

ブタおよびイノシシからの
哺乳類オルソレオウイルスの浸潤状況
および遺伝子多様性に関する研究

深瀬 優香

要 旨

哺乳類オルソレオウイルス(MRV)はエンベロープを持たない2本鎖RNAウイルスであり、広い宿主域を有する。MRVは世界各地に分布しており、我が国ではヒト、イヌ、ネコ、イノシシおよびブタといった様々な動物から分離され、下水からも検出されている。しかし我が国のブタおよびイノシシにおけるMRVの浸潤状況やMRVの遺伝学的特徴は調べられていない。そこで本研究では、腸管系ウイルス調査のため我が国のブタおよびイノシシから採取された糞便を材料として、MRVの浸潤状況および分離株の遺伝学的特性について研究を行った。2017年から2022年にかけて採材したブタの直腸便421検体およびイノシシ216検体についてウイルス分離および次世代シーケンス(NGS)を実施したところ、ブタの5検体(1.2%)から5株のMRVが分離され、イノシシの1検体からNGSにより1株のMRVが検出された。S1遺伝子の解析から、これらのMRVはMRV-2型とMRV-3型に分類されることがわかった。全遺伝子解析の結果、我が国のMRVはDDBJ/EMBL/GenBankデータベースに登録されているブタMRVやMRVプロトタイプである1959年代の人由来MRVと相同性を共有しながらも、遺伝子多様性を示すことが判明した。また、我が国のブタ、下水およびヒト由来のMRVと種内遺伝子再集合を起こしている可能性が示された。さらにM1およびS1遺伝子において遺伝子相同組換えが確認された。S1蛋白構造予測では株間に構造の相違が認められ、株間において抗原性状の差があることが示唆された。これらの知見から、我が国のブタMRVはこれまでに報告のあるブタMRVの遺伝子をバックボーンに持ちながら種内遺伝子再集合および遺伝子相同組換えを起こしながら変異を続けていることが推察された。本研究成果はブタMRVの遺伝子多様性、遺伝子柔軟性およびウイルスの進化の解明およびブタのみならずヒトのMRV感染防止に寄与するものと思われる。

Abstract

Mammalian orthoreoviruses (MRVs) are non-enveloped double-stranded RNA viruses with a broad host range. MRVs are prevalent worldwide, and in Japan, they have been isolated from various hosts, including humans, dogs, cats, wild boars, and pigs, and they have also been found in sewage. However, information on the status of MRV prevalence and genomic characterization in pigs and wild boars in Japan is lacking. Therefore, in this study, prevalence and genetic characterization of MRVs were investigated using fecal samples of porcine and wild boar collected for a surveillance of enteric viruses in Japan. Virus isolation and next generation sequencing were carried out on 421 fecal samples from pigs and 216 rectal contents from wild boars collected in 2017-2022 in Japan. MRVs were isolated from five (1.2%) of the samples from pigs and one wild boar sample found to be positive for MRV. Genetic analysis of the S1 gene of these strains revealed that the Japanese porcine MRV isolates could be classified as MRV-2 and MRV-3. Whole genome analysis showed that Japanese porcine MRVs exhibited genetic diversity, although they shared sequence similarity with porcine MRV and MRV prototype human strains isolated in the 1950s sequences in the DDBJ/EMBL/GenBank database. Several potential intragenetic reassortment events were detected among MRV strains from pigs, sewage, and humans in Japan, suggesting zoonotic transmission. Furthermore, homologous recombination events were identified in the M1 and S1 genes of Japanese porcine MRV. Structural modeling of the S1 protein showed structural differences of S1 between the strains, suggesting diversity in antigenic properties of MRVs. These findings imply that different strains of Japanese porcine MRV share a porcine MRV genomic backbone and have evolved through intragenetic reassortment and

homologous recombination events. The results of this study shed light on the genetic diversity, plasticity and evolution of porcine MRV and prevention of MRV infection not only in porcine but also in human.

目次

緒言	7
第1章 ブタおよびイノシシの糞便からの哺乳類オルソレオウイルスの検出	10
序論	11
材料および方法	13
1. 供試材料	13
2. 培養細胞	13
3. ウイルス分離	13
4. RNA 抽出	14
5. cDNA ライブラリー作製と次世代シーケンス	14
6. 逆転写(RT)-PCR	14
成績	15
1. ウイルス分離	15
2. 糞便検体の NGS	15
3. 培養上清の NGS	15
4. RT-PCR による哺乳類オルソレオウイルス遺伝子の検	16
考察	17
図表	19
第2章 分子系統樹解析および遺伝子相同性解析による哺乳類オルソレオウイルスの疫学的分析	22
序論	23

材料および方法	24
1. 2017年から2019年に実施した次世代シーケンスデータからの哺乳類オルソレオウイルス遺伝子の検出	24
2. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)解析	24
3. 系統樹解析	24
4. 遺伝子相同性解析	25
成績	26
1. 次世代シーケンスデータからの哺乳類オルソレオウイルス遺伝子の検出	26
2. 分子系統解析および配列の相同性解析	26
考察	29
図表	31

第3章 遺伝子再集合、遺伝子相同組換えおよび S1 蛋白の構造解析による哺乳類オルソレオウイルス遺伝子の進化の分析

序論	54
材料および方法	55
1. SimPlot および mVISTA 解析による遺伝子再集合解析	55
2. SimPlot および Recombination detection program (RDP)解析による遺伝子相同組換え解析	55
3. AlphaFold2 を用いた S1 蛋白の立体構造予測	55
成績	56
1. 遺伝子再集合解析	56
2. 遺伝子相同組換え解析	56
3. AlphaFold2 を用いた S1 蛋白の立体構造予測	57

考 察	58
図 表	60
結 論	69
謝 辞	72
引用文献	73

緒言

哺乳類オルソレオウイルス (*Mammalian orthoreovirus*: MRV) は、*Avian orthoreovirus*、*Nelson Bay orthoreovirus*、*Baboon orthoreovirus*、*Reptilian orthoreovirus*、*Mahlapitsi orthoreovirus*、*Piscine orthoreovirus*、*Broome orthoreovirus*、*Neoavian orthoreovirus* および *Testudine orthoreovirus* とともにレオウイルス目スピナレオウイルス科オルソレオウイルス属の中の種として分類されている (<https://ictv.global/report/chapter/spinareoviridae/spinareoviridae/orthoreovirus>)。MRV はエンベロープを有さない 2 層構造を持つ capsid から構成される正 20 面体の構造を示し、分節型の 10 本の 2 本鎖 RNA をゲノムとして保有する。10 本の遺伝子分節は、8 つの構造蛋白質である $\lambda 1$ (L3 遺伝子)、 $\lambda 2$ (L2 遺伝子)、 $\lambda 3$ (L1 遺伝子)、 $\mu 1$ (M2 遺伝子)、 $\mu 2$ (M1 遺伝子)、 $\sigma 1$ (S1 遺伝子)、 $\sigma 2$ (S2 遺伝子) および $\sigma 3$ (S4 遺伝子)、および 4 つの非構造蛋白質である μ NS (M3 遺伝子)、 μ NSC (M3 遺伝子)、 σ NS (S3 遺伝子) および $\sigma 1s$ (S1 遺伝子) をコードしている[1-3]。 $\mu 1$ 、 $\sigma 3$ および $\sigma 1$ は外殻 capsid 蛋白質を構成し、このうち $\sigma 1$ は中和抗体によって認識されるオルソレオウイルスの血清型特異的抗原である[1]。コア構造を有する内殻は $\lambda 1$ 、 $\lambda 2$ および $\sigma 2$ により構成される[4, 5]。内殻内には 10 本の遺伝子分節に加えて RNA 依存性 RNA ポリメラーゼである $\lambda 3$ とポリメラーゼコファクターとされる $\mu 2$ が含まれている[4]。非構造蛋白質である μ NS はウイルス遺伝子の複製の場で中心的な役割を担っているが、他の非構造蛋白質の詳細な機能は明らかにされていない[6-9]。

MRV は世界中に分布し、ヒト[10-19]やブタ[20-35]およびイノシシ[36]を含め、コウモリ[37-43]、ウシ[44]、ウマ[45]、シャモア[46]、シカ[47]、ミンク[48, 49]、マスクパームジャコウネコ[50]、イヌ[51, 52]、ネコ[53, 54]、リス[55]および、げっ歯類[56, 57]といった

あらゆる種類の哺乳類に感染することが知られている[1]。ヒトにおいては MRV に感染しても一般的に症状は認められないと考えられていたが、呼吸器疾患や消化器疾患を伴う症例が散発的に報告されている[18, 19]。また最近では、神経疾患や急性呼吸器疾患など、より重篤な症状に MRV が関与することが報告されるようになった[11-17]。ブタにおいても MRV 感染はほとんどの場合、症状を示さないと考えられているが、中国、韓国、米国およびイタリアにおいて、MRV の単独感染または他の病原体との重複感染による重篤な下痢症例が報告されている[26-29, 31, 35]。

σ1 蛋白質の抗原性状と S1 遺伝子の遺伝的近縁性に基づいて、MRV は Lang (T1L)、Jones (T2J)、Dearing (T3D)、Abney (T3A)および Ndelle (T4N)をプロトタイプウイルス株とする MRV-1 (T1)、MRV-2 (T2)、MRV-3 (T3)および MRV-4 (T4)の血清型に分類されている[1, 2]。MRV は分節型の遺伝子を保有しているため、異なる血清型間であっても 1 個体の宿主に 2 株以上の MRV が同時に感染する、重複感染を起こすと容易に遺伝子再集合が発生し、遺伝子再集合体が生成される[2]。遺伝子再集合体は配列の多様性と有利な遺伝的進化を得ることで、病原性を増大し、宿主域を拡大すると考えられている[2]。

MRV は多くの宿主に感染して人獣共通感染症を引き起こし、我が国においてもヒトにおける症例が報告されているものの、我が国のブタにおける MRV 感染は呼吸器疾患のある個体の呼吸器から MRV-1 が、下痢症状のある個体とない個体の糞便から MRV-2 が分離された報告がそれぞれ 2 件あるのみで[23, 25]、我が国のブタやイノシシにおける MRV の分布状況は不明であった。また、上記の報告には MRV 遺伝子の情報はなく、我が国のブタおよびイノシシにおける MRV の分布実態および MRV の遺伝子情報の収集は急務であった。本研究では腸管系ウイルスの調査のため採材された我が国のブタおよびイノシシの糞便から MRV を検出し、詳細な遺伝子解析を実施した。

本論文は次の3章から構成される。第1章では北海道、本州および九州で飼養されているブタ 349 頭および北陸地方に生息するイノシシ 126 頭の糞便から培養細胞を用いたウイルス分離および次世代シーケンス(NGS)を行い、細胞変性効果が認められた培養上清から NGS および MRV を標的とした逆転写(RT)-PCR で MRV の検出を行い、浸潤状況を調べた。さらに MRV が検出された培養上清から RNA 抽出を行い、次世代シーケンスにより我が国のブタ由来 MRV の全遺伝子を我が国で初めて解読した。第2章では第1章で得られた 4 株に、2017 年から 2019 年にブタおよびイノシシの糞便について NGS を実施し、MRV が陽性となったブタおよびイノシシそれぞれ 1 検体から分離した 2 株の MRV を加え、DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録されている各種動物由来 MRV とともに全遺伝子分節の系統樹解析および塩基配列の相同性解析を実施し、我が国のブタおよびイノシシ由来 MRV について疫学的な考察を行った。第3章では得られた我が国のブタおよびイノシシ由来の MRV 遺伝子を GenBank に登録されている MRV 遺伝子データとともにバイオインフォマティクス技術を用いた解析を行い、MRV の遺伝子多様性および進化について考察を行った。

第1章

ブタおよびイノシシの糞便からの
哺乳類オルソレオウイルスの検出

序 論

我が国においてブタおよびイノシシから MRV が分離されていることから[23, 36]、MRV は我が国のブタおよびイノシシに浸潤していると考えられるが、このことを調査した報告は見当たらない。我が国において豚熱がイノシシを介して養豚場で発生していることから[58-60]、ブタとイノシシの間で MRV のやり取りが行われている可能性がうかがわれる。さらに MRV は人獣共通感染症であることから、感染源となりうるブタおよびイノシシにおける MRV の浸潤実態を調査することは重要と考えられる。

ウイルスの性状を詳細にかつ正確に解析するために、ウイルス分離は必要不可欠である[61]。腸管系ウイルスにはウイルス分離が困難なものが多いが[62, 63]、検出法の中でも遺伝子検査よりもウイルス分離が最も感度が高かったことを示した報告もある[61, 64]。MRV は培養細胞によるウイルス分離が可能であり、アフリカミドリザルの腎臓上皮細胞に由来する Vero 細胞[21, 23, 24, 27-29, 43, 65]、イヌの腎尿細管上皮細胞由来の MDCK 細胞[35]、腎臓皮質細胞由来の MDBK 細胞[32]、ブタサペロウイルス感染に耐性を誘導した PLC/PRF/5 細胞由来 N1380 細胞[35, 36, 66, 67]、初代ブタ腎臓細胞[33]およびアカゲザル胎子腎細胞由来の MA104 細胞[68]が MRV の分離に用いられている。MA104 細胞はロタウイルスの分離に用いられている細胞で、MRV とロタウイルスの分離状況の比較を行うことも可能であることから、ブタおよびイノシシの糞便材料からの MRV の分離に MA104 細胞を使用することは有用である可能性がある。NGS は遺伝子情報の不明である核酸材料であっても網羅的にシーケンスを行うことができる手法であり、ウイルス分離のできないウイルスの検出も可能である。NGS は普及しつつあるものの、糞便ウイルスの検出感度についての情報は十分ではない。

本章では、北海道、本州および九州で飼養されているブタ 349 頭および北陸地方に生息するイノシシ 126 頭の糞便から培養細胞を用いてウイルス分離、NGS および

RT-PCR により MRV の検出を行い、浸潤状況を調べ、比較した。さらに NGS により我が国のブタ由来 MRV の全遺伝子を解読した。

材料および方法

1. 供試材料

2020年から2022年に採材されたブタおよびイノシシの糞便を用いた。ブタは北海道、東北、北陸、関東、中部、近畿および九州で飼養されていた約1ヶ月齢から3ヶ月齢の下痢症状を呈する個体15頭および正常な個体334頭の直腸から便を採取した(表1)。イノシシは2020年から2022年に石川県および富山県で捕獲された健康な個体126頭を解体し直腸に入っている内容物を採取した(表2)。

糞便サンプルはイーグル MEM 培地 (EMEM) (イーグル MEM 培地「ニッスイ」(1)、日水製薬、東京) で 1:9 (w/v) に希釈し 3,000g 10 分、さらに 12,000g 10 分間遠心分離を行い、使用するまで -80°C で保存した。

2. 培養細胞

ウイルス分離にはアカゲザル胎子腎細胞由来の MA104 細胞を用いた。細胞の培養は 10% ウン胎子血清を添加した EMEM を用い、1 週間間隔で継代を実施した。

3. ウイルス分離

ウイルス分離は 24 ウェルプレートを用いて実施した。70-80% シートした状態の MA104 細胞を 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ トリプシン (日本 BD (株)、東京) 添加 EMEM で 3 回洗浄し、最終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるようトリプシンを添加した被検材料を 200 μL 各ウェルに接種して 37°C で 60 分感作させた。その後、接種材料を除去し、EMEM で 1 回洗浄した後、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ トリプシンを添加した EMEM を 1 mL 加え、静置培養を行った。細胞変性効果 (CPE) が観察されたら培養上清を回収し、CPE が認められない場合は 5 日目に盲継代を行い、さらに 5 回同様の継代を実施した。

4. RNA 抽出

CPE の現れた細胞培養上清を回収し、TRIzol LS Reagent (Life Technologies、Carlsbad, CA, USA)を利用して、取扱説明書に従って RNA を抽出した。

5. cDNA ライブラリー作製と次世代シーケンス

ウイルス培養上清から抽出した RNA 濃度を Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, USA)で測定し、1 検体当たり 10~100 ng の RNA を cDNA ライブラリー作製に用いた。ライブラリーの作製は NEBNext® Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina Version 1.0 (New England Biolabs, Ipswich, USA)を用いて実施し、最終 cDNA の濃度を Qubit® 2.0 Fluorometer を用いて測定した後、MiSeq bench-top sequencer (Illumina, San Diego, USA)にアプライした。シーケンスは 151 サイクルのペアエンドリードによるモードで行った。

得られたデータは Miseq reporter program (Illumina)を用いて FASTQ ファイルに変換し、CLC Genomics Workbench (CLC bio, Aarhus, Denmark)にインポートした。作成されたシーケンスリードは CLC Genomics Workbench の *de novo* assembly コマンドにより 300 塩基以上のコンティグを構築した。

6. 逆転写(RT)-PCR

RT-PCR は One Step PrimeScript RT-PCR kit (TaKaRa Bio、大津)により、MRV の L1 遺伝子の一部を標的とするプライマーペアを使用して行った[69]。その他、サペロウイルス[70]、エンテロウイルス G [71]および A 群ロタウイルス[72]を標的とした PCR も実施した。PCR 産物は 2%のアガロースゲルで電気泳動し、トランスイルミネーターで観察した。

成 績

1. ウイルス分離

ブタについては、2020 年度の 33 頭中 1 頭、2021 年度の 176 頭中 15 頭および 2022 年度の 140 頭中 31 頭からの検体を接種した MA104 細胞に CPE が観察された (図 1-1)。CPE は 2 代目もしくは 3 代目の継代を行った接種後 1 日から 2 日目にかけて観察された。どの検体の CPE も細胞が円形化し、3 日目には底面から完全に剥がれ落ちた。イノシシの検体についてはいずれも CPE は観察されなかった。

2. 糞便検体の NGS

ブタおよびイノシシの糞便検体からはサペロウイルス、アストロウイルス、エンテロウイルス G、テシオウイルス、A 群ロタウイルスおよび C 群ロタウイルスの遺伝子が検出されたが、MRV 遺伝子はいずれの検体からも検出されなかった。

3. 培養上清の NGS

47 検体の培養上清から RNA を抽出し、ライブラリーを作製して次世代シーケンス (NGS) を実施し、得られた FASTQ ファイルを CLC Genomics Workbench にインポートし、CLC Genomics Workbench のローカル BLAST 機能により MRV 遺伝子の配列を検索した (図 1-3)。その結果、20 検体から A 群ロタウイルス、13 検体からエンテロウイルス G および 10 検体からサペロウイルスの遺伝子が検出され、残りの 4 検体からは MRV のほぼ完全長の配列が得られた。

さらにより正確な配列を得るため、CLC Genomics Workbench のマップ機能を用いて 4 株の全塩基配列を決定した。2020 年に関東地方の A 農場の約 70 日齢の健康ブタから分離された株は Kana-Uchi-15、2021 年北陸地方の I 農場の 36 日齢の健康

ブタから分離された株は Ishi-Ueno-10 株、2021 年に関東地方の B 農場の約 70 日齢の健康ブタから 2 頭から分離された株をそれぞれ Kana-Ebina-9 および Kana-Ebina-11 と命名し、塩基配列を DDBJ/EMBL/GenBank データベースにアクセッション番号 LC705292-LC705331 で登録した。

4. RT-PCR による哺乳類オルソレオウイルス遺伝子の検出

CPE が観察された 47 検体の培養上清から RNA を抽出し、MRV L1 遺伝子を標的とした RT-PCR を実施した。L1.rv5 および L1.rv6 のプライマーペアによる PCR では、MRV は 455 ベースペアのバンドが得られるが、2020 年の 1 頭および 2021 年の検体からは 3 頭の検体から目的の大きさの PCR 産物が得られた (図 1-2)。その他の CPE が認められた検体はサペロウイルス (10 検体)、エンテロウイルス G (13 検体) および A 群ロタウイルス (20 検体) を標的とした PCR が陽性であり、NGS の成績と一致した。

考 察

本研究では MA104 細胞を用いたウイルス分離と NGS を行い、比較した。MA104 は A 群ロタウイルスの分離に用いられる細胞であり我が国においても家畜からの A 群ロタウイルスの分離に用いられている[73, 74]。ブタの糞便材料を接種した MA104 細胞の 349 検体中 47 検体に CPE が観察された。そのうちの 20 検体は A 群ロタウイルスであることが確認されたが、その他に MRV を含むサペロウイルスおよびエンテロウイルス G も含まれていたことから、MA104 細胞は MRV を含む糞便ウイルスの分離が可能であることが示された。近年、MA104 細胞を用いてこれまで未知であった牛パレコウイルスが新規に分離され[61]、MA104 はレオウイルス目のみならずピコルナウイルスの分離にも使用できる可能性が示された。一方、NGS ではサペロウイルス、アストロウイルス、エンテロウイルス G、テシオウイルス、A 群ロタウイルスおよび C 群ロタウイルスの遺伝子が検出されたが、MRV 遺伝子はいずれの検体からも検出されなかった。NGS は網羅的に材料中の核酸をシークエンスすることができるが、ウイルス遺伝子の割合が核酸サンプル中に少ない場合、今回実施したメタゲノムシークエンスによる手法では検出されないことがある。MRV がウイルス分離で陽性であった糞便検体は MRV 遺伝子が検出されなかったが、サペロウイルスの全遺伝子配列および C 群ロタウイルス、アストロウイルス、エンテロウイルス G、テシオウイルスの部分配列が確認された(データ示さず)。このことは、糞便中において MRV は検出されたウイルスに比べウイルスの量が少なかったことが推察された。これらの結果から、MRV においては糞便検体の NGS よりもウイルス分離の方が検出感度が高いことが示された。

MRV は我が国においてヒトの消化管疾病の中から 1981 年以来ほぼ毎年検出されている[19]。一方、我が国のブタおよびイノシシにおける MRV の浸潤率は明らかになっていない。今回、ウイルス分離による MRV の検出率はブタが 1.1% (4 頭/349 頭)で

あり、2022 年の検体 140 検体からは検出されなかった。下痢検体は 15 検体と少なかったものの、すべて陰性であった。イノシシについては期間を通じて検出されなかった。MRV のブタにおける浸潤について、ザンビアおよび韓国においては 19.7%および 19%であったと報告されており[24, 26]、検査の手法は異なるもののこれらの報告に比べ今回の国内の検出率は低い値であった。MRV はヒトでは幼少期にほとんどのヒトが感染を受けるとされており[19]、その後は検出されにくくなる。既報との詳細に比較はできなかったが、浸潤率を比較する場合には個体の日齢、飼養状況および品種を考慮する必要があると思われる。抗体検査ではウイルスの検出よりもはるかに高い陽性率が認められることから[29]、真の浸潤率を求めるためには MRV に対する中和試験による抗体検査が良好あり、抗原性が異なる 3 つの型すべてを使用して実施する必要があると考えられる。

ウイルス分離培養上清の次世代シーケンスによる分離された 4 株すべての全塩基配列を得ることができた。糞便から直接、腸管系ウイルスの通常の PCR を行って得られた産物をシーケンスすることで塩基配列を得ることも可能であるが、次世代シーケンスを行う場合に腸内に存在する細菌のリボゾーマル RNA が障害となる。MRV の場合も同様であり、MA104 細胞を用いたウイルス分離とその培養上清からの全遺伝子塩基配列の決定は有用な方法であることが示された。

図 表

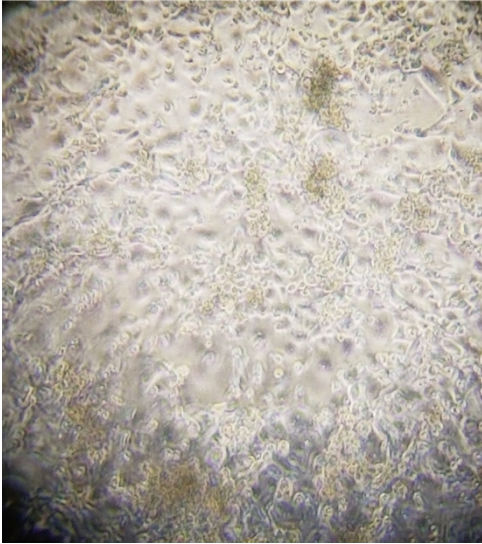
表 1-1 ウイルス分離に用いたブタの地域、農場、日・月齢および症状

年度	地域	農場	日・月齢	下痢	正常
2020年度	関東	A	1.5-3ヶ月	0	24
	関東	B	1.5-3ヶ月	0	9
2021年度	北陸	C	31-37日齢	0	10
	北陸	D	33日齢	0	10
	北陸	E	33日齢	0	10
	北陸	F	36日齢	0	10
	北陸	G	39日齢	0	10
	北陸	H	42-45日齢	0	10
	北陸	I	33-36日齢	5	5
	関東	J	10日齢	0	8
	関東	J	31日齢	0	13
	関東	J	40-50日齢	0	18
	九州	K	約1ヵ月	0	30
2022年度	関東	A	1.5-3ヶ月	0	19
	関東	B	1.5-3ヶ月	0	18
	関東	L	34-42日齢	0	10
	中部	M	約1ヵ月	0	10
	東北	N	約1ヵ月	0	10
	近畿	O	約1ヵ月	0	10
	北海道	P	約1ヵ月	0	10
	北海道	Q	約1ヵ月	0	10
	北陸	R	約1ヵ月	10	0
	関東	S	約10日齢	0	10
	関東	S	約1ヵ月	0	10
関東	S	40-50日齢	0	10	
関東	A	1.5-3ヶ月	0	20	
関東	B	1.5-3ヶ月	0	20	
合計				15	334

表 1-2 ウイルス分離に用いたイノシシの地域、県、日・月齢および症状

年度	地域	県	日・月齢	下痢	正常
2020年度	北陸	石川	1-5ヵ月齢	0	23
2021年度	北陸	石川	1-5ヵ月齢	0	17
	北陸	富山	1-5ヵ月齢	0	19
2022年度	北陸	石川	1-5ヵ月齢	0	35
	北陸	富山	1-5ヵ月齢	0	32
合計				0	126

A



B

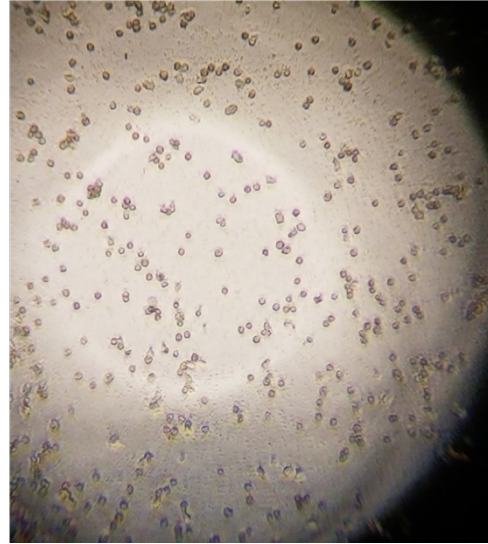


図 1-1 糞便材料を接種していない MA104 細胞 (A) および MRV が分離されて CPE が現れた MA104 細胞 (B)

