

令和 4 年 5 月 7 日現在

機関番号：30109

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16675

研究課題名（和文）北方系ヤブカを用いたデングウイルスおよびジカウイルスの感染評価系の確立

研究課題名（英文）Experimental infection model of Dengue virus and Zika virus in northern Japanese local mosquitoes

研究代表者

内田 玲麻 (Uchida, Leo)

酪農学園大学・獣医学群・講師

研究者番号：50756723

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトに熱性疾患や胎児の小頭症を引き起こす、蚊媒介性ジカウイルスが、日本産の北方系ヤマトヤブカ体内で増殖すること、またヤマトヤブカの唾液中にウイルスが排出され、蚊がウイルスを媒介し得ることを明らかにした。加えて、蚊の体内で増えたウイルスはウイルスの表面を構成するエンベロープタンパクに特徴的なアミノ酸変異を有し、本変異がウイルスの糖鎖修飾能に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ジカウイルスは2015年、南米を中心とした世界的な流行が見られ、近年、日本国内への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルスである。本研究では日本に広く分布するヤマトヤブカにおいて、程度は低いながらもウイルスが媒介され得ることを明らかにした。また、本研究で見つかったウイルスの変異は、ウイルスが蚊で増殖する際の適合性に関わる因子と考えられ、今後、蚊媒介性ウイルス関連の研究へ展開が見込まれる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to evaluate the susceptibility and vector competence of *Aedes japonicus* from northern Japan to Zika virus (ZIKV), which causes febrile illness and microcephaly to human. After oral infection of ZIKV, the amplified virus was detected from several parts of the body of *Ae. japonicus*, and the viral RNA was detected from the saliva of the mosquitoes. The infection rate was lower than two major ZIKV vector, *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti*, but the virus titer in the body was almost same level or higher than the two mosquito species. Besides, next generation sequencing targeting on ZIKV genome which derived from the virus-infected mosquitoes revealed that two amino acid mutations accumulate in the viral envelope protein. The two amino acid mutations imply that regulate N-linked glycosylation of envelope protein.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ジカウイルス 蚊 感受性 媒介能 次世代シーケンス 変異 適合性

1. 研究開始当初の背景

デング熱、ジカウイルス感染症は共にフラビウイルス科、フラビウイルス属のデングウイルス (Dengue virus, DENV) およびジカウイルス (Zika virus, ZIKV) により引き起こされる熱性疾患である。自然界でウイルスはヒトと蚊の間で感染環が維持されており、ヒトは主にウイルスを保有した蚊の刺咬により感染する。熱帯、亜熱帯地方において両ウイルスはヒトスジシマカ (Aedes albopictus) またはネッタイシマカ (Aedes aegypti) により媒介される。DENV は実験感染において、ヤマダシマカやリバースシマカで感受性あるいは媒介能を持つ事が確認されているが、その報告は限られる。一方、ZIKV はネッタイシマカ、ヒトスジシマカに加え、一部のヤブカでウイルスを媒介する事が知られるが、詳細な種、具体的な媒介能 (ウイルス保有期間、介卵伝播能等) については不明な点が多い。

日本にはおおよそ 12 属、110 種の蚊科昆虫が分布し、これらは、大隅海峡 (三宅線) を境に北方系 (旧北区系) と南方系 (東洋区系) とに大別される。これまで、DENV、ZIKV の媒介能に関する研究は、実験室コロニーの確立されたネッタイシマカとヒトスジシマカを中心に進められてきた。しかしコロニーの確立されていないヤブカ属の蚊については、その利用の難しさから、媒介能、介卵伝播能に関する知見は乏しい。とりわけ、日本に広く分布する北方系のヤブカの DENV、ZIKV の媒介能に関してはほとんど知見が得られていない。

日本政府観光局によれば、この数年間、訪日外国人旅行者数は増加傾向を示し、2016 年の訪日外客数は 2400 万人に上った。中でもタイ、ベトナム、フィリピンといったデング熱の流行の見られるアジア地域からの旅行者は全体の 85% を占める。また、国内の輸入デング熱症例のうち、88% がアジアを旅行中に感染したことが推定されている。こうした中、2014 年の東京でのデング熱流行のように、国内で定着の見られない DENV、ZIKV といったウイルスが人あるいは蚊を介して国内に持ち込まれる可能性が高い。よって、国内に広く分布する北方系ヤブカの両ウイルスに対する媒介能、介卵伝播能を評価することは公衆衛生上の急務と言える。

