

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658248

研究課題名（和文） 新規アレナウイルス Luna virus の自然宿主及び他種動物内での性状解析

研究課題名（英文） Characterization of the novel arenavirus, Luna virus, in the host and other animals.

研究代表者

石井 秋宏 (ISHII AKIHIRO)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・助教

研究者番号：90421982

研究成果の概要（和文）：

ザンビア国各地において齧歯類動物の保有するアレナウイルスの調査を行い、新規アレナウイルスである Luna ウイルスおよび Lunk ウイルスを分離、同定し、自然宿主がそれぞれマストミスおよびアフリカンピグミーマウスであることを明らかとした。両ウイルスの病原性を調べるため、分離ウイルスをマウスの腹腔内に投与したが、体重減少等のウイルス感染症の症状は現れず、既知の非病原性アレナウイルスと同様の性質であることが考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We isolated and identified novel arenaviruses, Luna and Lunk virus in surveillance for rodents in Zambia. Phylogenetic analysis revealed that genotype of the virus genome in each area. In order to investigate pathogenesis, the viruses were infected to mice by intraperitoneal injection. However, the viruses did not develop any symptom, such as loss of weight, debilitation and death, for mice under our observation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：動物生命科学・獣医学

キーワード：人獣共通感染症・ザンビア・アレナウイルス・Luna ウイルス・Lunk ウイルス

1. 研究開始当初の背景

研究代表者の所属する北海道大学 人獣共通感染症リサーチセンターではアフリカのザンビア共和国に研究拠点を構え、人獣共通感染症に関するフィールドワークを継続的に行っている。ザンビアでは 2008 年に新規アレナウイルス (Lujo virus) による出血熱が発生し、最終的に 4 人の死亡者が出た (Paweska et al., 2009, Emerg Inf Dis)。ユーラシア・アフリカ大陸に存在するアレナウイルスは Old world arenavirus (OWA) と総称される。OWA は主にマストミス等の齧歯類動物をレゼルボアとし、遺伝的に Lassa ウィ

ルス様ウイルスおよび Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) の 2 グループに大別できる。西アフリカに存在する Lassa ウイルスは出血熱を引き起こすが、中央～東部アフリカに存在する近縁種 (Mopeia virus, Mobala virus 等) ではヒトへの病原性は報告されていない。アジア・ヨーロッパに存在する LCMV は、マウス (genus *Mus*) をレゼルボアとし、ヒトに対する弱い病原性を持つ。Lujo ウイルスは OWA に属すると考えられるが、これまでに知られているアレナウイルスとは遺伝的に大きく異なる部分もあり、レゼルボアを含め不明な点が多い。

OWA を含むアレナウイルスの宿主特異性や、病原性に関する遺伝的要因は明らかとされていない部分も多く、さらにアフリカ大陸では LCMV が分離されておらず遺伝的背景が不明である、宿主であるマストミスは細胞株も樹立されていないなど研究ツールも未だ不十分な状態である。

2. 研究の目的

本研究は人獣共通感染症病原体としての OWA の研究を進めるため、ザンビア国において齧歯類動物が保有するアレナウイルスを調査して Lujo ウイルスの探索を行うと共に、ザンビア国内のウイルスの遺伝型と自然宿主動物を明らかとし、この調査において見いだした野性型ウイルスを用いて細胞および動物を用いたアレナウイルスの感染実験モデル系を構築することを目的とした。

図1：ザンビア国における調査地

1. Mpulung
2. Kasanka NP
3. Lusaka
4. Namwala
5. Livingstone



3. 研究の方法

アレナウイルスのサーベイランスのため、シャーメントラップおよび

ケージトラップを用いてザンビア国各地（図1：ルサカ、リビングストン、カサンカ国立公園、ムプルング）で齧歯類動物を捕獲した。捕獲した齧歯類動物は麻酔殺後に解剖し、採取した腎臓試料から全 RNA を抽出し、本研究代表者が設計した Lujo ウイルスを含む OWA のユニバーサルプライマーを用いた one step RT-PCR 法でアレナウイルスのスクリーニングを行った。ウイルスの自然宿主動物はシトクロム b 遺伝子の相同性から同定した。齧歯類動物のシトクロム b 遺伝子のユニバーサルプライマーを設計し、one step RT-PCR 法によって腎臓 RNA から増幅した。

