027542.1	934	NC_014527.1	999	NC_025806.1	1064	NC_026823.1	1129	NC_007543.1
805	NC_004185.1	870	NC_027541.1	935	NC_014526.1	1000	NC_025805.1	1065	NC_026822.1	1130	NC_007544.1
806	NC_004184.1	871	NC_027540.1	936	NC_014525.1	1001	NC_025804.1	1066	NC_026821.1	1131	NC_007545.1
807	NC_004183.1	872	NC_027539.1	937	NC_014522.1	1002	NC_025803.1	1067	NC_026820.1	1132	NC_007546.1
808	NC_004182.1	873	NC_027538.1	938	NC_014523.1	1003	NC_025802.1	1068	NC_014512.1	1133	NC_007558.1
809	NC_004181.1	874	NC_027537.1	939	NC_012755.1	1004	NC_025801.1	1069	NC_014513.1	1134	NC_007557.1
810	NC_004180.1	875	NC_027536.1	940	NC_012754.1	1005	NC_023822.1	1070	NC_014514.1	1135	NC_007556.1
811	NC_003707.1	876	NC_027535.1	941	NC_007757.1	1006	NC_023821.1	1071	NC_014515.1	1136	NC_007555.1
812	NC_003706.1	877	NC_027534.1	942	NC_007756.1	1007	NC_023820.1	1072	NC_014516.1	1137	NC_007554.1
813	NC_003705.1	878	NC_027533.1	943	NC_007755.1	1008	NC_023819.1	1073	NC_014517.1	1138	NC_007553.1
814	NC_003704.1	879	NC_013405.1	944	NC_007754.1	1009	NC_023818.1	1074	NC_014518.1	1139	NC_007552.1
815	NC_003703.1	880	NC_013404.1	945	NC_007753.1	1010	NC_023817.1	1075	NC_014519.1	1140	NC_007551.1
816	NC_003702.1	881	NC_013403.1	946	NC_007752.1	1011	NC_023816.1	1076	NC_014520.1	1141	NC_007550.1
817	NC_003701.1	882	NC_013402.1	947	NC_007751.1	1012	NC_023815.1	1077	NC_014521.1	1142	NC_007549.1
818	NC_003700.1	883	NC_013401.1	948	NC_007750.1	1013	NC_023814.1	1078	NC_007569.1	1143	NC_007548.1
819	NC_003699.1	884	NC_013400.1	949	NC_007749.1	1014	NC_023813.1	1079	NC_007574.1	1144	NC_007573.1
820	NC_003698.1	885	NC_013399.1	950	NC_007748.1	1015	NC_020445.1	1080	NC_007547.1	1145	NC_004205.1
821	NC_003697.1	886	NC_013398.1	951	NC_007665.1	1016	NC_020439.1	1081	NC_021590.1	1146	NC_004221.1
822	NC_003696.1	887	NC_013397.1	952	NC_007664.1	1017	NC_020448.1	1082	NC_021589.1	1147	NC_004220.1
823	NC_006009.1	888	NC_013396.1	953	NC_007663.1	1018	NC_020447.1	1083	NC_021588.1	1148	NC_004219.1
824	NC_005995.1	889	NC_024510.1	954	NC_007662.1	1019	NC_020446.1	1084	NC_021587.1	1149	NC_004218.1
825	NC_005994.1	890	NC_024509.1	955	NC_007661.1	1020	NC_020444.1	1085	NC_021586.1	1150	NC_004217.1
826	NC_005993.1	891	NC_024508.1	956	NC_007660.1	1021	NC_020443.1	1086	NC_021585.1	1151	NC_004211.1
827	NC_005992.1	892	NC_024507.1	957	NC_007659.1	1022	NC_020442.1	1087	NC_021584.1	1152	NC_004204.1
828	NC_005991.1	893	NC_024506.1	958	NC_007658.1	1023	NC_020441.1	1088	NC_021583.1	1153	NC_004203.1
829	NC_006018.1	894	NC_024505.1	959	NC_007657.1	1024	NC_020440.1	1089	NC_021582.1	1154	NC_004202.1
830	C_006017.1	895	NC_024504.1	960	NC_007656.1	1025	NC_015886.1	1090	NC_021581.1	1155	NC_004200.1
831	NC_006016.1	896	NC_024503.1	961	NC_006024.2	1026	NC_015885.1	1091	NC_021580.1	1156	NC_004198.1
832	NC_005996.1	897	NC_024500.1	962	NC_005990.1	1027	NC_015884.1	1092	NC_021635.1	1157	NC_007741.1
833	NC_006012.1	898	NC_024499.1	963	NC_006019.1	1028	NC_015883.1	1093	NC_021634.1	1158	NC_007740.1
834	NC_005989.1	899	NC_022642.1	964	NC_006006.1	1029	NC_015882.1	1094	NC_021633.1	1159	NC_007739.1
835	NC_005988.1	900	NC_022641.1	965	NC_006005.1	1030	NC_015881.1	1095	NC_021632.1	1160	NC_007738.1
836	NC_005987.1	901	NC_022640.1	966	NC_006004.1	1031	NC_015880.1	1096	NC_021631.1	1161	NC_007737.1
837	NC_005986.1	902	NC_022639.1	967	NC_006003.1	1032	NC_015879.1	1097	NC_021630.1	1162	NC_007736.1
838	NC_006011.1	903	NC_022638.1	968	NC_006002.1	1033	NC_015878.1	1098	NC_021629.1	1163	NC_007747.1
839	NC_027815.1	904	NC_022637.1	969	NC_006001.1	1034	NC_015877.1	1099	NC_021628.1	1164	NC_007746.1
840	NC_027814.1	905	NC_022634.1	970	NC_006000.1	1035	NC_015135.1	1100	NC_021627.1	1165	NC_007745.1
841	NC_027813.1	906	NC_022636.1	971	NC_005999.1	1036	NC_015134.1	1101	NC_021626.1	1166	NC_007744.1
842	NC_027812.1	907	NC_022635.1	972	NC_005998.1	1037	NC_015133.1	1102	NC_021625.1	1167	NC_007743.1
843	NC_027811.1	908	NC_022633.1	973	NC_005997.1	1038	NC_015132.1	1103	NC_021551.1	1168	NC_007742.1
844	NC_027807.1	909	NC_022629.1	974	NC_006025.1	1039	NC_015131.1	1104	NC_021550.1	1169	NC_004216.1
845	NC_027806.1	910	NC_022628.1	975	NC_006023.1	1040	NC_015130.1	1105	NC_021549.1	1170	NC_004215.1

表 1-4-4 multiplex PCR-NGS 法におけるマッピング参照配列 (4)

No.	Accession No.						
1171	NC_004214.1	1236	NC_006152.1	1301	KF791261	1366	KF979338.1
1172	NC_004213.1	1237	NC_006148.1	1302	JX204738	1367	AY275539.1
1173	NC_004212.1	1238	NC_005889.1	1303	KJ476699	1368	KC757344.1
1174	NC_004210.1	1239	NC_004828.1	1304	KT428308	1369	GQ914053.2
1175	NC_004209.1	1240	NC_002077.1	1305	KJ865906	1370	AF296118.1
1176	NC_004208.1	1241	NC_001829.1	1306	KF741706	1371	AF231768.1
1177	NC_004207.1	1242	NC_001729.1	1307	KR997899	1372	AF361253.1
1178	NC_004206.1	1243	NC_001701.1	1308	KF741696	1373	EU755009.1
1179	NC_004199.1	1244	NC_000883.2	1309	KF741766	1374	HQ654774.1
1180	NC_004201.1	1245	NC_004295.1	1310	KF741716	1375	KP995438.1
1181	NC_025825.1	1246	NC_027430.1	1311	KF741726	1376	JN819203.1
1182	NC_001662.1	1247	NC_001427.1	1312	KM877325	1377	KT757282.1
1183	NC_028973.1	1248	NC_025215.1	1313	KF741756	1378	KR063109.1
1184	NC_028101.1	1249	NC_022789.1	1314	KR052714.1	1379	KC667560.1
1185	NC_016647.1	1250	NC_022788.1	1315	NC_021541.1	1380	DQ641257.1
1186	NC_012042.1	1251	NC_015630.1	1316	GQ358721.1	1381	AB928205.1
1187	NC_020499.1	1252	NC_018401.1	1317	NC_014511.1	1382	AF435866.1
1188	NC_024453.1	1253	NC_015396.1	1318	GU733443.1	1383	JN635296.1
1189	NC_014358.1	1254	NC_017091.1	1319	NC_021625.1	1384	KM259923.1
1190	NC_012564.1	1255	NC_028650.1	1320	JN596591.1		
1191	NC_012729.2	1256	NC_026815.1	1321	M77280.1		
1192	NC_023673.1	1257	NC_004713.1	1322	LC010984.1		
1193	NC_022800.1	1258	NC_001718.1	1323	AF006073.1		
1194	NC_016032.1	1259	NC_001358.1	1324	D00540.1		
1195	NC_016031.1	1260	NC_023860.1	1325	KJ495690.1		
1196	NC_017823.1	1261	NC_025965.1	1326	KR902507.1		
1197	NC_007455.1	1262	NC_024454.1	1327	KP941111.1		
1198	NC_004442.1	1263	NC_023020.1	1328	KJ495689.1		
1199	NC_001540.1	1264	NC_011619.1	1329	KR902508.1		
1200	NC_028045.1	1265	NC_011618.1	1330	AB576629.1		
1201	NC_023421.1	1266	NC_008186.1	1331	M32805.1		
1202	NC_026945.1	1267	NC_008185.1	1332	JX971580.1		
1203	NC_025792.1	1268	NC_001630.1	1333	JN974795.2		
1204	NC_025791.1	1269	NC_001539.1	1334	JN974793.2		
1205	NC_008522.1	1270	NC_001510.1	1335	KJ466982.1		
1206	NC_008521.1	1271	KM820747	1336	KF500218.1		
1207	NC_025247.1	1272	KM820757	1337	KC876010.1		
1208	NC_025246.1	1273	KP208817	1338	NC_021590.1		
1209	NC_023885.1	1274	KU194661	1339	JN596592.1		
1210	NC_024694.1	1275	NC_013227	1340	KJ752084.1		
1211	NC_022897.1	1276	KT224507	1341	KP982879.1		
1212	NC_021206.1	1277	KM087108	1342	AB738412.1		
1213	NC_020904.1	1278	KT900698	1343	KP988013.1		
1214	NC_020099.1	1279	KJ476702	1344	KP776593.1		
1215	NC_017843.2	1280	KP731614	1345	AB576629.1		
1216	NC_015399.1	1281	KJ874315	1346	AB874611.1		
1217	NC_013774.1	1282	KJ874323	1347	KM116026.1		
1218	NC_008375.1	1283	KJ874325	1348	DQ205221.1		
1219	NC_008033.1	1284	KR997922	1349	AB573079.1		
1220	NC_007220.1	1285	KM877328	1350	JN872865.1		
1221	NC_006561.1	1286	KP173686	1351	KJ450842.1		
1222	NC_005148.1	1287	KT224504	1352	KJ450831.1		
1223	NC_005053.1	1288	JX028412	1353	KM504278.1		
1224	NC_003410.1	1289	NC_013225	1354	U20228.1		
1225	NC_003054.1	1290	KT444572	1355	M28061.1		
1226	NC_001792.2	1291	KT444562	1356	AF170575.2		
1227	NC_002361.1	1292	KT444552	1357	M28061.1		
1228	NC_001944.1	1293	KT444542	1358	AF170576.2		
1229	NC_027429.1	1294	KT444532	1359	EU305616.1		
1230	NC_001401.2	1295	KT444522	1360	KR733243.1		
1231	NC_014468.1	1296	KP208814	1361	KR733227.1		
1232	NC_006263.1	1297	KP208804	1362	KP976410.1		
1233	NC_006261.1	1298	KM820754	1363	KJ577172.1		
1234	NC_006260.1	1299	KM820744	1364	KJ577164.1		
1235	NC_006147.2	1300	KM087105	1365	AY517471.1		

表 1-5 multiplex PCR-NGS 法開発用ウイルス NGS リードマッピング結果

Name	Consensus length	Total read count	Single reads	Reads in pairs	Average coverage	Reference length
NC_009894 Akabane virus	1307	27106	10522	16584	274.7236459	6868
NC_001461 BVDV	1632	247868	238488	9380	1363.84069	12573
NC_011507 Bovine Rota A	570	413738	16022	397716	9355.067535	3302
NC_006579 PVM	1727	1562987	35887	1527100	7903.08438	14885
NC_001989 BRSV	711	726	726	0	1.212945839	15140
NC_002161 BPIV3	1399	540550	21658	518892	2621.144928	15456
NC_001921 Canine distemper virus	1804	564433	24713	539720	2656.727151	15690
NC_002685 BAV	1620	92311	90657	1654	214.129293	31301
NC_001859 Bovine enterovirus	868	2110563	554063	1556500	19904.47761	7414
JN936206 BRAV	2431	13529	2923	10606	108.2717241	7250
JX204738 mammalian orthoreo virus	77	7	7	0	0.03425013	3854
NC_001847 IBR	9150	35923	31053	4870	18.39800888	135301
NC_013590 Feline herpesvirus 1	38048	429020	241860	187160	211.742174	135797
AC_000020 CAV2	5334	122489	8733	113756	259.0156435	31323
NC_001539 Canine parvovirus	2850	188828	13642	175186	2612.412737	5323
NC_001481 Feline calicivirus	368	26517	26517	0	75.96720031	7683
NC_003045 Bovine coronavirus	1481	2363413	61779	2301634	5719.76908	31028
LC088095 Bovine torovirus	1708	524423	22295	502128	1381.23269	28308
JQ743328 parainflu 5 (canine parainflu)	720	167	29	138	0.664370983	15246
GQ857595 Feline parvovirus	379	117	55	62	3.166951567	1755

mammalian orthoreo virus は、陽性の条件である、マッピングコンセンサス長 200 以上マッピングリード数 100 以上を満たさなかった。

表 1-6 multiplex PCR-NGS 法と従来法の比較

Genus No.	genus (species)	multiplex PCR- NGS法	従来法(RNAseq)
59	Circovirus	+	-
95	Rotavirus	+	+
156	Enterovirus	+	+
161	Kobuvirus	+	+
188	Mamastrovirus	+	-
-※	(unidentifiedvirus)	-	+
-※	(Porcine endogenous retrovirus)	-	+
-※	(IAS virus)	-	+

※はプライマー設計対象外のため Genus No. がない。すなわち multiplex PCR-NGS 法では検出されない。

## 第二章 コウモリからの新規・希少ウイルスの検出

## 序 論

ヒトに感染症を引き起こす病原体の半分が人獣共通感染症であり、新興感染症の約半数が人獣共通感染症である (Taylor et al., 2001, Mandl et al., 2018)。このように人獣共通感染症は人類にとって大きな脅威となっている。コウモリは数多くの病原体を運ぶと考えられている。コウモリは翼手目に属し、世界中で齧歯目に次いで数の多い哺乳類である。近年、コウモリが人獣共通感染症のレゼルボアとして注目されてきたのは、① lyssavirus (Davis et al., 2013a, Davis et al., 2013b; Albas et al., 2011; Almeida et al., 2011; Almeida et al., 2005) や henipavirus (Roche et al., 2015; Breed et al., 2011; Rahman et al., 2010)、coronavirus (Anthony et al., 2017, Chen et al., 2016, Anindita et al., 2015, Annan et al., 2013, Anthony et al., 2013)、ebolavirus (Han et al., 2015)、picornavirus (Wu et al., 2012; Lau et al., 2011) などをヒトに感染させることを示唆する論文が報告されていること、② 人と同じ哺乳類なので、同様に空を飛ぶ鳥類よりもヒトに感染する病原体を保有している可能性があること、③ コウモリがヒトを噛むことによって人獣共通感染症の病原体を感染させる危険性があるばかりでなく、空から病原体を含んだ糞尿を撒き散らすので感染が成立しやすいこと、④ コウモリは蚊やダニなど病原体を媒介する節足動物に比較するとはるかに長い飛行距離を飛ぶことができること、すなわち病原体が越境する可能性があること、⑤ コウモリは集団で密集して生活するのでいったん感染症がコウモリの集団に入るとパンデミックを起こしやすいこと、などの理由が挙げられる。

コウモリのウイルス感染症に関する研究は ebolavirus と SARS coronavirus の出現を契機に盛んになった。SARS coronavirus が世界中に感染拡大した 2003 年から数年後に

NGS が急速に普及し始めた。SARS coronavirus の起源はキクガシラコウモリに感染している bat coronavirus であることが明らかになり (Luk et al., 2019)、コウモリの保有するウイルスを NGS で検出する論文が数多く報告された。そして、哺乳類に感染するウイルスと同じ科に属するウイルスが多くコウモリに感染していることが明らかになり、毎年コウモリに感染するウイルスについての論文が報告され続けている (Mendenhallet al., 2019)。それゆえ、コウモリにはまだ明らかになっていない未知のウイルスが存在していると考えられる。しかし、その一方でウイルスを検出するための NGS の技術は大きく進歩していないのも事実である。そこで、第一章では新たに DSN-NGS 法と multiplex PCR-NGS 法を開発した。

コウモリは、いくつかの人獣共通感染症ウイルスのレゼルボアであることが知られている。その中でも lyssavirus は特に注目されている。lyssavirus はラブドウイルス科 Lyssavirus 属に属するウイルスであり、rabies virus が含まれている。狂犬病は致死率がほぼ 100%であることから、rabies virus に近縁なウイルスについては注意が必要である。Lyssavirus 属には 7 つの遺伝子型があり (Zhang et al., 2017)、ICTV では 16 種類のウイルス種に分類されている (<https://talk.ictvonline.org/>)。1 型には rabies virus、2 型には Lagos bat virus、3 型には Mokola virus、4 型には Duvenhage virus、5 型には European bat lyssavirus serotype 1、6 型には European bat lyssavirus serotype 2 が属している。7 型には Australian bat lyssavirus が属している (Zhang et al., 2017)。この他にも新たに報告されている lyssavirus はあり、今後も新たな遺伝子型・種類の lyssavirus が発見される可能性がある。そこで、本研究ではコウモリが保有しているウイルスをより網羅的に検出するために multiplex PCR-NGS 法の中に lyssavirus に共通な領域を増幅できるプライマーを追加すると同時に、13 種類の lyssavirus をそれぞれ

