

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21298

研究課題名（和文）昆虫特異的ウイルスによるアルボウイルス制御

研究課題名（英文）Control of arbovirus infection by Insect-specific virus

研究代表者

大場 靖子（Orba, Yasuko）

北海道大学・人獣共通感染症国際共同研究所・准教授

研究者番号：60507169

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、蚊と共存し病原性の無い昆虫特異的ウイルスが、ヒトに伝播し感染症の原因となる蚊媒介性ウイルスが蚊に同時に感染した際に、増殖伝播に及ぼす影響を明らかにすることを目的としている。我々がこれまでに蚊から単離した2種類の昆虫特異的ウイルスの性状を明らかにし、蚊への感染系を確立した。これらのウイルスが、培養細胞および媒介蚊成体においてデングウイルス2型の増殖に与える影響を検証した結果、今回用いたウイルスはデングウイルスの蚊成体内での増殖に影響を与えずに共存して増殖可能であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蚊などの節足動物が媒介しヒトや動物に感染症を起こすデング熱等のウイルス感染症の多くは、未だ予防法や治療法が確立しておらず、媒介蚊の対策が最も重要である。本研究は、媒介蚊に共存し病原性の無いウイルスの存在と性状を明らかにし、蚊の中でデングウイルス等の病原性ウイルスの増殖を抑制する方法を検証するものである。媒介蚊を自然界から排除するのは困難であり、蚊に感染する様々なウイルスの特性を理解し利用することで、環境に配慮した蚊媒介性ウイルス感染症の予防策を見出す研究である。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to clarify the effects of non-pathogenic insect-specific viruses that co-exist with mosquitoes on replication and transmission when mosquitoes are simultaneously infected with mosquito-borne viruses that cause infectious diseases. Using two types of insect-specific viruses which we have isolated from mosquitoes, we investigated the effects of these viruses on the growth of dengue virus type 2 in cultured cells and adult mosquito vectors. The results indicated that the infection rate and viral replication of dengue virus 2 were not affected by co-infection with these insect-specific viruses in adult *Aedes albopictus* mosquitoes.

研究分野：ウイルス学

キーワード：蚊媒介性ウイルス 昆虫特異的ウイルス 蚊

1. 研究開始当初の背景

昆虫特異的ウイルスであるネジェウイルス群は、世界各地の蚊やサシチョウバエから同定されている 1 本鎖(+)RNA ウィルスで、新たな分類群として提唱されている未分類のウイルス群である。ネジェウイルス群のウイルスはアメリカ、ヨーロッパ、アフリカ、アジアの世界各地の蚊やサシチョウバエから見つかっており、世界的に分布する昆虫特異的ウイルスと考えられるが、ウイルスの病原性や存在意義に関してはいまだ不明である。ネジェウイルス群のみならず、蚊には多くのウイルス種が存在しており、そのほとんどはヒトや動物に感染性が無く病原性を示さないものと考えられる。

こうした自然界に存在する非病原性ウイルスを以って病原性ウイルスを制する可能性を検証し、蚊に常在し動物に病原性の無いウイルスの存在を生かし、蚊の生態系を変えること無く病原性ウイルスの伝播を減らすことで、感染症の流行を阻止するという対策案に繋がる研究として本研究を実施した。

2. 研究の目的

蚊などの節足動物が媒介しヒトや動物に感染症を起こすアルボウイルス感染症の多くは、未だ特異的予防法や治療法が確立しておらず、媒介蚊の防蚊対策が最も重要であり、生態系を考慮した効率的な防蚊対策が求められている。

本研究では、蚊と共存し病原性の無い昆虫特異的ウイルスが、蚊に同時に感染したアルボウイルスの増殖に及ぼす影響を明らかにする。昆虫特異的ウイルス感染蚊によるアルボウイルス制御法の可能性を示し、蚊媒介性ウイルス感染症の予防策に繋げることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 蚊に感染している昆虫特異的ウイルスの単離と性状解析。

ss(+)RNA ウィルスであるネジェウイルス群のロレトウイルス(LORV)

新規の未分類 ss(+)RNA ウィルスである Hatsudai Tombus-like virus (TLV)