2. 研究の目的

以上を踏まえ、本研究では日本産の北方系ヤブカにおける

(1) DENV、ZIKV の蚊体内でのウイルス動態、および媒介能

(2) 蚊体内で起こるウイルス変異

を明らかにし、日本産北方系ヤブカの公衆衛生学的な重要性和、国内のウイルス定着可能性について評価を行うことを目標とした (図 1)。

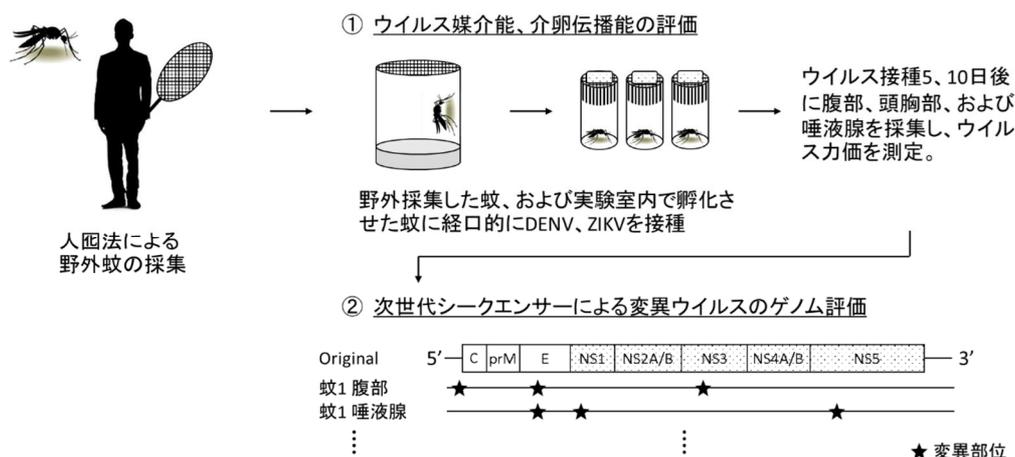


図 1 実験の概要

3. 研究の方法

(1) 野外蚊の採集および飼育

北海道江別市酪農学園大学構内において、捕虫網を用いた人囮法による野外蚊の採集を行った。採集した蚊は形態学的特長により同定し、同定困難なものについては、COI 遺伝子を標的としたシーケンス解析を行った。野外蚊は温度 28℃、湿度 45%、照明サイクル明：暗 = 12 : 12 の条

件下で飼育した。飼育ケースは25ml 自立型チューブあるいは、100ml ビーカーとし、産卵のため濡らした濾紙を入れ、口はメッシュで覆うことで換気、給餌（4%ショ糖溶液）を可能とした。人工吸血にはプラスチックフィルムを用いた人工吸血装置を作成した（図2）。

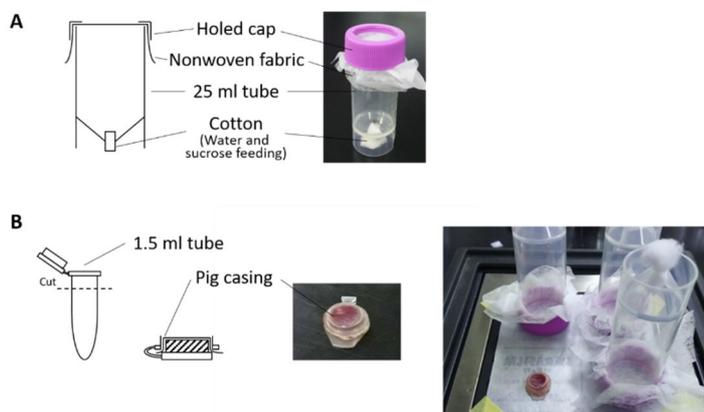


図2 飼育ケース (A) および人工吸血装置 (B)

