

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08086

研究課題名(和文) 吸血コウモリ由来狂犬病の感染拡大阻止を目的とした進化疫学研究

研究課題名(英文) Evolutionary epidemiological study aimed at preventing the spread of vampire bat-related rabies

研究代表者

酒井 健夫 (SAKAI, Takeo)

日本大学・生物資源科学部・名誉教授

研究者番号：50147667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は吸血コウモリ由来狂犬病ウイルス(RABV)の拡散を分子疫学的に解明する目的で、RABVゲノムの次世代シーケンサー(NGS)による解読を進めた。NGS解析で未解読の領域はサンガー法により行った。分子系統樹解析の結果、食虫コウモリである*Tadarida brasiliensis*は北米から南米にかけて広範に分布しているが、吸血コウモリは、北中米に分布する*T. brasiliensis*の集団からRABVが伝播され、その後、RABVは南米に南下しながらブラジル各地の吸血コウモリ集団に拡散して、その過程で食果コウモリ(*Artibeus*属)にもRABVが伝播したことが推定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、現在南米の家畜で流行している狂犬病の主要な媒介動物である吸血コウモリから分離された狂犬病ウイルスの分子疫学的解析を行ったことにより、その起源が北中米の食虫コウモリであることを明らかにした。分子系統樹解析の結果、この狂犬病ウイルスは中米から南米に吸血コウモリの集団に伝播する形で南下して拡散し、その過程で異種の食果コウモリへの伝搬が起こったと考えられた。このような吸血コウモリ由来感染症の拡散様式や異種伝搬を明らかにしたことは、現在課題となっている多くのコウモリ関連人獣共通感染症の制御を考える上で重要な情報を提供した。

研究成果の概要(英文)： This study aimed to elucidate the spread of the vampire-derived rabies virus (RABV) from the viewpoint of molecular epidemiology, and proceeded to decipher the RABV genome by a next-generation sequencer (NGS). The nucleotide sequence region that could not be sequenced by NGS analysis was decoded by the Sanger sequencing. The insectivorous bat *Tadarida brasiliensis* is widely distributed from North America to South America, but as a result of molecular phylogenetic analysis, vampire bats were transmitted RABV from a population of *T. brasiliensis* distributed in North and Central America, and then RABV was transmitted southward. It was then speculated that RABV was widely spread to a population of vampire bats in various regions of Brazil, and that RABV was also transmitted to the frugivorous bat (genus *Artibeus*) during the spread process.

研究分野：農学

キーワード：吸血コウモリ 狂犬病ウイルス 分子疫学 次世代シーケンサー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

吸血コウモリは中南米に生息し、家畜や野生動物などの血液のみを餌とする特異な動物種である。狂犬病ウイルス (RABV) は感染した動物の唾液に排泄されるため、吸血コウモリ (*Desmodus rotundus*) はその独特な生態から、中南米における RABV の媒介動物として公衆衛生および畜産衛生上も非常に大きな問題となっている。この吸血コウモリはアメリカ大陸で発見された化石の年代推定から、250 万年前には中南米に存在していたと考えられている。

研究代表者らは、吸血コウモリと食果コウモリの間で RABV の種間伝播 (スピルオーバー) が起き、その後、食果コウモリ集団内でも RABV の流行・拡大が起きていることを報告した。従って、吸血コウモリ集団にどのように RABV が適応・拡大してきたのか、その進化の歴史を解明できれば、吸血コウモリ媒介性狂犬病ウイルスを撲滅するための有効な手段を構築する手がかりが得られることが期待される。

また研究代表者らが 15 年間以上継続した野生動物狂犬病の現地サーベイランスによって、コウモリ狂犬病の感染環が部分的に解明されたが、コウモリ由来狂犬病の発生件数は減少することなく、むしろ疫学調査の進展に伴い、自然界でのその存在が顕在化してきている。特にコウモリ狂犬病の流行様式の要因、コウモリ種間における RABV の伝播・維持様式、およびコウモリ集団から他種動物への伝搬 (スピルオーバー) 機序等、さらに解明すべき疫学的課題は多い。

2. 研究の目的

そこで本研究は、これまでに構築した調査ネットワークを用いた流行地域での継続調査によって吸血コウモリ狂犬病と関連する新たなウイルス検体の収集に努め、これらの検体の大規模な分子疫学的解析とともに、研究代表者らが保管している多数のコウモリ狂犬病由来 RABV ゲノムの配列情報を利用して、さらに新規の遺伝子解読手法や分析・診断手法を駆使して網羅解析し、吸血コウモリ狂犬病の起源・拡散様式の疫学、適応進化機序、および他種動物への将来の感染拡大予測など、それらの解明に取り組むことを計画した。