(2) 蚊由来培養細胞(ヒトスジシマカ由来 C6/36 細胞)において、昆虫特異的ウイルスとの共感染が各種アルボウイルス増殖効率に及ぼす影響を解析した。

(3) 各種継代蚊成体 (*Aedes albopictus*, *Aedes aegypti*, *Culex pipiens*) への感染系の確立と、蚊成体における昆虫特異的ウイルス共感染が各種アルボウイルス増殖効率に及ぼす影響を解析した。

4. 研究成果

(1) 蚊に感染している昆虫特異的ウイルスの単離と性状解析

ss(+)RNA ウィルスであるネジェウイルス群のロレトウイルス(LORV)

ボリビアに生息する *Psorophora* 属の蚊のライセトを、蚊由来細胞である C6/36 細胞に接種し、数日後に細胞変性(CPE)を認めた培養上清を継代し、上清中の RNA を次世代シーケンサー(NGS)にて解析した結果、LORV を同定した。C6/36 細胞で増殖させた LORV を用いて各種の感染実験を実施した。

LORV は蚊由来 C6/36 細胞において増殖効率が非常に高く、感染後 12 時間から 24 時間で CPE が見られた。

LORV をモルモットに接種し、ウイルスタンパク質を検出する為の抗体を作出した。LORV 抗血清を用いて、感染細胞におけるウイルスタンパク発現を検討した結果、感染後 12 時間でほぼすべての C6/36

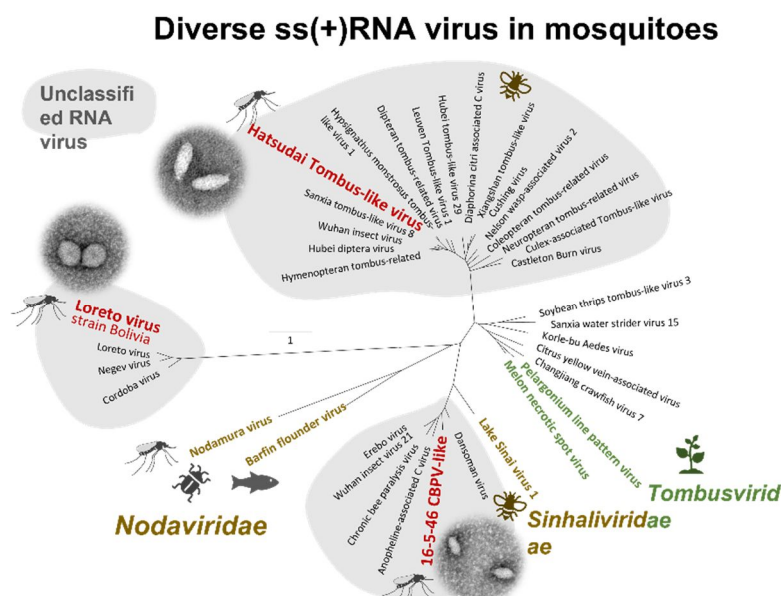


図1 蚊から単離された RNA ウィルス

細胞の細胞質にウイルス抗原が陽性であった。

培養上清中の LORV をショ糖密度勾配により分画精製し、ウイルス粒子を電子顕微鏡で観察した結果、50 nm 程度の楕円形のウイルス粒子を確認した (図 1)。

新規の未分類 ss(+)RNA ウイルスである Hatsudai Tombus-like virus (TLV)

日本の初台由来のヒトスジシマカ継代株を用いて RNA-seq 解析を実施した際に、約 2 kb の RNA ウイルス様の遺伝子が 2 種類検出された。蚊のライセトを、C6/36 細胞に接種しウイルス単離を試みた結果、CPE が見られた細胞上清において、上記の RNA ウイルス遺伝子を同定した。このウイルスは未分類の ss(+)RNA ウイルスと考えられ、2,303 nt と 1,959 nt の 2 つのセグメントから成る RNA ゲノムを保有していた。昆虫等で見つかっている Tombusvirus に近縁と考えられた為、一時的な名称を Hatsudai Tombus-like virus (TLV) とした。ウイルス感染細胞上清をショ糖密度勾配により分画精製し、ウイルス粒子を電子顕微鏡で観察した結果、50 nm 程度の楕円形の一端に特徴的な形状を持つウイルス粒子を確認した (図 1)。