ウイルス RNA 陽性の試料については、乳剤を調製し、VeroE6 細胞に接種してウイルス分離を試みた。分離されたウイルスは全ゲノム配列を次世代シーケンサーを用いて解析すると共に、各種培養細胞および動物への感染実験を行った。

4. 研究成果

研究期間内に齧歯類動物を合計 305 匹採集した。この内の *Mastomys natalensis* (マストミス) 198 検体中 18 検体と、*Mus minutoides* (アフリカンピグミーマウス) 3 検体中 1 検体からアレナウイルス RNA を検出した。増幅された遺伝子断片の配列から、マストミスか

ら検出された株は、本研究代表者らが以前報告した Lassa ウイルス様アレナウイルスの Luna ウイルスであること、アフリカンピグミーマウスから検出された株は新規 LCMV 様ウイルスであることが示唆された。ウイルス RNA 陽性検体の腎臓を乳剤として VeroE6 細胞に接種した結果、9 株の Luna ウイルスと 1 株の LCMV 様ウイルスが分離できた。これらウイルスについて、次世代シーケンサー (GS Junior, Roche) を用いて全ゲノムを解析した結果、LCMV 様ウイルスは新規ウイルスであることが示され、Lunk ウイルスと命名した。これまでアフリカ大陸においては LCMV もしくはその近縁ウイルスは分離されておらず、遺伝子断片で存在が示唆されるだけであり、本 Lunk ウイルスがアフリカ大陸で初の LCMV 様ウイルスの分離例である。また、全ゲノム解析の結果から nucleoprotein のアミノ酸配列が推定でき、既知の LCMV と比較すると、OWA の分類の指標とされる 12% 以上の相同性の違いがあったことから、ユーラシア大陸に存在する LCMV とは別種として分類されることが示された (図2)。

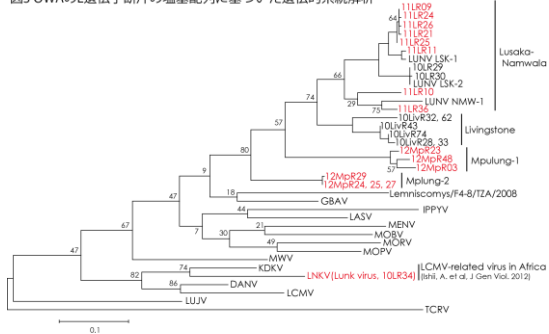
図2: OWA株間のnucleoproteinのアミノ酸配列相同性の比較

	1	2	3	4	5	6	7	8
LUNV	1							
MOPV	2	80.88						
LASV	3	73.33	73.86					
LUJV	4	58.22	56.12	55.04				
LCMV ARM	5	63.81	64.16	61.47	58.16			
LCMV DAN	6	64.34	65.56	63.22	58.16	94.09		
LCMV GRO1	7	64.86	63.99	61.65	59.57	90.14	89.96	
LNKV	8	63.11	62.76	60.95	59.40	82.26	82.08	80.82

%identity

Luna, Lunk ウイルスを含む OWA 全体で遺伝的系統解析を行った結果、Luna ウイルスは採取地域ごとに遺伝型があり、これまでに検出された Luna ウイルスも含めて少なくとも 4 年間は保存されていた (図3)。

図3 OWAのL遺伝子断片の塩基配列に基づいた遺伝的系統解析

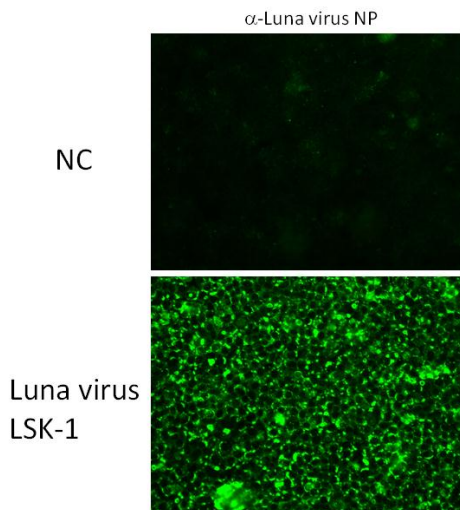


また、Lujo ウイルスは本研究で発見されたザンビア株を含めた全ての OWA 株との遺伝的距離が非常に遠いことが示された (図3)。

次に、OWA 感染実験のツールとして自然宿主動物である *M. natalensis* の近縁種である *M. coucha* を飼育、繁殖して、その腎臓組織から初代培養細胞系を樹立した。また、この細胞に SV40 の T 抗原遺伝子を導入すること