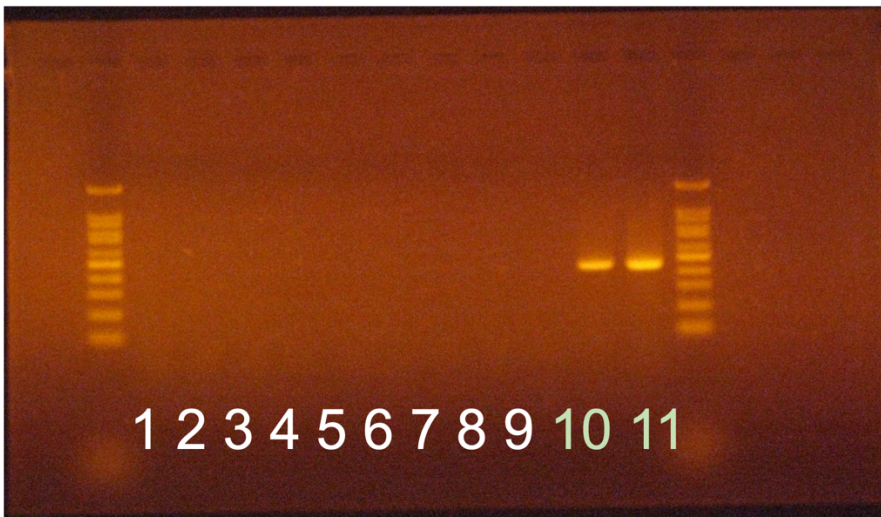


図 1-2 MRV L1 遺伝子を標的とした PCR の電気泳動像。両端は 100 ベースペアの分子量マーカー。検体番号 10 および 11 に目的の 455 ベースペアのバンドが観察された。

Query	Low...	Accession (E-value)	Description (E-value)
-3_S95_L001_R1_001 (paired) trimmed (paired) contig 17		not available	not available
-3_S95_L001_R1_001 (paired) trimmed (paired) contig 54		not available	not available
-3_S95_L001_R1_001 (paired) trimmed (paired) contig 59		not available	not available
-3_S95_L001_R1_001 (paired) trimmed (paired) contig 2	0.00	BX537263	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-208G1 in linkage group 5, complete sequence.
-3_S95_L001_R1_001 (paired) trimmed (paired) contig 3	0.00	BX537263	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-208G1 in linkage group 5, complete sequence.
-3_S95_L001_R1_001 (paired) trimmed (paired) contig 4	0.00	BX537263	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-208G1 in linkage group 5, complete sequence.
-3_S95_L001_R1_001 (paired) trimmed (paired) contig 5	0.00	KU746283	Guanarito mammarynavirus isolate CVH-960201 segment L, complete sequence.
-3_S95_L001_R1_001 (paired) trimmed (paired) contig 7	0.00	AE191073	Stealth virus 1 clone 3B43, genomic sequence.
-3_S95_L001_R1_001 (paired) trimmed (paired) contig 12	0.00	REO2M2	Mammalian orthoreovirus 2 D5/Jones outer capsid shell protein mu-1C and core protein mu-1 (M2...
-3_S95_L001_R1_001 (paired) trimmed (paired) contig 14	0.00	JX415472	Porcine reovirus SHR-A segment L3, complete sequence.
-3_S95_L001_R1_001 (paired) trimmed (paired) contig 15	0.00	KT224511	Mammalian orthoreovirus 3 strain SD-14 segment S2, complete sequence.
-3_S95_L001_R1_001 (paired) trimmed (paired) contig 19	0.00	KM820759	Mammalian orthoreovirus 3 isolate FS-03 segment M3, complete sequence.
-3_S95_L001_R1_001 (paired) trimmed (paired) contig 26	0.00	GU569577	Mammalian orthoreovirus 3 strain Abney segment L1, complete sequence.
-3_S95_L001_R1_001 (paired) trimmed (paired) contig 29	0.00	JF829216	Mammalian orthoreovirus strain KPR146 sigma 1 (S1) gene, complete cds.
-3_S95_L001_R1_001 (paired) trimmed (paired) contig 30	0.00	RSU35358	Reovirus sp. T3/Bovine/Maryland/clone 18/1961 non-structural sigma-NS protein gene, complete c...
-3_S95_L001_R1_001 (paired) trimmed (paired) contig 34	0.00	KX343200	Mammalian orthoreovirus 3 isolate MRV3/Swine/Italy/224660-4/2015 lambda 3 gene, partial cds.
-3_S95_L001_R1_001 (paired) trimmed (paired) contig 35	0.00	JF829222	Mammalian orthoreovirus strain KPR G sigma 1 (S1) gene, complete cds.
-3_S95_L001_R1_001 (paired) trimmed (paired) contig 36	0.00	AF129820	Reovirus 1 Lang L3 gene segment major core protein lambda 1 mRNA, complete cds.
-3_S95_L001_R1_001 (paired) trimmed (paired) contig 38	0.00	AF378003	Mammalian orthoreovirus 1 Lang core-spike protein lambda-2 (L2) mRNA, complete cds.
-3_S95_L001_R1_001 (paired) trimmed (paired) contig 39	0.00	JX415473	Porcine reovirus SHR-A segment S4, complete sequence.
-3_S95_L001_R1_001 (paired) trimmed (paired) contig 41	0.00	AF129820	Reovirus 1 Lang L3 gene segment major core protein lambda 1 mRNA, complete cds.
-3_S95_L001_R1_001 (paired) trimmed (paired) contig 49	0.00	AF378003	Mammalian orthoreovirus 1 Lang core-spike protein lambda-2 (L2) mRNA, complete cds.
-3_S95_L001_R1_001 (paired) trimmed (paired) contig 50	0.00	AF129820	Reovirus 1 Lang L3 gene segment major core protein lambda 1 mRNA, complete cds.
-3_S95_L001_R1_001 (paired) trimmed (paired) contig 52	0.00	AF378003	Mammalian orthoreovirus 3 Abney clone 87 core-spike protein lambda-2 (L2) mRNA, complete cds.
-3_S95_L001_R1_001 (paired) trimmed (paired) contig 55	0.00	REO2M2	Mammalian orthoreovirus 2 D5/Jones outer capsid shell protein mu-1C and core protein mu-1 (M2...
-3_S95_L001_R1_001 (paired) trimmed (paired) contig 63	0.00	X59945	Reovirus type 1 Lang gene for mu2 protein, genomic RNA.
-3_S95_L001_R1_001 (paired) trimmed (paired) contig 66	0.00	X59945	Reovirus type 1 Lang gene for mu2 protein, genomic RNA.
-3_S95_L001_R1_001 (paired) trimmed (paired) contig 69	0.00	AF378003	Mammalian orthoreovirus 1 Lang core-spike protein lambda-2 (L2) mRNA, complete cds.
-3_S95_L001_R1_001 (paired) trimmed (paired) contig 71	0.00	AF378003	Mammalian orthoreovirus 1 Lang core-spike protein lambda-2 (L2) mRNA, complete cds.
-3_S95_L001_R1_001 (paired) trimmed (paired) contig 47	3.59E-1	MG999593	Mammalian orthoreovirus isolate SI-MRV07 segment S2, complete sequence.
-3_S95_L001_R1_001 (paired) trimmed (paired) contig 65	3.48E-1	AF378003	Mammalian orthoreovirus 1 Lang core-spike protein lambda-2 (L2) mRNA, complete cds.
-3_S95_L001_R1_001 (paired) trimmed (paired) contig 75	9.99E-1	REO2M2	Mammalian orthoreovirus 2 D5/Jones outer capsid shell protein mu-1C and core protein mu-1 (M2...
-3_S95_L001_R1_001 (paired) trimmed (paired) contig 1	4.21E-1	AF191073	Stealth virus 1 clone 3B43, genomic sequence.

図 1-3 CLC Genomics Workbench に次世代シーケンスデータの FASTQ ファイルをインポートし、BLAST 解析により検出された MRV 遺伝子 (赤線で囲まれた部分)。

第2章

分子系統樹解析および遺伝子相同性解析による 哺乳類オルソレオウイルスの疫学的分析

序 論

MRV は感染する宿主域が広く、ほとんどの哺乳類に感染すると考えられており、そのうちのいくつかは肺炎などの呼吸器感染症、下痢などの消化管感染および神経症状を伴った中枢神経感染を引き起こすことがブタおよびヒトを含む哺乳類で報告されている[10-19, 28-30]。ブタにおいては、下痢症例から分離された MRV-3 が激しい下痢症の原因となり、高い死亡率を示すことが報告されている[31]。このように MRV はヒトの疾患のみならず獣医学領域においても重要性が示されており、MRV の型により病原性が異なる可能性も示唆されている。このことから MRV の型別を行い、遺伝子の配列を比較することは重要と考えられる。

レオウイルス目のウイルスは分節型のウイルス遺伝子を保有し遺伝子再集合を起こすため、疫学的な解析を行う際には確実性と正確性を確保するためにすべての分節について解析を行うことが望まれている。このことから、セドレオウイルス科のロタウイルスにおいては 11 本の遺伝子分節すべてで遺伝子型別を行う方法が行われている[75, 76]。MRV は全遺伝子分節による遺伝子型別は行われていないが、S1 遺伝子における 4 遺伝子型 (MRV-1~4) が知られており、抗原性状が大きく異なるため、中和試験にそれぞれの型の代表株が用いられてきた。S1 以外の遺伝子分節においても近年遺伝子情報が集積されており、各遺伝子分節における相同性の比較や分子系統解析は重要と考えられている。

第2章では、第1章でウイルス分離に成功し、次世代シーケンスで全遺伝子分節が解読された 4 株に加え、2017 年から 2019 年にブタおよびイノシシの糞便で次世代シーケンスを実施して得られたデータの中から MRV 遺伝子を検索し、全配列が得られたブタおよびイノシシからの MRV それぞれ 1 株を加えて、全遺伝子分節の系統樹解析および塩基配列の相同性解析を行い、疫学的な考察を行った。

材料および方法

1. 2017年から2019年に実施した次世代シーケンスデータからの哺乳類オルソレオウイルス遺伝子の検出

2017年から2019年にブタの直腸から採取した下痢便 7 検体および正常便 65 検体、および 2018年から2019年に捕獲された健康個体 86 検体の直腸内容物を材料に腸管系ウイルス調査を目的として実施した次世代シーケンスデータの FASTQ ファイルを材料として用いた。なお、糞便から直接 RNA を抽出した RNA は、DNase 処理を実施した後、第1章に示した方法で実施した。

MRV 遺伝子の検出は、OmicsBox analysis tool (BioBam, Valencia, Spain)を用い、FASTQ ファイルをアップロードし、OmixBox 内の Kraken metagenomics system によるシーケンスリードの分類で実施した。

2. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 解析

次世代シーケンスで得られた全遺伝子配列はオンラインによる Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)解析 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を実施し、相同性の高い配列を検索した。

3. 系統樹解析

塩基配列は ClustalW[77]を用いてアライメントし、MEGA7 [78]を用いて最尤法により最も適したモデルを選択して系統樹解析を実施した。Bootstrap 解析は 1000 回繰り返し実施した[79]。

4. 遺伝子相同性解析

遺伝子相同性の解析は CLC Genomics Workbench のツールボックスの中の Classical Sequence Analysis を用いて実施した。

成 績

1. 次世代シーケンスデータからの哺乳類オルソレオウイルス遺伝子の検出

次世代シーケンスの FASTQ ファイルを OmicsBox で解析した結果、2018 年に山陰地方の V 農場の健康な 59 日齢のブタから MRV が検出された。この検体を第1章に示した方法でウイルス分離を行ったところ MRV が分離され、次世代シーケンスにより全塩基配列が得られた。この株を Totto-MoI6 株と命名し、塩基配列を DDBJ/EMBL/GenBank データベースにアクセッション番号 LC705282-LC705291 で登録した。イノシシについては 2018 年に富山県で捕獲された個体から MRV 遺伝子が検出された。この検体からは本研究ではウイルス分離は成功しなかったが、国立感染症研究所に依頼したところ Zhang らによりウイルスが分離された[36]。そこでこのイノシシ株は株名を WB/To14 とし、LC579751-LC579760 の遺伝子情報を解析に使用した。

2. 分子系統解析および配列の相同性解析

我が国のブタおよびイノシシからの MRV と DDBJ/EMBL/GenBank データベースから得られた MRV の S1 遺伝子の塩基配列を用いた系統解析において、Totto-MoI-6 と Kana-Uchi-15 はブタ由来の MRV-2 のグループと、Ishi-Ueno-10、Kana-Ebina-9、Kana-Ebina-11 および WB/To14 はブタ、ミンク、コウモリ、ハクビシン、イノシシ、コモンツパイおよびヒト由来の MRV-3 とグループを形成した(図 2-1)。BLAST 解析の結果、Totto-MoI6、Kana-Uchi-15 および米国のブタ由来 MRV-2、Ishi-Ueno-10 は韓国のブタ由来 MRV-3 とそれぞれ最も高い相同性を示した(図 2-1)。Kana-Ebina-9、Kana-Ebina-11 と WB/To14 株は、塩基配列およびアミノ酸配列レベルで 98.2%および 98.7%以上と高い相同性を示した(表 2-8)。

S2 遺伝子では、Totto-MoI-6、Kana-Ebina-9、Kana-Ebina-11 および Kana-Uchi-

15 はそれぞれアメリカおよび中国のブタ由来の MRV と分岐した。Ishi-Ueno-10 は我が国のブタ由来 MRV 株と分岐せず、塩基配列の同一性は 89.6%以下であったが、Ishi-Ueno 株はミンク、ツリートガリネズミ、ヒトMRV 株と高いアミノ酸類似性(97.6-97.9%)を有していた。WB/To14 は我が国のブタ由来 MRV とはまったく別に分岐し、我が国のヒトから 2014 年に分離された MRV と高い相同性を示した(図 2-2、表 2-3、2-9)。

S3 遺伝子の解析では、Totto-Mol6、KanaUchi-15 および Ishi-Ueno-10 はブタ由来の MRV 株および MRV のプロトタイプである Lang 株と、Kana-Ebina-9 および Kana-Ebina-11 は我が国のヒト由来 MRV である Osaka1994 株、Osaka2005 株および中国のミンク由来 MRV 株と高い類似性を示した(図 2-3、表 2-2~2-7、2-10)。S4 遺伝子については、我が国のブタおよびイノシシ由来 MRV 株はヒト、イノシシ、動物園ライオンおよび下水由来の我が国の MRV 株と遠縁であり、塩基配列の相同性は 77.6%以上、アミノ酸配列の相同性は 87.7%以上であった(図 2-4、表 2-2~2-7)。

M1、M3、L2 および L3 遺伝子の系統樹および相同性解析では、我が国のブタおよびイノシシ由来 MRV は米国、イタリア、台湾、ザンビアおよび中国のブタ MRV およびヒト由来 MRV のプロトタイプである Lang 株とともにクラスターを形成し、ブタ由来株およびプロトタイプ株と配列の相同性を示した(図 2-5、2-7、2-9、2-10、表 2-2~2-7、2-12、2-14、2-16、2-17)。

M2 遺伝子では、Totto-Mol6 および Kana-Uchi-15 はアメリカ、ザンビアおよびイタリアのブタ由来 MRV とクラスターを形成した。Ishi-Ueno-10 はスロベニアのヒト由来 MRV と分岐し、ヒト、イノシシ、動物園ライオンおよび下水から分離された我が国の MRV とは遠縁であった(図 2-6)。

Ishi-Ueno-10 と他の我が国の MRV 株との塩基配列相同性は 76.7%以下であり、アミノ酸配列の相同性は 94.1-96.5%であった(表 2-13)。

Kana-Ebina-9 および-11 は、ブタ、ネズミ、ミンク、シカ、ヒトおよび下水由来 MRV 株とクラスターを形成した(図 2-6)。

L1 遺伝子の系統解析では Totto-Mol6、Kana-Uchi-15 および Ishi-Ueno-10 はそれぞれ米国、台湾およびイタリアのブタ由来 MRV

と分岐し(図 2-8)、Ishi-Ueno-10 は由来 MRV に加えてヒト由来の MRV プロトタイプ株である Lang 株とも配列同一性が高かった(表 2-3)。Kana-Ebina-9 および Kana-Ebina-11 は、我が国の他のブタ由来 MRV 株とは別に分岐し、我が国の下水由来 MRV である THK0617 株と密接に相関しており、塩基配列およびアミノ酸配列の同一性はそれぞれ 98.3%および 99.7%と高かった(図 2-8、表 2-5、2-6)。

我が国で分離された MRV 株の全セグメント遺伝子の塩基配列相同性を解析した結果、Totto-Moi-6 と Kana-Uchi-15 の間の L1 遺伝子(95.3%)と Kana-Ebina-9 と-11 の間の全遺伝子セグメント間(99.3-100%)を除けば、相同性は 92.4%以下であった(表 2-8~2-17)。

考 察

疫学的解析や分節遺伝子を保有するウイルスの進化パターンを追跡するための決定的なデータを得るためには、全分割遺伝子のゲノム解析が不可欠である[75, 76]。そこで DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録されている MRV とともに、我が国のブタおよびイノシシ由来 MRV の全 10 遺伝子セグメントについて解析を行った。S1 遺伝子のほぼ完全長の塩基配列を用いた系統解析の結果、我が国のブタおよびイノシシ由来 MRV は MRV-2 および MRV-3 に分類された。MRV-1 および MRV-2 は我が国のブタからの分離がすでに報告されている[23, 25]が、MRV-3 は我が国ではイヌおよびイノシシからしか報告されていない[36, 52]。したがって、本研究は我が国のブタにおける MRV-3 の分離は初の報告となる。MRV-2 株である Totto-MoI-6 および Kana-Uchi-15 株は、DDBJ/EMBL/GenBank データベースの中の最も類似した株と、それぞれ塩基配列で 91.7%およびアミノ酸配列で 90.9%、塩基配列で 89.1%およびアミノ酸配列で 88.3%の相同性しか有していなかった。したがって、これらの株の S1 遺伝子の起源は不明であった。さらに、これらの株の S1 遺伝子は、我が国のヒト、動物園ライオンおよび下水由来の MRV 株とは低い相同性(塩基レベルで 85.8%およびアミノ酸レベルで 83.3%)を共有していたが、すべての株が MRV-2 に属していた。S1 遺伝子セグメントは特異的抗原を形成する $\sigma 1$ 蛋白質をコードしていることから[1]、これらの塩基配列の違いが我が国のブタ由来 MRV-2 株間の抗原性状の相違に関連している可能性がある。

ほとんどの系統樹において、我が国のブタおよびイノシシ由来の MRV 株は国外のブタ由来の MRV 株やプロトタイプであるヒト由来 MRV 株と同じクラスターを形成しており、我が国のブタ由来 MRV はブタ由来 MRV と共通の起源を持つことが示唆された。我が国のブタ由来 MRV と最も類似性の高い MRV 株とのアミノ酸配列の類似性は、塩

基配列の類似性よりも高かったが、このことは同義変異の存在によって説明できる。我が国および国外のブタ由来 MRV 株の M1、M2、L1、L2 および L3 遺伝子分節は、同義置換によってプロトタイプのコウモリ由来 MRV から派生した可能性がある。Kana-Ebina-9 株と Kana-Ebina-11 株の S3、M2 および L1 遺伝子は、我が国のコウモリ由来 MRV-2 の Osaka 株および我が国の下水由来 MRV 株と高い配列相同性を示した(表 2-10、2-3、2-17)。下水由来の MRV 株は、大阪市から 500km 以上離れた東北地方で採取されたにもかかわらず、MRV-2 Osaka 株と高い遺伝子相同性を示した。このことは、MRV-2 Osaka 株類似の株が全国的に流行していることを示唆している[65]。したがって、Kana-Ebina-9 株および Kana-Ebina-11 株は、我が国で流行しているコウモリ由来の MRV から、人獣共通感染症または環境水を通じて、S2、S3 および M2 遺伝子セグメントを獲得した可能性があると考えられた。我が国のブタ由来 MRV 株の遺伝子分節の中には、Ishi-Ueno-10 株の S2 遺伝子のように、他の MRV と塩基配列の類似性が低く、独立して分岐しているものもあり、遺伝子分節の起源を明らかにすることはできなかった。DDBJ/EMBL/GenBank に登録されている MRV 遺伝子の塩基配列データが不十分であることから、十分な塩基配列データを得るための研究が必要である。

図表

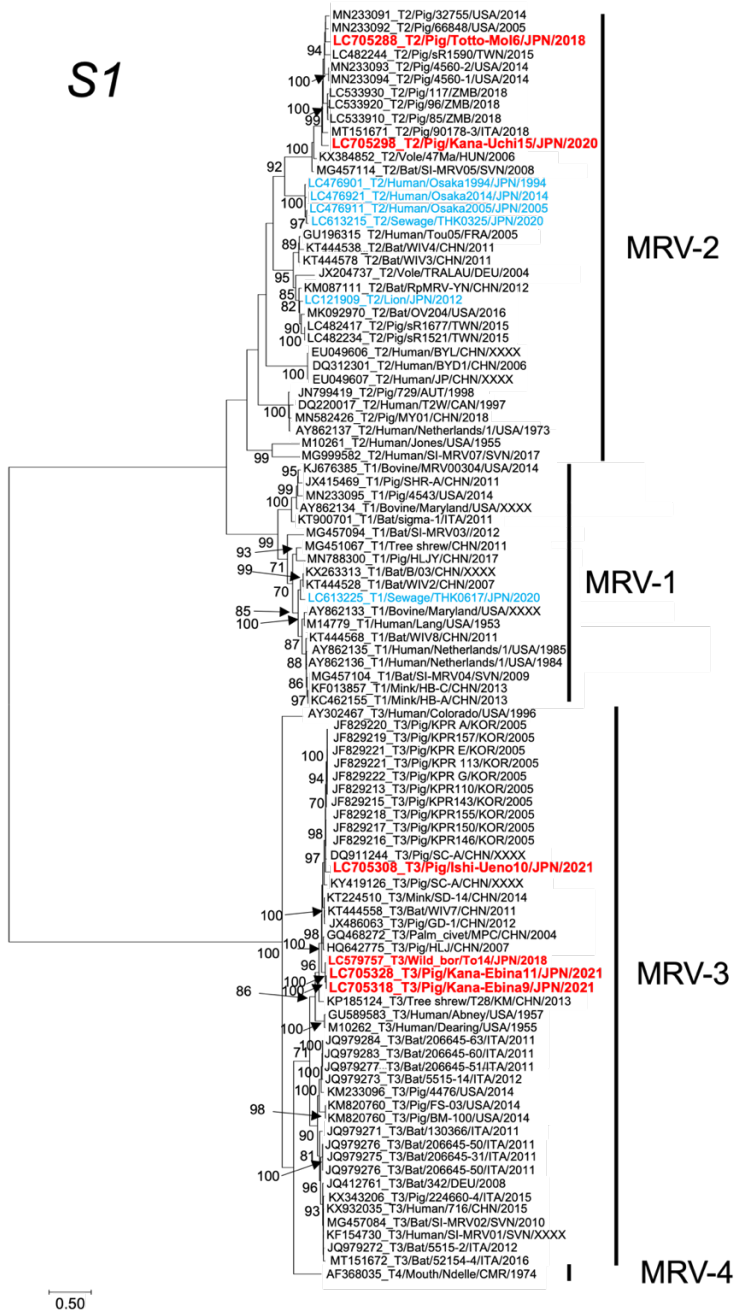


図 2-1 我が国のブタおよびイノシシから分離された MRV の S1 遺伝子塩基配列による分子系統樹。系統樹は最尤法で GTR+G により作成した。Bootstrap 値は 70 以上を示した。赤字は我が国のブタおよびイノシシからの MRV を、青字は我が国で検出されたヒト、下水および動物園のライオンからの MRV 株を示す。

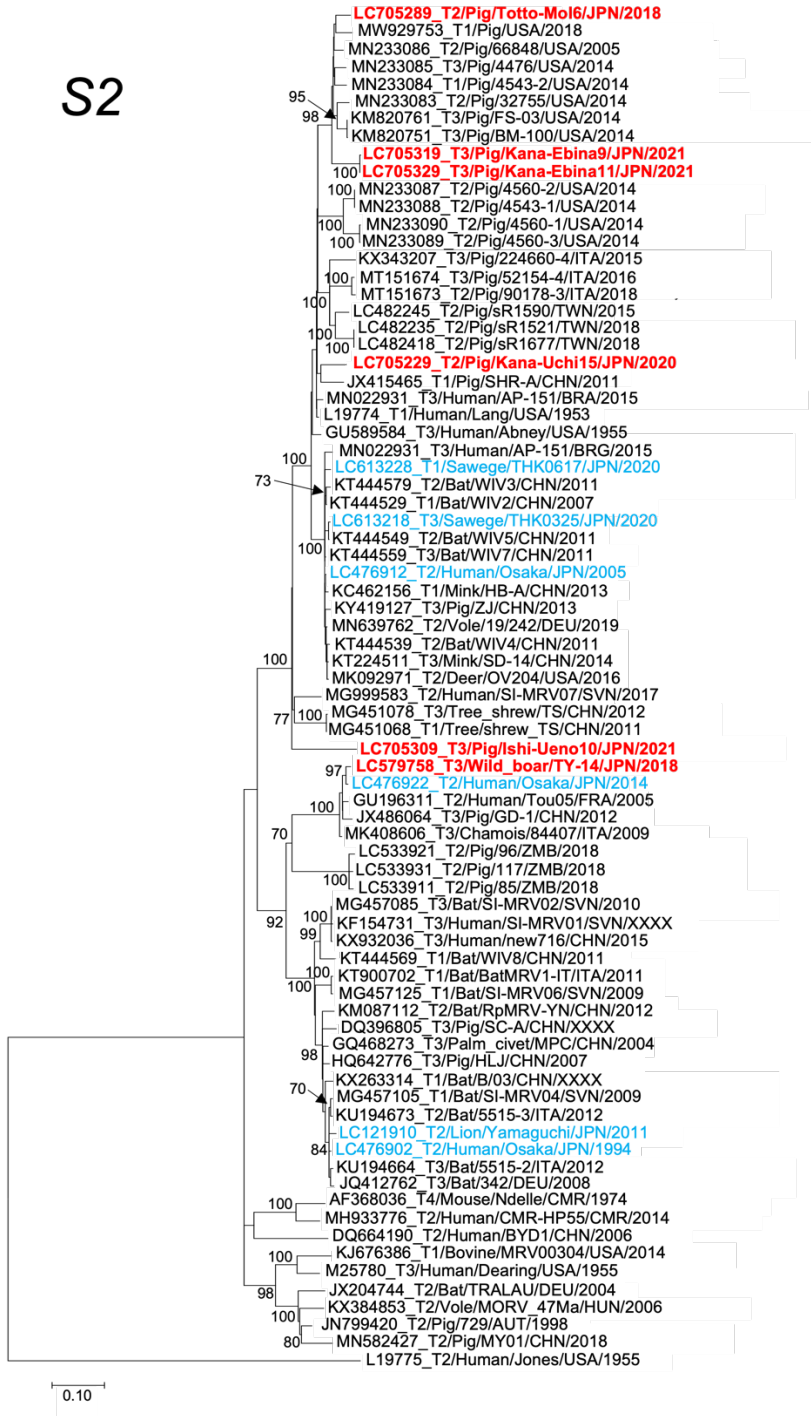


図 2-2 我が国のブタおよびイノシシから分離された MRV の S2 遺伝子塩基配列による分子系統樹。系統樹は最尤法で GTR+G+I により作成した。Bootstrap 値は 70 以上を示した。赤字は我が国のブタおよびイノシシからの MRV を、青字は我が国で検出されたヒト、下水および動物園のライオンからの MRV 株を示す。