(2) 蚊由来培養細胞 (ヒトスジシマカ由来 C6/36 細胞) において、昆虫特異的ウイルスとの共感染が各種アルボウイルス増殖効率に及ぼす影響

LORV (100 or 10TCID₅₀/ml) と、フラビウイルス属のジカウイルス (ZIKV) 又はデングウイルス 2 型 (DENV2) (5 × 10⁵ FFU/ml) を、同時又は単独で C6/36 細胞に感染させ、24 時間後、48 時間後に細胞上清を回収し、上清中のウイルスカ価又はウイルスコピー数を qRT-PCR により測定した。その結果、ZIKV 又は DENV2 の 48 時間後のウイルス量は、単独感染時と比べて LORV と共感染させた際に増殖量が低下した。一方 LORV のウイルスゲノム量は、ZIKV、DENV2 との共感染による増殖への影響は見られなかった (図 2)。

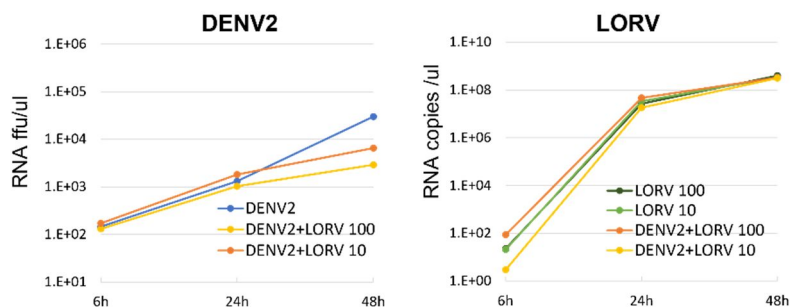


図 2 C6/36 細胞における LORV と DENV2 の共感染

TLV (2 × 10⁴ TCID₅₀ /ml) と DENV2 (2 × 10⁵ pfu /ml) を単独または同時に C6/36 細胞へ感染させ、24 時間おきに 96 時間までの細胞上清を回収し、各ウイルス量を解析した。その結果、DENV2 のウイルス量は、DENV2 単独感染時に比べて共感染時に若干の増殖量の低下が見られた。TLV の増殖は、DENV2 との共感染により顕著にウイルス量が低下した。TLV 増殖は培養細胞において、DENV2 共感染の影響を受けることが判明した。

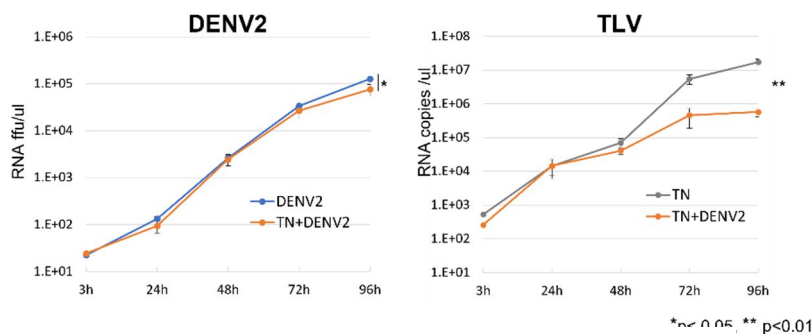


図 3 C6/36 細胞における TLV と DENV2 の共感染

(3) 各種継代蚊成体 (*Aedes albopictus*, *Aedes aegypti*, *Culex pipiens*) への感染系の確立と、蚊成体における昆虫特異的ウイルス共感染が各種アルボウイルス増殖効率に及ぼす影響を解析

LORV の成虫蚊、又は幼虫での増殖形態を明らかにするため、in vivo 感染実験を実施した。ヒトスジシマカ、ネッタシマカ、アカイエカの成虫継代蚊に LORV を人口吸血により感染させ、2 週間後の各蚊個体での LORV 感染を qRT-PCR で解析した結果、ヒトスジシマカ、ネッタシマカで感染率が高く、ウイルスコピー数は多くの個体で 10⁸ コピー以上であった。また、ネッタシマカ幼虫への LORV 感染実験の結果、幼虫への感染はほとんど認められず、LORV がシマカ成虫で効率的に増殖することが判明した。