検出できるプライマーセットを独立して検出するシステム (multiplex PCR-NGS for bat viruses) を構築した。

コウモリは哺乳類なので、吸血節足動物がウイルスを媒介する可能性がある。すなわち、コウモリによる人獣共通感染症の原因ウイルスはコウモリから咬傷・糞尿などを介してヒトに直接感染する場合と、蚊やダニなどを介して間接的に感染する場合がある。

ダニが媒介するウイルスとしてブニヤウイルス科のウイルスが良く知られている。ブニヤウイルス科のウイルスには Crimean-Congo hemorrhagic fever virus や Akabane virus などヒトや家畜に重大な被害を及ぼすものが多い (Horne KM et al., 2014)。その中でも、特に近年の日本では severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) が注目されている。SFTS は、2011 年に報告されたが、その患者の発生は 2006 年にさかのぼるとされている (Yu et al., 2011, Liu et al., 2012)。それからわずか一年で日本国内の患者が SFTS と診断された (Takahashi et al., 2013)。その後も国内での患者は増え続けており、毎年死亡例が後を絶たない。コウモリを吸血するダニはヒトを刺すこともある。そこで本章ではコウモリを吸血するダニも研究対象としてウイルスの検出を試みた。

本章では、国内外のコウモリ検体およびダニを対象に第一章で新たに開発した方法で新規・希少ウイルスの検出を試みた。なお、DSN-NGS 法および multiplex PCR-NGS 法は NGS の前処理に時間と費用がかかることから、ウイルスの分離が強く疑われる細胞の培養上清については、検体中に大量のウイルスが含まれていることが想定されるのでこれらの前処理を行うことなく従来の方法で NGS 解析を実施した。

※ なお、本章 STV の研究発表の後に ICTV によってウイルスの新しい分類が発表された。本章におけるブニヤウイルス科、Nairovirus 属、Hantavirus 属、は、現在それ

それぞれニヤウイルス目、ナイロウイルス科、ハンタウイルス科、となっており、

**Phlebovirus** 属はフェニユウイルス科 **Phlebovirus** 属となっている。

## 材料および方法

### 1 核酸の抽出及び cDNA 合成

#### 1-1 コウモリ関連サンプル 1

サンプリングはインドネシアで行われた。インドネシアの森林省の許可を得て複数種類のコウモリ 142 頭を捕捉し、安楽死処置後に脳乳剤を作製した。核酸の抽出には High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche) を使用した。Super Script III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) によりランダムプライマーを使用して cDNA を合成した。合成された cDNA は 10 頭分ずつプールし PCR のテンプレートとした。

#### 1-2 コウモリ関連サンプル 2

台湾のサンプルは National Chung Hsing University (台湾) の Wong 教授と National Taiwan Normal University (台湾) の Wu 教授から使用許可を受け分与された。サンプリングは台湾の桃園市 Dasi 地区および新北市 Ruifang 地区にある 2 つの洞窟で実施された。排泄物が堆積し固化したグアノを洞窟のいくつかの地点で無作為に収集したものをプールした。韓国の済州島の洞窟のグアノサンプルは Institute of Science Education, Jeju National University (韓国) の Oh 教授から使用許可を受け分与された。日本の奈良県西吉野、同川上市、福井県鯖江市の洞窟でもサンプリングを行った。日本国内の糞便グアノサンプリングについては地権者の許可を得て実施した。High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche) を用いてプールしたグアノから核酸を抽出し、TURBO DNA-free キット (Life Technologies, CA, USA) で精製し、サンプル中の核酸

を RNA のみとした。Super Script IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) によりランダムプライマーを使用して cDNA を合成した。

### 1-3 コウモリ関連サンプル 3

2011 年に国内のコウモリが住み着いた宿泊施設に許可を得、屋根裏の、コウモリが入りする開口部付近でコウモリマルヒメダニ (*Argas vespertilionis*) を採取した。18 匹のコウモリマルヒメダニの内臓と体液をショ糖リン酸グルコース溶液中でホモジナイズしたのち、ホモジネートを遠心分離し、上清を Vero 細胞に接種した。1 週間間隔の盲継代の 2 代目接種後 3 日目に CPE が観察されたため上清を回収した (図 2-1)。High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche) を使用して培養上清から全 RNA を抽出した。NGS 用ライブラリー調整には NEBNext Ultra RNA Library Prep kit (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) を使用した。いずれも製品プロトコール通りに実施した。

## 2 シーケンシング

### 2-1 コウモリ関連サンプル 1

コウモリ関連サンプル 1 から lyssavirus を検出する目的で multiplex PCR-NGS for batviruses を構築した。GenBank に Refseq として登録されている lyssavirus のうち、ゲノム全長が明らかとなっている 17 種 (表 2-1) すべてを検出するためのプライマーセットを構築した。まず、① multiplex PCR-NGS 法のうち Lyssavirus 属に関係するプライマーを抜粋し、それに ② 既報 (Vázquez-Morón et al., 2006) の lyssavirus 用プライマーを加え、最後に ③ 既報のプライマーでカバーされていない 6 種を検出するための nested PCR プライマーを設計し、追加した (表 2-2)。

これらプライマーセットを用いて、コウモリの脳乳剤由来の cDNA を PCR した。PCR の酵素は GoTaq Colorless Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) を使用し、テンプレートとして cDNA を 1 $\mu$ l 使用した。nested PCR の 2nd PCR のテンプレートには 1 $\mu$ l の 1st PCR のプロダクトを使用した。反応条件は、いずれも 95 $^{\circ}$ C で 2 分の熱変性の後、95 $^{\circ}$ C 30 秒、55 $^{\circ}$ C (既報のプライマーのみ 53 $^{\circ}$ C) 30 秒、72 $^{\circ}$ C 30 秒を 35 サイクル実施し、最後に 72 $^{\circ}$ C で 5 分の伸長を行った。

## 2-2 コウモリ関連サンプル 2

### 2-2-1 NGS 用ライブラリー調整、ハイスループットシーケンシング

コウモリ関連サンプル 2 は multiplex PCR-NGS 法で解析を行った。multiplex PCR は Multiplex PCR Assay Kit (TaKaRa) を使用して行った。1well あたり Multiplex PCR Mix 1 を 0.125 $\mu$ l、Multiplex PCR Mix 2 を 12.5 $\mu$ l、cDNA の混合物を 1 $\mu$ l、10 $\mu$ M のプライマーmix を 10 $\mu$ l および nuclease free 水を 1.375 $\mu$ l 混合した。反応時間は 94 $^{\circ}$ C 90 秒の初期変性の後、94 $^{\circ}$ C 30 秒、45 $^{\circ}$ C 90 秒、72 $^{\circ}$ C 90 秒を 40 サイクル実施し、最終伸長を 72 $^{\circ}$ C 10 分行った。ライブラリー調整には NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina (NEW ENGLAND Bio Labs) を一部改変して使用した。具体的にはマニュアルに記載されている end repair 以降のみを実施した。MiSeq Reagent Kit v2 (300 サイクル) (Illumina) を使用し MiSeq bench-top sequencer (Illumina) にて、ペアエンドシーケンシングを実施した。得られた各リードについては MiSeq レポーターを用いて FASTAQ 形式ファイルとして出力し、CLC genomic Workbench 6.5.1 (CLC bio) を用いて解析した。マッピングデータセット内の配列すべてに対しリードをマッピングした。マッピングされた結果のうちコンセンサス長 200 以上、マッピングリード数

100 以上の条件を満たす参照配列をそのウイルスゲノムが検出された可能性があるものとし、参照配列ごとにマッピング画像の確認を行った。マッピング画像においては multiplex PCR プロダクトのサイズに合う距離を置いて forward 端と reverse 端の両方にリードのマッピングがみられるものを陽性と判断した (図 1-4)。

### 2-2-2 EMCV の保存領域における PCR

encephalomyocarditis virus (EMCV) 遺伝子の検出は、抽出核酸を SuperScript IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific) によって逆転写反応し、EMCV の高度に保存された領域 (Liu et al., 2016, Duke et al., 1992) を PCR によって増幅することによって行った。プライマー情報を表 2-3 に示す。PCR は KOD-Plus-Neo (ToYoBo, Japan) を使用し、94°C で 2 分の熱変性の後、98°C 10 秒、58°C 30 秒、68°C 30 秒を 35 サイクル、72°C で 5 分の伸長を行った。台湾の洞窟サンプルだけでなく、韓国および日本のサンプルについても同様の PCR を実施した。

## 2-3 コウモリ関連サンプル 3

### 2-3-1 NGS 用ライブラリー調整、ハイスループットシーケンシング

NGS 用ライブラリー調整には NEBNext Ultra RNA Library Prep kit (New England BioLabs) を使用した。いずれも製品プロトコール通りに実施した。MiSeq Reagent Kit Nano v2 (300cycles) を用いて MiSeq bench-top sequencer (Illumina) にてシーケンシングを行った。得られた各リードについては MiSeq レポーターを用いて FASTAQ 形式ファイルとして出力し、CLC Genomic Workbench 6.5.1 (CLC bio) を用いて解析した。CLC Genomics Workbench 6.5.1 (CLC bio) の *de novo* assembly コマンド (minimum

contig length 1000) によってコンティグを作成した。得られたすべてのコンティグに対して The National Center for Biotechnology Information (NCBI) の BLASTn 検索 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を実施した。

### 2-3-2 系統解析

セグメント L の塩基配列の ORF 部分のみの系統解析を実施した。系統発生解析は、MEGA 6 ソフトウェアの最尤法 (ML) を用いて行った。系統樹の信頼性は、1000 回反復によるブートストラップ解析によって評価した (Felsenstein, 1985)。

## 結 果

### 1 コウモリ関連サンプル 1

コウモリ関連サンプル 1 について、multiplex PCR-NGS for batviruses のシステムにおいて Lyssavirus の検出を試みたが、陽性結果は得られなかった。

### 2 コウモリ関連サンプル 2～encephalomyocarditis virus の検出～

台湾の 2 つの洞窟から得られたグアノサンプル抽出核酸を multiplex PCR したプロダクトをハイスループットシーケンシングし、得られたリードをマッピングデータセットの各ウイルス配列にマッピングした。2 つの洞窟（台湾 1 と台湾 2）のどちらのサンプルも 200 以上のリードが参照配列 EMCV に対しプライマーによる PCR 想定プロダクトサイズどおりの間隔をもってマッピングされていた。

EMCV ゲノムの存在を確認するために、EMCV の保存された領域を増幅するプライマーセット（表 2-3）を使用して PCR を実施したところ、プロモーター領域のプライマーのみから想定サイズのバンドを得た（図 2-2A）。EMCV ゲノムがげっ歯類、コキクガシラコウモリおよびユビナガコウモリのゲノムに組み込まれている可能性を排除するために、得られた配列に対して BLASTn 検索を実施し、その結果、これらの動物のゲノムに EMCV 様の配列が存在しないことを確認した（data not shown）。

EMCV ゲノムの存在をさらに確認するために、日本と韓国の洞窟からもグアノサンプルを採取し、PCR を実施した。全ての洞窟で PCR 陽性であり（図 2-2B）、PCR プロダクトをシーケンシングした結果 EMCV の塩基配列と一致した。

サンプリングした地域には主にユビナガコウモリおよびキクガシラコウモリ (*Rhinolophus ferrumequinum*) が棲息していたが、これらのコウモリを捕獲して直腸便を採取することができなかつたので、本研究では糞便グアノを用いた解析を行った。それゆえ、ウイルスゲノムの供給源がこれらのコウモリであるかを検証する必要がある。グアノはコウモリ以外にもげっ歯類からの排泄物で構成されているかもしれない。収集したグアノを構成した動物種を決定するために、ミトコンドリア遺伝子、チトクローム c オキシダーゼ I (COI) の 5'末端および 3'末端領域に基づく DNA バーコード領域の NGS 解析を実施した。台湾に生息している、あるいは生息が予想される哺乳類 75 種の DNA バーコード領域の塩基配列にマッピングを実施した。COI の最大種内距離は 0.00-11.00%の間とした (Yassin et al., 2010)。89% 以上の相同性を示した 10 のコンセンサス配列のうち 4 つは、BLASTn による確認の結果もユビナガコウモリと一致し (97.60% - 100%)、残り 6 つは BLASTn の結果昆虫およびクモ類と高い相同性を示した。また、89%未満の結果を示した配列は、BLASTn により昆虫やサソリや線虫などの哺乳類以外の生物の塩基配列と相同性が高いことが分かった。これらの結果より、グアノがユビナガコウモリ以外の脊椎動物の排泄物を含む可能性は非常に低いことが示唆された (data not shown)。

### 3 コウモリ関連サンプル 3～新規 soft tick bunyavirus の検出～

総リード数は 7,400,954 であった。CLC Genomics Workbench 6.5 (CLC bio) の *de novo assembly* コマンド (minimum contig length 1000) によって得られたコンティグ数は 14 であった。得られたすべてのコンティグに対する BLASTn 検索の結果、3 つのコンティグが Issyk-Kul virus のセグメント L (Accession No. KF892055.1) , セグメ

ント M (Accession No. KF892056.1) , セグメント S (Accession No. 892057.1) とそれぞれ 77%、76%、79%の相同性を示した。これらのコンティグを構成するリード数は、それぞれ 333,028 リード、72,551 リード、53,314 リードであった。この新しいウイルスを soft tick bunyavirus (STV) と名付け、各セグメントの塩基配列を DNA Data Bank of Japan (DDBJ: <http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html>) に登録した (Accession No. LC027467, LC027466, LC027465)。セグメント L の ORF 部分のみの塩基配列による系統解析の結果を図 2-3 に示した。

## 考 察

multiplex PCR-NGS 法は、ハイスループットシーケンシングのテンプレートとして multiplex PCR のプロダクトを使用することによりサンプル中のウイルスゲノムの相対的濃度を高めることができる。一方で、血液や糞便などの臨床サンプル中の宿主細胞や細菌や食物残渣などに由来するゲノムの相対的濃度を下げるため、NGS 解析する際に現れるターゲットウイルス以外のゲノムに由来するリードを減らすことができる。さらに、NGS では検出できないほどにターゲットウイルスゲノム濃度が低いサンプルからでもコンベンショナル PCR では検出ができるという報告がある (Wylie et al., 2012)。本研究の multiplex PCR-NGS 法ではターゲットウイルスゲノム断片をあらかじめ増幅させてからハイスループットシーケンシングすることで、より高感度にターゲットウイルスを検出できる。第一章でのブタサンプルによる検証により、プライマーとして設計されているウイルス属に関しては multiplex PCR-NGS 法の方が従来法よりも確実にウイルスゲノム断片を検出できると考えられた。

本章では台湾の桃園市および新北市内の洞窟で採取されたユビナガコウモリ (*Miniopterus fuliginosus*) の糞便サンプルにおけるウイルスの検出を実施した。

EMCV はピコルナウイルス科 *Cardiovirus* 属の ssRNA (+) virus である (Billinis et al., 2004)。齧歯類のウイルスと考えられているが (Liu et al., 2017)、サルを含む広範囲の宿主に感染する (Liu et al., 2017)。また、心筋炎、脳炎、神経疾患、生殖障害および糖尿病を引き起こす人獣共通のウイルスである (Luo et al., 2017)。自然界ではウイルスが失活しにくいことや、過酷な環境で数日間感染性を保持し続けるため、本研究

で採取したグアノ中の EMCV は動物やヒトに感染する可能性がある (Carocci and Bakkali-Kassimi, 2012)。

コウモリは遠距離を飛ぶ能力を有すること (Calisher et al., 2006) と船舶および船積みコンテナに誤って棲息し大陸間を移動することがあるので、国境を越えてウイルスを運搬する (Constantine 2003)。本章における研究では、EMCV ゲノムが韓国と日本のサンプルにも見出されたため、このようなコウモリによるウイルスの移動が考えられる。また、これらの国の間でのコウモリの移動については、コウモリミトコンドリアの遺伝子の分析結果から以前に報告されている (Iida et al., 2017)。

本章における研究は、台湾、韓国、および日本のユビナガコウモリが EMCV を保有していることを示唆しており、ユビナガコウモリは東アジアで広く EMCV の自然宿主の 1 つである可能性がある。新興感染症の原因ウイルスのレゼルボアとして注目されているコウモリからこのようなウイルスが発見されたことは公衆衛生上非常に重要である (前田ら 2011)。

一方、国内のコウモリコロニーの生息場所から採取されたコウモリマルヒメダニの内臓と体液から Vero 細胞を用いてウイルス分離を試みた際の培養上清サンプルから NGS 従来法によりブニヤウイルス科の新しいウイルス STV を検出した。ブニヤウイルス科には蚊やダニなどの節足動物により媒介されるウイルスが多く含まれ、Nairovirus 属の Crimean-Congo hemorrhagic fever virus のほか、Orthobunyavirus 属の akabane virus や Hantavirus 属の hantaan virus、Phlebovirus 属の severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) など、ヒトや家畜に重大な被害を及ぼすものが多い (Horne KM et al., 2014)。

ブニヤウイルス科各ウイルスのセグメント L のアミノ酸系統解析によると、STV はヒトに頭痛や発熱を引き起こす Issyk-kul virus (Atkinson et al., 2015) に最も近縁であり、家畜に重篤な症状を引き起こすウイルスを多く含む Nairovirus 属のクラスターに含まれることが示された。このウイルスがダニやコウモリ、その他の哺乳類等に対する病原性を示すかは不明である。しかし、培養細胞に細胞傷害性を示したことから、何らかの宿主に対して病原性を示す可能性は否定できない。今後、実験動物を用いて明らかにする必要がある。