S3

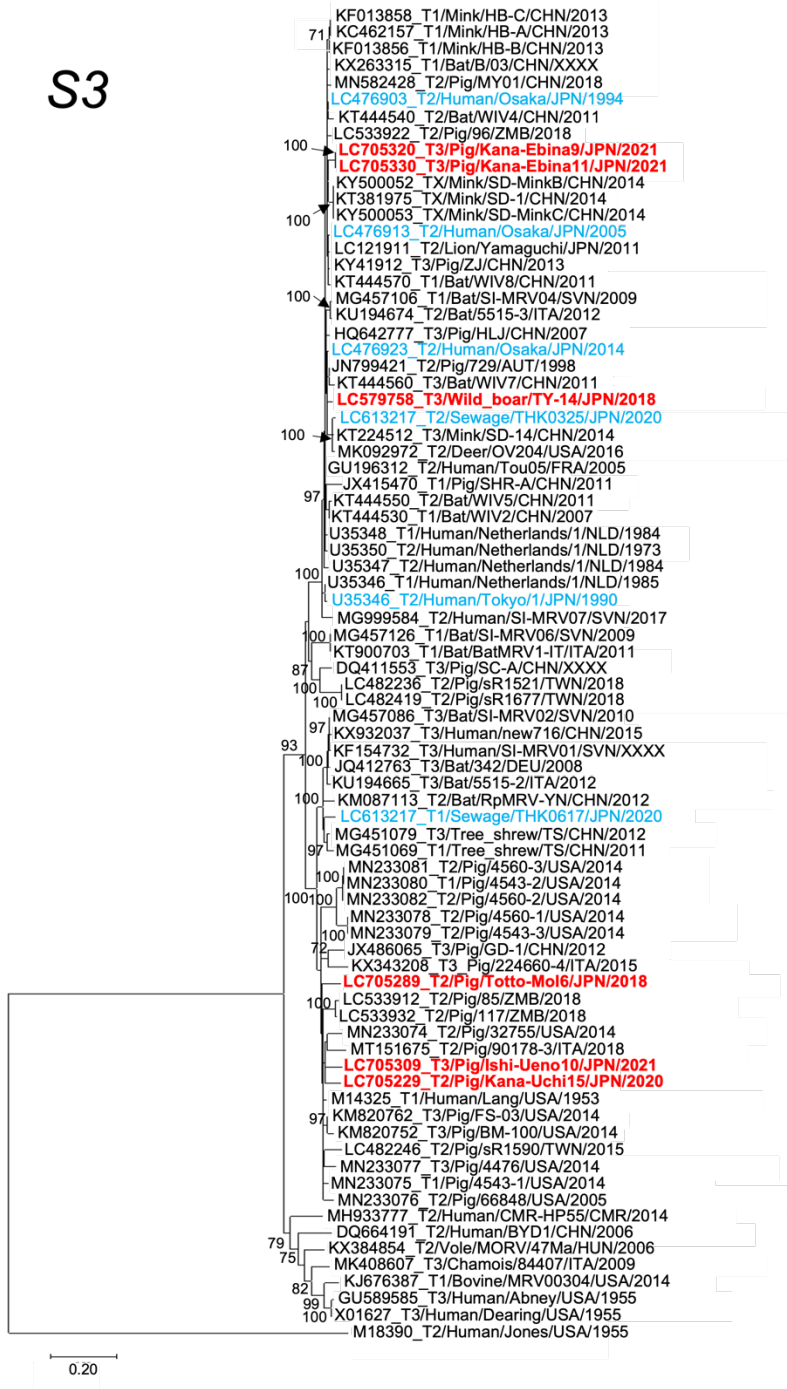


図 2-3 我が国のブタおよびイノシシから分離された MRV の S3 遺伝子塩基配列による分子系統樹。系統樹は最尤法で GTR+G+I により作成した。Bootstrap 値は 70 以上を示した。赤字は我が国のブタおよびイノシシからの MRV を、青字は我が国で検出されたヒト、下水および動物園のライオンからの MRV 株を示す。

S4

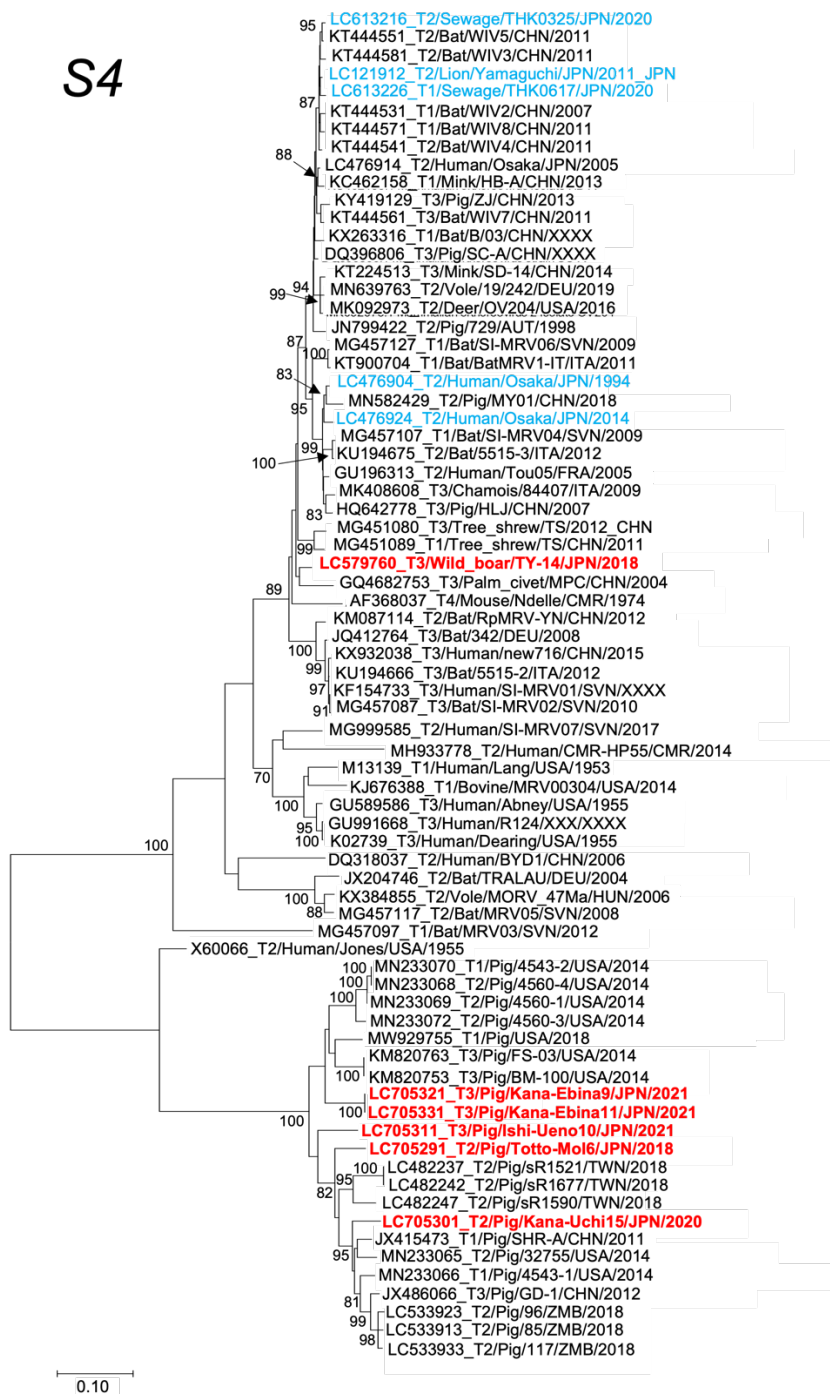


図 2-4 我が国のブタおよびイノシシから分離された MRV の S4 遺伝子塩基配列による分子系統樹。系統樹は最尤法で GTR+G+I により作成した。Bootstrap 値は 70 以上を示した。赤字は我が国のブタおよびイノシシからの MRV を、青字は我が国で検出されたヒト、下水および動物園のライオンからの MRV 株を示す。

M1

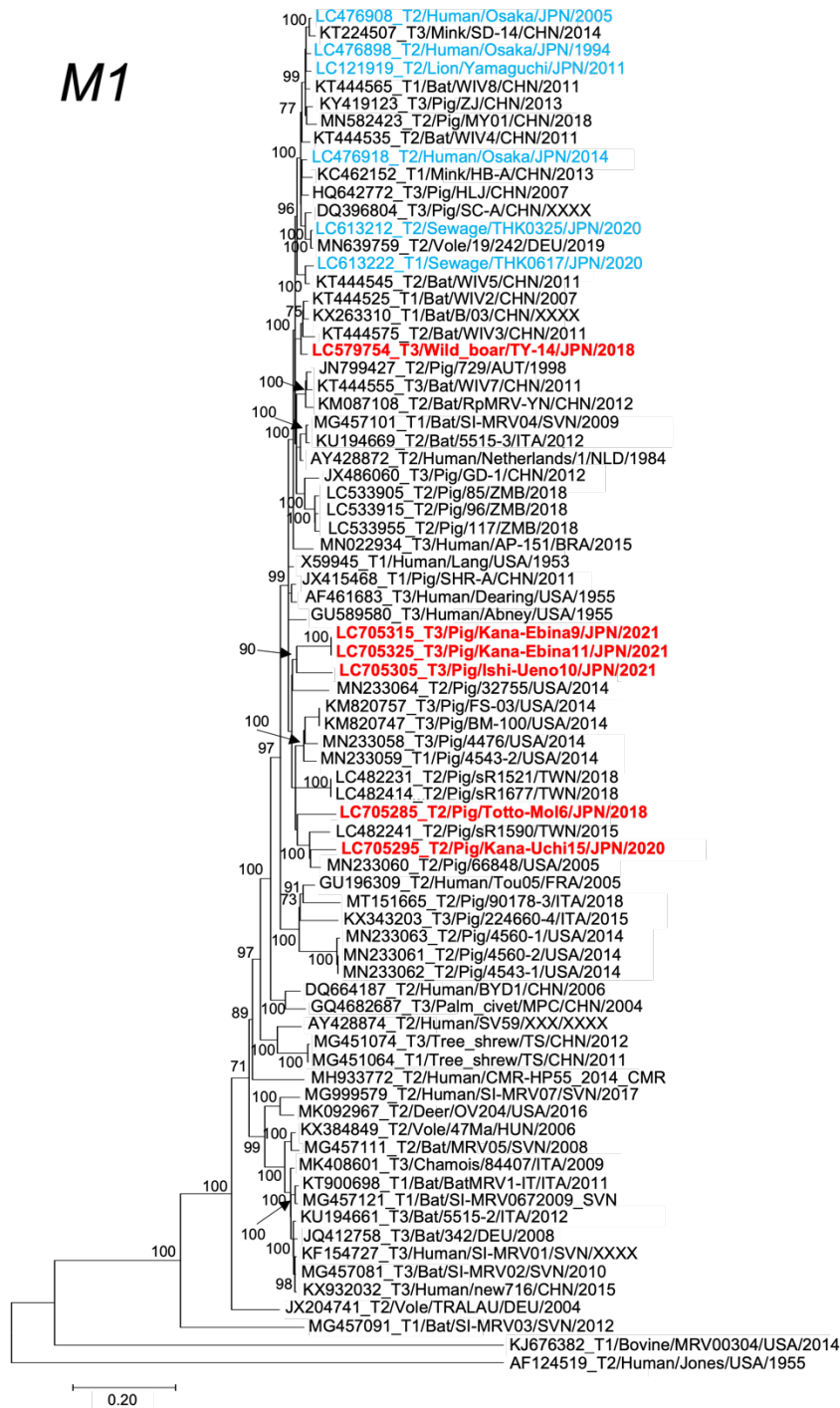


図 2-5 我が国のブタおよびイノシシから分離された MRV の M1 遺伝子塩基配列による分子系統樹。系統樹は最尤法で GTR+G+I により作成した。Bootstrap 値は 70 以上を示した。赤字は我が国のブタおよびイノシシからの MRV を、青字は我が国で検出されたヒト、下水および動物園のライオンからの MRV 株を示す。

M2

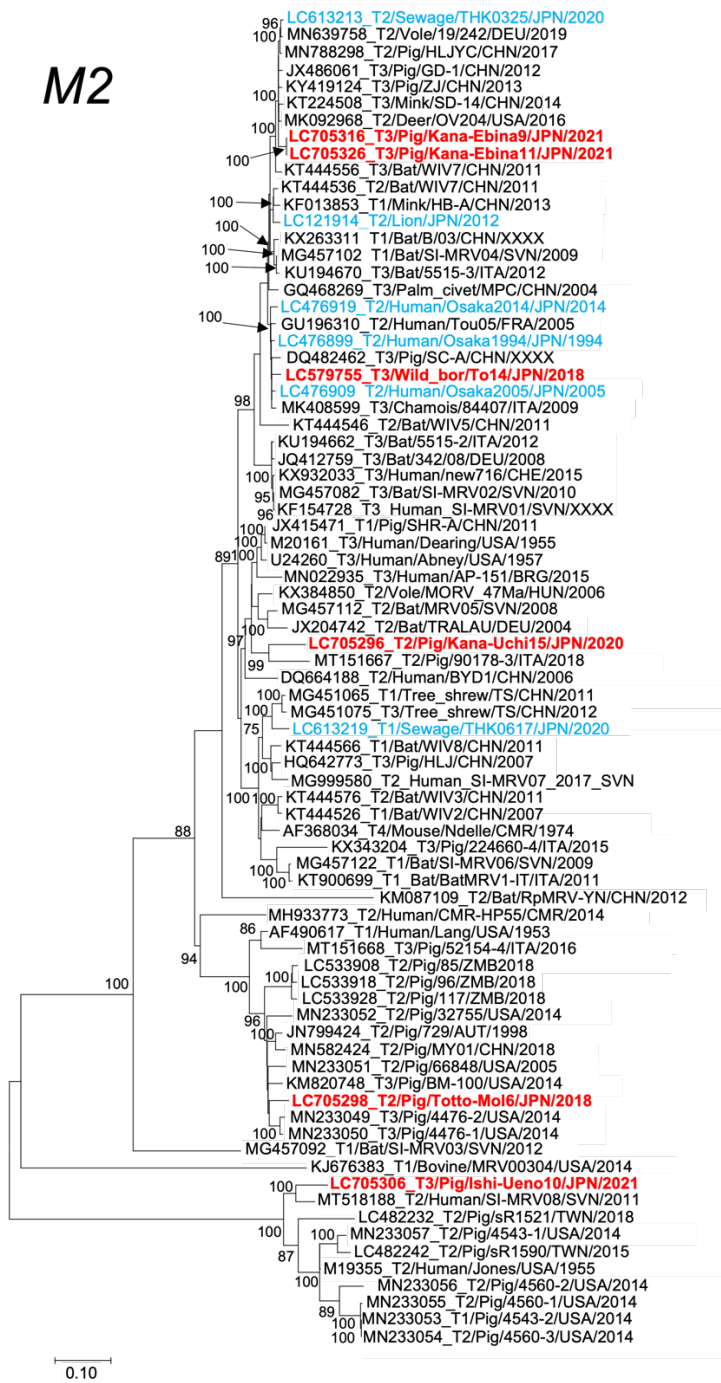


図 2-6 我が国のブタおよびイノシシから分離された MRV の M2 遺伝子塩基配列による分子系統樹。系統樹は最尤法で GTR+G+I により作成した。Bootstrap 値は 70 以上を示した。赤字は我が国のブタおよびイノシシからの MRV を、青字は我が国で検出されたヒト、下水および動物園のライオンからの MRV 株を示す。

M3

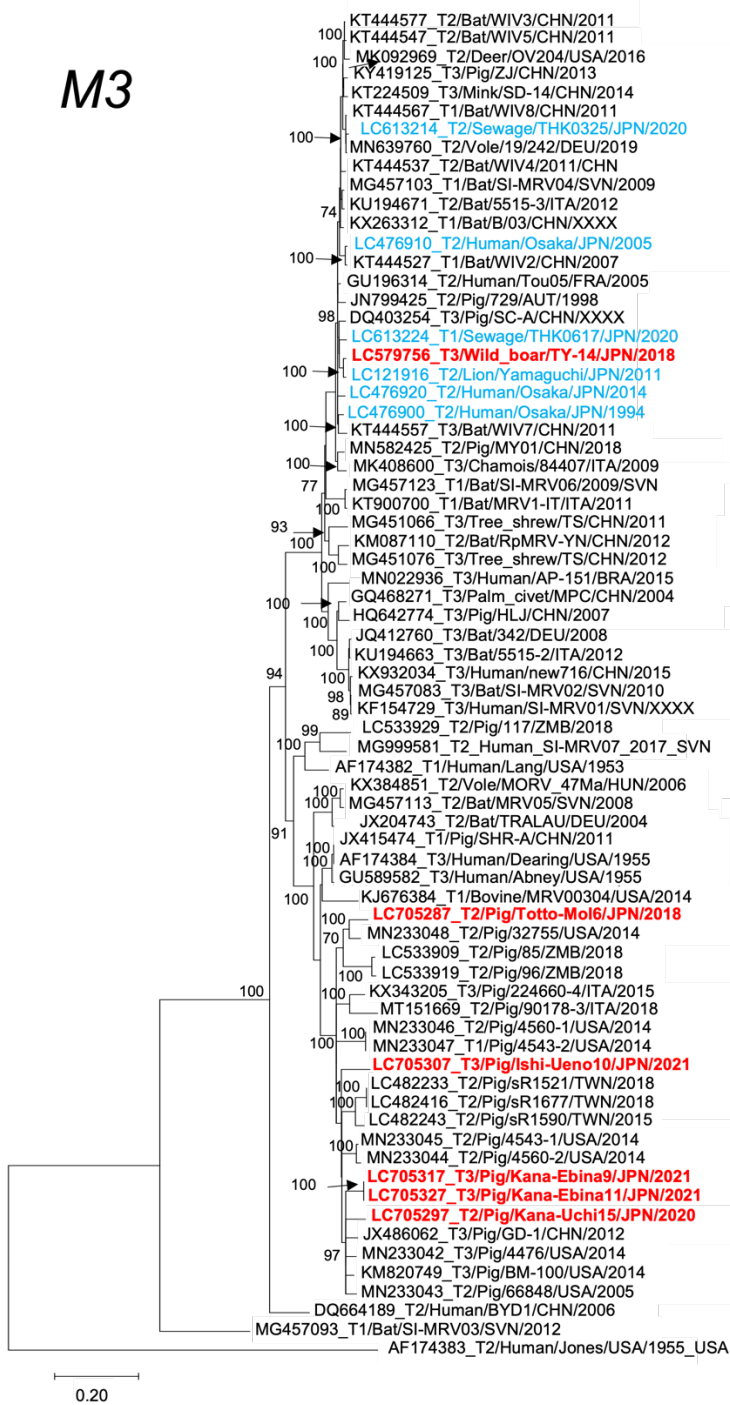


図 2-7 我が国のブタおよびイノシシから分離された MRV の M3 遺伝子塩基配列による分子系統樹。系統樹は最尤法で GTR+G+I により作成した。Bootstrap 値は 70 以上を示した。赤字は我が国のブタおよびイノシシからの MRV を、青字は我が国で検出されたヒト、下水および動物園のライオンからの MRV 株を示す。

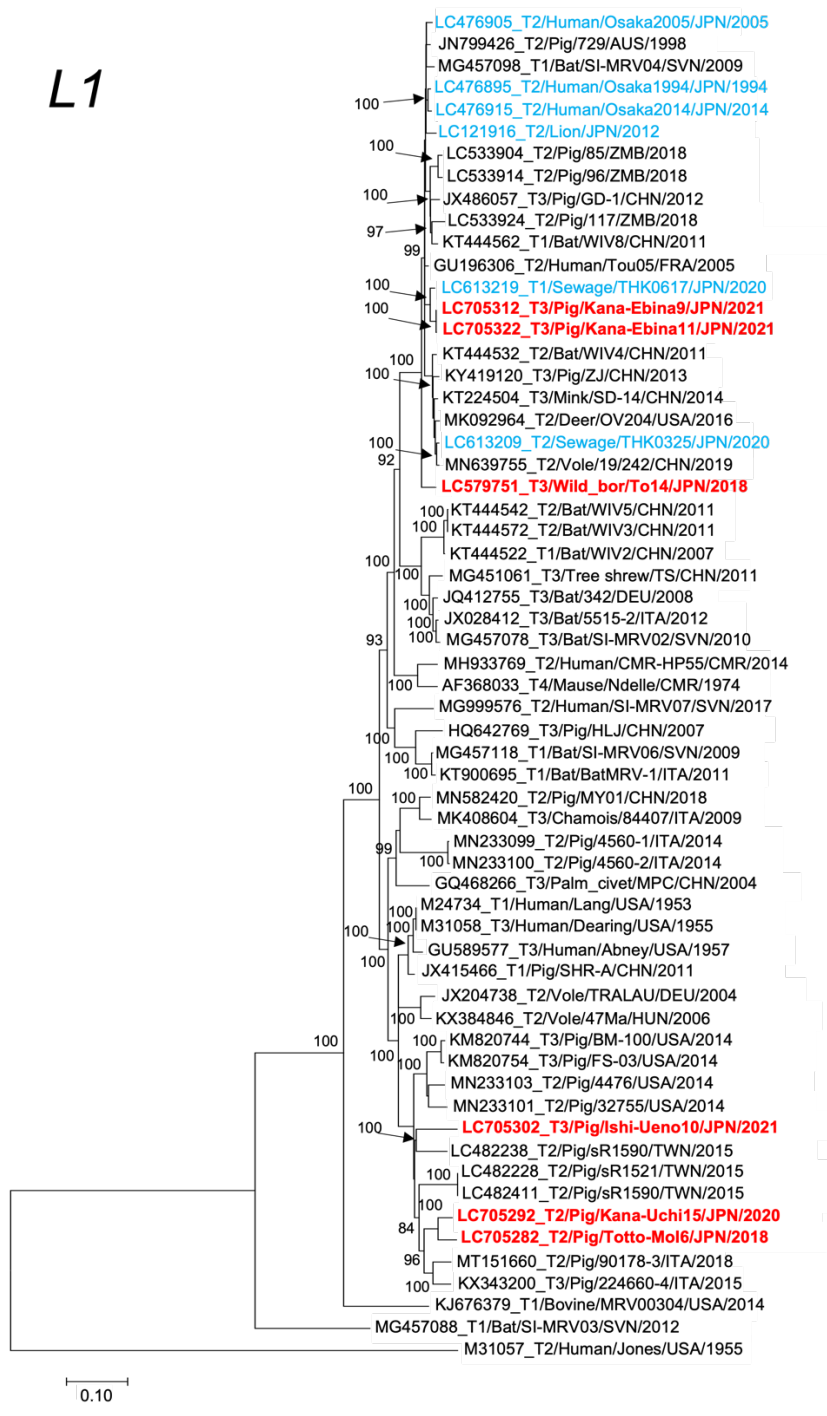


図 2-8 我が国のブタおよびイノシシから分離された MRV の L1 遺伝子塩基配列による分子系統樹。系統樹は最尤法で GTR+G+I により作成した。Bootstrap 値は 70 以上を示した。赤字は我が国のブタおよびイノシシからの MRV を、青字は我が国で検出されたヒト、下水および動物園のライオンからの MRV 株を示す。