ヒトスジシマカを用いた LORV 感染系を用いて、LORV が蚊成体内で、DENV2 と共感染した際のウイルス増殖への影響を検討した。ウマ血液に LORV (1 × 10⁹ /ml) および DENV2 (1 × 10⁷ /ml) を単独又は両方を加えて人口吸血装置により雌蚊 (各群 25 匹) に感染させ、2 週間後に生存蚊の各個体におけるウイルス量を qRT-PCR により測定した。

その結果、LORV との共感染による DENV2 の感染率、および共感染した個体の DENV2 ゲノム量は、DENV2 感染単独の蚊と比較し顕著な差が認められなかった。このことから、蚊由来細

胞での LORV 共感染による DENV2 増殖抑制の結果と異なり、蚊成体内では、双方のウイルスが共存し増殖し得ることが明らかとなった（図 4）。

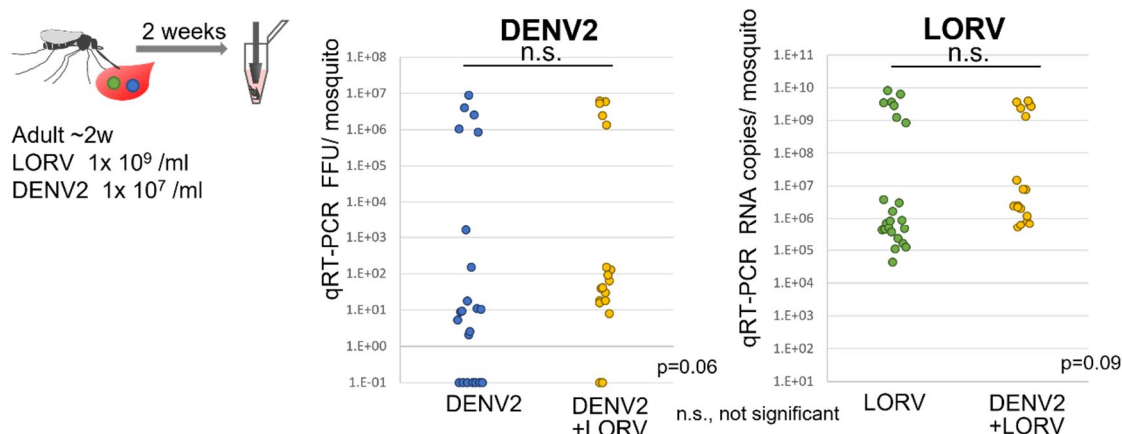
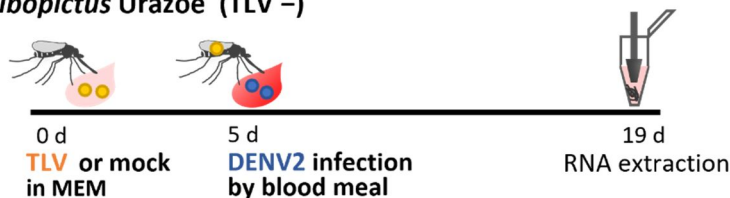


図 4 ヒトスジシマカにおける LORV と DENV2 の共感染

TLV は継代飼育ヒトスジシマカ（初台株）に常在していることが判明したことから、日本の沖縄および京都で採集したヒトスジシマカでの TLV 感染を調査した。その結果、沖縄および京都で採集したヒトスジシマカから TLV は検出されなかった。ヒトスジシマカにおいて、TLV 感染が DENV 増殖に与える影響を検証する為、TLV が感染していない沖縄由来ヒトスジシマカ（浦添株）の継代飼育株を樹立し、TLV と DENV の共感染実験を実施した。ヒトスジシマカ（浦添株）に TLV を経口感染後 5 日目に DENV2 を人口吸血により感染させた群と、DENV2 単独感染群の DENV2 感染 2 週間後のウイルス量を各個体で検証した。その結果、TLV 及び DENV2 感染率共に、単独感染時に比べて、共感染時の感染率とウイルスゲノム量に顕著な差は見られなかった。これらの結果から、ヒトスジシマカ成体内において、TLV は DENV2 と共感染が可能であり、共存による双方のウイルス増殖に明らかな影響がないことが判明した。

Ae. albopictus Urazoe (TLV -)



Representative result of qRT-PCR using Urazoe (TLV -)