(2) 蚊体内における DENV、ZIKV 増殖能、媒介能および介卵伝播率の評価

ZIKV PRVABC59 および MR766 株のウイルスストックは、Vero を用い作成し、ウイルス力価は抗フラビウイルスモノクローナル抗体 (12D11/7E8) を用いたフォーカス法により行った。蚊へのウイルス接種実験は成虫蚊の逃亡を防ぐため、図 2 のような One-way 方式の個別飼育下で実施した。野外採集した蚊を個別飼育ケースに移し、 10^6 FFU/ml に調整した ZIKV PRVABC59 または MR766 株を含む馬保存血液を、吸血装置を用いて蚊に経口接種した。ウイルス感染 5、10 日後に飼育ケースごと冷凍庫に入れることで蚊を殺し、腹部、脚・翅部、頭・胸部に分け、フォーカス法によりウイルス力価を定量した。

上記のように ZIKV を経口感染させた蚊より、ピロカルピン塩酸塩を満たしたマイクロキャピラリーを用い、唾液の採集を行った。採集した唾液より RNA を抽出し、リアルタイム PCR によりウイルス RNA の検出を行った。

(3) 次世代シーケンサーを用いた蚊体内の変異ウイルスの評価

上記の方法により作出したウイルス感染蚊の腹部、脚・翅部、頭・胸部から抽出した RNA を鋳型とし、ZIKV のゲノム全領域をターゲットとしたオーバーラッピング逆転写 PCR を行った。PCR 産物は定量後、Nextera XT DNA Library Preparation Kit を用い断片化、インデックス付加を行い、精製後、MiSeq Reagent Kit v3 による 300bp x 2 ペアエンドシーケンスに供試した。得られた Fastq データは解析ソフト CLC Genomics workbench を用いリファレンス配列に対しマッピングし、Covelage > 1,000、変異率 > 1% でバリエーション解析を行った。

4. 研究成果

(1) ミスジシマカ、チシマヤブカおよびヤマトヤブカにおける ZIKV 感受性

合計 715 匹 (3 属、7 種) の野外蚊が採集され、これらに対し ZIKV PRVABC59 株の経口感染を試み、ミスジシマカ、チシマヤブカおよびヤマトヤブカをウイルス感受性評価に共試した。それぞれの蚊の人工吸血装置からの吸血率はそれぞれ 30.3%、22.8% および 25.4% であった。ミスジシマカ (n=23) では感染 2、5 日後の腹部、および感染 10 日後の頭・胸部でウイルスが検出された。また、ヤマトヤブカ (n=23) では感染 10 日後の腹部でウイルスが検出された。一方、チシマヤブカ (n=25) ではいずれの日数、部位においてもウイルスは検出されなかった。

なお、研究当初の計画では介卵伝播能を評価する予定であったが、感染成立する蚊が予想以上に少なかったことに加え、上記の手法では産卵率が極め低く、また孵化が見られなかったことより、介卵伝播能の評価は断念した。

(2) ヤマトヤブカとヒトスジシマカ、ネッタシマカにおける ZIKV 感受性比較

続けて、最も採集数の多かったヤマトヤブカについて、ZIKV の一般的なベクターであるヒトスジシマカおよびネッタシマカとの ZIKV MR766 株感受性比較を行った (図 3)。ヤマトヤブカ、ヒトスジシマカおよびネッタシマカの感染率 (感染 7 日以降、体のいずれかの部位よりウイルスが検出された率) は、それぞれ 18.2% (n=4/22)、66.7% (n=10/15)、71.4% (n=5/7) であり、播種率 (感染 14 日以降、脚・翅部または頭・胸部よりウイルスが検出された率) は、それぞれ 60.0% (n=3/5)、71.4% (n=5/7)、66.7% (n=2/3) であった。Fisher の正確確率検定では、ヤマトヤブカが他二種に比べ有意に低い感染率が示されたが、播種率について有意差は見られなかった。

いずれの蚊種においても、推定ウイルス量 (感染 0 日目より算出) を大きく上回るウイルスが検出されたことから、検出されたウイルスは体内に残存した摂取ウイルスではなく、新たに蚊体内で増殖したウイルスであることが明らかとなった。ヤマトヤブカでは摂取ウイルス量の 1,000