で増殖能を増加した細胞系を樹立し、それぞれ MKF3, MKF3T 細胞と命名した。VeroE6 および MKF3, MKF3T 細胞に Luna, Lunk ウイルスを接種したところ、培養上清中へのウイルスの放出 (ウイルス RNA 量の増加)、国立感染症研究所 森川茂先生から分与していただいた Luna ウイルス NP タンパク質に対する抗体を用いた免疫染色による観察 (図 4) から、ウイルスの増殖は確認されたが、細胞変性効果は観察されなかった。また、C57BL/6J マウスに接種したが、体重減少等の顕著な症状は示さなかったことから、Luna, Lunk ウイルス共に、過去に報告された非病原性 OWA と同様

図4:Lunaウイルスを感染させたVeroE6細胞の免疫染色



の性質を持っていることが考えられた。

本研究によって、ザンビアにおける主要な OWA の主要な 2 グループ (Lassa ウイルスおよび LCMV) に属するウイルスが分離され、全ゲノム解析から遺伝的背景が明らかとなった。その結果、Lujo ウイルスの遺伝的背景が、他のザンビア株と系統関係を持たない特異なものであることが示された。次に、分離されたザンビア株ウイルスは培養細胞およびマウスに対して顕著な病原性を持たないことが示されたが、マストミスの由来細胞株を樹立できたことから、今後、これらのウイルスおよび動物、細胞等をツールとして用いて、自然宿主動物および他の動物の細胞内での動態を比較するなどの研究を進める予定としている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Ishii A, Thomas Y, Moonga L, Nakamura I, Ohnuma A, Hang'ombe BM, Takada A, Mweene AS, Sawa H. Molecular surveillance and

phylogenetic analysis of Old World arenaviruses in Zambia. *J Gen Virol* (2012) 93(pt10): 2247-2251 (査読有)

2. Ishii A, Thomas Y, Moonga L, Nakamura I, Ohnuma A, Hang'ombe B, Takada A, Mweene A and Sawa H. Novel arenavirus, Zambia. *Emerg Infect Dis* (2011) 17(10):1921-1924 (査読有)

3. 石井秋宏、ザンビア共和国における新規アレンウイルスによる出血熱の発生と自然宿主動物の探索、最新医学、(2011) 66(12): 2649-2654 (査読無)

[学会発表] (計 5 件)

1. Akihiro Ishii, Yuka Thomas, Ladslav Moonga, Ichiro Nakamura, Aiko Ohnuma, Bernard M. Hang'ombe, Ayato Takada, Aaron S. Mweene and Hirofumi Sawa, Molecular surveillance and phylogenetic analysis of Old World Arenaviruses in Zambia., Asian Research Forum on Emerging and Reemerging Infections - 2013, Tokyo Medical and Dental University, Japan, 23 Jan 2013.

2. 石井 秋宏、トーマス 由佳、高田 礼人、中村 一郎、澤 洋文、ザンビア共和国におけるアレンウイルスの疫学調査と新規 LCMV 様ウイルスの系統解析、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪国際会議場、日本、2012 年 11 月 14 日

3. 石井秋宏、澤洋文、ザンビア共和国におけるアレンウイルスの疫学調査、やすらぎ伊王島「海に見えるホテル」、日本、平成 24 年 2 月 4 日

4. Akihiro Ishii, Yuka Thomas, Ladslav Moonga, Ichiro Nakamura, Aiko Ohnuma, Bernard Hang'ombe, Ayato Takada, Aaron Mweene, Hirofumi Sawa, Investigation and phylogenetic analysis of novel arenaviruses in Zambia., The International Young Researcher Seminar in Zoonosis Control, Hokkaido University, Japan, 17 Dec. 2012

5. Akihiro Ishii, Yuka Thomas, Ladslav Moonga, Ichiro Nakamura, Aiko Ohnuma, Bernard Hang'ombe, Ayato Takada, Aaron Mweene, Hirofumi Sawa, Surveillance and phylogenetic analysis of a novel arenavirus in Zambia., International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo Convention Center, 12 Sep. 2011

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 秋宏（ISHII AKIHIRO）

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・助教

研究者番号：90421982