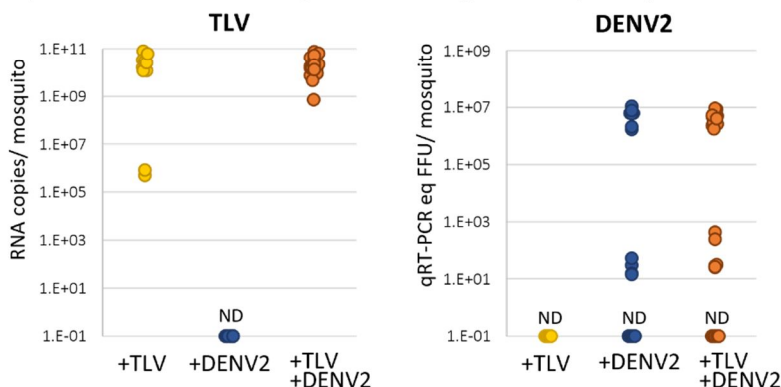


図 5 ヒトスジシマカ(浦添株)における TLV と DENV2 の共感染

これらの結果から、今回検証した昆虫特異的ウイルスである LORV と TLV に関しては、培養細胞を用いた in vitro での結果とは異なり、蚊成体内においては DENV2 の増殖に顕著な影響を与えず、双方のウイルスが共存し増殖し得ることが明らかとなった。今後、LORV と TLV の他のアルボウイルスへの影響や、他の昆虫特異的ウイルスを用いた in vivo でのウイルス増殖への影響を検証する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 10件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Chambaro Herman M., Hirose Kazuyo, Sasaki Michihito, Libanda Brigadier, Sinkala Yona, Fandamu Paul, Muleya Walter, Banda Fredrick, Chizimu Joseph, Squarre David, Shawa Misheck, Qiu Yongjin, Harima Hayato, Eshita Yuki, Simulundu Edgar, Sawa Hirofumi, Orba Yasuko	4. 巻 16
2. 論文標題 An unusually long Rift valley fever inter-epizootic period in Zambia: Evidence for enzootic virus circulation and risk for disease outbreak	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Neglected Tropical Diseases	6. 最初と最後の頁 e0010420
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pntd.0010420	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 Tabata Koshiro, Itakura Yukari, Toba Shinsuke, Uemura Kentaro, Kishimoto Mai, Sasaki Michihito, Harrison Jessica J., Sato Akihiko, Hall William W., Hall Roy A., Sawa Hirofumi, Orba Yasuko	4. 巻 616
2. 論文標題 Serological characterization of lineage II insect-specific flaviviruses compared with pathogenic mosquito-borne flaviviruses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 115 ~ 121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.05.080	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 Mubemba B, Mburu MM, Changula K, Muleya W, Moonga LC, Chambaro HM, Kajihara M, Qiu Y, Orba Y, Hayashida K, Sutcliffe CG, Norris DE, Thuma PE, Ndubani P, Chitanga S, Sawa H, Takada A, Simulundu E.	4. 巻 16(2)
2. 論文標題 Current knowledge of vector-borne zoonotic pathogens in Zambia: A clarion call to scaling-up "One Health" research in the wake of emerging and re-emerging infectious diseases.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS Negl Trop Dis.	6. 最初と最後の頁 e0010193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pntd.0010193.	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 Velu RM, Kwenda G, Libonda L, Chisenga CC, Flavien BN, Chilyabanyama ON, Simunyandi M, Bosomprah S, Sande NC, Changula K, Muleya W, Mburu MM, Mubemba B, Chitanga S, Tembo J, Bates M, Kapata N, Orba Y, Kajihara M, Takada A, Sawa H, Chilengi R, Simulundu E.	4. 巻 10(8)
2. 論文標題 Mosquito-Borne Viral Pathogens Detected in Zambia: A Systematic Review.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 1007
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pathogens10081007.	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 Harima H, Orba Y, Torii S, Qiu Y, Kajihara M, Eto Y, Matsuta N, Hang'ombe BM, Eshita Y, Uemura K, Matsuno K, Sasaki M, Yoshii K, Nakao R, Hall WW, Takada A, Abe T, Wolfinger MT, Simuunza M, Sawa H.	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 An African tick flavivirus forming an independent clade exhibits unique exoribonuclease-resistant RNA structures in the genomic 3'-untranslated region.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 4883
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-84365-9.	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 Orba Yasuko, Matsuno Keita, Nakao Ryo, Kryukov Kirill, Saito Yumi, Kawamori Fumihiko, Loza Vega Ariel, Watanabe Tokiko, Maemura Tadashi, Sasaki Michihito, Hall William W., Hall Roy A., Pereira Juan Antonio, Nakagawa So, Sawa Hirofumi	4. 巻 102
2. 論文標題 Diverse mosquito-specific flaviviruses in the Bolivian Amazon basin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of General Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jgv.0.001518	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 該当する