L2

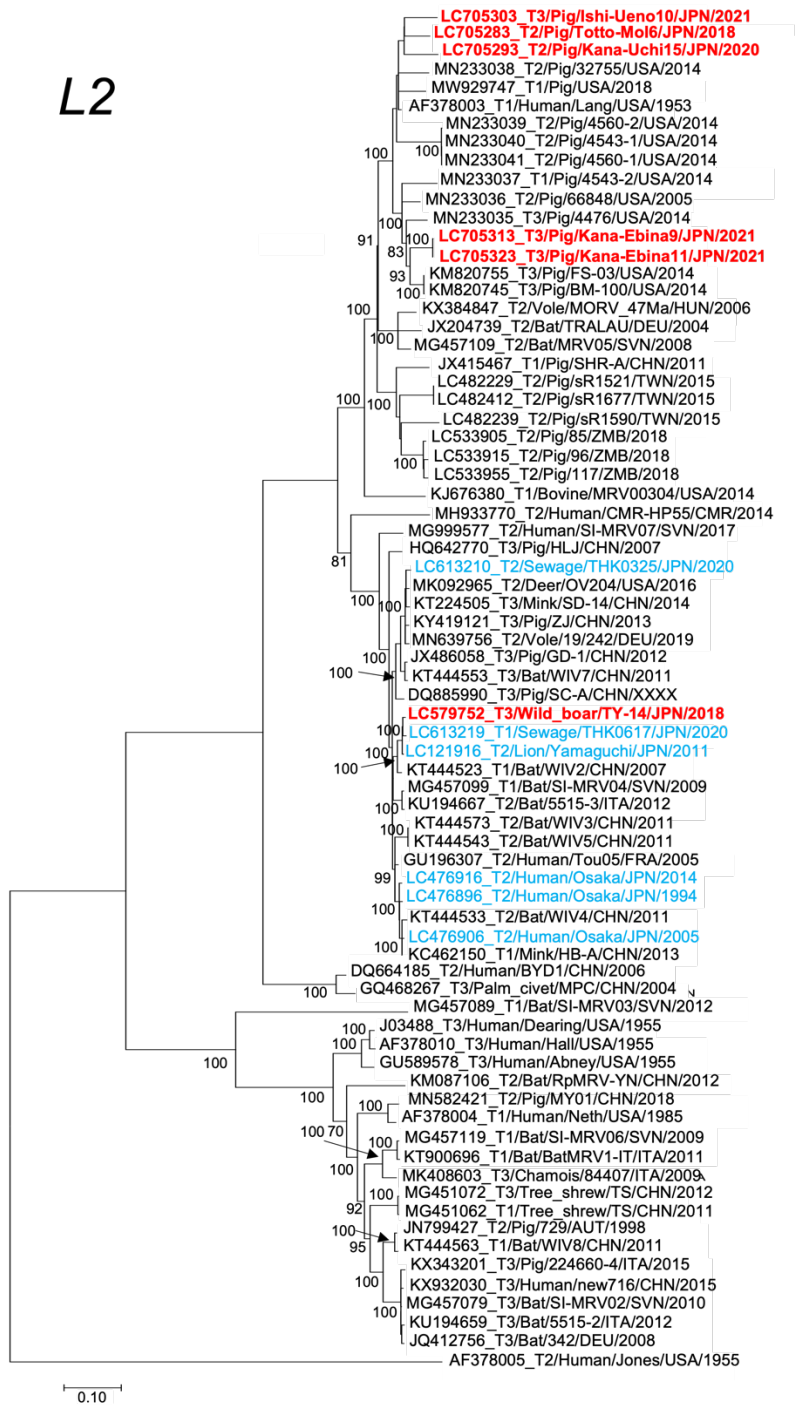


図 2-9 我が国のブタおよびイノシシから分離された MRV の L2 遺伝子塩基配列による分子系統樹。系統樹は最尤法で GTR+G+I により作成した。Bootstrap 値は 70 以上を示した。赤字は我が国のブタおよびイノシシからの MRV を、青字は我が国で検出されたヒト、下水および動物園のライオンからの MRV 株を示す。

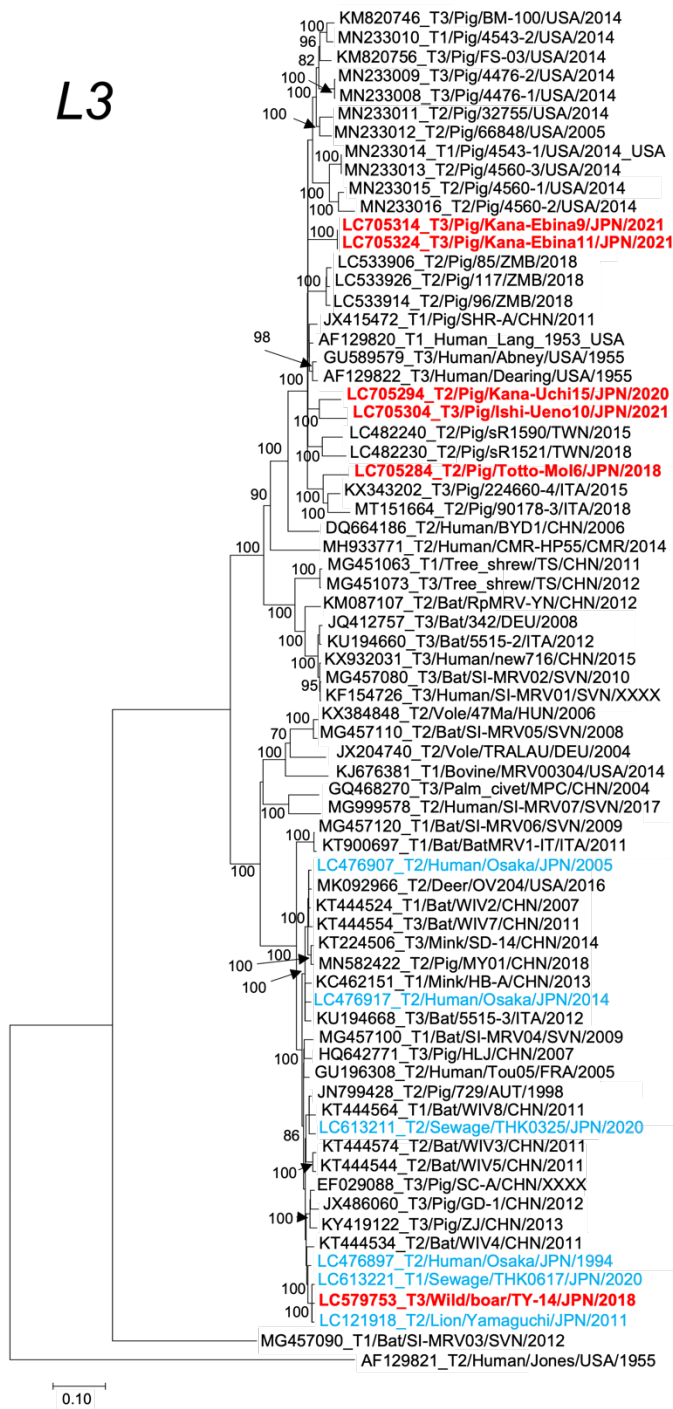


図 2-10 我が国のブタおよびイノシシから分離された MRV の L3 遺伝子塩基配列による分子系統樹。系統樹は最尤法で GTR+G+I により作成した。Bootstrap 値は 70 以上を示した。赤字は我が国のブタおよびイノシシからの MRV を、青字は我が国で検出されたヒト、下水および動物園のライオンからの MRV 株を示す。

表 2-1 過去に糞便材料を材料として次世代シーケンスを行ったブタ(A)およびイノシシ(B)の詳細な情報。

(A)

年度	地域	農家	日・月齢	下痢	正常
2017年度	北陸	T	27日齢	1	5
	北陸	U	28-29日齢	0	6
2018年度	関東	A	1.5-3ヶ月	0	12
	関東	B	1.5-3ヶ月	0	10
	山陰	V	29-59日齢	1	4
	山陰	W	38-75日齢	0	3
	山陰	X	38-60日齢	5	5
2019年度	関東	A	1.5-3ヶ月	0	13
	関東	B	1.5-3ヶ月	0	7

(B)

年度	地域	県	日・月齢	下痢	正常
2018年度	北陸	石川県	1-5カ月齢	0	14
	北陸	富山県	1-5カ月齢	0	22
2019年度	北陸	石川県	1-5カ月齢	0	34
	北陸	富山県	1-5カ月齢	0	16

表 2-2 Kana-Uchi-15 の塩基配列およびアミノ酸配列に最も相同性を示す上位3 MRV 株と相同性(%)。

Segment	Kana-Uchi-15/2020			
	strain (nucleotide)	%	strain (amino acid)	%
S1	MN233092/Pig/66848/USA/2005/T2	89.1	LC533930/Pig/117/ZAM/2018/T2	88.3
	MN233093/Pig/4560-2/USA/2014/T2	88.8	LC533910/Pig/85/ZAM/2018/T2	87.4
	MN233094/Pig/4560-1/USA/2014/T2	88.6	MN233092/Pig/66848/USA/2005/T2	86.3
S2	L19774/Human/Lang/USA/1953/T1	94.8	P03525/Human/Dearing/USA/T3	98.3
	MW582629/Bat/B19-02/KOR/2019/T1	94.2	KT224511/Mink/SD-14/CHN/2014/T3	98.1
	GU589584/Human/Abney/USA/1955/T3	93.5	MG451078/Tree shrew/CHN/2012/T3	97.9
S3	KM820762/Pig/FS-03/USA/2014/T3	94.8	MN233075/Pig/4543-1/USA/2014/T1	99.2
	M14325/Human/Lang/USA/1953/T1	94.4	MN233077/Pig/4476/USA/2014/T3	99.2
	KM820752/Pig/BM-100/USA/2014/T3	94.1	KM820752/Pig/BM-100/USA/2014/T3	98.9
S4	JX415473/Pig/SHR-A/CHN/2011/T1	94.0	MN233066/Pig/4543-1/USA/2014/T1	97.5
	MN233066/Pig/4543-1/USA/2014/T1	93.9	JX415473/Pig/SHR-A/CHN/2011/T1	97.0
	LC533933/Pig/117/ZAM/2018/T2	93.6	MN233065/Pig/32755/USA/2014/T2	96.4
M1	MN233060/Pig/66848/USA/2005/T2	94.1	MN233060/Pig/66848/USA/2005/T2	96.5
	AF461682/Human/Lang/USA/1953/T1	93.0	AY428872/Pig/NLD/1971/T1	95.9
	LC482241/Pig/sR1590/TWN/2015/T2	92.5	AF461682/Human/Lang/USA/1953/T1	95.9
M2	U24260/Human/Abney/USA/1955/T3	91.4	MT151667/Pig/90178-3/ITA/2018/T2	96.9
	JX415471/Pig/SHR-A/CHN/2011/T1	91.3	MG451065/Tree shrew/CHN/2011/T1	96.9
	M20161/Human/Dearing/USA/1955/T3	91.0	KT444576/Bat/WIV3/CHN/2011/T2	96.9
M3	KM820749/Pig/BM-100/USA/2014/T3	92.2	MN233042/Pig/4476/USA/2014/T3	98.2
	MN233042/Pig/4476/USA/2014/T3	91.7	JX486062/Pig/GD-1/CHN/2012/T3	97.5
	MN233043/Pig/66848/USA/2005/T2	91.5	KM820749/Pig/BM-100/USA/2014/T3	97.5
L1	MT151660/Pig/90178-3/ITA/2018/T2	92.9	MT151660/Pig/90178-3/ITA/2018/T2	98.7
	KX343200/Pig/224660-4/ITA/2015/T3	92.7	MN233103/Pig/4476/USA/2014/T3	98.7
	LC482238/Pig/sR1590/TWN/2015/T2	91.9	KM820754/Pig/FS-03/USA/2014/T3	98.7
L2	AF378003/Human/Lang/USA/1953/T1	93.6	AF378003/Human/Lang/USA/1953/T1	97.8
	MW929747/Pig/USA/2018/T1	90.9	AF378008/Bovine/Maryland/USA/1961/T3	97.7
	MN233036/Pig/66848/USA/2005/T2	90.7	AF378007/Murine/FRA/1961/T3	96.9
L3	AF129820/Human/Lang/USA/1953/T1	93.8	JX415472/Pig/SHR-A/CHN/2011/T1	98.8
	JX415472/Pig/SHR-A/CHN/2011/T1	93.5	GU589579/Human/Abney/USA/1955/T3	98.8
	GU589579/Human/Abney/USA/1955/T3	93.3	AF129820/Human/Lang/USA/1953/T1	98.6

表 2-3 Ishi-Ueno10 の塩基配列およびアミノ酸配列に最も相同性を示す上位3MRV株と相同性(%)。

Segment	Ishi-Ueno-10/2021			
	strain (nucleotide)	%	strain (amino acid)	%
S1	JF829216/Pig/KPR146/KOR/2005/T3	94.4	JF829216/Pig/KPR146/KOR/2005/T3	93.2
	JF829217/Pig/KPR150/KOR/2005/T3	94.3	JF829217/Pig/KPR150/KOR/2005/T3	93.0
	JF829215/Pig/KPR143/KOR/2005/T3	94.2	JF829218/Pig/KPR155/KOR/2005/T3	92.8
S2	KT224511/Mink/SD-14/CHN/2014/T3	89.6	KT224511/Mink/SD-14/CHN/2014/T3	97.9
	LC476912/Human/Osaka2005/JPN/2005/T2	89.3	MG451078/Tree shrew/CHN/2012/T3	97.6
	KT444559/Bat/WIV7/CHN/2011/T3	89.3	P03525/Human/Dearing/USA/T3	97.6
S3	KM820762/Pig/FS-03/USA/2014/T3	94.1	MN233075/Pig/4543-1/USA/2014/T1	98.9
	M14325/Human/Lang/USA/1953/T1	93.7	MG451069/Tree shrew/CHN/2012/T3	98.6
	KM820752/Pig/BM-100/USA/2014/T3	93.5	KM820752/Pig/BM-100/USA/2014/T3	98.6
S4	MN233067/Pig/4476/USA/2014/T3	90.6	MW929755/Pig/USA/2018/T1	97.3
	MN233066/Pig/4543-1/USA/2014/T1	90.2	LC482237/Pig/sR1521/TWN/2015/T2	96.4
	LC482247/Pig/sR1590/TWN/2015/T2	90.1	MN233065/Pig/32755/USA/2014/T2	96.2
M1	AF461682/Human/Lang/USA/1953/T1	93.0	LC476918/Human/Osaka2014/T2	96.1
	JX415468/Pig/SHR-A/CHN/2011/T1	92.2	AF461682/Human/Lang/USA/1953/T1	96.1
	AF461683/Human/Dearing/USA/1955/T3	92.1	JX415468/Pig/SHR-A/CHN/2011/T1	95.9
M2	MT518188/Human/SI-MRV08/SVN/2011/T2	92.5	MT518188/Human/SI-MRV08/SVN/2011/T2	98.0
	M19355/Human/Jones/USA/1955/T2	89.5	M19355/Human/Jones/USA/1955/T2	97.9
	MN233057/Pig/4543-1/USA/2014/T2	87.3	MW929750/Pig/USA/2018/T1	96.6
M3	KM820749/Pig/BM-100/USA/2014/T3	92.2	MN233042/Pig/4476/USA/2014/T3	96.8
	MN233042/Pig/4476/USA/2014/T3	91.7	KM820749/Pig/BM-100/USA/2014/T3	96.7
	MN233043/Pig/66848/USA/2005/T2	91.5	MN233043/Pig/66848/USA/2005/T2	96.1
L1	M24734/Human/Lang/USA/1953/T1	91.4	M24734/Human/Lang/USA/1953/T1	98.7
	GU589577/Human/Abney/USA/1955/T3	91.4	LC482238/Pig/sR1590/TWN/T2	98.5
	KM820744/Pig/BM-100/USA/2014/T3	91.3	MT151660/Pig/90178-3/ITA/2018/T2	98.4
L2	AF378003/Human/Lang/USA/1953/T1	93.8	AF378003/Human/Lang/USA/1953/T1	98.0
	MW929747/Pig/USA/2018/T1	90.8	AF378008/Bovine/Maryland/USA/1961/T3	97.8
	MN233038/Pig/32755/USA/2014/T2	90.7	MN233038/Pig/32755/USA/2014/T2	97.1
L3	AF129820/Human/Lang/USA/1953/T1	93.0	JX415472/Pig/SHR-A/CHN/2011/T1	98.4
	GU589579/Human/Abney/USA/1955/T3	93.0	GU589579/Human/Abney/USA/1955/T3	98.3
	JX415472/Pig/SHR-A/CHN/2011/T1	92.7	AF129820/Human/Lang/USA/1953/T1	98.1

表 2-4 Kana-Ebina9 の塩基配列およびアミノ酸配列に最も相同性を示す上位3MRV株と相同性(%)。

Segment	Kana-Ebina-9/2021			
	strain (nucleotide)	%	strain (amino acid)	%
S1	LC579757/Wild boar/Toyama14/JPN/2018/T3	98.4	LC579757/Wild boar/Toyama14/JPN/2018/T3	98.7
	JX486063/Pig/GD-1/CHN/2012/T3	92.2	JX486063/Pig/GD-1/CHN/2012/T3	94.5
	KT224510/Mink/SD-14/CHN/2014/T3	92.0	KT444558/Bat/WIV7/CHN/2011/T3	94.5
S2	MN233086/Pig/66848/USA/2005/T2	93.7	KT444529/Bat/WIV2/CHN/2007/T1	97.9
	KM820751/Pig/BM-100/USA/2014/T3	93.2	MG451078/Tree shrew/CHN/2012/T3	97.9
	KM820761/Pig/FS-03/USA/2014/T3	93.1	KT444579/Bat/WIV3/CHN/2011/T2	97.6
S3	LC476903/Human/Osaka/JPN/1994/T2	97.0	KF013856/Mink/HB-B/CHN/2013/T1	100
	LC476913/Human/Osaka2005/JPN/2005/T2	96.7	LC476913/Human/Osaka2005/JPN/2005/T2	99.7
	KF013856/Mink/HB-B/CHN/2013/T1	96.7	LC476903/Human/Osaka/JPN/1994/T2	99.7
S4	MW929755/Pig/USA/2018/T1	91.7	MN233073/Pig/66848/USA/2005/T2	96.2
	MN233073/Pig/66848/USA/2005/T2	91.7	KM820753/Pig/BM-100/USA/2014/T3	95.9
	KM820763/Pig/FS-03/USA/2014/T3	91.0	MW929755/Pig/USA/2018/T1	95.9
M1	AF461682/Human/Lang/USA/1953/T1	93.1	AF461682/Human/Lang/USA/1953/T1	95.9
	JX415468/Pig/SHR-A/CHN/2011/T1	92.3	LC476918/Human/Osaka2014/T2	95.8
	AF461683/Human/Dearing/USA/1955/T3	92.3	JX415468/Pig/SHR-A/CHN/2011/T1	95.7
M2	KY419124/Pig/ZJ/CHN/2013/T3	97.9	LC613213/Sewage/THK0325/JPN/2020/T2	99.7
	KT224508/Mink/SD-14/CHN/2014/T3	97.9	KT224508/Mink/SD-14/CHN/2014/T3	99.6
	JX486061/Pig/GD-1/CHN/2012/T3	97.9	MK092968/Deer/OV204/USA/2016/T2	99.4
M3	KM820749/Pig/BM-100/USA/2014/T3	94.8	MN233042/Pig/4476/USA/2014/T3	98.3
	MN233042/Pig/4476/USA/2014/T3	94.2	KM820749/Pig/BM-100/USA/2014/T3	98.2
	MN233043/Pig/66848/USA/2005/T2	94.1	MN233043/Pig/66848/USA/2005/T2	98.1
L1	LC613219/Sewage/THK0617/JPN/2020/T1	98.3	LC613219/Sewage/THK0617/JPN/2020/T1	99.7
	GU196306/Human/Tou05/FRA/2005/T2	97.6	LC476905/Human/Osaka_2005/JPN/2005/T2	99.3
	LC476895/Human/Osaka_1994/JPN/1994/T2	97.4	KT224504/Mink/SD-14/CHN/2014/T3	99.2
L2	KM820755/Pig/FS-03/USA/2014/T3	94.3	KM820745/Pig/BM-100/USA/2014/T3	98.2
	KM820745/Pig/BM-100/USA/2014/T3	94.3	MN233035/Pig/4476/USA/2014/T3	97.4
	AF378003/Human/Lang/USA/1953/T1	93.0	AF378003/Human/Lang/USA/1953/T1	97.4
L3	AF129820/Human/Lang/USA/1953/T1	94.3	JX415472/Pig/SHR-A/CHN/2011/T1	98.8
	GU589579/Human/Abney/USA/1955/T3	93.8	GU589579/Human/Abney/USA/1955/T3	98.8
	JX415472/Pig/SHR-A/CHN/2011/T1	93.7	AF129820/Human/Lang/USA/1953/T1	98.6

表 2-5 Kana-Ebina11 の塩基配列およびアミノ酸配列に最も相同性を示す上位3 MRV 株と相同性(%)。

Segment	Kana-Ebina-11/2021			
	strain (nucleotide)	%	strain (amino acid)	%
L1	LC613219/Sewage/THK0617/JPN/2020/T1	98.3	LC613219/Sewage/THK0617/JPN/2020/T1	99.7
	GU196306/Human/Tou05/FRA/2005/T2	97.6	LC476905/Human/Osaka_2005/JPN/2005/T2	99.3
	LC476895/Human/Osaka_1994/JPN/1994/T2	97.3	KT224504/Mink/SD-14/CHN/2014/T3	99.2
L2	KM820755/Pig/FS-03/USA/2014/T3	94.3	KM820745/Pig/BM-100/USA/2014/T3	98.3
	KM820745/Pig/BM-100/USA/2014/T3	94.3	MN233035/Pig/4476/USA/2014/T3	97.5
	AF378003/Human/Lang/USA/1953/T1	93.0	AF378003/Human/Lang/USA/1953/T1	97.5
L3	AF129820/Human/Lang/USA/1953/T1	94.3	JX415472/Pig/SHR-A/CHN/2011/T1	98.8
	GU589579/Human/Abney/USA/1955/T3	93.8	GU589579/Human/Abney/USA/1955/T3	98.8
	JX415472/Pig/SHR-A/CHN/2011/T1	93.7	AF129820/Human/Lang/USA/1953/T1	98.5
M1	AF461682/Human/Lang/USA/1953/T1	93.1	AF461682/Human/Lang/USA/1953/T1	95.9
	JX415468/Pig/SHR-A/CHN/2011/T1	92.3	LC476918/Human/Osaka2014/T2	95.8
	AF461683/Human/Dearing/USA/1955/T3	92.3	JX415468/Pig/SHR-A/CHN/2011/T1	95.7
M2	MN788298/Pig/HLJY/CHN/2017/T1	98.0	LC613213/Sewage/THK0325/JPN/2020/T2	99.7
	KY419124/Pig/ZJ/CHN/2013/T3	97.9	KT224508/Mink/SD-14/CHN/2014/T3	99.6
	KT224508/Mink/SD-14/CHN/2014/T3	97.9	MK092968/Deer/OV204/USA/2016/T2	99.4
M3	KM820749/Pig/BM-100/USA/2014/T3	94.8	MN233042/Pig/4476/USA/2014/T3	98.3
	MN233042/Pig/4476/USA/2014/T3	94.2	KM820749/Pig/BM-100/USA/2014/T3	98.2
	MN233043/Pig/66848/USA/2005/T2	94.1	MN233043/Pig/66848/USA/2005/T2	98.1
S1	LC579757/Wild boar/Toyama14/JPN/2018/T3	98.4	LC579757/Wild boar/Toyama14/JPN/2018/T3	98.7
	JX486063/Pig/GD-1/CHN/2012/T3	92.2	JX486063/Pig/GD-1/CHN/2012/T3	94.5
	KT224510/Mink/SD-14/CHN/2014/T3	92.0	KT444558/Bat/WIV7/CHN/2011/T3	94.5
S2	MN233086/Pig/66848/USA/2005/T2	93.9	KT444529/Bat/WIV2/CHN/2007/T1	97.9
	MN233085/Pig/4476/USA/2014/T3	93.5	MG451078/Tree shrew/CHN/2012/T3	97.9
	KM820751/Pig/BM-100/USA/2014/T3	93.3	KT444579/Bat/WIV3/CHN/2011/T2	97.6
S3	LC476903/Human/Osaka/JPN/1994/T2	96.9	KF013856/Mink/HB-B/CHN/2013/T1	100
	KF013856/Mink/HB-B/CHN/2013/T1	96.7	LC476913/Human/Osaka2005/JPN/2005/T2	99.7
	LC476913/Human/Osaka2005/JPN/2005/T2	96.6	LC476903/Human/Osaka/JPN/1994/T2	99.7
S4	MW929755/Pig/USA/2018/T1	91.7	MN233073/Pig/66848/USA/2005/T2	96.2
	MN233073/Pig/66848/USA/2005/T2	91.7	KM820753/Pig/BM-100/USA/2014/T3	95.9
	KM820763/Pig/FS-03/USA/2014/T3	91.0	MW929755/Pig/USA/2018/T1	95.9

表 2-6 Totto-MoI-6 の塩基配列およびアミノ酸配列に最も相同性を示す上位3MRV株と相同性(%)。

Segment	Totto-MoI-6/2018			
	strain (nucleotide)	%	strain (amino acid)	%
S1	MN233092/Pig/66848/USA/2005/T2	91.7	MN233092/Pig/66848/USA/2005/T2	90.9
	MN233091/Pig/32755/USA/2014/T2	90.6	LC482244/Pig/sR1590/TWN/2015/T2	88.9
	MN233093/Pig/4560-2/USA/2014/T2	90.4	MN233091/Pig/32755/USA/2014/T2	89.6
S2	MN233086/Pig/66848/USA/2005/T2	96.1	MN233086/Pig/66848/USA/2005/T2	99.0
	MN233084/Pig/4543-2/USA/2014/T1	95.5	MN233083/Pig/32755/USA/2014/T2	98.8
	MW929753/Pig/USA/2018/T1	95.1	KM820751/Pig/BM-100/USA/2014/T3	98.6
S3	M14325/Human/Lang/USA/1953/T1	94.3	LC476913/Human/Osaka2005/JPN/2005/T2	98.1
	KM820762/Pig/FS-03/USA/2014/T3	94.1	KF013856/Mink/HB-B/CHN/2013/T1	97.8
	MN233076/Pig/66848/USA/2005/T2	93.7	U35346/Human/Netherlands/1/1985/T1	97.8
S4	JX415473/Pig/SHR-A/CHN/2011/T1	92.8	MT151677/Pig/90178-3/ITA/2018/T2	96.4
	MN233065/Pig/32755/USA/2014/T2	92.8	MN233065/Pig/32755/USA/2014/T2	95.9
	MN233066/Pig/4543-1/USA/2014/T1	92.3	MN233066/Pig/4543-1/USA/2014/T1	95.6
M1	AF461682/Human/Lang/USA/1953/T1	92.7	MG457101/Bat/S1-MRV04/SIN/2009/T1	96.3
	JX415468/Pig/SHR-A/CHN/2011/T1	92.0	JX415468/Pig/SHR-A/CHN/2011/T1	96.1
	AF461683/Human/Dearing/USA/1955/T3	91.6	AY428872/Pig/NLD/1971/T1	96.1
M2	MN233050/Pig/4476-1/USA/2014/T3	94.8	MN233050/Pig/4476-1/USA/2014/T3	99.3
	KM820748/Pig/BM-100/USA/2014/T3	94.6	MN233049/Pig/4476-2/USA/2014/T3	99.3
	JN799424/Pig/729/AUT/1998/T2	94.3	P11077/Human/Lang/USA/1953/T1	99.0
M3	MN233048/Pig/32755/USA/2014/T2	93.8	MN233048/Pig/32755/USA/2014/T2	97.2
	KM820749/Pig/BM-100/USA/2014/T3	91.5	MN233042/Pig/4476/USA/2014/T3	96.0
	MN233042/Pig/4476/USA/2014/T3	90.8	JX486062/Pig/GD-1/CHN/2012/T3	95.8
L1	KX343200/Pig/224660-4/ITA/2015/T3	92.4	MT151660/Pig/90178-3/ITA/2018/T2	98.6
	MT151660/Pig/90178-3/ITA/2018/T2	92.4	MN233103/Pig/4476/USA/2014/T3	98.3
	LC482228/Pig/sR1521/TWN/2015/T2	91.6	KM820754/Pig/FS-03/USA/2014/T3	98.3
L2	AF378003/Human/Lang/USA/1953/T1	94.8	AF378003/Human/Lang/USA/1953/T1	98.4
	MW929747/Pig/USA/2018/T1	91.9	AF378008/Bovine/Maryland/USA/1961/T3	98.3
	MN233038/Pig/32755/USA/2014/T2	91.5	AF378007/Murine/FRA/1961/T3	97.4
L3	KX343202/Pig/224660-4/ITA/2015/T3	93.3	JX415472/Pig/SHR-A/CHN/2011/T1	98.0
	AF129820/Human/Lang/USA/1953/T1	93.0	AF129820/Human/Lang/USA/1953/T1	98.0
	GU589579/Human/Abney/USA/1955/T3	92.5	GU589579/Human/Abney/USA/1955/T3	98.0