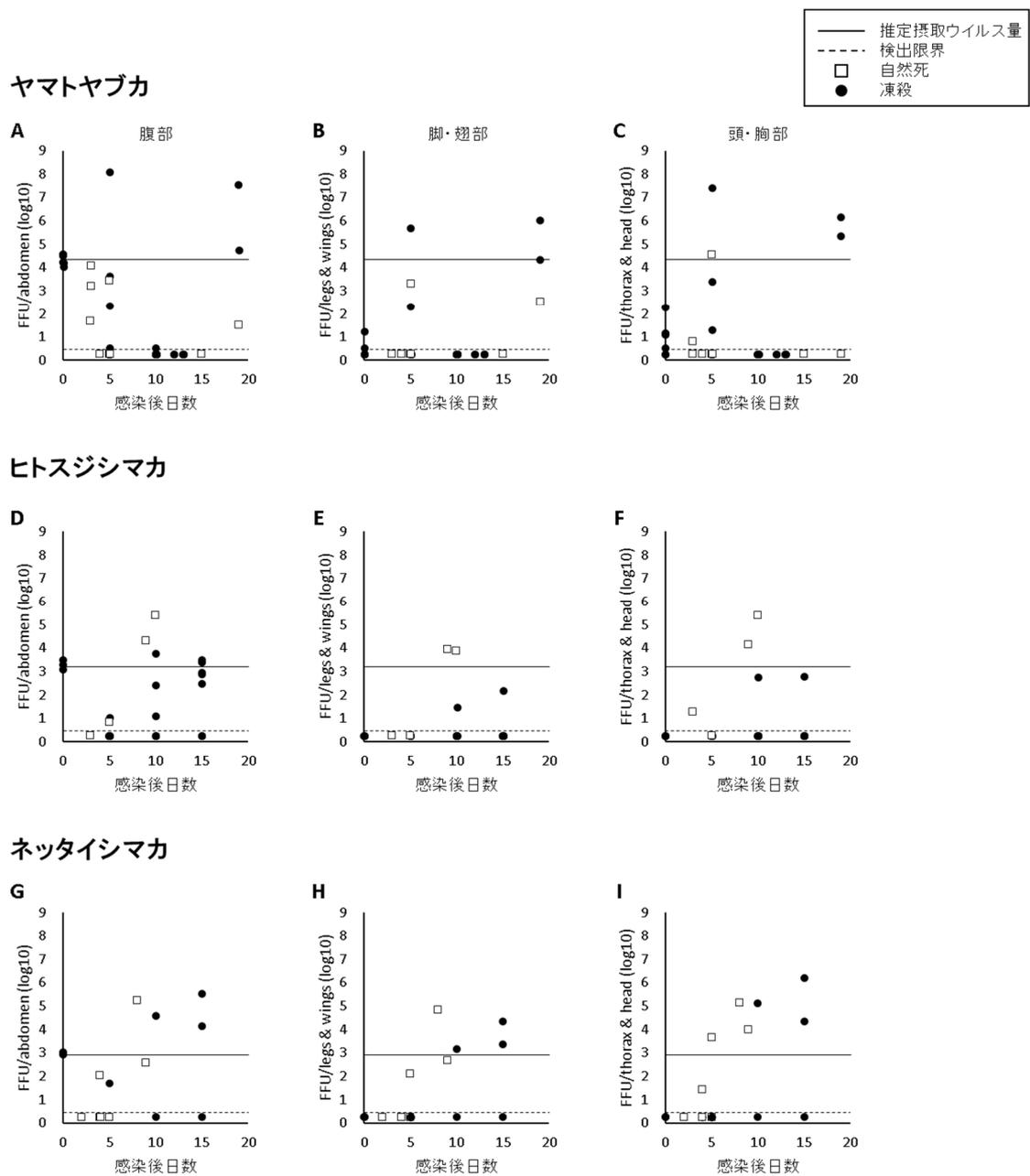


図3 ヤマトヤブカ、ヒトスジシマカ、ネッタイシマカ体内におけるZIKV量

倍を超えるウイルス量が検出された個体もあり、ウイルス増殖能についてヒトスジシマカおよびネッタイシマカと同程度あるいはそれ以上と考えられる。

(3) ヤマトヤブカ唾液中のウイルス排出

ヤマトヤブカにおけるZIKV媒介能を評価するため、ウイルス感染蚊より唾液を採集し、リアルタイムPCRによりウイルスRNAの検出を試みた。その結果、感染5、10日後において、それぞれ20.0% (n=4/20)、19.0% (n=4/21)の蚊の唾液からウイルスRNAが検出された。ヤマトヤブカの唾液中にウイルスが検出されたことより、同蚊がZIKVを媒介可能である可能性が高いと考えられる。