1. 著者名 Runtuwene LR, Kawashima S, Pijoh VD, Tuda JSB, Hayashida K, Yamagishi J, Sugimoto C, Nishiyama S, Sasaki M, Orba Y, Sawa H, Takasaki T, James AA, Kobayashi T, Eshita Y.	4. 巻 21(20)
2. 論文標題 The Lethal(2)-Essential-for-Life [L(2)EFL] Gene Family Modulates Dengue Virus Infection in <i>Aedes aegypti</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 7520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21207520	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 該当する

1. 著者名 Wastika CE, Harima H, Sasaki M, Hang'ombe BM, Eshita Y, Qiu Y, Hall WW, Wolfinger MT, Sawa H, Orba Y.	4. 巻 12(9)
2. 論文標題 Discoveries of Exoribonuclease-Resistant Structures of Insect-Specific Flaviviruses Isolated in Zambia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 1017
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v12091017	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 Chambaro HM, Sasaki M, Simulundu E, Silwamba I, Sinkala Y, Gonzalez G, Squarre D, Fandamu P, Lubaba CH, Munyeme M, Maseko A, Chimwewe C, Mataa L, Mooya LE, Mukubesa AN, Harima H, Samui KL, Munang'andu HM, Simuunza M, Nalubamba KS, Qiu Y, Carr MJ, Hall WW, Eshita Y, Sawa H, Orba Y.	4. 巻 12(9)
2. 論文標題 Co-Circulation of Multiple Serotypes of Bluetongue Virus in Zambia. Viruses.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 963
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v12090963	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 Torii S, Orba Y, Sasaki M, Tabata K, Wada Y, Carr M, Hobson-Peters J, Hall RA, Takada A, Fukuhara T, Matsuura Y, Hall WW, Sawa H.	4. 巻 295(23)
2. 論文標題 Host ESCRT factors are recruited during chikungunya virus infection and are required for the intracellular viral replication cycle.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 7941-7957
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.012303	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 大場靖子、澤洋文、松野啓太	4. 巻 70
2. 論文標題 節足動物媒介性ウイルス (アルボウイルス)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ウイルス	6. 最初と最後の頁 3-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田畑耕史郎、江下優樹、佐々木道仁、澤洋文、大場靖子
2. 発表標題 蚊特異的フラビウウイルスの蚊成体における感染動態の解析
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大場 靖子、田畑 耕史郎、佐々木 道仁、澤 洋文、江下 優樹
2. 発表標題 継代飼育ヒトスジシマカに存在する昆虫特異的ウイルスの単離とアルボウイルス感染への影響
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大場 靖子
2. 発表標題 地球規模で広がる蚊媒介ウイルス感染症の対策に向けて
3. 学会等名 山口大学 中高温微生物研究センター発酵微生物部門シンポジウム「未来を拓くバイオSDGs」（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田畑耕史郎、板倉友香里、岸本麻衣、佐々木道仁、澤洋文、大場靖子
2. 発表標題 蚊特異的フラビウウイルス抗体の脊椎動物感染性フラビウウイルスへの反応性解析
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 河岡 義裕、岩見 真吾、大場 靖子、川口 寧、佐藤 佳、澤 洋文、鈴木 信弘、高橋 英樹、朝長 啓造、中川 草、長崎 慶三、西浦 博、野田 岳志、古瀬 祐気、堀江 真行、牧野 晶子、松浦 善治、松野 啓太、村田 和義、望月 智弘、渡辺 登喜子	4. 発行年 2021年
2. 出版社 集英社	5. 総ページ数 320
3. 書名 ネオウイルス学	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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			
アイルランド	国立アイルランド大学ダブリン校			
ザンビア	ザンビア大学獣医学部			
ボリビア	Gabriel Rene Moreno大学獣医学部			
オーストラリア	Queensland大学			
米国	ウイスコンシン大学			