表 2-7 Wild Boar TY14 の塩基配列およびアミノ酸配列に最も相同性を示す上位3 MRV 株と相同性(%)。

Segment	Wild Boar TY14/2018					
	strain (nucleotide)		%	strain (amino acid)		%
S1	LC705318/Pig/Kana-Ebina-9/JPN/2021/T3		98.4	LC705318/Pig/Kana-Ebina-9/JPN/2021/T3		98.7
	LC705328/Pig/Kana-Ebina-11/JPN/2021/T3		98.4	KT444558/Bat/WIV7/CHN/2011/T3		95.0
	JX486063/Pig/GD-1/CHN/2012/T3		92.5	JX486063/Pig/GD-1/CHN/2012/T3		95.0
S2	LC476922/Human/Osaka2014/JPN/2014/T2		98.7	KT224511/Mink/SD-14/CHN/2014/T3		99.5
	MK408606/Chamois/84407/ITA/2009/T3		97.6	KY419127/Pig/ZJ2014/CHN/2014/T3		99.5
	GU196311/Human/Tou05/FRA/2005/T2		97.3	MG451078/Tree shrew/TS/CHN/2012/T3		99.3
S3	LC476923/Human/Osaka2014/JPN/2014/T2		97.6	JN799421/Pig/729/AUT/1998/T2		99.5
	MW198712/Cattle/YNSZ/V207/CHN/2016/T1		97.4	LC476923/Human/Osaka2014/JPN/2014/T2		99.2
	GU196312/Human/Tou05/FRA/2005/T2		97.3	KT224512/Mink/SD-14/CHN/2014/T3		98.6
S4	DQ396806/Pig/SC-A/CHN/XXXX/T3		95.0	KT444551/Bat/WIV5/CHN/2011/T2		99.7
	LC476914/Human/Osaka2005/JPN/2005/T2		94.9	DQ396806/Pig/SC-A/CHN/XXXX/T3		99.7
	KT444581/Bat/WIV3/CHN/2011/T2		94.9	OR074538/Sewage/T2E2/CAN/2012/T2		99.7
M1	KT444525/Bat/WIV2/CHN/2007/T1		97.6	KT444525/Bat/WIV2/CHN/2007/T1		98.6
	AY428872/Pig/NLD/1971/T1		96.7	AF461682/Human/Lang/USA/1953/T1		98.6
	KT444575/Bat/WIV3/CHN/2011/T2		96.4	AY428872/Pig/NLD/1971/T1		98.5
M2	LC476909/Human/Osaka2005/JPN/2005/T2		97.7	GU196310/Human/Tou05/FRA/2005/T2		99.9
	LC476899/Human/Osaka1994/JPN/1994/T2		97.6	LC476919/Human/Osaka2014/JPN/2014/T2		99.7
	MK408599/Chamois/84407/ITA/2009/T3		97.6	OR074580/Sewage/T1E1v3/CAN/2012/T1		99.7
M3	LC121915/Lion/Yanaguchi/JPN/2011/T2		98.9	OR074581/Sewage/T1E1v3/CAN/2012/T1		99.2
	OR074581/Sewage/T1E1v3/CAN/2012/T1		97.4	LC476900/Human/Osaka1994/JPN/1994/T2		99.0
	MW198709/Cattle/YNSZ/V207/CHN/2016/T1		97.2	KT444577/Bat/WIV3/CHN/2011/T2		99.0
L1	MW198704/Cattle/YNSZ/V207/CHN/2016/T1		96.8	KT444522/Bat/WIV2/CHN/2007/T1		99.4
	OP169449/Bat/QAPpC66/CHN/2016/T2		96.8	KX932029/Human/new716/CHE/2015/T3		99.3
	OP169448/Bat/QAPpC15/CHN/2016/T2		96.8	JX028412/Bat/5515-2/ITA/2012/T3		99.2
L2	LC121917/Lion/Yanaguchi/JPN/2011/T2		99.2	LC613220/Sewage/THK0617/JPN/2020/T1		99.5
	LC613220/Sewage/THK0617/JPN/2020/T1		99.0	GU196307/Human/Tou05/FRA/2005/T2		99.3
	KT444523/Bat/WIV2/CHN/2007/T1		97.9	MG457099/Bat/SI-MRV04/SVN/2009/T1		99.2
L3	LC121918/Lion/Yanaguchi/JPN/2011/T2		99.1	LC613221/Sewage/THK0617/JPN/2020/T1		99.8
	LC613221/Sewage/THK0617/JPN/2020/T1		99.1	KT444544/Bat/WIV5/CHN/2011/T2		99.8
	LC476897/Human/Osaka1994/JPN/1994/T2		98.8	OP057399/Bat/Nebraska/USA/2017/T2		99.7

表 2-8 我が国のブタ、イノシシ、動物園のライオン、ヒトおよび下水からの MRV の S1 の塩基配列およびアミノ酸配列の相同性(%)。黄色の塗りつぶしは 96.0%以上 98.0%未満、ピンクの塗りつぶしは 98.0%以上を示す。

S1	amino acid	nucleotide	Wild Boar TY14/2018										Se	
			Mol-6	Uchi-15	Ueno-10	Ebina-9	Ebina-11	WB/To14	P Leo	Osaka1994	Osaka2005	Osaka2014	THK0325	THK0617
	Totto-Mol-6/2018/T2			85.8	39.1	39.9	40.0	39.6	65.4	68.0	67.8	68.0	66.7	52.3
	Kana-Uchi-15/2020/T2		83.3		40.3	41.5	41.4	40.9	65.6	69.4	68.9	69.3	68.1	53.9
	Ishi-Ueno-10/2021/T3		23.7	24.5		86.8	86.7	87.0	40.8	41.2	40.7	41.0	40.6	36.8
	Kana-Ebina-9/2021/T3		24.1	24.3	88.4		99.9	98.2	41.9	42.1	41.8	41.5	41.2	37.9
	Kana-Ebina-11/2021/T3		24.1	24.3	88.4	100	98.4	98.4	41.8	42.0	41.7	41.5	41.2	37.9
	Wild boar_To14/2018/JPN/T3 (LC579757)		23.7	23.9	88.6	98.7	98.7	98.7	41.3	41.6	41.2	41.1	40.7	37.9
	Panthera_Leo/2011/JPN/T2 (LC121909)		68.1	69.4	25.8	24.5	24.5	24.1		69.9	69.8	69.1	69.1	55.1
	Human/Osaka/1994/JPN/T2 (LC476901)		71.1	73.9	25.8	25.0	25.0	75.1	24.7		96.9	97.3	95.3	54.9
	Human/Osaka/2005/JPN/T2 (LC476911)		71.1	73.9	25.6	24.7	24.7	75.7	24.5	98.0		96.6	97.1	54.3
	Human/Osaka/2014/JPN/T2 (LC476921)		71.1	74.1	25.8	24.7	24.7	75.1	24.5	97.6	97.2		94.9	55.0
	Sewage/THK0325/2020/JPN/T2 (LC613215)		70.4	73.9	25.0	24.1	24.1	75.3	23.9	96.3	97.8	95.9		54.5
	Sewage/THK0617/2020/JPN/T1 (LC613225)		45.9	48.3	22.7	23.5	23.5	51.5	23.1	52.4	51.9	52.6	51.9	

表 2-9 我が国のブタ、イノシシ、動物園のライオン、ヒトおよび下水からの MRV の S2 の塩基配列およびアミノ酸配列の相同性(%)。黄色の塗りつぶしは 96.0%以上 98.0%未満、ピンクの塗りつぶしは 98.0%以上を示す。

S2 amino acid nucleotide	Mol-6	Uchi-15	Ueno-10	Ebina-9	Ebina-11	WB/To14	P Leo	Osaka1994	Osaka2005	Osaka2014	Se THK0325	Se THK0617
Totto-Mol-6/2018/T2		90.9	86.7	92.4	92.2	84.5	84.5	85.9	92.2	84.5	90.9	91.8
Kana-Uchi-15/2020/T2	96.2		87.2	90.6	90.7	82.6	85.4	85.8	92.0	83.3	90.2	91.1
Ishi-Ueno-10/2021/T3	96.9	96.4		86.2	86.7	83.5	83.7	84.8	89.3	84.0	86.9	88.5
Kana-Ebina-9/2021/T3	97.1	96.9	95.7		99.5	82.8	83.5	84.7	90.7	83.2	89.0	90.0
Kana-Ebina-11/2021/T3	97.1	96.9	95.7	100		83.3	83.6	84.8	91.2	83.6	88.9	90.5
Wild boar_To14/2018/JPN/T3 (LC579758)	97.9	97.6	97.6	97.1	97.1		85.4	86.7	84.3	98.6	82.4	83.8
Panthera_leo/2011/JPN/T2 (LC121910)	97.4	97.9	97.1	97.4	97.4	98.8		97.4	84.6	85.2	83.5	84.1
Human/Osaka/1994/JPN/T2 (LC476902)	97.6	98.1	97.4	97.6	97.6	99.0	99.8		85.9	86.5	84.5	85.4
Human/Osaka/2005/JPN/T2 (LC476912)	98.1	97.6	97.4	97.6	97.6	99.0	98.8	99.0		84.7	96.7	98.4
Human/Osaka/2014/JPN/T2 (LC476922)	97.9	97.6	97.6	97.1	97.1	100	98.8	99.0	99.0		82.7	84.2
Sewage/THK0325/2020/JPN/T2 (LC613216)	98.1	97.6	97.4	97.6	97.6	99.0	99.0	99.0	99.5	99.0		95.9
Sewage/THK0617/2020/JPN/T1 (LC613226)	97.9	97.4	97.1	97.4	97.4	98.8	98.6	98.8	99.3	98.8	99.3	

表 2-10 我が国のブタ、イノシシ、動物園のライオン、ヒトおよび下水からの MRV の S3 の塩基配列およびアミノ酸配列の相同性(%)。黄色の塗りつぶしは 96.0%以上 98.0%未満、ピンクの塗りつぶしは 98.0%以上を示す。

S3 amino acid nucleotide	Mol-6	Uchi-15	Ueno-10	Ebina-9	Ebina-11	WB/To14	P Leo	Osaka1994	Osaka2005	Osaka2014	Se THK0325	Se THK0617
Totto-Mol-6/2018/T2		91.0	89.2	87.5	87.4	87.8	87.9	88.3	88.2	88.5	88.0	89.6
Kana-Uchi-15/2020/T2	97.0		91.4	86.7	86.6	87.0	88.5	87.4	87.4	88.1	87.7	90.2
Ishi-Ueno-10/2021/T3	96.2	98.6		86.9	86.8	87.3	87.1	87.7	87.2	88.1	87.9	90.4
Kana-Ebina-9/2021/T3	97.8	98.1	97.3		99.9	95.3	94.9	97.0	96.7	96.5	95.1	88.5
Kana-Ebina-11/2021/T3	97.8	98.1	97.3	100		95.2	94.8	96.9	96.6	96.4	95.0	88.4
Wild boar_To14/2018/JPN/T3 (LC579759)	96.7	97.0	97.0	97.8	97.8		94.7	96.6	96.2	97.6	95.7	88.4
Panthera_leo/2011/JPN/T2 (LC121911)	97.5	97.8	97.5	99.7	99.7	98.1		96.6	96.9	95.9	94.2	89.3
Human/Osaka/1994/JPN/T2 (LC476903)	97.5	97.8	97.0	99.7	99.7	97.5	99.5		98.3	97.8	96.1	89.0
Human/Osaka/2005/JPN/T2 (LC476913)	98.1	98.4	97.5	99.7	99.7	97.5	99.5	99.5		97.5	95.7	89.2
Human/Osaka/2014/JPN/T2 (LC476923)	97.0	97.8	97.8	98.6	98.6	99.2	98.9	98.4	98.4		96.9	89.5
Sewage/THK0325/2020/JPN/T2 (LC613217)	96.2	97.0	97.0	97.8	97.8	98.4	98.1	97.5	97.5	99.2		88.6
Sewage/THK0617/2020/JPN/T1 (LC613227)	97.3	97.5	97.3	98.4	98.4	97.3	98.6	98.1	98.6	98.1	97.3	

表 2-11 我が国のブタ、イノシシ、動物園のライオン、ヒトおよび下水からの MRV の S4 の塩基配列およびアミノ酸配列の相同性(%)。黄色の塗りつぶしは 96.0%以上 98.0%未満、ピンクの塗りつぶしは 98.0%以上を示す。

S4 amino acid nucleotide	Mol-6	Uchi-15	Ueno-10	Ebina-9	Ebina-11	WB/To14	P Leo	Osaka1994	Osaka2005	Osaka2014	Se THK0325	Se THK0617
Totto-Mol-6/2018/T2		91.8	89.0	87.1	87.1	75.9	76.7	76.3	76.4	75.7	75.8	75.7
Kana-Uchi-15/2020/T2	94.8		88.1	87.0	87.6	75.5	77.4	76.0	75.8	75.8	76.1	76.0
Ishi-Ueno-10/2021/T3	95.3	94.8		88.5	88.2	76.5	75.3	76.8	76.6	76.3	76.7	75.3
Kana-Ebina-9/2021/T3	94.0	92.9	94.8		99.3	77.4	76.8	77.5	77.4	77.4	77.6	76.8
Kana-Ebina-11/2021/T3	94.0	92.9	94.8	100		77.2	77.4	77.3	77.1	77.2	77.4	76.9
Wild boar_To14/2018/JPN/T3 (LC579760)	86.6	86.0	87.4	87.7	87.7		93.1	94.2	93.8	94.8	94.1	93.2
Panthera_leo/2011/JPN/T2 (LC121912)	86.3	85.8	87.1	87.4	87.4	99.7		93.8	93.1	97.1	97.1	97.2
Human/Osaka/1994/JPN/T2 (LC476904)	86.0	85.5	86.9	87.1	87.1	99.5	99.2		98.0	95.6	94.7	94.2
Human/Osaka/2005/JPN/T2 (LC476914)	86.6	86.0	87.4	87.7	87.7	100.0	99.7	99.5		95.1	94.1	93.7
Human/Osaka/2014/JPN/T2 (LC476924)	85.5	84.9	86.3	86.6	86.6	98.6	98.4	98.6	98.6		98.0	97.1
Sewage/THK0325/2020/JPN/T2 (LC613209)	86.3	85.8	87.1	87.4	87.4	99.2	98.9	98.6	99.2	97.8		97.4
Sewage/THK0617/2020/JPN/T1 (LC613219)	86.6	86.0	87.4	87.7	87.7	100.0	99.7	99.5	100.0	98.6	99.2	

表 2-12 我が国のブタ、イノシシ、動物園のライオン、ヒトおよび下水からの MRV の M1 の塩基配列およびアミノ酸配列の相同性(%)。黄色の塗りつぶしは 96.0%以上 98.0%未満、ピンクの塗りつぶしは 98.0%以上を示す。

M1 amino acid nucleotide	Mol-6	Uchi-15	Ueno-10	Ebina-9	Ebina-11	WB/To14	P Leo	Osaka1994	Osaka2005	Osaka2014	Se THK0325	Se THK0617
Totto-Mol-6/2018/T2		89.0	88.2	88.2	88.2	89.8	88.7	89.4	89.5	89.9	89.3	89.5
Kana-Uchi-15/2020/T2	94.0		88.9	88.8	88.7	89.9	89.0	89.8	89.5	89.8	88.9	89.0
Ishi-Ueno-10/2021/T3	94.2	94.0		89.5	89.5	90.5	88.7	89.8	89.6	90.5	89.5	89.5
Kana-Ebina-9/2021/T3	93.5	93.9	93.6		99.9	89.9	88.6	89.5	89.4	90.0	89.5	89.3
Kana-Ebina-11/2021/T3	93.5	93.9	93.6	100		90.0	88.5	89.5	89.5	90.1	89.6	89.3
Wild boar_To14/2018/JPN/T3 (LC579754)	95.5	95.4	95.1	95.1	95.1		93.3	94.9	95.0	95.7	94.7	94.8
Panthera_leo/2011/JPN/T2 (LC121913)	94.8	94.8	95.0	94.6	94.6	97.4		96.6	96.6	95.4	93.5	94.4
Human/Osaka/1994/JPN/T2 (LC476898)	95.2	95.4	95.4	95.2	95.2	98.1	98.5		98.1	96.9	94.8	95.7
Human/Osaka/2005/JPN/T2 (LC476908)	95.5	95.8	95.7	95.4	95.4	98.1	98.8	99.2		96.8	94.7	95.6
Human/Osaka/2014/JPN/T2 (LC476918)	96.2	95.9	96.1	95.8	95.8	98.8	98.6	99.1	99.3		95.1	96.5
Sewage/THK0325/2020/JPN/T2 (LC613212)	95.4	95.1	95.2	95.0	95.0	97.8	97.4	97.8	98.1	98.8		94.2
Sewage/THK0617/2020/JPN/T1 (LC613222)	94.8	94.7	94.6	94.3	94.3	97.0	96.3	96.9	97.3	97.4	96.6	

表 2-13 我が国のブタ、イノシシ、動物園のライオン、ヒトおよび下水からの MRV の M2 の塩基配列およびアミノ酸配列の相同性(%)。黄色の塗りつぶしは 96.0%以上 98.0%未満、ピンクの塗りつぶしは 98.0%以上を示す。

M2 amino acid nucleotide	Mol-6	Uchi-15	Ueno-10	Ebina-9	Ebina-11	WB/To14	P Leo	Osaka1994	Osaka2005	Osaka2014	Se THK0325	Se THK0617
Totto-Mol-6/2018/T2		83.2	76.7	84.2	84.4	83.6	83.9	84.1	84.2	84.0	83.3	83.8
Kana-Uchi-15/2020/T2	95.6		75.2	86.9	87.1	87.3	87.4	87.9	87.8	86.6	86.6	86.3
Ishi-Ueno-10/2021/T3	96.5	94.1		75.7	75.8	75.7	76.0	75.6	75.8	75.3	74.7	75.8
Kana-Ebina-9/2021/T3	97.6	96.1	95.6		99.8	94.7	95.1	95.8	96.0	95.6	96.9	87.8
Kana-Ebina-11/2021/T3	97.6	96.1	95.6	100		94.5	95.3	95.6	95.7	95.3	96.8	87.6
Wild boar_To14/2018/JPN/T3 (LC579754)	97.9	96.3	95.9	99.4	99.4		95.3	97.6	97.7	97.1	94.2	88.5
Panthera_leo/2011/JPN/T2 (LC121914)	97.9	96.3	96.1	99.4	99.4	99.7		95.9	95.9	95.5	94.8	88.0
Human/Osaka/1994/JPN/T2 (LC476899)	98.0	96.2	95.9	99.6	99.6	99.6	99.6		98.6	98.1	95.2	88.6
Human/Osaka/2005/JPN/T2 (LC476909)	98.0	96.5	96.1	99.6	99.6	99.9	99.9	99.7		97.9	95.4	88.8
Human/Osaka/2014/JPN/T2 (LC476919)	97.9	96.5	96.1	99.4	99.4	99.7	99.7	99.6	99.9		95.2	88.6
Sewage/THK0325/2020/JPN/T2 (LC613213)	97.9	96.3	95.9	99.7	99.7	99.7	99.7	99.6	99.9	99.7		87.8
Sewage/THK0617/2020/JPN/T1 (LC613223)	97.5	96.5	95.9	98.3	98.3	98.6	98.6	98.5	98.7	98.6	98.6	

表 2-14 我が国のブタ、イノシシ、動物園のライオン、ヒトおよび下水からの MRV の M3 の塩基配列およびアミノ酸配列の相同性(%)。黄色の塗りつぶしは 96.0%以上 98.0%未満、ピンクの塗りつぶしは 98.0%以上を示す。

M3 amino acid nucleotide	Mol-6	Uchi-15	Ueno-10	Ebina-9	Ebina-11	WB/To14	P Leo	Osaka1994	Osaka2005	Osaka2014	Se THK0325	Se THK0617
Totto-Mol-6/2018/T2		89.1	88.6	89.0	89.0	83.0	83.1	84.0	83.6	81.7	83.1	82.0
Kana-Uchi-15/2020/T2	94.7		90.1	92.2	92.2	82.7	83.0	83.0	82.6	80.8	82.1	81.1
Ishi-Ueno-10/2021/T3	94.0	95.4		90.2	90.2	83.0	83.1	83.8	83.1	81.7	82.5	81.5
Kana-Ebina-9/2021/T3	94.6	97.1	95.6		100	83.9	83.1	84.0	84.1	81.4	83.0	82.1
Kana-Ebina-11/2021/T3	94.6	97.1	95.6	100		83.9	83.1	84.0	84.1	81.4	83.0	82.1
Wild boar_To14/2018/JPN/T3 (LC579756)	94.0	93.2	93.5	93.6	93.6		98.3	96.7	96.2	94.2	94.7	94.9
Panthera_leo/2011/JPN/T2 (LC121915)	93.6	92.8	93.3	93.3	93.3	98.8		96.5	95.6	94.0	94.7	95.0
Human/Osaka/1994/JPN/T2 (LC476900)	94.5	93.6	93.9	94.0	94.0	99.0	98.6		96.5	95.0	95.1	95.0
Human/Osaka/2005/JPN/T2 (LC476910)	94.7	93.8	93.5	94.3	94.3	98.3	97.9	99.0		93.7	94.9	94.1
Human/Osaka/2014/JPN/T2 (LC476920)	94.5	93.9	93.9	94.0	94.0	98.8	98.3	99.5	98.8		94.7	95.8
Sewage/THK0325/2020/JPN/T2 (LC613214)	94.3	93.5	93.8	93.9	93.9	98.6	98.2	99.3	98.9	99.0		95.1
Sewage/THK0617/2020/JPN/T1 (LC613224)	94.9	94.0	94.0	94.5	94.5	98.9	98.5	99.2	98.5	98.9	98.8	

表 2-15 我が国のブタ、イノシシ、動物園のライオン、ヒトおよび下水からの MRV の L1 の塩基配列およびアミノ酸配列の相同性(%)。黄色の塗りつぶしは 96.0%以上 98.0%未満、ピンクの塗りつぶしは 98.0%以上を示す。

L1 amino acid nucleotide	Mol-6	Uchi-15	Ueno-10	Ebina-9	Ebina-11	WB/To14	P Leo	Osaka1994	Osaka2005	Osaka2014	Se THK0325	Se THK0617
Totto-Mol-6/2018/T2		95.3	90.4	87.9	87.9	87.5	87.2	87.9	87.8	87.7	87.4	87.8
Kana-Uchi-15/2020/T2	99.1		90.6	87.8	87.8	87.2	87.1	87.7	87.7	87.6	87.4	87.4
Ishi-Ueno-10/2021/T3	97.6	98.0		87.2	87.1	86.5	86.1	87.1	87.0	87.2	86.7	87.0
Kana-Ebina-9/2021/T3	97.4	97.8	97.7		100	95.7	96.1	97.4	97.2	97.3	96.4	98.2
Kana-Ebina-11/2021/T3	97.4	97.8	97.7	100		95.7	96.1	97.3	97.1	97.3	96.3	98.2
Wild boar_To14/2018/JPN/T3 (LC579751)	97.5	97.9	97.8	98.9	98.9		95.3	96.5	96.0	96.4	95.5	95.7
Panthera_leo/2011/JPN/T2 (LC121916)	97.2	97.6	97.6	99.0	99.0	99.0		97.2	96.9	97.0	95.7	96.2
Human/Osaka/1994/JPN/T2 (LC476895)	97.5	97.8	97.7	99.1	99.1	99.1	99.3		98.3	99.1	97.0	97.4
Human/Osaka/2005/JPN/T2 (LC476905)	97.2	97.6	97.6	99.3	99.3	98.9	99.2	99.3		98.1	96.6	97.2
Human/Osaka/2014/JPN/T2 (LC476915)	97.5	97.9	97.7	99.1	99.1	99.1	99.2	99.5	99.2		96.9	97.4
Sewage/THK0325/2020/JPN/T2 (LC613209)	97.1	97.5	97.4	98.8	98.8	98.8	99.0	99.2	99.0	99.1		96.1
Sewage/THK0617/2020/JPN/T1 (LC613219)	97.4	97.8	97.9	99.7	99.7	99.1	99.1	99.3	99.3	99.2	99.0	

表 2-16 我が国のブタ、イノシシ、動物園のライオン、ヒトおよび下水からの MRV の L2 の塩基配列およびアミノ酸配列の相同性(%)。黄色の塗りつぶしは 96.0%以上 98.0%未満、ピンクの塗りつぶしは 98.0%以上を示す。

L2 amino acid nucleotide	Mol-6	Uchi-15	Ueno-10	Ebina-9	Ebina-11	WB/To14	P Leo	Osaka1994	Osaka2005	Osaka2014	Se THK0325	Se THK0617
Totto-Mol-6/2018/T2		91.5	91.6	90.0	90.0	84.9	84.6	84.9	85.0	84.7	84.2	84.4
Kana-Uchi-15/2020/T2	97.1		90.9	89.3	89.1	84.4	83.9	84.4	84.6	84.1	83.7	83.9
Ishi-Ueno-10/2021/T3	97.1	96.7		89.4	89.2	84.3	83.7	84.0	84.1	83.7	83.2	83.9
Kana-Ebina-9/2021/T3	96.0	95.9	96.0		99.7	84.7	84.3	84.8	84.8	84.4	83.6	84.1
Kana-Ebina-11/2021/T3	96.0	96.0	96.1	99.9		84.5	84.5	84.8	84.9	84.4	83.6	84.2
Wild boar_To14/2018/JPN/T3 (LC579752)	96.0	95.4	95.5	95.4	95.4		98.6	96.1	95.8	95.9	94.4	98.5
Panthera_leo/2011/JPN/T2 (LC121917)	96.0	95.4	95.6	95.4	95.4	99.5		96.0	95.7	96.4	94.9	98.8
Human/Osaka/1994/JPN/T2 (LC476896)	96.0	95.4	95.8	95.6	95.7	98.7	98.8		98.8	98.7	94.9	95.9
Human/Osaka/2005/JPN/T2 (LC476906)	96.0	95.5	95.7	95.7	95.8	98.8	99.0	99.5		98.4	94.5	95.6
Human/Osaka/2014/JPN/T2 (LC476916)	96.0	95.5	95.7	95.5	95.6	98.8	98.9	99.3	99.5		95.2	96.2
Sewage/THK0325/2020/JPN/T2 (LC613210)	96.0	95.7	95.7	95.6	95.7	98.9	98.9	98.7	98.8	98.8		94.8
Sewage/THK0617/2020/JPN/T1 (LC613220)	96.0	95.4	95.6	95.4	95.4	99.5	99.7	98.8	99.0	98.9	99.0	