(4) 蚊体内で生じるウイルス変異

ネッタイシマカ、ヒトスジシマカおよびヤマトヤブカ体内で増殖したZIKV MR766株において、ウイルスゲノム上の計417カ所に1%以上の頻度で遺伝子変異が認められた(一塩基多型、挿入、欠損等)。この内、全ての蚊種に共通するOpen reading frame (ORF)上の一塩基多型は14カ所であり、さらに3カ所がアミノ酸置換を伴う非同義置換であっ

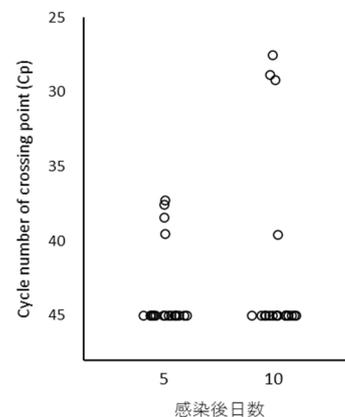


図4 蚊唾液中のウイルス量

た(表1)。

表1 蚊体内で増殖したウイルスに見られる ORF 中の 1%以上の変異力所の数

	変異力所の数(その内、非同義置換の数)									
	C	prM	E	NS1	NS2A	NS2B	NS3	NS4A	NS4B	NS5
Input (接種ウイルス)	0 (0)	0 (0)	12 (6)	6 (3)	3 (1)	2 (0)	66 (5)	2 (1)	4 (1)	9 (2)
ネッタイシマカ	0 (0)	1 (0)	11 (5)	1 (1)	3 (1)	5 (1)	48 (9)	2 (0)	3 (1)	30 (15)
ヒトスジシマカ	2 (1)	3 (2)	18 (9)	4 (1)	4 (2)	3 (0)	9 (1)	1 (0)	3 (2)	38 (23)
ヤマトヤブカ	8 (7)	7 (4)	30 (17)	17 (9)	11 (4)	2 (0)	23 (8)	3 (2)	13 (5)	35 (18)
全蚊種共通	0 (0)	0 (0)	6 (2)	1 (0)	0 (0)	1 (0)	3 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (1)

上記の変異率に基づく主成分分析の結果、主成分得点に蚊種、組織ごとのクラスタリングは見られなかったが、感染後日数ごとに若干のクラスター形成が認められた(図5)よって、蚊体内で増殖した ZIKV は蚊種や組織特異的な遺伝子集団は形成しないが、感染日数に伴い集団構造が変化することが示唆された。

全蚊種共通で認められた非同義置換は E 領域の C1431T、T1443C、および NS5 領域の C8783A であった。この内、C1431T、T1443C は経時的に変異率が増加する傾向が認められ、とりわけヤマトヤブカ体内で増殖したウイルスで顕著であった(図6)。C1431T および T1443C はエンベロープタンパクの N-結合型糖鎖修飾を調節するアミノ酸(N-X-S/T)モチーフの一部をコードしており、同領域の糖鎖修飾が ZIKV の蚊に対する適合性に重要な因子であることが示唆された。