STV の L・M・S のセグメントに相当するコンティグは、それぞれがほぼ完全長であった。3つのコンティグを構成するリード数は合わせて 458,893 であり、これは全リード数 740,954 の 6割以上にも上った。ウイルス分離後の細胞培養上清から抽出した核酸であったことが、ターゲットウイルス由来のリードを多く獲得できた理由であると考えられた。このように、あらかじめ多くのターゲットウイルス由来の核酸が含まれていることが予測されるサンプルでは、サンプル前処理をしないハイスループットシーケンシングでも十分な結果が得られることが明らかとなった。ただし、すべての新興感染症ウイルスが容易にウイルス分離できるとは限らず、またウイルス分離には時間がかかるため、第一章に示したような multiplex PCR-NGS 法のような網羅的なウイルス検出法を適宜使用することは迅速な判断が要求される場合には必要である。

正常 Vero 細胞



接種 5 継代目 Vero 細胞



**図 2-1 コウモリマルヒメダニのホモジネートを接種した Vero 細胞の変化**  
均一に発育していた Vero 細胞（左）が斑状に脱落し明るく見えている（右）

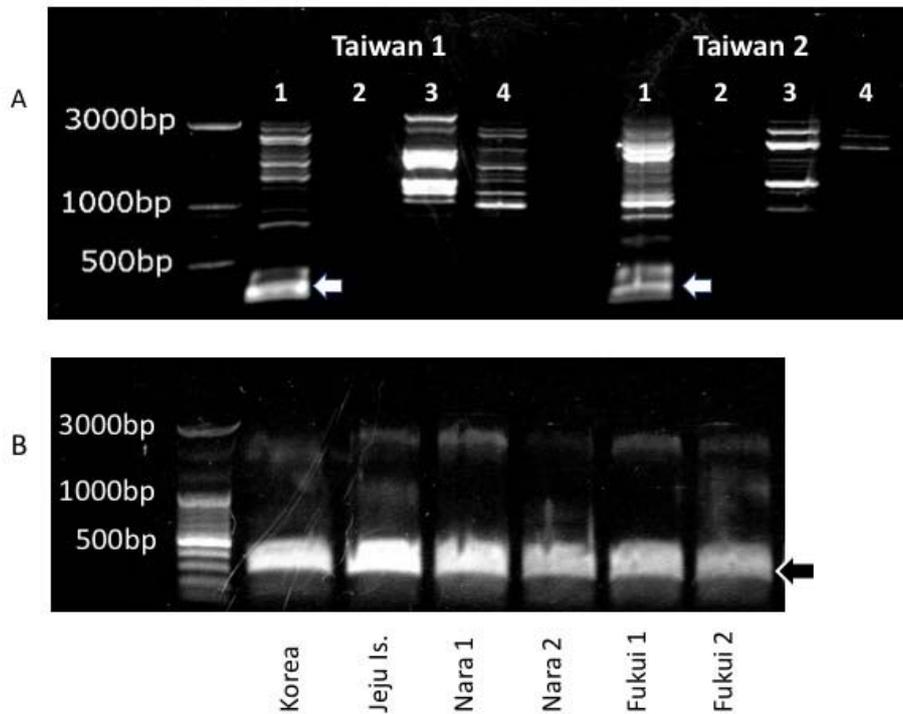


図 2-2 台湾、韓国、日本のコウモリ関連サンプルにおける EMCV 遺伝子の増幅

Aは台湾洞窟 1 および 2 における EMCV 保存領域の PCR プロダクトの電気泳動、Bは韓国および日本のサンプルにおける EMCV promotor gene の PCR プロダクト電気泳動の結果を示す。台湾、韓国、日本のいずれのサンプルからも promorter gene の PCR で想定サイズのバンドが得られた ( ← , ← )。

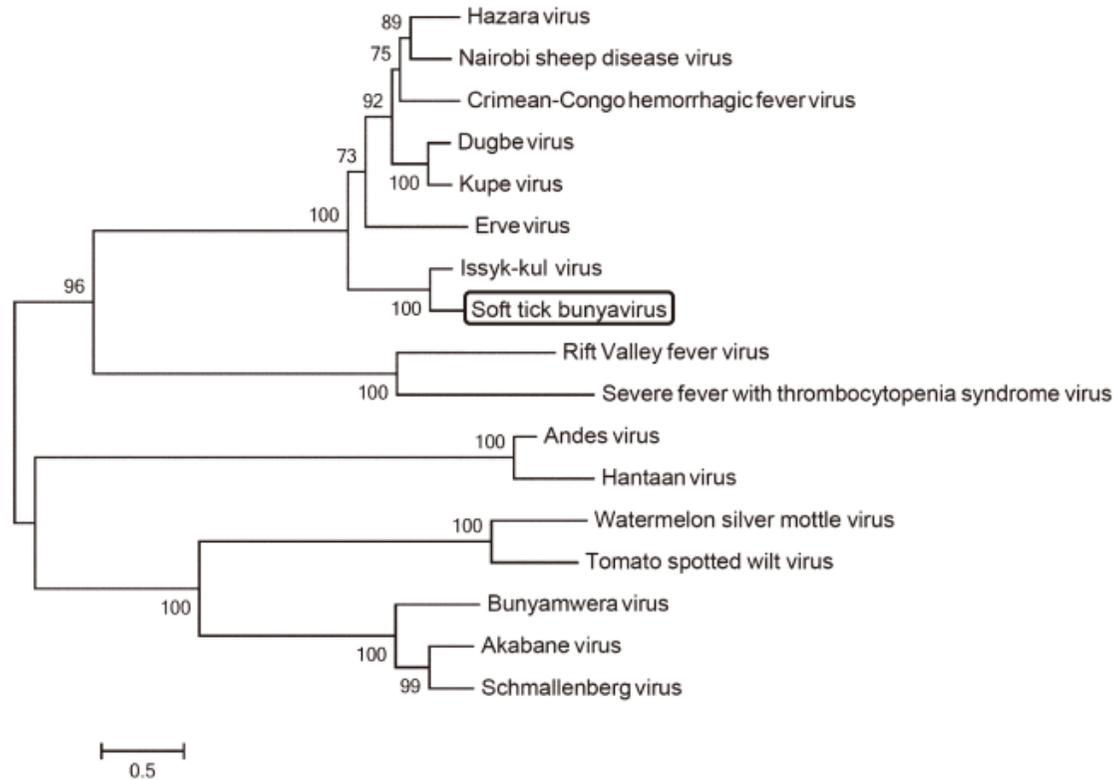


図 2-3 ブニヤウイルス科各ウイルスの塩基配列による系統樹

MEGA6 を使用し Maximum likelihood 法 (1000replicates) にて算出した。使用したウイルスの Accession No. は次のとおりである。CCHFV GU477492, Hazara virus DQ076419.1 NSDV EU697951.1 Kupe virus EU257628.1 Dugbe virus U15018.1 Erve virus JF 911697.1 Issyk\_Kul virus KF892055.1 Rift valley virus JF311376.1 SFTSV JQ684871.1 Hantaan virus JQ083393.1 Schmallenberg virus KC355457.1 Akabane virus AB190458.1 Tomato spotted wilt virus KC261962.1

表 2-1 multiplex PCR-NGS for batviruses 対象のウイルス

No.	Genus	Virus (Abbreviation)
1	Lyssavirus	Aravan virus
2		Australian bat lyssavirus
3		Bokeloh bat lyssavirus
4		Duvenhage virus
5		European bat lyssavirus 1
6		European bat lyssavirus 2
7		Gannoruwa bat lyssavirus
8		Ikoma lyssavirus
9		Irkut virus
10		Khujand virus
11		Lagos bat virus
12		Lleida bat lyssavirus
13		Lyssavirus Ozernoe
14		Mokola virus
15		Rabies virus
16		Shimoni bat virus
17		West Caucasian bat virus

表 2-2 multiplex PCR-NGS for batviruses のプライマー一覧

name(Forward)	sequence(5'→3')	name(Reverse)	sequence(5'→3')	product size	origin
120_lyssa2_1_10242F	AGGACRARATGGGTRGATCAAG	120_lyssa2_1_10650R	ARGCCATSARRTCATTACCTC	408bp	
120_lyssa2_2_10242F	AGGACRARATGGGTRGATCAAG	120_lyssa2_2_10651R	GARGCCATSARRTCATTACCT	409bp	
120_lyssa9_1_7264F	TGGAYTAYGAGAAGTGGAAACAA	120_lyssa9_1_7849R	ACTCTYGCCCATCTYTTAGATT	585bp	
120_lyssa9_2_7287F	ACTCYAGAGTGACYTATGCTTT	120_lyssa9_2_7899R	ACTCTYGCCCATCTYTTAGATT	612bp	this study
120_lyssa6_1_655F	AATTGGAGYACAATCCAAACT	120_lyssa6_1_1229R	ACWGTTCCATCATCWGCCAATG	575bp	
120_lyssa6_2_656F	ATTGGAGYACAATCCAAACTT	120_lyssa6_2_1229R	ACWGTTCCATCATCWGCCAATG	574bp	
120_lyssa1_1_8361F	ATHAGGAAGGCYYTKTATGATG	120_lyssa1_1_8975R	ATGRACATTKGTSACYTTCTCC	615bp	
120_lyssa1_2_8362F	THAGGAAGGCYYTKTATGATGA	120_lyssa1_2_8975R	ATGRACATTKGTSACYTTCTCC	614bp	
GRAB1F	AARATNGTRGARCAYCACAC	GRAB1R	GCRTTSGANGARTAAGGAGA		S.V'azquez-Mor'on et al., 2006
GRAB2F	AARATGTGYGCIAAYTGGAG	GRAB2R	TCYTGHCIGGCTCRAACAT	260bp	
Ikoma_outer4694F	TAGAGTTTATACTGTTAAGAGG	Ikoma_outer4970R	TTTAACGGTTACTGGCCTGAGAAATG		
Ikoma_inner4721F	AGGCTTCGTGAGGGTTCTATGAATG	Ikoma_inner4941R	CGGAGAAGCGCTGGATCCAAGAATG	221bp	
Shimoni_outer1502F	CTTCAATCCTTCCCTCCAAGATGAG	Shimoni_outer1773R	AGGTAGTAAAACCTCGTCCTCAGAG		
Shimoni_inner1528F	AAGGGGCTTATTCATCCGAGTTCC	Shimoni_inner1746R	GCTCTCTCCTTCATCTCCGATCCTGA	219bp	this study
Ganno_outer2570F	CCCCCAGATGACGACGATCTATGG	Ganno_outer2855R	GTGTTCTCCTCAGCTTATATACCCAG		
Ganno_inner2606F	GAGTATGTTCCATTAACAGAGGTCAC	Ganno_inner2813R	CAGGAGCTCCCGACAAAGCTAGGCC	208bp	
Lleida_outer4274F	ACACGGGCACTACAAATCAGTATCG	Lleida_outer4563R	CCCTCATATGCAACTGAATGAACCTCA		
Lleida_inner4306F	CTGAGATTCTTCCACCCTATATGC	Lleida_inner4532R	CTCTGAAGAAGGGTCTGTATCATCC	227bp	

表 2-3 EMCV 保存領域のプライマー一覧

EMCV genes	Forward Primer (5'→3')	Reverse Primer (5'→3')	product size
Promoter	TGAATGTCGTGAAGGAAGCAGT	ACCTCGACTAAACACATGT	315bp
Promoter (nested)	TGGAAGCTTCTTGAAGACA	AGATCAGATCCCATACAAT	240bp
1A	ATTCCACCTCCTCAGACAAGA	AGCTAGCAATGGAAGCATAT	206bp
2B	TTCATGTTTAGACCAAGGAAACA	AGAGATTGTGGGAAACCGT	432bp
2B (nested)	AGACCCAAGGAGCGGCAGTGT	TGTCTTGAAGTTAGCTGCTAT	361bp
3A/B	TCCAGTAGACGAGGTCAGT	TGAATGTCCAACAAGTCA	321bp
3A/B (nested)	TCCAGCAGCTTAAAGCAAGACA	AACTCTCGCCGTCTCATTGTA	256bp

### 第三章 ブタからの新規・希少ウイルスの検出

## 序 論

第一章では新規・希少ウイルスを NGS で検出するための新しい方法を開発し、第二章ではこれらの方法を用いてコウモリを対象に 2 種類のウイルスを検出した。世界的にコウモリはウイルスを運び、ヒトや動物に感染させるレゼルボアとして重要である (Plowright et al., 2015)。日本にもコウモリが棲息し Coronavirus などを保有していることは明らかになっているが (Shirato et al., 2012)、現在までに国内においてコウモリ由来の人獣共通感染症が発生したという報告はない。そこで、本章では国内で人獣共通感染症の原因ウイルスを保有しており、しかもヒトに近いところで生活している動物の一つとして家畜のブタを対象として、新規・希少ウイルスの検出を試みた。

日本において養豚場のブタは高度に衛生管理されていることから、ブタに感染しているウイルスをすべて把握していると考えている研究者は多い。しかし、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では 2012 年から現在に至るまで国内の養豚場の糞便から様々な新規・希少ウイルスを検出してきた。例えば、ブタの正常便から、porcine Group A rotavirus のセグメントと human Group A rotavirus のセグメントがひとつのウイルス粒子に入り込んだリアソータントウイルスが検出されている (Nagai et al., 2015)。養豚場においてブタとヒトは非常に近いところで生活している。このリアソータントウイルスは、porcine Group A rotavirus に感染しているブタが human Group A rotavirus を経口的に取りこみ、2つのウイルスが豚の腸管の細胞に同時に感染してリアソートメントを起こした結果、糞便中に排出されたと考えられる。このウイルスは NSP 5 の非翻訳領域がそれまでに発見されていた porcine Group A rotavirus より長いために超短 RNA 電気泳動型を示した。このウイルスは正常便から検

出されたので、病原性については不明である。さらに、世界的に検出例の少ない **porcine Group C rotavirus** の新しい遺伝子型も発見されている (Niira et al., 2016)。一方、ウシの糞便からウシとブタとヒツジの **astrovirus** のゲノムの組換えによって出来たと考えられるウイルスが検出されている (Nagai et al., 2015)。また、ブタから発見された **picornavirus** はリスザルのウイルスに近縁であった (Naoi et al., 2016)。この他にも、緒言で述べた **porcine torovirus** と **porcine enterovirus** のゲノムの組換えが起こっていることが明らかにされている (Shang et al., 2017)。このようにブタの腸管に感染するウイルスは、ヒトを含めて動物間を渡り歩きゲノムの組換えを起こしていると推測される。ウイルスゲノムの組換えは新たな病原性の獲得と臓器嗜好性の拡大を起こす可能性がある。

このような知見から、国内の養豚場のブタには未知・既知のウイルスが存在している可能性が高いと考えた。そこで本章では、NGS においてサンプルの前処理を行わない従来法、第一章で開発した DSN-NGS 法を用いてウイルスの網羅的検出を実施した。なお、multiplex PCR-NGS 法を用いたブタ検体のウイルス網羅的検出法も実施したが、既知のウイルスは検出されたが、新規ウイルスは検出されなかったので、本章では結果を割愛した。

※ なお、本章サーコウイルスの研究発表の後に ICTV によってウイルスの新しい分類が発表された。これにより、FSfaCV は、現在サーコウイルス科ではなくジェノモウイルス科 **Gemycircularvirus** 属のウイルスとして分類されている。

## 材料および方法

### 1 核酸の抽出

#### 1-1 ブタサンプル 1

2014-2016年に、鳥取県（6農場）と石川県（6農場）にて下痢の有無にかかわらず、2～120日齢のブタ222頭よりサンプリングされた糞便試料を使用した。同サンプルからはメタゲノミクス解析により複数のウイルスが検出され報告されている（Nagai et al., 2015, Tsuchiaka et al., 2018）。糞便はPBSにより10%の乳剤に調整し、遠心した上清から直接抽出したRNAをサンプルとして使用した。

#### 1-2 ブタサンプル 2

2014年1月から2月にかけて日本の9つの農場から収集された子ブタの糞便85頭分をサンプルとして使用した。同じサンプル群から新しい porcine rotavirus、astrovirus、posavirus をすでに発見し報告している（Ito et al., 2017, Nagai et al., 2015, Sano et al., 2016）。糞便は滅菌PBSにて10%の乳剤に調整し、その上清を核酸抽出に使用した。核酸はHigh Pure Viral Nucleic Acid Kit（Roche）およびDNA mini Kit（QIAGEN）を用いて抽出した。いずれも製品プロトコールに従って実施した。

抽出した核酸を混合して2つのサンプルプールを作製した。各サンプルプール中のdsDNA量をDSN solution 1 $\mu$ lで処理できる最大量の500ng程度となるよう調整した。具体的には、サンプルプール1にはサンプルID 1-1、2-1、3-1、4-1、5-1、6-1、7-1、8-1の8サンプルを各10 $\mu$ lずつ、サンプルプール2にはサンプル2-2、5-2、6-2、7-2の4サンプルを各200 $\mu$ lずつそれぞれ混合した。

## 2 NGS 用ライブラリー調整、ハイスループットシーケンシング

### 2-1 ブタサンプル 1

ブタサンプル 1 ではサンプルの前処理をしない NGS 従来法を用いた。NGS 用ライブラリー調整には NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs) を使用し、製品プロトコールに従った。151 ペアエンドリードを用いたハイスループットシーケンシングは、MiSeq benchtop sequencer (Illumina) で行った。

### 2-2 ブタサンプル 2

ブタサンプル 2 は DSN-NGS 法を用いた。各サンプルプールはエバポレーターで濃縮し、液量を 8 $\mu$ l に調整した。その後、第一章で述べた方法により DSN 処理を実施した。簡単に述べると、8 $\mu$ l の核酸混合溶液に 1 $\mu$ l の DSN solution と 1 $\mu$ l の 10 $\times$ DSN master buffer を加え、35 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートし、GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit (GE Healthcare) を使用して DNA の増幅と 2nd strand の合成を行った。NGS 用ライブラリー調整には、NexteraXT DNA sample prep kit (Illumina) を製造業者のプロトコールに従って使用した。サンプルプール毎にインデックスを付加した DNA ライブラリーは、MiSeq benchtop sequencer にて MiSeq Reagent Kit v2 (50 サイクル) を使用してシーケンシングされた。