表 2-17 我が国のブタ、イノシシ、動物園のライオン、ヒトおよび下水からの MRV の L3 の塩基配列およびアミノ酸配列の相同性(%)。黄色の塗りつぶしは 96.0%以上 98.0%未満、ピンクの塗りつぶしは 98.0%以上を示す。

L3 amino acid nucleotide	Moi-6	Uchi-15	Ueno-10	Ebina-9	Ebina-11	WB/To14	P Leo	Osaka1994	Osaka2005	Osaka2014	Se THK0325	Se THK0617
Totto-Moi-6/2018/T2		89.4	89.0	90.0	90.0	83.4	83.4	83.7	83.2	83.4	83.2	83.3
Kana-Uchi-15/2020/T2	97.3		92.6	91.4	91.2	83.8	83.6	84.0	83.6	83.4	84.0	83.4
Ishi-Ueno-10/2021/T3	96.9	97.9		90.4	90.3	83.0	82.7	82.8	82.9	82.6	83.0	82.7
Kana-Ebina-9/2021/T3	97.3	98.1	97.8		99.8	83.5	83.3	83.5	83.4	83.3	83.1	83.2
Kana-Ebina-11/2021/T3	97.3	98.1	97.8	100		83.3	83.3	83.3	83.3	83.2	83.0	83.3
Wild boar_To14/2018/JPN/T3 (LC579753)	97.5	98.1	97.6	98.0	98.0		98.8	98.1	96.1	96.0	96.3	98.7
Panthera_leo/2011/JPN/T2 (LC121918)	97.6	98.1	97.7	98.0	98.0	99.8		98.0	96.0	95.8	96.2	98.8
Human/Osaka/1994/JPN/T2 (LC476897)	97.6	98.1	97.6	98.0	98.0	99.8	99.8		96.7	96.6	97.1	97.8
Human/Osaka/2005/JPN/T2 (LC476907)	97.3	97.9	97.3	97.8	97.8	99.5	99.6	99.6		97.7	95.9	95.9
Human/Osaka/2014/JPN/T2 (LC476917)	97.5	98.0	97.5	98.0	98.0	99.6	99.7	99.7	99.6		96.0	95.9
Sewage/THK0325/2020/JPN/T2 (LC613211)	97.6	98.2	97.7	98.1	98.1	99.6	99.7	99.7	99.5	99.6		96.2
Sewage/THK0617/2020/JPN/T1 (LC613221)	97.7	98.2	97.7	98.1	98.1	99.8	99.9	99.9	99.7	99.8	99.8	

第3章

遺伝子再集合、遺伝子相同組換えおよび

S1 蛋白の構造予測による

哺乳類オルソレオウイルス遺伝子の進化の分析

序 論

RNA ウイルスは中和抗体からの回避により発生する選択圧による突然変異の蓄積および RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの修復機能がないことから RNA ウイルスと比較して高頻度に発生する遺伝子組換えにより進化する[80]。1 つの細胞に 2 つ以上の異なったウイルスが感染すると遺伝子組換えが発生し、普遍的に分布するウイルスにおいては発生する頻度が高い[81-85]。遺伝子組換えは2本鎖 RNA ウイルスにおいても多くの報告がなされている[86-92]。さらに遺伝子分節型のウイルスは頻繁に分節の入替えによる遺伝子再集合を起こし、遺伝子多様性を獲得したウイルスは種内および種間伝播が発生しやすくなる[48, 93, 94]。このようなことから、我が国のブタおよびイノシシ由来の MRV の起源や進化を考察する上で、遺伝子再集合と遺伝子相同性組換えを調べることは重要と考えられる。

ウイルスの血清学的性状は病原性に関連する場合があります、感染防御にも関係することから、抗原性状を調べることは重要である。しかしウイルスの抗原性状を調べるには中和試験や感染試験を必要とし、実施が困難な場合が多い。近年、抗原性状に関連するウイルス蛋白質の立体構造を明らかにされているモデルをもとに推定する SWISSMODEL homology-modelling server を利用し、立体構造の推定が可能となった[95]。さらに近年、立体構造のモデルなしに構造を推定できる Alphafold2 がオンラインで利用可能となっている[96]。

そこで本章では、我が国のブタおよびイノシシ由来 MRV について遺伝子再集合、遺伝子組換えを解析し、さらには S1 蛋白質の立体構造の予測を行い、我が国のブタおよびイノシシ由来 MRV の起源や進化について考察を行った。

材料および方法

1. SimPlot および mVISTA 解析による遺伝子再集合解析

我が国のブタおよびイノシシ由来 MRV の遺伝子再集合を調べるため、MRV 遺伝子分節の塩基配列を、ClustalW [77]を用いて GenBank/EMBL/DDBJ データベースに登録されている MRV 配列とともにアライメントし、SimPlot software v. 3.5.1 [97]および mVISTA [98]による解析を行った。

2. SimPlot および Recombination detection program (RDP)解析による遺伝子相同組換え解析

遺伝子相同組換えを調べるため、MRV 遺伝子分節の塩基配列を、ClustalW [77]を用いて GenBank/EMBL/DDBJ データベースに登録されている MRV 配列とともにアライメントし、SimPlot software v. 3.5.1 [97]および Recombination Detection Program (RDP) v.4.80 [99]による解析を行った。

3. AlphaFold2 を用いた S1 蛋白の立体構造予測

S1 蛋白質の立体構造は Colab notebook (<https://colab.research.google.com/github/deepmind/alphafold/blob/main/notebooks/AlphaFold.ipynb>)の AlphaFold v2.1.0 (Alphafold2)を用いて予測した[96]。Alphafold2により予測した立体構造の情報は ChimeraX を用いて可視化した[100]。

成 績

1. 遺伝子再集合解析

我が国のブタとイノシシ由来の MRV の関係性を調べるため、MRV の全遺伝子分節 10 本を連結して、我が国のヒト、動物園ライオンおよび下水由来の MRV も含めて SimPlot 解析を実施した。その結果、我が国のイノシシ由来の WB/To14 株は、L2、L3 および M3 遺伝子は我が国の動物園で飼育されていたライオンから 2011 年に分離された MRV と遺伝子配列の相同性が確認された。さらに S1 および S2 遺伝子において、2021 年にブタから分離された Kana-Ebina-9 株および 2014 年にヒトから分離された Osaka2014 株とそれぞれ高い相同性が確認された(図 3-1A)。mVISTA により解析においても同様の結果が認められた(図 3-1B)。

2. 遺伝子相同組換え解析

1 本鎖 RNA ウイルスのみならず 2 本鎖分節型遺伝子を保有する RNA ウイルスにおける遺伝子相同組換えが報告されていることから[89-92]、我が国のブタおよびイノシシ由来 MRV の塩基配列および DDBJ/EMBL/GenBank から得られた塩基配列を RDP と SimPlot ソフトウェアを用いて遺伝子相同組換えを検索した。

S1 遺伝子において、RDP プログラムによりスロベニアのコウモリ由来の S1-MRV03/SVN 株、我が国のブタ由来の Kana-Uchi-15 株および我が国のヒト由来の Osaka2005/JPN 株が関与する遺伝子組換えのブレイクポイントが検出され、RDP プログラムの RDP、GENECONV、BootScan、MaxChi、Chimaera、SiScan および 3Seq 検定における P 値のカットオフ値は 6.342×10^{-04} 、 7.730×10^{-04} 、 1.375×10^{-03} 、 1.616×10^{-04} 、 6.431×10^{-03} 、 5.440×10^{-27} および 5.215×10^{-01} であり、この組換えは確からしきであると判定された(図 3-2)。

M1 遺伝子においては、我が国の WB/To14 株は、我が国のブタ由来株 Totto-MoI-6 株と Ishi-Ueno-10 株が関与するクロスオーバーポイントを有していた(図 3-3)。この遺伝子相同組換えは、GENECONV および 3Seq 検定では確からしさは得られなかったが、RDP プログラムの RDP、BootScan、MaxChi、Chimaera および SiScan 検定でそれぞれ 9.272×10^{-01} 、 6.725×10^{-03} 、 1.606×10^{-02} 、 3.433×10^{-02} 、 5.301×10^{-03} の確からしいカットオフ値が確認された。

DDBJ/EMBL/GenBank データベースから得られた配列データの解析では、4 つの未報告の P 値カットオフ RDP、GENECONV、BootScan、MaxChi Chimaera、SiScan および 3Seq 検定のカットオフ値が十分な値 ($< 10^{-8}$) でサポートされた遺伝子相同組換えが、M2 遺伝子における 3 株の中国で分離されたコウモリ由来 MRV 間(図 3-4)、中国のブタ、スロベニアのヒトおよび中国のコウモリ由来の MRV 間(図 3-5)、L3 遺伝子における中国の 2 株のコウモリ由来と米国のシカ由来の MRV 間(図 3-6)および米国の 3 株のブタ由来の MRV 間(図 3-7)に認められた。

3. AlphaFold2 を用いた S1 蛋白の立体構造予測

MRV-1 のプロトタイプである Lang 株、MRV-2 のプロトタイプである Jones 株、MRV-2 の Kana-Uchi-15 株および Totto-MoI-6 株、MRV-3 のプロトタイプである Dearing 株、MRV-3 の Ishi-Ueno-10 株、Kana-Ebina-9 株、Kana-Ebina-11 株および WB/To14 株の S1 蛋白質のアミノ酸配列をアライメントし(図 3-8A)、AlphaFold2 の立体構造予測の成績(図 3-8B)と比較した。MRV-1、MRV-2 および MRV-3 の S1 アミノ酸配列の前半 N 端側はそれぞれの型間に高い相同性を認めなかったにもかかわらず、すべての株は直線状の形状を示した。配列後半の C 端部分は遺伝子型間に構造の相違が認められ、遺伝子型内では MRV-2 はプロトタイプとブタ由来株間で形状が異なったが、MRV-3 内ではプロトタイプを含め類似性が認められた。

考 察

イノシシは家畜のみならずヒトへ感染症を伝播する感染源となることが知られているが[101, 102]、近年我が国では野生のノシシの分布域と個体数が増加しており[103, 104]、豚熱を家畜に伝播する感染源となっているほかにも、ブタに感染するウイルスを保有することが報告されている[103-108]。我が国のイノシシ由来 MRV の WB/To14 株について遺伝子再集合を調べたところ、L2、L3 および M3 遺伝子は我が国の動物園で飼育されていたライオン由来の MRV と高い相同性を示した。イノシシと動物園に飼育されている動物とは接触する機会がないことから、ライオンの餌や環境にヒトを介して MRV が混入し、ライオンに感染した可能性が示唆された。S2 遺伝子に関しては大阪で 2014 年にヒトから分離された MRV 株との相関性が高かった。このヒト由来の Osaka 株は我が国に長期間にわたって検出されている[19]。S1 遺伝子は免疫誘導を起こすことから変異の激しい遺伝子分節であるが、WB/To14 株は 2021 年に関東地方でブタから分離された MRV に高い相同性を保有していた。このことはブタとイノシシ間に MRV のやり取りがあることを示しており、イノシシはヒトやブタの MRV 感染の感染源になる可能性があることが示された。

分節型の遺伝子を保有する dsRNA ウイルスは、遺伝子の点変異と遺伝子再集合が遺伝的多様性を獲得する主なメカニズムであるが、ロタウイルスなどのいくつかの分節型遺伝子を保有する dsRNA ウイルスでは、遺伝子相同組換えによる変異も報告されている[89-92]。ウイルスにおける遺伝子相同組換えは、広範囲の新しい宿主への適応を促進し、病原性を増大させる可能性がある[92]。WB/To14 株の M2 遺伝子において、我が国の動物園ライオン由来株および中国のコウモリ由来株との遺伝子組換えが報告されている[36]。今回の解析では、Kana-Uchi-15 株の S1 遺伝子において、中国のコウモリ由来株およびスロベニアのヒト由来株との遺伝子組換えポイントが検出さ

れた(図 3-2)。さらに WB/To14 株の M1 遺伝子において、Totto-Mol-6 株および Ishi-Ueno-10 株との遺伝子相同組換えが確認された(図 3-3)。これらの解析結果は GENECONV と 3Seq による検定ではカットオフ値が低かった。GENECONV と 3Seq は RDP のプログラムの中で特異的ではない結果を排除するのに最も有用な方法であるが、遺伝子相同組換え検出率は最も低い[89]。DDBJ/EMBL/GenBank データベースから得た配列データを用いた組換え解析では、ブタ由来の MRV を含む L3 遺伝子および M2 遺伝子にカットオフ値 $P < 10^{-8}$ で確からしさが強く支持される遺伝子組換えが存在することが示された(図 3-4~3-7)。これらの知見は、遺伝子組換えが遺伝子の可塑性と多様性を獲得することで MRV の進化を促進している可能性があるという考えを支持するものである。

MRV の S1 蛋白質の立体構造予測では、遺伝子型間に C 端側の構造の相違があるものの、N 端側の棒状の構造は MRV に共通して認められた(図 3-8)。遺伝子型内でも C 端側の構造は類似しており、プロトタイプ構造が保たれつつ進化しているものと考えられた。

図 表

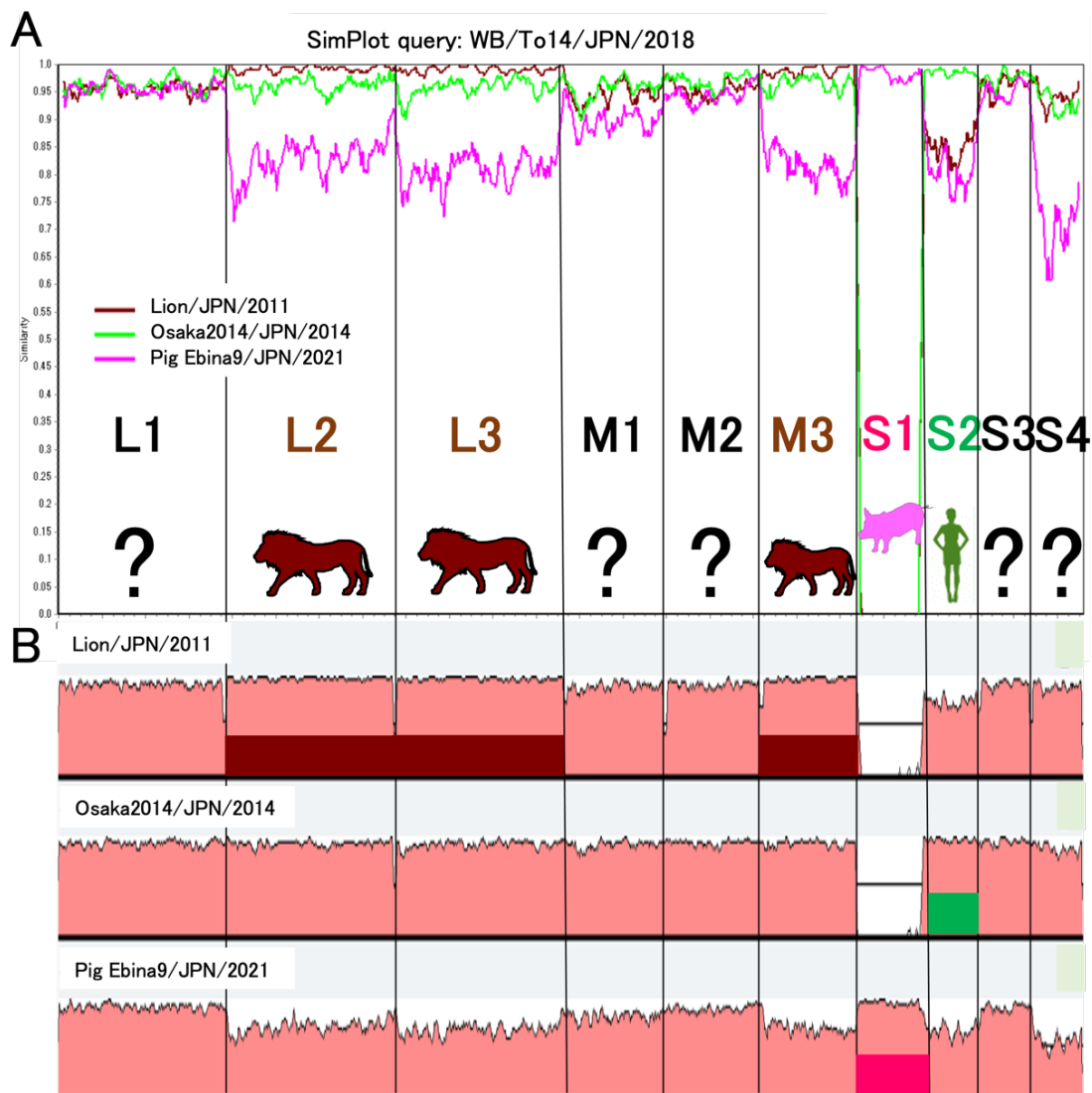


図 3-1 Lion/JPN/2011 株(エビ茶)、Human/Osaka2014/JPN/2014 株(緑)および Pig/Kana-Ebina-9/JPN/2021 株(ピンク)の MRV の 10 本の遺伝子分節を繋げて、WB/To14/JPN/2018 株をクエリー配列として実施した SimPlot 解析(A)。mVISTA による WB/To14/JPN/2018 株に対する Lion/JPN/2011 株、Human/Osaka2014/JPN/2014 株および Pig/Kana-Ebina-9/JPN/2021 株の相同性解析(B)。

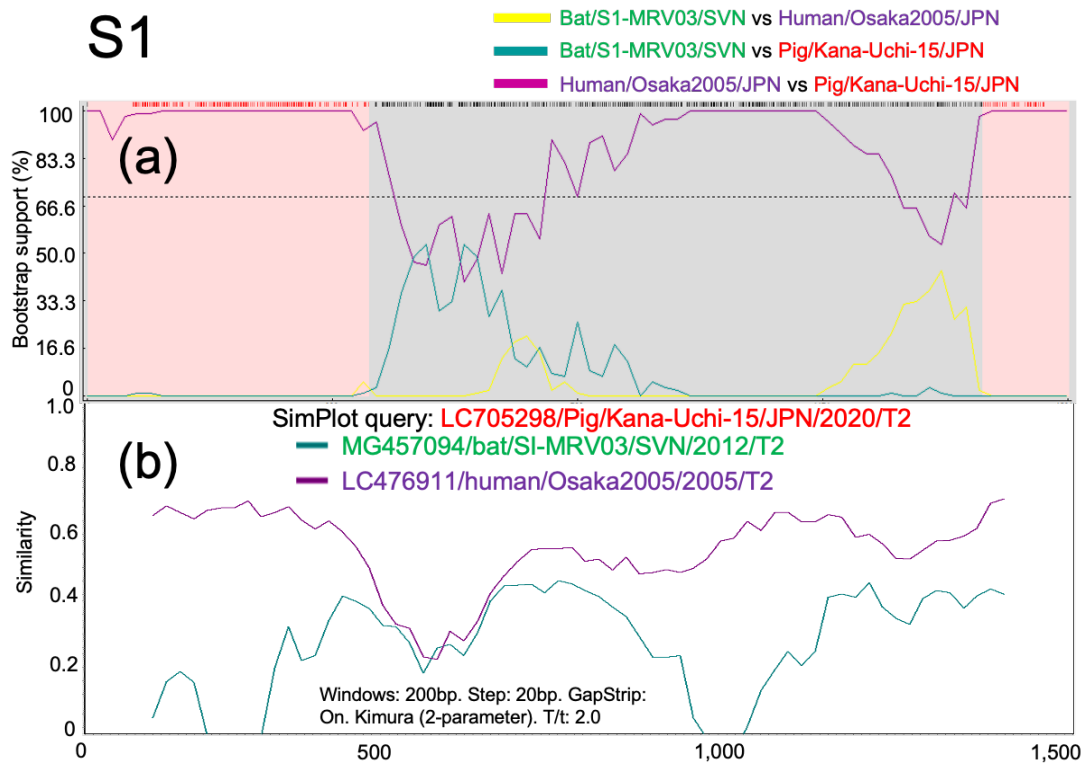


図 3-2 Bat/S1-MRV03/SVN と Human/Osaka2005/JPN (黄)、Bat/S1-MRV03/SVN と Pig/Kana-Uchi-15/JPN (青緑) および Human/Osaka2005/JPN と Pig/Kana-Uchi-15/JPN (紫) の S1 遺伝子分節の Recombination Detection Program v.4.80 による組換え解析(a)。Bat/SI-MRV03/SVN (青緑) と Human/Osaka2005/2005 (紫)、Pig/Kana-Uchi-15/JPN をクエリー配列とし、スライディングウィンドウを 200 塩基、移動ステップサイズを 20 ヌクレオチドと設定した SimPlot 解析 (b)。

M1

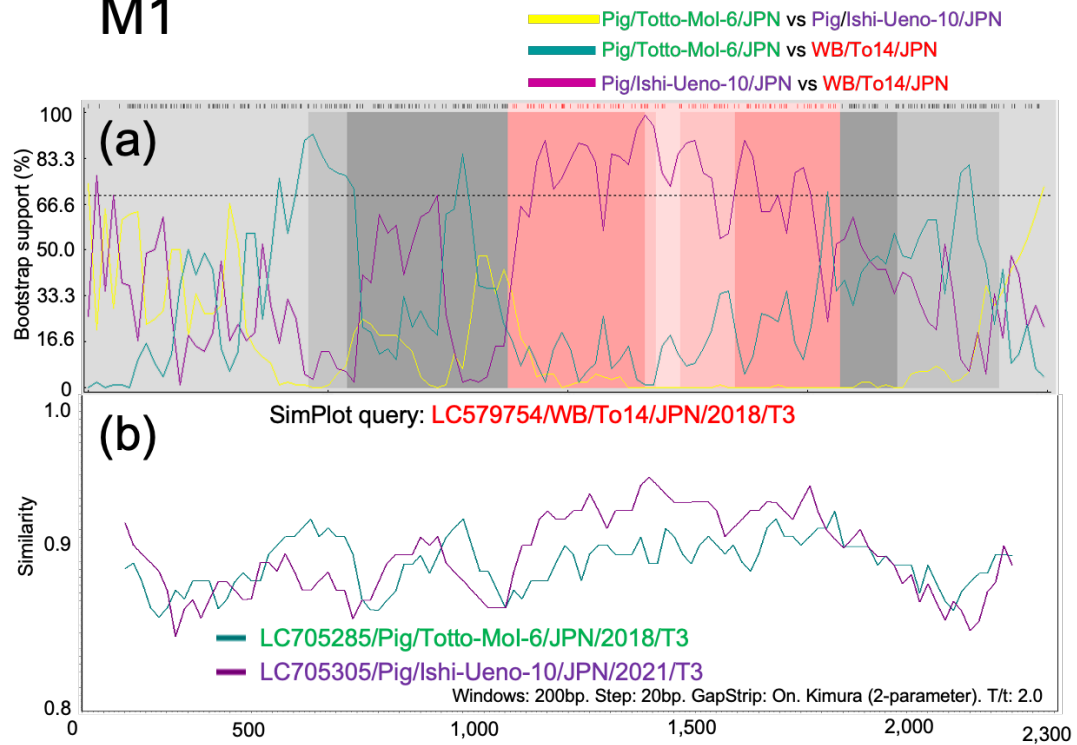


図 3-3 Pig/Totto-MoI-6/JPN と Pig/Ishi-Ueno-10/JPN (黄)、Pig/Totto-MoI-6/JPN と WB/To14/JPN (青緑) および Pig/Ishi-Ueno-10/JPN と WB/To14/JPN (紫) の Recombination Detection Program v.4.80 による M1 遺伝子分節の組換え解析(a)。Pig/Totto-MoI-6/JPN (青緑) と Pig/Ishi-Ueno-10/JPN (紫)、WB/To14/JPN をクエリー配列とし、スライディングウィンドウを 200 塩基、移動ステップサイズを 20 塩基と設定した SimPlot 解析 (b)。

M2

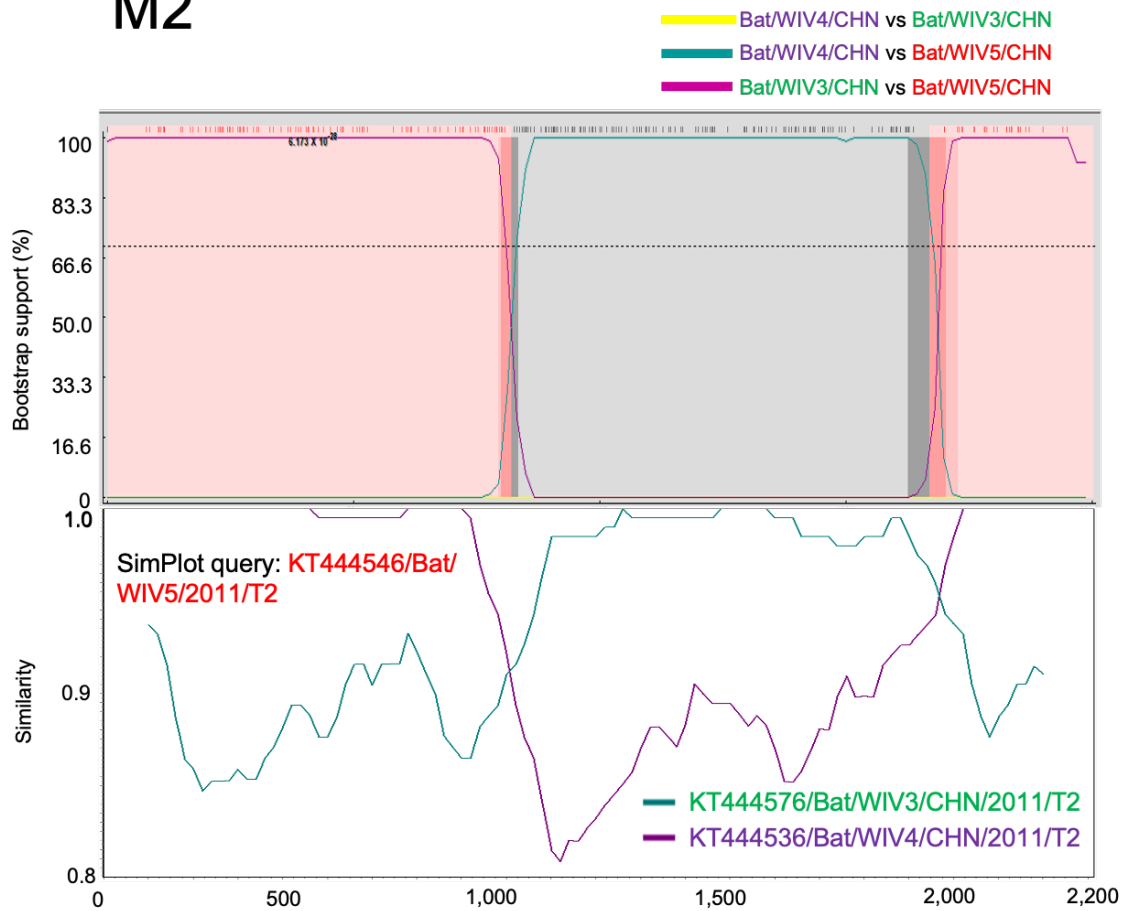


図 3-4 Bat/WIV4/CHN と Bat/WIV3/CHN(黄)、Bat/WIV4/CHN と Bat/WIV5/CHN(青緑)、Bat/WIV3/CHN と Bat/WIV5/CHN(紫)の M2 遺伝子分節の Recombination Detection Program v.4.80 による組換え解析 (a)。Fig/4560-3/USA (黄)と Fig/4560-2/USA(紫)および Fig/4560-1/USA をクエリー配列として、200 ヌクレオチドのスライディングウィンドウと 20 ヌクレオチドの移動ステップサイズと設定した SimPlot 解析(b)。