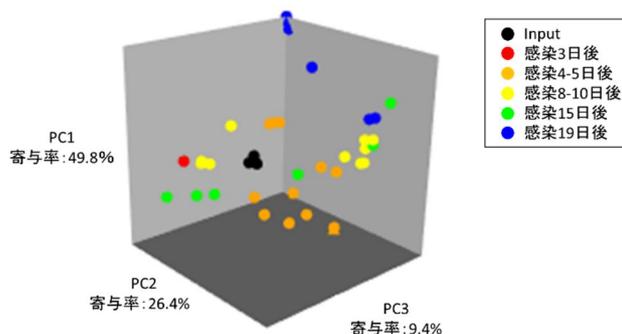


図5 変異率に基づく主成分分析

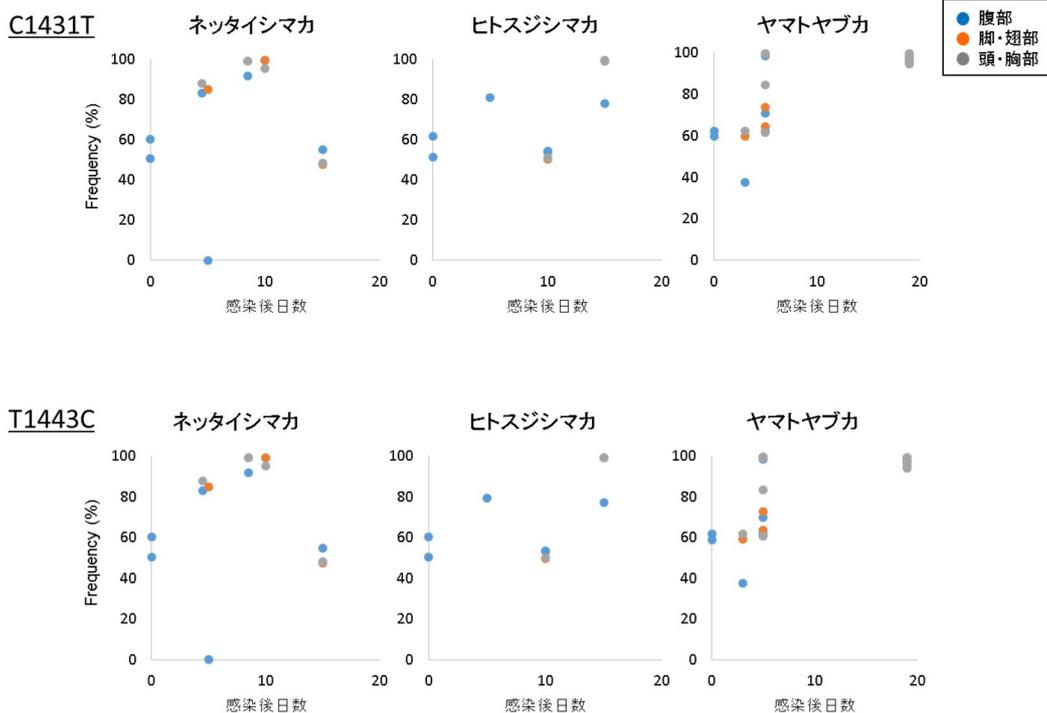


図6 エンベロープ領域における変異率の経時的変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Uchida Leo, Shibuya Miki, Morales-Vargas Ronald Enrique, Hagiwara Katsuro, Muramatsu Yasukazu	4. 巻 10
2. 論文標題 Zika Virus Potential Vectors among Aedes Mosquitoes from Hokkaido, Northern Japan: Implications for Potential Emergence of Zika Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 938 ~ 938
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pathogens10080938	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 該当する

1. 著者名 Shimooka Makoto, Sakurai Yoshimi, Muramatsu Yasukazu, Uchida Leo	4. 巻 12
2. 論文標題 Isolation and Characterization of Mosquito-Associated Spiroplasma cantharicola from Aedes japonicus Collected in Hokkaido, Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Insects	6. 最初と最後の頁 1056 ~ 1056
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/insects12121056	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 内田玲麻、櫻井愛美、村松康和
2. 発表標題 北海道のヤブカにおけるアルボウイルスの検索
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三木要、岩本夏奈、江下優樹、大場靖子、澤洋文、村松康和、内田玲麻
2. 発表標題 ヤマトヤブカ体内におけるジカウイルスのQuasispecies評価
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川江詩乃、岩本夏奈、江下優樹、大場靖子、澤洋文、村松康和、内田玲麻
2. 発表標題 北海道産ヤマトヤブカにおけるジカウイルス感受性の評価
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Leo Uchida, Ronald Enrique Morales-Vargas, Katsuro Hagiwara, Yasukazu Muramatsu, Yuki Eshita, Yasuko Orba, Hirofumi Sawa
2. 発表標題 Zika Virus Potential Vectors among Aedes Mosquitoes from Northern Japan
3. 学会等名 Joint International Tropical Medicine Meeting (JITMM) Virtual 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
研究協力者	モラレス - バルガス ロナルド エ ンリケ (Morales-Vargas Ronald Enrique)	マヒドン大学・Department of Medical Entomology, Faculty of Tropical Medicine・Associate professor	
研究協力者	江下 優樹 (Eshita Yuki)	北海道大学・人獣共通感染症国際共同研究所・招へい教員	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
タイ	Mahidol University			