## 3 データ解析

### 3-1 ブタサンプル 1

データは CLC Genomics Workbench 7.5.5 (CLC bio) で解析された。トリミングされたリードは、CLC Genomics Workbench のデフォルトパラメータを用いた *de novo assembly* コマンドによってコンティグに組み立てられた。生成されたコンティグは、最も厳しいパラメータ設定にて参照配列にマッピングすることによって評価した。不十分なデプス (<3) を有する 5' および 3' 配列は省略した。ゲノムの 5' 末端を得るために、市販のキット (5'-Full RACE Core Set, TaKaRa Bio, Otsu, Japan) を用いて cDNA 末端法 (RACE) の迅速増幅を行った。

塩基および推定アミノ酸配列は、ClustalW (Thompson et al., 1997) においてアライメントした。5' UTR における RNA の二次構造は、mfold によって予測した (Zuker, 2003)。系統発生解析は、MEGA 7 ソフトウェア (Kumar et al., 2016) の最尤法 (ML) を用いて行った。系統樹の信頼性は、1000 回反復によるブートストラップ解析によって評価した (Felsenstein, 1985)。ペアワイズ配列同一性は、CLC Genomics Workbench 6.5.1 (CLC bio) を用いて計算した。

### 3-2 ブタサンプル 2

得られたリードは、CLC Genomics Workbench 6.5.1 (CLC bio) において、ワードサイズ 50、minimum contig length 200bp 設定で *de novo assembly* コマンドによってコンティグに組み立てられた。得られたコンティグの相同性検索は NCBI ウェブサイト上の BLASTn プログラムを用いて行った。

## 結 果

### 1 ブタサンプル 1～新規 porcine teschovirus の発見～

#### 1-1 コンティグの組み立て

鳥取県（6 農場）と石川県（6 農場）にて下痢の有無にかかわらず、2～120 日齢のブタ 222 頭よりサンプリングされた糞便試料を NGS 解析したところ、ほぼ完全長の約 6,000 塩基長を超す porcine teschovirus (PTV) に相同性を有する 8 つのコンティグと、同じく PTV に相同性を示す、P1 全長を含むコンティグ 2 つが得られた。得られたコンティグを表 3-1 に示す。これらのサンプルからは PTV 以外にも sapovirus、enterovirus G、posavirus、rotavirus、porcine astrovirus、picobirnavirus、Aichivirus C、sapelovirus が検出された。

#### 1-2 全ゲノムの決定

PTV\_JPN / Ishi-Ka2 / 2006 (PTV\_Ka2) を含むサンプルについて 5' RACE を実施して、5' 末端の塩基配列を決定した。3' 末端には polyA が付加されていたので、polyA 配列を 3' 末端の配列とした。このようにして得られた PTV\_Ka2 の完全長のゲノムの塩基配列は、polyA を除いて 7,203 nt 長であり、5' UTR (424nt) および 3' UTR (125nt) に挟まれた polyprotein 前駆体である 2,217 aa をコードする 6,651 nt を含む単一の ORF を有していた (図 3-1)。

#### 1-3 ペアワイズ配列同一性

ペアワイズ配列同一性は、CLC Genomics Workbench 6.5.1 を用いて計算した。

PTV\_Ka2 は、他の PTV に相同性のある 3 つのコンティグである PTV\_JPN / Ishi-Ka1 (PTV\_Ka1)、PTV\_JPN / Ishi-Ta1 (PTV\_Ta1) および PTV\_JPN / Ishi-Ta2 (PTV\_Ta2) と高い配列同一性を示したが、既存の PTV 株に対する相同性は 75% 未満であった。もう 1 つの PTV 様配列 PTV\_JPN / Ishi-Im1-1 / 2015 (PTV\_Im1-1) も既存 PTV 株との相同性は 77% 未満、Ka2 との相同性は 75.4% と低かった。これらの既存 PTV 株と低い相同性を示す株を PTV 様株と呼ぶことにした。

#### 1-4 RNA 二次構造分析

mfold によって予測された PTV\_Ka2 の IRES の二次構造を、代表的な PTV-1 Talfan 株 (AF231769) と比較すると、PTV\_Ka2 は典型的な IV 型 IRES を有し、その基底領域および頂点は Talfan 株のものと同じであった (図 3-2)。PTV\_Ka2 の Kozak 配列は AUUAUGG、Talfan 株では ACCAUGG であった。この塩基配列の差が翻訳にどのような影響を及ぼすかについては今後の研究課題である。18S rRNA の 3' 末端と相互作用し、適切な翻訳開始に重要な役割を果たすと考えられる短いオリゴピリミジン配列 (CUUU) (Scheper et al., 1994) は、両ウイルスの開始コドンの 22 nt 上流に見出された (図 3-2)。

#### 1-5 系統解析

PTV 様ウイルスの完全な polyprotein のアミノ酸配列を MEGA7 でピコルナウイルススーパーグループ 1 のウイルスとアライメントし、ML 法で系統解析を実施した。5 つの PTV 様ウイルス (PTV\_Ka1, Ka2, Ta1, Ta2 および Im1-1) は、5 株とも *Teschovirus*

A と同じ大きなまとまりを形成したが、そのまとまりはスーパーグループ 1 内の他の picornavirus とは遠く離れて位置した (図 3-3)。また、5 つの PTV 様ウイルスは、大きなまとまりの中で既存の *Teschovirus A* 株とは完全に独立したクラスターを形成していることが明らかになった。さらに VP1、P1、2C および 3CDa 領域における系統樹解析では PTV 様ウイルスが *Teschovirus A* 株と異なるグループであることが明らかになった (図 3-4~3-7)。P1 アミノ酸の配列同一性について、PTV\_Im1-1 群と PTV\_Ka、Ta 群は、PTV 1 - PTV 13 に対してそれぞれ 75.2 - 79.0% および 66.2 - 70.6% の相同性を示したが、PTV1 - PTV13 間の相同性は 76.5 - 92.1% であった。2C のアミノ酸の配列同一性は、PTV\_Im1-1 群、PTV\_Ka、Ta 群と PTV1 - PTV13 に対する配列同一性が 86.6 - 92.8% および 88.9 - 92.8% であり PTV1 - PTV13 間 (93.2 - 100%) のものよりも低かったが、この 2C のアミノ酸配列の PTV 様と PTV1 - PTV13 の配列同一性は P1、2C、3CD のそれより高かった。PTV1 - PTV13 間では、3C において 93.2 - 100% の配列同一性および 3D において 95.8 - 100% の配列同一性を示したが、PTV\_Im1-1 群および PTV\_Ka、Ta 群と PTV1 - PTV13 間では、71.1 - 81.0% および 71.1 - 81.0% (3C) 83.4 - 86.3% および 83.9 - 86.7% (3D) の配列同一性であった。

これらの結果から、本研究で検出された PTV 様ウイルスは新規 PTV であることが示された。

## 2 ブタサンプル 2

### 2-1 サンプルプール 1~fur seal feces-associated circular DNA virus JPN1 の検出～

#### 2-1-1 コンティグの組み立て

8 頭のブタ糞便核酸 mix サンプルを DSN-NGS 法により NGS 解析した結果、1,767,619 のリードと 1,113 のコンティグが得られた。これらのコンティグを NCBI ウェブサイトの BLSATn プログラムで解析したところ、14 のコンティグが ssDNA ウィルスに相同性を示した。カットオフ値は E-value < 1.0E-5 とした。表 3-2 には各コンティグに対して最も高い相同性を示すウィルス株を記載した。最も低い E-value を示すコンティグ (contig 1002) が、fur seal faeces associated circular DNA virus (FSfaCV) (Accession No. KF246569) に最も高い相同性を示した。

### 2-1-2 全ゲノムの決定

FSfaCV に相同性を示す ssDNA ウィルスの全ゲノム配列を決定するために、NGS から得られた塩基配列情報に基づいて新たに設計したプライマーを用いて Overlapping PCR を行った (data not shown)。PCR プロダクトをサンガーシーケンシングすることによりウィルス全ゲノムの塩基配列を決定した。図 3-8 にレプリケーションタンパク質 (Rep) およびキャプシドタンパク質 (Cap) をコードする 2 つのオープンリーディングフレームを示した。ゲノム全体では FSfaCV の塩基配列と約 92% の相同性を示した。このウィルスを fur seal feces-associated circular DNA virus JPN1 (FSfaCV-J1) と命名し、全ゲノム配列を DDBJ に登録した (Accession No. LC133373)。

### 2-1-3 FSfaCV-J1 の保有率調査

図 3-8 に示すプライマー (1002f ; 5'-ctgtatccgctcgccttgaa-3' および 1002r ; 5'-cggagaatttaaagtcattgtcaac-3') を用いて PCR を実施し、日本の農場のブタにおける FSfaCV-J1 の保有率について検討した。バンドが得られたサンプルではダイレクトシー

ケンシングにより FSfaCV-J1 と一致することを確認した。サンプルプール 1 に使用した 8 頭を含む合計 85 頭の子ブタの糞便から抽出した DNA サンプルについて FSfaCV-J1 の陽性率を検討したところ、65 頭 (76%) のブタで FSfaCV-J1 が検出された。なお、農場間において保有率と塩基配列の有意な差は認められなかった (data not shown)。

## 2-2 サンプルプール 2 ～porcine feces-associated IASV-like virus の検出～

### 2-2-1 コンティグの組み立て

4 頭のブタ糞便核酸 mix サンプルを用いて DSN-NGS 法により NGS 解析した結果、502,419 のリードと 1,628 のコンティグが得られた。これらのコンティグを NCBI ウェブサイトの BLASTn プログラムで解析したところ、そのうち 5 つのコンティグが immunodeficiency-associated stool virus (IASV) (Accession No.KJ003983.1) に相同性を示した (E-value<1.0E-10)。各コンティグの長さは 320、300、285、250、284bp であった (表 3-3)。

### 2-2-2 IASV に相同性を示すフラグメントの増幅

NGS から得られたデータを確認するために、NGS で得られたリードを IASV ゲノム配列にマッピングして得たコンセンサス配列から PCR プライマー (IAS\_F ; 5'-TTGGAGTCCAGGCAAGGTTA-3' および IAS\_R ; 5'-CCTGCAAGTTTACCTGTAGC-3') を設計し、PCR を実施した。電気泳動の結果、4 サンプルすべてに予測サイズ 789bp のバンドが確認された (図 3-9)。4 つの PCR プロダクトから 1 つを任意に選択し、ダイレクトシーケンシングを実施した。得られた塩基配列は、インターネット上の BLASTn によって IASV のゲノム配列と約 70%の相同性を示した。そこで、今回検出

された配列を有する新規ウイルスを porcine feces-associated IASV-like virus (PfaIV) と命名し、その塩基配列を DDBJ に登録した (Accession No.LC318452)。

### 2-2-3 IASV および PfaIV のアライメント

IASV および PfaIV の塩基配列と推定アミノ酸配列をアライメントし、図 3-10 に示した。これらの 2 つのウイルスの推定上のアミノ酸配列は BLASTp アルゴリズムに従うと約 67% の相同性を有していた。IASV と PfaIV のコンセンサスアミノ酸配列の最大連続長は 26 残基であった。BLASTx においてこの推定上のタンパク質の機能を予測したが、結果は得られなかった。

### 2-2-4 PfaIV の保有率調査

日本の農場のブタにおける PfaIV の保有率を調査するために、85 頭分の DNA について IAS\_F および IAS\_R プライマーを用いた PCR を実施し、塩基配列をダイレクトシーケンシングで決定した。ダイレクトシーケンシングで決定した配列が IASV に相同性を示したサンプルを陽性と定義した。85 頭のうち 62 頭 (72.9%) が PfaIV 陽性となり、下痢および健康な便のいずれからも PfaIV 遺伝子断片が検出された (表 3-4)。

## 考 察

本研究では国内の養豚場のブタ糞便から PTV 様ウイルスおよび PfaIV の 2 つの新規ウイルスを検出し、これに FSfaCV-J1 を含めた計 3 つのウイルスを日本で初めて報告した。

新規 PTV は 5 つの養豚場で 7 頭 (3.2%) のブタから検出された。PTV はポリオ脳炎、繁殖障害および胃腸障害を起こすが、健康なブタの糞便中にも検出されることが知られている。PTV が属する *Teschovirus* 属は現在 94 種を含む 40 属 (2018 年 2 月現在) を構成するピコルナウイルス科のメンバーである。現在、ピコルナウイルス科は系統発生的に 6 つのスーパーグループに分けられている。*Teschovirus* 属は、*Aphthovirus*、*Bovivirus*、*Cardiovirus*、*Cosavirus*、*Erbovirus*、*Hunnivirus*、*Mischivirus*、*Mosavirus*、*Senecavirus*、*Torchivirus*、*Aimelvirus*、*Malagasivirus* および *Tottorivirus* (<http://www.picornaviridae>) 属とともにピコルナウイルススーパーグループ 1 に分類されている。*Teschovirus* 属には単一種の *Teschovirus A* のみが属し、現在、この中では交差中和試験において少なくとも異なる 13 の血清型が知られている (Boros et al., 2012, Cano-Gómez et al., 2017, Zell et al., 2001)。

PTV は、約 7.1kb の長さの ssRNA (+) ゲノムを有する非エンベロープウイルスである。PTV ゲノムは、ウイルスゲノム翻訳に必要とされるリーダー (L) タンパク質、構造タンパク質 (VP1~VP4) をコードする P1 領域、および非構造タンパク質である 2A~2C および 3A~3D をコードする P2 領域および P3 領域を含む単一のオープンリーディングフレーム (ORF) から成る。5' UTR は、ウイルスゲノム翻訳に必要な IRES を含む (Chard et al., 2006, Fernandez-Miragall et al., 2009, Pisarev et al., 2003, Kaku

et al., 2001)。現在、IRES は、核酸および構造的な特徴ならびに翻訳開始機構 (Yu et al., 2011, Sweeney et al., 2011) によって 5 つのタイプに分類されている。5' UTR および 3' UTR の一部の配列は相同的な RNA 組換えによって同属内で交換されたと考えられ、1 つの属には同一の IRES 構造が存在するとされる。

本研究では、下痢の有無にかかわらず日本のブタ糞便試料中から新規 PTV を同定した。コード領域のアミノ酸配列全長の系統発生解析により、これらの新たに同定されたウイルスは *Teschovirus A* とは遠く離れており、ピコルナウイルススーパーグループ 1 内の既存の PTV または他の属の株とも同一のクラスターに属しなかった。ピコルナウイルス科のこれらの新規 PTV は IV 型 IRES および保存された特徴的モチーフを共有しているが、既存の PTV 株間でアミノ酸配列の相同性が高く保たれている 3C および 3D (それぞれ 93.2 - 100%, 95.8 - 100%) において PTV 様ウイルスと既存 PTV 株間の配列の相同性は低かった (77.1 - 81.0% および 84.3 - 86.7%)。これらのデータは、新たに同定されたウイルスが *Teschovirus* 属に属するが、新規ウイルスであることを示している。

本章では ssDNA ウイルスゲノムを効率的に検出できる DSN-NGS 法を用いて、2 つのサンプルプールのブタ糞便抽出核酸を解析した。サンプルプール 1 からは circovirus の一種である FSfaCV-J1 を検出した。circovirus はサーコウイルス科に属する環状 ssDNA ウイルスであり、様々な哺乳動物、鳥類、爬虫類、魚類および環境から分離されている (Blinkova et al., 2010, Ng et al., 2009, Rose et al., 2012, Whon et al., 2012, Woods et al., 1994)。ブタの Circovirus の中でも Porcine circovirus 2 (PCV-2) は離乳豚に Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) を引き起こすことが知られているが (Fenaux et al., 2000, Fenaux et al., 2003, Reuter et al., 2014)、それ以

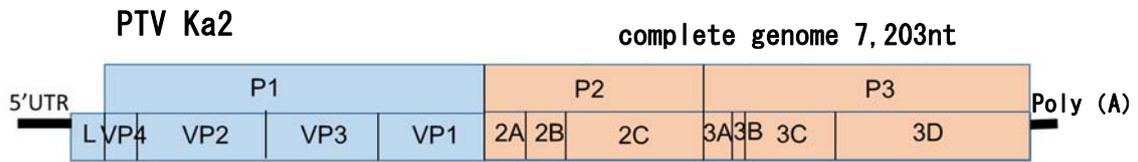
外の circovirus については病原性がないと考えられているため報告は少ない。そのような中、FSfaCV-J1 は本研究における検出が日本で初めての報告となった。ニュージーランドのオットセイの糞便から検出されたウイルスの近縁ウイルスが日本のブタの糞便から検出されたことは非常に興味深いことである。さらに、9 農場 85 頭のブタの糞便から抽出した DNA サンプルについて FSfaCV-J1 の保有率を PCR にて検索したところ、65 頭 (76%) のブタが FSfaCV-J1 陽性であった。このことから FSfaCV-J1 が日本の養豚場に広く蔓延していることが示唆された。FSfaCV については 1 頭のオットセイからの検出報告であり、病原性や他のオットセイにおける陽性率などの情報は得られていない。なぜ、ニュージーランドの水生野生動物と日本の家畜であるブタから同じウイルスが検出されるのか、オットセイの食餌と日本のブタの餌に共通点があるのかなど、不明な点は多い。しかし、日本のブタに広く蔓延しているこのウイルスが何かのきっかけで病原性を持ちうるのかどうかについては注意深く監視していく必要があるかもしれない。

一方、IASV の情報は GenBank 上に unclassified の環状 dsDNA ゲノムを有するゲノム長 99,915bp のウイルスとして示されている (Hemert et al., 2014)。IASV はオランダの病院に受診したヒト免疫不全ウイルスに感染した計 6 名の下痢 / 非下痢の患者の糞便から検出されており (Hemert et al., 2014)、IASV の GenBank データは KJ003983.1 のみである。IASV に相同性を示すいくつかのリードがスウェーデンにおける NGS を用いたブタの糞便抽出核酸解析データ中に見いだされている。しかし、健康なブタ 3 頭から得られたこれらのリードについての塩基配列に関する詳細な情報は報告されていない (Karlsson et al., 2016)。IASV の病原性およびその人獣共通感染症の可能性は不明である。本研究では DSN 処理後のサンプルから PfaIV が検出されたの