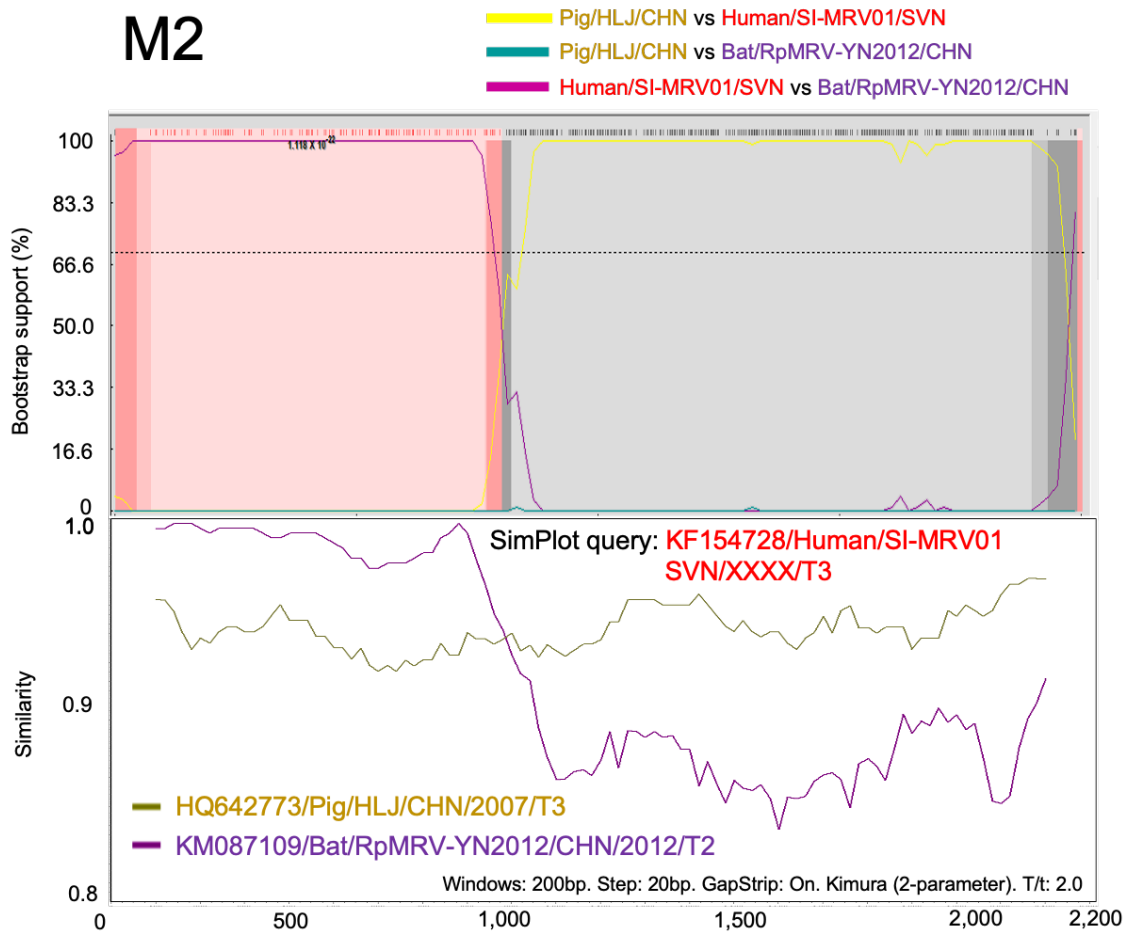


図 3-5 Pig/HLJ/CHN と Human/SI-MRV01/SVN (黄)、Pig/HLJ/CHN と Bat/RpMRV-YN2012/CHN (青緑) および Human/SI-MRV01/SVN とバット/RpMRV-YN2012/CHN (紫) の M2 遺伝子分節の Recombination Detection Program v.4.80 による組換え解析 (a)。Pig/HLJ/CHN (黄) と Bat/RpMRV-YN2012/CHN (紫) および Human/SI-MRV01/SVN をクエリー配列として、200 ヌクレオチドのスライディングウィンドウと 20 ヌクレオチドの移動ステップサイズと設定した SimPlot 解析 (b)。

L3

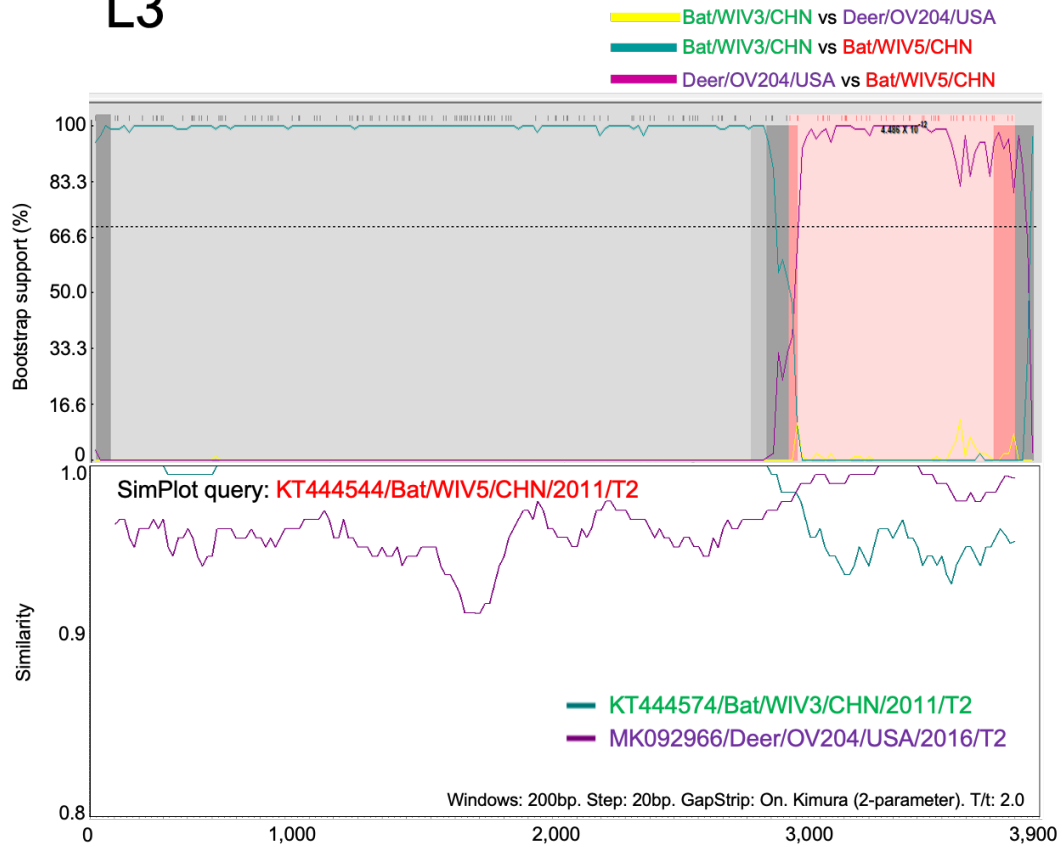


図 3-6 Bat/WIV3/CHN と Deer/OV204/USA (黄)、Bat/WIV3/CHN と Bat/WIV5/CHN (青緑)、Deer/OV204/USA と Bat/WIV5/CHN (紫) の L3 遺伝子分節の Recombination Detection Program v.4.80 による組換え解析(a)。Bat/WIV3/CHN (青緑) と Deer/OV204/USA (紫) および Bat/WIV5/CHN をクエリー配列として、200 ヌクレオチドのスライディングウィンドウと 20 ヌクレオチドの移動ステップサイズと設定した SimPlot 解析 (b)。

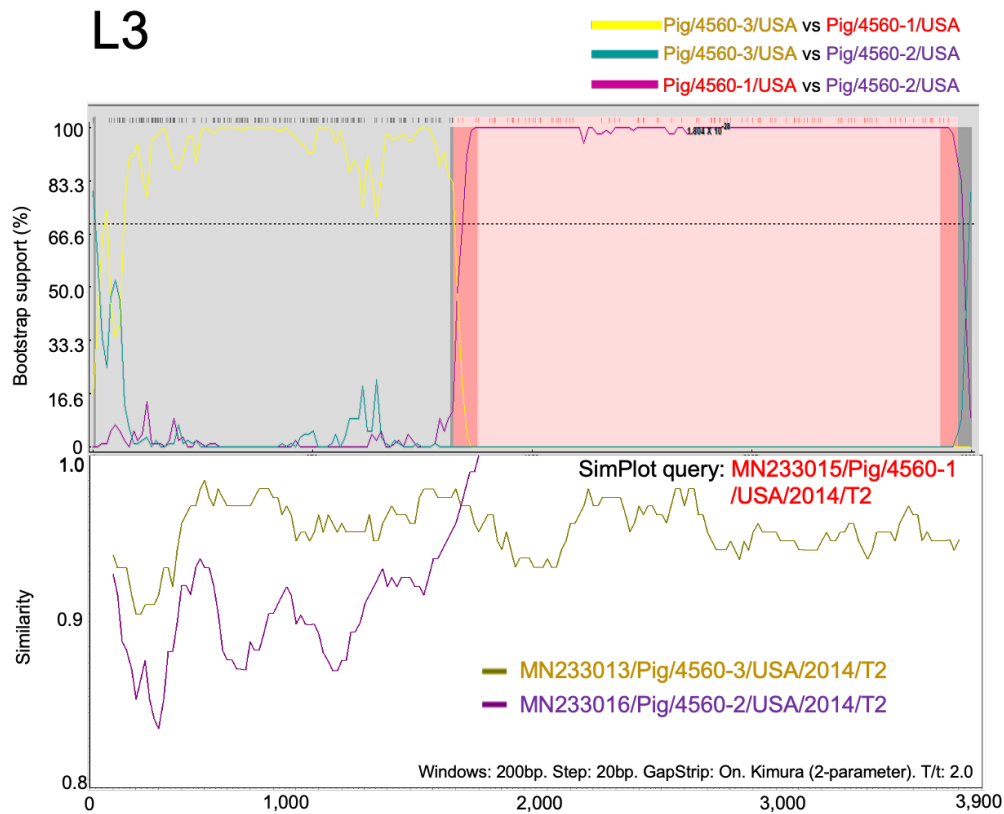


図 3-7 Pig/4560-3/USA と Pig/4560-1/USA (黄)、Pig/4560-3/USA と Pig/4560-2/USA (青緑)、Pig/4560-1/USA と Pig/4560-2/USA (紫) の L3 遺伝子分節の Recombination Detection Program v.4.80 による組換え解析(a)。Pig/4560-3/USA (黄) と Pig/4560-2/USA (紫)、および Pig/4560-1/USA をクエリー配列とし、スライディングウィンドウを 200 ヌクレオチド、移動ステップサイズを 20 ヌクレオチドと設定した SimPlot 解析(b)。

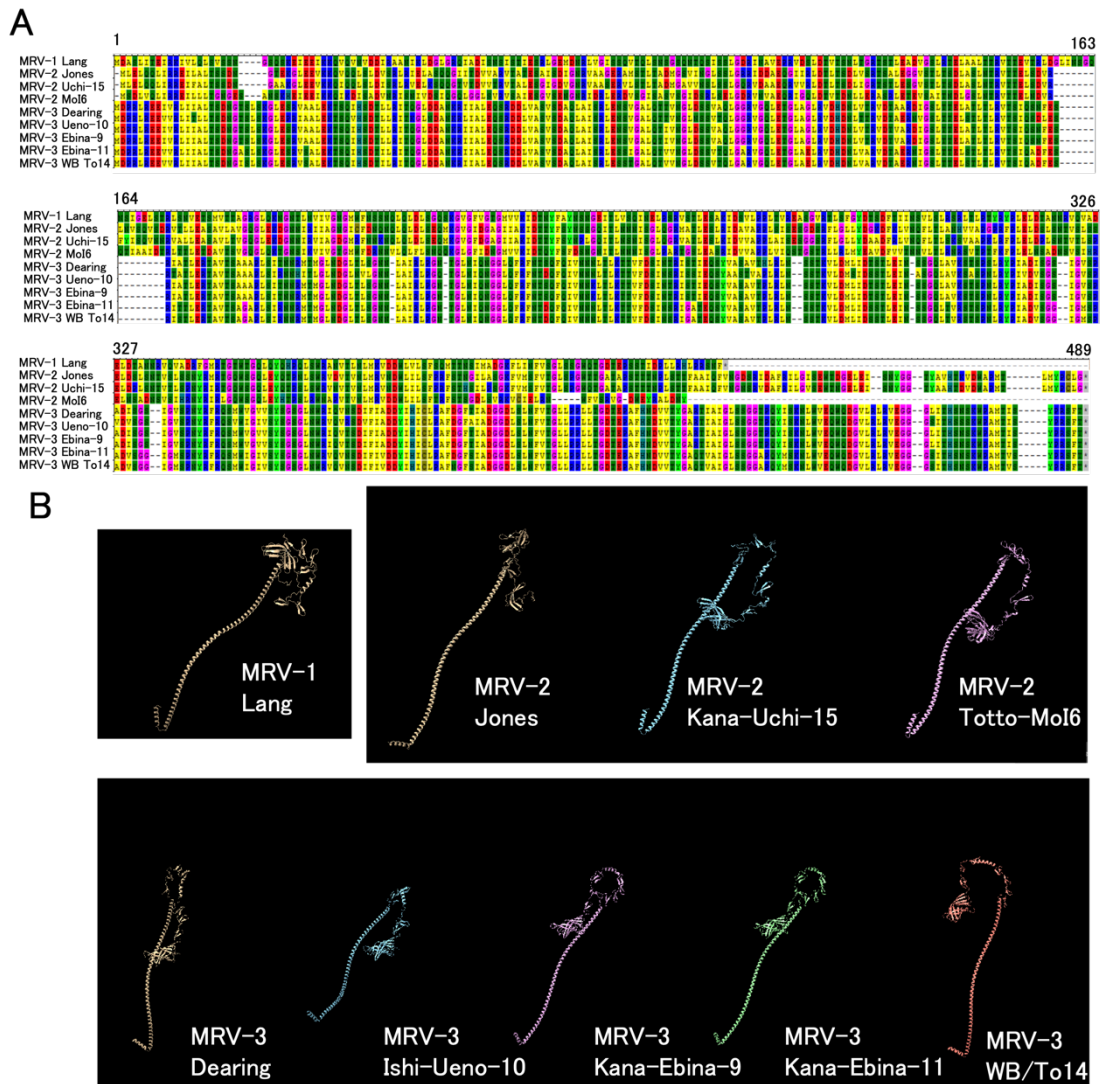


図 3-8 MRV-1 プロトタイプ Lang 株、MRV-2 プロトタイプ Jones 株、我が国のブタ由来株 Kana-Uchi-15 株および Totto-Mol6 株、MRV-3 プロトタイプ Dearing 株、我が国のブタ由来の Ishi-Ueno-10 株、Kana-Ebina-9 株、Kana-Ebina-11 株およびイノシシ由来の WB/To14 株の S1 遺伝子アミノ酸配列のアライメント(A)。MRV-1 プロトタイプの Lang 株、MRV-2 プロトタイプ Jones 株、我が国のブタ由来株 Kana-Uchi-15 株および Totto-Mol6 株、MRV-3 プロトタイプ Dearing 株、我が国のブタ由来の Ishi-Ueno-10 株、Kana-Ebina-9 株、Kana-Ebina-11 株およびイノシシ由来の WB/To14 株の S1 蛋白質の 3 次元構造。立体構造は Alphafold2

(<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>)を用いて予測し、ChimeraX を用いて可視化した(B)。

結 論

MRV は広い宿主域を持ち、ブタを含む家畜やイノシシを含む野生動物やヒトに感染する。MRV 感染の多くは症状を示さないことが多いが、ヒトやブタで呼吸器、消化器および中枢神経系の疾患を引き起こすことが知られている。我が国ではヒトにおける MRV の調査が行われているものの、ブタおよびイノシシにおける MRV 感染の実態は不明であった。このことから、全国のブタの糞便および北陸地方のイノシシの直腸内容物を材料として、培養細胞をもちいたウイルス分離による MRV の浸潤状況調査を行い、分離された MRV の塩基配列を明らかにし、種々の手法を用いて我が国のブタおよびイノシシ由来 MRV の性状を解析し、以下の成績を得た。

1. 2020 年から 2022 年に採材されたブタの糞便 349 検体およびイノシシの直腸内容物 126 検体について MA104 細胞を用いたウイルス分離を行ったところ、ブタの糞便の 47 検体に CPE が観察された。さらに NGS および MRV L1 遺伝子を標的とした RT-PCR を実施したところ 4 検体が MRV 陽性となった。イノシシの材料は CPE を示すものがなかった。糞便から直接 NGS を行ったサンプル全すべてから MRV は検出されず、NGS よりもウイルス分離のほうが MRV 検出率が高いことが明らかとなった。ブタの MRV 検出率は 1.1% であったが、検出法は異なるものの既報のザンビア (19.7%) や韓国 (19.0%) からの浸潤率に比べて低値ではあるものの、近年の我が国のブタに MRV が感染していることが判明した。

2. 2017 年から 2019 年に採材されたブタ 72 検体およびイノシシ 86 検体の次世代シーケンズデータ入手し解析したところ、新たにブタ 1 検体およびイノシシ 1 検体のデータから MRV 遺伝子が検出され、このうちブタの 1 検体から MRV が分離された。この

2 株とウイルス分離で得られた 4 株の全塩基配列を決定し、S1 遺伝子の分子系統樹解析を行ったところ、ブタ由来の 2 株が MRV-2、ブタ由来 3 株およびイノシシ由来 1 株が MRV-3 に分類されることがわかった。

3. S1 遺伝子以外の遺伝子分節のシーケンスデータの分子系統樹解析では、我が国のブタおよびイノシシ由来の MRV 株は国外のブタ由来の MRV 株やプロトタイプであるヒト由来 MRV 株と遺伝学的に類似しており、我が国のブタ由来 MRV は世界的に分布しているブタ由来 MRV と共通の起源を持つことが示唆された。

4. 全遺伝子解析では、我が国のイノシシ由来株は国内の動物園ライオン、ヒトおよびブタ由来 MRV と相同性の高い遺伝子分節を保有しており遺伝子再集合を起こしていることが推察されたことから、イノシシは MRV の感染源になりうることが示された。

5. 遺伝子組換え解析では、複数の株に組換えのブレイクポイントを発見したことから、国内のブタ由来およびイノシシ由来の MRV において遺伝子組換えは他の動物宿主由来の MRV と遺伝子組換えを起こしていることが確認された。

以上から、MRV は我が国のブタおよびイノシシに感染しており、国内の他の宿主由来の MRV と遺伝子分節をやり取りし、さらには遺伝子組換えを起こしてブタおよびイノシシ群中で進化を続けていることが明らかとなった。イノシシにおいては、上記のメカニズムにより進化した MRV をヒトおよびブタをはじめとした家畜に伝播する感染源になりうることが示唆された。本研究で得られた知見が MRV の疫学解明の一助となり、MRV 感染症の診断や予防の一助となることを期待したい。

本論文の一部は以下に公表した。

- Fukase Y, Minami F, Masuda T, Oi T, Takemae H, Ishida H, Murakami H, Aihara N, Shiga T, Kamiie J, Furuya T, Mizutani T, Oba M, Nagai, M (2022) Genetic diversity, reassortment, and recombination of mammalian orthoreoviruses from Japanese porcine fecal samples. *Archives of Virology*. 167: 2643-2652.

<https://doi.org/10.1007/s00705-022-05602-8>

Reproduced with permission from Springer Nature.

謝 辞

石川県北部家畜保健衛生所の福田藤子先生、岡山理科大学獣医学部の増田恒幸先生は貴重なブタ糞便を採材くださり、養豚に関する貴重な情報を教えてくださりました。石川県立大学生物資源環境学部の大井徹先生には貴重なイノシシの材料およびイノシシの生態について貴重な情報をいただきました。東京農工大学農学部の中谷哲也先生、東京農工大学感染症未来疫学研究センターの竹前等先生、水谷哲也先生、病理学研究室の上家潤一先生、相原尚之先生、志賀崇先生には論文投稿に際しましてご助言、ご指導いただき、深く御礼申し上げます。

最後に微生物学研究室の田原口智士先生、伝染病学研究室の須永藤子先生、大場真己先生(現東京農工大学感染症未来疫学研究センター)、村上裕信先生、石田大歩先生には学位論文の作成に多大なるご指導を賜りました。伝染病学研究室の室生の皆さまにもいろいろと助けていただきました。心から感謝するとともに厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. Day JM (2009) The diversity of the orthoreoviruses: molecular taxonomy and phylogenetic divides. *Infect Genet Evol* 9:390-400.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.01.011>
2. Dermody TS, Parker JSL, Sherry B (2013) Orthoreoviruses. In: David, M.K., Peter, M.H. (Eds.), *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA 19103 USA, 1304-1346.
3. Guglielmi KM, Johnson EM, Stehle T, Dermody TS (2006) Attachment and cell entry of mammalian orthoreovirus. *Curr Top Microbiol Immunol* 309:1-38.
https://doi.org/10.1007/3-540-30773-7_1.
4. 小林剛 (2014) オルソレオウイルス. *ウイルス* 191-202.
5. Coombs KM (1998) Stoichiometry of reovirus structural proteins in virus, ISVP, and core particles. *Virology* 243: 218-228.
6. Broering TJ, Parker JS, Joyce PL, Kim J, Nibert ML (2002) Mammalian reovirus nonstructural protein muNS forms large inclusions and colocalizes with reovirus microtubule-associated protein mu2 in transfected cells. *J Virol* 76: 8285-8297.

7. Becker MM, Peters TR, Dermody TS (2003) Reovirus sigma NS and mu NS proteins form cytoplasmic inclusion structures in the absence of viral infection. *J Virol* 77, 5948-5963.
8. Miller CL, Broering TJ, Parker JS, Arnold MM, Nibert ML (2003) Reovirus sigma NS protein localizes to inclusions through an association requiring the mu NS amino terminus. *J Virol* 77, 4566-4576.
9. Broering TJ, Kim J, Miller CL, Piggott CD, Dinoso JB, Nibert ML, Parker JS (2004) Reovirus nonstructural protein mu NS recruits viral core surface proteins and entering core particles to factory-like inclusions. *J Virol* 78, 1882-1892.
10. Mikuletič T, Steyer A, Kotar T, Zorec TM, Poljak M (2019) A novel reassortant mammalian orthoreovirus with a divergent S1 genome segment identified in a traveler with diarrhea. *Infect Genet Evol* 73:378-383.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.06.002>
11. Rosa UA, Ribeiro GO, Villanova F, Luchs A, Milagres FAP, Komninakis SV, Tahmasebi R, Lobato MCABS, Brustulin R, Chagas RTD, Abrão MFNDS, Soares CVDA, Tinker RJ, Pandey RP, Raj VS, Sabino EC, Deng X, Delwart E, Costa ACD, Leal É (2019) First identification of mammalian Orthoreovirus type 3 by gut

virome analysis in a diarrheic child in Brazil. *Sci Rep* 9:9(1), 18599.

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-55216-5>

12. Johansson PJ, Sveger T, Ahlfors K, Ekstrand J, Svensson L (1996) Reovirus type 1

associated with meningitis. *Scand J Infect Dis* 28:117–120.