3. 研究の方法

既存の吸血コウモリ由来 RABV ゲノム 1,500 検体に加え、現地調査で収集した RABV ゲノム検体の全長配列を解読し、また公開登録されたコウモリ由来 RABV ゲノム配列を加えて分子進化解析および分離地理・地形等の各種疫学情報を用いて、吸血コウモリの間で維持されている狂犬病の流行拡大様式の解明を試みた。ゲノム配列の解読にあたっては、吸血コウモリの RABV は遺伝的多様性が低いために従来ゲノム中の一部の特定領域の解析のみでは信頼度の高い分子系統解析ができないことが予測された。そこで、次世代シーケンサー (NGS) によるゲノム全長配列決定によって遺伝子配列情報量とサンプル数増加を計画した。保管された分離株および新たに収集した野外 RABV 全ゲノムの塩基配列を NGS である MiSeq で決定した。サンプルにはコウモリなど宿主由来の RNA が大量に混在して解析の妨げになるため、これまで研究代表者らが決定した吸血コウモリ分離株の配列を基にウイルス RNA の全長を増幅できるプライマーを設計し、アンプリコンシークエンスにより全長配列を決定した。また RABV の *Tadarida (T.) brasiliensis* (食虫コウモリ) から吸血コウモリへの適応進化および異種動物へのスピルオーバーによって生じる新たな感染リスクについて推定するために、*T. brasiliensis* と吸血コウモリ RABV のゲノム比較進化解析ならびに食果コウモリで流行している RABV の疫学解析を行った。

4. 研究成果

(1) 効率的な RABV ゲノム配列解読手法の確立

本研究で材料とした検体は感染した動物の脳組織から抽出した RNA であるため、宿主由来の RNA が多く含まれていた。さらにウイルス RNA の断片化が進んでいる検体も含まれたため、従来法では RABV ゲノムの全長領域の増幅が困難であった。そこで RABV の全長ゲノム領域をカ

パーした増幅産物を得るために9組のプライマーペアを用いたマルチプレックスPCRを行ったが、検体によって増幅できる遺伝子領域に偏りがあり、さらに増幅を確認しにくいプライマーペアも存在した。そこで、より多くの検体のNGS解析を効率的に進めるために、プライマーペアの再設計を行い、最適化した4組のプライマーペアを用いたPCR法に変更し、ライブラリ調整を進めた。

(2) 吸血コウモリ由来 RABV の分子系統樹解析

本研究で塩基配列を決定したブラジルの吸血コウモリ由来 RABV に、GenBank に登録されている南米大陸で分離されたコウモリ由来 RABV17 配列を加えた計 25 検体の塩基配列 10,601bp を用いて NJ 法で分子系統樹を作製した。本系統樹は、系統樹の信頼性の指標となるブートストラップ値が 90%以上を示す内部岐が N 遺伝子 CDS (1,230bp) や、G 遺伝子 CDS (1,574bp) で作製した分子系統樹よりも多く、非常に近縁で遺伝的多様性が低い吸血コウモリ由来 RABV 集団の分析に適したより信頼性の高い分子系統樹を得ることができることを確認した(図1)。従って、以後の解析においては、RABV のほぼ全長のゲノム配列を用いて分子疫学解析を行った。

(3) 全ゲノム配列データを用いた分子疫学解析

NGS において塩基配列を決定した一部の検体の遺伝子領域が未解読であったため、該当領域はサンガー法によりシーケンスを行い、新たに4検体の吸血コウモリ由来 RABV の全長配列を決定した。吸血コウモリ由来 RABV と比較するために、食果コウモリから分離された RABV の L 遺伝子領域を NGS により決定し、全長配列を決定した。これまで、食果コウモリ由来 RABV は吸血コウモリ由来 RABV と遺伝的に非常に近縁なために詳細な系統関係の比較が困難であったが、全長配列決定によって食果コウモリ由来 RABV も吸血コウモリ由来 RABV と同様にウイルス感染環に地域性があることが明らかになった。

また、従来の N 遺伝子とあわせて本研究で得た全長配列を用いた南米の吸血コウモリ由来 RABV の分子系統樹解析を行うことにより、現在、南米の吸血コウモリで維持されている RABV の起源は北中米に生息する *T. brasiliensis* が中米に生息していた吸血コウモリに伝播して生じ、

その後、南下しながら南米の吸血コウモリの間で感染が拡大し、その拡大過程において吸血コウモリから食果コウモリ (*Aeribeus* sp.) への伝搬が起こったことが推定された(図1, 2)。