で、当初 PfaIV ゲノムは ssDNA であろうと推察していた。しかしながら、IASV は dsDNA ウイルスとして GenBank に登録されていた。そこで、IASV が dsDNA か ssDNA ウイルスであるかを確認するために、PfaIV 含むサンプル中の DNA について dsDNA を切断する制限酵素 (Nde I) で処理した後に、制限酵素部位の外側に新たに設計したプライマーを用いて PCR を実施したところ、PCR プロダクトは得られなかった (data not shown)。それゆえ、PfaIV は dsDNA ゲノムを有する可能性が高いと考えられた。dsDNA ウイルスの PfaIV が DSN 処理をしても検出された理由は、PfaIV の複製中にヘリカーゼ活性によって形成される部分的な ss 構造領域が存在していたためか、あるいは DSN 処理が不十分であったためではないかと推測している。

85 頭のブタにおける PfaIV の保有率は 72.9%であり、サンプルプール 1 における FSfaCV-J1 の 76%とは同じくらい高率であった。PfaIV および FSfaCV-J1 の両方が検出されたブタも多く (data not shown)、両ウイルスに共感染していた可能性が示唆された。糞便の性状 (下痢もしくは軟便、普通便) と糞便中の FSfaCV-J1 および PfaIV の存在との間に明確な相関は示されなかったため、両ウイルスはブタに下痢を起こさない可能性が高いと考えられた。

以上の結果から、DSN-NGS 法は効率的に ssDNA ウイルスを検出できる方法であると同時に、ライブラリー調整のキットの都合で実施困難であった ssDNA ゲノムのハイスループットシーケンシングも可能とする方法であることが示された。



**図 3-1 PTV のゲノム構造**

PTV\_Ka2 は polyprotein 前駆体である 2,217 aa をコードする 6,651 nt を含む単一の ORF を有していた。polyprotein には、構造タンパク質をコードする P1 および非構造タンパク質をコードする P2、P3 が含まれている。5' UTR には IRES を持つ。

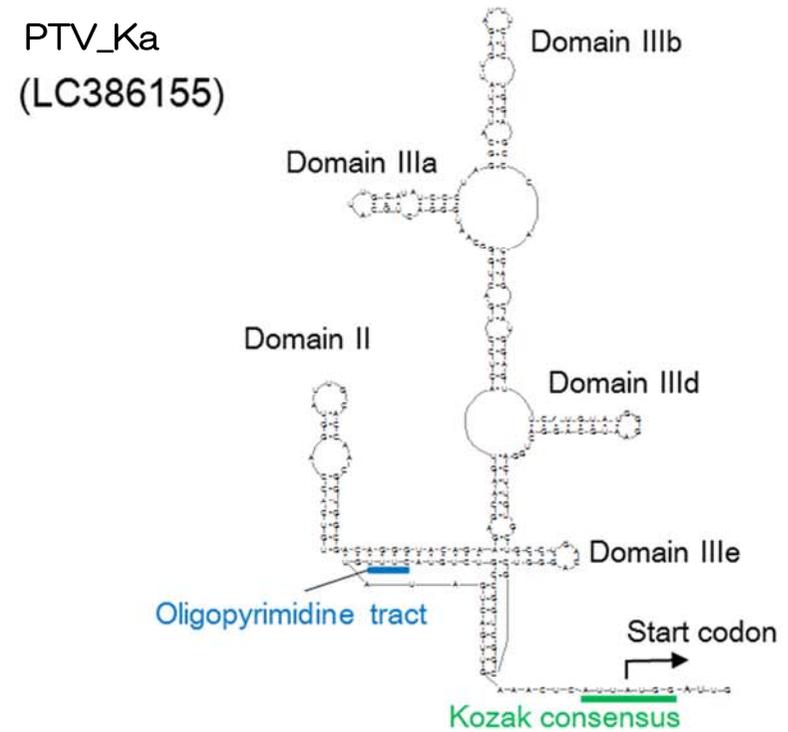
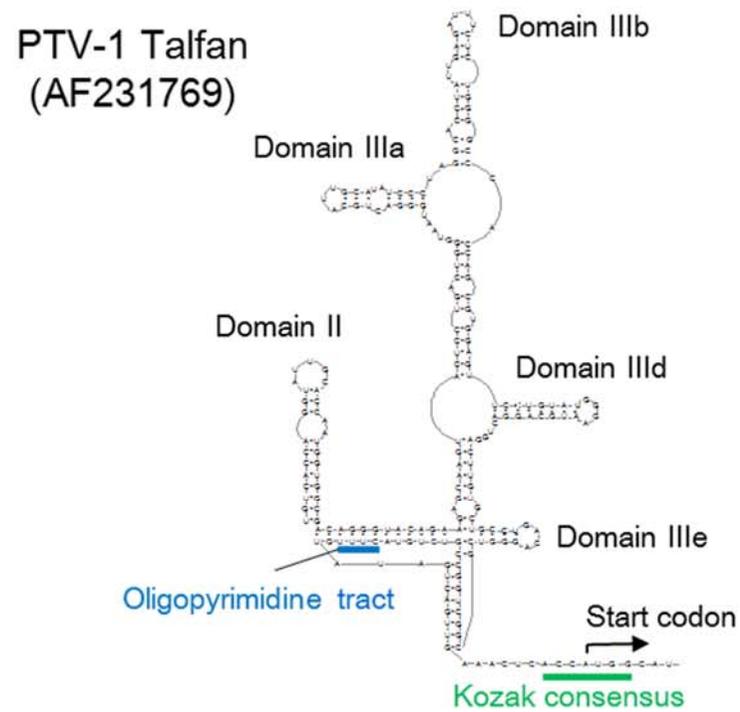


図 3-2 IRES (internal ribosome entry site) の構造解析

mfoldにより予測された IRES の構造を既存 PTV1 Talfan 株と PTV\_JPN/Ishi-Ka2/2005 とで比較した。両者は典型的な IV 型 IRES を有し、その基底領域および頂点は同一であった。

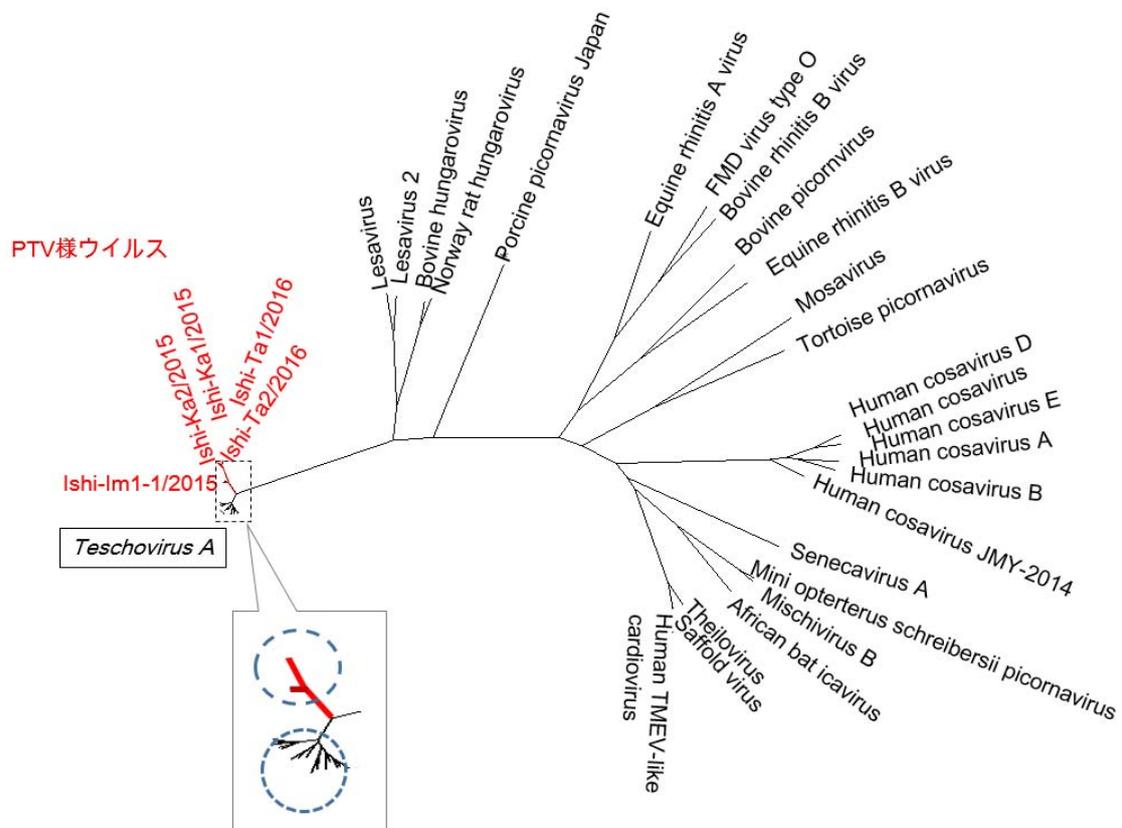


図 3-3 ピコルナウイルススーパーグループ 1 各ウイルスによる系統樹

polyprotein 全長のアミノ酸配列による系統樹。teschovirus の中で PTV 様ウイルスは既存 PTV と異なるクラスターを形成している。

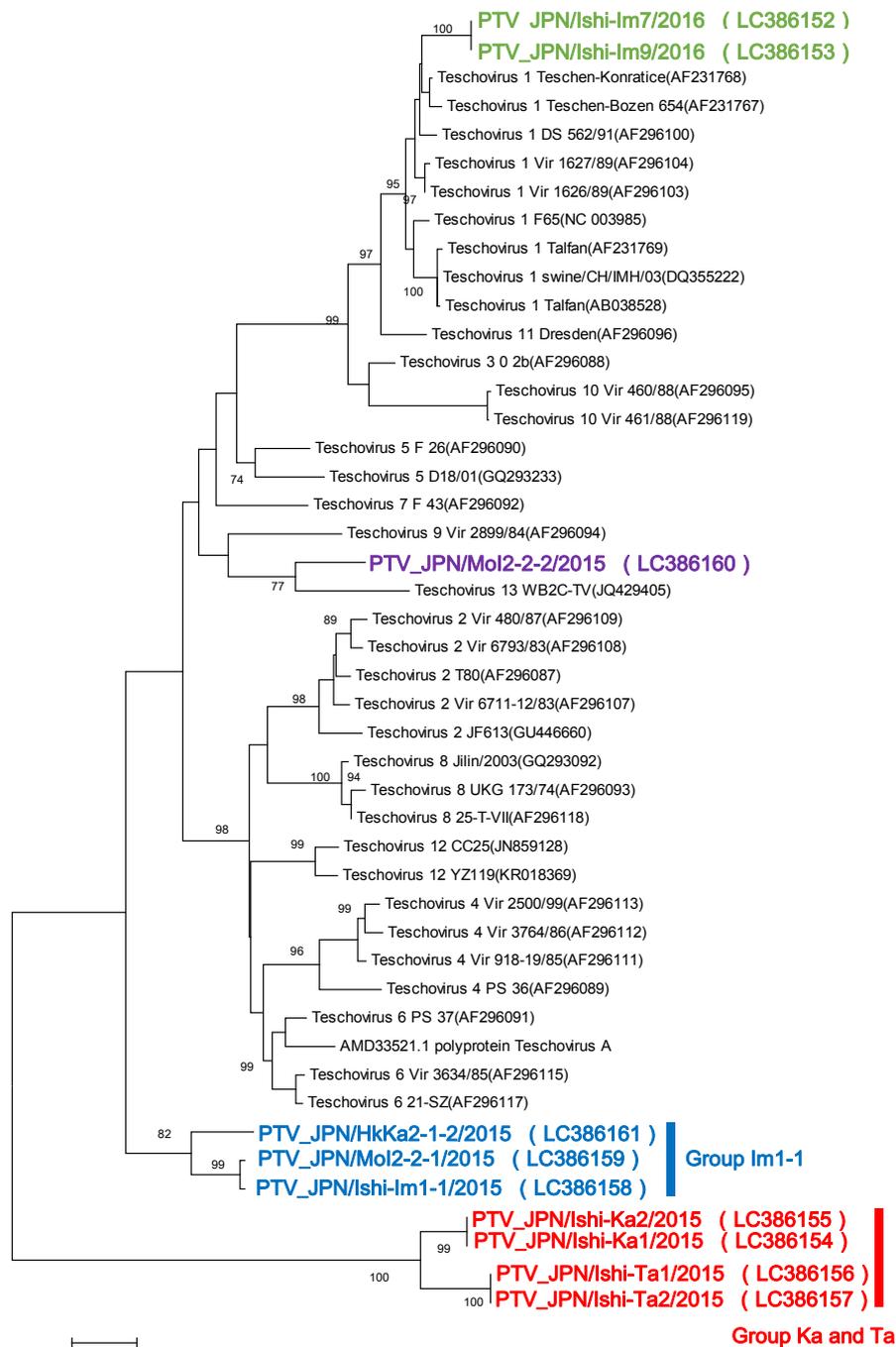


図 3-4 本研究の PTV および PTV 様ウイルスと既存 PTV の系統樹 1

VP1 のアミノ酸配列を使用した。PTV\_HaKka2-1、Mol2-2-1、Ishi-Im1-1 (青色) と PTV\_Ka1、Ka2、Ta1、Ta2 (赤色) で示した PTV 様ウイルスは既存 PTV と全く別のクラスターを形成した。PTV\_Ishi-Im7、Ishi-Im9 (緑)、Mol2-2-2 (紫) は既存 PTV と同じクラスターに分類された。

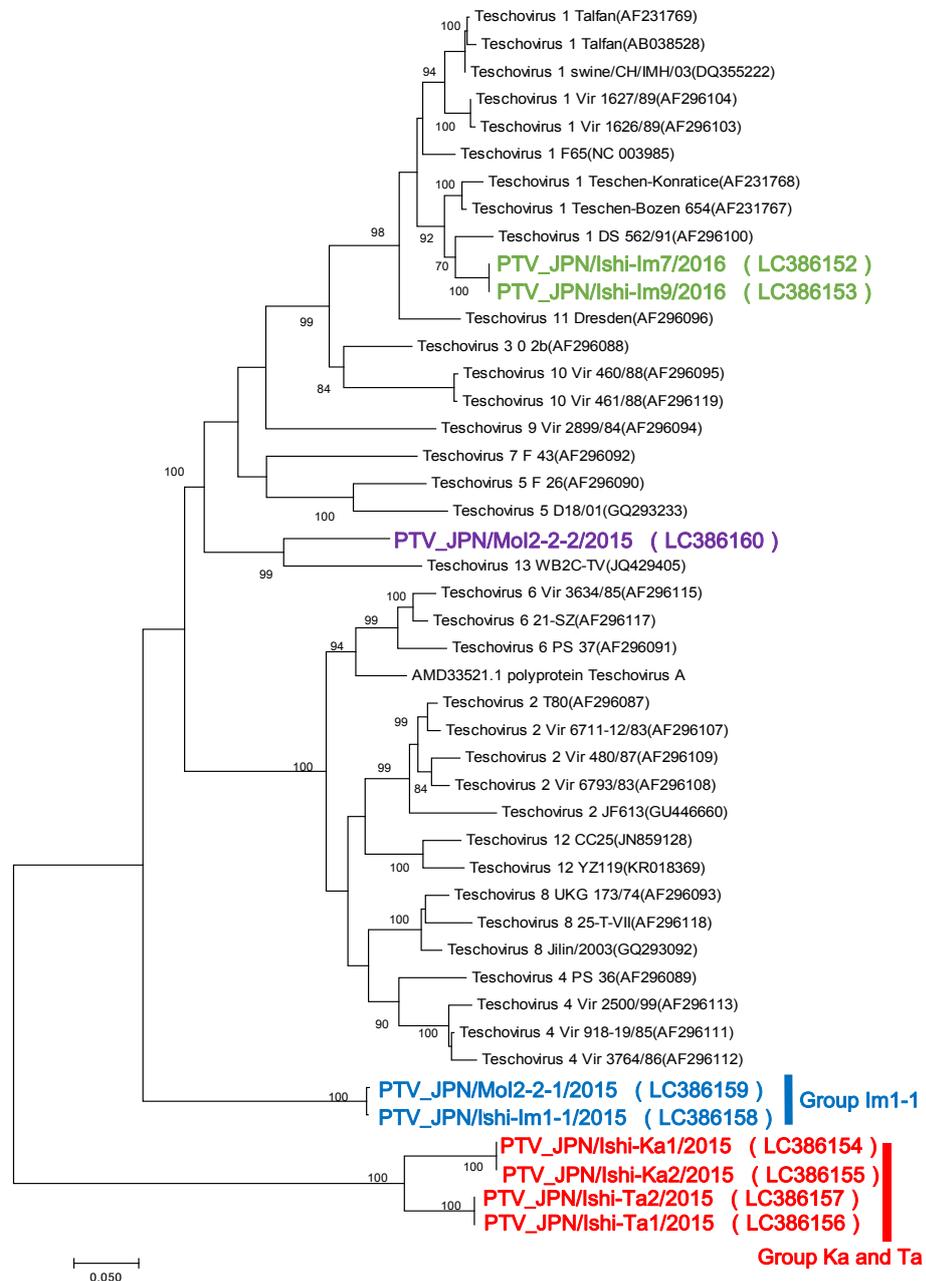


図 3-5 本研究の PTV および PTV 様ウイルスと既存 PTV の系統樹 2

P1 のアミノ酸配列を使用した。PTV\_HaKka2-1、Mol2-2-1、Ishi-Im1-1 (青色) と PTV\_Ka1、Ka2、Ta1、Ta2 (赤色) で示した PTV 様ウイルスは既存 PTV と全く別のクラスターを形成した。PTV\_Ishi-Im7、Ishi-Im9 (緑)、Mol2-2-2 (紫) は既存 PTV と同じクラスターに分類された。