<https://doi.org/10.3109/00365549609049060>

13. Hermann L, Embree J, Hazelton P, Wells B, Coombs RT (2004) Reovirus type 2

isolated from cerebrospinal fluid. *Pediatr Infect Dis J* 23:373–375. [https://doi.org/](https://doi.org/10.1097/00006454-200404000-00026)

[10.1097/00006454-200404000-00026](https://doi.org/10.1097/00006454-200404000-00026)

14. Chua KB, Crameri G, Hyatt A, Yu M, Tompang MR, Rosli J, McEachern J,

Crameri S, Kumarasamy V, Eaton BT, Wang LF (2007) A previously unknown

reovirus of bat origin is associated with an acute respiratory disease in humans. *Proc*

Natl Acad Sci USA 104:11424-11429. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701372104>

15. Cheng P, Lau CS, Lai A, Ho E, Leung P, Chan F, Wong A, Lim W (2009) A novel

reovirus isolated from a patient with acute respiratory disease. *J Clin Virol* 45:79-

80. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.03.001>

16. Chua KB, Voon K, Yu M, Keniscope C, Abdul Rasid K, Wang LF (2011)

Investigation of a potential zoonotic transmission of orthoreovirus associated with

acute influenza-like illness in an adult patient. PLoS One 6(10):e25434.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025434>

17. Tyler KL, Barton ES, Ibach ML, Robinson C, Campbell JA, O'Donnell SM, Valyi-Nagy T, Clarke P, Wetzel JD, Dermody T (2004) Isolation and molecular characterization of a novel type 3 reovirus from a child with meningitis. J Infect Dis 189:1664-1675. <https://doi.org/10.1086/383129>
18. Tai JH, Williams JV, Edwards KM, Wright PF, Crowe JE Jr, Dermody TS (2005) Prevalence of reovirus-specific antibodies in young children in Nashville, Tennessee. J Infect Dis 191:1221-1224. <https://doi.org/10.1086/428911>.
19. Yamamoto SP, Motooka D, Egawa K, Kaida A, Hirai Y, Kubo H, Motomura K, Nakamura S, Iritani N (2020) Novel human reovirus isolated from children and its long-term circulation with reassortments. Sci Rep 22:10(1), 963. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58003-9>
20. Cao D, Sooryanarain H, Yugo DM, Tian D, Rogers AJ, Heffron CL, Thimmasandra Narayanappa A, LeRoith T, Overend C, Matzinger SR, Elankumaran S, Hermann JR, Patterson AR, Meng XJ (2018) Evaluation of the pathogenicity of mammalian orthoreovirus type 3 (MRV3) in germ-free gnotobiotic pigs and of the efficacy of an

- inactivated vaccine against MRV3 infection in neonatal conventional piglets. *Vet Microbiol* 224:23-30. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.08.019>
21. Cavicchio L, Tassoni L, Zamperin G, Campalto M, Carrino M, Leopardi S, Benedictis P, Beato MS (2020) Unexpected genetic diversity of two novel swine MRVs in Italy. *Viruses* 12:12(5), 574. <https://doi.org/10.3390/v12050574>
22. Dai Y, Zhou Q, Zhang C, Song Y, Tian X, Zhang X, Xue C, Xu S, Bi Y, Cao Y (2012) Complete genome sequence of a porcine orthoreovirus from southern China. *J Virol* 86:12456. <https://doi.org/10.1128/JVI.02254-12>
23. Fukutomi T, Sanekata T, Akashi H (1996) Isolation of reovirus type 2 from diarrheal feces of pigs. *J Vet Med Sci* 58:555-557. <https://doi.org/10.1292/jvms.58.555>
24. Harima H, Sasaki M, Kajihara M, Gonzalez G, Simulundu E, Bwalya EC, Qiu Y, Okuya K, Isono M, Orba Y, Takada A, Hang'ombe BM, Mweene AS, Sawa H (2020) Characterization of mammalian orthoreoviruses isolated from feces of pigs in Zambia. *J Gen Virol* 101:1027-1036. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001476>
25. Hirahara T, Yasuhara H, Matsui O, Kodama K, Nakai M, Sasaki N (1988) Characteristics of reovirus type 1 from the respiratory tract of pigs in Japan. *Nihon Juigaku Zasshi* 50:353-361. <https://doi.org/10.1292/jvms1939.50.353>

26. Kwon HJ, Kim HH, Kim HJ, Park JG, Son KY, Jung J, Lee WS, Cho KO, Park SJ, Kang MI (2012) Detection and molecular characterization of porcine type 3 orthoreoviruses circulating in South Korea. *Vet Microbiol* 157:456-463.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.12.032>
27. Lelli D, Beato MS, Cavicchio L, Lavazza A, Chiapponi C, Leopardi S, Baioni L, De Benedictis P, Moreno A (2016) First identification of mammalian orthoreovirus type 3 in diarrheic pigs in Europe. *Virology* 13:139. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0593-4>
28. Luo Y, Fei L, Yue H, Li S, Ma H, Tang C (2020) Prevalence and genomic characteristics of a novel reassortment mammalian orthoreovirus type 2 in diarrhea piglets in Sichuan, China. *Infect Genet Evol* 85.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104420>, 104420
29. Qin P, Li H, Wang JW, Wang B, Xie RH, Xu H, Zhao LY, Li L, Pan Y, Song Y, Huang YW (2017) Genetic and pathogenic characterization of a novel reassortant mammalian Orthoreovirus 3 (MRV3) from a diarrheic piglet and seroepidemiological survey of MRV3 in diarrheic pigs from east China. *Vet Microbiol* 208:126-136. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.07.021>

30. Steyer A, Gutiérrez-Aguire I, Kolenc M, Koren S, Kutnjak D, Pokorn M, Poljšak-Prijatelj M, Racki N, Ravnikar M, Sagadin M, Fratnik Steyer A, Toplak N (2013) High similarity of novel Orthoreovirus detected in a child hospitalized with acute gastroenteritis to mammalian orthoreoviruses found in bats in Europe. *J Clin Microbiol* 51:3818-3825. <https://doi.org/10.1128/JCM.01531-13>
31. Thimmasandra Narayanappa A, Sooryanarain H, Deventhiran J, Cao D, Ammayappan Venkatachalam B, Kambiranda D, LeRoith T, Heffron CL, Lindstrom N, Hall K, Jobst P, Sexton C, Meng XJ, Elankumaran S (2015) A novel pathogenic mammalian orthoreovirus from diarrheic pigs and swine blood meal in the United States. *mBio* 6. <https://doi.org/10.1128/mBio.00593-15>, e00593-e00515
32. Ye D, Ji Z, Shi H, Chen J, Shi D, Cao L, Liu J, Li M, Dong H, Jing Z, Wang X, Liu Q, Fan Q, Cong G, Zhang J, Han Y, Zhou J, Gu J, Zhang X, Feng L (2020) Molecular characterization of an emerging reassortant mammalian orthoreovirus in China. *Arch Virol* 165:2367-2372. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04712-5>
33. Zhang C, Liu L, Wang P, Liu S, Lin W, Hu F, Wu W, Chen W, Cui S (2011) A potentially novel reovirus isolated from swine in northeastern China in 2007. *Virus Genes* 43:342-349. <https://doi.org/10.1007/s11262-011-0642-4>

34. Zhang W, Kataoka M, Doan, HY, Wu FT, Haga K, Takeda N, Muramatsu M, Li TC (2020) Isolation and characterization of mammalian orthoreoviruses using a cell line resistant to Sapelovirus infection. *Transbound Emerg Dis* <https://doi.org/10.1111/tbed.13655>
35. Wang L, Li Y, Walsh T, Shen Z, Li Y, Deb Nath N, Lee J, Zheng B, Tao Y, Paden CR, Queen K, Zhang S, Tong S, Ma W (2021) Isolation and characterization of novel reassortant mammalian orthoreovirus from pigs in the United States. *Emerg Microbes Infect* 10:1137-1147. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1933608>
36. Zhang W, Kataoka M, Doan YH, Oi T, Furuya T, Oba M, Mizutani T, Oka T, Li TC, Nagai M (2021) Isolation and characterization of mammalian orthoreovirus type 3 from a fecal sample from a wild boar in Japan. *Arch Virol*. 166:1671-1680. [Htts://doi.org/10.1007/s00705-021-05053-7](https://doi.org/10.1007/s00705-021-05053-7).
37. Kohl C, Lesnik R, Brinkmann A, Ebinger A, Radonić A, Nitsche A, Mühlendorfer K, Wibbelt G, Kurth A (2012) Isolation and characterization of three mammalian orthoreoviruses from European bats. *PLOS ONE* 7:e43106. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043106>

38. Lelli D, Moreno A, Lavazza A, Bresaola M, Canelli E, Boniotti MB, Cordioli P (2013) Identification of mammalian orthoreovirus type 3 in Italian bats. *Zoonoses Public Health* 60:84-92. <https://doi.org/10.1111/zph.12001>
39. Lelli D, Moreno A, Steyer A, Naglič T, Chiapponi C, Prosperi A, Faccin F, Sozzi E, Lavazza A (2015) Detection and characterization of a novel reassortant mammalian orthoreovirus in bats in Europe. *Viruses* 7:5844-5854. <https://doi.org/10.3390/v7112908>
40. Li Z, Liu D, Ran X, Liu C, Guo D, Hu X, Tian J, Zhang X, Shao Y, Liu S, Qu L (2016) Characterization and pathogenicity of a novel mammalian orthoreovirus from wild short-nosed fruit bats. *Infect Genet Evol* 43:347-353. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.05.039>
41. Naglič T, Rihtarič D, Hostnik P, Toplak N, Koren S, Kuhar U, Jamnikar-Ciglencčki U, Kutnjak D, Steyer A (2018) Identification of novel reassortant mammalian orthoreoviruses from bats in Slovenia. *BMC Vet Res* 14. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1585-y>, 264
42. Wang L, Fu S, Cao L, Lei W, Cao Y, Song J, Tang Q, Zhang H, Feng Y, Yang W, Liang, G (2015) Isolation and identification of a natural reassortant mammalian

orthoreovirus from least horseshoe bat in China. PLOS ONE 10.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118598>, e0118598

43. Yang XL, Tan B, Wang B, Li W, Wang N, Luo CM, Wang MN, Zhang W, Li B, Peng C, Ge XY, Zhang LB, Shi ZL (2015) Isolation and identification of bat viruses closely related to human, porcine, and mink orthoreoviruses. *J Gen Virol* 96:3525-3531. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000314>
44. Anbalagan S, Spaans T, Hause BM (2014) Genome sequence of the novel reassortant mammalian Orthoreovirus strain MRV00304/13, isolated from a calf with diarrhea from the United States. *Genome Announc* 2:2(3), e00451-14. [https://doi: 10.1128/genomeA.00451-14](https://doi:10.1128/genomeA.00451-14)
45. Conner M, Kalica A, Kita J, Quick S, Schiff E, Joubert J, Gillespie J (1984) Isolation and characteristics of an equine reovirus type 3 and an antibody prevalence survey to reoviruses in horses located in New York State. *Vet Microbiol* 9:15-25.
46. Besozzi M, Lauzi S, Lelli D, Lavazza A, Chiapponi C, Pisoni G, Viganò R, Lanfranchi P, Luzzago C (2019) Host range of mammalian orthoreovirus type 3 widening to alpine chamois. *Vet Microbiol* 230:72-77. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.01.012>

47. Ahasan MS, Subramaniam K, Sayler KA, Loeb JC, Popov VL, Lednicky JA, Wisely SM, Campos Krauer JM, Waltzek TB (2019) Molecular characterization of a novel reassortment Mammalian Orthoreovirus type 2 isolated from a Florida White-tailed deer fawn. *Virus Res* 270. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197642>
48. Lian H, Liu Y, Zhang S, Zhang F, Hu R (2013) Novel orthoreovirus from mink, China, 2011. *Emerg Infect Dis* 19:1985-1988. <https://doi.org/10.3201/eid1912.130043>
49. Zhang YW, Liu Y, Lian H, Zhang F, Zhang SF, Hu RL (2016) A natural reassortant and mutant serotype 3 reovirus from mink in China. *Arch Virol* 161:495-498. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2670-1>
50. Li Z, Shao Y, Liu C, Liu D, Guo D, Qiu Z, Tian J, Zhang X, Liu S, Qu L (2015) Isolation and pathogenicity of the mammalian Orthoreovirus MPC/04 from masked civet cats. *Infect Genet Evol* 36:55-61. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.08.037>
51. Decaro N, Campolo M, Desario C, Ricci D, Camero M, Lorusso E, Elia G, Lavazza A, Martella V, Buonavoglia C (2005) Virological and molecular characterization of a mammalian Orthoreovirus type 3 strain isolated from a dog in Italy. *Vet Microbiol* 109:19-27. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.05.014>

52. Kokubu T, Takahashi T, Takamura K, Yasuda H, Hiramatsu K, Nakai M (1993)
Isolation of reovirus type 3 from dogs with diarrhea. *J Vet Med Sci* 55:453-454.
<https://doi.org/10.1292/jvms.55.453>
53. Mochizuki M, Tamazumi T, Kawanishi A, Azuma T, Shimizu T (1992) Serotype 2
reoviruses from the feces of cats with and without diarrhea. *J Vet Med Sci* 54:963-
968. <https://doi.org/10.1292/jvms.54.963>
54. Muir P, Harbour DA, Gruffydd-Jones TJ (1992) Reovirus type 2 in domestic cats:
isolation and experimental transmission. *Vet Microbiol* 30:309-316.
[https://doi.org/10.1016/0378-1135\(92\)90018-o](https://doi.org/10.1016/0378-1135(92)90018-o).
55. Li X, Sun X, Lu C, Kuang D, Han Y, Wang W, Tong P, Li N, Zhou J, Dai J (2020)
Isolation and identification of two new strains of mammalian orthoreovirus from
Chinese tree shrews. *Arch Virol* 165:1541-1550. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04635-1>
56. Fehér E, Kemenesi G, Oldal M, Kurucz K, Kugler R, Farkas SL, Marton S, Horváth
G, Bányai K, Jakab F (2017) Isolation and complete genome characterization of
novel reassortant Orthoreovirus from common vole (*Microtus arvalis*). *Virus Genes*
53:307-311. <https://doi.org/10.1007/s11262-016-1411-1>

57. Gauvin L, Bennett S, Liu H, Hakimi M, Schlossmacher M, Majithia J, Brown EG (2013) Respiratory infection of mice with mammalian reoviruses causes systemic infection with age- and strain-dependent pneumonia and encephalitis. *Virology* 1;10:67. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-67>, 67.
58. Postel A, Nishi T, Kameyama KI, Meyer D, Suckstorff O, Fukai K, Becher P (2019) Reemergence of Classical Swine Fever, Japan, 2018. *Emerg Infect Dis* 25(6):1228-1231. <https://doi.org/10.3201/eid2506.181578>.
59. Ito S, Jurado C, Bosch J, Ito M, Sánchez-Vizcaíno JM, Isoda N, Sakoda Y (2019) Role of Wild Boar in the Spread of Classical Swine Fever in Japan. *Pathogens* 24;8(4):206. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040206>.
60. Sawai K, Nishi T, Fukai K, Kato T, Hayama Y, Yamamoto T (2022) Phylogenetic and phylodynamic analysis of a classical swine fever virus outbreak in Japan (2018-2020). *Transbound Emerg Dis* 69(3):1529-1538. <https://doi.org/10.1111/tbed.14117>.
61. Oba M, Sakaguchi S, Wu H, Fujioka Y, Takemae H, Oki H, Kawai M, Shiokawa M, Aoki H, Fukase Y, Madarame H, Nakano T, Mizutani T, Nagai M (2022) First isolation and genomic characterization of bovine parechovirus from faecal samples of cattle in Japan. *J Gen Virol*. Feb;103(2). <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001718>.
62. 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. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.02.008>.
63. Nagai M, Okabayashi T, Akagami M, Matsuo A, Fujimoto Y, Hashem MA, Mekata H, Nakao R, Matsuno K, Katayama Y, Oba M, Omatsu T, Asai T, Nakagawa K, Ito H, Madarame H, Kawai K, Ito T, Nonaka N, Tsukiyama-Kohara K, Inoshima Y, Mizutani T, Misawa N (2020) Metagenomic identification, sequencing, and genome analysis of porcine hepe-astroviruses (bastroviruses) in porcine feces in Japan. *Infect Genet Evol.* 88:104664. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104664>.
64. Oba M, Obinata S, Takemae H, Kazama K, Oguro M, Ito K, Kakinuma S, Ishida H, Murakami H, Sakaguchi S, Mizutani T, Nagai M (2023) Prevalence and genetic diversity in bovine parechovirus infecting Japanese cattle. *Arch Virol* 14;168(3):91. <https://doi.org/10.1007/s00705-023-05712-x>.
65. Kitamura K, Takagi H, Oka T, Kataoka M, Ueki Y, Sakagami A (2021) Intertypic reassortment of mammalian orthoreovirus identified in wastewater in Japan. *Sci Rep* 15;11(1):12583. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92019-z>
66. Bai H, Liu J, Fang L, Kataoka M, Takeda N, Wakita T, Li TC (2018) Characterization of porcine Sapelovirus isolated from Japanese swine with PLC/PRF/5 cells. *Transbound Emerg Dis* 65:727-734. <https://doi.org/10.1111/tbed.12796>
67. Zhang W, Kataoka M, Doan HY, Ami Y, Suzaki Y, Takeda N, Muramatsu M, Li TC (2019) Characterization of a novel simian Sapelovirus isolated from a cynomolgus monkey using PLC/PRF/5 cells. *Sci Rep* 27:9(1), 20221. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56725-z>

68. Castilla D, Escobar V, Ynga S, Llanco L, Manchego A, Lázaro C, Navarro D, Santos N, Rojas M (2021) Enteric viral infections among Domesticated South American Camelids: First detection of mammalian orthoreovirus in camelids. *Animals (Basel)* 19;11(5):1455. <https://doi.org/10.3390/ani11051455>
69. Leary TP, Erker JC, Chalmers ML, Cruz AT, Wetzel JD, Desai SM, Mushahwar IK, Dermody TS (2002) Detection of mammalian reovirus RNA by using reverse transcription-PCR: sequence diversity within the lambda3-encoding L1 gene. *J Clin Microbiol* 40:1368-1375. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.4.1368-1375.2002>
70. Krumbholz A, Wurm R, Scheck O, Birch-Hirschfeld E, Egerer R, Henke A, Wutzler P, Zell R (2003) Detection of porcine teschoviruses and enteroviruses by LightCycler real-time PCR. *J Virol Methods*. 113(1):51-63. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(03\)00227-1](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(03)00227-1).
71. Zell R, Krumbholz A, Henke A, Birch-Hirschfeld E, Stelzner A, Doherty M, Hoey E, Dauber M, Prager D, Wurm R (2000) Detection of porcine enteroviruses by nRT-PCR: differentiation of CPE groups I-III with specific primer sets. *J Virol Methods*. 88(2):205-18. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(00\)00189-0](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(00)00189-0).
72. Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, Fang ZY (1990) Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* 28(2):276-282. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.2.276-282.1990>.
73. Masuda T, Nagai M, Yamasato H, Tsuchiaka S, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Nishiura N, Sassa Y, Omatsu T, Furuya T, Koyama S, Shirai J, Taniguchi K, Fujii Y, Todaka R, Katayama K, Mizutani T (2014) Identification of novel bovine group A rotavirus G15P[14] strain from epizootic diarrhea of adult cows by de novo

- sequencing using a next-generation sequencer. *Vet Microbiol* 171(1-2):66-73.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.03.009>.
74. 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(3-4):250-256.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.02.002>.
75. Matthijnssens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijs I, Delbeke T, McDonald SM, Palombo EA, Iturriza-Gomara M, Maes P, Patton JT, Rahman M, Van Ranst M (2008) Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J Virol* 82:3204-3219 <https://doi.org/10.1128/JVI.02257-07>
76. Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Banyai K, Brister JR, Buesa J, Esona MD, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gomara M, Johne R, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Parreno V, Rahman M, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Patton JT, Desselberger U, Van Ranst M (2011) Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol* 156:1397-1413
<https://doi.org/10.1007/s00705-011-1006-z>
77. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25:4876-4882.
<https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>

78. Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870-1874.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
79. Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
80. Simmonds P (2006) Recombination and selection in the evolution of picornaviruses and other mammalian positive-stranded RNA viruses. *J Virol*, 80:11124-11140.
<https://doi.org/10.1128/JVI.01076-06>
81. Nora T, Charpentier C, Tenaillon O, Hoede C, Clavel F, Hance AJ (2007) Contribution of recombination to the evolution of human immunodeficiency viruses expressing resistance to antiretroviral treatment. *J Virol* 81:7620-7628.
<https://doi.org/10.1128/JVI.00083-07>
82. Oberste MS, Peñaranda S, Pallansch MA (2004) RNA recombination plays a major role in genomic change during circulation of coxsackie B viruses. *J Virol* 78:2948-2955. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.6.2948-2955.2004>
83. Pérez-Losada M, Arenas M, Galán JC, Palero F, González-Candelas F (2015) Recombination in viruses: mechanisms, methods of study, and evolutionary consequences. *Infect Genet Evol* 30:296-307.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.12.022>
84. Prodělalová, J., 2012. The survey of porcine teschoviruses, sapeloviruses and enteroviruses B infecting domestic pigs and wild boars in the Czech Republic between 2005 and 2011. *Infect. Genet. Evol.* 12, 1447–1451.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.04.025>.

85. Sozzi, E., Barbieri, I., Lavazza, A., Lelli, D., Moreno, A., Canelli, E., Bugnetti, M., Cordioli, P., 2010. Molecular characterization and phylogenetic analysis of VP1 of porcine enteric picornaviruses isolates in Italy. *Transbound. Emerg. Dis.* 57, 434–442. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01170.x>.
86. Noh JY, Lee DH, Lim TH, Lee JH, Day JM, Song CS (2018) Isolation and genomic characterization of a novel avian Orthoreovirus strain in Korea, 2014. *Arch Virol* 163:1307-1316. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3667-8>
87. Farkas SL, Marton S, Dandar E, Kugler R, Gal B, Jakab F, Balint A, Kecskemeti S, Banyai K (2016) Lineage diversification, homo- and heterologous reassortment and recombination shape the evolution of chicken orthoreoviruses. *Sci Rep* 10;6:36960. <https://doi.org/10.1038/srep36960>
88. Ye D, Ji Z, Shi H, Chen J, Shi D, Cao L, Liu J, Li M, Dong H, Jing Z, Wang X, Liu Q, Fan Q, Cong G, Zhang J, Han Y, Zhou J, Gu J, Zhang X, Feng L (2020) Molecular characterization of an emerging reassortant mammalian orthoreovirus in China. *Arch Virol* 165:2367-2372. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04712-5>
89. Hoxie I, Dennehy JJ (2020) Intragenic recombination influences rotavirus diversity and evolution. *Virus Evol* 2020;13;6(1):vez059. <https://doi.org/10.1093/ve/vez059>
90. Cao D, Barro M, Hoshino Y (2008) Porcine rotavirus bearing an aberrant gene stemming from an intergenic recombination of the NSP2 and NSP5 genes is defective and interfering. *J Virol* 82:6073-6077 <https://doi.org/10.1128/JVI.00121-08>
91. Oki H, Masuda T, Hayashi-Miyamoto M, Kawai M, Ito M, Madarame H, Fukase Y, Takemae H, Sakaguchi S, Furuya T, Mizutani T, Oba M, Nagai M (2022) Genomic

- diversity and intragenic recombination of species C rotaviruses. *J Gen Virol* 103
<https://doi.org/10.1099/jgv.0.001703>.
92. Smith SC, Gribble J, Diller JR, Wiebe MA, Thoner TW Jr, Denison MR, Ogden KM (2021) Reovirus RNA recombination is sequence directed and generates internally deleted defective genome segments during passage. *J Virol* 20;95(8):e02181-20 <https://doi.org/10.1128/JVI.02181-20>
93. Cowley D, Donato CM, Roczo-Farkas S, Kirkwood CD (2016) Emergence of a novel equine-like G3P[8] inter-genogroup reassortant rotavirus strain associated with gastroenteritis in Australian children. *J Gen Virol* 97:403-410.
<https://doi.org/10.1099/jgv.0.000352>
94. McDonald SM, Nelson MI, Turner PE, Patton JT (2016) Reassortment in segmented RNA viruses: mechanisms and outcomes. *Nat Rev Microbiol* 14:448-460.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.46>
95. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer FT, de Beer TAP, Rempfer C, Bordoli L, Lepore R, Schwede T (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res* 46(W1):W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>.
96. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Žídek A, Potapenko A, Bridgland A, Meyer C, Kohl SAA, Ballard AJ, Cowie A, Romera-Paredes B, Nikolov S, Jain R, Adler J, Back T, Petersen S, Reiman D, Clancy E, Zielinski M, Steinegger M, Pacholska M, Berghammer T, Bodenstein S, Silver D, Vinyals O, Senior AW, Kavukcuoglu K, Kohli P, Hassabis D (2021) Highly accurate protein structure prediction with

- AlphaFold. Nature 2021, 596, 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
97. Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, Ingersoll R, Sheppard HW, Ray SC (1999) Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. J Virol 73:152-160. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.1.152-160.1999>
98. Frazer KA, Pachter L, Poliakov A, Rubin EM, Dubchak I (2004) VISTA: Computational Tools for Comparative Genomics. Nucleic Acids Res 32:273-279. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh458>
99. Martin DP, Murrell B, Golden M, Khoosal A, Muhire B (2015) RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. Virus Evol 26;1(1):vev003. <https://doi.org/10.1093/ve/vev003>.
100. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Meng E.C, Couch GS, Croll TI, Morris JH, Ferrin TE (2021) UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. Protein Sci. 2021, 30, 70–82. <https://doi.org/10.1002/pro.3943>.
101. Meng XJ, Lindsay DS, Sriranganathan N (2009) Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. Philos. Trans R Soc Lond B Biol Sci 364:2697-2707. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0086>.
102. Meier R, Ryser-Degiorgis M (2018) Wild boar and infectious diseases: Evaluation of the current risk to human and domestic animal health in Switzerland: a review. Schweiz Arch Tierheilkd 160:443-460. <https://doi.org/10.17236/sat00168>

103. Ohdachi S, Ishibashi Y, Iwasa MA, Saitoh T (eds) 2009. The wild mammals of Japan. Shoukadoh Book Sellers, Kyoto 544.
104. Yamazaki Y, Adachi F, Sawamura A (2016) Multiple origins and admixture of recently expanding Japanese wild boar (*Sus scrofa leucomystax*) populations in Toyama Prefecture of Japan. *Zool Sci* 33:38-43. <https://doi.org/10.2108/zs150092>
105. Abe M, Ito N, Sakai K, Kaku Y, Oba M, Nishimura M, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Sugiyama M, Mizutani T (2011) A novel Sapelovirus-like virus isolation from wild boar. *Virus Genes* 43:243-248. <https://doi.org/10.1007/s11262-011-0628-2>
106. Katsuta R, Sunaga F, Oi T, Doan YH, Tsuzuku S, Suzuki Y, Sano K, Katayama Y, Omatsu T, Oba M, Furuya T, Ouchi Y, Shirai J, Mizutani T, Oka T, Nagai M (2019) First identification of Sapoviruses in wild boar. *Virus Res* 2;271:197680. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197680>.
107. Nagata A, Sekiguchi Y, Oi T, Sunaga F, Madarame H, Imai R, Sano K, Katayama Y, Omatsu T, Oba M, Furuya T, Shirai J, Okabayashi T, Misawa N, Oka T, Mizutani T, Nagai M (2020) Genetic diversity of enterovirus G detected in faecal samples of wild boars in Japan: identification of novel genotypes carrying a papain-like cysteine protease sequence. *J Gen Virol* 101(8):840-852. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001446>.
108. Oba M, Borjigin S, Kikuchi F, Oi T, Takemae H, Ishida H, Murakami H, Aihara N, Shiga T, Kamiie J, Mizutani T, Nagai M (2022) First Isolation and Identification of Homologous Recombination Events of Porcine Adenovirus from Wild Boar. *Viruses*. 2022 29;14(11):2400. <https://doi.org/10.3390/v14112400>.