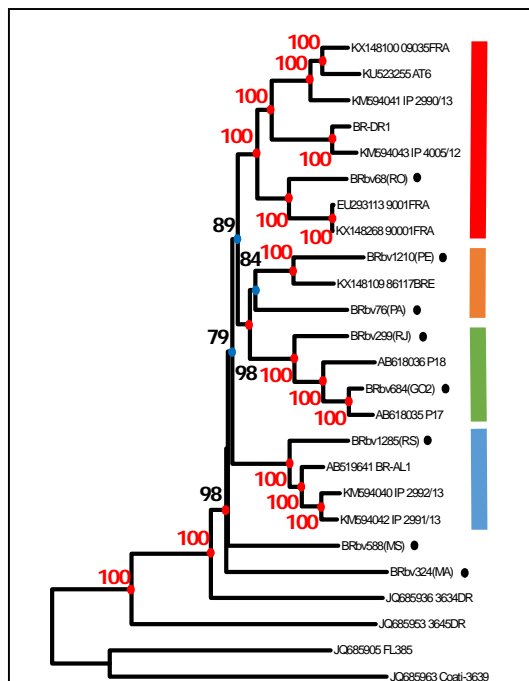


図1 吸血コウモリ由来 RABV の 10,601塩基を用いて作製した分子系統樹

黒丸は本研究で配列決定した検体を、右端の分岐集団毎の色は図2の分離地域を示す。

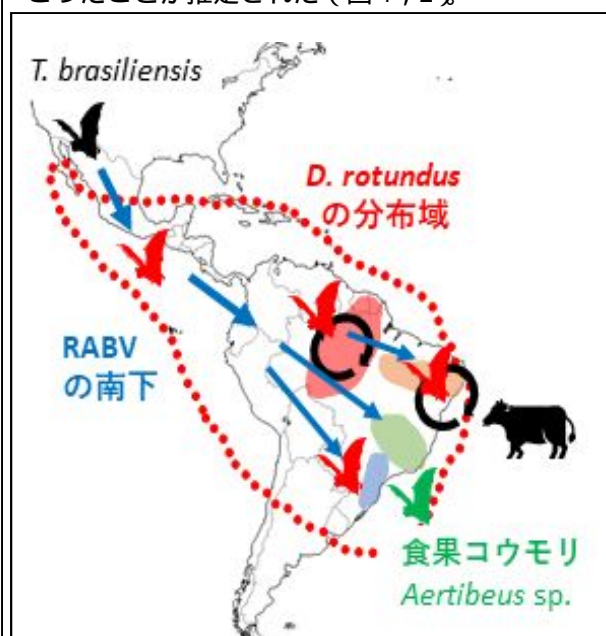


図2 吸血コウモリ狂犬病の推定される適応進化の経路

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sato Mana, Hosoya Sho, Yoshikawa Sota, Ohki Shun, Kobayashi Yuki, Itou Takuya, Kikuchi Kiyoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 A highly flexible and repeatable genotyping method for aquaculture studies based on target amplicon sequencing using next-generation sequencing technology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6904
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-43336-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yokomori Tamu, Tozaki Teruaki, Mita Hiroshi, Miyake Takeshi, Kakoi Hironaga, Kobayashi Yuki, Kusano Kanichi, Itou Takuya	4. 巻 12
2. 論文標題 Heritability estimates of the position and number of facial hair whorls in Thoroughbred horses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	6. 最初と最後の頁 346
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13104-019-4386-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi Yuki, Shimazu Tsukika, Murata Koichi, Itou Takuya, Suzuki Yoshiyuki	4. 巻 262
2. 論文標題 An endogenous adeno-associated virus element in elephants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virus Research	6. 最初と最後の頁 10～14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.virusres.2018.04.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kano Rui, Kobayashi Yuki, Nishikawa Akitoyo, Murata Ryo, Itou Takuya, Ito Takaaki, Suzuki Kazuyuki, Kamata Hiroshi	4. 巻 59
2. 論文標題 Next-generation Sequencing Analysis of Bacterial Flora in Bovine <I>Prototheca</I> Mastitic Milk	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medical Mycology Journal	6. 最初と最後の頁 E41～E46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3314/mmj.18-00004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakagawa K, Kobayashi Y, Ito N, Suzuki Y, Okada K, Makino M, Goto H, Takahashi T, Sugiyama M.	4. 巻 91
2. 論文標題 Molecular Function Analysis of Rabies Virus RNA Polymerase L Protein by Using an L Gene-Deficient Virus.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Virol.	6. 最初と最後の頁 e00826-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.00826-17.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小林由紀
2. 発表標題 アフリカ獣上目動物におけるボルナウイルス由来エレメントの蛋白質機能
3. 学会等名 日本進化学会 第20回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 青柳皓大, 瀬川太雄, 鈴木美和, 岩田秀一, 澤 修作, 加来雅人, 駒場昌幸, 小林由紀, 伊藤琢也
2. 発表標題 バンドウイルカから分離された腸内定着性に優れた乳酸菌の探索
3. 学会等名 第24回日本野生動物医学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Itou T, Markotter W, Nel LH.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 World Health Organization	5. 総ページ数 202
3. 書名 Laboratory Techniques in Rabies, Fifth Edition, Volume 2. (Eds) Charles E Rupprecht, Anthony R Fooks, Bernadette	

1. 著者名 末吉 益雄、高井 伸二	4. 発行年 2020年
2. 出版社 文永堂出版	5. 総ページ数 312
3. 書名 動物の衛生 第2版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	伊藤 琢也 (ITOU Takuya) (20307820)	日本大学・生物資源科学部・教授 (32665)	
研究 分担者	鈴木 由紀 (SUZUKI Yuki) (30712492)	日本大学・生物資源科学部・准教授 (32665)	