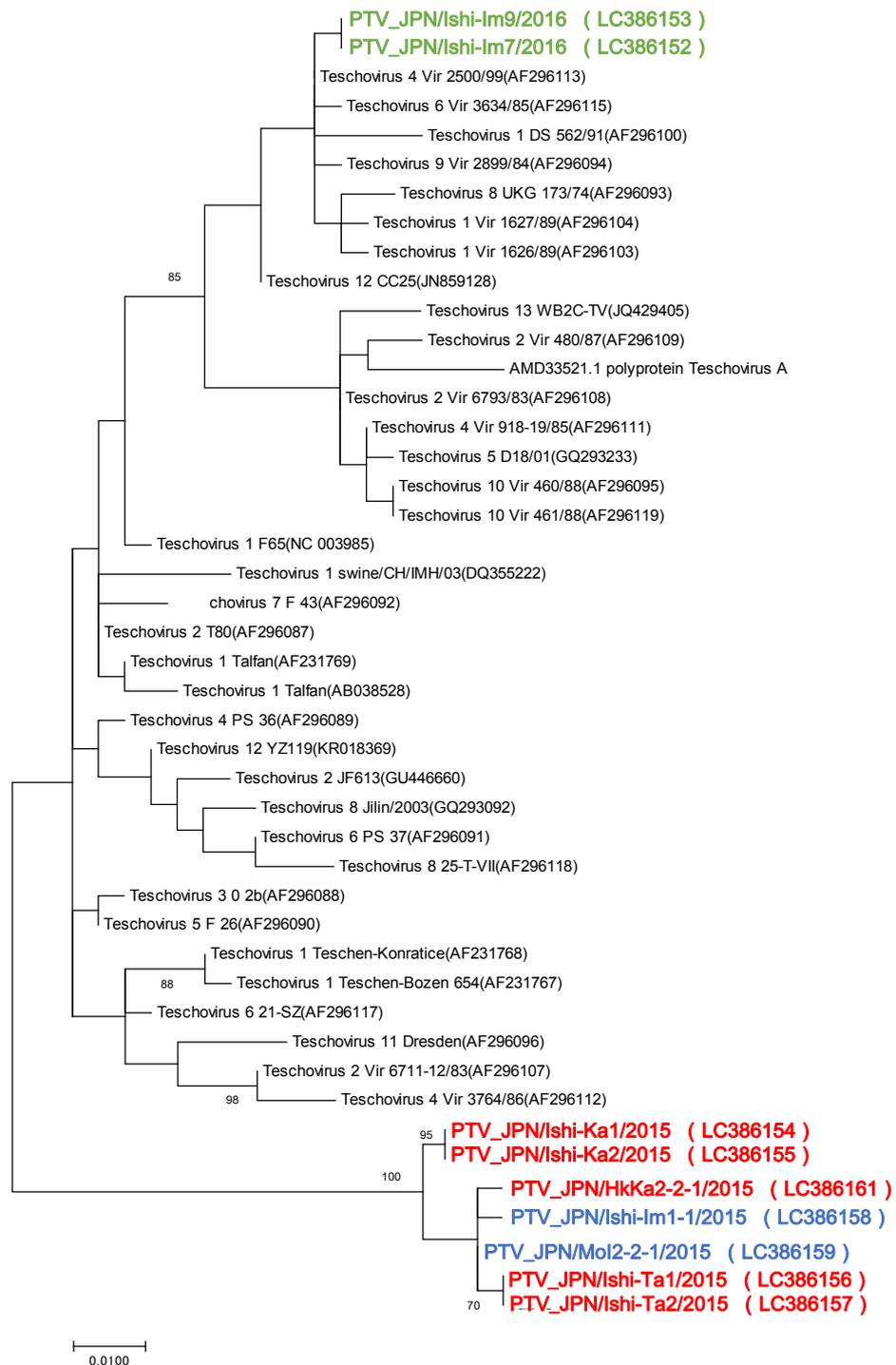


図 3-6 本研究の PTV および PTV 様ウイルスと既存 PTV の系統樹 3

2C のアミノ酸配列を使用した。PTV\_HaKka2-1、Mol2-2-1、Ishi-Im1-1（青色）と PTV\_Ka1、Ka2、Ta1、Ta2（赤色）で示した PTV 様ウイルスは既存 PTV と全く別のクラスターを形成した。PTV\_Ishi-Im7、Ishi-Im9（緑）は既存 PTV と同じクラスターに分類された。

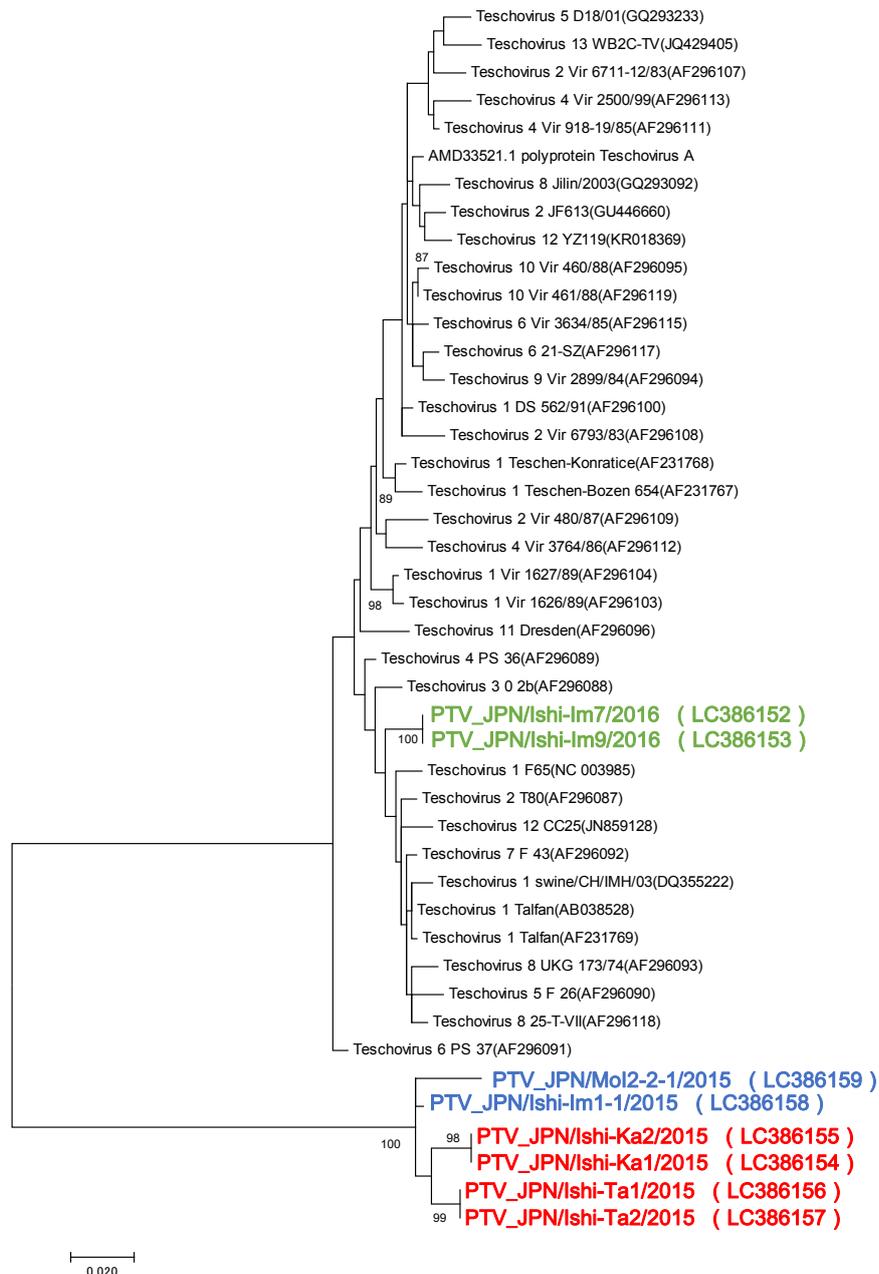


図 3-7 本研究の PTV および PTV 様ウイルスと既存 PTV の系統樹 4

3CD のアミノ酸配列を使用した。PTV\_HaKka2-1、Mol2-2-1、Ishi-Im1-1 (青色) と PTV\_Ka1、Ka2、Ta1、Ta2 (赤色) で示した PTV 様ウイルスは既存 PTV と全く別のクラスターを形成した。PTV\_Ishi-Im7、Ishi-Im9 (緑) は既存 PTV と同じクラスターに分類された。

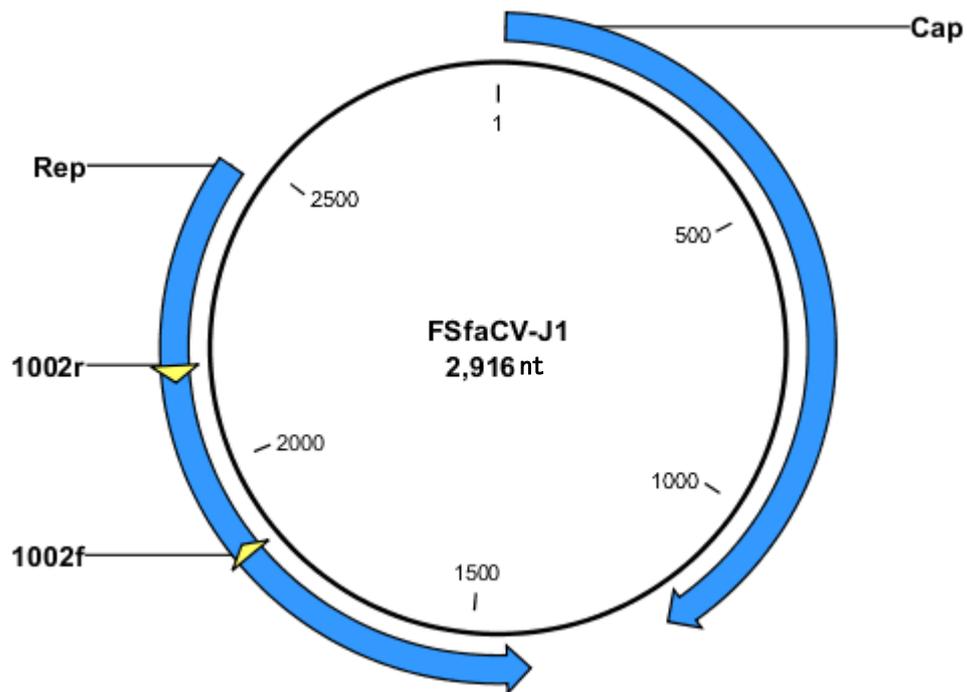
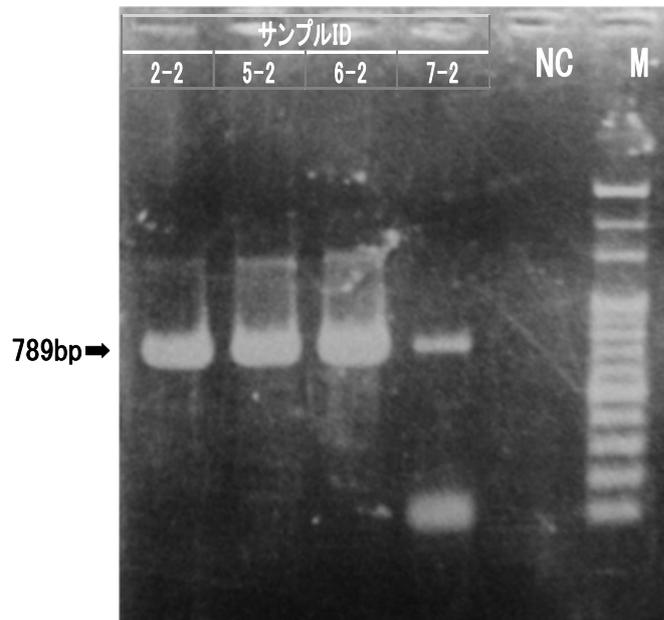


図 3-8 FSfaCV-J1 のゲノム構造

コンティグ内に設計したプライマー 1002 f と 1002 r はオーバーラッピング PCR と FSfaCV-J1 の保有率調査の両方で用いた。



**図 3-9 PfaIV の遺伝子断片検出**

サンプルプール 2 に含まれている 4 頭から PfaIV の遺伝子断片が検出された。

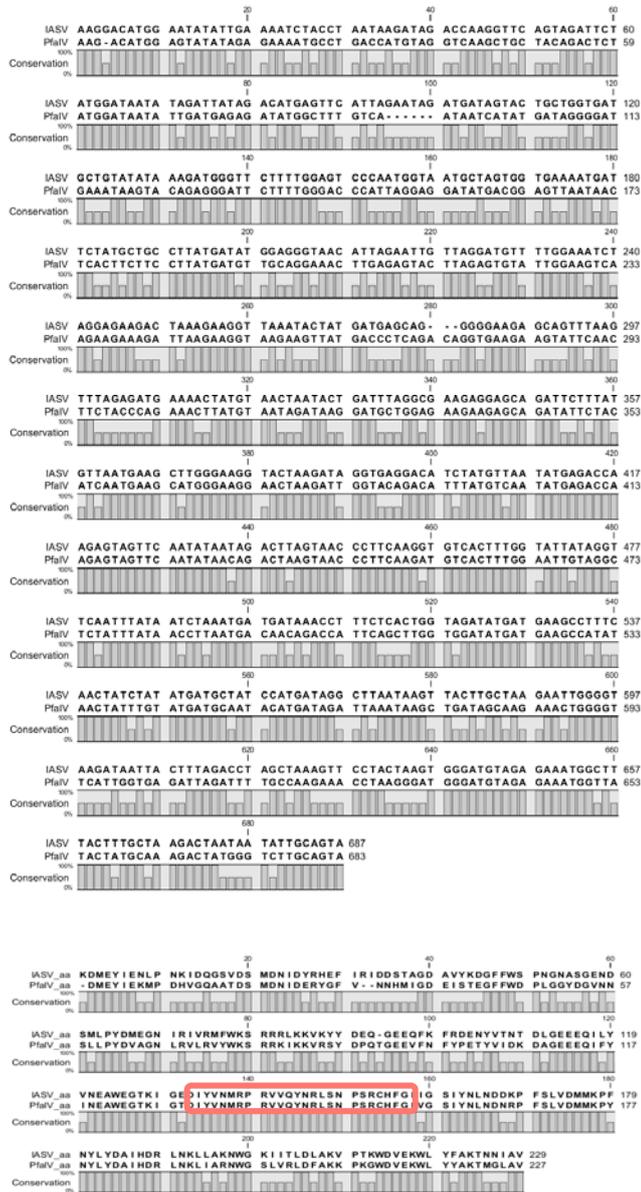


図 3-10 IASV および PfaIV の塩基配列（上）と推定アミノ酸配列（下）のアライメント

IASV と PfaIV の遺伝子断片について、塩基配列とアミノ酸配列をそれぞれ BLASTn と BLASTp アルゴリズムでアライメントした。コンセンサスアミノ酸配列の最大連続長箇所を   で示す。

表 3-1 PTV に相同性を示すコンティグー覧

contig name	Reads and sequences obtained from deep sequencing			DDBJ Accession No.	Co-infection with other viruses
	Total reads	Teschovirus reads	Sequence Length (excluding poly-A)		
JPN/Ishi-Im7/2016	1,554,736	38,424	7,104	LC386152	Sapovirus, Enterovirus G, Posavirus, Rotavirus A
JPN/Ishi-Im9/2016	1,759,264	1,497	7,096	LC386153	Sapovirus, Enterovirus G, Picobirnavirus, Aichivirus C, Rotavirus A
JPN/Ishi-Ka1/2015	1,401,774	4,301	7,138	LC386154	Aichivirus C, Sapelovirus
JPN/Ishi-Ka2/2015	2,678,468	5,215	7,203	LC386155	Aichivirus C, Enterovirus G
JPN/Ishi-Ta1/2016	939,382	1,402	7,163	LC386156	Aichivirus C
JPN/Ishi-Ta2/2016	1,199,614	144,555	7,154	LC386157	Aichivirus C
JPN/Ishi-Im1-1/2015	1,809,416	922	6,820	LC386158	Sapovirus, Porcine astrovirus, Picobirnavirus, Posavirus
JPN/MoI2-2-1/2015	1,495,394	823	6,445	LC386159	Porcine astrovirus, Sapelovirus, Enterovirus G, Rotavirus C
JPN/MoI2-2-2/2015		209	3,342	LC386160	
JPN/HkKa2-1/2015	1,128,024	438	3,663	LC386161	Sapovirus, Porcine astrovirus, Picobirnavirus, Posavirus

表 3-2 ブタサンプル 2 サンプルプール 1 における ssDNA ウイルスに相同性を示すコンティグー覧

contig No.	length	description	Accession No.	E-value
contig 1002	361	Fur seal faeces associated circular DNA virus isolate as50, complete genome	KF246569	1.10E-147
contig 287	352	Fur seal faeces associated circular DNA virus isolate as50, complete genome	KF246569	4.00E-145
contig 913	251	Fur seal faeces associated circular DNA virus isolate as50, complete genome	KF246569	1.70E-114
contig 314	322	Porcine stool-associated circular virus 2 isolate TP3, complete genome	KJ577818	1.70E-112
contig 262	361	Porcine stool-associated circular virus 3 isolate L2T, complete genome	KC545230	1.75E-63
contig 249	1185	Porcine stool-associated circular virus 2 isolate TP3, complete genome	KJ577818	3.09E-60
contig 691	269	Fur seal faeces associated circular DNA virus isolate as50, complete genome	KF246569	8.37E-33
contig 415	837	Odonata-associated circular virus-17 isolate OdasCV-17-US-1619LM1-12, complete genome	KM598400	5.12E-24
contig 98	663	Po-Circo-like virus 21, complete genome	JF713716	1.95E-22
contig 1	254	Fur seal faeces associated circular DNA virus isolate as50, complete genome	KF246569	7.85E-21
contig 80	889	Dromedary stool-associated circular ssDNA virus isolate DcSCV_c1566, complete genome	KM573776	8.36E-13
contig 280	556	Fur seal faeces associated circular DNA virus isolate as50, complete genome	KF246569	9.10E-13
contig 79	884	Dromedary stool-associated circular ssDNA virus isolate DcSCV_c1566, complete genome	KM573776	4.33E-10
contig 269	355	Fur seal faeces associated circular DNA virus isolate as50, complete genome	KF246569	1.64E-09

(cut off E-value < 1.0E-5)

表 3-3 ブタサンプル 2 サンプルプール 2 におけるウイルスに相同性を示すコンティグー覧

contig No.	length	description	Accession No.	E-value
contig 1386	320	IAS virus, complete genome	KJ003983.1	1.34E-52
contig 1536	300	IAS virus, complete genome	KJ003983.1	5.57E-37
contig 470	957	Porcine serum-associated circular virus isolate BR6, complete genome	KU203356.1	3.71E-32
contig 1408	285	IAS virus, complete genome	KJ003983.1	3.02E-26
contig 1309	250	IAS virus, complete genome	KJ003983.1	4.73E-17
contig 268	284	IAS virus, complete genome	KJ003983.1	6.88E-13
contig 1462	252	Gokushovirus WZ-2015a isolate 33Mky03, complete genome	KT264781.1	3.97E-12
contig 1474	268	IAS virus, complete genome	KJ003983.1	5.90E-10

(cut off E-value < 1.0E-10)

表 3-4 国内ブタにおける PfaIV 遺伝子の保有頭数と便性状

	diarrhea	healthy	Total
PfaIV(+)	23	39	62
PfaIV(-)	9	14	23
Total	32	53	85

(number of heads)

## 総括

本研究では、生物学のさまざまな分野で広く使用されているハイスループットシーケンシングを利用してウイルスゲノム検出を行った。同時に、ターゲットウイルスゲノム検出のためのハイスループットシーケンシングが、血液や糞便などの臨床サンプルを用いた場合に宿主のゲノムがウイルスゲノムの検出を妨げる等の理由からその能力を発揮しきれないことがあるという問題点を解決するために、新しいサンプル前処理方法を開発し野生のコウモリおよび家畜のブタの糞便サンプルから新規・希少ウイルスを検出した。

第一章ではウイルスをゲノム性状から ssDNA ウイルス・dsDNA ウイルス・ssRNA ウイルス・dsRNA ウイルスの 4 種類に分けることで、それぞれをターゲットとするサンプルの前処理方法を個別に実施すればより効率的にターゲットウイルスゲノムを獲得し得るであろうことに着目し、この 4 種類の中で特に ssDNA ウイルスゲノムを効率的にサンプルから検出するための前処理方法である DSN-NGS 法を開発し、その有用性を検証した。NGS はライブラリー調整キットの都合上、基本的に ssDNA ゲノムをシーケンシングすることができない。DSN-NGS 法はこの問題点を解消しつつ効率的に ssDNA ウイルスゲノムを検出できることを明らかにした。さらに、dsDNA ウイルスを含めたウイルスの検出方法として、multiplex PCR-NGS 法を開発した。この方法は、鳥類および哺乳類に感染の可能性のあるウイルス属 137 属について約 700 本の multiplex PCR 用プライマーを設計し、multiplex PCR のプロダクトをハイスループットシーケンシングすることで効率的にウイルスゲノムの断片を検出する方法である。ブタの糞便を用いて、この方法の有用性を示した。

第二章では、コウモリの糞便やコウモリを吸血するダニから、本研究で開発した multiplex PCR-NGS 法と従来の NGS 法を用いて、EMCV および STV を検出した。EMCV は台湾で採取したユビナガコウモリ (*Miniopterus fuliginosus*) の糞便から検出された。EMCV はヒトへの感染の危険もあるウイルスである。さらに、日本と韓国の洞窟から採取したサンプルからも EMCV が検出された。これらの結果は、台湾、韓国および日本のユビナガコウモリが EMCV を保有していることを示唆しており、ユビナガコウモリは東アジアで広く EMCV の自然宿主の 1 つである可能性がある。新興感染症の原因ウイルスのレゼルボアとして注目されているコウモリからこのようなウイルスが発見されたことは公衆衛生上、非常に重要である。また、国内のコウモリコロニーの生息場所から採取されたコウモリマルヒメダニからウイルス分離した培養上清サンプルから検出された STV は、系統解析の結果、ブニヤウイルス科 Nairovirus 属の Issyk-kul virus というヒトに発熱等の症状を示すウイルスに最も近縁であることを明らかにした。このウイルスがダニやコウモリ、その他の哺乳類等に対して病原性を示すかは不明である。しかし、培養細胞に細胞傷害性を示したことから、何らかの宿主に対して病原性を示す可能性は否定できない。今後、実験動物を用いて明らかにする必要がある。

第三章では、ブタの糞便から従来の NGS 法と DSN-NGS 法を用いて、新しい porcine teschovirus (PTV) と日本で初めての報告となる fur seal feces-associated circular DNA virus JPN1 (FSfaCV-J1) および porcine feces-associated IASV-like virus (PfaIV) を発見した。FSfaCV-J1 および PfaIV は、日本の養豚場に広く蔓延していることも明らかとなった。PTV はポリオ脳炎、繁殖障害および胃腸障害を起こすが、健康なブタの糞便中にも検出されることが知られている。新しい PTV の病原

性は全く不明であるため、更なる研究が求められる。FSfaCV-J1 および PfaIV に病原性がある可能性は今のところは低い。しかし、広く日本の養豚場に蔓延している両ウイルスが何かのきっかけで病原性を持ちうるのかどうかについては注意深く監視していく必要がある。

以上のように、本研究では、動物の検体から NGS を用いてウイルスを検出する際の問題点を DSN-NGS 法と multiplex PCR-NGS 法という 2 つの新しいサンプル前処理方法を開発することによって解決し、従来の方法とこれらの新規方法を用いてコウモリとブタから新規・希少ウイルスを検出した。また、これによりコウモリやブタにはまだ知られていないウイルスが相当数存在している可能性が示された。このことは、新興ウイルス感染症発生の脅威は常にあることを明らかにしたといえるだろう。今回ブタで発見されたウイルスは、今のところどれもブタに症状を引き起こしたり、人へ感染したりする可能性は低いと考えられるが、これらのウイルスが変異を起こすことによりブタに重篤な症状を引き起こしたり、人獣共通ウイルス感染症の原因になる可能性は否定できない。また、コウモリは多様なウイルスのレゼルボアとして知られているが、今回コウモリおよびコウモリに付着するダニから発見されたウイルスはいずれも人への感染、発症の可能性が否定できないウイルスであった。コウモリの保有するウイルスが家畜に感染することが新興ウイルス感染症発生の原因の一つと言われている (Banyard et al., 2014, Plowright et al., 2015) ことから、今後も、本研究で開発した方法などを用いて、コウモリやブタなどに感染しているウイルスを網羅的に検出しその情報を蓄積することは、新たなウイルス感染症の防疫に重要であると考えられる。

## 謝辞

本論文を作成するにあたり、ご指導ご鞭撻を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科実験動物学研究室教授 久和茂先生に深甚の謝辞を表します。

各実験の実施やデータ解析等にあたっては、名古屋大学農学部資源生物科学科動物形態学研究室教授 本道栄一先生、山口大学共同獣学部獣医微生物学分野教授 前田健先生、麻布大学獣医学部獣医学科伝染病学研究室教授 長井誠先生、東京農工大学獣医微生物学研究室准教授 古谷哲也先生、国立感染症研究所細菌第1部 川端寛樹先生、国立感染症研究所ウイルス1部 安藤秀二先生、鳥取県倉吉家畜保健衛生所 増田恒幸先生、岐阜大学大学院連合獣医学研究科准教授 大谷賢司先生、 Department of Microbiology and Immunology, The University of Texas Medical Branch at Galveston, Dr. Shinji Makino, Centre for Infection and Immunity, Mailman School of Public Health, Columbia University, Dr. Atsushi Okumura を始めとする多くの方々から多大なご協力を頂きました。心より感謝申し上げます。

最後に本研究を遂行するにあたり、日頃からご指導ご鞭撻を賜りました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教授 水谷哲也先生、准教授 大松勉先生並びに同センター職員の皆さまおよび学生諸氏に謹んで感謝の意を表します。

## 参考文献

- Albas, A., Campos, A. C., Araujo, D. B., Rodrigues, C. S., Sodre, M. M., Durigon, E. L., Favoretto, S. R., 2011. Molecular characterization of rabies virus isolated from non-haematophagous bats in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 44, 678-683.
- Almeida, M. F., Favoretto, S. R., Martorelli, L. F., Trezza-Netto, J., Campos, A. C., Ozahata, C. H., Sodre, M. M., Kataoka, A. P., Sacramento, D. R., Durigon, E. L., 2011. Characterization of rabies virus isolated from a colony of *Eptesicus furinalis* bats in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 53, 31-37.
- Almeida, M. F., Martorelli, L. F. A., Aires, C. C., Sallum, P. C., Durigon, E. L., Massad, E., 2005. Experimental rabies infection in haematophagous bats *Desmodus rotundus*. *Epidemiol Infect.* 133, 523-527.
- Anindita, P. D., Sasaki, M., Setiyono, A., Handharyani, E., Orba, Y., Kobayashi, S., Rahmadani, I., Taha, S., Adiani, S., Subangkit, M., Nakamura, I., Sawa, H., Kimura, T., 2015. Detection of coronavirus genomes in moluccan naked-backed fruit bats in Indonesia. *Arch Virol.* 160, 1113-1118.
- Annan, A., Baldwin, H. J., Corman, V. M., Klose, S. M., Owusu, M., Nkrumah, E. E., Badu, E. K., Anti, P., Agbenyega, O., Meyer, B., Oppong, S., Sarkodie, Y. A., Kalko,

E. K., Lina, P. H., Godlevska, E. V., Reusken, C., Seebens, A., Gloza-Rausch, F., Vallo, P., Tschapka, M., Drosten, C., Drexler, J. F., 2013. Human betacoronavirus 2c emc/2012-related viruses in bats, Ghana and Europe. *Emerg Infect Dis.* 19, 456-459.

Anthony, S. J., Gilardi, K., Menachery, V. D., Goldstein, T., Ssebide, B., Mbabazi, R., Navarrete-Macias, I., Liang, E., Wells, H., Hicks, A., Petrosov, A., Byarugaba, D. K., Debbink, K., Dinnon, K. H., Scobey, T., Randell, S. H., Yount, B. L., Cranfield, M., Johnson, C. K., Baric, R. S., Lipkin, W. I., Mazet, J. A., 2017. Further evidence for bats as the evolutionary source of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *mBio.* 8, e00373-17.

Anthony, S. J., Ojeda-Flores, R., Rico-Chavez, O., Navarrete-Macias, I., Zambrana-Torrel, C. M., Rostal, M. K., Epstein, J. H., Tipps, T., Liang, E., Sanchez-Leon, M., Sotomayor-Bonilla, J., Aguirre, A. A., Avila-Flores, R., Medellin, R. A., Goldstein, T., Suzan, G., Daszak, P., Lipkin, W. I., 2013. Coronaviruses in bats from Mexico. *J Gen Virol.* 94, 1028-1038.

Atkinson, B., Marston, D. A., Ellis, R. J., Fooks, A. R., Hewson, R., 2015. Complete Genomic Sequence of Issyk-Kul Virus. *Genome Announc.* 3, e00662-15.

- Banyard, A. C., Evans, J. S., Luo, T. R., Fooks, A. R., 2014. Lyssaviruses and bats: emergence and zoonotic threat. *Viruses*. 6, 2974-2990.
- Billinis, C., Leontides, L., Psychas, V., Spyrou, V., Kostoulas, P., Koenen, F., Papadopoulos, O., 2004. Effect of challenge dose and age in experimental infection of pigs with encephalomyocarditis virus. *Vet Microbiol*. 99, 187-195.
- Blinkova, O., Victoria, J., Li, Y., Keele, B. F., Sanz, C., Ndjango, J. B. N., Peeters, M., Travis, D., Lonsdorf, E.V., Wilson, M. L., Pusey, A. E., Hahn, B. H. and Delwart, E. L. 2010. Novel circular DNA viruses in stool samples of wild-living chimpanzees. *J Gen Virol*. 91, 74-86.
- Blome, S., Staubach, C., Henke, J., Carlson, J., Beer, M. 2017. Classical Swine Fever- An Updated Review. *Viruses*. 9, pii: E86.
- Breed, A. C., Breed, M. F., Meers, J., Field, H. E., 2011. Evidence of endemic hendra virus infection in flying-foxes (*Pteropus conspicillatus*) --implications for disease risk management. *PLoS One*. 6, e28816.
- Boros, Nemes, C., Pankovics, P., Kapusinszky, B., Delwart, E., Reuter, G., 2012. Porcine teschovirus in wild boars in Hungary. *Arch. Virol*. 157, 1573-1578.

Cano-Gómez, C., Fernández-Pinero, J., García-Casado, M.A., Zell, R., Jiménez-Clavero, M. A., 2017. Characterization of PTV-12, a newly described porcine teschovirus serotype: in vivo infection and cross-protection studies. *J Gen. Virol.* 98, 1636–1645.

Chen, Y. N., Phuong, V. N., Chen, H. C., Chou, C. H., Cheng, H. C., Wu, C. H., 2016. Detection of the severe acute respiratory syndrome-related coronavirus and alphacoronavirus in the bat population of Taiwan. *Zoonoses Public Health.* 63, 608-615.

Calisher, C. H., Childs, J. E., Field, H. E., Holmes, K. V., Schountz, T., 2006. Bats: Important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin Microbiol Rev.* 19, 531-545.

Carocci, M., Bakkali-Kassimi, L., 2012. The encephalomyocarditis virus. *Virulence.* 3, 351-367

Chard, L. S., Kaku, Y., Jones, B., Nayak, A., Belsham, G. J., 2006. Functional analyses of RNA structures shared between the internal ribosome entry sites of hepatitis C virus and the picornavirus porcine teschovirus 1 Talfan. *J Virol.* 80, 1271–1279.

Constantine, D. G., 2003. Geographic translocation of bats: Known and potential problems. *Emerg Infect Dis.* 9, 17-21.

Davis, A. D., Gordy, P. A., Bowen, R. A., 2013a. Unique characteristics of bat rabies viruses in big brown bats (*Eptesicus fuscus*) . *Arch Virol.* 158, 809-820.

Davis, A. D., Jarvis, J. A., Pouliott, C., Rudd, R. J., 2013b. Rabies virus infection in *Eptesicus fuscus* bats born in captivity (naive bats) . *PLoS One.* 8, e64808.

De Nys, H. M., Kingebeni, P. M., Keita, A. K., Butel, C., Thaurignac, G., Villabona-Arenas, C. J., Lemarcis, T., Geraerts, M., Vidal, N., Esteban, A., Bourgarel, M., Roger, F., Leendertz, F., Diallo, R., Ndimbo-Kumugo, S. P., Nsio-Mbeta, J., Tagg, N., Koivogui, L., Toure, A., Delaporte, E., Ahuka-Mundeke, S., Tamfum, J. M., Mpoudi-Ngole, E., Ayouba, A., Peeters, M., 2018. Survey of ebola viruses in frugivorous and insectivorous bats in Guinea, Cameroon, and the Democratic Republic of the Congo, 2015-2017. *Emerg Infect Dis.* 24, 2228-2240.

Duke, G. M., Hoffman, M. A., Palmenberg, A. C., 1992. Sequence and structural elements that contribute to efficient encephalomyocarditis virus RNA translation. *J Virol.* 66, 1602-1609.

Felsenstein, J., 1995. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791

Fenaux, M., Halbur, P. G., Gill, M., Toth, T. E. Meng, X. J., 2000. Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2, *J. Clin. Microbiol.* 38, 2494–2503.

Fenaux, M., Opriessnig, T., Halbur, P. G., Meng, X. J., 2003. Immunogenicity and pathogenicity of chimeric infectious DNA clones of pathogenic porcine circovirus type 2 (PCV2) and nonpathogenic PCV1 in weanling pigs. *J. Virol.* 77, 11232–11243.

Fernández-Miragall, O., de López Quinto, S., Martínez-Salas, E., 2009. Relevance of RNA structure for the activity of picornavirus IRES elements. *Virus Res.* 139, 172–182.

Geoch, D. J. M. C, Dolan, A., Ralph, A. C., 2000. Toward a comprehensive phylogeny for mammalian and avian herpesviruses. *J Virol.* 74, 10401–10406.

Han, H. J., Wen, H. L., Zhou, C. M., Chen, F. F., Luo, L. M., Liu, J. W., Yu, X. J., 2015.

Bats as reservoirs of severe emerging infectious diseases. *Virus Res.* 205, 1-6.

Hemert, F. J., Chung, K., Cotton, M., Snijders, F., Sol, C. J., van der Hoek, L., 2014.

Unexplained diarrhoea in HIV-1 infected individuals. *BMC Infect Dis.* 14, 22.

Horne, K. M., Vanlandingham, D. L., 2014. Bunyavirus-vector interactions. *Viruses.*

13, 4373-4397.

Iida, K., Kobayashi, R., Hengjan, Y., Nagata, N., Yonemitsu, K., Nunome, M., Kuwata,

R., Suzuki, K., Ichiyanagi, K., Maeda, K., Ohmori, Y., Hondo, E., 2017. The genetic diversity of d-loop sequences in eastern bent-winged bats (*Miniopterus fuliginosus*)

living in Wakayama prefecture, Japan. *J Vet Med Sci.* 79, 1142-1145.

Ito, M., Kuroda, M., Masuda, T., Akagami, M., Haga, K., Tsuchiaka, S., Kishimoto,

M., Naoi, Y., Sano, K., Omatsu, T., Katayama, Y., Oba, M., Aoki, H., Ichimaru, T., Mukono, I., Ouchi, Y., Yamasato, H., Shirai, J., Katayama, K., Mizutani, T., Nagai,

M., 2017. Whole genome analysis of porcine astroviruses detected in Japanese pigs reveals genetic diversity and possible intra-genotypic recombination. *Infect Genet Evol.* 50, 38-48.

- Jimba, M., Takeshima, S., Matoba, K., Endoh, D., Aida, Y., 2010. BLV-CoCoMo-qPCR :  
Quantitation of bovine leukemia virus proviral load using the CoCoMo algorithm,  
*Retrovirology*. 7, 91.
- Kaku, Y., Chard, L. S., Inoue, T., Belsham, G. J., 2001. Unique characteristics of a  
picornavirus internal ribosome entry site from the porcine teschovirus-1 talfan. *J.*  
*Virology*. 76, 11721–11728.
- Karlsson, O. E., Larsson, J., Hayer, J., Berg, M., Jacobson, M., 2016. The intestinal  
eukaryotic virome in healthy and diarrhoeic neonatal piglets. *PLoS One*. 11,  
e0151481.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics  
Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*. 33, 1870-1874.
- Lau, S. K., Woo, P. C., Lai, K. K., Huang, Y., Yip, C. C., Shek, C. T., Lee, P., Lam, C.  
S., Chan, K. H., Yuen, K. Y., 2011. Complete genome analysis of three novel  
picornaviruses from diverse bat species. *J Virol*. 85, 8819-8828.
- Li, W., Shi, Z., Yu, M., Ren, W., Smith, C., Epstein, J. H., Wang, H., Crameri G., Hu,  
Z., Zhang, H., Zhang, J., McEachern, J., Field, H., Daszak, P., Eaton, B. T., Zhang,

- S., Wang, L. F., 2005. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science*. 310, 676-679.
- Lien, Y. Y., Huang, C. H., Sun, F. C., Sheu, S. C., Lu, T. C., Lee, M. S., Hsueh, S. C., Chen, H. J., Lee, M. S., 2012. Development and characterization of a potential diagnostic monoclonal antibody against capsid protein VP1 of the chicken anemia virus. *J Vet Sci*. 13, 73-79.
- Liu, H., He, X., Song, X., Xu, L., Zhang, Y., Zhou, G., Zhu, W., Chang, C., Yin, Z., Shi, Y., Wang, C., Chang, H., 2016. Isolation and molecular and phylogenetic analyses of encephalomyocarditis virus from wild boar in central China. *Infect Genet Evol*. 40, 67-72.
- Liu, H., Li, Y., Zhang, G., Sang, S., Wang, C., Chang, H., 2017. Complete genome sequences and phylogenetic analysis of encephalomyocarditis virus strains isolated from pigs and rats origin. *Infect Genet Evol*. 55, 277-280.
- Luk, H. K. H., Li, X., Fung, J., Lau, S. K. P., Woo, P. C. Y., 2019. Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of SARS coronavirus. *Infect Genet Evol*. 71, 21-30.

- Liu Y., Li Q., Hu W., Wu J., Wang Y., Mei L., Walker D.H., Ren J., Wang Y., Yu X.J., 2012. Person-to-person transmission of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12, 156-160.
- Luo, Y. K., Liang, L., Tang, Q. H., Zhou, L., Shi, L. J., Cong, Y. Y., Lin, W. C., Cui, S. J., 2017. Isolation and characterization of encephalomyocarditis virus from dogs in China. *Sci Rep.* 7, 438.
- Mendenhall, I. H., Wen, D. L. H., Jayakumar, J., Gunalan, V., Wang, L., Mauer-Stroh, S., Su, Y. C. F., Smith, G. J. D., 2019. Diversity and evolution of viral pathogen community in Cave Nectar Bats (*Eonycteris spelaea*). *Viruses.* 11, 250.
- Mandl, J. N., Schneider, C., Schneider, D. S., Baker, M. L., 2018. Going to bat(s) for studies of disease tolerance. *Front Immunol.* 9, 2112.
- Mészáros, I., Olasz, F., Cságola, A., Tijssen, P., Zádori, Z., 2017. Biology of Porcine parvovirus (Ungulate parvovirus 1). *Viruses.* 9, 393.
- Nagai, M., Shimada, S., Fujii, Y., Moriyama, H., Oba, M., Katayama, Y., Tsuchiaka, S., Okazaki, S., Omatsu, T., Furuya, T., Koyama, S., Shirai, J., Katayama, K., Mizutani, T., 2015. H2 genotypes of G4P[6], G5P[7], and G9[23] porcine rotaviruses show super-short RNA electropherotypes. *Vet Microbiol.* 176, 250–256.

Nahar, N., Asaduzzaman, M., Sultana, R., Garcia, F., Paul, R. C., Abedin, J, Sazzad, H. M. S., Rahman, M., Gurley, E. S., Luby, S. P., 2017. A large-scale behavior change intervention to prevent Nipah transmission in Bangladesh: components and costs. *BMC Res Notes*. 10, 225.

Naoi, Y., Kishimoto, M., Masuda, T., Ito, M., Tsuchiaka, S., Sano, K., Yamasato, H., Omatsu, T., Aoki, H., Furuya, T., Katayama, Y., Oba, M., Okada, T., Shirai, J., Mizutani, T., Nagai, M., 2016. Characterization and phylogenetic analysis of a novel picornavirus from swine feces in Japan. *Arch Virol*. 6, 1685-1690.

Ng, T. F. F., Manire, C., Borrowman, K., Langer, T., Ehrhart, L. and Breitbart, M., 2009. Discovery of a novel single-stranded DNA virus from a sea turtle fibropapilloma by using viral metagenomics. *J Virol*. 83, 2500–2509.

Niira, K., Ito, M., Masuda, T., Saitou, T., Abe, T., Komoto, S., Sato, M., Yamasato, H., Kishimoto, M., Naoi, Y., Sano, K., Tuchiaka, S., Okada, T., Omatsu, T., Furuya, T., Aoki, H., Katayama, Y., Oba, M., Shirai, J., Taniguchi, K., Mizutani, T., Nagai, M., 2016. Whole genome sequences of Japanese porcine species C rotaviruses reveal a high diversity of genotypes of individual genes and will contribute to a comprehensive, generally accepted classification system. *Infect Genet Evol*. 44, 106-113.

Noteborn, M. H., Koch, G., 1995. Chicken anaemia virus infection: molecular basis of pathogenicity. *Avian Pathol.* 24, 11-31.

Oba M., Tsuchiaka S., Omatsu T., Katayama Y., Otomaru K., Hirata T., Aoki H., Murata Y., Makino S., Nagai M., Mizutani T., 2018. A new comprehensive method for detection of livestock-related pathogenic viruses using a target enrichment system. *Biochem Biophys Res Commun.* 495, 1871-1877.

Pisarev, A. V., Chard, L. S., Kaku, Y., Johns, H. L., Shatsky, I. N., Belsham, G. J., 2003. Functional and structural similarities between the internal ribosome entry sites of hepatitis C virus and porcine teschovirus, a picornavirus. *J Virol.* 78, 4487–4497.

Plowright, R. K., Eby, P., Hudson, P. J., Smith, I. L., Westcott, D., Bryden, W. L., Middleton, D., Reid, P. A., McFarlane, R. A., Martin, G., Tabor, G. M., Skerratt, L. F., Anderson, D. L., Crameri, G., Quammen, D., Jordan, D., Freeman, P., Wang, L. F., Epstein, J. H., Marsh, G. A., Kung, N. Y., McCallum, H., 2015. Ecological dynamics of emerging bat virus spillover. *Proc Biol Sci.* 282, 20142124.

Rahman, S. A., Hassan, S. S., Olival, K. J., Mohamed, M., Chang, L. Y., Hassan, L., Saad, N. M., Shohaimi, S. A., Mamat, Z. C., Naim, M. S., Epstein, J. H., Suri, A. S., Field, H. E., Daszak, P. G., 2010. Henipavirus ecology research,

Characterization of nipah virus from naturally infected pteropus vampyrus bats, Malaysia. *Emerg Infect Dis.* 16, 1990-1993.

Reuter, G., Boros, Á., Delwar, E., Pankovics, P., 2014. Novel circular single-stranded DNA virus from turkey faeces. *Arch Virol.* 159, 2161–2164.

Roche, S. E., Costard, S., Meers, J., Field, H. E. Breed, A. C., 2015. Assessing the risk of nipah virus establishment in Australian flying-foxes. *Epidemiol Infect.* 143, 2213-2226.

Rose, N., Opriessnig, T., Grasland, B. and Jestin, A., 2012. Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2) . *Virus Res.* 164, 78–89.

Sakoda, Y., Ito, H., Uchida, Y., Okamatsu, M., Yamamoto, N., Soda, K., Nomura, N., Kuribayashi, S., Shichinohe, S., Sunden, Y., Umemura, T., Usui, T., Ozaki, H., Yamaguchi, T., Murase, T., Ito, T., Saito, T., Takada, A., Kida, H., 2012. Reintroduction of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus by migratory water birds, causing poultry outbreaks in the 2010-2011 winter season in Japan. *J Gen Virol.* 93, 541-550.

Sano, K., Naoi, Y., Kishimoto, M., Masuda, T., Tanabe, H., Ito, M., Niira, K., Haga, K., Asano, K., Tsuchiaka, S., Omatsu, T., Furuya, T., Katayama, Y., Oba, M., Ouchi,

- Y., Yamasato, H., Ishida, M., Shirai, J., Katayama, K., Mizutani, T., Nagai, M., 2016. Identification of further diversity among posaviruses. *Arch Virol.* 161, 3541–3548.
- Sakai, K., Hagiwara, K., Omatsu, T., Hamasaki, C., Kuwata, R., Shimoda, H., Suzuki, K., Endoh, D., Nagata, N., Nagai, M., Katayama, Y., Oba, M., Kurane, I., Saijo, M., Morikawa, S., Mizutani, T., Maeda, K., 2015. Isolation and characterization of a novel rhabdovirus from a wild boar (*Sus scrofa*) in Japan. *Vet Microbiol.* 179, 197-203.
- Scheper, G. C., Voorma, H. O., Thomas, A. A. M., 1994. Basepairing with 18S ribosomal RNA in internal initiation of translation. *FEBS Lett.* 352, 271–275.
- Shagin, D. A., Rebrikov, D. V., Kozhemyako, V. B., Altshuler, I. M., Shcheglov, A. S., Zhulidov, P. A., Bogdanova, E. A., Staroverov, D. B., Rasskazov, V. A., Lukyanov, S., 2002. A novel method for SNP detection using a new duplex-specific nuclease from crab hepatopancreas. *Genome Res.* 12, 1935–1942.
- Shang, P., Misra, S., Hause, B., Fang, Y., 2017. A naturally occurring recombinant enterovirus expresses a Torovirus deubiquitinase. *J Virol.* 91, e00450–17.

Shimada, S., Nagai, M., Moriyama, H., Fukuhara, T., Koyama, S., Omatsu, T., Furuya, T., Shirai, J., Mizutani, T., 2015. Use of S1 nuclease in deep sequencing for detection of double-stranded RNA viruses. *J Vet Med Sci.* 77, 1163-1166.

Shirato, K., Maeda, K., Tsuda, S., Suzuki, K., Watanabe, S., Shimoda, H., Ueda, N., Iha, K., Taniguchi, S., Kyuwa, S., Endoh, D., Matsuyama, S., Kurane, I., Saijo, M., Morikawa, S., Yoshikawa, Y., Akashi, H., Mizutani, T., 2012. Detection of bat coronaviruses from *Miniopterus fuliginosus* in Japan. *Virus Genes.* 44, 40-44.

Song, C., Zhu, C., Zhang, C., Cui, S., 2010. Detection of porcine parvovirus using a Taqman-based real-time PCR with primers and probe designed for the NS1 gene. *Virology* 7, 353.

Spinner, M. L, Giovanni, G. D. D. I., 2001. Detection and identification of mammalian Reoviruses in surface water by combined cell culture and reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol.* 67, 3016-3020.

Taylor, L. H., Latham, S. M., Woolhouse, M. E., 2001. Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 356, 983-989.

Takahashi, T., Maeda, K., Suzuki, T., Ishido, A., Shigeoka, T., Tominaga, T., Kamei, T., Honda, M., Ninomiya, D., Sakai, T., Senba, T., Kaneyuki, S., Sakaguchi, S.,

Satoh, A., Hosokawa, T., Kawabe, Y., Kurihara, S., Izumikawa, K., Kohno, S., Azuma, T., Suemori, K., Yasukawa, M., Mizutani, T., Omatsu, T., Katayama, Y., Miyahara, M., Ijuin, M., Doi, K., Okuda, M., Umeki, K., Saito, T., Fukushima, K., Nakajima, K., Yoshikawa, T., Tani, H., Fukushi, S., Fukuma, A., Ogata, M., Shimojima, M., Nakajima, N., Nagata, N., Katano, H., Fukumoto, H., Sato, Y., Hasegawa, H., Yamagishi, T., Oishi, K., Kurane, I., Morikawa, S., Saijo, M., 2014. The first identification and retrospective study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan. *J Infect Dis.* 209, 816-827.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G., 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876–4882.

Tsuchiaka, S., Naoi, Y., Imai, R., Masuda, T., Ito, M., Akagami, M., Ouchi, Y., Ishii, K., Sakaguchi, S., Omatsu, T., Katayama, Y., Oba, M., Shirai, J., Satani, Y., Takashima, Y., Taniguchi, Y., Takasu, M., Madarame, H., Sunaga, F., Aoki, H., Makino, S., Mizutani, T., Nagai, M., 2018. Genetic diversity and recombination of enterovirus G strains in Japanese pigs: High prevalence of strains carrying a papain-like cysteine protease sequence in the enterovirus G population. *PLoS One.* 13, e0190819.

Vázquez-Morón, S., Avellón, A., Echevarría, J. E., 2006. RT-PCR for detection of all seven genotypes of Lyssavirus genus. *J Virol Methods*. 135, 281-287.

Mendenhall, I., H., Wen, D., L., H., Jayakumar, J., Gunalan, V., Wang, L., Mauer-Stroh, S., Su, Y., C., F., Smith, G., J., D., 2019. Diversity and evolution of viral pathogen community in Cave nectar bats (*Eonycteris spelaea*). *Viruses*. 11, E250.

Whon, T. W., Kim, M. S., Roh, S. W., Shin, N. R., Lee, H. W. and Bae, J. W., 2012. Metagenomic characterization of airborne viral DNA diversity in the near-surface atmosphere. *J Virol*. 86, 8221–8231.

Woods, L. W., Latimer, K. S., Niagro, F. D., Riddell, C., Crowley, A. M., Anderson, M. L., Daft, B. M., Moore, J. D., Campagnoli, R. P. and Nordhausen, R. W., 1994. A retrospective study of circovirus infection in pigeons: nine cases (1986-1993) . *J Vet Diagn Invest*. 6, 156–164.

Wu, Z., Ren, X., Yang, L., Hu, Y., Yang, J., He, G., Zhang, J., Dong, J., Sun, L., Du, J., Liu, L., Xue, Y., Wang, J., Yang, F., Zhang, S., Jin, Q., 2012. Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bat species from Chinese provinces. *J Virol*. 86, 10999-11012.

Wylie, K. M., Mihindukulasuriya, K. A., Sodergren, E., Weinstock, G. M., Storch, G. A., 2012. Sequence analysis of the human virome in febrile and afebrile children. *PLoS One*. 7, e27735.

Xue-Jie, Y., Mi-Fang, L., Shou-Yin, Z., Yan, L., Jian-Dong, L., Yu-Lan, S., Lihong, Z., Quan-Fu, Z., Vsevolod, L., Chuan, L., Jing, Q., Qun, L., Yan-Ping, Z., Rong, H., Wei, W., Qin, W., Fa-Xian, Z., Xian-Jun, W., Biao, K., Shi-Wen, W., Kang-Lin, W., Huai-Qi, J., Jin-Xin, L., Wen-Wu, Y., Hang, Z., Xu-Hua, G., Jia-Fa, L., Zhen-Qiang, B., Guo-Hua, L., Jun, R., Hua, W., Zhuo, Z., Jing-Dong, S., Jin-Rong, H., Tao, W., Jing-Shan, Z., Xiu-Ping, F., Li-Na, S., Xiao-Ping, D., Zi-Jian, F., Wei-Zhong, Y., Tao, H., Yu, Z., David, H. W., Yu, W., De-Xin, L., 2011. Fever with Thrombocytopenia Associated with a Novel Bunyavirus in China. *N Engl J Med*. 364, 1523-1532.

Yassin, A., Markow, T.A., Narechania, A., O'Grady, P. M., DeSalle, R., 2010. The genus *Drosophila* as a model for testing tree- and character-based methods of species identification using DNA barcoding. *Mol Phylogenet Evol*. 57, 509-517.

Yuan, Y., Kitamura-Muramatsu, Y., Saito, S., Ishizaki, H., Nakano, M., Haga, S., Matoba, K., Ohno, A., Murakami, H., Takeshima, S. N., Aida, Y., 2015. Detection of the BLV provirus from nasal secretion and saliva samples using BLV-CoCoMo-

qPCR-2: Comparison with blood samples from the same cattle. *Virus Res.* 210, 248-254.

Zell, R., Delwart, E., Gorbalenya, A. E., Hovi, T., King, A. M. Q., Knowles, N. J., Lindberg, A. M., Pallansch, M. A., Palmenberg, A. C., Reuter, G., Simmonds, P., Skern, T., Stanway, G., Yamashita, T., 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *J Gen Virol.* 98, 2421–2422.

Zhang, J. M., Zhang, Z. S., Deng, Y. Q., Wu, S. L., Wang, W., Yan, Y. S., 2017. Incidence of human rabies and characterization of rabies virus nucleoprotein gene in dogs in Fujian province, southeast China, 2002-2012. *BMC Infect Dis.* 17, 599.

Zhang, S., Bai, R., Feng, R., Zhang, H., Liu, L., 2014. Detection and evolutionary analysis of picobirnaviruses in treated wastewater. *Microb Biotechnol.* 8, 474-482.

Zhang, W., Yang, S., Shan, T., Hou, R., Liu, Z., Li, W., Guo, L., Wang, Y., Chen, P., Wang, X., Feng, F., Wang, H., Chen, C., Shen, Q., Zhou, C., Hua, X., Cui, L., Deng, X., Zhang, Z., Qi, D., Delwart, E., 2017. Virome comparisons in wild-diseased and healthy captive giant pandas. *Microbiome.* 5, 90.

Zuker, M., 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31, 3406–3415.

前田健, 水谷哲也, 田口文広., 2011. コウモリ由来のウイルスとその感染症, 獣医疫学  
雑誌. 15, 88-93.